

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.,)

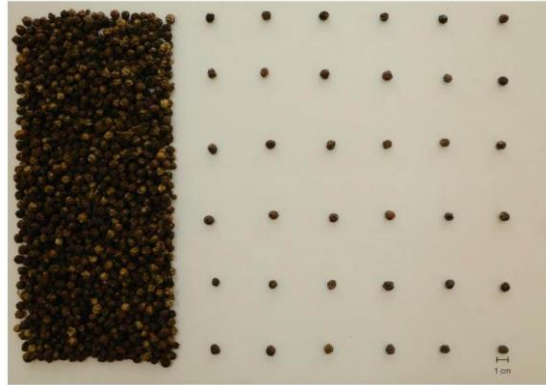
2.1.1 Taksonomi Tanaman Lada Hitam (*Piper nigrum* L.,)



Gambar 2.1 Tanaman Lada Hitam (*Piper nigrum* L.,)
Sumber : (Saenong, 2017)

- Kerajaan : *Plantae*
Divisi : *Tracheophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Piperales*
Family : *Piperaceae*
Genus : *Piper* L.,
Spesies : *Piper nigrum* L.,

2.1.2 Karakteristik Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.,)

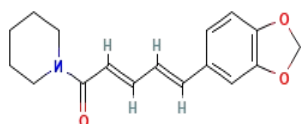


Gambar 2.2 Simplisia Buah Lada Hitam
Sumber : (Kementerian Kesehatan RI, 2017)

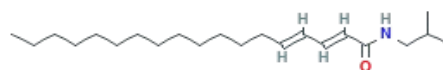
Buah lada hitam berbentuk hampir bulat, permukaan keriput kasar, menyerupai jala, pada ujung buah terdapat sisa dari kelapa putik yang tidak bertangkai, perikarpium melekat erat pada biji, warna coklat kelabu sampai hitam kecokelatan, bau aromatik, rasa sangat pedas (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

2.1.3 Komponen Kimia dan Manfaat Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.,)

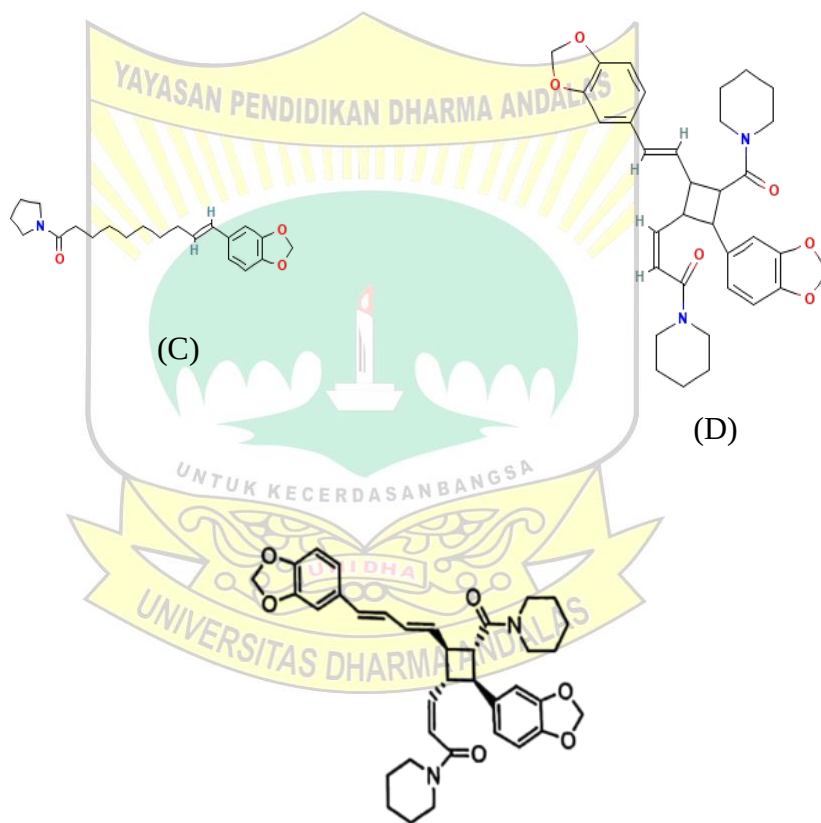
Komponen kimia buah lada hitam terdiri dari *piperin*, *piperin* dan *Isopiperolein*. Sedangkan buah lada hitam di India ditemukan *pipercyclobutanamide A*, *pipercylobutanamide B* serta berbagai senyawa amida seperti *retrofractamide A*, *pipercide*, *piperchabamide D*, *pellitorin*, *dehydroretrofractamide*, dan *dehydropiperpernonaline* (Arbain, et al., 2014).



(A)



(B)



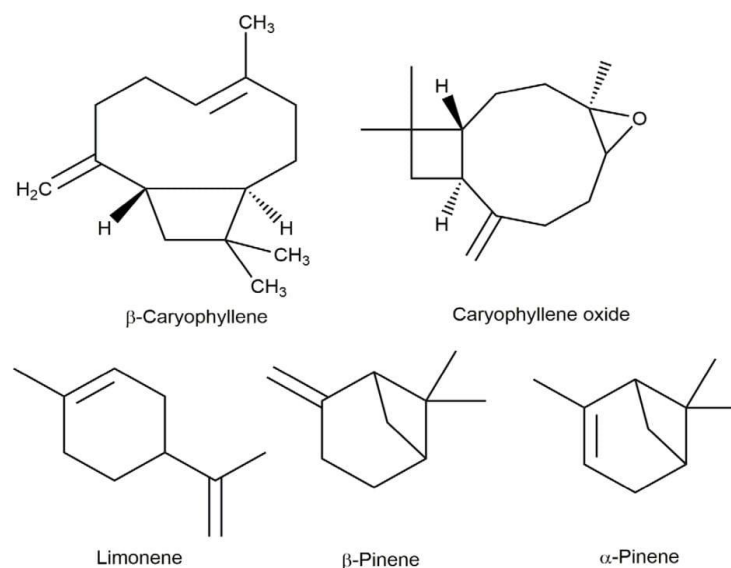
(C)

(D)

(E)

Gambar 2.3 Struktur (A) *Isopiperolein*, (B) *Pipericine*, (C) *Piperin*, (D) *Pipercyclobutanamide A*, (E) *Pipercyclobutanamide B*
Sumber : (Pubchem, 2024)

Pada minyak atsiri buah lada hitam terdiri dari beberapa komponen diantaranya adalah *β-caryophyllene* (sesquiterpene), *limonene*, *β-pinene*, *α-pinene*, *sabinene*, *3-carene* serta *camphene* (monoterpenes) dan terpenoid (*caryophyllene oksida*, *linalool*, *terpinen-4-ol* dan *eugenol*). (Arbain, et al., 2014)



Gambar 2.4 Komponen pada Minyak atsiri buah lada hitam (*Piper nigrum* L.,)
Sumber : (Milenković and Stanojević, 2021)

Menurut Ravindran & Kallapurackal (2012) fenol dalam lada hitam merupakan campuran glikosida asam fenolik dan glikosida flavonol. Beberapa senyawa fenolik yang paling melimpah adalah asam fenolik yang mengandung asam hidroksibenzoat dan hidroksisinamat serta sejumlah besar kuersetin dan kaempferol. Flavon yang ditemukan pada lada hitam adalah *isoquercetin*, *isoramnetin*, *3-O-β-D-rutinoside*, *kaempferol-3-O-arabinoside-7-ramnoside*, *kaempferol-3-O-β-glucoside*, dan *quercetin-3-O-β-D-rutinoside*.

2.1.4 Penggunaan Tradisional Buah Lada Hitam

Penggunaan tradisional lada hitam dicampur dengan jahe dan madu, digunakan sebagai obat kuat sesudah melahirkan. Secara eksternal digunakan untuk kulit sebagai counter-irritant, bias juga digunakan sebagai tapal pada perut yang mulas atau sakit. Untuk rematik, sakit kepala dan dioleskan (Arbain, *et al.*, 2014).

2.1.5 Bioaktivitas Buah Lada Hitam

Piperin pada buah lada hitam dilaporkan dapat menjaga berat badan, dan meningkatkan sensitivitas insulin dan leptin, sehingga mengatur obesitas. Dalam studi dua puluh turunan piperin yang mengandung bagian benzothiazole, Sembilan analog piperin menunjukkan aktivitas antidiabetes yang lebih tinggi (Kharbanda, *et al.*, 2016). Piperin menunjukkan aktivitas antihiperglikemik pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan karena efek penurunan glukosa darah yang signifikan pada dosis 20 mg/kg (Atal, *et al.*, 2012). Buah lada hitam ini tercatat memiliki aktivitas menyembuhkan diabetes, menyembuhkan inflamasi, antijamur, perlindungan lambung dan hati, antimutagen, dan juga berpotensi sebagai penolak serangga (Silalahi, *et al.*, 2018).

Huljanah (2024) melakukan skrining aktivitas penghambatan enzim α -amilase secara In vitro dari ekstrak rempah-rempah makanan khas Sumatera Barat, dari skrining tersebut ada satu rempah yang mempunyai aktivitas inhibitor terhadap enzim α -amilase yaitu buah lada hitam dengan nilai IC_{50} lebih kecil dari acarbose (pembanding), dengan nilai (IC_{50} =10,351 ppm), sedangkan Acarbose

(IC_{50} =12,283 ppm). selain itu, piperin dapat menghambat inflamasi yang diinduksi oleh lipopolisakarida melalui hambatan terhadap shock endotoksin yang diinduksi oleh lipopolisakarida. Pada makrofag peritoneal, piperine menghambat produksi $TNF-\alpha$ yang diinduksi oleh LPS (Lipopolisakarida). Piperin juga memperlihatkan berbagai aktivitas biologis termasuk menghambat aktivitas monoamine oksidase A dan B (MAO) dengan IC_{50} masing-masing 58,98 dan 0,483 μM (Arbain, *et al.*, 2014).

2.2. Diabetes Melitus

Penyakit Diabetes Melitus (DM) atau yang biasa disebut penyakit gula adalah salah satu penyakit degenerativ kronis yang semakin meningkat prevalensinya di masa mendatang, diabetes melitus adalah suatu gangguan metabolic yang dapat ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) yang berakibat kerusakan pada sekresi insulin dan kerja insulin (Astuti and Purnama 2018). Menurut Soelistijo (2021) Diabetes merupakan penyakit gangguan metabolisme glukosa sebagai akibat gangguan produksi insulin, kerja insulin atau keduanya. Diabetes melitus (DM) juga didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Gangguan atau definisi produksi insulin oleh sel beta Langerhans kelenjar pankreas atau disebabkan kurangnya responsivnya sel-sel tubuh terhadap insulin merupakan penyebab terjadinya insufisiensi insulin (Dwiharini and Hadi, 2017).

2.2.1 Glukosa Postprandial

Keadaan postprandial secara luas didefinisikan sebagai “periode setelah makan” adalah proses fisiologis yang bertanggung jawab atas metabolisme nutrisi dan penyediaan bahan bakar metabolisme penting ke jaringan. Keadaan postprandial ditandai dengan peningkatan glukosa dan lipid yang tidak normal atau yang disebut “dimetabolisme postprandial” (Fragopoulou and Antonopoulou, 2018).

Glukosa postprandial dapat didefinisikan sebagai peningkatan glikemia segera setelah makan, terutama makanan yang mengandung karbohidrat (roti, dan kentang). Peningkatan glikemia ini terjadi 10 sampai 20 menit setelah dimulainya konsumsi, meningkat antara 30 menit dan 1 jam setelah makan, dan kembali ke nilai basal dari 2 sampai 5 jam. Peningkatan glukosa plasma postprandial merupakan faktor yang berkontribusi terhadap perkembangan aterosklerosis, ketidakseimbangan antara radikal bebas dan pertahanan antioksidan menyebabkan stress oksidatif, suatu kondisi yang diketahui berperan dalam perkembangan penyakit degenerative. Hiperglikemia menyebabkan disfungsi endotel melalui induksi stress oksidatif sebagai mediator umum. Hiperglikemia postprandial diketahui menyebabkan kelebihan produksi superoksida oleh rantai transport elektron mitokondria di sel endotel melalui aktivasi NAD(P)H oksidase. Peningkatan glukosa postprandial akan mengakibatkan kerusakan pembuluh darah yang merupakan peningkatan pembentukan produk akhir glikasi, perubahan aktivasi protein kinase dan faktor nuklir kappa B (NF- κ B). Disfungsi endotel merupakan proses awal

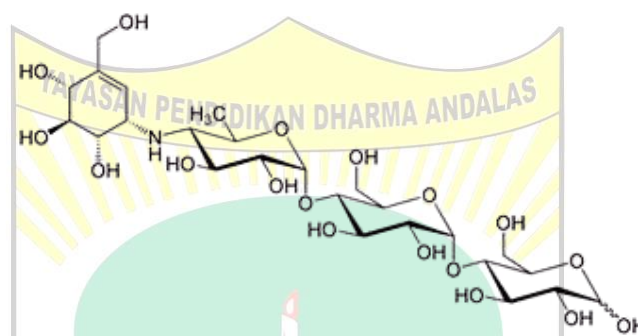
aterosklerosis dan akibatnya dapat dianggap sebagai parameter yang sangat sensitive terhadap resiko perkembangan aterosklerosis. Peningkatan superoksida vascular mendorong produksi radikal bebas lebih lanjut dan meningkatkan oksidasi LDL selama hyperlipidemia postprandial. Lipoprotein densitas rendah terperangkap di endotel, kemudian dioksidasi oleh radikal bebas yang diproduksi oleh endotel itu sendiri atau monosit pada tahap awal aterosklerosis. Lipoprotein densitas rendah yang teroksidasi akan menonaktifkan oksida nitrat dan bersifat sitotoksik yang merupakan awal terjadinya aterosklerosis (Morabito, *et al.*, 2013).

2.2.2 Penatalaksanaan Diabetes Postprandial

- a. Insulin prandial : insulin yang berfungsi untuk mengontrol kenaikan kadar glukosa setelah makan (postprandial). Insulin prandial diberikan sebelum makan (pre-meal). Contohnya :
 - Humulin R (Kerja pendek) : onset 30-45 menit, efek 2-4 jam, lama kerja 6-8 jam.
 - Lispro (Kerja cepat) : onset 5-15 menit, efek 1-2 jam, dan lama kerja 4-6 jam (Medical, 2023).
- b. Inhibitor katabolisme karbohidrat meliputi inhibitor α -amilase yang bekerja dengan cara menghambat pati untuk dirubah menjadi disakarida dan inhibitor α -glukosidase bekerja dengan cara menghambat disakarida untuk diubah menjadi glukosa (Nair, Kavrekar, and Mishra, 2013) contoh obatnya antara lain :

- Acarbose : dosis harian 100-300 mg/hari (dalam 3 dosis terbagi), efek samping abdominal bloating (penumpukan gas dalam usus), diare, nyeri abdomen, mual dan gangguan hati (Medical, 2023).
- Miglitol : dosis 50 mg 3x sehari, efek samping diare, mual, dan penumpukan gas dalam usus (Joseph T. Dipiro, *et al.*, 2021).

2.3. Acarbose

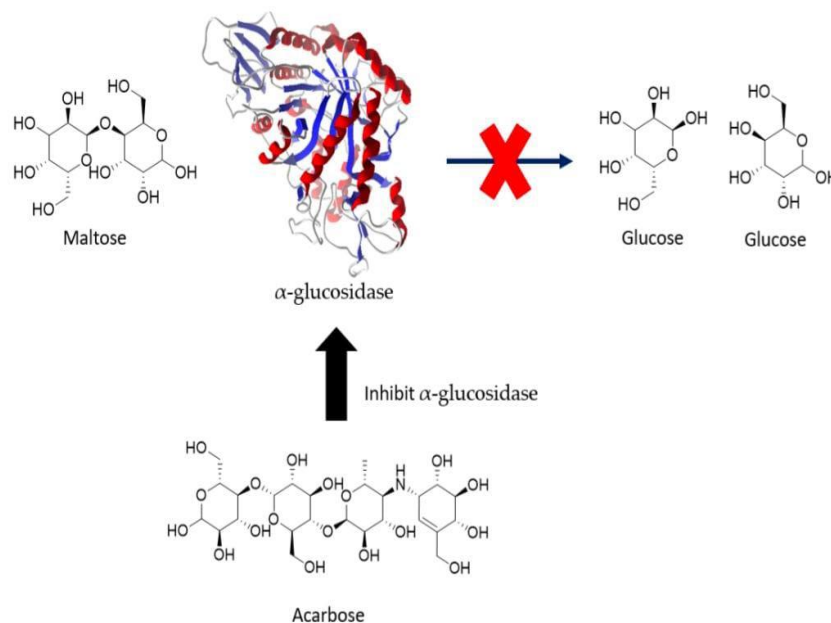


Gambar 2.5 Struktur Acarbose
Sumber : (Tsunoda, *et al.*, 2022)

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 -amilase dan enzim α -glukosidase yang bekerja di usus halus untuk memecah pati, dekstrin, maltose, dan sukrosa sehingga menghasilkan monosakarida yang dapat dicerna. Inhibitor α -amilase dan α -glukosidase seperti acarbose bekerja dengan cara menghambat absorpsi glukosa di dalam usus sehingga dapat mencegah peningkatan gula darah. Selain itu, acarbose memiliki efek penurunan glukosa darah melalui mekanisme

peningkatan pelepasan hormon GLP-1 ke dalam sirkulasi darah, dan juga memperlama efek hormon tersebut (Hasan, *et al.*, 2023).

Acarbose dapat menurunkan kadar gula darah postprandial (setelah makan) dengan menghambat α -amilase dan α -glukosidase sehingga tidak dapat mengubah α -glukosidase menjadi monosakarida seperti yang disajikan pada gambar 2.6. Obat ini biasanya diberikan dengan dosis awal 50 mg yang kemudian dapat dinaikkan secara bertahap hingga 150-600 mg per hari, disarankan untuk dikonsumsi bersama segelas air pada suapan pertama sarapan atau makan (Gendokesumo, *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini, acarbose digunakan sebagai pembanding terhadap senyawa hasil isolasi dari ekstrak buah lada hitam untuk menurunkan kadar glukosa darah (glukosa postprandial).



Gambar 2.6 Mekanisme Acarbose Menurunkan Gula Darah
Sumber : (Gendokesumo, *et al.*, 2022)

2.4. Enzim α -amilase

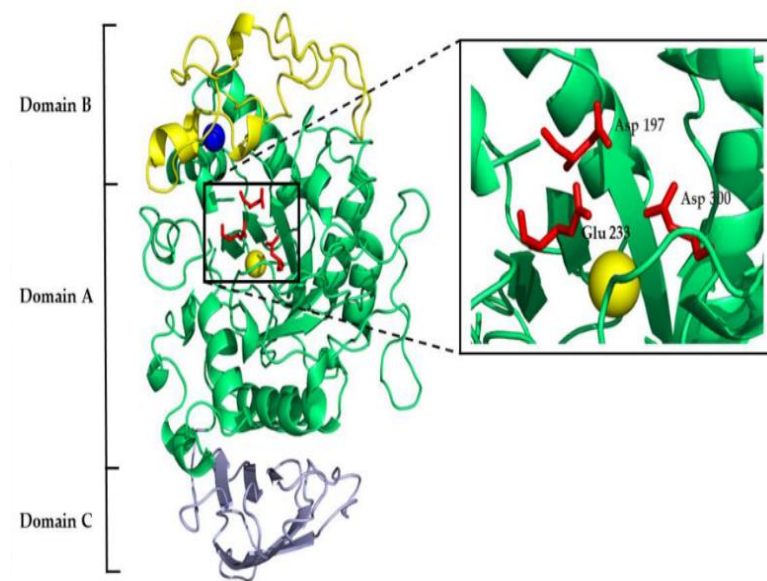
Enzim adalah molekul biologis yang berperan dalam meningkatkan kecepatan reaksi biokimia khusus dan menghasilkan produk yang spesifik. Seperti protein lainnya, enzim dibuat oleh jaringan tubuh untuk memenuhi kebutuhan metabolisme. Enzim dengan spesifisitas, afinitas, dan efisiensi katalitik yang tinggi sangat penting dalam berbagai proses kimia yang mendukung kehidupan dan mempercepat reaksi kimia (Purwani, 2018).

Enzim sebagai suatu senyawa yang berstruktur protein baik murni maupun protein yang terikat pada gugus non protein, memiliki sifat yang sama dengan protein lain (Poedjiadi, 1994) :

- a. Dapat terdenaturasikan oleh panas.
- b. Terpresipitasikan atau terendapkan oleh senyawa-senyawa organik cair seperti etanol dan aseton juga oleh garam-garam organik berkonsentrasi tinggi seperti ammonium sulfat,
- c. Memiliki bobot molekul yang relatif besar sehingga tidak dapat melewati membrane semi permeable atau tidak dapat terdialisis.

α -amilase (α -1,4 glukon-4-glukanohidrolase ; E.C. 3.2.1.1) adalah salah satu produk sekretori utama pankreas (sekitar 5-6%) dan kelenjar ludah. α -amilase berperan dalam pencernaan pati dan glikogen dan dapat ditemukan pada mikroorganisme, dan tumbuhan. α -amilase merupakan keluarga endoamilase yang mengkatalisis hidrolisis awal pati menjadi oligosakarida yang lebih pendek melalui pembelahan ikatan glikosidik α -D-(1,4), baik residu glukosa terminal maupun ikatan α -1,6-ikatan yang dapat dibelah oleh α -amilase. produk akhir dari

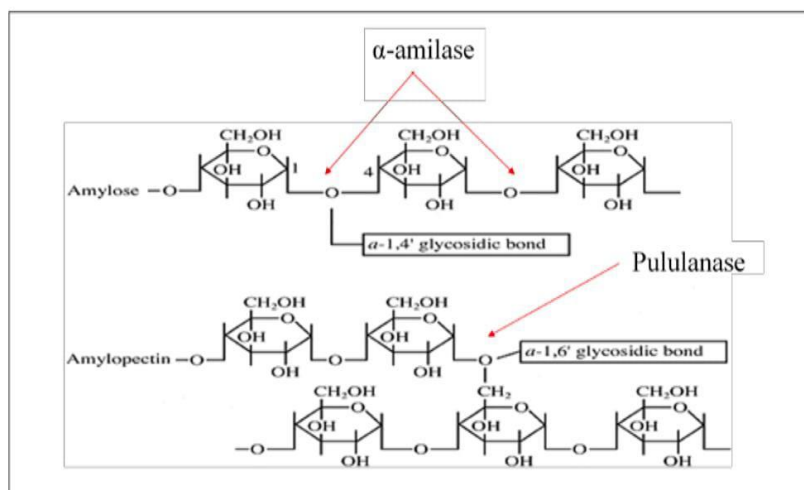
aksi α -amilase adalah oligosakarida dengan konfigurasi α dan limit dekstrin α - (21) yang merupakan campuran maltose, maltotriosa dan oligosakarida bercabang dari 6-8 unit glukosa yang mengandung kedua α -1,4 dan α -1,6 yang berperan dalam proses pemecahan pati (de Sales, *et al.*, 2012).



Gambar 2.7 Struktur 3 dimensi α -amilase
Sumber : (Kalinovskii, *et al.*, 2023)

amilase terdiri dari struktur tiga dimensi yang mampu mengikat substrat dan melalui aksi gugus katalitik yang sangat spesifik, mendorong pemutusan ikatan glikosida. Protein mengandung 3 domain: A, B, dan C. Domain A, yang memiliki (β/α), lipatan barel, merupakan domain inti katalitik. Ini mengandung sekitar 280–300 residu. Triad katalitik (Asp, Asp, Glu) ada di domain A. Domain B disisipkan di antara domain A dan C dan melekat pada domain A melalui ikatan disulfida. Domain C menampilkan struktur lembaran β yang dihubungkan

ke domain A melalui rantai polipeptida sederhana dan tampaknya merupakan domain independen dengan fungsi yang tidak diketahui. Situs aktif (pengikatan substrat) α -amilase terletak di celah panjang yang terletak di antara ujung karboksil domain A dan B. Kalsium (Ca^{2+}) terletak di antara domain A dan B dan dapat bertindak dalam menstabilkan struktur tiga dimensi dan sebagai aktivator alosterik (de Sales, *et al.*, 2012).



Gambar 2.8 Hidrolisis Ikatan α -(1,4) oleh amilase dan ikatan α -(1,6) oleh pululanase
Sumber : (Millati and Nurhayati, 2020)

2.5. Mekanisme Inhibitor Enzim

Inhibitor Enzim adalah suatu zat yang cenderung menurunkan laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Inhibitor enzim adalah zat yang mengubah kerja katalitik enzim dan akibatnya memperlambat, dan menghentikan katalisis (Worthington, *et al.*, 2016). Senyawa inhibitor adalah senyawa yang mengubah kemampuan enzim dalam mengikat substrat, sehingga menyebabkan perubahan

dalam aktivitas katalitik enzim (Sulistyowati, *et al.*, 2017). Ada 3 jenis inhibitor enzim secara umum, diantaranya inhibitor kompetitif, *non*-kompetitif, dan inhibitor substrat (Worthington, *et al.*, 2016).

2.5.1 Inhibitor Kompetitif

Inhibitor kompetitif adalah senyawa yang secara struktural menyerupai substrat dan bersaing dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif suatu enzim untuk membentuk kompleks enzim-inhibitor. Setelah inhibitor menempati situs aktif enzim, ia mencegah pengikatan substrat dan menghapuskan pembentukan produk metabolisme normal. Inhibitor mengikat enzim secara reversible dan oleh karena itu persaingan dapat dikurangi hanya dengan menambahkan lebih banyak substrat (Bjelaković, *et al.*, 2002).

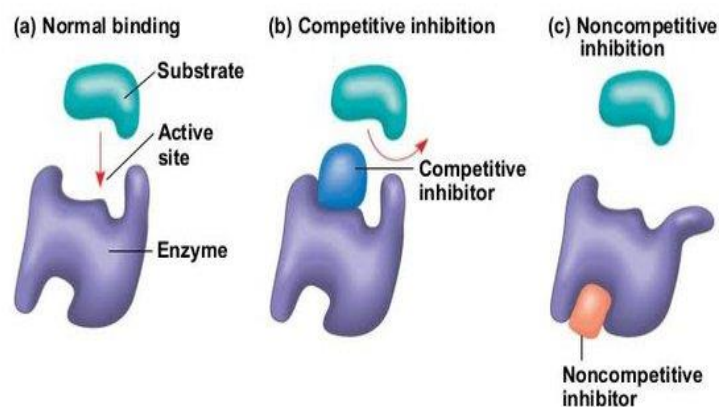
2.5.2 Inhibitor *non*-kompetitif

Dalam jenis *non*-kompetitif, substrat dan inhibitor tidak bersaing untuk mengikat sisi aktif enzim. Inhibitor ini tidak memiliki struktur yang mirip dengan substrat dan biasanya berikatan dengan situs alosterik enzim, mengakibatkan perubahan bentuk sisi aktif enzim (Yulian, 2014).

2.5.3 Inhibitor substrat

Dalam inhibisi unkompetitif, inhibitor mengikat ke sisi alosterik enzim setelah terbentuknya kompleks enzim-substrat. Ini berarti inhibitor tidak dapat berikatan langsung dengan enzim dalam keadaan bebas; ia hanya dapat mengikat setelah terbentuknya kompleks enzim-substrat. Ketika kompleks enzim-substrat inhibitor terbentuk, enzim kehilangan aktivitas katalitiknya (menjadi inaktif),

sehingga produk tidak dapat terbentuk. Produk hanya akan dibebaskan jika inhibitor lepas dari kompleks enzim-substrat inhibitor. Umumnya, inhibisi unkompetitif terjadi ketika produk reaksi enzim menumpuk, dan jarang terjadi pada reaksi enzim yang melibatkan satu substrat dan satu produk (*Bjelaković, et al.*, 2002).



Gambar 2.9 Inhibitor kompetitif dan nonkompetitif
Sumber : (Toppr, 2024)

2.5.4 Inhibitor α -amilase

Inhibitor α -amilase adalah senyawa yang mampu mengurangi aktivitas α -amilase, enzim yang berperan penting dalam pencernaan karbohidrat seperti pati dan glikogen. Penghambatan α -amilase dianggap sebagai strategi untuk mengobati gangguan metabolisme karbohidrat seperti hiperglikemia. Senyawa ini dapat ditemukan dalam berbagai sumber, termasuk tanaman, dan dapat bertindak sebagai penghambat karbohidrat dengan membatasi pencernaan dan penyerapan karbohidrat dalam saluran pencernaan.

Dalam konteks biologi molekuler, inhibitor α -amilase merujuk pada keluarga protein yang secara khusus menghambat α -amilase mamalia dengan membentuk kompleks 1:1 yang ketat dengan enzim tersebut. Senyawa penghambat ini dapat berasal dari sumber protein atau non-protein. Khususnya, sumber protein nabati seperti kacang kedelai (*Glycine max*) telah banyak diteliti untuk aktivitas menghambat α -amilase (Wahyuntari and Tekol, 2012).

Penghambatan α -amilase memiliki dampak signifikan terhadap metabolisme dalam saluran pencernaan, termasuk gangguan atau perlambatan pemecahan karbohidrat, yang dapat mengurangi ketersediaan kalori atau memengaruhi sistem glukosa-insulin. Penelitian pada manusia menunjukkan bahwa penghambatan α -amilase, terutama oleh inhibitor protein, dapat memperlambat penyerapan karbohidrat dan menurunkan konsentrasi glukosa darah setelah makan, memberikan potensi manfaat bagi penderita diabetes melitus tipe 2 (Juge, *et al.*, 2006).

2.6. Uji Aktivitas α -amilase

2.6.1 Metoda Kolorimetri

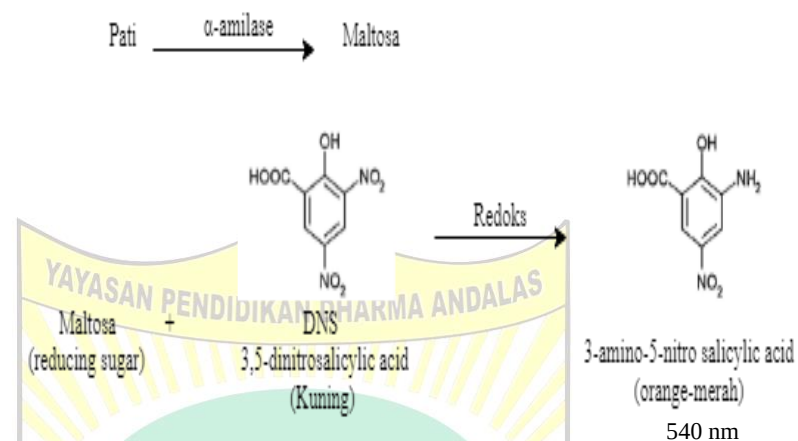
Penghambatan enzim α -amilase dapat dilakukan dengan mengukur jumlah gula pereduksi yang terbentuk akibat aktivitas enzim α -amilase dengan substrat (pati) dengan metoda kolorimetri menggunakan reagen asam dinitrosalisilat (DNS). Dalam metode ini, pati digunakan sebagai substrat untuk enzim α -amilase (Gaspersz, *et al.*, 2022).

Metode DNS (Dinitrosalicylic acid) digunakan untuk mengidentifikasi reaksi enzimatik secara kuantitatif dengan mengamati perubahan warna larutan menjadi cokelat kemerahan sebagai indikator. Dalam proses ini, DNS berperan sebagai oksidator yang mengalami reduksi saat bereaksi dengan sampel, membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Gugus aldehyd pada glukosa dioksidasi oleh asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil dalam suasana basa, yang menghasilkan perubahan warna yang dapat diamati dan diukur secara kuantitatif. Metode ini umum digunakan dalam penelitian untuk mengukur jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati oleh enzim seperti α -amilase (Teo, 2013).

Reagen DNS, atau asam 3,5-dinitrosalisilat, memiliki fungsi penting dalam proses pemecahan pati menjadi gula sederhana seperti glukosa dan maltosa. Semakin banyak maltosa yang terbentuk dari hidrolisis pati, semakin banyak pula pati yang telah terurai menjadi maltosa dan glukosa. DNS, yang merupakan senyawa aromatis, dapat bereaksi dengan gula reduksi untuk membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Asam 3-amino-5-nitrosalisilat ini memiliki sifat khusus yaitu kemampuannya untuk menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang tertentu, khususnya pada 540 nm (Gaspersz, *et al.*, 2022).

Dalam pengujian menggunakan metode DNS, prinsipnya adalah melihat interaksi antara maltosa, glukosa, dan reagen DNS. Interaksi ini menghasilkan perubahan warna kompleks dalam larutan uji, yang menjadi indikator bahwa ada gula pereduksi seperti maltosa dan glukosa yang hadir dalam sampel yang dianalisis.

Metode ini sering digunakan dalam penelitian untuk mengukur aktivitas enzim yang menghidrolisis pati atau senyawa lain menjadi gula-gula sederhana (Gaspersz, *et al.*, 2022).



Gambar 2.10 Mekanisme Reaksi DNS
Sumber : (Bedak, *et al.*, 2022)

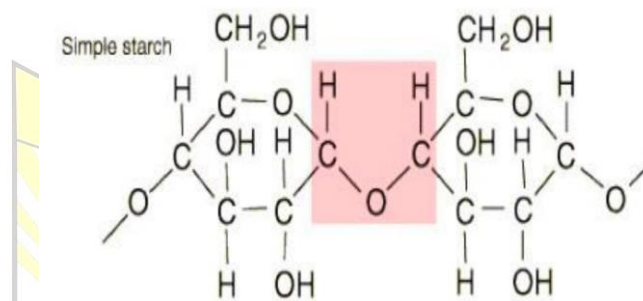
2.6.2 Metode Consumption of Starch (Substrat)

Metode ini didasarkan pada pengikatan iodine ke terminal rantai polimer pati yang menghasilkan kompleks warna biru yang dapat dipantau secara kualitatif ataupun kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis. Pewarnaan berlangsung seketika dengan penambahan larutan pewarna yang mengandung I³⁻ yang merupakan hasil pelarutan antara KI dan I₂ dalam air (Oliveira, *et al.*, 2019).

Prinsip uji iodine adalah bahwa iodine akan membentuk kompleks dengan gugus pati, menghasilkan warna biru kehitaman. Jika warna ini mulai memudar

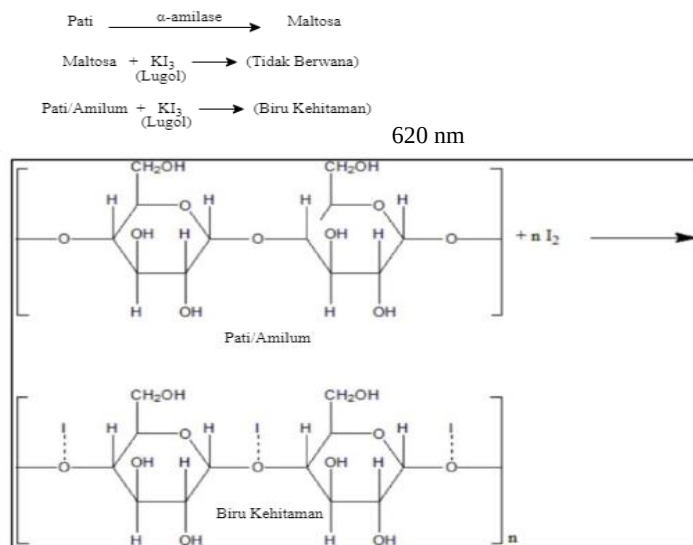
hingga menjadi bening, berarti pati telah terhidrolisis menjadi gula pereduksi (Fleischer, 2019).

Pati adalah karbohidrat yang terdiri dari polimer glukosa dan terbagi menjadi amilosa dan amilopektin. Amilosa adalah komponen dari polimer yang memiliki ikatan α -(1,4) antara unit-unit glukosa, membentuk rantai lurus yang sering disebut sebagai linier dalam struktur pati (Adrian, *et al.*, 2020).



Gambar 2.11 Struktur Pati
Sumber : (Adrian, *et al.*, 2020)

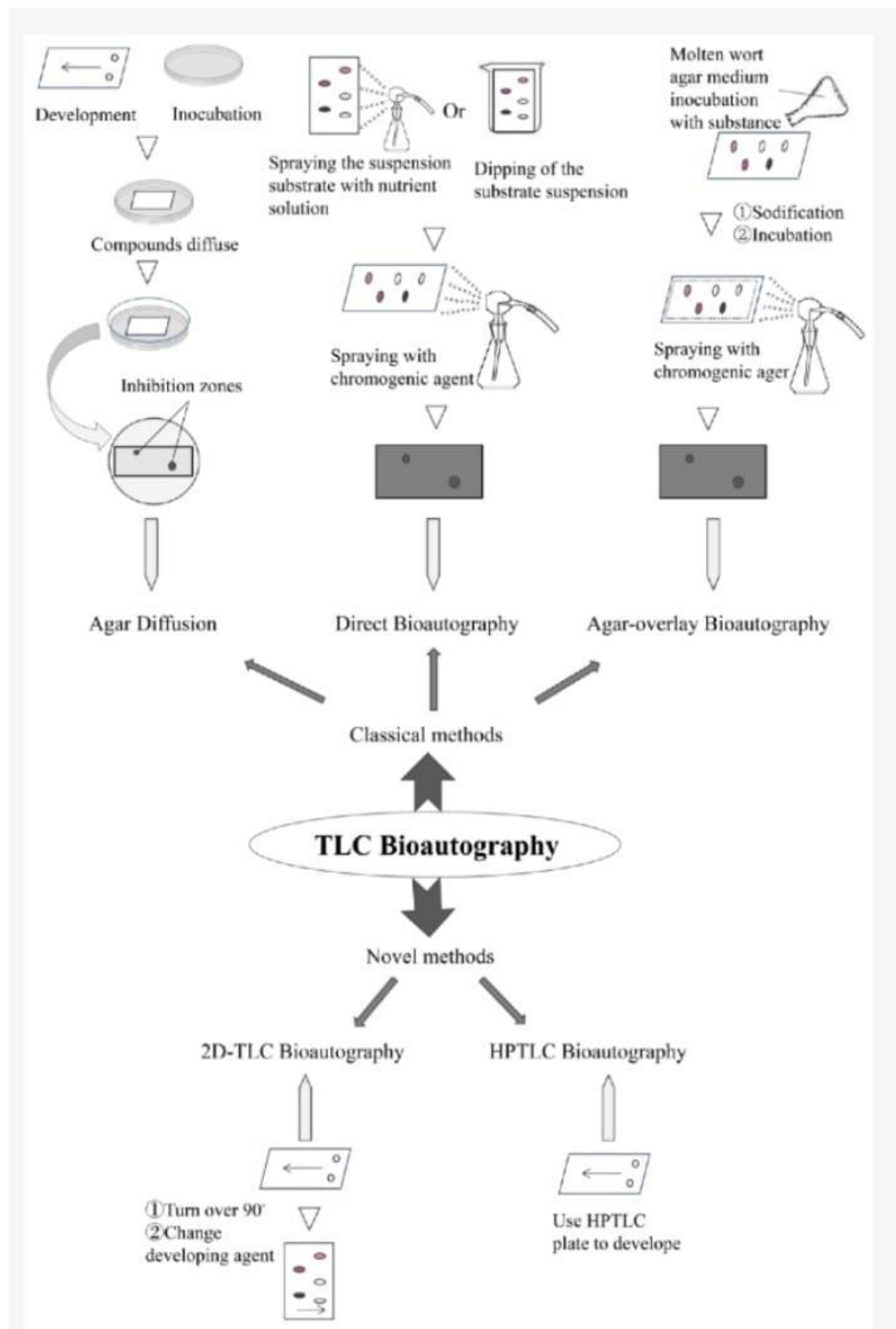
Kemampuan hidrolisis pati secara enzimatis lebih efisien dibandingkan dengan metode kimiawi karena adanya enzim, seperti α -amilase. Pati yang sebagian besar terdiri dari amilosa, memiliki glukosa yang dihubungkan melalui ikatan 1,4- α -glikosidik. Enzim alfa amilase inilah yang memecah ikatan tersebut, sehingga menghasilkan molekul karbohidrat yang lebih pendek, seperti maltosa dan glukosa (Adrian, *et al.*, 2020).



Gambar 2.12 Reaksi Iodium dengan Pati
Sumber : (Fleischer, 2019)

2.7. TLC-Bioautografi

TLC- Bioautografi adalah teknologi yang menggabungkan antara teknik pemisahan serta analisis TLC dengan deteksi aktivitas biologis. TLC bioautografi digunakan untuk mengisolasi, menemukan, dan mengevaluasi konstituen aktif. Bioautografi adalah metode yang menggunakan komponen kimia untuk bereaksi dengan substrat/agen kromogenik untuk membentuk atau menghasilkan warna berbeda dengan latar belakang kromogenik sehingga noda yang timbul dapat diamati dan dilacak komponen aktifnya. KLT yang dikombinasikan dengan bioautografi memiliki keuntungan diantaranya mengurangi penggunaan hewan percobaan, biaya yang relative murah, waktu pengembangan yang cepat, serta sensitivitas tinggi (M. Wang, *et al.*, 2021). Prinsip metode ini adalah pemisahan dan deteksi sifat biologis dari komponen campuran yang dilakukan langsung pada plat KLT (Jesioneck, *et al.*, 2015).



Gambar 2.13 Skema metode bioautografi yang dikombinasikan dengan TLC

Sumber : (Wang, *et al.*, 2021)

2.8. Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses untuk mengambil senyawa aktif dari bahan nabati atau hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses pembuatan ekstrak ini dapat dilakukan dengan berbagai metode, tergantung pada sifat dan tujuan ekstraksi tersebut (Depkes RI, 2000).

Ekstraksi bertujuan untuk mengeluarkan semua komponen kimia yang ada dalam simplisia. Prinsip dasar dari ekstraksi adalah pemindahan massa komponen dari zat padat ke pelarut, yang dimulai ketika pelarut bersentuhan dengan lapisan antar muka simplisia, kemudian berdifusi ke dalam pelarut. Dalam proses ekstraksi komponen kimia dari sel tanaman, pelarut organik akan menembus dinding sel dan memasuki rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik yang ada di luar sel, dan larutan pekat akan berdifusi keluar dari sel. Proses ini berlanjut hingga tercapai keseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel. Faktor-faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi meliputi jenis persiapan sampel, waktu ekstraksi, jumlah pelarut, suhu pelarut, dan jenis pelarut (Depkes RI, 2000).

Ekstraksi dibagi menjadi dua jenis, yaitu ekstraksi cara dingin dan ekstraksi cara panas. Ekstraksi yang termasuk cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi sedangkan ekstraksi yang termasuk cara panas yaitu sokletasi, refluks, digesti, infusa, dan dekok (Depkes RI, 2000).

A. Cara dingin

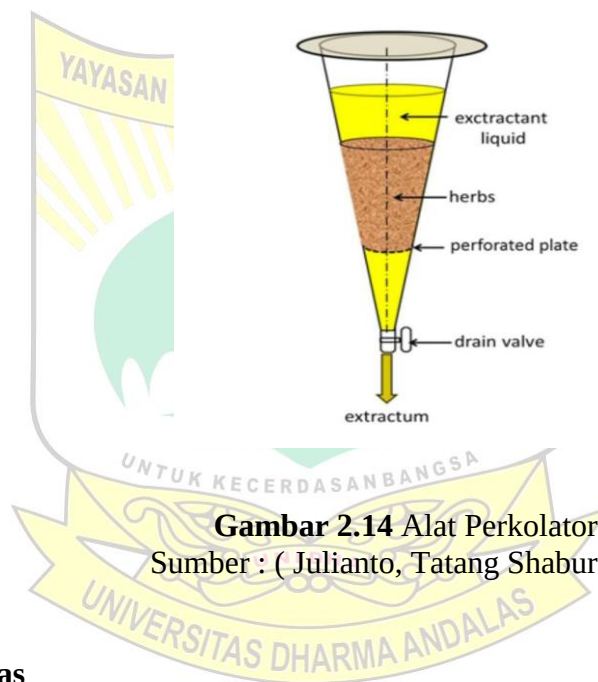
1. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi simplisia yang melibatkan penggunaan pelarut dengan pengocokan atau pengadukan beberapa kali pada suhu ruangan (kamar). Pengadukan dapat mempercepat proses ekstraksi. Namun, kelemahan dari metode ini adalah waktu yang dibutuhkan bisa cukup lama, dan ekstraksi menyeluruh dapat memerlukan banyak pelarut, yang berpotensi menyebabkan kehilangan metabolit. Selain itu, beberapa senyawa mungkin tidak diekstraksi dengan efisien jika tidak larut pada suhu kamar (27°C). Maserasi dilakukan pada suhu kamar (27°C) untuk menghindari degradasi metabolit yang sensitif terhadap panas (Depkes RI, 2000).

2. Perkolasi

Perkolasi adalah metode ekstraksi di mana pelarut baru terus digunakan hingga ekstraksi dianggap lengkap (ekstraksi menyeluruh), biasanya dilakukan pada suhu ruangan. Proses ini melibatkan beberapa tahap: pengolahan bahan, maserasi antara, dan tahap perkolasi utama (penetesan atau penampungan ekstrak). Proses ini berlangsung terus-menerus hingga diperoleh ekstrak (perkolat) dengan volume 1-5 kali jumlah bahan yang digunakan (Depkes RI, 2000). Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori (Sambodo, *et al.*, 2022).

Keuntungan metode perkolasi adalah sangat sesuai untuk bahan yang tidak tahan panas. Metode ini lebih efektif karena aliran pelarut yang digunakan menggantikan larutan dengan konsentrasi lebih rendah, meningkatkan perbedaan konsentrasi. Namun, kekurangan dari metode perkolasi adalah membutuhkan waktu yang cukup lama, sehingga kurang efisien dalam hal waktu penggunaan (Depkes RI 2000).



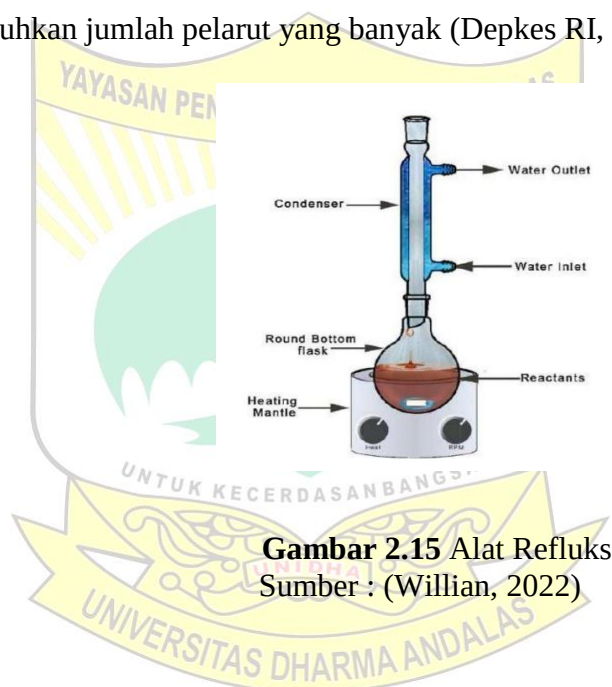
Gambar 2.14 Alat Perkolator
Sumber : (Julianto, Tatang Shabur, 2019)

B. Cara Panas

1. Refluks

Refluks adalah metode ekstraksi yang menggunakan pelarut pada suhu titik didihnya, dengan waktu tertentu dan volume pelarut yang relatif konstan, dilengkapi dengan pendingin balik. Proses ini biasanya diulang pada residu pertama sebanyak 3-5 kali untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh (Depkes RI, 2000). Prinsip dasar metode refluks adalah

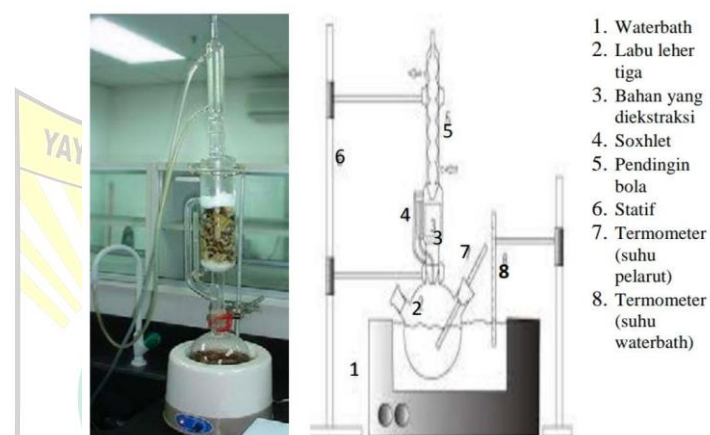
pelarut yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, kemudian uap tersebut didinginkan oleh kondensor sehingga mengembun kembali. Hasil kondensasi ini kemudian turun kembali ke dalam wadah reaksi, memastikan bahwa pelarut tetap tersedia sepanjang proses ekstraksi (Susanty & Bachmid, 2016). Kelebihan metode refluks adalah padatan yang memiliki tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung dapat diekstrak dengan metode ini. Sedangkan kelemahannya adalah membutuhkan jumlah pelarut yang banyak (Depkes RI, 2000).



2. Soxhlet

Soxhlet adalah metode ekstraksi yang menggunakan pelarut yang selalu diganti dengan yang baru, biasanya dilakukan dengan alat khusus yang memungkinkan ekstraksi secara terus-menerus dengan jumlah pelarut yang tetap dan dilengkapi dengan kondensor balik. Prinsip dasar dari sokletasi adalah proses penyaringan berulang kali untuk mencapai hasil ekstraksi yang optimal dengan penggunaan pelarut yang relatif

sedikit. Sokletasi memiliki beberapa keuntungan, antara lain penggunaan pelarut yang lebih sedikit, waktu proses yang lebih cepat, hasil ekstraksi yang lebih banyak, dan ekstraksi yang lebih menyeluruh karena dilakukan secara berulang. Namun, kelemahannya adalah potensi kerusakan pada solut atau komponen lain yang tidak tahan panas, akibat pemanasan ekstrak yang dilakukan secara terus-menerus (Depkes RI, 2000).



Gambar 2.16 Alat Soxhlet
Sumber : (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021)

3. Infusa

Infusa adalah larutan cair yang diperoleh dengan cara mengekstraksi bahan nabati menggunakan pelarut air pada suhu 90°C selama 15 menit. Biasanya, infusa dibuat dari simplisia yang memiliki jaringan lunak seperti bunga dan daun, yang mengandung minyak atsiri dan senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan yang lama. Kelebihan dari metode infusa meliputi mudah dilakukan, biaya pembuatannya yang relatif murah, dan penerapannya yang lebih praktis untuk masyarakat umum. Namun,

kelemahan infusa adalah hasilnya tidak dapat disimpan dan digunakan setelah 24 jam karena ekstraksi dengan pelarut air cenderung tidak stabil dan rentan terhadap kontaminasi oleh jamur dan kapang. (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021).



Gambar 2.17 Alat Infusa
Sumber : (Nurani, *et al.*, 2014)

4. Dekoktasi

Dekoktasi adalah metode ekstraksi melalui perebusan, di mana air digunakan sebagai pelarut pada suhu 90-95°C selama 30 menit. Sediaan ini dapat disimpan dalam suhu dingin untuk jangka waktu yang lama, asalkan tidak terjadi kontaminasi (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021).

2.9. Isolasi dan Pemurnian Senyawa

Isolasi adalah teknik untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam bahan alam. Proses isolasi senyawa dari bahan alam meliputi beberapa tahap, yaitu ekstraksi, fraksinasi, pemurnian, dan identifikasi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa kimia dari sampel bahan alam

ke dalam pelarut. Prinsip utama metode ekstraksi adalah distribusi zat terlarut ke dalam pelarut, dan hasil dari proses ini disebut ekstrak. Fraksinasi adalah proses pemisahan komponen-komponen dalam ekstrak menjadi fraksi-fraksi yang lebih murni. Metode fraksinasi dapat dilakukan menggunakan teknik seperti kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), dan GC (Gas Chromatography). Pemurnian dan identifikasi merupakan tahap akhir dalam isolasi, di mana senyawa metabolit sekunder dipisahkan dan dikarakterisasi secara lebih detail. Salah satu metode yang paling umum dan efektif untuk pemurnian senyawa adalah dengan menggunakan teknik kristalisasi atau rekristalisasi (Dianti Pratiwi, *et al.*, 2021).

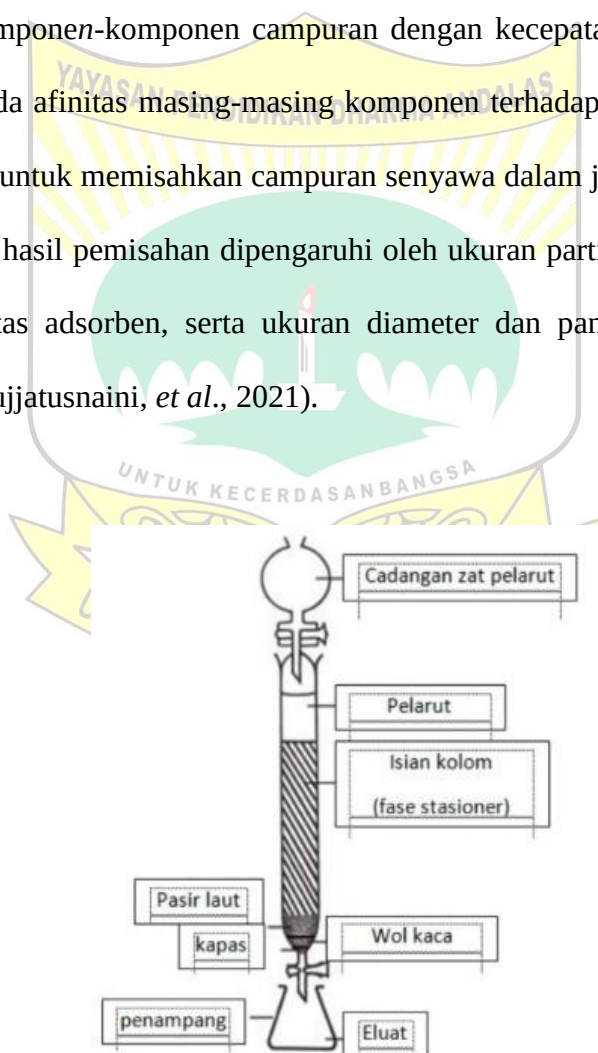
2.9.1 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah teknik pemisahan senyawa yang hingga saat ini masih dipakai. Prinsip kerja dari kromatografi kolom melibatkan perbedaan kemampuan senyawa campuran untuk diserap. Senyawa yang bersifat polar akan diserap lebih kuat oleh gel silika, sehingga mereka bergerak lebih lambat, sedangkan senyawa non-polar diserap lebih lemah dan bergerak lebih cepat (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021).

Senyawa yang dipisahkan dengan kromatografi kolom mengikuti prinsip yang serupa dengan metode kromatografi lainnya, yaitu perbedaan gaya antar molekul dalam sampel, fase gerak, dan fase diam. Kromatografi kolom bekerja dengan cara mengadsorpsi senyawa-senyawa dari campuran yang memiliki afinitas yang berbeda-beda terhadap permukaan fase diam atau adsorben. Metode ini umumnya digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dalam

jumlah cukup besar, tergantung pada diameter dan panjang kolom yang digunakan. Keberhasilan pemisahan dalam kromatografi kolom dipengaruhi oleh pemilihan adsorben dan eluen atau pelarut, ukuran kolom, serta kecepatan elusi (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021).

Kromatografi kolom memiliki karakteristik dengan fase diam yang berupa bahan padat seperti gel silika, alumina, atau karbon aktif, dan fase gerak yang berbentuk cair seperti aseton atau etanol. Fase gerak ini melarutkan dan membawa komponen-komponen campuran dengan kecepatan yang bervariasi tergantung pada afinitas masing-masing komponen terhadap adsorben. Teknik ini digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dalam jumlah yang relatif besar, dengan hasil pemisahan dipengaruhi oleh ukuran partikel fase diam dan tingkat aktivitas adsorben, serta ukuran diameter dan panjang kolom yang digunakan (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021).



Gambar 2.18 Kromatografi Kolom
Sumber : (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021)

1. Filtrasi Gel

Filtrasi gel merupakan teknik penting dalam bidang biopolymer, Gel adalah bahan berpori netral yang memungkinkan molekul dengan ukuran berbeda untuk menembus ke dalam gel pada tingkat yang berbeda. Ini merupakan suatu proses yang bersifat reversible sehingga molekul-molekul kecil yang masuk ke bagian dalam gel dapat dielusi keluar. Untuk gel tertentu, terdapat batas pengecualian terhadap berat molekul yang melebihi batas tertentu sehingga tidak akan terjadi penetrasi ke dalam gel. Secara umum, molekul akan dielusi dalam urutan kebalikan dari berat molekulnya, meskipun untuk molekul yang lebih kecil terdapat faktor lain yang berperan seperti polaritas (Coletage SM, 2008).

Sephadex LH-20 yang merupakan hasil alkilasi sebagian besar gugus hidroksil sephadex G-24 telah menjadi gel hidrofilik yang paling populer dalam isolasi bahan alam. Gel akan mengembang dalam pelarut polar seperti air, metanol, dan tetrahidrofuran. Dalam mode filtrasi gel, dengan menggunakan pelarut tunggal, senyawa dipisahkan menurut ukurannya (Coletage SM, 2008).

2. Kromatografi Kolom Preparatif

Metode kromatografi open-column yang konvensional berdasarkan gravitasi masih banyak digunakan baik dalam mode filtrasi cepat maupun pemisahan. Sampel dengan rasio 1:10 sampai 1:300 dapat digunakan tergantung pada tingkat kesulitan pemisahan senyawa dari campuran. Fase diam tersedia dengan beragam ukuran partikel (10-200 μm) dan porositas (50 nm). Silika merupakan fase diam yang paling sering digunakan, tetapi beberapa fase silika yang terikat (cyano, amino, hydrocyl, nitro) juga digunakan meskipun cenderung

lebih mahal. Polimer stiren-divinibenzena (XAD, HP, SP resin) digunakan untuk kromatografi fase terbalik, walaupun butirannya relatif besar (250-600) sehingga menghalangi pemisahan dengan resolusi tinggi. Alumina (Al_2O_3) yang dulu awalnya sering digunakan, hanya bisa untuk senyawa yang memiliki kestabilan yang tinggi. Dalam bentuk asam atau basanya dapat menjadi katalis kuat yang menyebabkan reaksi yang tidak diinginkan (Coletage SM, 2008).

Kromatografi kolom terbuka merupakan metode yang lambat dengan konsekuensi bahwa material hilang akibat dari proses adsorpsi yang irreversibel. Selain itu, metode ini juga membutuhkan pelarut dalam jumlah besar apalagi dalam elusi pelarut gradien bertingkat sehingga tidak mudah untuk dipulihkan (Coletage SM, 2008).

3. Kromatografi Flash

Kromatografi flash merupakan teknik sederhana dan menguntungkan yang diterapkan dalam kimia produk sintetis dan alam. Secara singkatnya, kolom diisi dengan adsorben yang kering, selanjutnya sampel dimasukkan dan pelarut dipaksa melewati kolom di bawah tekanan udara terkompresi atau nitrogen (kira-kira 1 bar di atas tekanan atmosfer). Adsorban (fase diam) yang sering digunakan adalah silika gel (25-200 μm). Fase terikat termasuk fase diam kiral juga dapat digunakan (Coletage SM, 2008).

2.9.2 Kromatografi Planar

Kromatografi planar merupakan istilah kolektif untuk semua metode pemisahan analitik, mikropreparatif, dan preparative di mana fase gerak berpindah melewati fase diam pada suatu pelarut (susunan planar). Metode-

metode ini pada umumnya terdiri dari dua jenis yaitu KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan *forced-flow planar chromatography* (FFPC). Dalam KLT, pemisahan senyawa yang terjadi merupakan hasil dari gaya penggerak fase gerak dan aksi perlambatan oleh fase diam. FFPC meliputi *centrifugal thin layer chromatography* (CTLC), *overpressure layer chromatography* (OPLC), dan *electroplanar chromatography*. Pemisahan KLT dapat digunakan dalam pemilihan kondisi kromatografi kolom. Kondisi KLT yang memberikan nilai R_f dapat ditransfer sebagai pendekatan dalam pemisahan dengan kromatografi kolom. Identifikasi senyawa target pada pelat KLT dapat dilakukan dengan membandingkan dengan standar atau melalui reagen penampak noda (Coletage SM, 2008).

2.10. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau biasa disebut HPLC (High Performance Liquid Chromatography) adalah suatu sistem pemisahan senyawa berdasarkan kromatografi kolom dimana terdapat kemajuan teknologi kolom dengan system pompa tekanan tinggi dan detektor yang sensitif sehingga menghasilkan pemisahan dengan kecepatan dan efikasi yang tinggi (Mc Naira, 1988).

Dalam Metode HPLC ini digunakan fase diam yang terikat pada polimer berpori yang terdapat dalam kolom baja tahan karat yang berdiameter kecil dan fase gerak berupa cairan yang mengalir akibat adanya tekanan yang besar. Senyawa dipantau ketika keluar dari kolom dengan menggunakan pendeteksi, biasanya dengan mengukur spectrum serapan UV. Hasil pemisahan analitik

diberikan dalam harga waktu, waktu yang dibutuhkan untuk tinggal dalam fase stasioner adalah waktu retensi (Mc Naira, 1988).

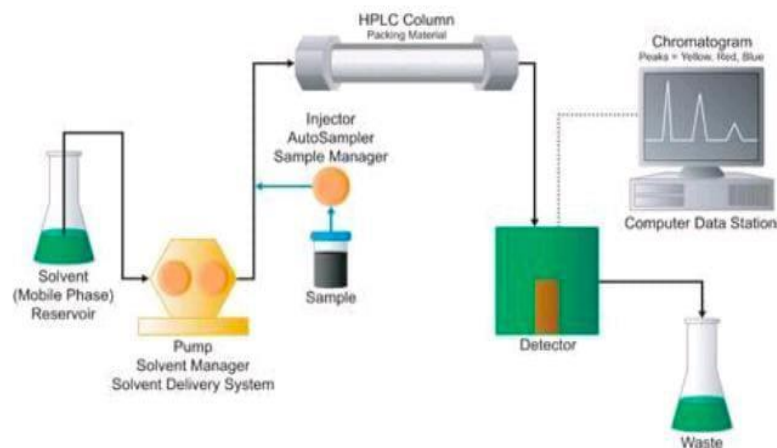
Ada dua tipe pemisahan dalam HPLC yang mana tergantung pada polaritas relatif dari pelarut dan fase diam, yaitu (Hermanto, 2009) :

a. Fase normal (*normal phase*)

Dalam tipe ini kolom diisi dengan partikel silika yang sangat kecil dan pelarut non polar, misalnya *n*-heksana. Sebuah kolom sederhana memiliki diameter internal 4,6 mm (dan mungkin kurang dari nilai ini) dengan panjang 150-200 mm. Senyawa- senyawa polar dalam campuran melalui kolom akan melekat lebih lama pada silika yang polar dibanding dengan senyawa- senyawa yang non polar. Oleh karena itu, senyawa non polar kemudian akan melewati kolom lebih cepat.

b. Fase terbalik (*reverse phase*)

Dalam kasus ini ukuran kolom sama dengan kolom fase normal, tetapi silika dimodifikasi menjadi non polar melalui pelekatan rantai-rantai hidrokarbon panjang pada permukaannya secara sederhana baik berupa atom karbon 8 atau 18. Sebagai contoh, pelarut polar yang digunakan berupa campuran air dan alkohol seperti metanol.



Gambar 2.19 Diagram Alir HPLC
Sumber : (Angraini and Desmaniar, 2020)

Peralatan HPLC terdiri dari beberapa bagian antara lain (Mc Naira, 1988).:

a) Tempat Pelarut

Tempat pelarut biasanya berupa sebuah botol yang tahan terhadap pelarut organik atau pelarut lain yang digunakan oleh sistem. Salah satu syarat larutan untuk HPLC adalah bebas dari partikel dan gas. Karena adanya partikel dan gas yang terbawa masuk ke dalam kolom dan pompa. Adanya gas yang masuk ke pompa dan kolom dapat mengakibatkan terganggunya kestabilan pompa dan bila masuk ke detektor maka pemisahannya menjadi tidak baik.

b) Pompa

Pompa digunakan untuk mendorong larutan dari botol penyimpanan ke dalam system HPLC. Pompa dilengkapi dengan system petunjuk aliran dan petunjuk tekanan yang diakibatkan oleh

aliran tersebut. Suatu pompa di dalam suatu system harus mengalirkan larutan ke seluruh system dengan kecepatan alir yang tetap.

c) Injektor

Bagian ini merupakan alat dimana contoh yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam alat melalui injektor. Terdapat 3 jenis injektor, yaitu :

- Aliran henti yaitu aliran dihentikan, penyuntikan dilakukan pada tekanan atmosfer, system tutup dan aliran dilanjutkan lagi.
- Septum yaitu injektor langsung pada aliran. Septum tidak dapat dipakai pada semua pelarut. Selain itu partikel kecil dari septum cenderung lepas dan menyumbat injektor dan kolom. Katup jalan-kitar dipakai untuk menyuntikan volum yang lebih besar dari 10 μ l dan dipakai pada sistem yang diotomatiskan.

d) Kolom

Kolom merupakan bagian utama, keberhasilan dan kegagalan analisis bergantung pada kondisi kerja yang tepat. Kolom terbagi atas 2 kelompok yaitu kolom preparatif dan kolom analitik. Kolom berfungsi sebagai tempat untuk fase diam dalam kromatografi.

e) Detektor

Detektor berfungsi mendeteksi komponen-komponen yang terdapat di dalam contoh yang akan keluar dari kolom. Komponen contoh keluar dari kolom dan masuk ke dalam detector bersama fase gerak. Detektor yang biasa digunakan adalah detektor UV dan detektor indeks refraksi. F. Rekorder Fungsi dari rekorder adalah sebagai pencatat dan member gambar yang terbentuk puncak diatas kertas pencatat setelah komponen dari campuran zat yang telah dipisahkan terpisah keluar dari kolom dan melintas detektor.

2.11. Karakterisasi Senyawa

2.11.1 *Fourier Transform Infra Red (FTIR)*

Spektrofotometri inframerah dapat digunakan untuk menentukan struktur, terutama pada senyawa organik, serta untuk analisis kuantitatif. Rentang radiasi dalam spektroskopi inframerah mencakup panjang gelombang antara 0,78 hingga 1000 μm , atau bilangan gelombang dari 12.800 hingga 10 cm^{-1} . Secara umum, radiasi inframerah dibagi menjadi tiga wilayah: daerah IR dekat (12.800 hingga 4.000 cm^{-1}), daerah IR tengah (4.000 hingga 200 cm^{-1}), dan daerah IR jauh (200 hingga 10 cm^{-1}) (Hermanto, 2009).

Spektrofotometri Fourier Transform Infrared (FTIR) adalah metode analisis yang digunakan untuk menentukan gugus fungsi, mengidentifikasi senyawa, dan menganalisis campuran. Identifikasi gugus fungsional dilakukan berdasarkan bilangan gelombang yang diperlukan untuk molekul bergetar pada ikatan, baik

dalam bentuk pemanjangan (stretching) atau pembengkokan (bending). Setiap ikatan memiliki bilangan gelombang yang unik, sehingga setiap molekul menghasilkan spektrum inframerah yang khas atau sidik jari (fingerprint) tertentu. Prinsip analisis FTIR didasarkan pada fakta bahwa frekuensi sinar inframerah yang diserap oleh senyawa organik berkaitan dengan energi yang dipancarkan pada getaran ikatan, translasi, dan rotasi molekul (Hermanto, 2009).

Ketika suatu molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan peningkatan amplitudo getaran atom-atom yang terikat, sehingga molekul tersebut menjadi tereksitasi. Energi yang diserap kemudian dilepaskan dalam bentuk panas saat molekul kembali ke keadaan dasar. Panjang gelombang yang diserap oleh suatu ikatan tergantung pada jenis getaran ikatan tersebut. Oleh karena itu, spektroskopi inframerah dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gugus fungsi dalam molekul. Variasi energi inframerah yang diserap oleh molekul disebabkan oleh perubahan momen dipol saat energi diserap (Supratman, 2010). Berikut Tabel bilangan gelombang Spektrofotometer FTIR :

Tabel 2.1 Daerah Serapan Spektrum Inframerah

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Puncak	Gugus Fungsi	Senyawa
3700-3584	Medium, sharp	O-H stretching	Alkohol
3550-3200	Strong, broad	O-H stretching	Alkohol
3500	Medium	N-H stretching	Amina primer
3350-3310	Medium	N-H stretching	Amina sekunder
3300-2500	Strong, broad	O-H stretching	Asam karboksilat
3200-2700	Weak, broad	O-H stretching	Alkohol
3000-2800	Strong, broad	N-H stretching	Garam amina
3333-3267	Strong, sharp	C-H stretching	Alkuna
3100-3000	Medium	C-H stretching	Alkena
3000-2840	Medium	C-H stretching	Alkana
2830-2695	Medium	C-H stretching	Aldehid
2260-2190	Weak	C≡C stretching	Alkuna (disubstitusi)
2140-2100	Weak	C≡C stretching	Alkuna (monosubstitusi)
2000-1650	Weak	C-H bending	aromatik (overtone)
1815-1785	Strong	C=O stretching	Asam halide
1770-1780	Strong	C=O stretching	vinil/ fenil ester
1760	Strong	C=O stretching	Asam karboksilat (monomer)
1750-1735	Strong	C=O stretching	Ester
1750-1735	Strong	C=O stretching	δ-lakton
1740-1720	Strong	C=O stretching	Aldehid
1730-1715	Strong	C=O stretching	α,β-ester jenuh
			
1725-1705	Strong	C=O stretching	Keton alifatik (sikloheksanon/ siklopentenon)
1720-1706	Strong	C=O stretching	Asam karboksilat (dimer)
1690	Strong	C=O stretching	Amida primer
1685-1666	Strong	C=O stretching	Keton terkojugasi
1680	Strong	C=O stretching	Amida sekunder
1680	Strong	C=O stretching	amida tersier
1678-1668	Weak	C=C stretching	Alkena (disubstitusi - trans)
1675-1665	Weak	C=C stretching	Alkena (trisubstitusi)
1675-1665	Weak	C=C stretching	Alkena (tetrasubstitusi)
1662-1626	Medium	C=C stretching	Alkena (disubstitusi – cis)
1648-1638	Strong	C=C stretching	Alkena (monosubstitusi)
1465	Medium	C-H bending	Alkana (gugus metilen)
1450	Medium	C-H bending	Alkana (gugus metil)
1390-1380	Medium	C-H bending	Aldehyde
1500-400	Daerah sidik jari		

Sumber : (Alauhdin, *et al.*, 2021)

2.11.2 LC-MS

Kromatografi cair (Liquid Chromatography (LC)) dikombinasikan dengan spektrometri massa (Mass Spectrometry (MS)) menciptakan alat analisis yang ideal dalam laboratorium. LC-MS adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) telah menjadi instrumen pilihan untuk memisahkan, menganalisis, dan memurnikan campuran senyawa organik sejak tahun 1970an (McMaster, 2005).

Kolom KCKT dapat memisahkan hampir semua campuran yang dapat dilarutkan. MS dapat mengionisasi larutan puncak yang terpisah dan menghasilkan berat molekul untuk setiap komponen puncak. Sistem LC-MS/MS dapat memecah ion induk menjadi pola fragmentasi yang berbeda dan dapat memisahkan daughter ion untuk identifikasi dan kuantisasi. Pola fragmentasi yang khas dari masing-masing ion induk dapat diidentifikasi dengan membandingkan pola fragmentasi yang dihasilkan oleh database komputerisasi standar (McMaster, 2005).

Pada prinsipnya, terdapat empat langkah yang terlibat dalam menghasilkan spectrum massa pada instrumen spektrometer massa, sebagai berikut:

- Pengenalan sampel
- Ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gas (metode ionisasi)
- Pemilahan ion fase gas yang dihasilkan berdasarkan rasio massa terhadap muatan (penganalisa massa); dan

- Deteksi ion yang terpisah

Sumber ionisasi yang ideal untuk spectrometer massa harus memberikan efisiensi ionisasi yang tinggi dan stabilitas ion yang tinggi untuk analisis massa selanjutnya oleh penganalisis massa. Selain itu, kontrol energy internal yang disimpan pada ion selama ionisasi harus dapat dicapai di sumber ionisasi untuk mengontrol tingkat fragmentasi. Berbagai metode ionisasi telah dikembangkan termasuk electron ionitation (EI), ionisasi kimia (CI), ionisasi desorpsi (DI), desorpsi/ionisasi laser berbantuan matriks (MALDI), desorpsi ionisasi ekstrospray (DESI), ionisasi electrospray (ESI), dan ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI) (McMaster, 2005).

Fungsi dasar dari penganalisa massa adalah untuk mengukur rasio massa terhadap muatan ion (partikel bermuatan) dan menyediakan sarana untuk memisahkan ion. Prinsip operasi penganalisis massa bergantung pada interaksi partikel bermuatan dengan medan listrik atau magnet. Penganalisis massa yang umum digunakan adalah sector magnetic, quadropole, perangkap ion, time-of-flight (TOF), dan resonansi siklotron ion transformasi Fourier (FT-ICR).