

**PENGARUH PH EKSTRAK BUAH BAKAU *Rhizophora mucronata*
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM α -GLUKOSIDASE**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Oleh:
MUTIARA WARDA SYAMSYAH
NIM. 115080300111005**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**PENGARUH PH EKSTRAK BUAH BAKAU *Rhizophora mucronata*
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM α -GLUKOSIDASE**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

**Oleh :
MUTIARA WARDA SYAMSYAH
NIM. 115080300111005**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

SKRIPSI

PENGARUH PH EKSTRAK BUAH BAKAU *Rhizophora mucronata*
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM α -GLUKOSIDASE

Oleh :

MUTIARA WARDA SYAMSYAH
NIM. 115080300111005

telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 4 Maret 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. : _____
Tanggal : _____

Dosen Penguji I,



Dr. Ir. Dwi Setijawati, M. Kes
NIP. 19611022 198802 2 001
Tanggal : 08 APR 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I,



Dr. Ir. Hardoko, MS
NIP. 19620108 199802 1 001
Tanggal : 08 APR 2016

Dosen Penguji II,



Dr. Ir. Yahya, MP
NIP. 19630706 199003 1 005
Tanggal : 08 APR 2016

Dosen Pembimbing II,



Dr. Ir. Bambang Budi S. MS
NIP. 19570119 198601 1 001
Tanggal : 08 APR 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Dr. Ir. Arning Widiyeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal : 08 APR 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 4 Maret 2016
Mahasiswa

MUTIARA WARDA SYAMSYAH
NIM. 115080300111005



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT atas rahmat-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan laporan ini.
2. Ibunda dan Ayahanda tercinta atas dorongan yang kuat, kebijaksanaan dan do'a yang selalu menyertai setiap langkah tujuan hidup penulis.
3. Bapak Dr. Ir. Hardoko, MS dan Bapak Dr. Ir. Bambang Budi S, MS selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam mengerjakan laporan ini, serta atas bantuan dana selama penelitian.
4. Ibu Dr. Ir. Dwi Setijawati, MS dan Bapak Dr. Ir. Yahya, MP selaku Dosen Penguji yang telah banyak memberikan masukan untuk terselesaikannya laporan ini.
5. Ibu Yunita E.P, Mas Nunu, Bangun, Yuyun, Ayus, Astri yang senantiasa membantu selama proses penelitian skripsi ini.
6. Untuk dulur-dulur THP angkatan 2011 yang selalu menghangatkan suasana kampus dengan canda tawa yang membuat penulis tidak bisa tidur malam.
7. Keluarga eks. Duack (Hilda, Zaskia, Sita, Hagejo) yang selalu menemani dan memberi semangat bagi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini
8. Keluarga *Piranha Basketball Team, Buntal Angel Futsal Team, LUKAI Team* (Tim olimpiade THP 2011) yang menyisahkan kenangan indah dengan canda, tawa,dan semangat yang berkobar-kobar menghidupkan jiwa muda penulis.
9. Mas Rizaq, Wulan, Udin, Fikri, Fandi, Rizki, Erisa, Afror, Alya, Dewi, Shindy sebagai teman penghibur penulis disaat penat dan bosan.

Malang, 4 Maret 2016

Penulis



RINGKASAN

MUTIARA WARDA SYAMSYAH (NIM 1150803001110005). Skripsi tentang Pengaruh pH Ekstrak Buah Bakau *Rhizophora mucronata* Tua terhadap Aktivitas Enzim α -Glukosidase (Di bawah bimbingan **Dr. Ir Hardoko, MS** dan **Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS**)

Diabetes Militus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolisme lemak, protein, karbohidrat. Pengujian senyawa aktif dalam menghambat aktivitas metabolisme glukosa dapat dilakukan secara *in-vitro* dengan menggunakan enzim α -glukosidase. Enzim α -glukosidase bertanggung jawab atas hidrolisis poli dan oligosakarida menjadi monomer atau pembelahan ikatan antara gula dan aglikon nonkarbohidrate yang terdapat pada batas pertemuan (*brust border*) sel usus. Inhibitor α -glukosidase merupakan inhibitor glukosidase telah diusulkan sebagai pengobatan untuk penyakit DM tipe 2 karena bekerja dengan pencernaan karbohidrat. Ekstrak buah *R. mucronata* mengandung senyawa polifenol yang dapat menghambat aktivitas enzim α -glukosidase salah satunya tanin. Senyawa tanin dapat berikatan dengan protein maupun karbihidrat menjadi senyawa kompleks sehingga sukar dicerna. Dengan kata lain, tanin mampu memperlambat metabolisme karbohidrat dan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* terhadap aktivitas enzim α -glukosidase, total fenol, total tanin, serta total tanin terkondensasi. Perlakuan yang digunakan terdiri atas enam perlakuan derajat keasaman pada sampel ekstrak, yakni R (tanpa perlakuan), pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8. Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dan RAL sederhana dengan tiga kali ulangan.

Berdasarkan penelitian ini, pengaruh perlakuan pH ekstrak buah *R. mucronata* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap aktivitas enzim α -glukosidase, total fenol, total tanin, dan total tanin terkondensasi. Perlakuan pH 5 pada ekstrak buah *R. mucronata* merupakan pH optimum dalam menginhibisi enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} terendah yakni sebesar 2,396 ppm dan diikuti oleh ekstrak pH 6, pH 7, pH 8, pH 4, tanpa perlakuan pH (R) dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 2,602 ppm, 2,745 ppm, 2,938 ppm, 2,990 ppm, 3,092 ppm. Sebagai pembanding kemampuan ekstrak dalam menghambat enzim α -glukosidase digunakan serta pengujian pada sampel acarbose. Hasil yang ditunjukkan acarbose dalam menginhibisi enzim α -glukosidase sebesar 13,9 ppm. Nilai total fenol yang didapatkan dari ekstrak R, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, dan pH 8 berturut-turut sebesar 3603,24; 4638,74; 4300,77; 4203,55; 4103,24; 3431,17 (mg GAE/100 g). Untuk nilai total tanin ekstrak R, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 berturut-turut sebesar 965,28; 1902,01; 1564,81; 1458,33; 1363,42; 921,30 (mg GAE/100 g). Berdasarkan data nilai fenol dan tanin diperoleh nilai optimum pada ekstrak buah *R. mucronata* pH 4. Semakin tinggi pH yang ekstrak, nilai total fenol dan tanin semakin menurun. Pada total tanin terkondensasi ekstrak R, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 berturut-turut sebesar 24074,39; 15187,57; 14734,54; 13819,15; 13,072,65; 11401,52 (mg/100 g). Berdasarkan nilai total tanin terkondensasi, nilai tertinggi diperoleh dari ekstrak R dan terendah diperoleh dari ekstrak pH 8. Tingkat keasaman pada senyawa fenolik dipengaruhi oleh substitusi yang terjadi pada fenol yang menghasilkan struktur yang berbeda.

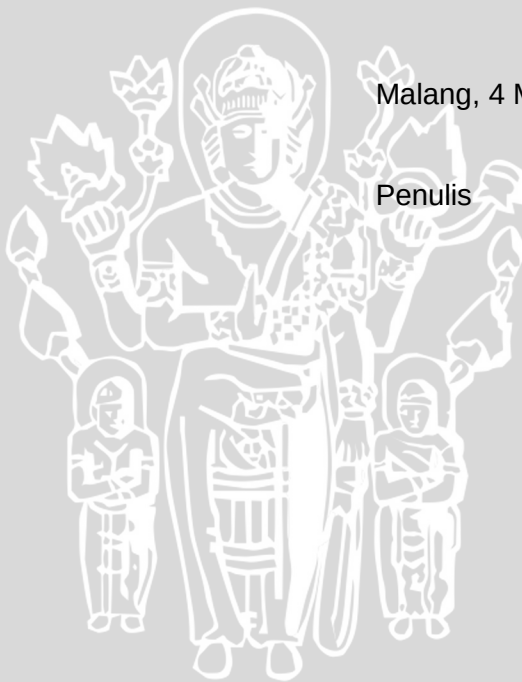
KATA PENGANTAR

Laporan skripsi yang berjudul Pengaruh pH Ekstrak Buah Bakau *R. mucronata* terhadap Aktivitas Enzim α -Glukosidase menyajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* terhadap aktivitas enzim α -glukosidase, pengaruh pH ekstrak terhadap total fenol, total tanin, dan total tanin terkondensasi. Dalam pembuatan laporan ini, penulis mengambil referensi-referensi baik dari buku, internet maupun artikel serta jurnal untuk dijadikan tinjauan pustaka yang dapat mendukung penyusunan laporan ini.

Ibarat pepatah “ tak ada gading yang tak retak “, begitupun laporan ini yang sangat jauh dari sempurna. Untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Dan semoga persembahan sederhana ini dapat bermanfaat bagi para pembaca khususnya bagi mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Malang, 4 Maret 2016

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN UCAPAN TERIMA KASIH	v
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Hipotesis	4
1.5. Kegunaan Penelitian	4
1.6. Waktu dan Tempat	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Buah Bakau Merah (<i>R. mucronata</i>)	5
2.2. Ekstraksi Metode Sonikasi	7
2.3. Tanin	8
2.4. Diabetes Mellitus	12
2.5. Enzim α -glukosidase	13
2.6. Spektrofotometri UV-Vis	16
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1. Materi Penelitian	18
3.1.1. Bahan Penelitian	18
3.1.2. Alat Penelitian	19
3.2. Metode Penelitian	20
3.2.1. Perlakuan dan Rancangan Percobaan	20
3.2.2. Prosedur Percobaan	22
3.2.2.1. Pembuatan Tepung Buah <i>R. mucronata</i>	22
3.2.2.2. Ekstraksi Buah <i>R. mucronata</i>	23
3.2.2.3. Karakterisasi pH pada Sampel Ekstrak	24
3.2.3. Parameter yang Diamati	25
3.2.3.1. Rendemen	25
3.2.3.2. Uji Fitokimia	26
3.2.3.3. Uji Aktivitas Enzim α -Glukosidase	27
3.2.3.4. Total Fenol	29
3.2.3.5. Total Tanin	30
3.2.3.6. Total Tanin Terkondensasi	31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Rendemen	32
4.2. Uji Fitokimia	33
4.3. Pengaruh pH Ekstrak terhadap Aktivitas Enzim α -Glukosidase	34
4.4. Total Fenol	40
4.5. Total Tanin	43
4.6. Total Tanin Terkondensasi	45
5. PENUTUP	48
DAFTAR PUSTAKA	49

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Spektrum tampak dan warna-warna komplementer	17
2.	Model desain RAL sederhana	21
3.	Model desain RAL faktorial	21
4.	Sistem reaksi pencampuran enzimatis α -glukosidase	27
5.	Rendemen tepung dan ekstrak buah <i>R. mucronata</i>	32
6.	Hasil uji fitokimia ekstrak buah <i>R. mucronata</i>	33



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ilustrasi tanaman bakau <i>R. mucronata</i>	6
2. Ciri-ciri buah <i>R. mucronata</i> yang telah matang	6
3. Struktur inti tanin	9
4. Struktur dasar tanin terkondensasi	9
5. Struktur asam galat	10
6. Beberapa struktur senyawa tanin	11
7. Pembuatan tepung buah <i>R. mucronata</i>	23
8. Proses ekstraksi buah <i>R. mucronata</i>	24
9. Hubungan konsentrasi pH ekstrak buah <i>R. mucronata</i> terhadap inhibisi enzim α -glukosidase	35
10. Grafik perubahan IC_{50} ekstrak dalam menginhibisi α -glukosidase	37
11. Grafik perubahan IC_{50} ekstrak dalam menginhibisi α -glukosidase	38
12. Struktur senyawa fenol	40
13. Grafik pengaruh pH ekstrak terhadap total fenol	41
14. Grafik pengaruh pH ekstrak terhadap total tanin	44
15. Grafik pengaruh pH ekstrak terhadap total tanin terkondensasi	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Rendemen Proses Penepungan dan Ekstraksi	55
2. Data % Inhibisi dan IC ₅₀ Ekstrak Terhadap Enzim α -Glukosidase.....	57
3. Hasil Analisis Keragaman Ekstrak Terhadap Enzim α -Glukosidase	60
4. Hasil Analisis Keragaman Ekstrak Terhadap Enzim α -Glukosidase	63
5. Data % Inhibisi dan IC ₅₀ Acarbose Terhadap Enzim α -Glukosidase	64
6. Absorbansi Asam Galat	65
7. Data Total Fenol Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i>	66
8. Hasil Analisis Keragaman Total Fenol Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i>	67
9. Data Total Tanin Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i>	68
10. Hasil Analisis Keragaman Total Tanin Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i>	69
11. Data Total Tanin Terkondensasi Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i>	70
12. Hasil Analisis Keragaman Total Tanin Terkondensasi Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i>	71
13. Penyiapan Larutan Uji Aktivitas Enzim α -Glukosidase	72
14. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i> Berdasarkan Berat Kering	74
15. Gambar Prosedur Kerja Penepungan Buah <i>R. mucronata</i>	75
16. Gambar Pembuatan Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i>	76
17. Gambar Pengujian Aktivitas Enzim α -Glukosidase	77
18. Gambar Pengujian Total Fenol	78
19. Gambar Pengujian Total Tanin	79
20. Gambar Pengujian Total Tanin Terkondensasi	8



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pohon bakau (*Rhizophora sp.*) merupakan tanaman yang berasal dari Asia Timur dan Tenggara yang berpotensi sebagai tanaman obat. Spesies *Rhizophora* yang sering dijumpai yakni *R. mucronata*, *R. mangle* dan *R. apiculat* (Rahim *et al.*, 2008). Masyarakat pesisir telah banyak memanfaatkan tanaman ini untuk pengobatan alami seperti pada bagian kulit kayu, bunga, dan daunnya (Purnobasuki, 2004). *R. mucronata* merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan tanin yang besar terutama di bagian kulitnya (Danarto *et al.*, 2011). Di India kulit batang *R. mucronata* digunakan sebagai terapi penyakit diabetes (Zulkarnaen *et al.*, 2012).

Diabetes mellitus (DM) merupakan gangguan metabolisme akibat ketidakseimbangan homeostasis glukosa, hiperglikemia (kadar gula melebihi batas normal), dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (Ashraf *et al.*, 2015). Pengujian senyawa aktif dalam menghambat aktivitas metabolisme glukosa dapat dilakukan secara *in-vitro* dengan menggunakan enzim α -glukosidase. Febriyanti (2012) menjelaskan bahwa enzim α -glukosidase merupakan enzim karbohidrase yang terletak pada dinding usus halus yang mengkatalis pembebasan dari glukosidase dan dari karbohidrat. Inhibitor α -glukosidase merupakan inhibitor glukosidase telah diusulkan sebagai pengobatan untuk penyakit diabetes melitus tipe 2 karena bekerja dengan pencernaan karbohidrat. Menurut Pujiyanto dan Ferniah (2010), salah satu cara kerja obat antidiabetes adalah menghambat pencernaan karbohidrat kompleks (amilum) menjadi glukosa sehingga asupan glukosa dari usus ke dalam darah dapat dikurangi (Pujiyanto dan Ferniah, 2010). Senyawa bioaktif yang dapat menghambat metabolisme karbohidat, salah satunya adalah tanin.

Tanin merupakan senyawa polipenol yang mempunyai berat molekul tinggi dan mempunyai gugus hidroksil dan gugus lainnya (seperti karboksil) sehingga dapat membentuk kompleks dengan protein dan makromolekul lainnya di bawah kondisi lingkungan (Danarto *et al.*, 2011). Tanin dapat mengikat protein membentuk ikatan kompleks protein tanin sehingga protein tersebut sukar dicerna oleh enzim protease. Tanin juga mempengaruhi metabolisme karbohidrat dengan mengikat pati sehingga sukar dicerna oleh enzim amilase (Tandi, 2010). Tanin banyak terdapat dalam paku-pakuan dan angiospermae terutama pada jenis tumbuhan berkayu (Suseno *et al.*, 2014).

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan manfaat dari tepung buah bakau *R. mucronata* sebagai antidiabetes sebagaimana telah dibahas oleh Sari (2013) dalam skripsinya yang berjudul pengaruh pemberian tepung buah bakau (*R. mucronata*) muda kupas terhadap kadar glukosa darah tikus wistar putih (*rattus norvegicus*). Sedangkan senyawa tanin pada pohon bakau sering dimanfaatkan dalam bidang *furniture* sebagaimana telah dikembangkan oleh Danarto *et al.*, (2011) dalam jurnalnya yang berjudul pemanfaatan tanin dari kulit kayu bakau sebagai pengganti gugus fenol pada resin fenol formaldehid. Senyawa tanin pada pohon bakau masih belum banyak dibahas mengenai fungsinya sebagai antidiabetes. Dari ulasan diatas, peneliti mencoba menggabungkan dua topik tersebut untuk dibahas lebih dalam yakni mengenai pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase secara *in-vitro*.

1.2. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Berapakah pH optimum ekstrak buah *R. mucronata* dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase?

2. Berapakah pH optimum pada perlakuan ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total fenol?
3. Berapakah pH optimum pada perlakuan ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total tanin?
4. Berapakah pH optimum pada perlakuan ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total tanin terkondensasi?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini dibagi menjadi dua, yaitu tujuan khusus dan tujuan umum. Adapun tujuan umum pada penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh perlakuan pH ekstrak buah *R. mucronata* dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Sedangkan tujuan khusus dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk menentukan pH optimum ekstrak buah *R. mucronata* dalam menghambat enzim α -glukosidase.
2. Untuk menentukan perlakuan pH optimum pada ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total fenol.
3. Untuk menentukan perlakuan pH optimum pada ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total tanin.
4. Untuk menentukan perlakuan pH optimum pada ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total tanin terkondensasi.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Diduga pH asam merupakan pH optimum ekstrak buah *R. mucronata* dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.
2. Diduga pH asam merupakan pH optimum ekstrak buah *R. mucronata* yang berpengaruh terhadap total fenol yang dihasilkan.

3. Diduga pH asam merupakan pH optimum ekstrak buah *R. mucronata* yang berpengaruh terhadap total tanin yang dihasilkan.
4. Diduga pH asam merupakan pH optimum ekstrak buah *R. mucronata* yang berpengaruh terhadap total tanin terkondensasi yang dihasilkan.

1.5. Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah:

1. Sebagai sumber informasi dan pengetahuan mengenai peranan senyawa tanin pada tepung buah *R. mucronata* dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.
2. Memberikan referensi baru bagi mahasiswa, dosen, dan masyarakat dalam memanfaatkan buah *R. mucronata* sebagai pangan fungsional antidiabetes.

1.6. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan dan Laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Mei-November 2015.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Buah Bakau *R. mucronata*

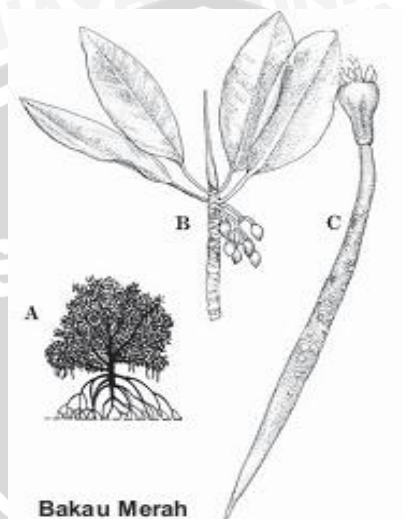
R. mucronata merupakan jenis pohon bakau yang mempunyai tajuk yang padat dan hijau serta tumbuh di tanah berlumpur lembek dengan kadar garam yang rendah. Perakaran tanaman ini tetap terendam selama air laut pasang (Danarto *et al.*, 2011). Nama daerah *Rhizophora mucronata* adalah bakau, bakau gundul, bakau genjah dan bangko. Tanaman bakau dapat tumbuh hingga ketinggian 35-40 m (Murdiyanto, 2003). Menurut Zipcodezoo (2015), klasifikasi tanaman bakau (*R. mucronata*) sebagai berikut:



Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Plantae
Phylum	: Tracheophyta
Subphylum	: Euphyllophytina
Class	: Spermatopsida
Order	: Malpighiales
Family	: Rhizophoraceae
Tribe	: Rhizophoreae
Genus	: Rhizophora
Botanical name	: <i>R. mucronata</i> Lam.

R. mucronata mempunyai bentuk morfologi daun mahkota berjumlah empat dengan warna putih dan memiliki rambut. Jumlah kelopak bunga empat buah dan berwarna kuning pucat, benang sari berjumlah delapan dan tidak bertangkai. buah membulat sehingga berbentuk telur berukuran 5-7 cm, berwarna hujai kecoklatan, seringkali kasar dan berbiji tunggal. Hipokotil silindris, kasar, dan berbintil. Leher kotiledon kuning ketika matang. Hipokotil berukuran panjang 36-70 cm dan diameter 2-3 cm (Noor *et al.*, 1999). Batang diselimuti kulit

berganda (4-5 cm) dan mengandung penyamak. Kulit tersebut retak berkotak-kotak tidak berlentisel dan bagian dalamnya berwarna kuning sampai oranye (Ditjen RRL, 1997). Ilustrasi tanaman bakau merah (*R. mucronata*) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ilustrasi *R. mucronata* (A) Habitus (B) Daun dan bunga (C) Buah
Sumber: Noor et al., (1999)

Menurut Wibisono et al., (2006) musim berbuah tanaman *R. mucronata* pada bulan September-Desember. Buah bakau *R. mucronata* yang telah matang memiliki ciri-ciri panjang hipokotil ± 50 cm, kotiledon berwarna kuning dan berbentuk seperti cincin melingkar 2 cm. Buah *R. mucronata* matang (tua) dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Ciri buah *R. mucronata* yang telah matang; terdapat tanda seperti cincin berwarna kekuningan (Wibisono et al., 2006).

Ekstrak dan bahan mentah dari mangrove telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat pesisir untuk keperluan obat-obatan alamiah. Campuran senyawa kimia bahan alam oleh para ahli kimia dikenal sebagai pharmacopoeia. Sejumlah tumbuhan mangrove dan tumbuhan asosiasinya digunakan pula sebagai bahan tradisional insektisida dan pestisida. (Purnobasuki, 2004). Manfaat *R. mucronata* adalah sebagai kayu bakar (arang), *pulp*, *plywood*, kulit kayu sebagai bahan pengawet dan buahnya dapat dipakai untuk campuran lauk pauk (Ditjen RRL, 1997). Manfaat lain adalah sebagai obat dalam kasus hematuria (pendarahan pada air seni), tanin dari kulit kayu digunakan sebagai pewarnaan, dan dapat juga ditanam untuk melindungi pematang di sepanjang tambak (Martawijaya, 1992).

2.2. Ekstraksi Metode Sonikasi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut yang berbeda. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar (Harborne, 1987). Metode sonikasi mengandalkan energi gelombang yang menyebabkan proses kavitasi, yaitu proses pembentukan gelembung-gelembung kecil akibat adanya transmisi gelombang ultrasonik untuk membantu difusi pelarut ke dalam dinding sel tanaman. (Nurchayanti, 2014).

Kavitasi adalah proses pembentukan gelembung-gelembung mikro karena meningkatnya tekanan pada saat ekstraksi sebagai akibat dari adanya gelombang ultrasonik. Gelembung-gelembung ini tidak stabil sehingga mudah pecah ketika gelembung tersebut mencapai volume yang tidak cukup lagi menyerap energi. Pecahnya gelembung-gelembung ini melibatkan energi yang besar dan menghasilkan efek panas yang membantu kontak antara pelarut dan

bahan dalam ekstraksi sehingga hasil ekstraksi lebih maksimal (Sani *et al.*, 2014).

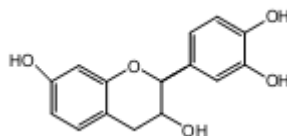
Energi ini dapat menyebabkan pergerakan molekul dengan migrasi ion dan rotasi dari dua kutub, tetapi tidak mengubah struktur molekulnya. Pemanasan akibat gelombang mikro menyebabkan dinding sel hancur, sehingga analit yang akan diekstrak keluar dari sel dan dapat berdifusi ke pelarut. Sedangkan metode sonikasi memanfaatkan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 42 kHz yang dapat menghancurkan sel daun sehingga mempercepat proses perpindahan massa senyawa bioaktif dari dalam sel ke pelarut (Utami *et al.*, 2009). Metode ultrasonik dipilih karena mampu menghasilkan rendemen ekstrak yang optimal dengan waktu yang relatif singkat.

Menurut Wati dan Motto (2012), penggunaan gelombang ultrasonik dalam proses ekstraksi mampu meningkatkan rendemen dan kualitas produk dibanding ekstraksi konvensional lainnya. penggunaan gelombang ultrasonik memungkinkan proses dilakukan pada tekanan dan temperatur lebih rendah, mengurangi pemakaian bahan baku dan pelarut, mengurangi tahapan sintesa yang akan dilakukan dan secara simultan akan meningkatkan selektifitas akhir, memungkinkan pemakaian bahan baku dan pelarut dengan kemurnian rendah, serta meningkatkan keaktifan katalis.

2.3. Tanin

Tanin merupakan kelompok polifenol yang larut dalam air dengan berat molekul antara 500 - 3000 g/mol. Tanin mampu mengendapkan alkaloid, gelatin dan protein lainnya, membentuk warna merah tua dengan kalium ferrisianida dan amonia serta dapat diendapkan oleh garam-garam Cu, Pb dan kalium kromat (Fajriati, 2006). Tanin tergolong senyawa fenolik membentuk senyawa kompleks

dengan Fe^{3+} membentuk endapan berwarna coklat kehitaman (Kristianto, 2013). Struktur inti tanin dapat dilihat pada Gambar 3.

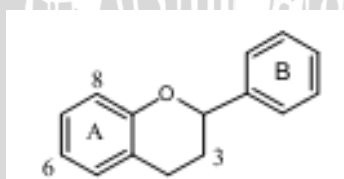


Gambar 3. Struktur inti tanin (Robinson, 1995)

Berdasarkan struktur kimianya, tanin diklasifikasikan dalam dua kelas, yang terdiri atas:

a. Tanin Terkondensasi (Proantosianidin)

Tanin terkondensasi merupakan oligomer atau polimer dari flavonoid yang mengandung unit flavan-3-ol (katekin) (Andarwulan dan Faradillah, 2012). Tanin terkondensasi tidak dapat dihidrolisis kecuali dalam suasana asam. Contoh: katekin, proantocyanidin (Fajriati, 2006), prosianidin B2 (epikatekin-(4 β →8')-epikatekin) (Andarwulan dan Faradillah, 2012). Tanin terkondensasi bersifat sangat reaktif terhadap formaldehid membentuk produk kondensasi yang berguna untuk bahan perekat termosetting yang tahan air dan panas (Suseno *et al.*, 2014). Struktur dasar tanin terkondensasi tertera pada Gambar 4.



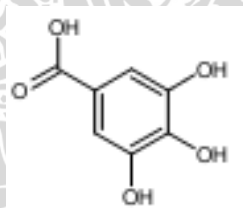
**Gambar 4. Struktur dasar tanin terkondensasi
Sumber: Kristianto (2013)**

b. Tanin Terhidrolisi

Hidrolisable Tannin, yaitu tanin yang terhidrolisis dalam air. Contoh: galotanin, caffetanin (Fajriati, 2006). Tanin yang dapat dihidrolisis terbagi atas dua kelompok, yaitu *gallotanin* dan *ellagitannin*. Gallotanin ditandai dengan pusat poliol yang mengikat 10-12 asam galat. Ellagitannin memiliki rumus struktur yang

mirip dengan gallotanin, yaitu memiliki gugus poliol sebagai pusat dan asam galat sebagai residu. Perbedaan antara kedua kelompok ini adalah pada ellagitanin karbon dari residu asam galat yang berdekatan saling berikatan (C-C) membentuk formasi heksahidroksidifenoil (Andarwulan dan Faradillah, 2012).

Tanin terhidrolisis biasanya berupa senyawa amorf, higroskopis, berwarna coklat kuning yang larut dalam air membentuk larutan koloid. Tanin terhidrolisis larut dalam pelarut organik yang polar tetapi tidak larut dalam pelarut organik non polar misalnya kloroform dan benzena (Suseno *et al.*, 2014). Menurut Kristianto (2013), tanin terhidrolisis merupakan turunan dari asam galat (asam 3,4,5-trihidroksil benzoat). senyawa ini mengandung ikatan ester antara suatu monosakarida terutama gugus hidroksilnya. Struktur asam galat tertera pada gambar 5.

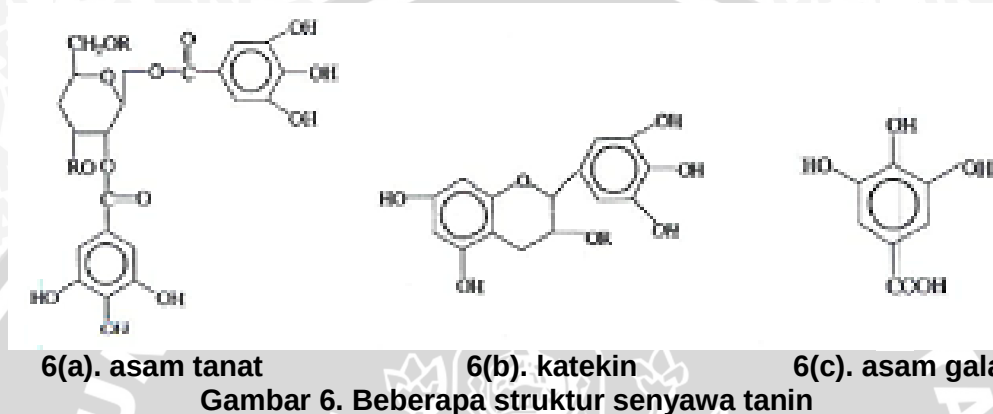


Gambar 5. Struktur asam galat
Sumber: Kristianto (2013)

Struktur senyawa tanin terdiri atas atom-atom yang berbeda dan tanin memiliki gugus hidroksi lebih dari satu dan memiliki momen dipol tidak sama dengan nol ($\mu \neq 0$) yang menyebabkan tanin bersifat polar, sehingga harus dilarutkan dengan pelarut yang bersifat polar. Pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi tanin adalah pelarut aseton. Pelarut aseton bisa meminimalkan interaksi antara tanin dengan protein sehingga tanin bisa terekstrak semua dalam fasa air dan protein bisa larut dalam aseton (Umarudin *et al.*, 2012).

Tanin memiliki sifat kimia, yaitu tanin merupakan senyawa kompleks dalam bentuk campuran polifenol yang sukar dipisahkan sehingga sukar mengkristal, tanin dapat diidentifikasi dengan kromatografi, senyawa fenol dari

tanin mempunyai aksi adstrigensia, antiseptik, dan pemberi warna (Fachry *et al.*, 2012). Tanin dapat dideteksi dengan sinar UV pendek berupa bercak lembayung yang bereaksi positif dengan setiap pereaksi fenol baku (Harborne, 1987). Fajriati (2006) menyebutkan beberapa struktur senyawa tanin yang dapat dilihat pada Gambar 6.



Menurut Browning (1966) sifat utama tanin tumbuh-tumbuhan tergantung pada gugusan phenolik-OH yang terkandung dalam tanin. berdasarkan sifat kimiawi, tanin merupakan senyawa yang gugus phenol dan bersifat koloid; semua jenis tanin dapat larut dalam air dan pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lainnya serta kelarutannya besar, dan akan bertambah besar apabila dilarutkan dalam air panas; tanin bereaksi dengan garam besi memberikan warna hijau dan biru kehitaman; tanin akan terurai menjadi pyrogallol, pyrocatechol dan phloroglucinol bila dipanaskan sampai suhu 210 °F – 215 °F (98,89 °C - 101,67 °C); tanin dapat dihidrolisa oleh asam, basa dan enzim; ikatan kimia yang terjadi antara tanin-protein atau polimer-polimer lainnya terdiri dari ikatan hidrogen, ikatan ionik dan ikatan kovalen. Sedangkan berdasarkan sifat fisika tanin, umumnya tanin mempunyai berat molekul tinggi dan cenderung mudah dioksidasi menjadi suatu polimer, sebagian besar tanin bentuknya amorf dan tidak mempunyai titik leleh; tanin

berwarna putih kekuning-kuningan sampai coklat terang; tanin berbentuk serbuk atau berlapis-lapis seperti kulit kerang, berbau khas dan mempunyai rasa sepat (astringent); warna tanin akan menjadi gelap apabila terkena cahaya langsung atau dibiarkan di udara terbuka; tanin mempunyai sifat atau daya bakterostatik, fungistatik dan merupakan racun.

Kadar tanin yang tinggi menyebabkan rasa sepat dan pahit pada bahan makanan. Senyawa ini bersifat karsinogenik apabila dikonsumsi dalam jumlah berlebih dan kontinyu namun dalam jumlah kecil dapat berfungsi sebagai antioksidan. Batas aman untuk kandungan tanin dalam bahan makanan adalah 560 mg/kg berat badan/hari (Awika *et al.*, 2009).

2.4. Diabetes Melitus

Gangguan metabolisme karbohidrat dapat menyebabkan Diabetes mellitus. Karbohidrat dalam saluran cerna mengalami metabolisme menjadi glukosa yang sederhana kemudian diabsorpsi masuk kedalam peredaran darah serta mempengaruhi kadar glukosa dalam darah. Proses penyerapan ini dikatalisis enzim pemecah ikatan α -1,4-glikosida yaitu α -amilase dan enzim pemecah ikatan α -1,6-glikosida yaitu α -glukosidase yang terdapat pada sel usus (Rais *et al.*, 2013).

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit kronis yang ditandai dengan hiperglikemia dan intoleransi glukosa yang terjadi karena kelenjar pankreas tidak dapat memproduksi insulin secara adekuat yang atau karena tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif atau kedua-duanya (Wicaksono, 2011). DM terbagi atas 2, yakni DM Tipe 1 dan DM Tipe 2. Gangguan produksi insulin pada DM Tipe 1 umumnya terjadi karena kerusakan sel-sel β pulau Langerhans yang disebabkan oleh reaksi otoimun. Namun ada pula yang disebabkan oleh bermacam-macam virus, diantaranya virus

Cocksakie, Rubella, CMVirus, Herpes, dan lain sebagainya. Masalah jangka panjang pada penderita DM Tipe 1 adalah rusaknya kemampuan tubuh untuk mensekresi glukagon sebagai respon terhadap hipoglikemia. Pada DM Tipe 2 penyebabnya multifaktor yang sepenuhnya belum terungkap dengan jelas. Faktor genetik dan pengaruh lingkungan cukup besar dalam menyebabkan terjadinya DM tipe 2, antara lain obesitas, diet tinggi lemak dan rendah serat, serta kurang gerak badan. Awal patofisiologis DM Tipe 2 bukan disebabkan oleh kurangnya sekresi insulin, tetapi karena sel-sel sasaran insulin gagal atau tak mampu merespon insulin secara normal (DepKes RI, 2005).

Pengobatan DM pada prinsipnya adalah menjaga agar kadar glukosa darah dapat dipertahankan pada kondisi normal (80-120 mg/dl). Salah satu cara kerja obat antidiabetes adalah menghambat pencernaan karbohidrat kompleks (amilum) menjadi glukosa sehingga asupan glukosa dari usus ke dalam darah dapat dikurangi. Salah satu senyawa aktif yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor alpha glukosidase adalah acarbose (Pujiyanto dan Ferniah, 2010).

2.5. Enzim α -Glukosidase

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup, dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme-perantara (*intermediary metabolism*) dari sel (Wirahadikusumah, 1989). Katalisator adalah zat yang mempercepat reaksi kimia yang mengalami perubahan fisik selama reaksi tetapi kembali ke kedudukan asalnya setelah reaksi selesai (Mayes *et al.*, 1987).

Ada tiga enzim yang berperan di dalam perombakan selulosa menjadi glukosa, yaitu: (a) Enzim endoglukanase, berfungsi memotong rantai glukosa yang panjang menjadi rantai yang lebih pendek secara acak, (b) Enzim

cellobiohydrolase, berfungsi memotong setiap dua rantai glukosa (selobiosa), dimulai dari rantai nomor satu (rantai terakhir) glukosa, dan (c) Enzim β - glukosidase, berfungsi memotong selobiosa menjadi molekul-molekul glukosa (Sukardati *et al.*, 2010).

Enzim α -glukosidase (E.C.3.2.1.20) berperan dalam metabolisme pati dan glikogen pada jaringan tumbuhan dan hewan yang dicirikan oleh berbagai substrat yang mengenalinya yaitu maltosa, glukosamilosa, sukrosa, dan sebagainya. α -Glukosidases bertanggung jawab atas hidrolisis poli dan oligosakarida menjadi monomer atau pembelahan ikatan antara gula dan aglikon noncarbohydrate. Dengan demikian, enzim ini terlibat dalam sejumlah proses biologis yang penting, seperti pencernaan karbohidrat menjadi glukosa atau pengolahan gugus oligosakarida dari glikoprotein (Chen *et al.*, 2004). Karbohidrat yang telah dicerna dalam lambung masuk ke dalam usus dan mengalami penyerapan. Penyerapan ini dipermudah dengan adanya enzim pemecah ikatan glikosida yaitu enzim α -glukosidase dan α -amilase yang terdapat pada batas pertemuan (*brush border*) sel usus (Rais *et al.*, 2013).

Aktivitas enzim α -glukosidase seperti maltase dan sukrase dalam menghidrolisis oligosakarida menjadi glukosa, fruktosa dan monosakarida lain pada dinding usus halus dapat dihambat oleh senyawa obat inhibitor α -glukosidase. Penghambatan aktivitas enzim ini efektif dalam mengurangi pencernaan karbohidrat dan proses absorpsinya dalam usus halus sehingga dapat menurunkan kadar gula darah *post prandial* penderita diabetes mellitus. Inhibitor α -glukosidase juga dapat menghambat aktivitas enzim α -amilase dalam menghidrolisis polisakarida dalam lumen usus (DepKes RI, 2005). Tanin juga mempengaruhi metabolisme karbohidrat dengan mengikat pati sehingga sukar dicerna oleh enzim amilase (Tandi, 2010).

Substrat p-NPG merupakan model yang digunakan untuk mempresentasikan karbohidrat yang akan dipecah oleh enzim α -glukosidase. Inhibisi enzim α -glukosidase terjadi karena enzim α -glukosidase akan menghidrolisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi p-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa. Warna kuning yang dihasilkan menjadi indikator kemampuan inhibitor untuk menghambat reaksi yang terjadi. Aktivitas enzim diukur berdasarkan absorbansi p-nitrofenol yang dihasilkan. Jika sampel ekstrak tumbuhan memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase maka warna kuning larutan yang dihasilkan akan lebih pudar dibandingkan larutan tanpa inhibitor (Fernando *et al.*, 2013).

Setiap enzim bekerja secara unik menurut prinsip lock-and-key yang saling berpasangan. Substrat yang berperan sebagai key masuk ke dalam sisi aktif enzim yang berperan sebagai lock, sehingga terbentuk 'kompleks enzim-substrat (ES)' yang bersifat tidak stabil. Pada kondisi yang sesuai, ketidakstabilan ini akan cenderung mengarahkan ES untuk berubah bentuk menjadi kompleks enzim-produk. Pada saat ikatan kompleks enzim-produk terputus, produk reaksi akan dilepaskan dan enzim akan kembali ke konfigurasi semula. Perbandingan antara konsentrasi enzim dan substrat yang tidak sesuai akan mengakibatkan adanya enzim ataupun substrat yang tidak memperoleh 'pasangan'. Hal ini sangat dimungkinkan karena tidak adanya pengadukan, sehingga kontak antara substrat dan enzim kurang baik (Sukardati *et al.*, 2010).

Penentuan aktivitas enzim biasanya dilakukan pada pH optimum dengan konsentrasi substrat dan ko-faktor yang berlebih, sehingga laju reaksi yang terjadi merupakan reaksi tingkat ke-nol (*zero order reaction*) terhadap substrat. Laju reaksi permulaan berbanding lurus dengan konsentrasi enzim, sehingga faktor pembatas laju reaksi (*rate-limiting factor*) yang sebenarnya

adalah konsentrasi enzim. Pengamatan reaksi biasanya ditentukan dengan berbagai cara kimia atau spektrofotometri (Wirahadikusumah, 1989).

Acarbose adalah suatu oligosakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme, *Actinoplanes utahensis*. Acarbose merupakan serbuk berwarna putih dengan berat molekul 645,6 bersifat larut dalam air dan memiliki pKa 5,1 (Najib, 2010). Acarbose bekerja secara kompetitif dengan karbohidrat di saluran cerna untuk berikatan dengan enzim alpha glucosidase, sehingga memperkecil peluang penyerapan karbohidrat. Dengan demikian hiperglikemia akut postprandial dapat dihindarkan pada penderita diabetes maupun prediabetes (Manaf, 2010).

2.6. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah anggota teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber REM (radiasi elektromagnetik) ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif (Mukti, 2012).

Kristianingrum (2000) menjelaskan secara kualitatif absorpsi cahaya dapat diperoleh dengan pertimbangan absorpsi cahaya pada daerah tampak. Apabila cahaya polikromatis (cahaya putih) yang berisi seluruh spektrum panjang gelombang melewati medium tertentu, akan menyerap panjang gelombang lain, sehingga medium itu akan tampak berwarna. Warna ini disebut warna komplementer terhadap warna yang diabsorpsi. Spektrum tampak dan warna-warna komplementer ditunjukkan dalam Tabel 1 berikut ini :

Tabel 1. Spektrum tampak dan warna-warna komplementer

Panjang gelombang (nm)	Warna yang diabsorpsi	Warna yang dipantulkan (komplementer)
340 – 450	Lembayung	Kuning – hijau
450 – 495	Biru	Kuning
495 – 570	Hijau	Violet
570 – 590	Kuning	Biru
590 – 620	Jingga	Hijau – biru
620 – 750	Merah	Biru - hijau

Sumber: Kristianingrum (2000)

Penggunaan Spektrofotometer dalam uji penghambatan enzim dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna, yang diukur absorbansinya selama periode waktu tertentu (Pujiyanto dan Ferniah, 2010). Substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida merupakan model yang digunakan untuk merepresentasikan karbohidrat yang akan dipecah oleh enzim α -glukosidase. Inhibisi enzim α -glukosidase terjadi karena enzim α -glukosidase akan menghidrolisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi p-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa. Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil absorbansi p-nitrofenol (Sugiwati, 2005).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah buah bakau jenis *R. mucronata* tua. Buah *R. mucronata* diperoleh dari wilayah Nguling, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur. Ciri-ciri buah *R. mucronata* tua yaitu memiliki kotiledon berwarna kuning sebagai sekat pemisah antara bongol dan buah dan memiliki ukuran yang lebih besar dan memiliki warna yang lebih gelap.

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada prosedur penelitian ini meliputi bahan-bahan pembuatan tepung buah *R. mucronata*, ekstraksi, serta bahan-bahan untuk karakterisasi pH sampel. Bahan-bahan untuk pembuatan tepung antara lain buah *R. mucronata*, air dan asam sitrat 0,5% (Merck). Bahan-bahan untuk ekstraksi terdiri atas tepung buah *R. mucronata*, aseton 70% (Smartlab) (v/v), 0,25% asam askorbat (Merck), dan aquades. Bahan-bahan yang digunakan karakterisasi pH sampel antara lain ekstrak buah *R. mucronata*, aquades, HCl 0,1 M (PA), dan NaOH 0,1 M (PA).

Pada parameter uji membutuhkan bahan-bahan untuk uji fitokimia, uji aktivitas enzim α -glukosidase, total fenol, total tanin, dan total tanin terkondensasi. Bahan-bahan untuk pengujian fitokimia terdiri atas 1,5-2% HCl (PA), 0,5 ml larutan asam encer (PA), reagen Wagner (PA), reagen Mayer (PA) (uji alkaloid); H_2SO_4 (teknis), asam asetat anhidrat (teknis), kloroform (Smartlab) (uji triterpenoid dan steroid); methanol panas 50% (PA), logam Mg (teknis), HCl pekat (PA) (uji flavonoid); air (Uji saponin); dan FeCl_3 (teknis) serta air (uji tanin).

Bahan-bahan untuk pengujian aktivitas enzim α -glukosidase antara lain ekstrak buah *R. mucronata*, KH_2PO_4 0,2 M, NaOH 0,2 N, enzim α -glukosidase (Megazyme), substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) (Sisco Research

Ltd.), dimethyl sulfoksida (DMSO) (*Merck*), Na_2CO_3 200 mM (*Smartlab A-2048*), bovine serum albumin (BSA) (*Merck*), dan acarbose (*Bayer, Indonesia*).

Bahan-bahan untuk penentuan kadar fenol terdiri atas ekstrak buah *R. mucronata*, aquades, reagen folin ciocalteu (*Merck*), dan larutan 75 g/L Na_2CO_3 (*Smartlab A-2048*). Bahan untuk uji total tanin terdiri atas senyawa polivinil polipyrrolidone (PVPP) (*Merck*), ekstrak buah *R. mucronata*, aquades, reagen folin ciocalteu, dan larutan 75 g/L Na_2CO_3 (*Smartlab A-2048*). Bahan untuk tanin terkondensasi terdiri atas ekstrak kasar tanin buah *R. mucronata* tua, reagen butanol-HCl (95:5), dan reagen ferric (PA Makmur Sejati).

3.1.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang dibutuhkan pada prosedur penelitian ini meliputi alat-alat pembuatan tepung buah *R. mucronata*, alat-alat untuk mengekstraksi buah *R. mucronata*, dan untuk karakterisasi pH sampel. Pada parameter uji alat-alat yang digunakan terdiri atas alat-alat uji fitokimia, uji aktivitas enzim α -glukosidase, uji total fenol, uji total tanin, dan uji total tanin terkondensasi.

Alat yang digunakan untuk pembuatan tepung buah *R. mucronata* antara lain timbangan digital, *dish meal* (*Motoyama F1 Series*), ayakan mesh 60, pisau, baskom, dan kompor gas. Alat untuk mengekstraksi buah *R. mucronata* terdiri atas *sonicator* (*Branson*), *rotary evaporator* (*Buchi Rotavapor R-205*), timbangan analitik (*Mettler Toledo*), timbangan digital (*Mettler Toledo*), dan *glassware*. Alat untuk karakterisasi pH sampel menggunakan pH meter (*Eutech*), *magnetic stirrer* (*Ikamag Ret*).

Pada parameter uji meliputi uji fitokimia, uji aktivitas enzim α -glukosidase, total fenol, total tanin, dan total tanin terkondensasi. Alat-alat untuk uji aktivitas enzim α -glukosidase antara lain pH meter (*Eutech*), waterbath (*Memmert W-350*), spektrofotometri UV-Vis (*Spectroquant Pharo-300*), mikro pipet (*Avi-Tech*), dan *glassware*. Alat-alat yang digunakan dalam penentuan total

fenol, total tanin dan total tanin terkondensasi terdiri atas waterbath (Memmert W-350), spektrofotometer UV-Vis (Spectroquant Pharo-300), vortex (Barnstead Thermolyne), dan glassware

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. eksperimen adalah observasi dibawah kondisi buatan (*artificial condition*), dimana kondisi tersebut dibuat dan diatur oleh peneliti yang tujuannya adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk pembandingan (Nazir, 1988). Eksperimen ini bertujuan untuk menentukan pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* terhadap aktivitas enzim α -glukosidase, total fenol, total tanin, dan total tanin terkondensasi.

3.2.1. Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Perlakuan yang diterapkan dalam penelitian ini adalah pH pada ekstrak buah *R. mucronata* (A) yang terdiri atas 6 taraf perlakuan derajat keasaman (pH) yaitu tanpa perlakuan (A_1), pH 4 (A_2), pH 5 (A_3), pH 6 (A_4), pH 7 (A_5), pH 8 (A_6). Berdasarkan perlakuan yang diterapkan, maka penelitian ini dirancang menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) faktorial untuk uji inhibisi enzim α -glukosidase (karena terdapat dua faktor, yakni pH dan konsentrasi) dan RAL sederhana untuk uji IC_{50} ekstrak terhadap enzim α -glukosidase, total fenol, total tanin, total tanin terkondensasi yang dilakukan dengan tiga kali ulangan.

Metode pengujian data yang digunakan adalah sidik ragam (ANOVA) dimana jika terdapat pengaruh yang nyata atau sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut BNT (beda nyata terkecil). Model desain RAL sederhana seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Model desain RAL sederhana

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A ₁	A _{1.1}	A _{1.2}	A _{1.3}
A ₂	A _{2.1}	A _{2.2}	A _{2.3}
A ₃	A _{3.1}	A _{3.2}	A _{3.3}
A ₄	A _{4.1}	A _{4.2}	A _{4.3}
A ₅	A _{5.1}	A _{5.2}	A _{5.3}
A ₆	A _{6.1}	A _{6.2}	A _{6.3}

Metode analisis yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + P + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

- Y_{ij} = hasil pengamatan pada satuan percobaan ekstrak buah *R. mucronata* dengan perlakuan pH ke-i yang terletak pada ulangan ke-j
 μ = nilai rata-rata umum
P = pengaruh perlakuan pH ekstrak buah *R. mucronata* ke- t
 ε = pengaruh dari galat pada satuan percobaan pH ekstrak buah *R. mucronata* ke-i yang terletak pada ulangan ke-j

Adapun model RAL faktorial dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Model desain RAL faktorial

Perlakuan		Konsentrasi (B)			
		6,25 ppm (B ₁)	12,5 ppm (B ₂)	25 ppm (B ₃)	50 ppm (B ₄)
pH (A)	R (A ₁)	(A ₁ B ₂).1,2,3	(A ₁ B ₂).1,2,3	(A ₁ B ₃).1,2,3	(A ₁ B ₄).1,2,3
	4 (A ₂)	(A ₂ B ₁).1,2,3	(A ₂ B ₂).1,2,3	(A ₂ B ₃).1,2,3	(A ₂ B ₄).1,2,3
	5 (A ₃)	(A ₃ B ₁).1,2,3	(A ₃ B ₂).1,2,3	(A ₃ B ₃).1,2,3	(A ₃ B ₄).1,2,3
	6 (A ₄)	(A ₄ B ₁).1,2,3	(A ₄ B ₂).1,2,3	(A ₄ B ₃).1,2,3	(A ₄ B ₄).1,2,3
	7 (A ₅)	(A ₅ B ₁).1,2,3	(A ₅ B ₂).1,2,3	(A ₅ B ₃).1,2,3	(A ₅ B ₄).1,2,3
	8 (A ₆)	(A ₆ B ₁).1,2,3	(A ₆ B ₂).1,2,3	(A ₆ B ₃).1,2,3	(A ₆ B ₄).1,2,3

Model statistika yang digunakan dalam penelitian dengan RAL faktorial sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

- Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor perlakuan pH taraf ke-i, faktor konsentrasi ekstrak taraf ke-j, pada ulangan ke –k
 μ = Rataan umum
A_i = Pengaruh faktor perlakuan pH pada taraf ke-i
B_j = Pengaruh faktor konsentrasi ekstrak pada taraf ke-j

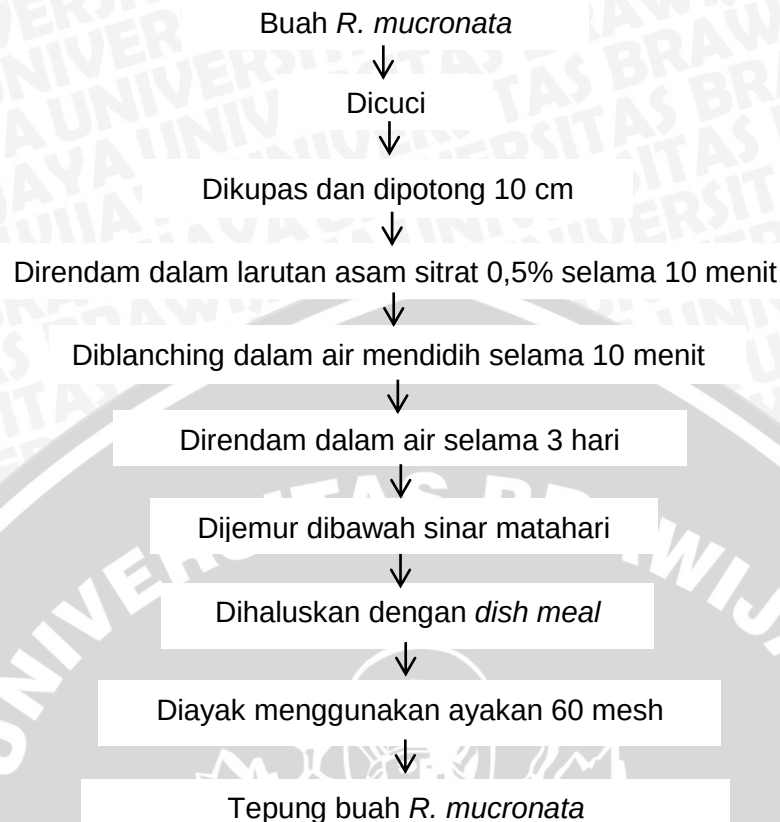
- (AB)_{ij} = Interaksi antara faktor perlakuan pH dan faktor konsentrasi ekstrak pada faktor pH taraf ke-I, faktor konsentrasi ekstrak taraf ke-j
 ϵ_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor perlakuan pH taraf ke-I, faktor ke faktor konsentrasi ekstrak taraf ke-j pada ulangan ke-k

3.2.2. Prosedur Percobaan

Pada penelitian tahap I meliputi persiapan pembuatan tepung buah *R. mucronata* (Hardoko *et al.*, 2014), proses ekstraksi buah *R. mucronata* (Zhou *et al.*, 2012), dan karakterisasi pH ekstrak *R. mucronata*.

3.2.2.1. Pembuatan Tepung Buah *R. mucronata* (Hardoko *et al.*, 2014)

Langkah awal dalam penelitian ini adalah menyiapkan tepung buah *R. mucronata* dengan metode pengeringan di bawah sinar matahari,. Pembuatan tepung buah *R. mucronata* berdasarkan modifikasi metode Hardoko *et al.*, (2014). Buah *R. mucronata* yang digunakan memiliki spesifikasi kotiledon yang berwarna kuning sebagai sekat pemisah antara bongol dan buah. Buah tua memiliki ukuran yang lebih besar dan memiliki warna yang lebih gelap.. Buah dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Setelah itu, buah dikupas dengan pisau. Selanjutnya dipotong 10 cm dan direndam dengan asam sitrat 0,5% selama 10 menit untuk menghindari terjadinya oksidasi. kemudian *diblanching* dalam air mendidih selama 10 menit dengan tujuan untuk menginaktifkan enzim. Selanjutnya, direndam dalam air selama 3 hari untuk memaksimalkan ekstraksi. Lalu, dikeringkan di bawah sinar matahari. Kemudian buah *R. mucronata* yang sudah kering dihaluskan menjadi tepung dengan menggunakan *dish meal*. Penggunaan *dish meal* dalam proses penepungan dikarenakan buah *R. mucronata* kering memiliki tekstur yang keras dan berserabut. Kemudian tepung diayak dengan ayakan 60 mesh yang bertujuan memperluas permukaan untuk meningkatkan efektivitas ekstraksi. Prosedur kerja pembuatan tepung buah *R. mucronata* dapat dilihat pada Gambar 7.

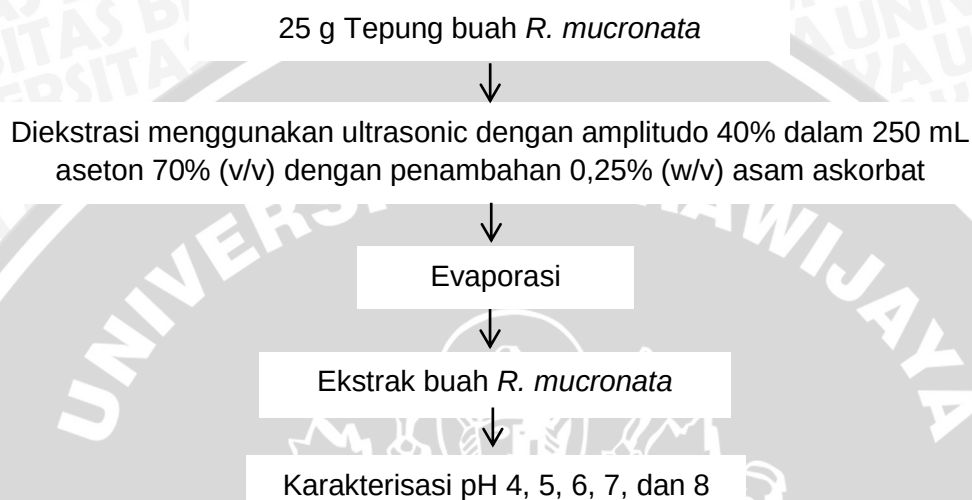


Gambar 7. Pembuatan tepung buah *R. mucronata* (Hardoko et al., 2014)

3.2.2.2. Proses Ekstraksi Buah *R. mucronata* (Zhou et al., 2012)

Pada penelitian ini proses ekstraksi buah *R. mucronata* dilakukan berdasarkan metode Zhou et al., (2012). Tepung buah *R. mucronata* yang telah mengalami proses penepungan diambil sebanyak 25 g dan dihomogenkan dalam 250 mL pelarut aseton/air 70% (v/v) dengan penambahan 0,25% (w/v) asam askorbat. Penambahan asam askorbat dilakukan untuk menghindari terjadinya oksidasi. Kemudian diekstraksi dengan metode sonikasi dengan bantuan gelombang ultrasonik beramplitudo 40% selama 30 menit dalam erlenmeyer 250 mL. Setelah itu ekstrak disentrifuge serta disaring untuk mendapatkan supernatan ekstrak hasil evaporasi. Setelah proses sonikasi dilakukan proses evaporasi untuk mendapatkan ekstrak pekat buah *R. mucronata*. Proses dievaporasi dilakukan untuk menghilangkan aseton menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan dengan kecepatan *rotary* 60 rpm dan suhu 60 °C. Rendemen

ekstrak didapatkan dari perhitungan berat labu tanpa larutan ekstrak, berat labu dengan larutan ekstrak sebelum dievaporasi, dan labu dengan ekstrak pekat setelah dievaporasi. Ekstrak buah *R. mucronata* kemudian diberi perlakuan pH 4, 5, 6, 7, dan 8 sebagai sampel ekstrak buah *R. mucronata*. Proses ekstraksi buah *R. mucronata* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Proses ekstraksi buah *R. mucronata* (Zhou et al., 2012)

3.2.2.3. Karakterisasi pH pada Ekstrak Buah *R. mucronata*

Penggunaan pH yang berbeda bertujuan untuk mengetahui pH optimum pada ekstrak buah *R. mucronata* untuk pengujian aktivitas α -glukosidase, total fenol, total tanin, dan total tanin terkondensasi. Pada penelitian ini, pH yang digunakan adalah pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Dalam karakterisasi pH pada ekstrak buah *R. mucronata*, pertama-tama diukur pH awal ekstrak kasar tanin. Kemudian untuk meningkatkan nilai pH ditambahkan larutan basa yakni NaOH 0,1 M sedangkan untuk menurunkan pH ditambahkan larutan asam yakni HCl 0,1 M. Penambahan larutan buffer dilakukan sedikit demi sedikit hingga mendapatkan pH yang diinginkan. Dalam proses ini perlu dilakukan pengecekan pH secara berkala hingga mendapatkan pH yang sesuai.

Dijelaskan oleh Kristianto (2013), pengaturan pH dilakukan dengan penambahan HCl 0,1 M dan NaOH 0,1 M. Kemudian dilakukan

pengadukan pada magnetic stirrer, dengan pengadukan cepat selama 1 menit dan pengadukan lambat selama 15 menit. Pengukuran pH dilakukan dengan penambahan air pada ekstrak kasar tanin dengan menggunakan pH meter.

Perlakuan pH pada sampel ekstrak kasar tanin dapat dilakukan dengan menggunakan metode modifikasi Apriyantono *et al.*, (1989) yakni sebanyak 0,1 g ekstrak kasar tanin dilarutkan dalam 1 mL aquades, dihomogenkan, dan diukur pHnya, dimana sebelumnya pH meter tersebut dikalibrasi dengan larutan buffer pH 4 dan pH 7. Adapun prosedur penggunaan pH meter adalah sebagai berikut:

1. Menyalakan pH meter sampai diperoleh keadaan stabil.
2. Elektroda pH meter dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Kemudian pH meter dikalibrasi dengan buffer pH 4 dan buffer pH 7 lalu dikeringkan dengan tissue.
3. Elektroda dicelupkan ke dalam larutan sampel dan nilai pH dapat diketahui setelah diperoleh pembacaan yang stabil dari pH meter.
4. Catat pH sampel.

3.2.3. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini mencakup rendemen (Sudarmadji, 1997), uji fitokimia (Puspitasari, 2010), uji aktivitas enzim α -glukosidase (Sugiwati *et al.*, 2006), total fenol (Haron dan Raob, 2014), total tanin (FAO, 2000), dan total tanin terkondensasi (FAO, 2000).

3.2.3.1. Rendemen (Sudarmadji, 1997)

Rendemen merupakan persentase berat akhir yang dihasilkan dibandingkan dengan jumlah bahan baku yang digunakan. Perhitungan rendemen dapat menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat akhir (g)}}{\text{Berat awal (g)}} \times 100\%$$

3.2.3.2. Uji Fitokimia (Puspitasari., 2010)

Pengujian fitokimia dilakukan pada ekstrak buah *R. mucronata*. Prosedur uji fitokimia menggunakan metode Puspitasari (2010) yang meliputi uji tanin, uji saponin, uji alkaloid, flavonoid dan steroid dan triterpenoid.

(1) Tanin

Ekstrak buah *R. mucronata* sebanyak 1 mL dilarutkan kedalam 1-2 mL air dan ditambahkan sebanyak 2 tetes larutan FeCl_3 . Adanya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin terhidrolisis sedangkan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin terkondensasi.

(2) Saponin

Ekstrak buah *R. mucronata* dalam tabung reaksi ditambahkan air 1:1, lalu dikocok selama 5 menit. Terdapatnya busa yang bertahan selama 30 menit menunjukkan adanya senyawa saponin. Marlina et al. (2005) menjelaskan timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya.

(3) Alkaloid

Ekstrak buah *R. mucronata* sebanyak 1 mL ditambahkan 1,5-2% HCl dan larutan dibagi kedalam 3 tabung. Tabung 1, larutan ditambah 0,5 mL larutan asam encer sebagai kontrol, tabung 2 ditambah 2-3 tetes reagen Dragendorff sedangkan tabung 3 ditambah 2-3 tetes reagen Mayer. Jika pada tabung 2 terbentuk endapan jingga dan tabung 3 terbentuk endapan berwarna kekuningan menunjukkan adanya alkaloid. Marlina et al., (2005) menjelaskan tujuan penambahan HCl pada uji alkaloid adalah karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang mengandung asam.

(4) Flavonoid

Ekstrak buah *R. mucronata* sebanyak 1 mL dilarutkan dalam 1-2 mL methanol panas 50%. Lalu ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Terbentuknya larutan berwarna merah jingga menunjukkan adanya flavonoid.

(5) Sterol dan triterpenoid

Ekstrak buah *R. mucronata* sebanyak 1 mL dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Setelah itu campuran ini ditetesi dengan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpen, sedangkan jika muncul warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol.

3.2.3.3. Uji Aktivitas Enzim α -glukosidase (Modifikasi Sugiwati *et al.*, 2009)

Uji aktivitas enzim α -glukosidase dari ekstrak buah *R. mucronata* dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Sugiwati *et al.*, (2009) yakni dengan menggunakan 1 mL stok larutan enzim α -glukosidase. Sebelum dilakukan pengujian ekstrak buah *R. mucronata* dalam menghambat enzim α -glukosidase, dilakukan uji stabilitas enzim α -glukosidase terlebih dahulu dengan tujuan untuk memeriksa faktor pengenceran yang dibutuhkan untuk menghasilkan aktivitas enzim yang optimum (diindikasikan dengan absorbansi control pada range 0,9-1,0) yang dilakukan dengan pembuatan control menggunakan konsentrasi enzim yang berbeda-beda, yakni dengan pengenceran 10x, 20x, 30x, dan 40x. Dalam penelitian ini, aktivitas optimum enzim didapat dari larutan stok enzim dengan konsentrasi 20x (1 mL larutan stok enzim tersebut kemudian diencerkan 20 kali dengan larutan buffer fosfat pH 7).

Pengujian aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan dengan reaksi pencampuran enzimatis yang terdiri atas 10 μ L sampel dalam DMSO, 490 μ L buffer fosfat (pH 7), dan 250 μ L substrat PNPG 20 mM yang dihomogenkan

dengan vortex. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 250 µL larutan enzim α-glukosidase (sebagai C dan S₁) dan ditambahkan 250 µL larutan buffer fosfat (sebagai B dan S₀), kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 15 menit. Penghentian reaksi enzimatis dilakukan dengan penambahan 1000 µL larutan natrium karbonat 200 mM. Reaksi pencampuran enzimatis tersebut akan menghasilkan p-nitriphenol yang berwarna kuning. P-nitriphenol yang dihasilkan dari reaksi tersebut, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm. % inhibisi dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{C-S}{C} \times 100\%$$

Keterangan: C = absorbansi kontrol (DMSO) tanpa sampel (C-B)

S = Absorbansi sampel (S₁-S₀)

Penyiapan larutan uji aktivitas enzim glukosidase dapat dilihat pada Lampiran 13. Adapun sistem reaksi pencampuran enzimatis α-glukosidase dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sistem reaksi pencampuran enzimatis α-glukosidase

	Blank (µL)	Control (µL)	S ₀ (µL)	S ₁ (µL)
Sampel	-	-	10	10
DMSO	10	10	-	-
Buffer fosfat pH 7	490	490	490	490
Substrat	250	250	250	250
Diinkubasi di waterbath suhu 37 °C selama 5 menit				
Buffer fosfat pH 7	250	-	250	-
Enzim	-	250	-	250
Diinkubasi di waterbath suhu 37 °C selama 15 menit				
Na ₂ CO ₃	1000	1000	1000	1000

Larutan acarbosa digunakan sebagai kontrol positif. Larutan acarbosa dibuat dengan melarutkan acarbosa dalam dalam buffer dan HCl 2 N (1:1) dengan konsentrasi 1% (b/v). Larutan disentrifugasi dan supernatannya digunakan sebagai standar. Supernatan diambil sebanyak 10 µL dan dimasukkan ke dalam campuran reaksi seperti dalam sampel ekstrak.

Penggunaan acarbosa sebagai faktor pembanding digunakan sebagai acuan sampel ekstrak dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.

Larutan yang digunakan sebagai kontrol negatif/blanko adalah DMSO yang juga digunakan sebagai pelarut ekstrak. DMSO tanpa sampel digunakan untuk menghitung %inhibisi yang dihasilkan pada setiap sampel uji. Sampel ekstrak buah *R. mucronata* dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 6,25 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm (b/v).

Penggunaan konsentrasi yang berbeda bertujuan untuk memperoleh nilai persen inhibisi yang digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim) dari setiap ekstrak. Nilai IC_{50} tersebut digunakan untuk mengetahui kekuatan penghambatan ekstrak terhadap enzim. Ekstrak yang memiliki nilai IC_{50} paling rendah merupakan ekstrak yang memiliki kemampuan menghambat aktivitas α -glukosidase paling tinggi (Loranza, 2012).

Ramdanis (2012) menjelaskan bahwa pengukuran nilai konsentrasi hambat 50% (IC_{50}) dihitung menggunakan persamaan regresi linier dengan persamaan $y = a + bx$, dimana sumbu x merupakan konsentrasi sampel dan sumbu y merupakan % inhibisi. Dari persamaan tersebut didapatkan nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus:

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b}$$

Semakin rendah nilai IC_{50} pada sampel maka semakin tinggi kemampuannya dalam menghambat kerja enzim α -glukosidase.

3.2.3.4. Total Fenol (Haron dan Raob, 2014)

Penentuan total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu (Haron dan Raob, 2014), yakni dengan mereaksikan 500 μ L ekstrak buah *R. mucronata* dengan 2500 μ L Folin-Ciocalteu (1:10), kemudian dihomogenkan dengan vortex

dan didiamkan selama 4 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL natrium karbonat (75 g/L). Dihomogenkan kembali dan diinkubasi selama 2 jam di suhu kamar. Diukur absorbansi menggunakan spectrophotometer UV-Vis dengan λ 760 nm. Perhitungan total fenol dilakukan dengan menggunakan kurva standar asam galat. Total fenol dinyatakan sebagai mg Ekuivalen Asam Galat (mg GAE/100 g) berat basah.

Penentuan total fenol dilakukan dengan metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu. Adanya inti aromatis pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik) dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi molibdenum yang berwarna biru (Febrinda *et al.*, 2013).

3.2.3.5. Total Tanin (FAO, 2000)

Penentuan total tanin berdasarkan FAO (2000) dilakukan dengan reaksi pengikatan komponen tanin dengan senyawa *polivinil polipyrrolidone* (PVPP). Dimasukkan 100 mg PVPP ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 mL aquades dan 1 mL ekstrak buah *R. mucronata* (100 mg PVPP cukup untuk mengikat 2 mg total fenol; jika total fenol lebih dari 10% dari *dry matter* harus diencerkan). Dihomogenkan dengan vortex, diinkubasi dengan suhu 4 °C selama 15 menit, kemudian vortex kembali dan disentrifuse (3000 rpm selama 10 menit). Supernatan yang dihasilkan digunakan sebagai penentuan total fenol non tanin. Penentuan total fenol non tanin dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu (Haron dan Raob, 2014). Total tanin diperoleh dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Total tanin} = \text{Total fenol} - \text{total fenol non tanin}$$

3.2.3.6. Total Tanin Terkondensasi (FAO, 2000)

Penentuan total tanin berdasarkan metode FAO (2000) yang didasarkan pada reaksi depolimerisasi oksidatif tanin terkondensasi dengan metode butanol-HCl. Analisis penentuan tanin terkondensasi dari tepung buah *R. mucronata* tua dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,5 mL ekstrak buah *R. mucronata* kemudian dimasukkan dalam tabung hungate. Tabung hungate tersebut ditambah dengan 3 mL reagen butanol-HCl (95:5 v/v) dan 0,1 mL dari reagen ferric, kemudian tabung yang berisi larutan dihomogenkan dengan vortex. Tabung ditutup, kemudian dimasukkan ke dalam waterbath selama 60 menit dengan suhu 97-100 °C. Tabung yang berisi larutan didinginkan pada suhu ruang, setelah dingin dibaca absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 550 nm. Diukur juga blank, yaitu campuran yang tanpa pemanasan. Tanin terkondensasi dihitung dengan formula berikut:

$$\text{Tanin Terkondensasi} = \frac{\text{Absorbansi 550 nm} \times 78,26 \times \text{Faktor Pengenceran}}{\text{Berat Kering}}$$

Keterangan:

$$\begin{aligned}\text{Berat Kering} &= \text{Berat Basah} - \% \text{ Kadar Air} \\ &= 100\% - \% \text{ KA}\end{aligned}$$

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Rendemen

Rendemen merupakan perbandingan bobot akhir dengan bobot awal dikalikan 100%. Persen rendemen digunakan untuk mengetahui bobot susut bahan saat proses pengolahan berlangsung. Rendemen yang dihitung meliputi rendemen tepung dan rendemen ekstrak buah *R. mucronata* yang dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rendemen tepung dan ekstrak buah *R. mucronata*

Proses	Rata-rata
Tepung buah <i>R. mucronata</i>	47,48±1,74
Ekstrak tepung buah <i>R. mucronata</i>	18,20±2,96

Pembuatan tepung buah *R. mucronata* dilakukan dengan metode pengeringan di bawah sinar matahari. Nilai rendemen yang rendah pada proses penepungan ini disebabkan karena buah *R. mucronata* mengandung kadar air yang cukup tinggi sebagaimana disebutkan oleh Purwaningsih *et al.* (2013) yakni sekitar 31,96% sehingga saat penjemuran bahan mengalami penyusutan bobot akibat menguapnya sebagian kadar air bahan. Tepung buah *R. mucronata* yang dihasilkan berwarna coklat dan memiliki banyak serabut. Tekstur tepung buah *R. mucronata* yang berserabut tersebut memungkinkan mengurangi efektifitas dalam proses ekstraksi sehingga perlu dilakukan pengayakan untuk mengefektifkan proses ekstraksi. Sembiring (2005) menjelaskan bahwa ukuran partikel bahan yang akan diekstrak berpengaruh terhadap bahan aktif ekstrak. Pengecilan ukuran bahan bertujuan untuk memperbesar luas permukaan pori-pori simplisia, sehingga kontak antartpartikel simplisia dengan pelarut semakin besar

Ekstraksi buah *R. mucronata* menggunakan metode sonikasi yang memanfaatkan gelombang ultrasonik dengan amplitudo 40% selama 30 menit.

Rendemen ekstrak yang dihasilkan sebesar 18,2%. Hasil perhitungan rendemen ini diperoleh dari pembagian berat akhir ekstrak buah *R. mucronata* dengan berat tepung buah *R. mucronata* sebagai berat awal dikali 100%. Perhitungan rendemen setiap proses yakni dari bahan baku buah *R. mucronata* hingga menjadi ekstrak buah *R. mucronata* dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2. Uji Fitokimia

Fitokimia merupakan senyawa bioaktif yang terdapat pada tumbuhan yang bermanfaat bagi manusia sebagai makronutrien dan mikronutrien. Senyawa fitokimia berfungsi melindungi tumbuhan dari penyakit dan kerusakan, serta berkontribusi memberi warna, aroma, dan rasa (Saxena *et al.*, 2013). Pengujian fitokimia dilakukan secara kualitatif yakni dengan mengidentifikasi ada tidaknya kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak buah *R. mucronata*. Metabolit sekunder yang diuji dalam penelitian ini terdiri atas senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid, dan steroid. Kandungan fitokimia pada ekstrak buah *R. mucronata* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji fitokimia ekstrak buah *R. mucronata*

Senyawa Fitokimia	Hasil	Keterangan
Alkaloid		
• Wagner	+	Terbentuknya endapan coklat
• Dragendroff	+	Terbentuk endapan jingga kekuningan
Flavonoid	+	Terbentuknya warna jingga
Tanin	+	Terbentuknya warna kehitaman
Saponin	+	Terbentuknya banyak busa saat dikocok
Triterpenoid	+	Terbentuknya cincin ungu kecoklatan
Steroid	-	Tidak terbentuk warna hijau kebiruan

Keterangan : (+) mengandung senyawa fitokimia

(-) tidak mengandung senyawa fitokimia

Tabel 6 menunjukkan bahwa ekstrak buah *R. mucronata* positif mengandung senyawa metabolit sekunder pada uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid, sedangkan hasil negatif ditunjukkan pada senyawa steroid.

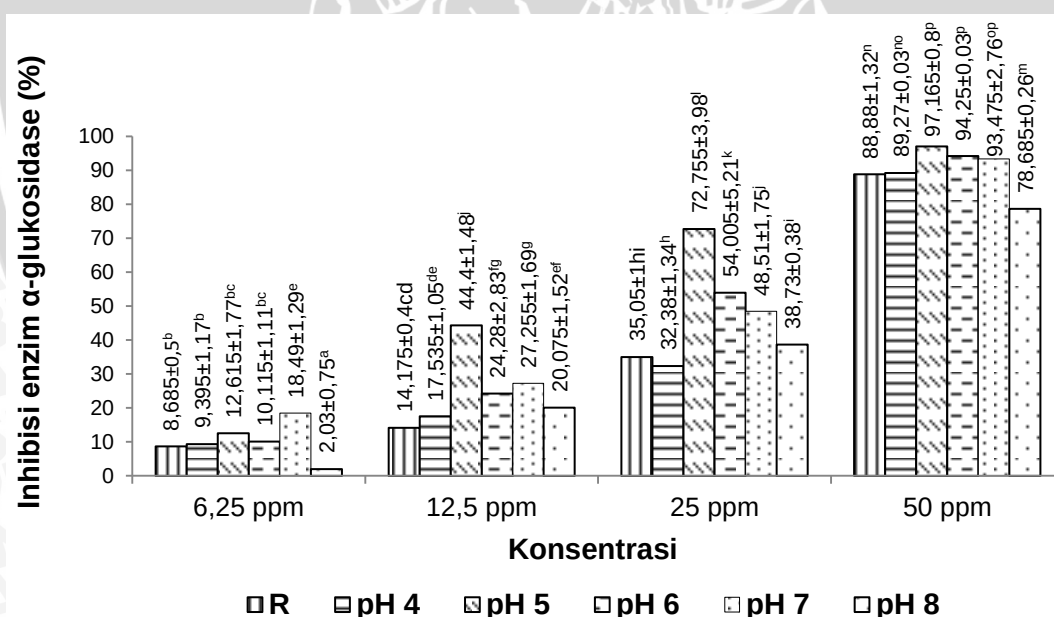
Disebutkan oleh Tandi (2010) bahwa senyawa tanin dapat mempengaruhi metabolisme karbohidrat dengan mengikat pati sehingga sukar dicerna oleh enzim amilase. Oleh karena itu, tanin mampu menghambat aktivitas enzim dalam menghidrolisis monosakarida yang menyebabkan penurunan penyerapan glukosa. Agustin *et al.*, (2015) menduga bahwa kandungan flavonoid yang mempunyai mekanisme sebagai inhibitor α -glukosidase yang dapat menghambat penyerapan glukosa dalam usus halus berpotensi untuk menurunkan kadar glukosa darah. Senyawa bioaktif yang juga dapat berfungsi sebagai antidiabetes adalah steroid yang merupakan bagian struktur aglikon dari saponin yang mampu menstimulasi keluarnya insulin dari pankreas sehingga dapat menurunkan kadar gula darah Febrinda *et al.* (2013) menyebutkan enzim α -glukosidase secara efektif juga dapat dihambat oleh flavonol, luteolin, myricetin, dan quersetin. Sehingga kemampuan aktivitas inhibitor α -glukosidase tidak terlepas dari senyawa fitokimia.

4.3. Pengaruh pH Ekstrak Buah *R. mucronata* terhadap Aktivitas Enzim α -Glukosidase

Enzim α -glukosidase berfungsi memecah karbohidrat menjadi glukosa pada usus halus manusia (Rahman, 2011). Mekanisme pemecahan polisakarida kompleks akan dihidrolisis menjadi dekstrin oleh enzim amilase setelah itu diubah menjadi glukosa oleh enzim α -glukosidase sebelum memasuki sirkulasi darah melalui penyerapan epitelium (Febrinda *et al.*, 2013). Karena dengan dihambatnya kerja enzim α -glukosidase, maka dapat menunda penguraian oligosakarida menjadi monosakarida (Loranza, 2012). Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase dilakukan dengan membandingkan ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan, ekstrak buah *R. mucronata* yang diberi perlakuan pH 4, 5, 6, 7, 8 dengan acarbose sebagai kontrol positif.

Dalam pengujian aktivitas enzim α -glukosidase menggunakan konsentrasi inhibitor sebesar 6,25 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm. Pembuatan konsentrasi ekstrak buah *R. mucronata* dalam uji inhibisi enzim α -glukosidase berdasarkan berat kering yang menghubungkan kadar air ekstrak buah *R. mucronata*. Pembuatan konsentrasi berdasarkan berat kering diharapkan mampu memberi data yang lebih valid. Hal ini dikarenakan tingkat kekentalan ekstrak buah *R. mucronata* dalam penelitian ini berbeda-beda. Perhitungan konsentrasi ekstrak buah *R. mucronata* berdasarkan berat kering dapat dilihat pada Lampiran 14.

Berdasarkan ANOVA (*Analysis of Variance*) atau analisis sidik ragam menunjukkan bahwa konsentrasi inhibitor memberi pengaruh yang berbeda sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap % inhibisi enzim α -glukosidase dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Hubungan konsentrasi pH ekstrak buah *R. mucronata* dan acarbose dengan % inhibisi enzim α -glukosidase

Keterangan:

R = ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan (pH ±3,4)

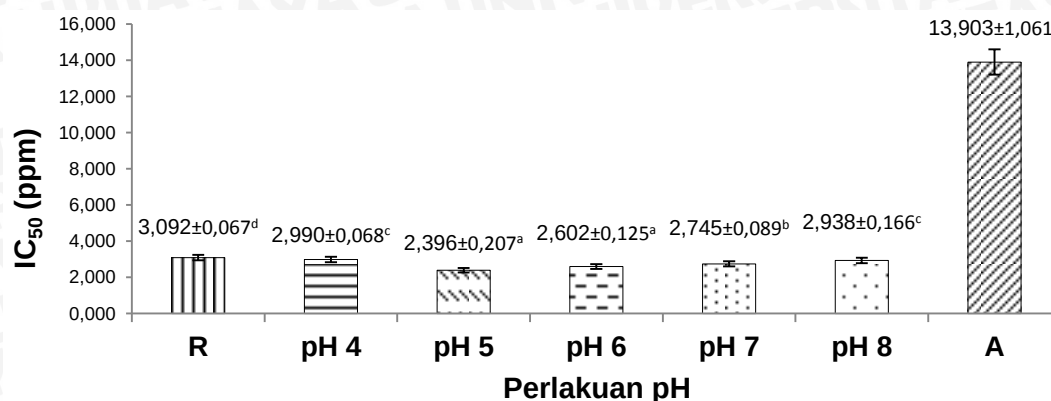
A = acarbose

Notasi menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antarkonsentrasi ($p < 0,05$)

Berdasarkan uji lanjut BNT (Beda Nyata Terkecil) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antarperlakuan sampel ekstrak buah *R. mucronata*, baik tanpa perlakuan dan dengan perlakuan pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8. Hal ini dapat dilihat adanya perbedaan notasi pada setiap konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula % inhibisi yang dihasilkan. Besarnya % inhibisi ditentukan dengan terbentuknya indikator warna kuning yang dihasilkan sebagai tanda adanya reaksi pembentukan p-nitrofenol. Semakin pekat warna kuning yang dihasilkan menandakan semakin kecil kemampuan inhibitor dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Kemampuan inhibitor dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase dapat menunda penguraian oligosakarida menjadi monosakarida sehingga mampu mengurangi penyerapan gula oleh darah.

Penggunaan 4 tingkat konsentrasi ekstrak yang berbeda bertujuan untuk mendapatkan nilai IC_{50} (konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim) sebagai penentuan pH ekstrak terbaik dalam menghambat enzim α -glukosidase. Semakin rendah nilai IC_{50} yang didapatkan maka semakin tinggi kemampuan ekstrak dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Nilai IC_{50} ditentukan dengan cara membuat kurva antara penggunaan konsentrasi yang berbeda dengan % inhibisi enzim α -glukosidase. Purwatresna (2012) menjelaskan bahwa nilai regresi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa terdapat hubungan dengan linieritas tinggi antara konsentrasi p-nitrofenol dengan nilai absorbannya. Linieritas yang tinggi antara keduanya menjadikan kurva standar yang diperoleh dapat digunakan sebagai acuan dalam menghitung konsentrasi produk (p-nitrofenol) yang terbentuk saat analisis daya inhibisi dan mekanisme inhibisi α -glukosidase secara in vitro.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa pH memberikan pengaruh yang sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap hasil IC_{50} enzim α -glukosidase pada taraf kepercayaan 95% dapat dilihat pada Gambar 10 (Lampiran 4).



Gambar 10. Grafik IC_{50} ekstrak buah *R. mucronata* dalam inhibisi enzim α -glukosidase

Keterangan:

R = ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan (pH $\pm 3,4$)

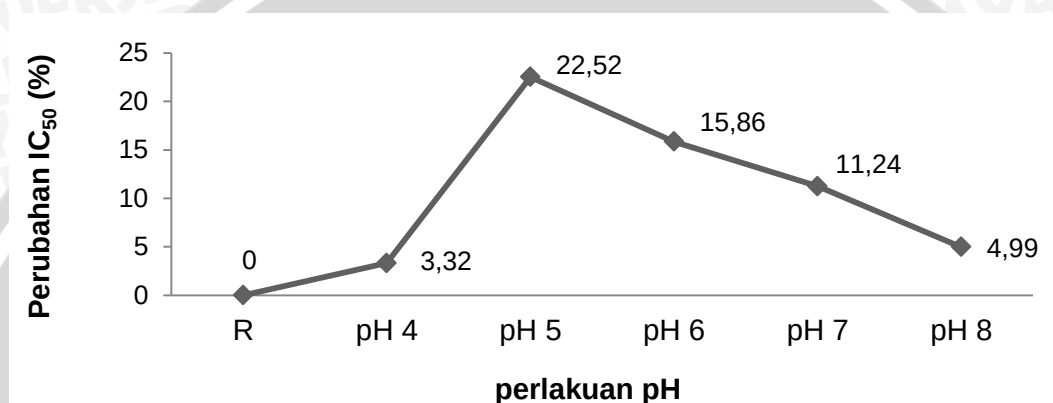
A = acarbose

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antarperlakuan ($p < 0,05$)

Gambar 10 menunjukkan bahwa pH ekstrak buah *R. mucronata* mempengaruhi aktivitas enzim α -glukosidase. Berdasarkan uji lanjut BNT, ekstrak buah *R. mucronata* pH 5 tidak berbeda nyata dengan ekstrak pH 6 yang merupakan pH optimum sekaligus pH terbaik ekstrak dalam menginhibisi enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 2,396 ppm dan 2,602 ppm. Pada ekstrak pH 7 memiliki nilai IC_{50} yang berbeda nyata dengan ekstrak R, pH 4, pH 5, pH 6, pH 8. Sedangkan ekstrak pH 4 tidak memiliki perbedaan yang nyata dengan ekstrak pH 8. Untuk ekstrak tanpa perlakuan dalam penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan sampel ekstrak lainnya dan memiliki nilai IC_{50} tertinggi dibandingkan sampel ekstrak buah *R. mucronata* lainnya. Dengan demikian urutan perlakuan pH ekstrak buah *R. mucronata* terbaik hingga terburuk dalam menginhibisi berturut-turut adalah ekstrak pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 4, dan ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan.

Persentase perubahan IC_{50} oleh pH ekstrak buah *R. mucronata* dapat dilihat pada Gambar 11. Perhitungan perubahan persentase IC_{50} berdasarkan perbandingan selisih nilai IC_{50} ekstrak tanpa perlakuan dengan pH ekstrak terhadap nilai IC_{50} ekstrak tanpa perlakuan yang dapat lihat berdasarkan rumus berikut:

$$\% \text{ Perubahan } IC_{50} = \frac{(IC_{50} \text{ ekstrak tanpa perlakuan pH} - IC_{50} \text{ ekstrak dengan perlakuan pH})}{IC_{50} \text{ ekstrak tanpa perlakuan pH}} \times 100\%$$



Gambar 11. Grafik perubahan IC_{50} terhadap pH ekstrak buah *R. mucronata*
Keterangan:
R = ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan (pH $\pm 3,4$)

Grafik menunjukkan pemberian suasana keasaman yang berbeda berpengaruh pada keefektifan ekstrak buah *R. mucronata* dalam menghambat enzim α -glukosidase. Ekstak buah *R. mucronata* pada penelitian ini memiliki pH asam yakni $\pm 3,4$. Peningkatan nilai pH pada ekstrak buah *R. mucronata* berpengaruh pada tingkat efektivitas ekstrak dalam menghambat enzim α -glukosidase. Pada ekstrak pH 4, efektivitas dalam menghambat enzim α -glukosidase meningkat sebesar 3,32% dari ekstrak R. Daya hambat enzim pada ekstrak pH 5 yang merupakan pH optimum mampu meningkatkan efektivitasnya sebesar 19,20% dari ekstrak pH 4. Sedangkan pada pH 6 efektivitas ekstrak mulai menurun dari ekstrak pH 5 sebesar 6,66%. Begitupula pada ekstrak pH 7 dan 8 yang menunjukkan penurunan tingkat efektivitas daya hambat enzim terhadap ekstrak pH 6 dan pH 7 berturut-turut sebesar 4,61% dan 6,26%.

Data juga menunjukkan bahwa ekstrak buah *R. mucronata* memiliki potensi yang lebih baik daripada acarbose dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Ekstrak buah *R. mucronata* lebih efektif karena memiliki nilai IC_{50} yang lebih rendah dari IC_{50} acarbose yakni sebesar 13,903 ppm (Lampiran 5). Hal ini sesuai dengan pernyataan Apriani (2012) bahwa nilai IC_{50} acarbose yang lebih tinggi dari sampel uji, kemungkinan disebabkan karena acarbose merupakan senyawa murni sedangkan sampel yang diuji masih berupa ekstrak kasar, sehingga dalam larutan ekstrak terdapat lebih dari satu senyawa inhibitor yang dapat menyebabkan daya inhibisi lebih tinggi.

Acarbose merupakan senyawa oligosakarida yang berasal dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis* yang memiliki rumus empiris $C_{25}H_{43}NO_{18}$. Senyawa oligosakarida kompleks ini merupakan inhibitor kompetitif potensial dari enzim α -glukosidase yang bekerja di *brush border* untuk memecah pati, dekstrin, maltose, dan sukrosa menjadi monosakarida yang dapat dicerna (Febrinda *et al.*, 2013).

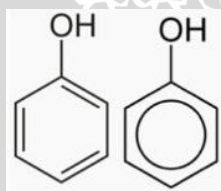
Purbowatiningrum *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas enzim maksimal. pH optimum menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi aktif enzim berada pada kondisi ionisasi yang diinginkan. Perubahan keadaan ionik dari residu asam amino dari molekul enzim dan substrat oleh pH akan menyebabkan perubahan efisiensi ikatan substrat.

Enzim bekerja pada pH tertentu, dimana pada pH optimum enzim memiliki struktur 3 dimensi yang tepat dan konformasi terbaik (keadaan ionisasi yang tepat pada sisi aktif enzim) sehingga enzim dapat mengikat dan mengolah substrat dengan kecepatan maksimum. Enzim maupun substrat dapat mengalami perubahan muatan listrik bila di luar pH optimum yang

mengakibatkan enzim tidak dapat mengikat substrat. Kondisi lingkungan yang asam atau di bawah pH optimum akan menyebabkan kelebihan ion H^+ yang akan berikatan dengan sisi aktif enzim atau sisi lain enzim yang bermuatan negatif sehingga struktur enzim menjadi terbuka. Kondisi lingkungan yang basa atau di atas pH optimum akan terjadi kekurangan ion H^+ yang menyebabkan substrat cenderung terprotonasi. Kondisi di luar pH optimum tersebut mengakibatkan tidak terjadi kontak enzim dengan substrat sehingga tidak terbentuk kompleks enzim-substrat (Handayani *et al.*, 2008).

4.4. Total Fenol

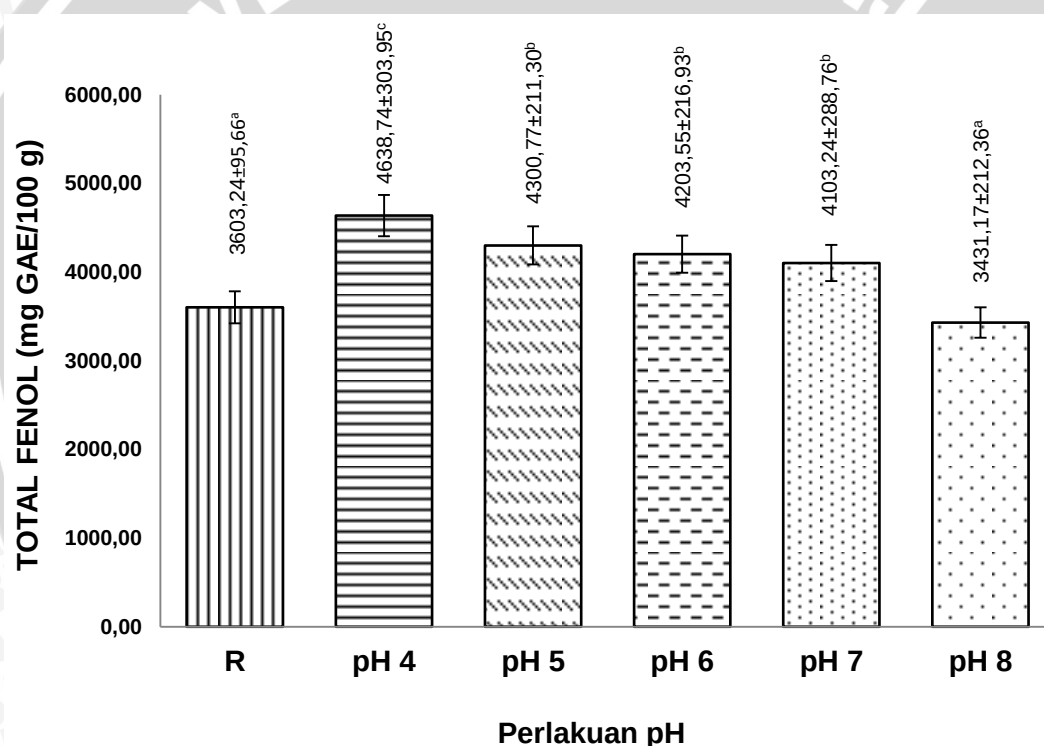
Senyawa fenolik adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel dicincin aromatik/benzena. Benzena merupakan cincin yang dibentuk oleh enam buah atom karbon yang berikatan secara semi rangkap (terkonjugasi) (Andarwulan dan Faradilla, 2012). Senyawa ini termasuk dalam golongan senyawa polar. Kelompok fenol terdiri dari ribuan senyawa, meliputi flavonoid, fenilpropanoid, asam fenolat, antosianin, pigmen kuinon, melanin, lignin, dan tanin (Harborne, 1996). Penentuan total fenol dilakukan dengan mereaksikan reagen Folin-Ciocalteu dengan sampel ekstrak yang membentuk warna ungu. Struktur senyawa fenol dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Struktur senyawa fenol (Wikipedia, 2015)

Total fenol dihitung berdasarkan kurva standar asam galat (Lampiran 6). Hasil ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan pH berpengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap total fenol pada taraf kepercayaan 95%. Gambar 13

menunjukkan total fenol pada pH 4, 5, 6, 7, dan 8 mengalami penurunan. Nilai total fenol tertinggi ditunjukkan pada pH 4 sebesar 4638,74 mg GAE/100 g, sedangkan nilai terendah ditunjukkan pada pH 8 sebesar 3431,17 mg GAE/100 g. Ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan diuji serta sebagai pembandingan. Ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan bersifat asam dengan kisaran nilai pH $\pm 3,4$ dan mengandung fenol sebesar 3603,24 mg GAE/100g. Nilai total fenol ekstrak tanpa perlakuan yang lebih kecil daripada ekstrak pH 4 menunjukkan bahwa ekstrak dengan pH 4 merupakan pH optimum untuk total tanin yang dihasilkan.



Gambar 13. Grafik pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total fenol

Keterangan:

R = ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan (pH $\pm 3,4$)

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antarperlakuan (p<0,05)

Berdasarkan uji lanjut BNT menunjukkan bahwa total fenol antarperlakuan pH memiliki nilai yang berbeda sangat nyata. Total fenol ekstrak

buah *R. mucronata* pH 4 memiliki nilai yang berbeda sangat nyata dengan nilai total fenol ekstrak tanpa perlakuan, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8. Pada ekstrak tanpa perlakuan memiliki nilai yang berbeda nyata dengan ekstrak pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, tetapi tidak berbeda nyata dengan ekstrak pH 8. Sedangkan ekstrak pH 5 tidak berbeda nyata dengan pH 6 dan pH 7. Perhitungan statistika pengaruh pH ekstrak terhadap total fenol dapat dilihat pada Lampiran 8. Rahmi (2007) menjelaskan pada pH yang lebih tinggi, persen adsorpsi semakin menurun karena peningkatan pH mengurangi konsentrasi H^+ dalam larutan, sehingga keseimbangan kembali bergeser ke kiri dan persen adsorpsi fenol pada polimer komposit semakin rendah.

Secara umum senyawa fenolik merupakan asam lemah. Suatu senyawa dikatakan asam jika senyawa tersebut dapat melepaskan proton (H^+) di dalam larutan. Asam kuat merupakan senyawa yang terdisosiasi (terpisah dengan protonnya) secara sempurna. Asam lemah tidak terdisosiasi sempurna atau berada dalam kesetimbangan dalam bentuk disosiasinya. Konstanta keasaman (K_a) menyatakan tingkat pelepasan proton tersebut. Semakin tinggi nilai K_a suatu senyawa, semakin asam senyawa tersebut. Fenol bersifat asam karena anion yang terbentuk stabil ketika setelah pelepasan proton. Kestabilan tersebut disebabkan oleh terjadinya resonansi sehingga muatan negatif dapat disebar (delokalisasi). Substitusi yang terjadi pada fenol dapat mempengaruhi tingkat keasaman senyawa fenolik. Beberapa substituen (gugus yang disubstitusi) dapat meningkatkan tingkat keasaman dan beberapa lagi memberikan pengaruh sebaliknya. Substituen penarikan elektron ($-Cl$, $-Cl=O$, $-NO_2$) cenderung menarik elektron yang terdapat di fenol sehingga proton (H^+) terikat lebih lemah dan mudah untuk dilepaskan. Sebaliknya, substituen penyumbang elektron ($-OCH_3$, $-CH_3$) cenderung memberikan elektronnya kepada fenol sehingga proton sulit terlepas (Andarwulan dan Faradilla, 2012).

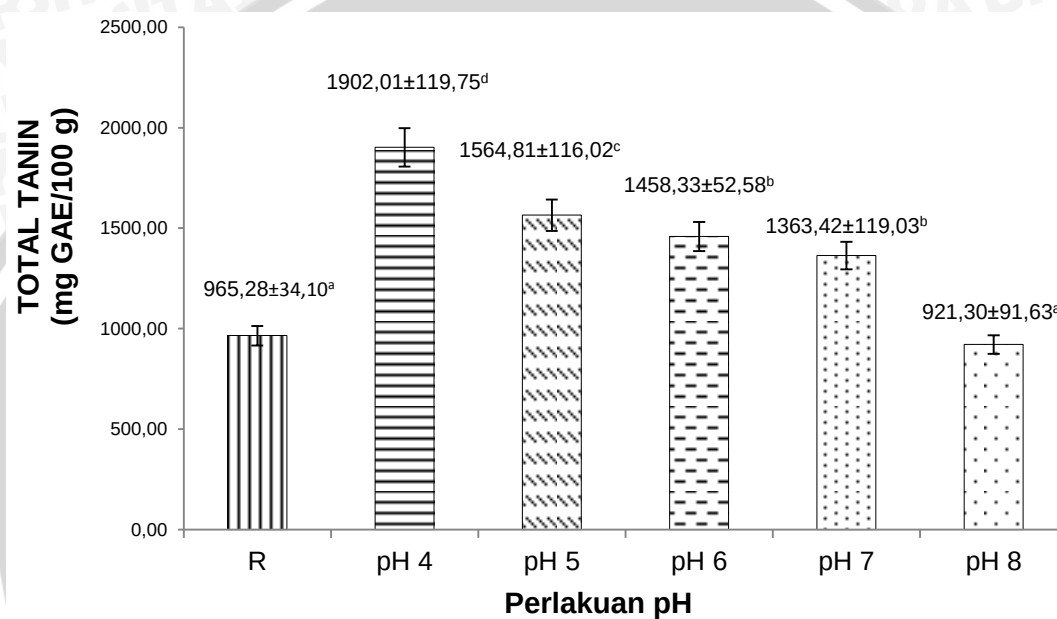
Korelasi IC_{50} dengan total fenol dalam penelitian ini menunjukkan hubungan yang negatif. Nilai IC_{50} terbaik ditunjukkan pada pH 5 sedangkan total fenol terbesar ditunjukkan oleh pH 4. Hal ini kemungkinan disebabkan karena enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas enzim maksimal. Selain itu diduga adanya senyawa aktif lainnya yang bukan dari golongan fenol seperti alkaloid, saponin, triterpenoid yang mampu menghambat enzim α -glukosidase.

4.5. Total Tanin

Tanin tergolong senyawa polifenol dengan karakteristiknya yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan makromolekul lainnya (Harborne, 1984). Total tanin ditentukan dengan mengikat senyawa tanin dalam ekstrak oleh senyawa PVPP sehingga didapatkan total non tanin. Untuk mendapatkan total tanin dilakukan pengurangan total fenol dengan total non tanin. Tanin termasuk dalam senyawa fenol yang bersifat polar.

Gambar 14 menunjukkan bahwa perlakuan pH ekstrak *R. mucronata* berpengaruh terhadap total tanin. Berdasarkan hasil ANOVA, pH ekstrak buah *R. mucronata* berpengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap total tanin pada taraf kepercayaan 95%. Hasil analisis keragaman total tanin dapat dilihat pada Lampiran 10. Gambar 14 menunjukkan bahwa ekstrak dari pH 4 sampai pH 8 menunjukkan total tanin yang terus mengalami penurunan. Total tanin tertinggi terdapat pada ekstrak pH 4 sebesar 1902,01 mg GAE/100 g dan terendah pada ekstrak pH 8 sebesar 921,30 mg GAE/100 g. Pada ekstrak *R. mucronata* tanpa perlakuan dengan nilai pH $\pm 3,4$, nilai total taninnya lebih kecil dari pH 4 yakni sebesar 965,28 mg GAE/100 g. Dengan demikian pH 4 merupakan pH optimum ekstrak *R. mucronata* terhadap total tanin. Berdasarkan uji lanjut BNT, ekstrak

pH 4 menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan ekstrak tanpa perlakuan, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8. Begitula dengan ekstrak pH 5 yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata terhadap sampel ekstrak lainnya. ekstrak tanpa perlakuan menunjukkan tidak beda nyata dengan ekstrak pH 8. Sedangkan ekstrak pH 6 menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata dengan ekstrak pH 7.



Gambar 14. Pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* terhadap totan tanin

Keterangan:

R = ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan (pH ±3,4)

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antarperlakuan (p<0,05)

Tanin adalah senyawa polifenol dengan bobot molekul yang tinggi dan mempunyai kemampuan untuk membentuk kompleks dengan karbohidrat dan protein (Maldonado, 1994). Tanin yg membentuk ikatan kompleks dengan protein mampu menurunkan daya cerna karena pada pH di atas 3,5 kompleks tanin-protein menjadi stabil (Tanuwiria, 2007). Senyawa kompleks tanin dengan karbohidrat tersebut mampu memperlambat metabolisme karbohidrat menjadi

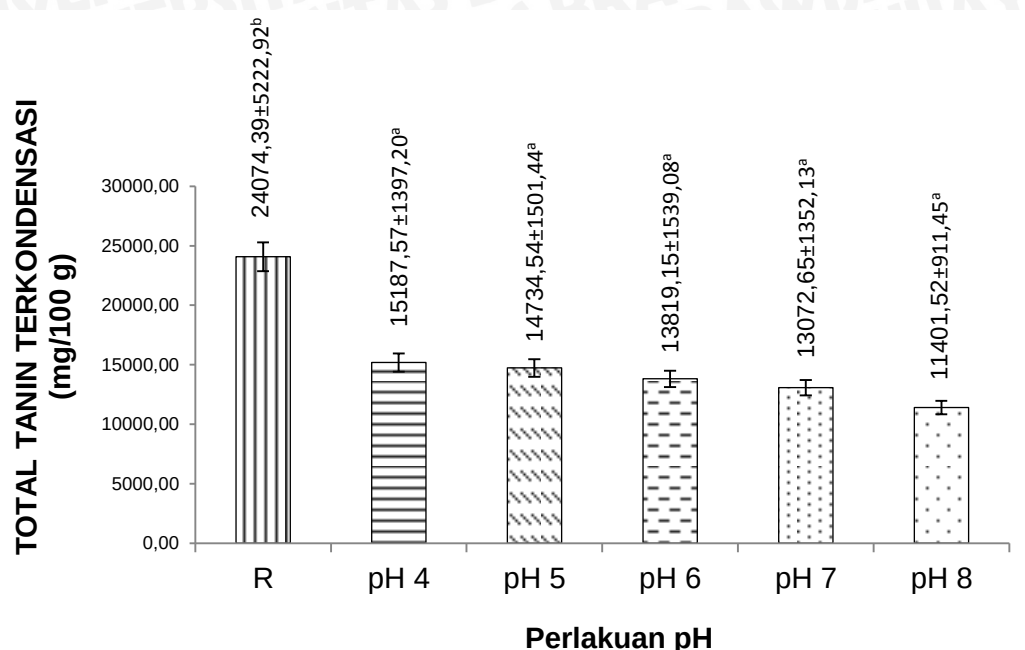
gulokasa, dengan kata lain senyawa kompleks tanin dengan karbohidrat mampu menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.

Korelasi IC_{50} dengan total fenol dalam penelitian ini menunjukkan hubungan yang negatif. Nilai IC_{50} terbaik ditunjukkan pada pH 5 sedangkan total tanin terbesar ditunjukkan oleh pH 4. Hal ini kemungkinan disebabkan karena terkandungnya senyawa non tanin dalam ekstrak buah *R. mucronata* yang efektif dalam menginhibisi enzim α -glukosidase.

4.6. Total Tanin Terkondensasi (Proantosianidin)

Tanin adalah senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan. Senyawa tanin merupakan turunan polifenol dengan karakteristiknya yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan makromolekul lainnya. Umumnya senyawa tanin larut dalam air (polar). Secara kimia terdapat dua jenis tanin, yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis (Harborne, 1984). Tanin terkondensasi adalah golongan tanin yang terjadi karena proses kondensasi flavonol. Tanin terkondensasi sering disebut sebagai proantosianidin yang merupakan polimer dari katekin dan epikatekin (maldonado, 1994). Kelompok senyawa ini kurang disukai dalam makanan karena menimbulkan rasa pahit dan warna yang gelap. Selain itu senyawa proantosianidin juga merupakan zat antinutrisi yang dapat menurunkan daya cerna protein, polisakarida, dan zat makronutrien lainnya (Andarwulan dan Faradillah, 2012).

Penentuan total tanin terkondensasi dilakukan dengan metode Butanol-HCl. Hasil ANOVA menunjukkan pH ekstrak buah *R. mucronata* berpengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap total tanin terkondensasi pada taraf kepercayaan 95%. Pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total tanin terkondensasi dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* terhadap total tanin terkondensasi

Keterangan:

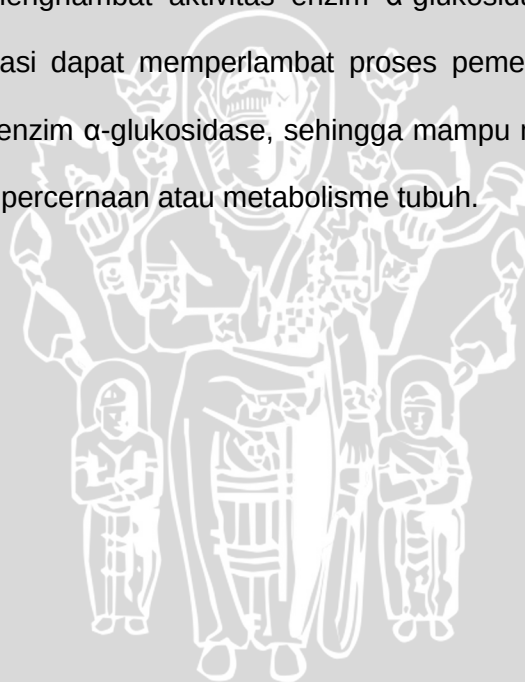
R = ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan (pH ±3,4)

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antarperlakuan (p<0,05)

Gambar 15 menunjukkan bahwa semakin tinggi pH ekstrak buah *R. mucronata* dalam rentang pH 4 sampai 8, maka semakin rendah tanin terkondensasi yang terkandung dalam ekstrak. Berdasarkan uji lanjut BNT diketahui bahwa total tanin terkondensasi ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan memiliki perbedaan yang sangat nyata terhadap total tanin terkondensasi pada ekstrak perlakuan pH 4, 5, 6, 7 dan 8. Penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan tanin terkondensasi pada ekstrak buah *R. mucronata* yang telah melalui karakteristik pH menunjukkan adanya penurunan kadar tanin terkondensasi yang cukup signifikan daripada ekstrak tanpa perlakuan. Hal ini kemungkinan terjadi akibat penambahan reagen asam maupun basa dapat mempengaruhi aktivitas biologis tanin sehingga terjadi ketidakstabilan senyawa dalam ekstrak. Sedangkan pada ekstrak pH 4-8

menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antarperlakuan. Hasil Analisis keragaman pengaruh pH terhadap total tanin terkondensasi dapat dilihat pada Lampiran 12.

Tanin terkondensasi umumnya mempunyai ikatan kompleks dengan protein lebih kuat dibandingkan dengan tanin terhidrolisis, sehingga kompleks tanin terkondensasi-protein mempunyai pengaruh kuat dalam menurunkan pencernaan. Tanin terhidrolisis dapat menyebabkan keracunan yang tingkatannya bervariasi akibat dari proses hidrolisis tersebut (Tanuwiria, 2007). Penurunan daya cerna oleh tanin terkondensasi inilah yang diduga serta mempunyai kemampuan dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Dengan kata lain, tanin terkondensasi dapat memperlambat proses pemecahan karbohidrat menjadi glukosa oleh enzim α -glukosidase, sehingga mampu menurunkan kadar glukosa dalam proses pencernaan atau metabolisme tubuh.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- ✓ Perlakuan pH 5 ekstrak buah *R. mucronata* merupakan pH optimum dalam menginhibisi enzim α -glukosidase dengan nilai IC₅₀ terendah yakni sebesar 2,396 ppm.
- ✓ Nilai optimum total fenol ditunjukkan pada ekstrak buah *R. mucronata* pH 4 yakni sebesar 4638,74 mg GAE/100 g.
- ✓ Nilai optimum total tanin ditunjukkan pada ekstrak buah *R. mucronata* pH 4 yakni sebesar 1902,01 mg GAE/100 g.
- ✓ Pada parameter total tanin terkondensasi menunjukkan nilai tertinggi didapatkan dari ekstrak buah *R. mucronata* tanpa perlakuan dengan nilai 24074,39 mg/100 g dan terendah pada ekstrak pH 8 sebesar 11401,52 mg/100 g.

5.2. Saran

Peneliti menyarankan untuk penelitian selanjutnya bisa dilakukan metode ekstraksi yang berbeda dan menggunakan pelarut yang tingkat kepolarannya lebih tinggi supaya rendemen senyawa fenolik target yang diinginkan dapat diekstraksi secara maksimal. Selain itu juga disarankan untuk menguji pengaruh pH ekstrak buah *R. mucronata* dengan parameter uji lainnya baik secara in-vivo maupun in-vitro.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, L., L. Mulqie., R. Choesrina. 2015. Uji Aktivitas Antihiperglikemia Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus Altilis* Parkinson Ex F.A.Zorn) Fosberg) pada Mencit Swiss Webster Jantan dengan Metode Uji Toleransi Glukosa. *Prosiding Penelitian SPeSIA Uniba*: 324-331.
- Andarwulan, N., R.H.F. Faradilla. 2012. Senyawa Fenolik pada Beberapa Sayuran *Indigenous* dari Indonesia. Tropical Plant Curriculum (TPC) Project. SEAFast Center IPB. Bogor. 150 hlm.
- Apriani, R. 2012. Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Aktif pada Ekstrak Kulit Batang *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Ness) Blume. Skripsi Universitas Indonesia. 87 hlm.
- Apriyanto, A., D. Fardiaz., N.L. Puspitasari., Sedorwanati., S. Budiyanto. 1989. Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan. IPB Press. Bogor. 171 hlm.
- Ashraf, J.M., M.Y. Arfat., Z. Arif., J. Ahmad., Moinuddin., K. Alam. 2015. A Clinical Correlation of Anti-DNA-AGE Autoantibodies in Type 2 Diabetes Mellitus with Disease Duration. *Cellular Immunology* 293: 74–79.
- Awika, J.M., L. Yang., J.D. Browning., A. Faraj. 2009. Comparative Antioxidant, Antiproliferatif and Phase II Enzyme Inducing Potential of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Varieties. *LWT-Food Science and Technology Journal* 42: 1041-1046.
- Browning, B. L. 1966. Methods of Wood Chemistry. Vol I, II. Interscience Publishers. New York. Dikutip dari Jurnal Penelitian I. Risnasari. 2002. TANIN. Fakultas Pertanian Universitas Sumatra Utara. 8 hlm.
- Chen, H., X. Yan., W. Lin., L. Zheng., W. Zhang. 2004. A New Method for Screening α -Glucosidase Inhibitors and Application to Marine Microorganisms. *Pharmaceutical Biology* 42 (6): 416–421.
- Danarto, Y.C., S.A. Prihananto., Z.A. Pamungkas. 2011. Pemanfaatan Tanin dari Kulit Kayu Bakau sebagai Pengganti Gugus Fenol pada Resin Fenol Formaldehid. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”. *Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*. 1-5 hlm.
- Departemen Kehutanan. 1997. Strategi Nasional Pengelolaan Mangrove di Indonesia. Jilid 2: Strategi dan Rancang Tindak. Departemen Kehutanan RI. Jakarta. 81 hlm.
- Departemen Kesehatan RI. 2005. Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Mellitus. Jakarta. 85 hlm.

- Direktorat Jenderal Reboisasi dan Rehabilitasi Lahan. 1997. Petunjuk Teknis Pedoman *Rhizophora mucronata*. Departemen Kehutanan. Jakarta. 75 hlm.
- Fachry, A.R., R.M.A. Sastrawan., G. Svingkoe. 2012. Kondisi Optimal Proses Ekstraksi Tanin dari Daun Jambu Biji Menggunakan Pelarut Etanol. *PROSIDING SNTK TOPI*: 69-73 hlm.
- Fajriati, I. 2006. Optimasi Metode Penentuan Tanin (Analisis Tanin secara Spektrofotometri dengan Pereaksi Orto-Fenantrolin). *Kaunia* **2** (2): 107-120.
- FAO. 2000. *Quantification of Tannins in Tree Foliage*. FAO/IAEA Working Document, IAEA, VIENNA. 25 hlm.
- Febrinda, A.E., M. Astawan., T. Wresdiyati., N.D. Yuliana. 2013. Kapasitas Antioksidan dan Inhibitor α -Glukosidase Ekstrak Umbi Bawang Dayak. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* **24** (2): 161-167.
- Febriyanti. 2012. Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Penghambatan Aktivitas Alfa-Glukosidase dari Kulit Batang Kayu Tuah (*Antidesma celebicum* Miq.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif. Skripsi FMIPA Universitas Indonesia. Depok. 62 hlm.
- Fernando, R., M.R. Nasution, J. Syahri. 2013. Uji Bioaktivitas Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai Inhibitor Enzim A-Glukosidase. 12 hlm.
- Handayani, S. N., Zufahair., R. D. Rizaeni. 2008. Penggunaan Enzim Peroksidase dari Daun Mangkogan untuk Penurunan Kadar Fenol. *Seminar Nasional Aplikasi Sains dan Teknologi*: 189-194 hlm.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia. Terjemahan oleh Dr. Kokasih Pudmawinata dan Dr. Iwang Soediro. Penerbit ITB. Bandung. 354 hlm.
- Hardoko., E. Suprayitno., Y.E. Puspitasari. 2014. Karakterisasi Bioaktif Tepung Buah Bakau *Rhizophora mucronata* sebagai Pangan Fungsional Antidiabetes. Laporan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi. Universitas Brawijaya. Malang. 87 hlm.
- Haron, H., N. Raob. 2014. Changes in Macronutrient, Total Phenolic and Anti-Nutrient Contents during Preparation of Tempeh. *J Nutr Food Sci* **4** (2): 1-5.
- Hernawan, U.D., A.D. Setyawan. 2003. REVIEW: Ellagitanin; Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi. *Biofarmasi* **1** (1): 25-38.
- Kristianingrum. 2000. Spektroskopi Ultra Violet dan Sinar Tampak (Spektroskopi Uv – Vis). Handout Universitas Negeri Yogyakarta. 33 hlm.
- Kristianto, A. 2013. Pengaruh Ekstrak Kasar Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.) pada Pengolahan Air. Skripsi FMIPA Universitas Jember. 40 hlm.

- Loranza, B. 2012. Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif Daun Buni (*Antidesma bunius* L.). Skripsi FMIPA Universitas Indonesia. Depok. 99 hlm.
- Maldonado. 1994. Profil Daya Rekat dan Kinerja Resim Fenolik: Aplikasi dalam Teknologi Papan Pertikel. Skripsi Institut Pertanian Bogor. Bogor. 96 hlm.
- Manaf, A. 2010. Use of Acarbose to Control Postprandial Hyperglycemia in Reducing Macrovascular Complication. *pit xi dep pd fk usu*. 14 hlm.
- Marliana, S.D., V. Suryanti., Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi* **3** (1): 26-31.
- Martawijaya, A. 1992. Indonesia Wood Atlas 2. Badan Pengembangan dan Penelitian Kehutanan. Bogor. 52 hlm.
- Mayes, P.A., D.K. Granner., V.W. Rodwell., D.W. Martin. 1987. Biokimia (Harper's Review of Biochemistry) Edisi 20. Terjemahan oleh Dr. Iyan Darmawan. EGC. Jakarta. 774 hlm.
- Mukti, K. 2012. Analisis Spektroskopi Uv-Vis "Penentuan Konsentrasi Permanganat (KMnO_4)". FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta. 1-18 hlm.
- Murdiyanto, B. 2003. Proyek Pembangunan Masyarakat Pantai dan Pengelolaan Sumber Daya Perikanan. Jakarta. 85 hlm.
- Najib, A. 2010. *Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Aktif Inhibitor α -Glukosidase Dari Fraksi N-Butanol Rimpang Acorus calamus L.* Tesis Universitas Indonesia. 44 hlm.
- Nazir, M. 1988. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta. 69 Hlm.
- Noor, Y.R., M. Khazali., IN.N. Suryadiputra. 1999. Panduan Pengelolaan Mangrove di Indonesia. PKAWI-IP. Bogor. 86 hlm.
- Nurchayanti, O. 2014. Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Daun Baru Laut (*Thespesia populnea* (L.) Soland Ex Correa) Pada Mus Musculus Terinfeksi Plasmodium Berghei dan Karakterisasi Hasil Isolasinya. Skripsi Universitas Bengkulu. 51 hlm.
- Pujiyanto, S., R.S. Ferniah. 2010. Aktifitas Inhibitor Alpha-Glukosidase Bakteri Endofit PR-3 yang Diisolasi dari Tanaman Pare (*momordica charantia*). *BIOMA* **12** (1): 1-5.
- Purbowatiningrum, R.S., Hasim., D. Iswantini. 2014. Pengembangan Metode Penentuan Isoflavon Kadar Rendah Dalam Limbah Cair Tahu Menggunakan Enzim NADH Oksidase. *Artikel: JKSA* **7** (1): 18-23.

- Purnobasuki, H. 2004. Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat. *Biota* **9** (2): 125-126.
- Purwaningsih, S., E. Salamah., A.Y.P. Sukarno., E. Deskawati. 2013. Aktivitas Antioksidan dari Buah Mangrove (*Rhizophora mucronata* Lamk.) pada Suhu yang Berbeda. *JPHPI* **16** (3): 199-206.
- Purwatresna, E. 2012. Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Air dan Etanol Daun Sirsak secara In Vitro melalui Inhibisi Enzim α -Glukosidase. Skripsi IPB. Bogor. 31 hlm.
- Puspitasari, Y.E. 2010. Aktivitas Antidiare Ekstrak Kasar Daun Bakau (*Rhizophora mucronata*) terhadap Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar. Tesis FPIK Universitas Brawijaya. Malang. 42 hlm.
- Rahim, A.A., E. Rocca., J. Steinmetz., M.J. Kassim., M.S. Ibrahim., H. Osman. 2008. Antioxidant Activities of Mangrove *Rhizophora apiculata* bark Extracts. *Food Chemistry* **107**: 200–207.
- Rahman, D.A. 2011. Aktivitas Antihiperglikemik dari Biomassa dan Polisakarida Ekstraseluler *Porphyridium cruentum* sebagai Inhibitor α -Glukosidase. Skripsi IPB. Bogor. 49 hlm.
- Rahmi. 2007. Adsorpsi Fenol pada Membran Komposit Khitosan Berikatan Silang. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan* **6** (1): 28-34.
- Rais, I.R., A.G. Samudra., S. Widyarini., A.E. Nugroho. 2013. Penentuan Aktivitas Isolat Andrografolid terhadap α -Amilase dan α -Glukosidase Menggunakan Metode Apostolidis dan Mayur. *Traditional Medicine Journal* **18** (3): 162-166
- Ramdanis, R. 2012. Penapisan dan Uji Efek Penghambatan Kapang Endofit Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King) terhadap Aktivitas α -Glukosidase. Skripsi FMIPA Universitas Indonesian. Depok. 76 hlm.
- Rengginasti, A.D. 2008. Pemisahan Senyawa Minyak Atsiri Rimpang Lempuyang Gajah (*Zingiber zerumbet*) secara Kromatografi Lapis Tipis dan Aktivitasnya terhadap *Malassezia Furfur* In Vitro. Artikel Penelitian Karya Tulis Ilmiah Universitas Diponegoro. Semarang. 21 Hlm.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB. 78 hlm.
- Sani, R.N., F.C. Nisa., R.D. Andriani., J.M. Maligan. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* **2** (2):121-126.
- Saxena, M., J. Saxena., R. Nema., D. Singh., A. Gupta. 2013. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*: 15.

- Sembiring, B. 2005. Status Teknologi Pasca Panen Sambiloto (*Andrographis paniculata* Needs). Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. 134-144 hlm.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 1997. Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta. 160 hlm.
- Sugiwati, S., S. Setiasih., E. Afifah. 2009. Antihyperglycemic Activity Of The Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] Leaf Extracts As An Alpha-Glucosidase Inhibitor. Makara, Kesehatan **13** (2): 74-78.
- Sukadarti, S., S.D. Kholisoh., H. Prasetyo., W.P. Santoso., T. Mursini. 2010. Menggunakan Jamur *Trichoderma reesei* Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*:1-7.
- Suseno, N., T. Adiarto., A. Dalton., P. Tendean. 2014. Ekstraksi Tanin Dari Kulit Kayu Pinus sebagai Bahan Perekat Briket. *Seminar Rekayasa Kimia dan Proses*. 1411-4216 hlm.
- Tandi, E.J. 2010. Pengaruh Tanin Terhadap Aktivitas Enzim Protease. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. 567-570 hlm.
- Tanuwiria, U.H. 2007. Proteksi Protein Tepung Ikan oleh Berbagai Sumber Tanin dan Pengaruhnya terhadap Fermentabilitas dan Kecernaannya (*In Vitro*). *Jurnal Agroland* **14** (1): 56-60.
- Umarudin., R. Susanti., A. Yuniastuti. 2012. Efektivitas Ekstrak Tanin Seledri Terhadap Profil Hiperkolesterolemi Lipid Tikus Putih. *Unnes Journal of Life Science* **1** (2): 78-85.
- Utami, T. S., R. Arbianti., H. Hermansyah., A. Reza., R. Rini. 2009. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpur (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA. *Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia*. 6 hlm.
- Wati, A., S.A. Motto. 2012. Ekstraksi Minyak dari Mikroalga Jenis *Chlorella sp* Berbantuan Ultrasonik. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang. 7 hlm.
- Wibisono, I.T.C., E.B. Priyanto., INN Suryadiputra. 2006. Panduan Praktis Rehabilitasi Pantai "Sebuah Pengalaman Merehabilitasi Kawasan Pesisir". Wetlands International-Indonesia Programme. Bogor. 81 hlm.
- Wicaksono, R.P. 2011. Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Kejadian Diabetes Melitus Tipe 2. Artikel Hasil Penelitian Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. 22 hlm.
- Wirahadikusumah, M. 1989. Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat. Penerbit ITB. Bandung. 91 hlm.

Zhou, H.C., N.F. Tam., Y.M. Lin, S.D. Wei., Y.Y. Li. 2012. Changes of Condensed Tannins During Decomposition of Leaves of *Kandelia obovata* in a Subtropical Mangrove Swamp in China. *Soil Biology and Biochemistry* **44**: 113-121.

Zipcodezoo. 2015. *Rhizophora mucronata*. http://zipcodezoo.com/index.php/Rhizophora_mucronata. Diakses pada tanggal 9 Februari 2015. 1 hlm.

Zulkarnaen, M., Tukiran., S.H. Syarief. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Kloroform Batang Tumbuhan Bakau Merah (*Rhizophora stylosa* Griff) dan Uji Aktivitas Biolarvasida terhadap Larva *Aedes aegypti*. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa*. 89-96 hlm.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Rendemen Penepungan Buah *R. mucronata*

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

A. Rendemen Pembuatan Tepung Buah *R. mucronata*➤ Data Keseluruhan Rendemen Pembuatan Tepung Buah *R. mucronata*

Proses	Bobot awal (Kg)	Bobot akhir (Kg)	Rendemen (%)
Pencucian buah <i>R. mucronata</i>	12,6 Kg	9,37 Kg	74,37
Pengupasan	9,37	8,92	95,20
Perendaman asam sitrat	8,92	11,26	126,23
Blanching	11,26	11,16	99,11
Perendaman hari ke-1	11,16	10,34	92,65
Perendaman hari ke-2	10,34	10,16	98,26
Perendaman hari ke-3	10,16	10,14	99,80
Penjemuran	10,14	5,08	50,10
Penepungan	5,08	4,45	87,60
Tepung buah <i>R. mucronata</i>	9,37	4,45	47,49

➤ Perhitungan Rendemen Pembuatan Tepung Buah *R. mucronata*– Rendemen pengupasan kulit buah *R. mucronata*

$$\text{Rendemen} = \frac{8,92 \text{ kg}}{9,37 \text{ kg}} \times 100\% = 95,20 \%$$

– Rendemen perendaman asam sitrat

$$\text{Rendemen} = \frac{11,26 \text{ kg}}{8,92 \text{ kg}} \times 100\% = 126,23 \%$$

– Rendemen blanching

$$\text{Rendemen} = \frac{11,16 \text{ kg}}{11,26 \text{ kg}} \times 100\% = 99,11 \%$$

– Rendemen perendaman hari ke-1

$$\text{Rendemen} = \frac{10,34 \text{ kg}}{11,16 \text{ kg}} \times 100\% = 92,65 \%$$

– Rendemen perendaman hari ke-2

$$\text{Rendemen} = \frac{10,16 \text{ kg}}{10,34 \text{ kg}} \times 100\% = 98,26 \%$$

– Rendemen perendaman hari ke-3

$$\text{Rendemen} = \frac{10,14 \text{ kg}}{10,16 \text{ kg}} \times 100\% = 99,80 \%$$

– Rendemen penjemuran

$$\text{Rendemen} = \frac{5,08 \text{ kg}}{10,14 \text{ kg}} \times 100\% = 50,10 \%$$

– Rendemen penepungan

$$\text{Rendemen} = \frac{4,45 \text{ kg}}{5,08 \text{ kg}} \times 100\% = 87,60 \%$$

– Rendemen penepungan

$$\text{Rendemen} = \frac{4,45 \text{ kg}}{9,37 \text{ kg}} \times 100\% = 47,49 \%$$

B. Rendemen Tepung dan Ekstrak Buah *R. mucronata*

1) Data Rendemen Tepung dan Ekstrak Buah *R. mucronata*

➤ Data Rendemen Tepung Buah *R. mucronata*

Ulangan	Berat Buah <i>R. mucronata</i> (Kg)	Berat Tepung Buah <i>R. mucronata</i> (Kg)	Rendemen (%)
I	3,24	1,54	47,53
II	3,04	1,39	45,72
III	3,09	1,52	49,19

– Tepung buah *R. mucronata* I

$$\text{Rendemen} = \frac{1,54 \text{ kg}}{3,24 \text{ kg}} \times 100\% = 47,53 \%$$

– Tepung buah *R. mucronata* II

$$\text{Rendemen} = \frac{1,39 \text{ kg}}{3,04 \text{ kg}} \times 100\% = 45,72 \%$$

– Tepung buah *R. mucronata* III

$$\text{Rendemen} = \frac{1,52 \text{ kg}}{3,09 \text{ kg}} \times 100\% = 49,19 \%$$

➤ Rendemen Ekstrak Buah *R. mucronata*

Ulangan	Berat Tepung Buah <i>R. mucronata</i> (g)	Berat Ekstrak Buah <i>R. mucronata</i> (g)	Rendemen (%)
I	25	3,71	14,84
II	25	5,1	20,4
III	25	4,84	19,36

– Ekstrak buah *R. mucronata* I

$$\text{Rendemen} = \frac{3,71 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 100\% = 14,84 \%$$

– Ekstrak buah *R. mucronata* II

$$\text{Rendemen} = \frac{5,1 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 100\% = 20,40 \%$$

– Ekstrak buah *R. mucronata* III

$$\text{Rendemen} = \frac{4,84 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 100\% = 19,36 \%$$

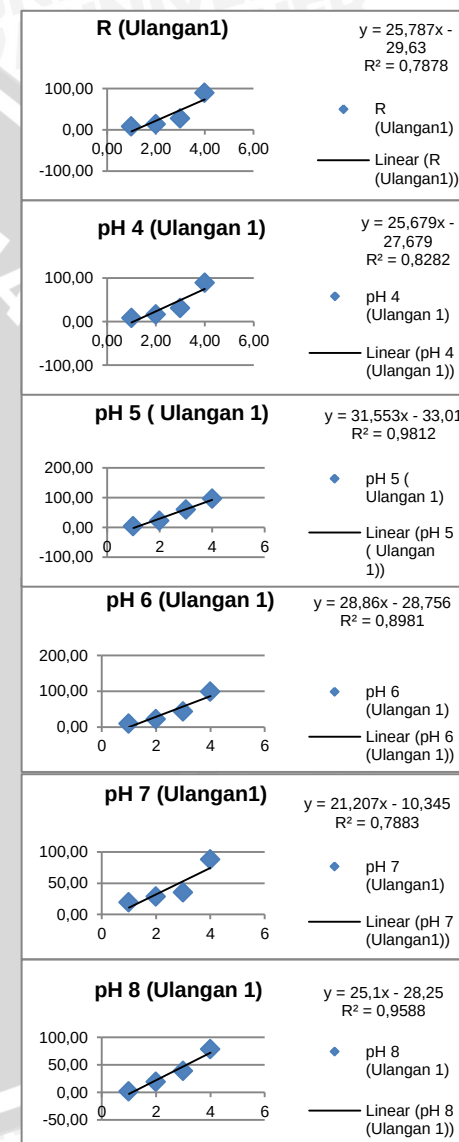
2) Perhitungan Analisis Data Rendemen Tepung dan Ekstrak Buah *R. mucronata*

Proses	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	I	II	III			
Tepung	47,53	45,72	49,19	142,44	47,48	1,74
Ekstraksi	14,84	20,4	19,36	54,60	18,20	2,96

Lampiran 2. Data % Inhibisi dan IC₅₀ Ekstrak Buah *R. mucronata* terhadap Enzim α -Glukosidase

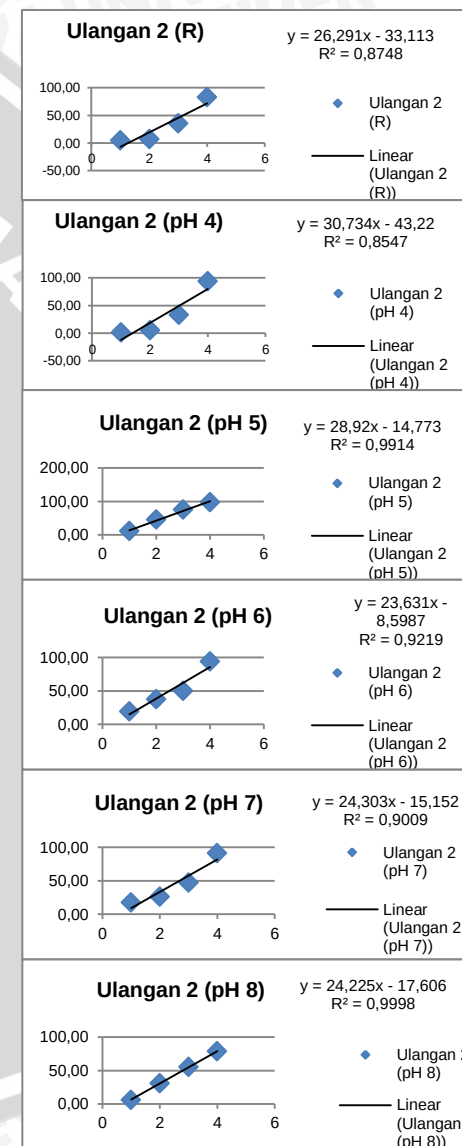
➤ **Ulangan 1**

	Konsentrasi	C	B	Si	So	C-B	Si-So	%Inhibisi	IC50
R	6,25 ppm	0,353	0,137	0,334	0,136	0,216	0,198	8,33	3,088
	12,5 ppm	0,353	0,137	0,319	0,133	0,216	0,186	13,89	
	25 ppm	0,353	0,137	0,291	0,134	0,216	0,157	27,31	
	50 ppm	0,353	0,137	0,149	0,127	0,216	0,022	89,81	
pH 4	6,25 ppm	0,416	0,136	0,397	0,141	0,28	0,256	8,57	3,025
	12,5 ppm	0,416	0,136	0,378	0,145	0,28	0,233	16,79	
	25 ppm	0,416	0,136	0,341	0,149	0,28	0,192	31,43	
	50 ppm	0,416	0,136	0,179	0,149	0,28	0,03	89,29	
pH 5	6,25 ppm	0,317	0,111	0,339	0,141	0,206	0,198	3,88	2,631
	12,5 ppm	0,317	0,111	0,289	0,13	0,206	0,159	22,82	
	25 ppm	0,317	0,111	0,214	0,132	0,206	0,082	60,19	
	50 ppm	0,317	0,111	0,142	0,135	0,206	0,007	96,60	
pH 6	6,25 ppm	0,333	0,14	0,324	0,149	0,193	0,175	9,33	2,729
	12,5 ppm	0,333	0,14	0,297	0,147	0,193	0,15	22,28	
	25 ppm	0,333	0,14	0,257	0,148	0,193	0,109	43,52	
	50 ppm	0,333	0,14	0,147	0,144	0,193	0,003	98,45	
pH 7	6,25 ppm	0,376	0,144	0,333	0,146	0,232	0,187	19,40	2,846
	12,5 ppm	0,376	0,144	0,331	0,165	0,232	0,166	28,45	
	25 ppm	0,376	0,144	0,294	0,143	0,232	0,151	34,91	
	50 ppm	0,376	0,144	0,176	0,148	0,232	0,028	87,93	
pH 8	6,25 ppm	0,345	0,145	0,337	0,14	0,2	0,197	1,50	3,118
	12,5 ppm	0,345	0,145	0,302	0,14	0,2	0,162	19,00	
	25 ppm	0,345	0,145	0,265	0,143	0,2	0,122	39,00	
	50 ppm	0,345	0,145	0,177	0,134	0,2	0,043	78,50	



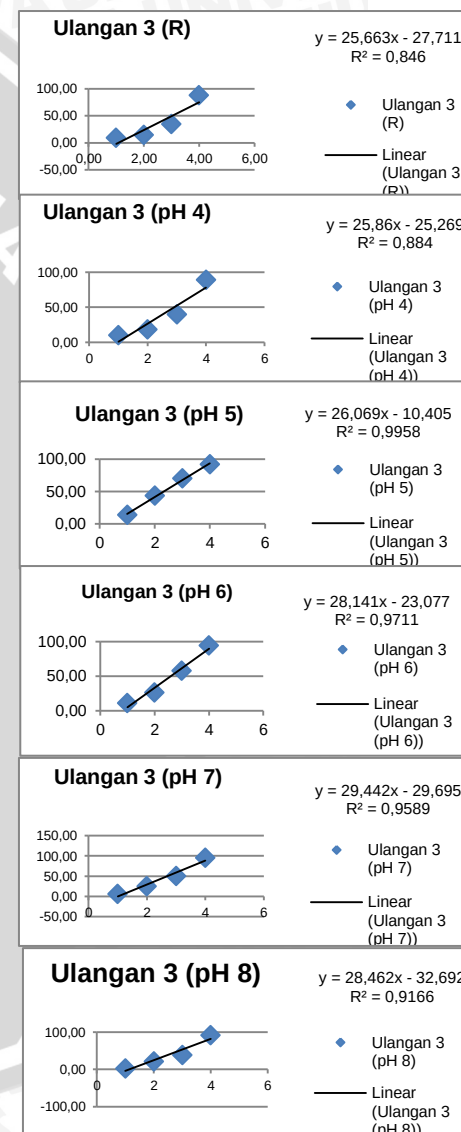
➤ **Ulangan 2**

	Konsentrasi	C	B	Si	So	C-B	Si-So	%Inhibisi	IC50
R	6,25 ppm	0,304	0,153	0,299	0,155	0,151	0,144	4,64	3,161
	12,5 ppm	0,304	0,153	0,282	0,142	0,151	0,14	7,28	
	25 ppm	0,304	0,153	0,241	0,144	0,151	0,097	35,76	
	50 ppm	0,304	0,153	0,175	0,149	0,151	0,026	82,78	
pH 4	6,25 ppm	0,326	0,149	0,316	0,141	0,177	0,175	1,13	3,033
	12,5 ppm	0,326	0,149	0,307	0,14	0,177	0,167	5,65	
	25 ppm	0,326	0,149	0,26	0,142	0,177	0,118	33,33	
	50 ppm	0,326	0,149	0,145	0,135	0,177	0,01	94,35	
pH 5	6,25 ppm	0,325	0,149	0,301	0,145	0,176	0,156	11,36	2,240
	12,5 ppm	0,325	0,149	0,24	0,144	0,176	0,096	45,45	
	25 ppm	0,325	0,149	0,194	0,151	0,176	0,043	75,57	
	50 ppm	0,325	0,149	0,144	0,14	0,176	0,004	97,73	
pH 6	6,25 ppm	0,292	0,135	0,269	0,143	0,157	0,126	19,75	2,480
	12,5 ppm	0,292	0,135	0,243	0,145	0,157	0,098	37,58	
	25 ppm	0,292	0,135	0,219	0,141	0,157	0,078	50,32	
	50 ppm	0,292	0,135	0,147	0,138	0,157	0,009	94,27	
pH 7	6,25 ppm	0,314	0,149	0,287	0,151	0,165	0,136	17,58	2,681
	12,5 ppm	0,314	0,149	0,267	0,145	0,165	0,122	26,06	
	25 ppm	0,314	0,149	0,224	0,137	0,165	0,087	47,27	
	50 ppm	0,314	0,149	0,146	0,132	0,165	0,014	91,52	
pH 8	6,25 ppm	0,326	0,184	0,316	0,183	0,142	0,133	6,34	2,791
	12,5 ppm	0,326	0,184	0,294	0,196	0,142	0,098	30,99	
	25 ppm	0,326	0,184	0,257	0,194	0,142	0,063	55,63	
	50 ppm	0,326	0,184	0,2	0,17	0,142	0,03	78,87	



➤ **Ulangan 3**

	Konsentrasi	C	B	Si	So	C-B	Si-So	%Inhibisi	IC50
R	6,25 ppm	0,358	0,192	0,33	0,179	0,166	0,151	9,04	3,028
	12,5 ppm	0,358	0,192	0,319	0,177	0,166	0,142	14,46	
	25 ppm	0,358	0,192	0,287	0,178	0,166	0,109	34,34	
	50 ppm	0,358	0,192	0,197	0,177	0,166	0,02	87,95	
pH 4	6,25 ppm	0,309	0,123	0,289	0,122	0,186	0,167	10,22	2,91
	12,5 ppm	0,309	0,123	0,273	0,121	0,186	0,152	18,28	
	25 ppm	0,309	0,123	0,233	0,121	0,186	0,112	39,78	
	50 ppm	0,309	0,123	0,135	0,115	0,186	0,02	89,25	
pH 5	6,25 ppm	0,303	0,13	0,29	0,141	0,173	0,149	13,87	2,317
	12,5 ppm	0,303	0,13	0,234	0,136	0,173	0,098	43,35	
	25 ppm	0,303	0,13	0,188	0,136	0,173	0,052	69,94	
	50 ppm	0,303	0,13	0,147	0,133	0,173	0,014	91,91	
pH 6	6,25 ppm	0,258	0,102	0,246	0,107	0,156	0,139	10,90	2,597
	12,5 ppm	0,258	0,102	0,22	0,105	0,156	0,115	26,28	
	25 ppm	0,258	0,102	0,171	0,105	0,156	0,066	57,69	
	50 ppm	0,258	0,102	0,113	0,104	0,156	0,009	94,23	
pH 7	6,25 ppm	0,319	0,122	0,311	0,125	0,197	0,186	5,58	2,707
	12,5 ppm	0,319	0,122	0,276	0,128	0,197	0,148	24,87	
	25 ppm	0,319	0,122	0,233	0,134	0,197	0,099	49,75	
	50 ppm	0,319	0,122	0,145	0,136	0,197	0,009	95,43	
pH 8	6,25 ppm	0,289	0,133	0,283	0,131	0,156	0,152	2,56	2,905
	12,5 ppm	0,289	0,133	0,253	0,13	0,156	0,123	21,15	
	25 ppm	0,289	0,133	0,227	0,131	0,156	0,096	38,46	
	50 ppm	0,289	0,133	0,147	0,134	0,156	0,013	91,67	



Lampiran 3. Hasil Analisis Keragaman Ekstrak Buah *R. mucronata* terhadap % Inhibisi Enzim α -Glukosidase

Sampel	Ulangan			Total	Rata-rata	sd
	I	II	III			
A1B1	8,33	4,64	9,04	17,37	8,69	0,50
A1B2	13,89	7,28	14,46	28,35	14,18	0,40
A1B3	27,31	35,76	34,34	70,10	35,05	1,00
A1B4	89,81	82,78	87,95	177,76	88,88	1,32
A2B1	8,57	1,13	10,22	18,79	9,40	1,17
A2B2	16,79	5,65	18,28	35,07	17,54	1,05
A2B3	31,43	33,33	39,78	64,76	32,38	1,34
A2B4	89,29	94,35	89,25	178,54	89,27	0,03
A3B1	3,88	11,36	13,87	25,23	12,62	1,77
A3B2	22,82	45,45	43,35	88,80	44,40	1,48
A3B3	60,19	75,57	69,94	145,51	72,76	3,98
A3B4	96,60	97,73	91,91	194,33	97,17	0,80
A4B1	9,33	19,75	10,90	20,23	10,12	1,11
A4B2	22,28	37,58	26,28	48,56	24,28	2,83
A4B3	43,52	50,32	57,69	108,01	54,01	5,21
A4B4	98,45	94,27	94,23	188,50	94,25	0,03
A5B1	19,40	17,58	5,58	36,98	18,49	1,29
A5B2	28,45	26,06	24,87	54,51	27,26	1,69
A5B3	34,91	47,27	49,75	97,02	48,51	1,75
A5B4	87,93	91,52	95,43	186,95	93,48	2,76
A6B1	1,50	6,34	2,56	4,06	2,03	0,75
A6B2	19,00	30,99	21,15	40,15	20,08	1,52
A6B3	39,00	55,63	38,46	77,46	38,73	0,38
A6B4	78,50	78,87	91,67	157,37	78,69	0,26
Total	1024,86	1039,55	0	2064,41	1032,21	

Keterangan:

A1 = Ekstrak *R. mucronata* tanpa perlakuan pH

A2 = Ekstrak *R. mucronata* pH 4

A3 = Ekstrak *R. mucronata* pH 5

A4 = Ekstrak *R. mucronata* pH 6

A5 = Ekstrak *R. mucronata* pH 7

A6 = Ekstrak *R. mucronata* pH 8

B1 = Konsentrasi 6,25 ppm

B2 = Konsentrasi 12,5 ppm

B3 = Konsentrasi 25 ppm

B4 = Konsentrasi 50 ppm

FK	88787,26
JK total	48192,91
JK Perlakuan	48108,93
JK ulangan	4,50
JK galat	79,49

Perlakuan		Konsentrasi (ppm)				Total	Rata-rata
		6,25 (B1)	12,5 (B2)	25 (B3)	50 (B4)		
pH	R (A1)	17,37	28,35	70,10	177,76	293,58	73,40
	4 (A2)	18,79	35,07	64,76	178,54	297,16	74,29
	5 (A3)	25,23	88,80	145,51	194,33	453,87	113,47
	6 (A4)	20,23	48,56	108,01	188,50	365,30	91,33
	7 (A5)	36,98	54,51	97,02	186,95	375,46	93,87
	8 (A6)	4,06	40,15	77,46	157,37	279,04	69,76
Total		122,66	295,44	562,86	1083,45	2064,41	
Rata-rata		20,44	49,24	93,81	180,58		

JK A	2808,85
JK B	43963,20
JK AB	1336,88

Tabel ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhit	F 5%	F 1%	Sig
Ulangan	1	4,50	4,50	1,30	4,28	7,88	
Perlakuan	23	48108,93	2091,69	605,25	2,01	2,76	**
A	5	2808,85	561,77	162,55	2,62	3,9	**
B	3	43963,20	14654,40	4240,37	3,01	4,72	**
A*B	15	1336,88	89,13	25,79	2,12	2,93	**
Galat	23	79,49	3,46				
Total	47	48192,91					

Keterangan : ** adanya perbedaan yang sangat nyata antarperlakuan ($p < 0,01$)

NOTASI

Perlakuan		Rata-rata	Notasi
pH	Konsentrasi		
R	6,25 ppm	8,685	b
	12,5 ppm	14,175	cd
	25 ppm	35,050	hi
	50 ppm	88,880	n
4	6,25 ppm	9,395	b
	12,5 ppm	17,535	de
	25 ppm	32,380	h
	50 ppm	89,270	no
5	6,25 ppm	12,615	bc
	12,5 ppm	44,400	j
	25 ppm	72,755	l
	50 ppm	97,165	p
6	6,25 ppm	10,115	bc
	12,5 ppm	24,280	fg
	25 ppm	54,005	k
	50 ppm	94,250	p
7	6,25 ppm	18,490	e
	12,5 ppm	27,255	g
	25 ppm	48,510	j
	50 ppm	93,475	op
8	6,25 ppm	2,030	a
	12,5 ppm	20,075	ef
	25 ppm	38,730	i
	50 ppm	78,685	m

Keterangan : R = tanpa perlakuan pH ($\text{pH} \pm 3,4$)

Lampiran 4. Hasil Analisis Keragaman Ekstrak Buah *R. mucronata* terhadap IC₅₀ Enzim α-Glukosidase

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	I	II	III			
R	3,088	3,161	3,028	9,277	3,092	0,067
pH 4	3,025	3,033	2,911	8,969	2,990	0,068
pH 5	2,631	2,240	2,317	7,188	2,396	0,207
pH 6	2,729	2,480	2,597	7,806	2,602	0,125
pH 7	2,846	2,681	2,707	8,234	2,745	0,089
pH 8	3,118	2,791	2,905	8,814	2,938	0,166

FK	140,4946
JKT	1,243147
JKP	1,037292
JKG	0,205855

Tabel ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F1%
Perlakuan	5	1,037292	0,207458	12,09349	3,106	5,064
Galat	12	0,205855	0,017155			
Total	17					

BNT

$$\text{BNT} = \text{tabel db galat} \sqrt{\frac{2 \times \text{KTG}}{\text{Ulangan}}} = 2,179 \sqrt{\frac{2 \times 0,017155}{3}} = 2,179 \times 0,106941 = 0,233024$$

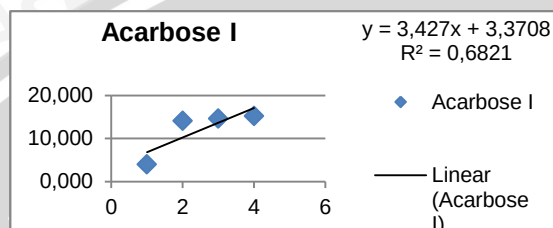
Perlakuan	Rata-rata	Notasi
R	3,092	D
pH 4	2,990	C
pH 5	2,396	A
pH 6	2,602	A
pH 7	2,745	B
pH 8	2,938	C

Lampiran 5. Data % Inhibisi dan IC₅₀ Acarbose terhadap Enzim α-Glukosidase

1) Data % Inhibisi dan IC₅₀ Acarbose terhadap Enzim α-Glukosidase

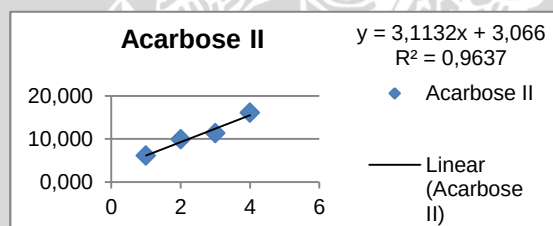
➤ Acarbose I

Konsentrasi	C	B	Si	So	C-B	Si-So	% inhibisi	IC ₅₀
6,25 ppm	0,29	0,112	0,281	0,11	0,178	0,171	3,933	13,61
12,5 ppm	0,29	0,112	0,274	0,121	0,178	0,153	14,045	
25 ppm	0,29	0,112	0,271	0,119	0,178	0,152	14,607	
50 ppm	0,29	0,112	0,27	0,119	0,178	0,151	15,169	



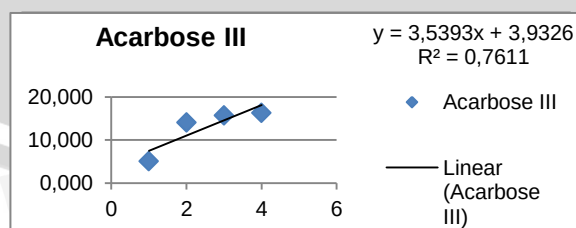
➤ Acarbose II

Konsentrasi	C	B	Si	So	C-B	Si-So	% inhibisi	IC ₅₀
6,25 ppm	0,344	0,132	0,335	0,136	0,212	0,199	6,132	15,08
12,5 ppm	0,344	0,132	0,331	0,14	0,212	0,191	9,906	
25 ppm	0,344	0,132	0,326	0,138	0,212	0,188	11,321	
50 ppm	0,344	0,132	0,316	0,138	0,212	0,178	16,038	



➤ Acarbose III

Konsentrasi	C	B	Si	So	C-B	Si-So	% inhibisi	IC ₅₀
6,25 ppm	0,286	0,108	0,282	0,113	0,178	0,169	5,056	13,02
12,5 ppm	0,286	0,108	0,27	0,117	0,178	0,153	14,045	
25 ppm	0,286	0,108	0,268	0,118	0,178	0,15	15,730	
50 ppm	0,286	0,108	0,265	0,116	0,178	0,149	16,292	

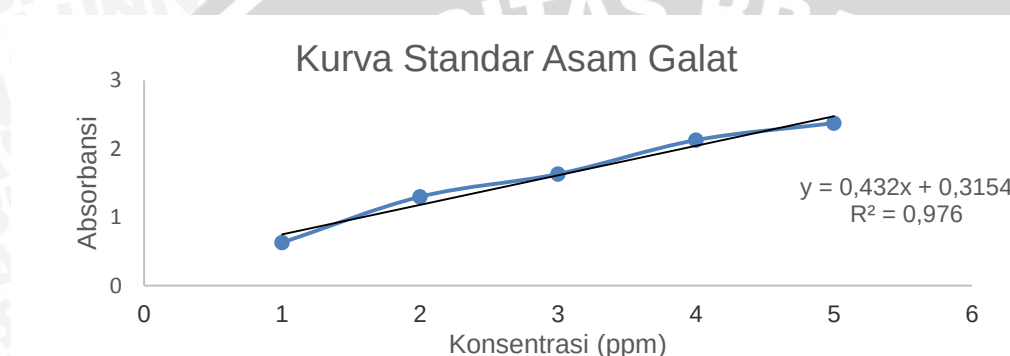


2) Analisis Keragaman IC₅₀ Ekstrak Buah *R. mucronata* terhadap Enzim α-Glukosidase

Sampel	I	II	III	Total	Rata-rata	SD
Acarbose	13,61	15,08	13,02	41,7	13,9	1,061

Lampiran 6. Absorbansi Standar Asam Galat

Konsentrasi	Absorbansi
50 ppm	0,628
100 ppm	1,298
150 ppm	1,631
200 ppm	2,126
250 ppm	2,374



Lampiran 7. Data Total Fenol Ekstrak Buah *R. mucronata*

Ulangan 1							
Perlakuan	absorbansi (y)	0,432 (a)	0,3154 (b)	Kadar ekuivalen AG (µg GAE/ml)	Kadar ekuivalen AG untuk 5 mL (µg GAE)	Total fenol (µg GAE/g)	Total fenol (mg GAE/100g)
R	1,86	0,432	0,3154	3,5755	17,877	35754,63	3575,46
pH 4	2,424	0,432	0,3154	4,8810	24,405	48810,19	4881,02
pH 5	2,105	0,432	0,3154	4,1426	20,713	41425,93	4142,59
pH 6	2,045	0,432	0,3154	4,0037	20,019	40037,04	4003,70
pH 7	1,968	0,432	0,3154	3,8255	19,127	38254,63	3825,46
pH 8	1,71	0,432	0,3154	3,2282	16,141	32282,41	3228,24
Ulangan 2							
R	1,838	0,432	0,3154	3,5245	17,623	35245,37	3524,54
pH 4	2,172	0,432	0,3154	4,2977	21,488	42976,85	4297,69
pH 5	2,138	0,432	0,3154	4,2190	21,095	42189,81	4218,98
pH 6	2,118	0,432	0,3154	4,1727	20,863	41726,85	4172,69
pH 7	2,079	0,432	0,3154	4,0824	20,412	40824,07	4082,41
pH 8	1,79	0,432	0,3154	3,4134	17,067	34134,26	3413,43
Ulangan 3							
R	1,918	0,432	0,3154	3,7097	18,549	37097,22	3709,72
pH 4	2,362	0,432	0,3154	4,7375	23,688	47375,00	4737,50
pH 5	2,277	0,432	0,3154	4,5407	22,704	45407,41	4540,74
pH 6	2,231	0,432	0,3154	4,4343	22,171	44342,59	4434,26
pH 7	2,217	0,432	0,3154	4,4019	22,009	44018,52	4401,85
pH 8	1,893	0,432	0,3154	3,6519	18,259	36518,52	3651,85

Lampiran 8. Hasil Analisis Keragaman Total Fenol Ekstrak Buah *R. mucronata*

	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	I	II	III			
R	3575,46	3524,54	3709,72	10809,72	3603,24	95,66
pH 4	4881,02	4297,69	4737,5	13916,21	4638,74	303,95
pH 5	4142,59	4218,98	4540,74	12902,31	4300,77	211,30
pH 6	4003,7	4172,69	4434,26	12610,65	4203,55	216,93
pH 7	3825,46	4082,41	4401,85	12309,72	4103,24	288,76
pH 8	3228,24	3413,43	3651,85	10293,52	3431,17	212,36

FK 294776439,1
 JKT 3698608,173
 JKP 3055162,438
 JKG 643445,7351

Tabel ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F1%
Perlakuan	5	3055162,438	611032,4876	11,3955062	3,106	5,064
Galat	12	643445,7351	53620,47793			
Total	17					

BNT

$$\text{BNT} = \text{tabel db galat} \sqrt{\frac{2 \times \text{KTG}}{\text{Ulangan}}} = 2,179 \sqrt{\frac{2 \times 53620,47793}{3}} = 411,98$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
R	3603,24	a
pH 4	4638,74	c
pH 5	4300,77	B
pH 6	4203,55	B
pH 7	4103,24	B
pH 8	3431,17	A

Lampiran 9. Data Total Tanin Ekstrak Buah *R. mucronata*

Ulangan 1

	Total fenol (mg GAE/100g)	Abs. (y)	0,432 (a)	0,3154 (b)	Kadar ekuivalen AG (µg GAE/ml)	Kadar ekuivalen AG untuk 5 mL (µg GAE)	Total fenol non tanin (µg GAE/g)	Total fenol non tanin (mg GAE/100g)	Total tanin (mg GAE/100g)
R	3575,46	1,44	0,432	0,3154	2,6032	13,016	26032,41	2603,24	972,22
pH 4	4881,02	1,57	0,432	0,3154	2,9042	14,521	29041,67	2904,17	1976,85
pH 5	4142,59	1,433	0,432	0,3154	2,5870	12,935	25870,37	2587,04	1555,55
pH 6	4003,7	1,425	0,432	0,3154	2,5685	12,843	25685,19	2568,52	1435,18
pH 7	3825,46	1,419	0,432	0,3154	2,5546	12,773	25546,30	2554,63	1270,83
pH 8	3228,24	1,309	0,432	0,3154	2,3000	11,500	23000,00	2300,00	928,24

Ulangan 2

R	3524,54	1,408	0,432	0,3154	2,5292	12,646	25291,67	2529,17	995,37
pH 4	4297,69	1,41	0,432	0,3154	2,5338	12,669	25337,96	2533,80	1763,89
pH 5	4218,98	1,51	0,432	0,3154	2,7653	13,826	27652,78	2765,28	1453,70
pH 6	4172,69	1,504	0,432	0,3154	2,7514	13,757	27513,89	2751,39	1421,30
pH 7	4082,41	1,508	0,432	0,3154	2,7606	13,803	27606,48	2760,65	1321,76
pH 8	3413,43	1,433	0,432	0,3154	2,5870	12,935	25870,37	2587,04	826,39

Ulangan 3

R	3709,72	1,517	0,432	0,3154	2,7815	13,907	27814,81	2781,48	928,24
pH 4	4737,5	1,513	0,432	0,3154	2,7722	13,861	27722,22	2772,22	1965,28
pH 5	4540,74	1,549	0,432	0,3154	2,8556	14,278	28555,56	2855,56	1685,18
pH 6	4434,26	1,575	0,432	0,3154	2,9157	14,579	29157,41	2915,74	1518,52
pH 7	4401,85	1,57	0,432	0,3154	2,9042	14,521	29041,67	2904,17	1497,68
pH 8	3651,85	1,457	0,432	0,3154	2,6426	13,213	26425,93	2642,59	1009,26

Lampiran 10. Hasil Analisis Keragaman Total Tanin Ekstrak Buah *R. mucronata*

	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	I	II	III			
R	972,22	995,37	928,24	2895,83	965,28	34,10
pH 4	1976,85	1763,89	1965,28	5706,02	1902,01	119,75
pH 5	1555,55	1453,7	1685,18	4694,43	1564,81	116,02
pH 6	1435,18	1421,3	1518,52	4375,00	1458,33	52,58
pH 7	1270,83	1321,76	1497,68	4090,27	1363,42	119,03
pH 8	928,24	826,39	1009,26	2763,89	921,30	91,63

FK	33416511,51
JKT	2189469,369
JKP	2080885,242
JKG	108584,1267

Tabel ANOVA

SK	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F1%
Perlakuan	5	2080885,242	416177,0485	45,9931367	3,106	5,064
Galat	12	108584,1267	9048,677228			
Total	17					

BNT

$$\text{BNT} = \text{tabel db galat} \sqrt{\frac{2 \times \text{KTG}}{\text{Ulangan}}} = 2,179 \sqrt{\frac{2 \times 9048,677228}{3}} = 169,24$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
R	965,28	A
pH 4	1902,01	D
pH 5	1564,81	C
pH 6	1458,33	B
pH 7	1363,42	B
pH 8	921,30	A

Lampiran 11. Data Total Tanin Terkondensasi Ekstrak Buah *R. mucronata*

Ulangan 1						
Perlakuan	Absorbansi		S-B	% DM	% Total tanin terkondensasi (mg/mL ~ mg/g)	% Total tanin terkondensasi (mg/100 mL ~ mg/100 g)
	Sampel	Blanko				
R	1,465	0,177	1,288	33,65	299,55	29955,09
pH 4	0,727	0,142	0,585	33,65	136,05	13605,38
pH 5	0,698	0,137	0,561	33,65	130,47	13047,21
pH 6	0,656	0,138	0,518	33,65	120,47	12047,16
pH 7	0,627	0,132	0,495	33,65	115,12	11512,24
pH 8	0,596	0,147	0,449	33,65	104,42	10442,42
Ulangan 2						
R	1,185	0,1	1,085	38,09	222,92	22292,49
pH 4	0,89	0,099	0,791	38,09	162,52	16251,95
pH 5	0,864	0,089	0,775	38,09	159,23	15923,21
pH 6	0,788	0,078	0,71	38,09	145,88	14587,71
pH 7	0,757	0,085	0,672	38,09	138,07	13806,96
pH 8	0,634	0,074	0,56	38,09	115,06	11505,80
Ulangan 3						
R	1,086	0,113	0,973	38,12	199,76	19975,60
pH 4	0,84	0,075	0,765	38,12	157,05	15705,38
pH 5	0,813	0,071	0,742	38,12	152,33	15233,19
pH 6	0,805	0,083	0,722	38,12	148,23	14822,59
pH 7	0,753	0,076	0,677	38,12	138,99	13898,75
pH 8	0,691	0,094	0,597	38,12	122,56	12256,35

Lampiran 12. Hasil Analisis Keragaman Total Tanin Terkondensasi Ekstrak Buah *R. mucronata*

	Ulangan			Total	Rata-rata	SD
	I	II	III			
R	29955,09	22292,49	19975,6	72223,18	24074,39	5222,92
pH 4	13605,38	16251,95	15705,38	45562,71	15187,57	1397,20
pH 5	13047,21	15923,21	15233,19	44203,61	14734,54	1501,44
pH 6	12047,16	14587,71	14822,59	41457,46	13819,15	1539,08
pH 7	11512,24	13806,96	13898,75	39217,95	13072,65	1352,13
pH 8	10442,42	11505,8	12256,35	34204,57	11401,52	911,45

FK 4258706053
 JKT 371929929
 JKP 298903483,5
 JKG 73026445,54

ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F1%
Perlakuan	5	298903483,5	59780696,69	9,823405	3,106	5,064
Galat	12	73026445,54	6085537,128			
Total	17					

BNT

$$\text{BNT} = \text{tabel db galat} \sqrt{\frac{2 \times \text{KTG}}{\text{Ulangan}}} = 2,179 \sqrt{\frac{2 \times 6085537,128}{3}} = 438,954$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
R	24074,39	f
pH 4	15187,57	a
pH 5	14734,54	a
pH 6	13819,15	a
pH 7	13072,65	a
pH 8	11401,52	a

Lampiran 13. Penyiapan Larutan Uji Aktivitas Enzim α -Glukosidase

➤ Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 7,0

- 125 mL larutan kalium dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) 0,2 M ditambah 56 mL NaOH 0,2 M
 - Dihomogenkan dan dicek pH larutan hingga menunjukkan nilai pH 7
 - Diencerkan hingga 500 mL
- (pembuatan buffer fosfat menggunakan pelarut aquabidestilata)

Perhitungan pembuatan larutan adalah sebagai berikut:

✓ KH_2PO_4 0,2 M

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{1000}{v}$$

$$0,2 = \frac{g}{136,048} \times \frac{1000}{250}$$

$$g = 6,8024 \text{ g}$$

✓ NaOH 0,2 M

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{1000}{v}$$

$$0,2 = \frac{g}{40} \times \frac{1000}{100}$$

$$g = 0,8 \text{ g}$$

➤ Pembuatan Larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA)

- Larutan Bovin Serum Albumin dibuat dengan melarutkan 200 mg BSA dengan buffer fosfat hingga 100 mL.

➤ Pembuatan Stok Larutan Enzim

- 0,1 mL enzim α -glukosidase dilarutkan dalam 100 mL buffer fosfat pH 7 yang mengandung 200 mg BSA
- larutan diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam ampul sebagai stok enzim α -glukosidase (larutan induk enzim disimpan dalam bentuk aliquot di dalam freezer -20°C agar tetap stabil selama beberapa tahun, sedangkan larutan enzim disimpan di dalam kulkas $-2 - (-8)^\circ\text{C}$ agar tetap stabil selama beberapa minggu).

➤ Larutan Substrat p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) 20 mM

- 60,25 mg PNPG dilarutkan dalam 10 mL aquabidestilata

✓ PNPG 20 mM

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{1000}{v}$$

$$20 \times 10^{-3} = \frac{g}{301,25} \times \frac{1000}{10}$$

$$g = 0,06025 \text{ g}$$

➤ **Pembuatan Larutan Na₂CO₃ 200 mM**

– 21,2 g natrium karbonat (Na₂CO₃) dilarutkan dalam 1000 mL aquades.

✓ Na₂CO₃ 200 mM

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{1000}{1000}$$

$$200 \times 10^{-3} = \frac{g}{301,25} \times \frac{1000}{10}$$

$$g = 0,06025 \text{ g}$$



Lampiran 14. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Buah *R. mucronata* Berdasarkan Berat Kering

Ekstrak buah <i>R. mucronata</i>	Kadar Air (%)
I	66,35
II	61,91
III	61,88

Langkah-langkah pembuatan konsentrasi larutan ekstrak buah *R. mucronata* untuk pengujian aktivitas enzim α -glukosidase sebagai berikut:

- 1) Membuat larutan ekstrak induk dengan konsentrasi 50 ppm

➤ Ekstrak Buah *R. mucronata* I

$$50 \text{ ppm} = \frac{100}{100-66,35} \times 50 \text{ ppm} = 148,59 \text{ ppm} \sim 148,59 \text{ mg/ 1000 mL}$$

➤ Ekstrak Buah *R. mucronata* II

$$50 \text{ ppm} = \frac{100}{100-61,91} \times 50 \text{ ppm} = 131,27 \text{ ppm} \sim 131,27 \text{ mg/ 1000 mL}$$

➤ Ekstrak Buah *R. mucronata* III

$$50 \text{ ppm} = \frac{100}{100-61,88} \times 50 \text{ ppm} = 131,16 \text{ ppm} \sim 131,16 \text{ mg/1000 mL}$$

- 2) Membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 6,25 ppm, 12,5 ppm, dan 25 ppm dengan metode pengenceran dari larutan ekstrak konsentrasi 50 ppm dengan rumus pengenceran $V_1 M_1 = V_2 M_2$

➤ 6,25 ppm

$$V_{6,25 \text{ ppm}} \times 6,25 \text{ ppm} = 20 \mu\text{L} \times 50 \text{ ppm}$$

$$V_{6,25 \text{ ppm}} = 160 \mu\text{L}$$

➤ 12,5 ppm

$$V_{12,5 \text{ ppm}} \times 12,5 \text{ ppm} = 20 \mu\text{L} \times 50 \text{ ppm}$$

$$V_{12,5 \text{ ppm}} = 80 \mu\text{L}$$

➤ 25 ppm

$$V_{25 \text{ ppm}} \times 25 \text{ ppm} = 20 \mu\text{L} \times 50 \text{ ppm}$$

$$V_{25 \text{ ppm}} = 160 \mu\text{L}$$

Lampiran 15. Gambar Prosedur Kerja Penepungan Buah *R. mucronata*



Buah *R. mucronata*



Pengupasan kulit buah *R. mucronata*



Pengirisan buah *R. mucronata*



Blanching selama 10 menit



Penirisan



Perendaman asam sitrat 0,5% selama 10 menit



Perendaman hari ke-1



Perendaman hari ke-2



Perendaman hari ke-3

Perendaman selama 3 hari



Tepung buah *R. mucronata*



Penepungan dengan dish meal



Penjemuran

Lampiran 16. Gambar Pembuatan Ekstrak Buah *R. mucronata*



25 g tepung buah *R. mucronata* + 0,625 g asam askorbat + 250 mL aseton 70%



Ekstraksi dengan metode sonikasi



Pemisahan filtrat dan residu dengan sentrifuge



Evaporasi



Ekstrak pekat buah *R. mucronata*

Lampiran 17. Gambar Pengujian Aktivitas Enzim α -Glukosidase



10 μ L sampel



490 μ L buffer fosfat pH 7



250 μ L substrat PNPG



Penambahan 250 μ L enzim α -glukosidase sebagai S_1 dan penambahan 250 μ L buffer fosfat pH 7 sebagai S_0

Inkubasi suhu 37 $^{\circ}$ C selama 5 menit



Inkubasi suhu 37 $^{\circ}$ C selama 15 menit

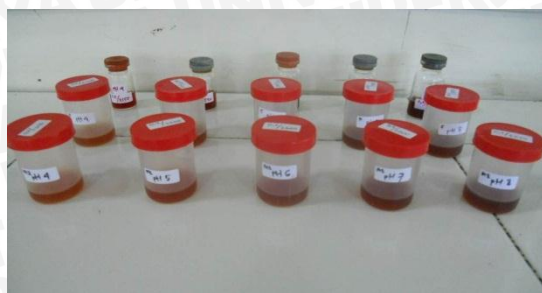


1000 μ L Na_2CO_3



Pengukuran absorbansi sampel dengan λ 400 nm

Lampiran 18. Gambar Pengujian Total Fenol



Stok ekstrak buah *R. mucronata*
pH 4, 5, 6, 7, 8



Pengenceran ekstrak 1000 ppm
sebanyak 0,5 mL



Perubahan warna menjadi hitau



Penghomogenan
dengan vortex



Penambahan 2,5 mL
reagen folin ceacelteu



Penambahan 2 mL
 Na_2CO_3 75 g/L



Penghomogenan
dengan vortex

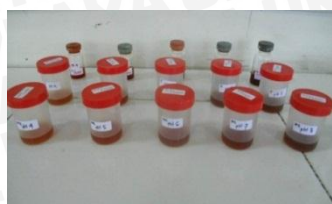


Perubahan warna menjadi
ungu kehitaman



Pengukuran absorbansi
sampel dengan
spectrofometer UV-Vis λ 760

Lampiran 19. Gambar Pengujian Total Tanin



Stok ekstrak buah *R. mucronata* pH 4, 5, 6, 7, 8



Pengenceran ekstrak 1000 ppm sebanyak 1 mL



Ditambah PVPP 1 mg dan aquades 1 mL



Penambahan 2,5 mL reagen folin ceacelteu



Disentrufuge 3000 rpm selama 10 menit



Diinkubasi dalam refrigrasi suhu 4 °C selama 15 menit



Perubahan warna menjadi hitam



Penghomogenan dengan vortex



Penambahan 2 mL Na_2CO_3 75 g/L



Pengukuran absorbansi sampel dengan spektrofometer UV-Vis λ 760

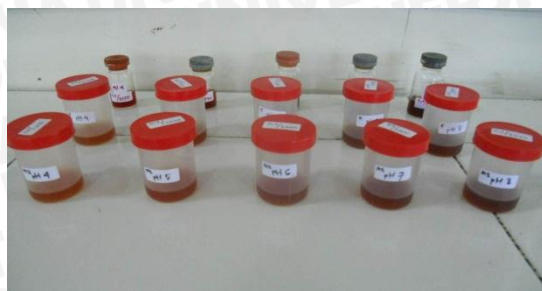


Perubahan warna menjadi ungu kehitaman



Penghomogenan dengan vortex

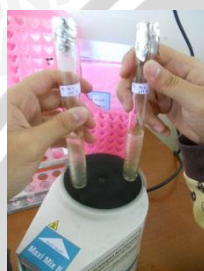
Lampiran 20. Gambar Pengujian Total Tanin Terkondensasi



Stok ekstrak buah *R. mucronata*
pH 4, 5, 6, 7, 8



Pengenceran ekstrak 1000 ppm
sebanyak 0,5 mL



Penghomogenan
dengan vortex



Penambahan 0,1 mL
reagen ferric



Penambahan 3 mL
butanol-HCl (95:5)



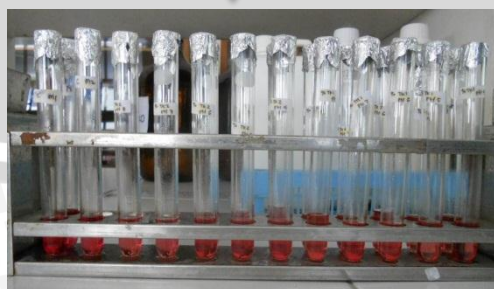
Perubahan warna
reaksi larutan



Diinkubasi dengan suhu 97-100 °C
dalam waterbath



Pengukuran absorbansi sampel dengan
spectrofometer UV-Vis λ 550 nm



Perubahan warna reaksi setelah
dipanaskan