



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES FRAKSI-FRAKSI
EKSTRAK ETANOL HERBA MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L.)
MELALUI PENGHAMBATAN AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI
FRAKSI YANG AKTIF**

SKRIPSI

**SILVI KHAIRUNNISA
0706264980**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS ANTIDIABETES FRAKSI-FRAKSI
EKSTRAK ETANOL HERBA MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L.)
MELALUI PENGHAMBATAN AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI
FRAKSI YANG AKTIF**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**SILVI KHAIRUNNISA
0706264980**

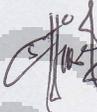
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Silvi Khairunnisa

NPM : 0706264980

Tanda Tangan : 

Tanggal : Januari 2012

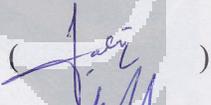
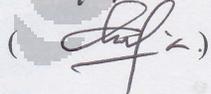
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Silvi Khairunnisa
NPM : 0706264980
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi-fraksi Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) melalui Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: Dr. Katrin, M.S., Apt.	()
Pembimbing II	: Dr. Abdul Mun'im, MSi., Apt.	()
Penguji I	: Dra. Azizahwati, M.S., Apt.	()
Penguji II	: Dr. Arry Yanuar, M.Si., Apt.	()
Penguji III	: Dr. Berna Elya, M.Si., Apt.	()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 11 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Tiada kata yang pantas diucapkan selain *alhamdulillahirabbil'alamin* kepada Allah *Subhanahu wa Ta'ala*, yang atas izin-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

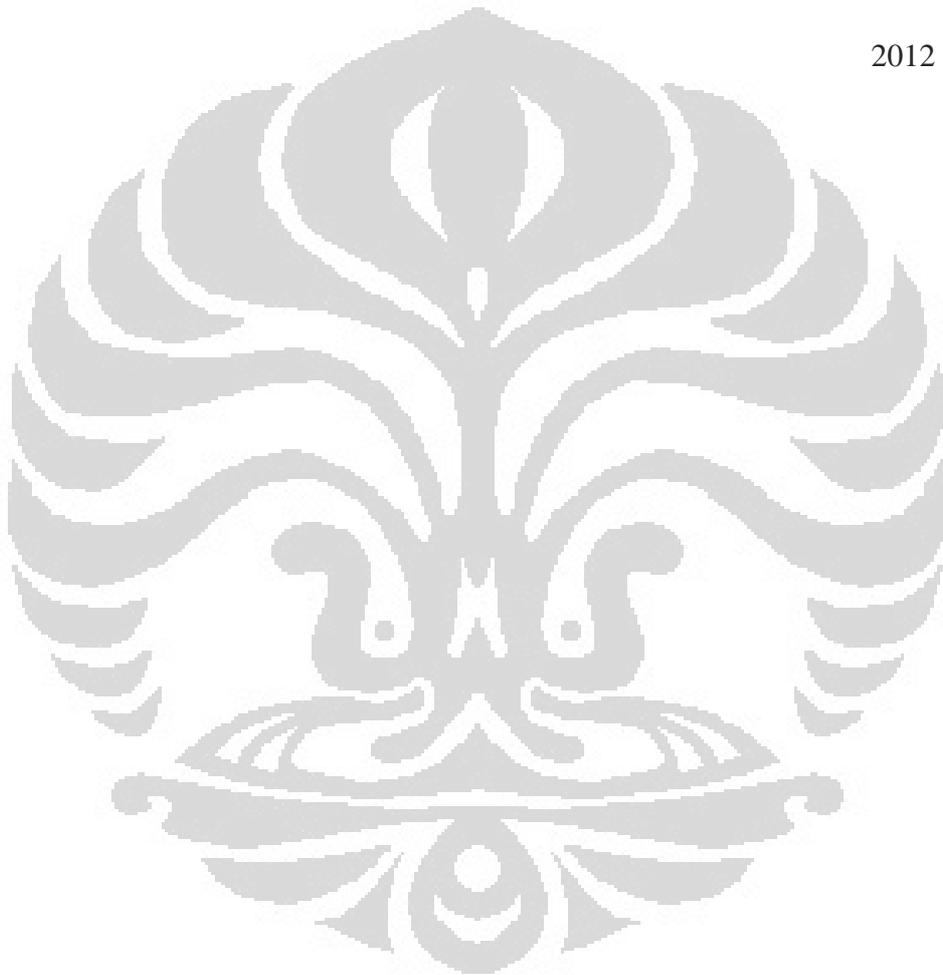
Dalam penulisan skripsi ini banyak sekali orang-orang di sekitar yang telah membantu, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini diselesaikan. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Katrin, M.S., Apt. selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
2. Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.S., Apt., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
4. Bapak Dr. Harmita, Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
5. Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama ini;
6. Kedua orang tua, Drs. Sukarno dan Alm. Ibu Dra. Siti Salbiyah serta adik-adik Rosya, Mala, dan Balqis yang selalu memberikan dukungan dan doa demi keberhasilan penyusunan skripsi;
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari tak mampu membalas segala kebaikan pihak-pihak yang telah membantu selain dengan ucapan terima kasih. Semoga Allah memberi balasan dengan sesuatu yang lebih baik lagi. Semoga penulisan skripsi ini dapat berguna bagi ilmu pengetahuan, khususnya bagi pengembangan ilmu kefarmasian sehingga manfaatnya dapat dirasakan oleh seluruh lapisan masyarakat.

Penulis

2012



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Silvi Khairunnisa
NPM : 0706264980
Program Studi : Sarjana
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi-fraksi Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) melalui Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif

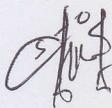
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : Januari 2012

Yang menyatakan



(Silvi Khairunnisa)

vii

ABSTRAK

Nama : Silvi Khairunnisa
Program Studi : S1 Farmasi
Judul : Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi-fraksi Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) melalui Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif

Pada penelitian sebelumnya, dilaporkan bahwa ekstrak etanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) paling kuat menghambat aktivitas α -glukosidase dibanding 15 tanaman uji lainnya. α -Glukosidase mengkatalisis tahap akhir proses pencernaan karbohidrat. Dengan demikian, terjadi penundaan absorpsi glukosa dan penurunan kadar glukosa plasma *postprandial*. Senyawa yang dapat menghambat α -glukosidase secara potensial dapat digunakan sebagai antidiabetes. Diabetes melitus merupakan penyakit gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang ditandai dengan hiperglikemia. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antidiabetes dengan metode penghambatan α -glukosidase. *Phyllanthus niruri* L. dimaserasi dengan etanol 80 % dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat, butanol, dan metanol. Reaksi α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat menghasilkan p-nitrofenol yang berwarna kuning. Produk reaksi ini diukur pada panjang gelombang 400 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Hasil menunjukkan bahwa fraksi metanol dari ekstrak etanol *Phyllanthus niruri* L., memiliki aktivitas penghambatan paling kuat terhadap α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 1,67 ppm. Golongan senyawa yang terdapat pada fraksi metanol ekstrak etanol *Phyllanthus niruri* L. adalah glikosida, alkaloid, dan tanin.

Kata Kunci : diabetes melitus, α -glukosidase, *Phyllanthus niruri* L., fraksi metanol, penapisan fitokimia.
xiii + 85 halaman : 12 gambar; 20 tabel; 10 lampiran
Daftar Acuan : 84 (1961-2011)

ABSTRACT

Name : Silvi Khairunnisa
Program study: S1 Pharmacy
Title : Antidiabetic Activity Test of *Phyllanthus niruri* L. Herb of Ethanolic Extract Fractions by α -Glucosidase Inhibitory Activity and Phytochemical Screening from the Active Fraction

In the previous research, *Phyllanthus niruri* L. herb ethanolic extract has been reported to be the strongest of α -glucosidase inhibitory activity compared with other fifteen plants. α -Glucosidase catalyzes the final step in the digestive process of carbohydrates. Because of that, it can retard the liberation of glucose from oligosaccharides and disaccharides. The compounds that could inhibit α -glucosidase activity are potentially used for antidiabetic by suppressing post-prandial hyperglycemia. Diabetes mellitus is a disease with disturbance of carbohydrate, fat and protein metabolism characterized by hyperglycemia. Based on that matter, this research tested antidiabetic activity with α -glucosidase inhibition method. *Phyllanthus niruri* L. was maserated with 80 % ethanol followed by fractination with petroleum ether, ethyl acetate, buthanol, and methanol as solvents. Reaction between α -glucosidase and p-nitrofenil- α -D-glukopiranosas as substrat produce p-nitrophenol which has yellow color. The absorbance of this product was measured at 400 nm by UV-Vis Spectrophotometer. The result showed that methanol fraction of *Phyllanthus niruri* L. ethanolic extract has the strongest inhibitory activity of α -glucosidase with IC_{50} value of 1,67 ppm. Chemical compounds that consist in *Phyllanthus niruri* L. ethanolic extract methanol fraction are glycosides, alkaloids and tannins.

Key Words : diabetes mellitus, α -glucosidase, *Phyllanthus niruri* L., methanolic fraction, phytochemical screening.

xiii + 85 pages : 12 pictures; 20 tables; 10 appendices

Bibliography : 84 (1961-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Diabetes Melitus	4
2.2. Deskripsi Tanaman	13
2.3. Ekstraksi Tanaman	16
2.4. Spektrofotometri UV-Vis	18
2.5. Enzim.....	19
2.6. Penapisan Fitokimia	25
2.7. Kromatografi Lapis Tipis	26
BAB 3. METODE PENELITIAN	29
3.1. Tempat dan Waktu	29
3.2. Bahan.....	29
3.3. Alat.....	29
3.4. Cara Kerja	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1. Penyiapan Bahan Uji	45
4.2. Ekstraksi Simplisia	46
4.3. Fraksinasi.....	47
4.4. Optimasi Aktivitas Enzim	47
4.5. Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase.....	50
4.6. Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase.....	53
4.7. Penapisan Fitokimia	55
4.8. Kromatografi Lapis Tipis	59
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	63
5.1. Kesimpulan	63
5.2. Saran	63
DAFTAR ACUAN	64

DAFTAR GAMBAR

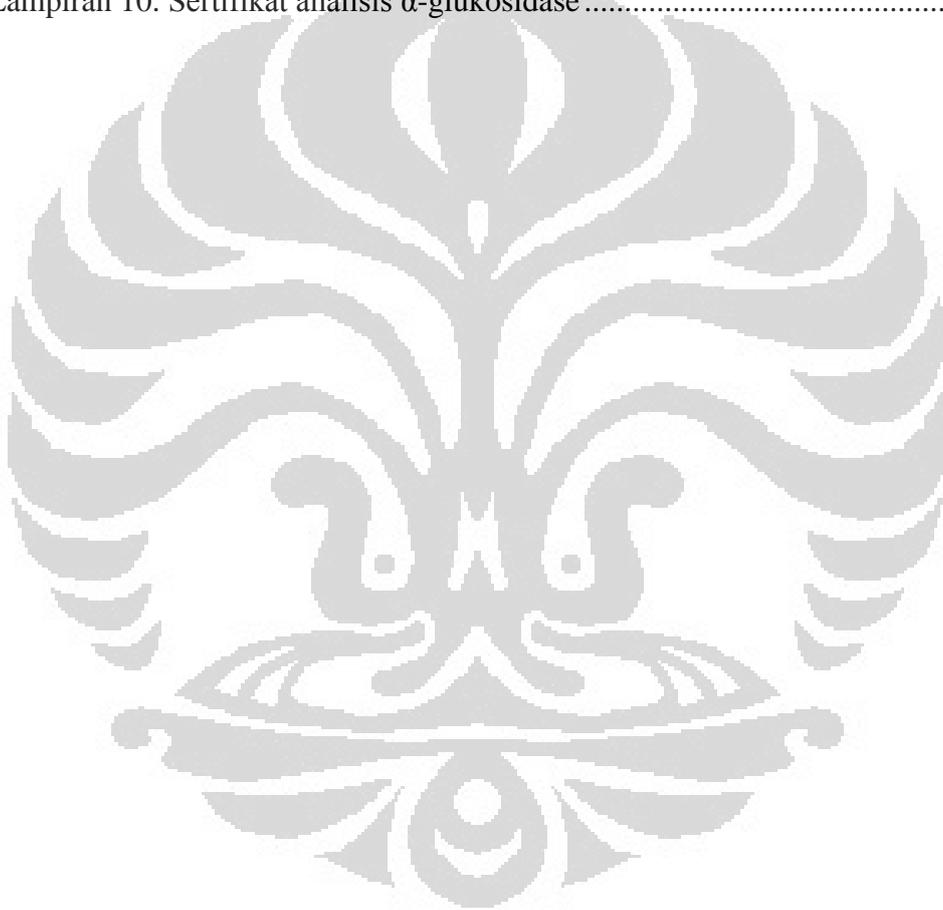
Gambar 2.1.	Struktur kimia akardiose	11
Gambar 2.2.	Mekanisme aksi inkretin	12
Gambar 2.3.	Rintangan energi pada reaksi kimia	20
Gambar 2.4.	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi enzim	21
Gambar 2.5.	Plot resiprokal ganda atau Lineweaver-Burk	23
Gambar 2.6.	Plot Lineweaver-Burk yang menunjukkan inhibisi kompetitif klasik.....	23
Gambar 2.7.	Plot Lineweaver-Burk yang menunjukkan inhibisi nonkompetitif reversibel	24
Gambar 2.8.	Persamaan reaksi enzimatik antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida.....	25
Gambar 4.1.	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	71
Gambar 4.2.	Grafik optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat 0,625 mM hingga 30 mM.....	52
Gambar 4.3.	Grafik kinetika penghambatan α -glukosidase oleh fraksi metanol ekstrak etanol herba meniran.....	55
Gambar 4.4.	Kromatogram flavonoid dari kiri ke kanan: fraksi petroleum eter, etil asetat, butanol, dan metanol sebelum (a) dan setelah (b) disemprot larutan penampak noda $AlCl_3$	71

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Penggolongan sediaan insulin berdasarkan mula dan masa kerja.....	8
Tabel 3.1. Prosedur optimasi aktivitas α -glukosidase.....	38
Tabel 3.2. Uji aktivitas penghambatan α -glukosidase	41
Tabel 4.1. Susut pengeringan herba meniran	72
Tabel 4.2. Rendemen ekstrak	72
Tabel 4.3. Hasil uji pendahuluan dengan unit enzim 0,0279 U/ml.....	72
Tabel 4.4. Optimasi aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat 0,625mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, dan 30 mM	72
Tabel 4.5. Optimasi aktivitas enzim dengan pH dapar fosfat 6,8, 7,0, dan 7,2	73
Tabel 4.6. Optimasi aktivitas enzim dengan waktu inkubasi 15, 20, dan 30 menit...	73
Tabel 4.7. Aktivitas penghambatan α -glukosidase pada akarbose (pembanding)	73
Tabel 4.8. Aktivitas penghambatan α -glukosidase pada fraksi petroleum eter	74
Tabel 4.9. Aktivitas penghambatan α -glukosidase pada fraksi etil asetat	74
Tabel 4.10. Aktivitas penghambatan α -glukosidase pada fraksi butanol.....	74
Tabel 4.11. Aktivitas penghambatan α -glukosidase pada fraksi metanol.....	75
Tabel 4.12. Hasil uji kinetika penghambatan enzim oleh ekstrak dengan konsentrasi 0,5% dan 1%	75
Tabel 4.13. Hasil identifikasi kandungan kimia	76
Tabel 4.14. Pengaruh penambahan substrat terhadap aktivitas penghambatan α - glukosidase tanpa adanya penghambat	76
Tabel 4.15. Pengaruh penambahan substrat terhadap aktivitas penghambatan α - glukosidase pada konsentrasi ekstrak 25,22 ppm.....	76
Tabel 4.16. Pengaruh penambahan substrat terhadap aktivitas penghambatan α - glukosidase pada konsentrasi ekstrak 50,45 ppm.....	77
Tabel 4.17. Nilai Rf hasil kromatografi lapis tipis terhadap senyawa flavonoid pada fraksi petroleum eter, etil asetat, dan butanol ekstrak etanol meniran.....	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja	78
Lampiran 2. Perhitungan unit larutan enzim.....	79
Lampiran 3. Skema uji aktivitas penghambatan α -glukosidase	80
Lampiran 4. Penguap putar vakum	81
Lampiran 5. Spektrofotometer UV-Vis.....	81
Lampiran 6. Timbangan analitik	82
Lampiran 7. Magnetik stirer.....	82
Lampiran 8. Lampu UV	82
Lampiran 9. Surat determinasi tanaman.....	83
Lampiran 10. Sertifikat analisis α -glukosidase	84



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis dengan multi etiologi yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Insufisiensi fungsi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel β Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (WHO, 1999 & Linn, Wofford, O'keefe, & Posey, 2009).

Pada tahun 2007, lebih dari 125 juta orang di seluruh dunia menderita penyakit DM. Populasi penderita DM di seluruh dunia terus mengalami peningkatan yang cukup besar. Jumlah penderita DM diprediksi meningkat menjadi lebih dari 220 juta orang pada tahun 2010. Jumlah ini diproyeksikan akan meningkat menjadi 366 juta orang penderita pada tahun 2030 (Wild, Roglic, Green, Sicree, & King, 2004).

Diabetes merupakan penyakit kronik yang tidak menyebabkan kematian secara langsung, namun pengelolaan yang tidak tepat dapat berakibat fatal. Pengelolaan DM tersebut memerlukan penanganan secara multidisiplin yang mencakup terapi non-obat dan terapi obat (DepKes, 2005).

Tujuan utama dari pengobatan diabetes adalah mempertahankan kadar gula darah dalam kisaran normal. Namun, kadar gula darah yang benar-benar normal sulit dipertahankan. Meskipun demikian, semakin mendekati kisaran normal, kemungkinan terjadinya komplikasi sementara maupun jangka panjang semakin berkurang. Untuk itu, diperlukan pemantauan kadar glukosa darah secara teratur baik secara mandiri menggunakan alat tes kadar glukosa darah atau pemeriksaan laboratorium terdekat (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI, 2007).

Masyarakat sudah banyak mengonsumsi obat herbal untuk mengatasi DM di samping menggunakan obat antidiabetik oral. Salah satu terapi herbal untuk mengobati penyakit tersebut adalah dengan mengonsumsi tanaman yang memiliki aktivitas antidiabetes. Salah satu mekanisme dalam pengobatan DM

adalah dengan menghambat aktivitas α -glukosidase. Penghambat α -glukosidase merupakan salah satu pengobatan alternatif karena penghambatan α -glukosidase akan menunda pencernaan karbohidrat sehingga dapat menekan kadar glukosa darah. Agen penghambat α -glukosidase memiliki efek samping yang ringan pada saluran cerna. Hal ini karena mekanisme aksi yang terbatas pada sisi luminal usus (Chiasson, Josse, Gomis, Hanefeld, Karasik, & Lakso, 2002).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Siti Masitoh pada tahun 2011, sudah dilakukan uji aktivitas penghambatan α -glukosidase terhadap beberapa tanaman obat di Indonesia yang berkhasiat sebagai antidiabetes. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penghambatan aktivitas α -glukosidase ekstrak etanol oleh herba meniran paling kuat dibanding beberapa tanaman uji lainnya (Masitoh, 2011). Meniran merupakan tanaman liar yang tumbuh di tempat terbuka. Secara empiris telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai pengobatan berbagai macam penyakit.

Meniran terbukti memiliki aktivitas sebagai imunostimulan, hepatoprotektif, antimalaria (Elfahmi, Ruslan, Bos, Kayser, Woerdenbag, & Quax), diuretik (Khare, 2007), antihiperlipidemik (Ross, 1999), dan masih banyak lagi. Mengingat Indonesia sangat kaya dengan tanaman obat, upaya untuk melakukan penapisan fitokimia dan skrining penghambatan aktivitas α -glukosidase pada tanaman yang memiliki aktivitas antidiabetes yang tumbuh di Indonesia menjadi penting dilakukan.

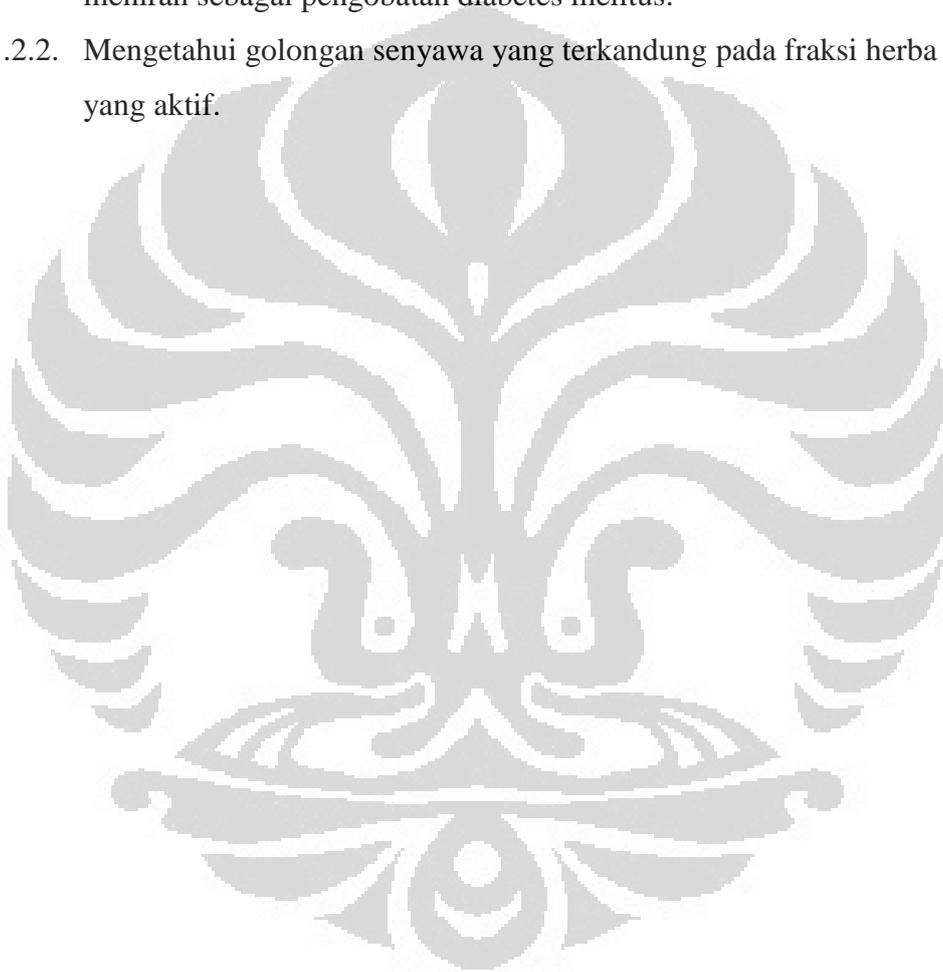
Penelitian ini akan menguji aktivitas antidiabetes fraksi aktif dari ekstrak etanol herba meniran dengan metode penghambatan aktivitas α -glukosidase. Digunakan pelarut etanol karena diketahui etanol memiliki kemampuan ekstraksi yang tinggi untuk hampir semua bahan alam dengan berat molekul rendah (Samuelsson, 1999).

Fraksinasi dilakukan dengan pengocokan menggunakan corong pisah kemudian memisahkan dua lapisan cairan yang terbentuk setelah pendiaman beberapa saat. Setiap fraksi yang diperoleh diuji aktivitasnya. Setelah diketahui fraksi aktifnya, dilakukan identifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi aktif tersebut.

Pengujian penghambatan aktivitas α -glukosidase ini menggunakan metode spektrofotometri. Metode ini dipilih karena mudah dilakukan dan bisa didapatkan hasil yang akurat dan cepat serta tepat untuk sampel yang berjumlah banyak (Eisenthal & Danson, 2002).

1.2. Tujuan Penelitian

- 1.2.1. Mengetahui penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi-fraksi herba meniran sebagai pengobatan diabetes melitus.
- 1.2.2. Mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada fraksi herba meniran yang aktif.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diabetes Melitus

2.1.1 Definisi

Diabetes melitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis dengan multi etiologi yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Insufisiensi fungsi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (WHO, 1999; Linn, Wofford, O'keefe, & Posey, 2009). Keadaan hiperglikemia ditandai dengan kadar glukosa puasa ≥ 126 mg/dL atau postprandial ≥ 200 mg/dL atau glukosa sewaktu ≥ 200 mg/dL (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI, 2007).

2.1.2 Klasifikasi

Diabetes melitus diklasifikasikan menjadi 4 tipe, yaitu:

2.1.2.1 DM Tipe 1

Diabetes tipe ini merupakan diabetes yang jarang, diperkirakan kurang dari 5-10% dari keseluruhan populasi penderita diabetes. (Depkes, 2005). Pada DM tipe 1, terjadi kerusakan sel β pankreas melalui reaksi autoimun sehingga tidak ada sekresi insulin (Linn, Wofford, O'keefe, & Posey, 2009). Kerusakan ini bisa terjadi karena infeksi virus, faktor genetik, dan zat-zat kimia (Guyton, 2006; Porte, 1996).

DM tipe 1 dapat diderita oleh semua usia, namun kebanyakan pasiennya adalah orang yang berusia kurang dari 30 tahun. (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). Tipe ini sering disebut DM yang tergantung dengan insulin (*insulin dependent diabetes mellitus* atau IDDM) (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI, 2007).

2.1.2.2 DM Tipe 2

DM tipe 2 terjadi karena penurunan sensitivitas jaringan target terhadap insulin. Penurunan sensitivitas terhadap insulin ini sering disebut DM yang tidak tergantung insulin (*noninsulin dependent diabetes mellitus* atau NIDDM) (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI, 2007). Pada DM tipe 2 ini tidak selalu dibutuhkan insulin, pada beberapa kasus cukup dengan diet dan antidiabetik oral.

Fungsi sel β memburuk secara progresif pada pasien DM tipe 2. Meskipun masih terdapat sekresi insulin, sekresi ini seringkali berlangsung lambat dan terjadi penurunan jumlah insulin yang disekresi (Corwin, 2008). Hal ini bermanifestasi pada penurunan penyerapan glukosa oleh otot dan kegagalan relatif fungsi sel β (Linn, Wofford, O'keefe, & Posey, 2009).

Beberapa faktor risiko untuk DM, terutama DM tipe 2 adalah riwayat diabetes dalam keluarga, riwayat diabetes gestasional, obesitas, usia, hipertensi, dan hiperlipidemia (DepKes, 2005). Faktor lingkungan seperti kebiasaan makan yang buruk dan minimnya aktivitas jasmani dapat memicu serta mempercepat perjalanan penyakit. Hal tersebut juga dapat mempercepat konversi pradiabetes menjadi diabetes dan timbulnya komplikasi (Manaf, 2010).

2.1.2.3 DM Gestasional

Diabetes gestasional didefinisikan sebagai intoleransi glukosa yang terjadi selama kehamilan. Diabetes gestasional juga lebih umum di kalangan wanita gemuk dan wanita dengan riwayat keluarga diabetes. Adanya plasenta pada wanita hamil akan mengeluarkan estrogen yang akan mempengaruhi kadar glukosa darah. Selama kehamilan, diabetes gestasional memerlukan pengobatan untuk mengoptimalkan kadar glukosa darah ibu untuk mengurangi risiko komplikasi pada bayi (US Department of Health and Human Services, 2011).

Gejala diabetes gestasional mirip dengan diabetes tipe 2. Diabetes gestasional sering didiagnosis melalui skrining prenatal, bukan gejala yang dilaporkan.

2.1.2.4 DM karena Faktor Lain

DM dapat terjadi karena beberapa faktor lain, seperti faktor genetik, pankreatitis, endokrinopati, pengaruh obat-obatan, infeksi, dan sindrom genetik (Walker & Edward, 2003).

2.1.3 Terapi

Tujuan terapi pada diabetes melitus diarahkan untuk mengurangi gejala hiperglikemia, memperlambat onset dan progresi komplikasi penyakit mikrovaskular dan makrovaskular (Dipiro, Talbert, Yees, Matzke, Wells, & Posey, 1999). Kadar glukosa darah yang mendekati normal akan mengurangi risiko komplikasi penyakit mikrovaskular, tetapi pengaturan faktor risiko kardiovaskular (misalnya, berhenti merokok, penanganan dislipidemia, kontrol tekanan darah secara intensif, terapi antiplatelet) yang baik juga dibutuhkan untuk mengurangi risiko penyakit makrovaskular (Wells, DiPiro, Schwinghammer, & Hamilton, 2006). Kontrol glukosa darah saja tidak cukup untuk menurunkan risiko komplikasi pada penderita DM. Perawatan yang tepat mengharuskan pengaturan glukosa darah, tekanan darah, dan kadar lipid, monitoring glukosa darah dan komplikasi secara rutin, diet, dan modifikasi olahraga (Dipiro, Talbert, Yees, Matzke, Wells, & Posey, 1999).

Untuk penanganan DM tipe 1, pasien dapat diberikan insulin dan dianjurkan untuk melakukan olah raga. Sedangkan pasien dengan DM tipe 2 direkomendasikan melakukan diet dan olahraga untuk mengurangi berat badan dan melawan resistensi insulin. Jika cara tersebut tidak berhasil, dapat diberikan obat untuk meningkatkan sensitivitas insulin atau menstimulasi peningkatan produksi insulin oleh pankreas (Guyton & Hall, 2006). Walaupun sebagian besar penderita DM tipe 2 tidak memerlukan terapi insulin, namun hampir 30% ternyata memerlukan terapi insulin di samping terapi hipoglikemik oral (DepKes, 2005).

2.1.3.1 Terapi Nonfarmakologi

a. Diet

Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi seimbang dalam hal karbohidrat, protein, dan lemak, serta serat tinggi, kalori rendah sampai sedang, dan pembatasan konsumsi lemak jenuh (kurang dari 7% dari total kalori) (Dipiro, Talbert, Yees, Matzke, Wells, & Posey, 1999; Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). Pilihan jenis makanan sebaiknya juga diperhatikan. Sumber lemak diupayakan yang berasal dari bahan nabati, sedangkan protein sebaiknya diperoleh dari ikan, ayam, tahu, dan tempe karena tidak banyak mengandung lemak (DepKes, 2005).

b. Pengaturan berat badan

Penurunan berat badan yang cukup telah terbukti mengurangi risiko kardiovaskular, mengurangi resistensi insulin, dan memperbaiki respons sel-sel β terhadap stimulus glukosa (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008; DepKes, 2005).

c. Olahraga

Asosiasi Diabetes Amerika merekomendasikan latihan dengan intensitas sedang selama 150 menit setiap minggu untuk kontrol glukosa, membantu menurunkan berat badan dan menurunkan risiko kardiovaskular (Linn, Wofford, O'keefe, & Posey, 2009). Olahraga akan memperbanyak jumlah dan meningkatkan aktivitas reseptor insulin dalam tubuh dan meningkatkan penggunaan glukosa (DepKes, 2005).

2.1.3.2 Terapi Farmakologi dengan Insulin

Insulin merupakan pengobatan utama untuk semua pasien DM tipe 1. Insulin digunakan sebagai terapi pemeliharaan dengan rute pemberian secara subkutan. Insulin memiliki keunggulan dalam hal aksesibilitas dan memudahkan pasien untuk menginjeksikan insulin sendiri. Rute pemberian intravena digunakan untuk penanganan ketoasidosis. Cara pemberian ini umumnya dianggap cara paling baik untuk pemberian jangka panjang (Walker & Edward, 2003).

Efek samping fisiologis utama dari terapi insulin adalah hipoglikemia. Manifestasi ini dapat terjadi pada kadar glukosa darah yang berbeda untuk

Universitas Indonesia

masing-masing individu. Reaksi kulit lokal juga bisa terjadi tetapi biasanya dapat hilang dengan sendirinya meskipun terapi dilanjutkan. Efek samping sistemik jarang terjadi karena penggunaan insulin murni (Walker & Edward, 2003).

Karakteristik yang umum digunakan untuk mengategorikan insulin adalah menurut sumbernya, kekuatan, onset, dan durasi aksi (Dipiro, Talbert, Yees, Matzke, Wells, Posey, 1999). Untuk terapi, ada berbagai jenis sediaan insulin yang tersedia, yang terutama berbeda dalam hal mula kerja (onset) dan masa kerjanya (durasi). Sediaan insulin untuk terapi dapat digolongkan menjadi 4 kelompok, yaitu insulin masa kerja singkat, insulin masa kerja sedang, insulin masa kerja sedang dengan mula kerja cepat, dan insulin masa kerja panjang. Penggolongan sediaan insulin dijelaskan pada tabel 2.1 (DepKes, 2005).

Tabel 2.1. Penggolongan sediaan insulin berdasarkan mula dan masa kerja

Jenis Sediaan Insulin	Mula Kerja (jam)	Puncak (jam)	Masa Kerja (jam)
Masa kerja singkat (<i>Short-acting</i>)	0,5	1-4	6-8
Masa kerja sedang (<i>Intermediate-acting</i>)	1-2	6-12	18-24
Masa kerja sedang, mula kerja cepat	0,5	4-15	18-24
Masa kerja panjang (<i>Long-acting insulin</i>)	4-6	14-20	24-36

2.1.3.3 Terapi Farmakologi dengan Obat Antidiabetik Oral

a. Golongan Sulfonilurea

Semua obat golongan sulfonilurea meningkatkan sensitivitas sel β terhadap glukosa sehingga terjadi peningkatan sekresi insulin oleh pankreas. Sulfonilurea juga meningkatkan sensitivitas jaringan terhadap insulin yang menyebabkan peningkatan aksi insulin (Walker & Edward, 2003). Obat golongan ini berinteraksi dengan saluran kalium yang sensitif terhadap ATP pada sel β . Ikatan ini menyebabkan depolarisasi yang akan membuka saluran kalsium, sehingga kalsium dapat masuk ke dalam sel dan terjadi pelepasan insulin.

Mekanisme lain dari obat golongan sulfonilurea adalah menurunkan kadar glukagon darah (Katzung, 2006).

Obat golongan sulfonilurea diklasifikasikan menjadi generasi satu dan generasi dua. Sulfonilurea generasi pertama antara lain klorpropamid, tolazamid, tolbutamid. Generasi keduanya adalah glipizid, gliburid, dan glimepirid (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). Semua jenis obat sulfonilurea memiliki efektivitas yang sama dalam menurunkan glukosa darah jika diberikan dalam dosis yang ekuivalen sesuai potensinya (Wells, DiPiro, Schwinghammer, & Hamilton, 2006).

b. Golongan Meglitinid

Obat golongan meglitinid menghasilkan efek yang sama dengan sulfonilurea, namun memiliki onset dan durasi aksi yang jauh lebih singkat. (Chisholm-Burns, *et al.*, 2008). Obat golongan ini tidak menstimulasi pelepasan insulin dari sel β secara langsung. Meglitinid bekerja dengan memediasi penutupan saluran kalium yang sensitif terhadap ATP pada sel β pankreas. Hal ini menyebabkan depolarisasi yang akan menstimulasi pelepasan insulin dari sel β (Walker & Edward, 2003).

Meglitinid dikonsumsi secara oral sebelum makan dan mencapai konsentrasi tertinggi dalam plasma dalam waktu 1 jam yang kemudian dimetabolisme di hati (Linn, Wofford, O'keefe, & Posey, 2009). Contoh obat golongan meglitinid adalah repaglinid dan nateglinid (DepKes, 2005).

c. Golongan Biguanid

Obat golongan biguanid contohnya adalah metformin. Metformin mengurangi kadar glukosa darah terutama dengan menurunkan produksi glukosa hati dan dengan meningkatkan aksi insulin pada otot dan lemak. Mekanisme metformin dalam menurunkan produksi glukosa hati diduga melalui pengurangan glukoneogenesis. Obat ini tidak menyebabkan pelepasan insulin dari pankreas dan umumnya tidak menyebabkan hipoglikemia (Davis, 2006). Metformin memiliki kelebihan dibanding dengan insulin dan sulfonilurea. Terapi DM menggunakan metformin dilaporkan dapat menurunkan risiko penyakit makrovaskular dan mikrovaskular (Katzung, 2006).

d. Golongan Tiazolidindion

Tiazolidindion bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin, tapi juga dapat menurunkan produksi glukosa oleh hati. Obat ini juga dapat meningkatkan transport glukosa ke otot dan jaringan adiposa dengan meningkatkan sintesis dan bentuk spesifik transporter glukosa (Davis, 2006). Obat golongan ini contohnya adalah rosiglitazon dan pioglitazon (DepKes, 2005).

e. Penghambat α -Glukosidase

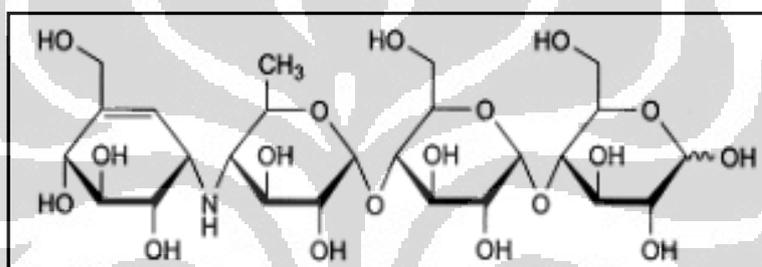
α -Glukosidase dan α -amylase termasuk dalam enzim metabolisme karbohidrat. α -Amylase menguraikan karbohidrat kompleks menjadi oligosakarida dan disakarida, sedangkan α -glukosidase mengubah oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida sehingga pada akhirnya akan diabsorpsi oleh usus. Produk akhir dari pencernaan karbohidrat adalah monosakarida seperti glukosa, fruktosa, dan galaktosa. Penghambatan α -glukosidase di usus akan membatasi kadar glukosa postprandial melalui keterlambatan proses hidrolisis karbohidrat dan absorpsi monosakarida, sehingga dapat digunakan dalam manajemen pengobatan diabetes tipe 2 (Shinde, *et al.*, 2008).

α -Glukosidase dapat berasal dari mikroorganisme, tanaman, dan jaringan hewan. Enzim yang berasal dari bakteri, khamir, dan insekta dinamakan α -glukosidase I, sedangkan enzim yang berasal dari tanaman dan mamalia (usus tikus) disebut α -glukosidase II (Kimura *et al.*, 2003; Shinde, *et al.*, 2008). α -Glukosidase dari semua sumber tersebut memiliki aktivitas yang sama.

Yang termasuk obat golongan ini adalah akarbose dan miglitol. Keduanya dapat digunakan sebagai monoterapi atau dalam kombinasi dengan obat diabetes lain (Linn, Wofford, O'keefe, & Posey, 2009).

Miglitol merupakan obat penghambat α -glukosidase generasi kedua, derivat dari *1-deoxynojirimycin* yang berikatan secara reversibel dengan α -glukosidase. Miglitol menyebabkan penurunan hiperglikemia postprandial lebih cepat dari obat penghambat α -glukosidase lainnya. Miglitol hampir diabsorpsi secara sempurna di usus halus (Sels, Huijberts, & Wolffenbuttel, 1999).

Efek penurunan glukosa darah oleh miglitol pada pasien DM tipe 2 lebih rendah dari penggunaan obat golongan sulfonilurea jangka panjang. Kelebihan miglitol dibanding sulfonilurea terletak pada efeknya terhadap kadar insulin dalam darah. Terapi miglitol menyebabkan kadar insulin dalam darah postprandial menjadi sedikit lebih rendah, sedangkan pengobatan sulfonilurea jangka panjang biasanya akan meningkatkan kadar insulin dalam darah. Dengan demikian, terapi dengan miglitol menyebabkan peningkatan berat badan yang lebih sedikit dan menurunkan risiko hipoglikemia selama terapi jangka panjang (Sels, Huijberts, & Wolffenbuttel, 1999). Efek samping miglitol umumnya ringan berupa gangguan pencernaan seperti diare (Fukaya, *et al.*, 2009).



[Sumber: British Pharmacopoeia, 2008]

Gambar 2.1 Struktur kimia akarbose

Akarbose merupakan suatu pseudooligosakarida yang diperoleh dari mikroba, secara kompetitif menghambat glukoamilase dan sukrase (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI, 2007; Manaf, 2010). Akarbose bekerja memperlambat pencernaan karbohidrat dan absorpsi monosakarida dengan menghambat α -glukosidase di sisi luminal usus (Shinde, *et al.*, 2008). Akarbose paling efektif bila diberikan bersama makanan yang berserat, mengandung polisakarida, dengan sedikit kandungan glukosa dan sukrosa. Khasiat khusus akarbose dalam mencegah hiperglikemia postprandial telah terbukti tidak hanya bermanfaat dalam pengendalian diabetes, tapi juga menekan terjadinya komplikasi kardiovaskuler (Manaf, 2010).

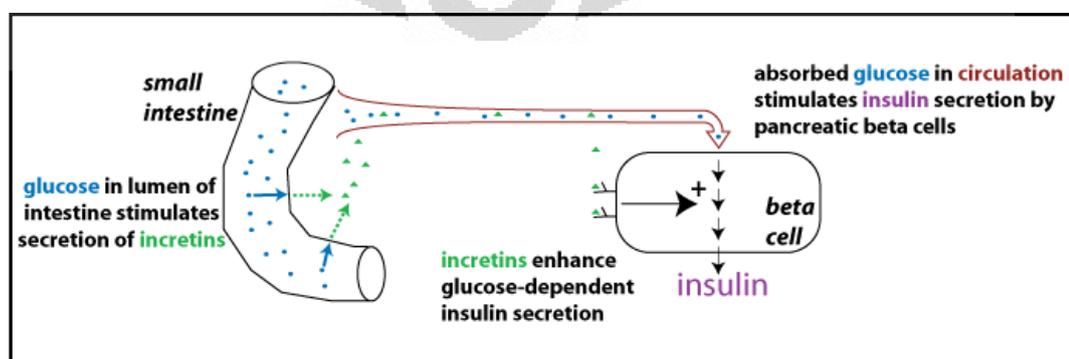
Efek samping sistemik jarang terjadi karena penggunaan akarbose. Efek samping yang sering terjadi terutama gangguan lambung, flatulens, nyeri perut

dan kadang-kadang diare. Efek samping ini meningkat dengan keberlanjutan terapi, tetapi akan berkurang dengan pemberian dosis awal yang rendah dan titrasi dosis (Walker & Edward, 2003).

Penelitian terhadap penghambatan aktivitas α -glukosidase pada tanaman sebagai antihiperqlikemik sudah banyak dilakukan. Sebagai contoh, beberapa tanaman yang terbukti memiliki aktivitas antihiperqlikemik adalah mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] (Sugiwati, Setiasi, & Afifah, 2009), pule (*Alstonia scholaris*) (Jong-Anurakkun, Bhandari, & Kawabata, 2006), alga merah (*Grateloupia elliptica*) (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2007). Dari data tersebut, dapat disimpulkan tanaman penghambat α -glukosidase berpotensi dijadikan agen terapeutik yang efektif untuk mengontrol tingginya kadar glukosa darah setelah makan (Mogale, Lebelo, Thovhogi, de Freitas, & Shai, 2011).

f. Obat Berbasis Inkretin

Inkretin merupakan hormon yang bekerja meningkatkan sekresi insulin. Terdapat dua hormon inkretin utama pada manusia, yaitu GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) dan GIP (*glucose-dependent insulinotropic peptide*). Kedua hormon ini disekresikan oleh sel endokrin di epitelium usus kecil. Mekanisme aksi inkretin dijelaskan pada gambar di bawah ini. Glukosa di usus halus menstimulasi pelepasan inkretin. Inkretin dibawa melalui sirkulasi ke jaringan targetnya, yaitu sel beta pankreas. Stimulasi inkretin terhadap sel beta menyebabkan respon berupa sekresi insulin dalam jumlah yang setara dengan glukosa darah yang menstimulasi.



Gambar 2.2 Mekanisme aksi inkretin

Universitas Indonesia

Penambahan sekresi insulin setelah makan oleh hormon gastrointestinal yang merupakan efek inkretin, memediasi 50-70% dari keseluruhan respon insulin setelah pencernaan makanan atau glukosa pada orang sehat. Namun efek ini berkurang secara nyata pada pasien DM tipe 2 (Meier, 2009). Ada dua macam obat berbasis inkretin yang memanfaatkan efek GLP-1 dalam mengontrol gula darah, yaitu inkretin mimetik dan inhibitor DPP4.

Inkretin mimetik, contohnya exenatid, memiliki aksi kerja yang sama dengan GLP-1 yang diproduksi oleh tubuh. Perbedaan antara keduanya adalah exenatid dapat bertahan selama 10 jam, sedangkan GLP-1 hanya bertahan 2 menit. Exenatid menunjukkan peningkatan kontrol glukosa pada pasien diabetes dan menyebabkan penurunan berat badan pada sebagian besar pasien.

Exenatid digunakan sebagai terapi tunggal atau sebagai kombinasi dengan obat antidiabetik lain seperti metformin dan sulfonilurea. Exenatid juga dapat digunakan bersama dengan insulin. Pemberiannya dengan cara injeksi sebanyak dua kali sehari, umumnya sebelum sarapan dan makan malam. Efek samping utamanya adalah mual (Molitch & Umpierrez, 2007).

DPP4 (Dipeptidil peptidase 4) merupakan suatu enzim yang dapat menginaktivasi GLP-1 di dalam darah dengan cepat. Inhibitor DPP4 bekerja menghentikan gangguan pada GLP-1. Hal ini menyebabkan GLP-1 bertahan lebih lama dan terjadi peningkatan kadarnya di dalam darah. Inhibitor DPP4 dapat digunakan sebagai terapi tunggal atau dalam kombinasi dengan obat-obat antidiabetik lainnya. Contoh obat inhibitor DPP4 adalah sitagliptin dan vildagliptin. Kedua obat tersebut dapat ditoleransi dengan cukup baik oleh kebanyakan pasien, efek sampingnya ringan dan umumnya tidak berhubungan dengan perubahan berat badan selama terapi (Molitch & Umpierrez, 2007).

2.2 Deskripsi Tanaman

2.2.1 Taksonomi

Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Euphorbiales
 Suku : Euphorbiaceae
 Marga : Phyllanthus
 Jenis : *Phyllanthus niruri* L. (Backer & van den Brink, 1965)
 Sinonim : *Phyllanthus carolinianus*, *P. Sellowianus*, *P. Fraternus*, *P. Kirganella*, *P. Lathyroides*, *P. Lonphali*, *Nymphanthus niruri* (Taylor, 2003)

2.2.2 Morfologi (DepKes, 1978)

Phyllanthus niruri L. atau meniran merupakan herba tahunan dengan tinggi 30 cm sampai 60 cm.

Batang: bercabang terpenjar, cabangnya mempunyai daun tunggal yang berseling dan tumbuh mendatar dari batang pokok. Batang berwarna hijau pucat atau hijau kemerahan.

Daun : bentuk daun bulat telur sampai bulat memanjang, panjang daun 5 mm sampai 10 mm, lebar 2,5 mm sampai 5 mm, ujung bulat atau runcing, permukaan daun bagian bawah berbintik-bintik kelenjar.

Bunga : bunga keluar dari ketiak daun; bunga jantan terletak di bawah ketiak daun, berkumpul 2 bunga sampai 4 bunga, gagang bunga 0,5 mm sampai 1 mm, berwarna merah pucat; bunga betina sendiri, letaknya di bagian atas ketiak daun, gagang bunga 0,75 mm sampai 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bulat telur sampai bulat memanjang, tepi berwarna hijau muda, panjang 1,25 mm sampai 2,5 mm. Buah licin, garis tengah 2 mm sampai 2,5 mm, panjang gagang buah 1,5 mm sampai 2 mm.

2.2.3 Ekologi dan Penyebaran

Tumbuhan ini terdapat di India, Cina, Malaysia, Filipina dan Australia. Tumbuh tersebar hampir di seluruh Indonesia pada ketinggian tempat antara 1 m sampai 1000 m di atas permukaan laut. Tumbuh liar di tempat terbuka, pada tanah gembur yang mengandung pasir, di ladang, di tepi sungai dan di pantai.

2.2.4 Kandungan Kimia

Universitas Indonesia

Meniran mengandung sejumlah flavonoid seperti kuersetin, kuersitrin, isokuercitrin, astragalin, dan rutin, serta mengandung kaempferol-4-ramnopiranosid, eridiktol-7-ramnopiranosid, nirurin, nirurid, filantin, hipofilantin, triterpen, dan alkaloid sekurin (ASEAN, 2004).

2.2.5 Aktivitas Farmakologi

Meniran memiliki aktivitas sebagai imunostimulan, hepatoprotektif, antimalaria (Elfahmi, Ruslan, Bos, Kayser, Woerdenbag, & Quax), analgesik, antipiretik, antibakteri, antifungal, antiviral, diuretik (Khare, 2007), inaktivator antigen permukaan hepatitis B, penghambat *reverse transcriptase*, antihepatotoksik, antihiperkolesterolemik, antihiperlipidemik, antihiperqlikemik, antihipertensi (Ross, 1999), aldose reduktase inhibitor, antimitagenik, antikarsinogenik, sitotoksik, antitumor, penghambat aberasi kromosom, karminatif, antidiare, asam urat (Widayati, 2008) antihiperkalsiuria, dan spasmolitik. (Yarnell, Abascal, & Rountree; Naik & Juvekar, 2003).

2.2.6 Efek Samping

Studi pada manusia menunjukkan bahwa meniran tidak dilaporkan adanya efek samping selama penggunaan kronik 3 bulan. Namun, tidak menutup kemungkinan terjadinya efek samping akibat beberapa aktivitas farmakologi lainnya dari meniran (Taylor, 2003).

2.2.7 Kontraindikasi

Phyllanthus niruri L. memiliki kontraindikasi sebagai berikut (Taylor, 2003):

- a. Meniran mempunyai efek antifertilitas pada tikus betina. Penggunaannya dikontraindikasikan untuk wanita yang ingin hamil atau sedang menggunakan obat fertilitas walaupun belum ada studi antifertilitas pada manusia.
- b. Meniran terbukti memiliki efek hipotensif pada hewan. Pasien dengan kondisi penyakit jantung dan/atau sedang menerima resep medikasi jantung harus berkonsultasi pada dokter sebelum menggunakan meniran.
- c. Meniran mempunyai efek abortif pada dosis tinggi

- d. Meniran memiliki efek hipoglikemia pada hewan dan manusia sehingga dikontraindikasikan pada individu dengan hipoglikemia. Individu yang menderita diabetes sebaiknya berkonsultasi pada dokter sebelum menggunakan meniran.
- e. Meniran memiliki efek diuretik pada studi manusia dan hewan. Penggunaan obat diuretik dan meniran secara bersamaan dalam jangka panjang dapat menyebabkan ketidakseimbangan elektrolit dan mineral.

2.2.8 Interaksi Obat (Taylor, 2003)

Interaksi obat yang terjadi selama penggunaan tanaman *Phyllanthus niruri* L. adalah:

- a. Meniran mengandung ganiin. Dari studi pada hewan seperti kodok, mencit, dan tikus, senyawa ini memiliki efek kronotropik negatif, inotropik negatif, hipotensif, dan ACE inhibitor. Oleh karena itu, tanaman ini dapat memperkuat efek obat antihipertensi, beta bloker, dan medikasi jantung lainnya (termasuk obat-obatan kronotropik dan inotropik).
- b. Meniran dapat memperkuat efek insulin dan obat antidiabetik.
- c. Meniran dapat memperkuat efek obat diuretik.

2.3 Ekstraksi Tanaman

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Dalam mengekstraksi bahan alam, terdapat beberapa metode yang menggunakan pelarut organik atau pelarut mengandung air yang dapat diterapkan. Pada ekstraksi cair-padat bahan tanaman mengalami kontak dengan pelarut. Beberapa metode yang banyak digunakan untuk ekstraksi bahan alam antara lain (DepKes, 2000):

2.3.1 Cara Dingin

2.3.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Prosedurnya dilakukan dengan merendam simplisia dalam pelarut

yang sesuai dalam wadah tertutup. Pengadukan sesekali ataupun konstan dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam bahan tanaman.

Kelemahan yang utama dari maserasi adalah prosesnya cukup memakan waktu yang lama, dapat berlangsung beberapa jam sampai beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan dapat berpotensi hilangnya metabolit. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut pada temperatur kamar. Di sisi lain, karena ekstraksi dilakukan pada temperatur kamar, maserasi tidak menyebabkan degradasi metabolit yang tidak tahan panas.

2.3.1.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan proses mengekstraksi senyawa terlarut dari jaringan selular simplisia dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Perkolasi cukup sesuai, baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun dalam jumlah besar.

2.3.2 Cara Panas

2.3.2.1 Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2.3.2.2 Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna. Kekurangan yang utama dari metode ini adalah terdegradasinya komponen yang tidak tahan panas.

2.3.2.3 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50° C.

2.3.2.4 Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur panangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih), temperatur terukur (96°-98° C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

2.3.2.5 Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air.

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (DepKes, 1979). Ekstrak berdasarkan sifatnya dapat dibagi menjadi:

- a. Ekstrak encer (*extractum tenue*), sediaan yang masih dapat dituang.
- b. Ekstrak kental (*extractum spissum*), sediaan yang tidak dapat dituang dan memiliki kadar air sampai 30%.
- c. Ekstrak kering (*extractum siccum*), sediaan yang berbentuk serbuk, dibuat dari ekstrak tumbuhan yang diperoleh dari penguapan bahan pelarut.
- d. Ekstrak cair (*extractum fluidum*), mengandung simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai bahan pengawet (Voight, 1995).

2.4 Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri adalah salah satu cabang analisis instrumental yang mempelajari interaksi antara atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik. Spektrofotometri ultra violet yang dipakai untuk aplikasi kuantitatif menggunakan radiasi dengan panjang gelombang 200-380 nm. Sedangkan spektrofotometri sinar tampak, menggunakan radiasi dengan panjang gelombang 380-780 nm. Molekul yang dapat memberikan absorpsi yang bermakna pada

Universitas Indonesia

daerah panjang gelombang 200-780 nm adalah molekul-molekul yang mempunyai gugus kromofor dan gugus auksokrom.

Gugus kromofor adalah gugus fungsi yang mempunyai spektrum absorpsi karakteristik pada daerah ultra violet atau sinar tampak. Gugus auksokrom adalah gugus yang dapat meningkatkan absorpsi dari suatu molekul. Gugus ini tidak memberikan absorpsi yang bermakna pada daerah ultra violet, tetapi dapat memberikan pengaruh yang besar pada absorpsi molekul di mana gugus tersebut terikat.

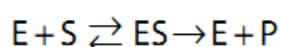
Jika radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang antara 200-380 nm dikenakan pada molekul-molekul yang mempunyai gugus-gugus tersebut maka akan terjadi absorpsi dari radiasi elektromagnetik itu oleh molekul-molekul tadi dan mengakibatkan terjadinya transisi elektron dari tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi (eksitasi). Besarnya energi radiasi elektromagnetik yang dibutuhkan untuk terjadinya eksitasi elektron pada suatu molekul bervariasi antara molekul yang satu dengan molekul yang lain, tergantung pada tipe elektron dari molekul tersebut (Kok, 1997).

Spektrum serapan kandungan tumbuhan dapat diukur dalam larutan yang sangat encer dengan pembanding blanko pelarut serta menggunakan spektrofotometer yang merekam otomatis. Pelarut yang banyak digunakan untuk spektrofotometri UV ialah etanol 95% karena kebanyakan golongan senyawa larut dalam pelarut tersebut (Harborne, 1987).

2.5 Enzim

2.5.1 Karakter Enzim

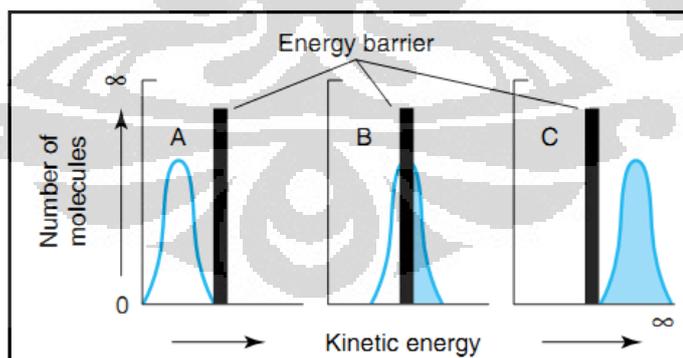
Enzim merupakan polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia (Murray, Granner, & Rodwell, 2006). Katalis adalah substansi yang meregulasi dan mempercepat reaksi biokimia tetapi tidak ikut bereaksi atau mengalami perubahan dalam reaksi tersebut (Marieb & Hoehn, 2007). Enzim akan berikatan dengan substrat untuk menghasilkan produk.



Enzim bersifat spesifik pada jenis reaksi yang dikatalisis dan jenis substrat yang bereaksi. Enzim berikatan dengan substrat pada tapak aktif enzim (Murray, Granner, & Rodwell, 2006). Meskipun enzim bersifat spesifik untuk substrat tertentu, molekul lain dapat bertindak sebagai inhibitor enzim jika strukturnya mirip dengan substrat sehingga dapat menempati tapak aktif enzim (Marieb & Hoehn, 2007).

Setiap reaksi kimia memerlukan sejumlah energi yang disebut energi aktivasi. Energi aktivasi adalah banyaknya energi yang dibutuhkan untuk memutus ikatan reaktan sehingga dapat terbentuk produk. Enzim mengkatalisis suatu reaksi dengan menurunkan energi aktivasi reaksi tersebut (Murray, Granner, & Rodwell, 2006).

Kecepatan reaksi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu suhu, konsentrasi substrat, dan pH. Dengan meningkatnya suhu enzim, kecepatan reaksi akan bertambah, tetapi hanya hingga ke tingkat energi kinetik yang dibutuhkan untuk memutus gaya nonkovalen lemah. Peningkatan suhu akan meningkatkan gerakan molekul dan frekuensi tabrakannya. Peningkatan gerakan dan frekuensi tabrakan molekul akan meningkatkan kecepatan reaksi enzim (Murray, Granner, & Rodwell, 2006). Namun jika suhu terus ditingkatkan, akan tercapai titik di mana enzim tidak aktif lagi.

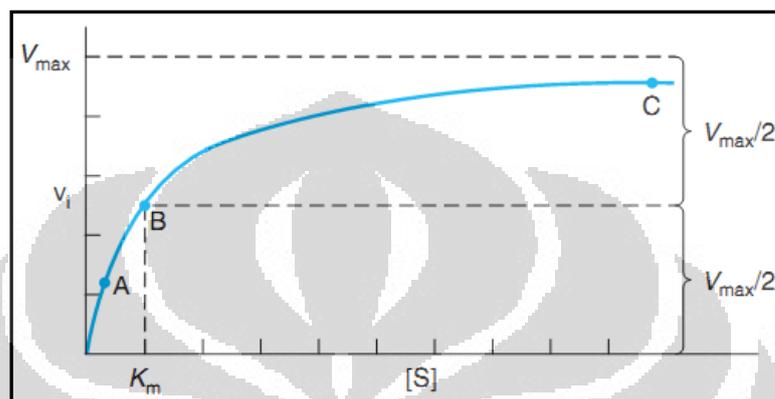


[Sumber: Murray, Granner, & Rodwell, 2006]

Gambar 2.3. Rintangan energi pada reaksi kimia

Kecepatan reaksi akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum dengan meningkatnya konsentrasi substrat, yang disebut dengan V_{max} . Hanya

substrat yang berikatan dengan enzim yang dapat menghasilkan produk. Jika tidak ada lagi enzim bebas yang dapat membentuk kompleks dengan substrat, peningkatan konsentrasi substrat tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi. Ketika penambahan konsentrasi substrat tidak lagi mempengaruhi kecepatan reaksi enzim, maka dikatakan enzim telah jenuh oleh substrat.



[Sumber: Murray, Granner, & Rodwell, 2006]

Gambar 2.4. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi enzim

Enzim memiliki nilai pH, di mana pada pH tersebut enzim aktif secara optimal (pH optimal). Nilai pH yang ekstrem akan menyebabkan denaturasi enzim melalui protonasi atau deprotonasi terhadap residu asam amino yang bersifat asam atau basa (Murray, Granner, & Rodwell, 2006).

2.5.2 Kinetika Enzim

Penentuan kinetika penghambatan aktivitas enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi substrat baik saat tidak ada inhibitor (ekstrak), maupun dengan adanya inhibitor (ekstrak) dengan beberapa konsentrasi. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data plot Lineweaver-Burk yang dihitung berdasarkan kinetika Michaelis-Menten (Dewi, *et al.*, 2007).

Konsentrasi substrat yang menghasilkan separuh kecepatan maksimal ($V_{max}/2$) disebut dengan konstanta Michaelis (K_m). Nilai K_m dapat ditetapkan secara eksperimental dengan membuat grafik dari V_i sebagai fungsi $[S]$. Persamaan Michaelis-Menten menunjukkan kecepatan reaksi bervariasi sesuai dengan variasi konsentrasi substrat.

$$V_1 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Berdasarkan orde reaksi, saat konsentrasi substrat lebih rendah dari K_m , kecepatan reaksi sebanding dengan konsentrasi substrat. Dengan demikian, kecepatan reaksi memenuhi orde satu. Ketika konsentrasi substrat jauh lebih besar dari K_m , kecepatan reaksi konstan dan sama dengan V_{\max} . Kemudian kecepatan reaksi tidak dipengaruhi oleh konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi memenuhi orde nol (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Tetapan kinetika Michaelis-Menten dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + bx$, di mana x adalah $1/[S]$ dan y adalah $1/V_1$. Bentuk linier persamaan Michaelis-Menten dapat digunakan untuk menentukan nilai K_m dan V_{\max} dengan menurunkan persamaan tersebut sehingga menjadi plot resiprokal ganda (Lineweaver-Burk).

Pembalikan persamaan Michaelis-Menten

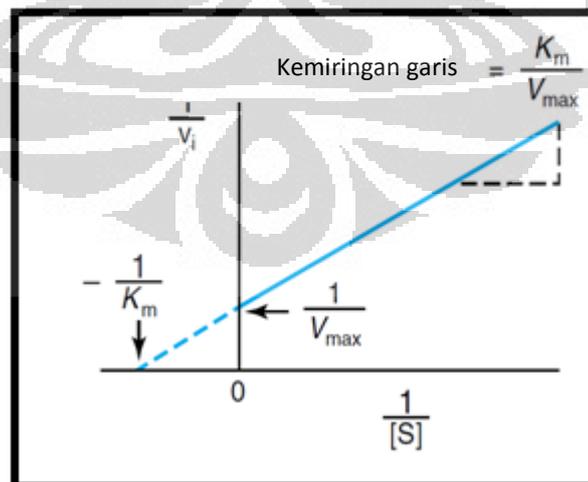
$$\frac{1}{V_1} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (2.2)$$

Difaktorkan

$$\frac{1}{V_1} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.3)$$

Disederhanakan

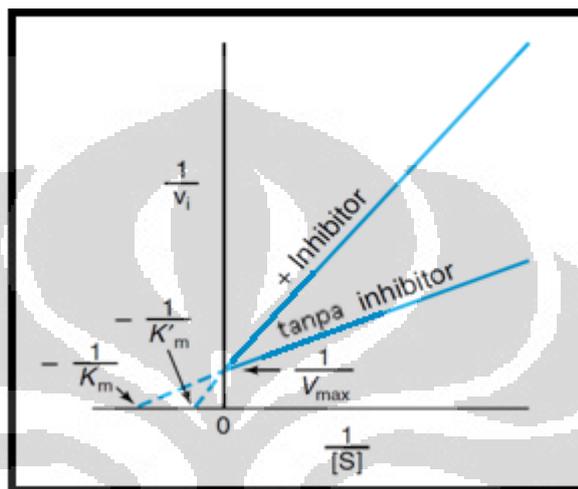
$$\frac{1}{V_1} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.4)$$



[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2006]

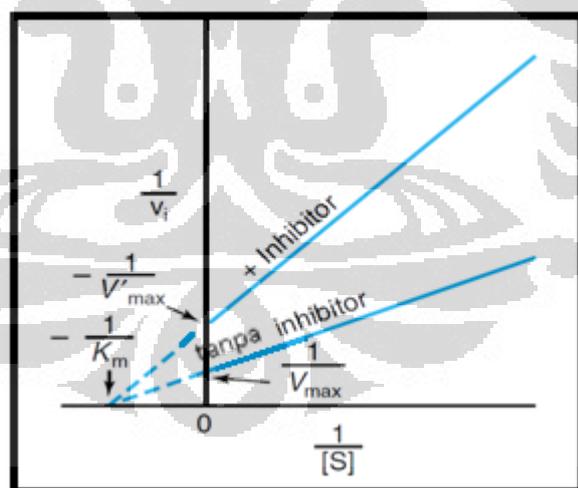
Gambar 2.5. Plot resiprokal ganda atau Lineweaver-Burk

Berdasarkan plot Lineweaver-Burk, dihasilkan garis lurus dengan intersep $1/V_{\text{maks}}$ dan kecuraman garis K_m/V_{maks} . Dengan demikian, $y = 0$ dan diperoleh $x = -1/K_m$. Nilai x dimasukkan ke dalam persamaan dan menjadi $y = a + b(-1/K_m)$, maka $K_m = b/a$. Dengan plot ini dapat ditentukan jenis inhibisi, yaitu kompetitif atau nonkompetitif (Murray, Granner, & Rodwell, 2006).



[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2006]

Gambar 2.6. Plot Lineweaver-Burk yang menunjukkan inhibisi kompetitif klasik



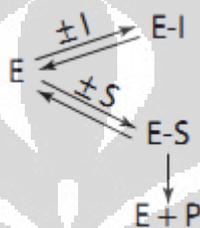
[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2006]

Gambar 2.7. Plot Lineweaver-Burk yang menunjukkan inhibisi nonkompetitif reversibel.

2.5.3 Penghambatan Aktivitas Enzim

Banyak substansi dapat mengganggu proses metabolik dengan mempengaruhi aktivitas enzim. Inhibitor enzim berperan penting dalam proses ini. Sejumlah besar obat dapat berperan sebagai inhibitor enzim. Metabolit alam juga terlibat dalam proses regulasi sebagai inhibitor (Koolman & Roehm, 2005).

Sebagian besar inhibitor bertindak secara reversibel dengan tidak menyebabkan perubahan permanen pada enzim. Mekanisme aksi inhibitor dapat ditentukan dengan membandingkan kinetika reaksi yang diinhibisi dan tidak diinhibisi (Koolman & Roehm, 2005).

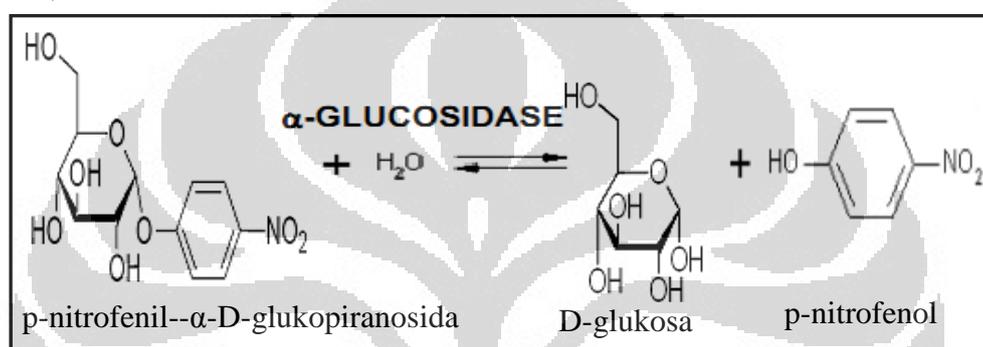


Inhibisi kompetitif adalah hambatan terhadap reaksi enzimatik di mana inhibitor bersaing dalam tapak ikatan enzim yang sama dengan substrat (Koolman & Roehm, 2005). Struktur pada kebanyakan inhibitor kompetitif klasik memiliki kemiripan dengan struktur substrat, yang disebut dengan analog substrat. Inhibitor kompetitif bekerja dengan menurunkan jumlah molekul enzim bebas yang dapat berikatan dengan substrat, menyebabkan berkurangnya ikatan enzim (E) – substrat (S) yang akhirnya menghasilkan produk. Efek dari inhibitor kompetitif dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2006).

Inhibisi nonkompetitif terjadi ketika ikatan inhibitor tidak mengganggu ikatan substrat dengan enzim. Dengan demikian, pembentukan kompleks E-I dan E-I-S mungkin terjadi. Namun, selama kompleks E-I masih dapat mengikat substrat, kemampuan pembentukan produk dari substrat menurun. Inhibitor nonkompetitif berikatan dengan enzim pada tapak pengikatan yang berbeda dengan substrat dan umumnya hanya memiliki sedikit atau tidak memiliki kemiripan struktur sama sekali dengan substrat (Murray, Granner, & Rodwell, 2006).

2.5.4 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Pengukuran penghambatan aktivitas α -glukosidase didasarkan pada pengukuran absorbansi p-nitrofenol (berwarna kuning) yang merupakan hasil reaksi hidrolisis substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida oleh α -glukosidase di samping menghasilkan glukosa. Intensitas warna kuning yang terbentuk ditentukan serapannya dengan menggunakan spektrofotometer *double beam* pada panjang gelombang 400 nm. Berdasarkan nilai variabel dan nilai serapan, dapat dihitung aktivitas enzim dalam satuan U/mL atau U/mg enzim (α -glukosidase, 2011).



[Sumber: Cihan, Ozcan, Tekin, & Cokmus, 2010]

Gambar 2.8 Persamaan reaksi enzimatik antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

Jika terjadi inhibisi aktivitas α -glukosidase, pembentukan p-nitrofenol akan berkurang. Hal ini akan terlihat dari nilai serapan yang menurun.

2.6 Penapisan Fitokimia (Harborne, 1987 & Sirait, 2007)

Penapisan kimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat bagi kesehatan seperti, alkaloid, senyawa fenol, flavonoid, glikosida, terpenoid, steroid, tanin dan saponin.

2.6.1 Alkaloid

Alkaloid adalah metabolit basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, bereaksi dengan pereaksi

alkaloid. Menurut sifatnya alkaloid umumnya memiliki sifat padat, walaupun ada yang cair, memutar bidang polarisasi, larut dalam air, ada yang tidak larut dalam pelarut organik, bersifat basa (N) dan terasa pahit.

2.6.2 Glikosida

Glikosida adalah suatu senyawa yang apabila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Gula yang terkandung umumnya berupa glukosa, fruktosa, galaktosa, dan manosa. Sedangkan genin merupakan senyawa yang mempunyai gugus -OH dalam bentuk alkoholis atau fenolis (Sirait, 2007).

2.6.3 Senyawa Fenol dan Flavonoid

Senyawa fenol merupakan senyawa yang memiliki cincin aromatik dan mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harborne, 1987).

2.6.4 Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun atas isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C_5 ini. Secara umum senyawa ini larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan (Harborne, 1987).

2.6.5 Tanin

Tanin merupakan senyawa yang terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, memiliki gugus fenol, memiliki rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Tanin secara kimia dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin kondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin

Universitas Indonesia

terhidrolisis mengandung ikatan ester yang dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987).

2.6.6 Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus.

2.6.7 Kuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon, yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon (Harborne, 1987).

2.7 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan suatu metode pemisahan di mana komponen dari material didistribusikan di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah sub bagian dari kromatografi cair, di mana fase geraknya cair dan fase diamnya berupa lapis tipis pada permukaan lempeng yang rata (Fried & Sherma, 1999). Kromatografi lapis tipis umumnya dianggap sebagai metode pemisahan yang mudah, cepat, dan tidak mahal. KLT memiliki beberapa kelebihan dibanding kromatografi kertas yang terbatas penggunaannya untuk selulosa sebagai fase gerak (Striegel & Hill, 1996).

KLT dapat menggunakan sejumlah lapisan penyerap yang menunjukkan resolusi yang baik, cepat, dan sensitif. Penyerap yang dapat digunakan untuk KLT antara lain silika gel, alumina, selulosa, poliamida, dan masih banyak lagi. penyerap yang paling banyak digunakan adalah silika gel karena dapat menghasilkan resolusi yang baik dan memiliki kemampuan untuk memisahkan semua golongan senyawa (Wall, 2005).

Fase gerak merupakan media transport untuk zat yang akan dipisahkan. Zat uji bergerak melalui fase diam dengan prinsip kapilaritas. Pergerakan substansi selama proses KLT merupakan hasil dari dua macam gaya, yaitu gaya tarik dari fase gerak dan gaya hambat dari penyerap (Fried & Sherma, 1999).

Universitas Indonesia

Proses KLT terdiri dari beberapa langkah, yaitu (Striegel & Hill, 1996):

a. Penyiapan sampel

Metode prinsip untuk penyiapan sampel adalah pelarutan sampel pada pelarut yang tepat atau hidrolisis asam dari sampel menjadi komponen-komponennya (untuk protein dan karbohidrat). Pemilihan pelarut didasarkan pada kelarutan sampel. Sifat dari pelarut juga merupakan hal yang penting untuk diperhatikan karena pelarut adalah pembawa yang digunakan untuk mengaplikasikan sampel ke lempeng.

b. Pemilihan lempeng KLT

c. Pemilihan fase gerak

d. Penotolan sampel pada lempeng

Larutan sampel diambil menggunakan mikropipet pipa kapiler. Sebesar 0,1 μL sampai 1,0 μL larutan ditotolkan pada garis dasar lempeng kemudian dikeringkan.

e. Proses pemisahan

Sebelum pemisahan, bejana yang akan digunakan dijenuhkan dengan uap pelarut selama 15-30 menit.

f. Pengeringan lempeng

g. Deteksi

Komponen kimia yang dipisahkan dengan KLT bisa merupakan senyawa yang berwarna atau tidak berwarna. Deteksi dapat dibantu dengan mereaksikan komponen dengan pereaksi kimia untuk membentuk bercak yang dapat terlihat atau dengan lampu UV. Deteksi menggunakan pereaksi dapat dilakukan dengan penyemprotan atau pencelupan. Penyemprotan adalah metode yang lebih sering digunakan karena membutuhkan jumlah pereaksi yang lebih sedikit.

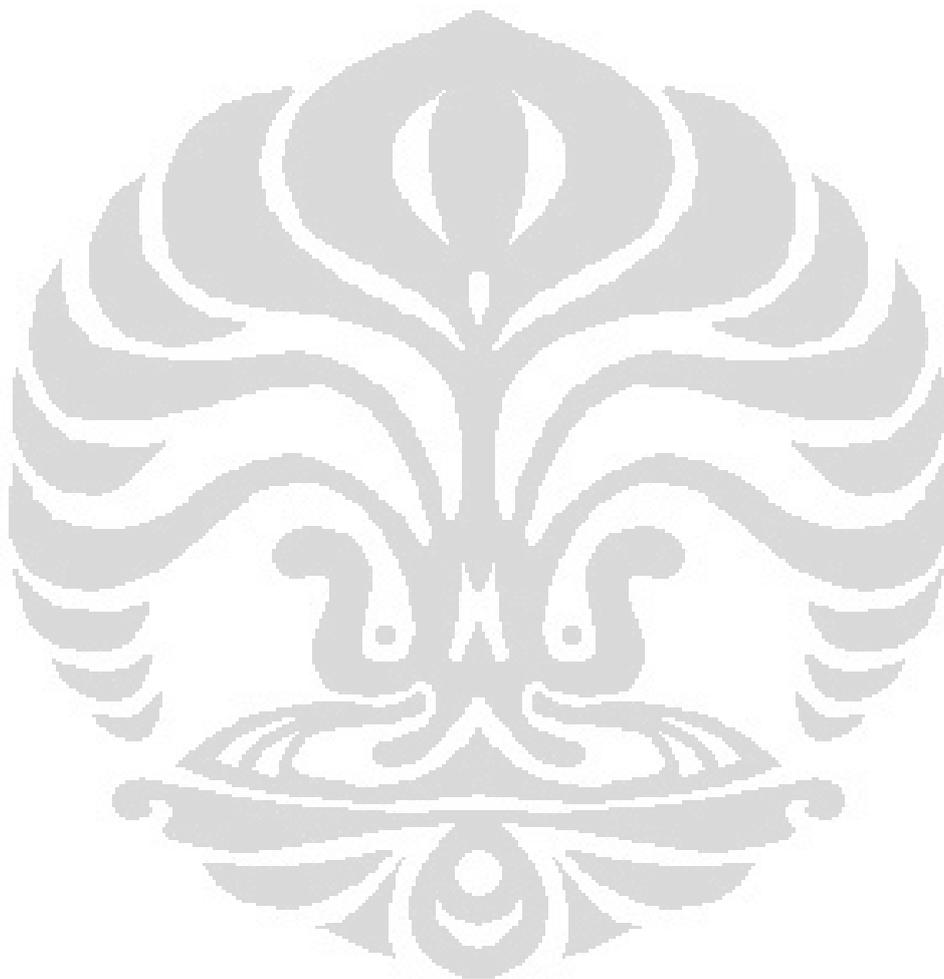
h. Pemeriksaan visual

Setelah deteksi, lempeng diperiksa untuk menentukan lokasi keberadaan komponen dengan cara dilihat di bawah cahaya normal. Jika terlihat adanya bercak berwarna, bercak ditandai dengan pensil. Selanjutnya lempeng diperiksa di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Jika terlihat adanya fluoresensi, daerah yang berwarna ditandai kembali dengan pensil.

Universitas Indonesia

i. Dokumentasi

Evaluasi dapat dilakukan dengan dokumentasi foto hasil KLT (DepKes, 2000).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Departemen Farmasi FMIPA UI sejak bulan September sampai dengan Desember 2011.

3.2 Alat

Lemari pengering, Oven (Hotpack Vacuum Oven), mesin penggiling (Panasonic), spektrofotometer (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments), blender (Waring), *Rotary evaporator* (Janke & Kunkel IKA, Jerman), pengocok, pH meter (Eutech Instruments), timbangan analitik (AND HR-200), penangas air (Imperial IV), pipet mikro 10-100 μL dan 100-1000 μL (Eppendorf), kuvet kuarsa (Quartz Cells, Jerman), alkoholmeter, dan alat-alat gelas lain.

3.3 Bahan

3.3.1 Bahan uji

Bahan uji untuk penelitian adalah ekstrak etanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yang tanamannya diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Bogor, Indonesia).

3.3.2 Bahan Kimia

α -Glukosidase dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Ultra, USA), akarbose, p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Jepang), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Merck, Jerman), natrium karbonat (Merck, Jerman), etanol, metanol, butanol, etil asetat, petroleum eter, eter, benzen (Merck, Jerman), aseton, kloroform, asam klorida (Merck, Jerman), natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), asam sulfat (Merck, Jerman), asam asetat anhidrat (Univar, USA), serbuk seng (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), timbal (II) asetat, serbuk asam borat (Merck, Jerman), serbuk asam oksalat (Merck, Jerman),

besi (III) klorida, natrium klorida (Mallinckrodt Chemicals, USA), gelatin (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Univar, USA).

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Penyiapan Bahan Uji

Tahap awal dari penyiapan bahan uji adalah pengambilan tanaman dari tempat asal. Setelah itu tanaman di determinasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Tanaman yang akan digunakan yaitu herba meniran, dipisahkan dari kotoran-kotoran yang menempel dengan mencuci bersih dengan air. Tanaman yang sudah bersih didiamkan beberapa saat untuk menghilangkan air yang masih menetes setelah pencucian. Selanjutnya tanaman ditimbang berat basahnya kemudian dipotong menjadi bagian lebih kecil. Setelah itu tanaman dianginkan pada suhu kamar dan dioven untuk mendapatkan hasil yang benar-benar kering. Hasil pengeringan ditimbang kembali untuk mengetahui bobot penyusutannya. Selanjutnya, dilakukan sortasi kering atau memisahkan pengotor-pengotor yang masih tertinggal pada simplisia kering. Tahap selanjutnya, tanaman dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan menggunakan blender.

3.4.2 Penyiapan Larutan Pereaksi

3.4.2.1 Etanol 80%

Etanol 80% dibuat dari etanol 96% dengan menggunakan alkoholmeter. Etanol 96% sebanyak 1 liter dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL lalu diukur kadar alkoholnya menggunakan alkoholmeter dengan cara mencelupkannya ke dalam gelas ukur yang berisi etanol 96%. Setelah itu, ditambahkan akuades 10 mL berulang kali sambil dilakukan pengukuran dengan alkoholmeter hingga kadar alkohol menjadi 80%.

3.4.2.2 Natrium Hidroksida 0,1 N (DepKes, 1979)

Larutan natrium hidroksida 0,1 N dibuat dengan menimbang dengan seksama 4 g NaOH kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 L.

3.4.2.3 Natrium Hidroksida 2 N (DepKes, 1979)

Larutan natrium hidroksida 2 N dibuat dengan menimbang dengan seksama 80,02 g natrium hidroksida kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 liter.

3.4.2.4 Natrium Hidroksida 10% (DepKes, 1979)

Larutan natrium hidroksida 10% dibuat dengan menimbang dengan seksama 100 mg natrium hidroksida kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 liter.

3.4.2.5 Asam Klorida 2 N (DepKes, 1979)

Larutan asam klorida 2N dibuat dengan menimbang dengan seksama 72,93 g asam klorida kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 liter.

3.4.2.6 Asam Klorida 10% (DepKes, 1979)

Larutan asam klorida 10% dibuat dengan menimbang dengan seksama 100 mg asam klorida kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 liter.

3.4.2.7 Asam Nitrat 0,5 N

Larutan asam nitrat 0,5 N dibuat dengan menimbang dengan seksama 31,5 g asam nitrat kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 liter.

3.4.2.8 Asam Sulfat 2 N (DepKes, 1979)

Larutan Asam sulfat 2N dibuat dengan menimbang dengan seksama 98,08 g asam sulfat kemudian larutkan dalam akuades hingga 1 liter.

3.4.2.9 Larutan pereaksi Mayer

Larutan pereaksi Mayer dibuat dengan cara mencampurkan larutan raksa (II) klorida P 2,266% b/v dan larutan kalium iodida P 50% b/v. Larutan raksa (II) klorida P dibuat dengan melarutkan 1,358 g raksa (II) klorida P dalam 60 mL akuades. Larutan kalium iodida P dibuat dengan melarutkan 5 g kalium iodida P

dalam 10 mL akuades. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100 mL.

3.4.2.10 Larutan Pereaksi Dragendorff

Pereaksi Dragendorff dibuat dari campuran larutan bismuth nitrat P 40% b/v dalam asam nitrat dan larutan kalium iodida P 54,4% b/v. Larutan bismuth nitrat P dibuat dengan cara melarutkan 8 g bismuth nitrat P dalam 20 mL asam nitrat. Larutan kalium iodida P dibuat dengan cara melarutkan 27,2 g kalium iodida P dalam 50 mL akuades. Kedua larutan dicampur dan didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan dengan akuades hingga 100 mL.

3.4.2.11 Larutan Pereaksi Bouchardat

Larutan pereaksi Bouchardat dibuat dari campuran iodium dan kalium iodida. Sebanyak 2 g iodium P dan 4 g kalium iodida P dilarutkan dalam 100 mL akuades.

3.4.2.12 Larutan Pereaksi Mollisch

Pereaksi Mollisch dibuat dengan cara melarutkan α -naftol P 3% b/v dalam asam nitrat 0,5 N. Pembuatan dilakukan dengan cara melarutkan 1,5 g α -naftol P dalam 50 mL asam nitrat 0,5 N.

3.4.2.13 Larutan Dapar fosfat pH 6,8 (DepKes, 1979)

Larutan dapar fosfat pH 6,8 dibuat dengan cara menimbang 0,6804 g kalium dihidrogenfosfat dan melarutkan dalam 50,0 mL akuades bebas CO₂. Setelah itu, larutan dicampurkan dengan 22,4 mL Natrium hidroksida 0,1 N dan mengukur pH nya menggunakan pH meter hingga tercapai pH 6,8. Selanjutnya diambahkan akuades bebas CO₂ hingga 200 mL.

3.4.2.14 Larutan Dapar Fosfat pH 7,0

Larutan dapar fosfat pH 7,0 dibuat dengan cara menimbang 0,6804 g kalium dihidrogenfosfat dan melarutkan dalam 50,0 mL akuades bebas CO₂.

Setelah itu, larutan dicampurkan dengan 29,1 mL Natrium hidroksida 0,1 N dan mengukur pH nya menggunakan pH meter hingga tercapai pH 7,0. Selanjutnya ditambahkan akuades bebas CO₂ hingga 200 mL.

3.4.2.15 Larutan Dapar Fosfat pH 7,2

Larutan dapar fosfat pH 7,2 dibuat dengan cara menimbang 0,6804 g kalium dihidrogenfosfat dan melarutkan dalam 50,0 mL akuades bebas CO₂. Setelah itu, larutan dicampurkan dengan 34,7 mL Natrium hidroksida 0,1 N dan mengukur pH nya menggunakan pH meter hingga tercapai pH 7,2. Selanjutnya ditambahkan akuades bebas CO₂ hingga 200 mL.

3.4.2.16 Larutan Bovin Serum Albumin (BSA)

Larutan larutan enzim pH 6,8 dibuat dengan melarutkan 200 mg BSA dalam dapar fosfat pH 6,8 hingga 100 mL. Larutan pH 7,0 dibuat dengan melarutkan 200 mg BSA dalam dapar fosfat pH 7,0 hingga 100 mL. Untuk larutan enzim pH 7,2, 200 mg BSA dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,2 hingga 100 mL.

3.4.2.17 Larutan Enzim

Larutan enzim dibuat dengan menimbang 1,2 mg α -glukosidase dilarutkan dalam 100 mL BSA dalam kondisi dingin. Kemudian larutan induk enzim diencerkan dengan dapar fosfat berbagai pH (6,8; 7,0; dan 7,2) hingga diperoleh larutan enzim 0,0279 U/mL. Perhitungan unit larutan enzim:

Label yang terdapat pada kemasan α -glukosidase adalah 16,5 mg; 26 % protein; 179 Unit/mg protein.

$$\text{Jumlah protein} = \frac{1,2}{1,2} \times 16,5 \text{ mg serbuk} = 4,29 \text{ mg protein}$$

Dari penelitian sebelumnya, diketahui unit enzim untuk pengujian harus kurang dari 0,05 U/mL agar serapannya berada dalam rentang 0,2-0,8. Selanjutnya dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan unit enzim yang akan digunakan. Dari hasil uji pendahuluan diperoleh unit enzim 0,0279 unit/mL dan unit enzim untuk larutan induk 55,848 unit, maka dapat dihitung jumlah enzim yang ditimbang adalah:

$$\text{Jumlah protein dalam 55,848 unit} = \frac{55,848}{179} = 0,312 \text{ mg}$$

Jumlah yang ditimbang = _____ = 1,2 mg serbuk

1,2 mg α -glukosidase dilarutkan dalam 100 ml dapar fosfat berbagai pH (6,8; 7,0; dan 7,2) sehingga menjadi 0,5584 unit/mL.

3.4.2.18 Larutan Substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

Larutan substrat 30 mM dibuat dengan menimbang 90,375 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dan dilarutkan dalam akuades hingga 10 mL. Larutan substrat 15 mM dibuat dengan melarutkan 45,1875 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dalam akuades hingga 10 mL atau dengan pengenceran dari larutan substrat 30 mM. Larutan substrat 20 mM dibuat dengan menimbang 60,25 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dan dilarutkan dalam akuades hingga 10 mL. Larutan substrat 10 mM dibuat dari pengenceran larutan substrat 20 mM. Sebanyak 5,0 mL larutan substrat 20 mM diambil dan dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL lalu ditambahkan akuades hingga 10 mL. Larutan substrat 5 mM; 2,5 mM; 1,25 mM dan 0,625 mM dibuat dengan pengenceran larutan substrat masing-masing dari larutan substrat 10 mM; 5 mM; 2,5 mM; dan 1,25 mM dengan cara yang sama.

3.4.2.19 Larutan Natrium Karbonat 200 mM

Larutan Na_2CO_3 dibuat dengan menimbang 21,2 gram natrium karbonat lalu dilarutkan dalam akuades hingga 1 L.

3.4.2.20 Larutan Akarbose

Larutan akarbose dibuat dengan cara menimbang 100 mg akarbose dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH optimum hingga 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1%. Larutan akarbose 0,5% dibuat dengan mengambil 5,0 mL larutan akarbose 1% dan dimasukkan ke dalam labu takar lalu ditambahkan larutan dapar pH optimum hingga 10 mL. Demikian juga larutan akarbose 0,25% dibuat dari pengenceran larutan akarbose 0,5% dan larutan akarbose 0,125% dibuat dari pengenceran larutan akarbose 0,25%.

3.4.2.21 Larutan Sampel Uji

Ekstrak ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan 1-2 ml dimetil sulfoksida (DMSO). Setelah larut, ditambahkan dapar fosfat pH optimum hingga 10 mL dan didapatkan konsentrasi ekstrak 1%. Larutan ekstrak 1% diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 0,5%, 0,25 % dan 0,125 %.

3.4.3 Ekstraksi

Sejumlah 500 gram simplisia kering diekstraksi menggunakan cara maserasi dengan pelarut \pm 1000 mL etanol 80% sebanyak 5 kali masing-masing selama 6 jam. Setiap kali proses maserasi selesai, dilakukan pendiaman bejana selama 18 jam. Kemudian ekstrak etanol yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum pada suhu 50°C dan diuapkan di penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ini kemudian ditimbang untuk mengetahui rendemen yang dihasilkan.

3.4.4 Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak etanol meniran dilakukan untuk mendapatkan fraksi-fraksi yang akan diuji aktivitasnya. Pelarut yang digunakan ada empat macam, yaitu petroleum eter, etil asetat, butanol, dan metanol. Sebelum digunakan, pelarut dijenuhkan terlebih dahulu dengan mencampur dan mengocok pelarut bersama akuades dengan perbandingan volume 1:1 dalam corong pisah. Hasil campuran ini didiamkan selama lebih kurang 30 menit untuk mencapai kondisi jenuh. Setelah itu lapisan pelarut (lapisan atas) dipisahkan dari lapisan air untuk selanjutnya digunakan pada proses fraksinasi.

Sebanyak \pm 30 gram ekstrak kental etanol meniran dilarutkan dalam air hangat 100 mL. Larutan ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan petroleum eter 100 mL. Campuran larutan dikocok setiap 10 menit sekali sebanyak 3 kali lalu didiamkan beberapa saat hingga memisah dan terbentuk dua lapisan. Lapisan atas (lapisan petroleum eter) diambil dan diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kental. Proses penambahan pelarut, pengocokan, dan pemisahan dilakukan sebanyak 5 kali.

Setelah lapisan petroleum eter selesai difraksinasi dan telah dipisahkan dari lapisan air, ke dalam corong pisah ditambahkan 100 mL etil asetat. Langkah selanjutnya sama dengan langkah pada petroleum eter. Setelah etil asetat, dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut butanol dengan langkah yang sama. Setelah fraksinasi dengan pelarut butanol selesai, larutan ekstrak dalam air dipindahkan ke dalam cawan penguap. Untuk fraksinasi dengan pelarut metanol, tambahkan \pm 100 mL metanol ke dalam cawan berisi ekstrak dan uapkan di atas penangas air. Setelah lapisan air menguap, ke dalam cawan ditambahkan kembali metanol dengan jumlah yang sama. Langkah tersebut dilakukan sebanyak 4-5 kali sampai diperoleh fraksi metanol yang sudah terbebas dari air.

3.4.5 Optimasi Aktivitas Enzim

Sebelum pengujian, perlu dilakukan optimasi enzim sehingga dapat diketahui kondisi di mana enzim dapat bekerja secara optimal. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh dari penurunan aktivitas enzim merupakan kerja dari ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tersebut. Variabel yang harus dioptimasi adalah konsentrasi substrat (0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, dan 30 mM), pH (6,8; 7,0; dan 7,2), dan waktu inkubasi (15 menit, 20 menit, dan 30 menit).

Optimasi pH dilakukan dengan membuat campuran reaksi yang terdiri dari 500 μ L 15 mM p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat dan 980 μ L 100 mM dapar fosfat (pH 6,8; 7,0; dan 7,2). Campuran diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Untuk larutan uji, ditambahkan 500 μ L larutan enzim 0,0279 U/mL dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 2000 μ L 200 mM natrium karbonat. Larutan uji diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm.

Larutan blanko dibuat sama dengan larutan uji, namun setelah diinkubasi selama 15 menit, ditambahkan 2000 μ L 200 mM natrium karbonat, dan selanjutnya diinkubasi kembali selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 500 μ L larutan enzim lalu diukur serapannya pada 400 nm.

Untuk optimasi waktu inkubasi, cara yang dilakukan sama seperti pada optimasi pH, namun waktu inkubasi kedua diubah-ubah mulai dari 15 menit, 20

menit dan 30 menit. Pada pengujian ini, pH yang digunakan adalah pH 7,0. Untuk optimasi konsentrasi substrat, digunakan pH 7,0 dan waktu inkubasi selama 15 menit dengan konsentrasi substrat diubah-ubah mulai dari konsentrasi 30 mM hingga 0,625 mM.

Tabel 3.1. Prosedur uji optimasi penghambatan aktivitas α -glukosidase

Reagen	Volume (μ l)					
	Uji 1	Uji 2	Uji 3	Blanko 1	Blanko 2	Blanko 3
Dapar fosfat 6,8	980	-	-	980	-	-
Dapar fosfat 7,0	-	980	-	-	980	-
Dapar fosfat 7,2	-	-	980	-	-	980
Substrat	500	500	500	500	500	500
Inkubasi 37°C, 5 menit						
Larutan Enzim	500	500	500	-	-	-
Natrium Karbonat	-	-	-	2000	2000	2000
Inkubasi 37°C, 15 menit						
Larutan Enzim	-	-	-	500	500	500
Natrium Karbonat	2000	2000	2000	-	-	-
Ukur serapan dengan spektrofotometer pada λ 400 nm						

Perhitungan Aktivitas

$$\text{Aktivitas} = \frac{18,1 \times V}{df \times V_e \times t \times C} \quad (3.1)$$

$$\text{Aktivitas} = \frac{18,1 \times V}{df \times V_e \times t \times C} \quad (3.2)$$

Keterangan :

V = Volume total

df = Faktor pengenceran

18,1 = Ekstinsi milimolar p-Nitrophenol pada 400 nm

V_e = Volume enzim (mL)

t = Waktu inkubasi (menit)

C = Banyaknya α -glukosidase dalam larutan uji (mg/mL)

Definisi Unit:

Satu unit enzim akan menghasilkan 1,0 μmol D-glukosa dari p-nitrofenil α -D-glukosida per menit pada pH 7,0 dan suhu 37°C.

3.4.6 Penentuan Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase (Choudhary, et al., 2011 dan Dewi, et al., 2007)

Pengukuran aktivitas dilakukan dengan menggunakan metode *Spectrophotometric Stop Rate Determination* yang didasarkan pada pengukuran absorbansi p-nitrofenol (berwarna kuning) yang merupakan hasil reaksi hidrolisis substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida oleh α -glukosidase di samping menghasilkan glukosa (Sigma, 1996). Penentuan penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan sesuai dengan kondisi optimasi yang diperoleh. Berikut prosedur dalam menentukan penghambatan aktivitas α -glukosidase:

3.4.6.1 Pengujian Blangko

Sejumlah 20 μL DMSO ditambah dengan 980 μL 100 mM dapar fosfat (pH optimum) dan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ke dalam sampel ditambahkan 2000 μL 200 mM natrium karbonat, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 500 μL enzim 0,0279 U/ml. Sampel diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

3.4.6.2 Pengujian Kontrol Blanko

Larutan 980 μL dapar fosfat (pH optimum) dicampur dengan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum dan 20 μL DMSO diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 2 mL natrium karbonat 0,2 M. Larutan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C kemudian ditambahkan 500 μL larutan enzim. Larutan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

3.4.6.3 Pengujian Sampel

Sampel 20 μL larutan ekstrak ditambah dengan 980 μL dapar fosfat (pH optimum) dan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Ke dalam sampel ditambahkan 500 μL enzim 0,0279 U/ml, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C . Setelah masa inkubasi selesai, tambahkan 2000 μL 200 mM natrium karbonat. Sampel diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

3.4.6.4 Pengujian Kontrol Sampel

Larutan 980 μL dapar fosfat (pH optimum) dicampur dengan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum dan 20 μL larutan ekstrak lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya ditambahkan 2 mL natrium karbonat 0,2 M dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi, segera ditambahkan 500 μL larutan enzim. Larutan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

3.4.6.5 Pengujian Pembanding

Larutan 980 μL dapar fosfat (pH optimum) dicampur dengan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum dan 20 μL larutan akarbose lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya ditambahkan 500 μL larutan enzim dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi, segera ditambahkan 2 mL natrium karbonat 0,2 M. Larutan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

3.4.6.6 Pengujian Kontrol Pembanding

Larutan 980 μL dapar fosfat (pH optimum) dicampur dengan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi optimum dan 20 μL larutan akarbose lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya ditambahkan 2 mL natrium karbonat 0,2 M dan diinkubasi kembali selama 15

menit pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, segera ditambahkan 500 µL larutan enzim. Larutan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

Tabel 3.2. Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase

Reagen	Volume (µl)			
	B1	B2	S1	S0
Sampel	-	-	20	20
DMSO	20	20	-	-
Dapar	980	980	980	980
Substrat	500	500	500	500
Inkubasi 37°C, 5 menit				
Natrium Karbonat	-	2000	-	2000
Enzim	500	-	500	-
Inkubasi 37°C, 15 menit				
Natrium Karbonat	2000	-	2000	-
Enzim	-	500	-	500

Keterangan: B1 = Blanko; B0 = kontrol blanko; S1 = sampel dan pembanding; S0 = kontrol sampel dan kontrol pembanding

Persen inhibisi dapat dihitung dari persamaan:

(3.3)

Keterangan:

- a = absorbansi kontrol
- b = absorbansi blanko
- c = absorbansi sampel dengan penambahan enzim
- d = absorbansi sampel tanpa penambahan enzim

IC₅₀ merupakan konsentrasi inhibitor yang dapat menghambat aktivitas enzim sebesar 50% (Mogale, Lebelo, Thovhogi, de Freitas, & Shai, 2011). Nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi

sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ dapat dihitung nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus

$$IC_{50} = \frac{a}{-b} \quad (3.4)$$

3.4.7 Penentuan Kinetika Inhibisi Enzim

Penentuan kinetika inhibisi enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil α -D-glukopiranosida sebagai substrat dengan konsentrasi 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM dan 20 mM dengan menggunakan ekstrak pada konsentrasi 6,25 ppm, 12,5 ppm dan 25 ppm. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan plot *Lineweaver-Burk* untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Tetapan kinetika Michaelis-Menten dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah konsentrasi substrat dan y adalah absorbansi sampel.

$$\text{Sehingga } y = 0 \rightarrow x = -1/K_M \quad (3.5)$$

$$y = a + b (-1/K_M) \rightarrow K_M = b/a \quad (3.6)$$

3.4.8 Penapisan Fitokimia

3.4.8.1 Alkaloid (Depkes, 1995b & Sirait, 2007)

Sebanyak ± 10 mg ekstrak ditambahkan dengan 1 mL HCl 2N dan 9 mL akuades, kemudian dipanaskan di penangas air selama 2 menit, dinginkan. Kemudian filtrat disaring dan ditampung. Filtrat digunakan sebagai larutan percobaan selanjutnya (larutan uji).

- a. Larutan uji diambil 1 mL dan dituang ke dalam kaca arloji, kemudian ditambahkan 2 tetes Bouchardart LP, terbentuk endapan coklat sampai dengan hitam (alkaloid positif).
- b. Larutan uji diambil 1 mL dan dituang ke dalam kaca arloji, kemudian ditambahkan 2 tetes Mayer LP, terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol (alkaloid positif).
- c. Larutan uji diambil 1 mL dan dituang ke dalam kaca arloji, kemudian ditambahkan 2 tetes Dragendorf LP, terbentuk endapan jingga coklat (alkaloid positif).

Uji kualitatif secara KLT: totolkan ekstrak yang sudah dipekatkan pada lempeng silika gel dalam kloroform : metanol (85:15). Deteksi adanya alkaloid mula-mula di bawah sinar UV 254-366 nm. Untuk lebih memastikan, semprot lempeng dengan menggunakan pereaksi dragendorf.

3.4.8.2 Flavonoid (Depkes, 1995b & Farnsworth, 1966)

Sebanyak \pm 10 mg ekstrak ditambahkan dengan 5 mL etil asetat hingga ekstrak larut (larutan uji).

- a. Sebanyak 1 mL larutan uji diuapkan dan ditambahkan 2 mL etanol 95% dan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 ml HCl 2N, diamkan 1 menit. Setelah itu, ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Kocok perlahan, kemudian didiamkan 2 sampai 5 menit. Terbentuk warna merah intensif (flavonoid positif).
- b. Sebanyak 1 mL larutan uji diuapkan dan ditambahkan 1 mL etanol 95% dan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat dan kocok perlahan. Hasil positif jika terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu (flavonoid positif) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron).
- c. Sebanyak 1 mL larutan diuapkan dan ditambahkan dengan 2 mL aseton, kemudian dilarutkan. Setelah itu, ditambahkan sedikit serbuk asam borat dan asam oksalat, panaskan hati-hati. Lalu, ditambahkan 10 ml eter. Amati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif (flavonoid positif).

Uji kualitatif secara KLT : larutan percobaan ditotolkan pada lempeng silika gel dengan memakai pengembang butanol : asam asetat :air (4:1:5). Semprot dengan larutan penampak noda $SbCl_3$ atau $AlCl_3$ dalam kloroform, noda warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3.4.8.3 Glikosida (Depkes, 1995)

Sebanyak \pm 10 mg ekstrak ditambahkan dengan 15 mL HCl 10 %, kemudian dipanaskan selama 10 menit dan disaring. Filtrat disari tiga kali, tiap kali dengan 5 mL larutan eter. Sari dikumpulkan dan ditambahkan natrium sulfat anhidrat, saring (larutan uji). Larutan uji diuapkan pada suhu tidak lebih dari

50°C, kemudian ditambahkan dengan 2 mL metanol dan diuapkan. Hasil penguapan dilarutkan dengan 1 mL air dan 8 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 1 mL asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (reaksi Molisch).

Uji kualitatif secara KLT: larutan percobaan ditotolkan pada lempeng silika gel dengan memakai pengembang kloroform : metanol :air (40:10:1). Semprot dengan larutan penampak AlCl₃ dalam kloroform.

3.4.8.4 Saponin (Depkes, 1995 & Farnsworth, 1966)

Ekstrak ± 10 mg ditambahkan dengan 10 mL air panas dan kemudian didinginkan. Larutan uji dikocok vertikal selama 10 detik, kemudian diamkan selama 10 menit. Terbentuk buih setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

Uji kualitatif secara KLT : kromatografi pada lempeng silika gel dengan memakai pengembang kloroform : metanol : air (13:7:2). Deteksi adanya saponin di bawah sinar UV, kemudian semprot menggunakan antimon klorida dalam HCl pekat dan dipanaskan pada 110 °C.

3.4.8.5 Tanin (Farnsworth, 1966 & Trease, 1961)

Ekstrak ± 10 mg ditambahkan dengan 50 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring (larutan uji).

- a. Sejumlah 5 mL larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 3%, terbentuk warna hijau violet (tanin positif).
- b. Sejumlah 5 mL larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan gelatin 10%, terbentuk endapan putih (tanin positif).
- c. Sejumlah 5 mL larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%), terbentuk endapan putih (tanin positif).

Uji kualitatif secara KLT: kromatografi pada lempeng silika gel dengan memakai pengembang butanol : asam asetat : air (4:1:5). Deteksi adanya tanin di

bawah sinar UV, kemudian semprot menggunakan FeCl_3 . Pada pemeriksaan kembali di bawah sinar UV akan terlihat warna lembayung yang menunjukkan adanya tanin.

3.4.8.6 Terpen / Sterol (Farnsworth, 1966)

Ekstrak ± 10 mg ditambahkan dengan 5 mL larutan eter, kemudian diuapkan dalam cawan penguap. Larutan uji kemudian ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Pada pengamatan terbentuk merah-hijau atau violet-biru yang menunjukkan hasil positif.

Uji kualitatif secara KLT : totolkan ekstrak yang sudah dipekatkan pada lempeng silika gel GF254 dengan memakai pengembang benzen : kloroform (1:1) atau benzen : etil asetat (19:1). Deteksi adanya terpen di bawah sinar UV 254 nm, kemudian semprot dengan menggunakan larutan anisaldehyd/ H_2SO_4 . Amati di bawah sinar tampak.

3.4.8.7 Kuinon / Antrakuinon

Ekstrak ± 10 mg dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2 N, dipanaskan sebentar kemudian didinginkan. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL wash benzen P, kocok, diamkan. Lapisan wash benzen dipisahkan dan disaring, filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1 mL sampai 2 mL natrium hidroksida 2 N, diamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna.

Uji kualitatif secara KLT : totolkan ekstrak yang sudah dipekatkan pada lempeng silika gel dengan pengembang benzen : etil asetat : asam asetat (75:24:1). Larutan penampak noda yang dipakai NaOH 10 % dalam metanol, warna yang semula kuning dan coklat kuning berubah menjadi merah, ungu, hijau, atau lembayung.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan Uji

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah meniran. Pemilihan tanaman ini didasarkan pada data empiris bahwa meniran telah digunakan untuk menurunkan kadar gula darah pada penderita diabetes. Studi terhadap meniran menunjukkan hasil bahwa tanaman ini memiliki potensi sebagai antidiabetes. Pada penelitian terhadap tikus, ekstraknya mampu menurunkan kadar glukosa darah (Okoli, Ibiyam, Ezike, Akah, Okoye, 2010 & Ranilla, Kwon, Apostolidis, Shetty, 2010).

Tanaman dideterminasi untuk memastikan bahwa tanaman yang diperoleh sesuai dengan yang diinginkan dan diperoleh hasil bahwa tanaman yang akan diuji adalah meniran dengan nama latin *Phyllanthus niruri* L. Bagian tanaman yang akan digunakan untuk pengujian berupa herba. Tanaman dipisahkan dari pengotor-pengotor seperti tanah, kerikil, bagian dari tanaman lain, dan pengotor lain yang mungkin ikut terbawa ketika pengambilan tanaman. Setelah itu tanaman dicuci dengan air hingga bersih lalu ditiriskan pada suhu kamar dan ditimbang bobotnya sebelum dikeringkan. Saat penimbangan didapatkan bobotnya 3780 gram. Karena yang digunakan untuk pengujian adalah seluruh bagian tanaman, maka untuk pengeringan dilakukan perajangan terlebih dahulu menjadi bagian yang lebih kecil agar proses pengeringan lebih cepat. Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung pada suhu kamar selama kurang lebih 7 hari. Hasil pengeringan selanjutnya ditimbang kembali dan diperoleh bobot sebesar 1275 gram. Dengan demikian dapat dihitung susut pengeringannya, yaitu 66,27 %.

Simplisia yang telah kering disortasi dari pengotor-pengotor yang tertinggal, seperti tanah yang masih melekat atau benda asing yang mungkin masuk selama proses pengeringan. Simplisia yang sudah disortir dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Penghalusan menjadi serbuk perlu dilakukan karena makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif dan efisien (DepKes, 2000). Untuk penyimpanan, serbuk simplisia

disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya untuk mencegah kerusakan dan penurunan mutu.

4.2 Ekstraksi Simplisia

Sejumlah 500 gram simplisia kering diekstraksi menggunakan cara maserasi dengan perendaman dan pengocokan konstan dalam ± 1 L etanol 80% dalam bejana maserasi. Total simplisia kering yang digunakan adalah 1000 gram. Cara maserasi dipilih karena dikhawatirkan ada bagian senyawa yang rusak jika digunakan ekstraksi cara panas.

Sebagai pelarut digunakan etanol 80% karena bersifat polar, sehingga dapat menarik senyawa aktif yang diperkirakan memiliki aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase, seperti halnya akarbose yang juga bersifat polar (pseudotetrasakarida). Campuran alkohol dengan air merupakan pelarut yang memiliki kemampuan ekstraksi tinggi untuk hampir semua senyawa bahan alam. Etanol juga tidak bereaksi dengan senyawa yang diekstrak atau senyawa lain yang ada di tanaman. Selain itu, etanol adalah pelarut yang biasa digunakan pada spektrofotometri UV-Vis dan tidak toksik (Harborne, 1987). Etanol juga merupakan salah satu pelarut yang biasa digunakan untuk uji aktivitas α -glukosidase (Chan, Sun, Reddy, & Wu, 2010; Shinde et al, 2008; Shoei, Hsiao, & Chien, 2008; Sio, Jhong, Chao, Chung, & Shoei, 2008).

Maserasi dilakukan sebanyak 5 kali masing-masing selama 6 jam. Di mana setiap kali maserasi pelarut diganti dengan pelarut yang baru. Dalam mengekstraksi dilakukan remaserasi berkali-kali agar senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman dapat tertarik secara maksimal. Proses maserasi dilakukan dengan pengocokan agar senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman dapat tertarik oleh pelarut. Setelah pengocokan selesai, filtrat ditampung dan diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum pada suhu 50°C. Hasil dari penguapan ini diuapkan kembali di penangas air menggunakan cawan penguap hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian ditimbang untuk mengetahui rendemen yang dihasilkan. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (DepKes, 2000). Setelah semua ekstrak kental ditimbang, didapatkan bobot seberat 115,5 gram. Dengan

Universitas Indonesia

demikian dapat dihitung rendemen yang dihasilkan dari ekstraksi ini, yaitu 11,55 %. Setelah itu ekstrak disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C untuk mencegah tumbuhnya mikroba yang tidak diinginkan (Depkes, 1985).

4.3 Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak etanol meniran dilakukan untuk mendapatkan fraksi-fraksi yang kemudian akan diuji aktivitasnya. Pelarut yang digunakan ada empat macam, yaitu petroleum eter, etil asetat, butanol, dan metanol. Untuk fraksinasi ini dipilih pelarut dengan polaritas yang berbeda-beda agar kandungan senyawa kimia dalam ekstrak dengan berbagai kepolaran dapat tersari seluruhnya. Sebelum digunakan, pelarut dijenuhkan terlebih dahulu dengan cara dikocok bersama air dalam corong pisah dengan perbandingan volume 1:1. Kemudian diambil lapisan pelarutnya yang ada di bagian atas.

Sebanyak 30 gram ekstrak kental etanol meniran dilarutkan dalam air hangat 100 ml. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan petroleum eter sebanyak 100 ml. Campuran larutan dikocok hingga bercampur lalu didiamkan beberapa saat hingga memisah dan terbentuk dua lapisan. Lapisan atas (lapisan petroleum eter) diambil dan diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kental. Penambahan pelarut dan pengocokan dilakukan terus menerus beberapa kali sampai lapisan petroleum eter menjadi cukup jernih, yang menandakan kandungan senyawanya sudah tersari sempurna.

Setelah lapisan petroleum eter cukup jernih dan dipisahkan dari ekstrak air, ke dalam corong pisah ditambahkan 100 ml etil asetat. Selanjutnya dilakukan langkah yang sama seperti petroleum eter. Setelah etil asetat, berturut-turut dilakukan fraksinasi dengan pelarut butanol dan metanol dengan langkah yang sama.

4.4 Optimasi Aktivitas Enzim

Sebelum pengujian, perlu dilakukan optimasi enzim terlebih dahulu, sehingga dapat diketahui kondisi yang optimal agar enzim dapat bekerja secara optimal. Optimasi aktivitas enzimatik dilakukan terhadap variasi konsentrasi substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida, pH pengujian, dan waktu inkubasi

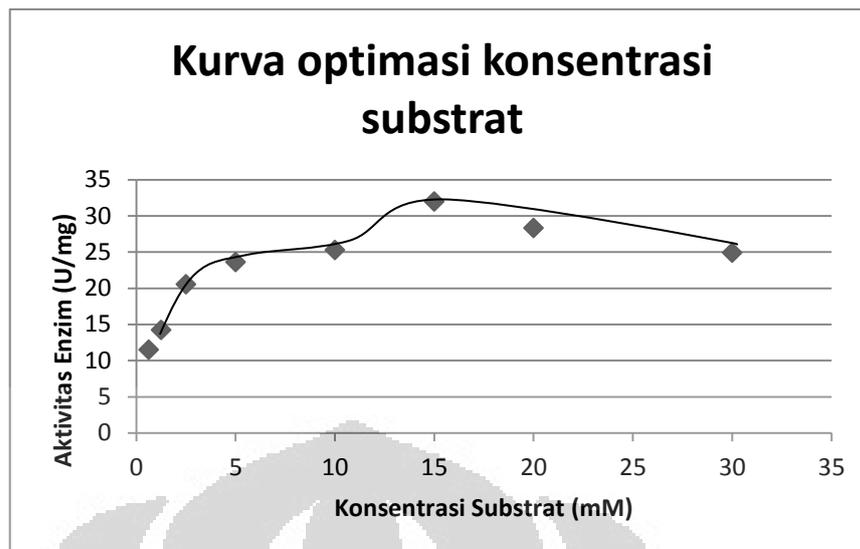
dengan unit enzim 0,0279 unit/mL. Optimasi ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi substrat, pH dapar fosfat, dan waktu inkubasi yang sesuai pada unit enzim yang digunakan. Selain itu juga untuk memastikan panjang gelombang maksimum dari larutan uji. Pemilihan unit enzim ini didasarkan pada hasil optimasi, di mana pada unit enzim tersebut diperoleh serapan yang berada dalam rentang 0,2-0,8. Hal ini dilakukan karena pada rentang ini kesalahan pembacaan hanya 0,5% (Gandjar & rohman, 2007).

Enzim bekerja optimal pada pH 6,0-9,0 dan stabil pada pH 5,0-10,0 (Kikkoman, 2011). Karena itu digunakan dapar fosfat pH 6,8, 7,0, dan 7,2 untuk uji optimasi aktivitas enzim. Reaksi enzimatik berlangsung pada suhu 37°C (Kikkoman, 2011), sehingga tidak perlu dilakukan optimasi suhu. Proses inkubasi dilakukan dua kali. Yang pertama, larutan diinkubasi 5 menit untuk membuat larutan uji mencapai suhu 37°C. Inkubasi kedua merupakan waktu inkubasi untuk reaksi enzimatik. Waktu inkubasi tahap kedua ini perlu dioptimasi terlebih dahulu untuk mengetahui waktu optimal yang digunakan enzim dalam bereaksi dengan substrat.

Substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida dan dapar fosfat (pH 7,0) diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Campuran larutan ini ditambahkan dengan larutan α -glukosidase 0,0279 U/mL lalu diinkubasi kembali selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Kikkoman, 2011). Produk yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida adalah p-nitrofenol yang berwarna kuning, sehingga produk ini dapat diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum sekitar 400 nm. Untuk mengoreksi hasil serapan blanko, dilakukan pengamatan kontrol terhadap aktivitas enzim dengan tahap awal sama seperti pada blanko. Setelah inkubasi 5 menit, ditambahkan natrium karbonat dan dilanjutkan dengan inkubasi 15 menit. Selanjutnya ditambahkan α -glukosidase pada campuran reaksi tersebut. Hasil yang diperoleh dari kontrol dapat digunakan untuk melihat apakah aktivitas enzim telah berhenti saat kondisi campuran telah dibasakan terlebih dahulu dengan natrium karbonat, sehingga tidak ada lagi produk yang masih terbentuk.

Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM 20 mM, dan 30 mM. Jika konsentrasi substrat meningkat, sementara semua kondisi lain dipertahankan tetap konstan, kecepatan awal yang terukur akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum. Kecepatan awal adalah serapan ketika baru sedikit sekali substrat yang bereaksi. Setelah mencapai nilai maksimum, peningkatan konsentrasi tidak lagi mempengaruhi aktivitas enzim. Keadaan ini dikatakan enzim telah jenuh oleh substrat.

Aktivitas enzim yang optimal bisa didapatkan dengan pengujian menggunakan konsentrasi substrat yang bervariasi. Karena itu perlu dilakukan penurunan konsentrasi menjadi 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM dan 0,625 mM. Hasil yang diperoleh menunjukkan terdapat kenaikan absorbansi dari konsentrasi substrat 1,25 mM hingga 15 mM, dan terjadi penurunan absorbansi pada konsentrasi substrat 20 mM. Kecepatan reaksi akan meningkat seiring bertambahnya konsentrasi substrat hingga enzim mencapai keadaan jenuh. Dalam hal ini, enzim telah jenuh pada konsentrasi substrat 15 mM, di mana konsentrasi tersebut memberikan aktivitas enzim tertinggi yaitu 0,3839 U/ml. Hal ini disebabkan karena substrat yang ada sudah melebihi jumlah substrat yang dapat bereaksi dengan enzim, sehingga tidak ada lagi enzim yang bebas yang dapat bereaksi dengan substrat. Dengan demikian, untuk uji aktivitas penghambatan α -glukosidase dapat digunakan konsentrasi enzim 0,0279 U/mL dan konsentrasi substrat 15 mM karena pada kondisi ini semua sisi aktif enzim sudah berikatan dengan substrat.



Gambar 4.2. Grafik optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat 0,625 mM hingga 30 mM

Optimasi dengan variasi pH menunjukkan hasil optimum pada dapar fosfat pH 7,0 (lihat pada Tabel 4.4). Pada pH ini, enzim memiliki aktivitas paling besar, namun serapan yang dihasilkan tetap dalam rentang 0,2-0,8. Sedangkan pada pH 7,2, serapannya melebihi 1,0 sehingga tidak dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Optimasi waktu inkubasi memberikan hasil optimum pada waktu inkubasi selama 15 menit (lihat pada Tabel 4.5). Pada waktu inkubasi 20 menit, serapan yang dihasilkan terlalu besar (mendekati 0,8), sehingga dipilih waktu inkubasi 15 menit.

4.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Uji aktivitas dilakukan untuk mengetahui aktivitas penghambatan fraksi-fraksi ekstrak herba meniran terhadap α -glukosidase dari berbagai konsentrasi ekstrak dengan melihat nilai persen inhibisi. Selain itu juga untuk mengetahui kekuatan penghambatan fraksi-fraksi tersebut terhadap enzim dengan melihat nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim (Mogale, Lebelo, Thovhogi, de Freitas, & Shai, 2011). Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 1%; 0,5%; 0,25%; dan 0,125%. Untuk pengujian ini digunakan berbagai konsentrasi supaya dapat melihat pengaruh penambahan

Universitas Indonesia

konsentrasi ekstrak terhadap peningkatan aktivitas penghambatan α -glukosidase. Enzim yang digunakan pada pengujian adalah α -glukosidase yang berasal dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* karena relatif lebih murah.

Ekstrak ditimbang \pm 100 mg lalu ditambahkan beberapa tetes DMSO untuk mempermudah kelarutan. Setelah cukup larut, larutan uji dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml. Selanjutnya larutan uji ditambahkan pelarut dapar fosfat (pH 7,0) diperoleh konsentrasi ekstrak 1 % atau 50 ppm. Larutan uji tersebut diencerkan hingga konsentrasi 0,5%; 0,25%; dan 0,125% kemudian dimasukkan ke dalam vial.

Pengamatan aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan nilai absorbansi sampel (S) dengan blanko (B). Larutan sampel (S_1) diinkubasi selama 5 menit bersama dengan dapar fosfat (pH 7,0) dan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 15 mM. Setelah itu, campuran direaksikan dengan α -glukosidase 0,0279 U/mL dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Kemudian, ditambahkan natrium karbonat yang bersifat basa untuk menghentikan reaksi enzimatik. Untuk kontrol sampel (S_0), pengamatan dilakukan dengan kondisi menukar posisi penambahan enzim dan natrium karbonat. Kontrol sampel dilakukan untuk mengetahui apakah ada senyawa lain yang memberikan serapan pada panjang gelombang sekitar 400 nm selain dari p-nitrofenol. Larutan blanko (B_1) adalah larutan uji tanpa sampel dengan perlakuan yang sama dengan larutan uji sampel. Kontrol blanko (B_0) pun perlakuannya sama dengan kontrol sampel yaitu dengan menukar posisi penambahan enzim dan natrium karbonat, hanya saja dilakukan tanpa sampel (Tabel 3.2). Produk yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida diukur serapannya pada panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum sekitar 400 nm.

Sebagai pembanding, digunakan akarbose, di mana senyawa ini telah teruji mampu menghambat aktivitas α -glukosidase. Dipilih pembanding akarbose karena akarbose merupakan obat yang sudah biasa digunakan dalam pengobatan klinis. Selain itu, untuk pengujian penghambatan aktivitas α -glukosidase umumnya digunakan akarbose. Pada saat reaksi enzimatik, akarbose menghambat substrat secara kompetitif. Sisi akarbose yang menempati tapak katalitik enzim adalah daerah ikatan amida (Kimura, et al., 2003). Terbentuknya kompleks enzim-

Universitas Indonesia

akarbose ini menyebabkan substrat tidak dapat berikatan dengan enzim untuk membentuk produk. Penghambatan kompetitif ini terjadi karena akarbose merupakan analog substrat, yaitu memiliki struktur yang mirip dengan substrat.

Akarbose dapat menghambat 13,51% aktivitas enzim dalam membentuk produk p-nitrofenol pada konsentrasi 1 %. Kekuatan penghambatannya berkurang dengan penurunan konsentrasi larutan uji akarbose, yaitu 9,99%; 7,32%; dan 4,47% masing-masing pada konsentrasi ekstrak 0,5%; 0,25%; dan 0,125%. Nilai IC_{50} yang diperoleh adalah 236,02 ppm.

Selain itu, dilihat dari nilai persen inhibisi, IC_{50} , dan hasil pengujian akarbose sebelumnya, akarbose memiliki aktivitas penghambatan yang rendah terhadap enzim α -glukosidase. Hal ini disebabkan karena enzim yang digunakan untuk pengujian berasal dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae*. Aktivitas penghambatan akarbose peka terhadap enzim yang berasal dari usus tikus, tetapi tidak ada aktivitas penghambatan terhadap enzim yang berasal dari khamir dan bakteri (Shinde et al., 2008). Hal ini terlihat juga pada pengujian akarbose pada penelitian sebelumnya dengan menggunakan enzim yang berasal bukan dari usus tikus. Konsentrasi untuk menghambat 50 % aktivitas enzim cukup besar, misalnya $IC_{50} > 1000$ ppm untuk enzim yang berasal dari bakteri atau pun khamir dan 1010 ± 210 ppm untuk enzim yang berasal dari khamir (Schäfer & Högger, 2007; Shinde et al., 2008). Hasil yang serupa juga telah dilaporkan, di mana akarbose tidak memiliki aktivitas penghambatan pada enzim yang berasal dari *S. cerevisiae* dan *B. stearothermophilus* (Kim, Nam, Kurihara, & Kim, 2008). Akarbose menunjukkan aktivitas penghambatan yang berbeda-beda jika menggunakan sumber enzim yang berbeda-beda pula. Untuk itu, sebaiknya digunakan standar yang lain, misalnya 1-deoxynojirimycin yang lebih peka terhadap usus tikus, khamir, maupun bakteri (Shinde et al., 2008).

Pengujian terhadap fraksi-fraksi ekstrak etanol herba meniran menunjukkan aktivitas penghambatan α -glukosidase paling kuat diberikan oleh fraksi metanol dengan nilai IC_{50} 1,67 ppm. Pada pengujian ini, dapat terlihat bahwa efek antidiabetes herba meniran disebabkan karena salah satu kemampuannya dalam menghambat α -glukosidase di usus halus (Ranilla, Kwon, Apostolidis, & Shetty, 2010). Hasil ini menunjukkan bahwa kemampuan

Universitas Indonesia

penghambatan fraksi metanol ekstrak etanol meniran lebih besar dibandingkan ekstrak etanolnya, yaitu 2,32 ppm. Hal tersebut mungkin dikarenakan ekstrak etanol masih berupa ekstrak kasar yang mengandung lebih dari satu senyawa yang dapat menghambat aktivitas α -glukosidase. Penelitian yang dilakukan oleh Shabeer, Srivastava, dan Singh membuktikan bahwa fraksi metanol-air dari tanaman jenis *Phyllanthus* memiliki efek hipoglikemik yang signifikan pada tikus yang dibuat diabetes dengan induksi aloksan (2009).

Fraksi petroleum eter memberikan penghambatan paling lemah dengan nilai IC_{50} 20,57 ppm. Setelah itu berturut-turut fraksi etil asetat dan butanol dengan nilai IC_{50} masing-masing 2,61 ppm dan 1,95 ppm. Dengan demikian, secara berurutan aktivitas penghambatan paling kuat ditunjukkan oleh fraksi metanol, lalu butanol, etil asetat, dan petroleum eter. Hasil ini mungkin dikarenakan senyawa aktif yang menghambat aktivitas α -glukosidase pada herba meniran terlarut pada pelarut polar. Maka dapat disimpulkan fraksi yang digunakan untuk penentuan kinetika enzim adalah fraksi yang memiliki nilai IC_{50} terkecil, yaitu fraksi metanol.

4.6 Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

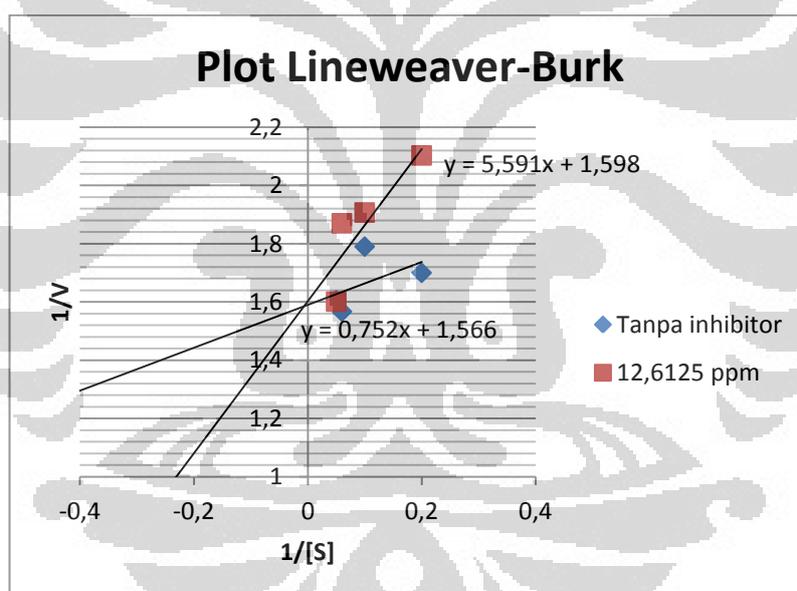
Kinetika enzim dilakukan untuk mengetahui jenis penghambatan yang dilakukan oleh sampel terhadap enzim. Untuk menganalisis kinetika enzim, dapat digunakan plot Lineweaver-Burk, dimana sumbu x adalah satu per konsentrasi substrat ($1/S$) sedangkan sumbu y adalah satu per kecepatan reaksi enzim ($1/V$). Kinetika enzim dapat diketahui dengan melihat aktivitasnya terhadap kenaikan konsentrasi substrat, dimana konsentrasi yang digunakan adalah 5 mM, 10 mM, 15 mM dan 20 mM.

Inhibisi kompetitif klasik terjadi pada tapak pengikatan substrat. Kecepatan pembentukan produk bergantung hanya pada konsentrasi enzim (E)-substrat (S). Jika penghambat (I) berikatan sangat erat dengan enzim, akan hanya ada sedikit enzim bebas yang tersedia untuk berikatan dengan substrat untuk membentuk produk. Apabila penghambat tetap dan ditambahkan lebih banyak substrat, dapat meningkatkan probabilitas bahwa enzim akan lebih banyak berikatan dengan substrat dibandingkan dengan penghambat. Dengan demikian, rasio E-S terhadap

Universitas Indonesia

E-I dan juga kecepatan reaksi akan naik. Pada konsentrasi substrat yang cukup tinggi, konsentrasi E-I seharusnya kecil dan nyaris menghilang sehingga kecepatan reaksi yang dikatalisis akan sama seperti keadaan tanpa adanya penghambat (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Pada inhibisi nonkompetitif, tidak terjadi persaingan antara substrat dan penghambat. Penghambat nonkompetitif reversibel menurunkan kecepatan reaksi maksimal yang diperoleh pada pemberian sejumlah enzim (V_{maks} yang lebih rendah), tetapi biasanya tidak mempengaruhi nilai K_m . Bila substrat mempunyai afinitas yang sama baiknya untuk enzim maupun untuk E-I, hasil yang terlihat akan diperoleh jika $1/V_1$ diplot terhadap $1/[S]$ dalam keadaan dengan atau tanpa inhibitor menghasilkan nilai $1/K_m$ yang sama (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).



Gambar 4.3. Grafik kinetika penghambatan α -glukosidase oleh fraksi metanol ekstrak etanol herba meniran

Dari perpotongan garis di sumbu x, dapat diketahui nilai $-1/K_m$. Berdasarkan nilai ini, persamaan garis untuk pengujian tanpa sampel, diperoleh persamaan $y = 1,566 + 0,752 x$ dengan nilai nilai $-1/K_m$ -2,16. Untuk uji dengan penghambat 12,6125 ppm, diperoleh persamaan $y = 1,598 + 5,591 x$ dengan nilai

$-1/K_m$ nya sebesar $-0,285$. Dari kedua nilai ini, terlihat ada pergeseran nilai $-1/K_m$ ke arah sumbu x positif. Pada inhibisi kompetitif, ada pergeseran nilai $-1/K_m$ ke arah sumbu x positif. Pada inhibisi nonkompetitif tidak terjadi pergeseran ini karena berpotongan di sumbu x.

Nilai $1/V_{maks}$ dapat dilihat dari perpotongan garis di sumbu y. Persamaan garis untuk uji tanpa sampel menghasilkan nilai $1/V_{maks}$ sebesar $0,638$; pada uji dengan konsentrasi sampel $12,6125$ ppm menunjukkan nilai $1/V_{maks}$ $0,625$. Dengan demikian terlihat bahwa pada grafik terjadi sedikit pergeseran nilai $1/V_{maks}$. Pada inhibisi kompetitif tidak terjadi pergeseran $1/V_{maks}$, sedangkan pada inhibisi nonkompetitif ada pergeseran $1/V_{maks}$ ke arah sumbu y positif.

Hasil plot Lineweaver-Burk (Gambar 4.3) memperlihatkan bahwa fraksi metanol ekstrak meniran berpotongan pada sumbu y. Melihat nilai V_{maks} yang berdekatan, dapat dikatakan tidak terjadi pergeseran nilai $1/V_{maks}$ yang signifikan. Oleh karena itu, diduga fraksi metanol ekstrak meniran memiliki mekanisme penghambatan kompetitif. Perbedaan nilai $1/V_{maks}$ ini dikarenakan senyawa yang terkandung dalam fraksi tersebut belum merupakan senyawa murni. Di dalamnya mungkin terdapat beberapa senyawa yang memiliki aktivitas antidiabetes dengan jenis penghambatan yang berbeda. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi metanol tersebut dapat merupakan inhibitor kompetitif atau nonkompetitif dengan mekanisme inhibisi dominan kompetitif.

4.7 Penapisan Fitokimia

Fraksi-fraksi dari ekstrak etanol meniran diidentifikasi untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terkandung pada fraksi tersebut. Beberapa golongan senyawa diketahui memiliki efek hipoglikemik seperti alkaloid, glikosida, terpen, flavonoid, dan lain sebagainya (Ebadi, 2002). Hasil identifikasi golongan senyawa kimia dari semua fraksi dapat dilihat pada tabel 4.13.

Tabel 4.13. Hasil identifikasi kandungan kimia

Kandungan Kimia	Pereaksi Kimia	Ekstrak			
		P. Eter	Etil Asetat	Butanol	Metanol
Alkaloid	Mayer	-	-	-	+
	Bouchardart	-	-	-	+
	Dragendorf	-	-	-	+
Glikosida	Molisch	-	-	-	+
Flavonoid	Serbuk Zn	+	+	+	-
	Serbuk Mg	+	+	+	-
Terpen	Lieberman-Burchard	+	+	+	-
Tanin	FeCl ₃	-	-	-	+
Saponin	Air panas	-	-	-	-

Keterangan: + = terdeteksi; - = tidak terdeteksi

4.7.1 Alkaloid

Senyawa alkaloid umumnya ditemukan dalam bentuk garam yang bersifat larut air di dalam tanaman. Identifikasi alkaloid dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu menggunakan pereaksi Mayer, Dragendorf, dan Bouchardart. Larutan uji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorf akan membentuk senyawa adisi yang tidak larut, sedangkan dengan pereaksi Bouchardart akan membentuk senyawa kompleks bebas (Depkes, 1995b).

Pada Tabel 4.13 dapat terlihat bahwa fraksi yang mengandung alkaloid adalah fraksi metanol. Endapan berwarna yang terbentuk tidak terlalu banyak dan warna coklat dari larutan ekstrak menyebabkan kesulitan dalam menyimpulkan hasil reaksi, sehingga diperlukan pengamatan yang sangat cermat.

4.7.2 Flavonoid

Pada pengujian, ekstrak kental dilarutkan dengan etil asetat untuk menarik senyawa flavonoid yang terkandung di dalam tanaman uji. Kemudian, larutan diuji dengan dua pereaksi yaitu dengan serbuk Zn dan serbuk Mg. Hasil pengujian menunjukkan fraksi petroleum eter, etil asetat dan butanol positif dengan dua pereaksi flavonoid tersebut. Ini berarti flavonoid dapat tersari dalam pelarut

petroleum eter, etil asetat dan butanol. Flavonoid yang terkandung dalam herba meniran adalah jenis flavonol (Isa, Bialangi, & Alio, 2010).

Untuk memastikan kembali keberadaan senyawa golongan flavonoid, dilakukan tambahan pengujian dengan fluoresensi menggunakan pelarut $AlCl_3$. Untuk memperoleh hasil yang lebih baik lagi, diperlukan pemisahan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (Harborne, 1987).

4.7.3 Glikosida

Pengujian glikosida dilakukan dengan terlebih dahulu menghidrolisis senyawa tersebut dengan asam klorida 10 % dan pemanasan. Saat glikosida terhidrolisis, molekul akan terpecah menjadi gugus glikon dan aglikon (Gunawan & Mulyani, 2004). Keduanya terhubung oleh suatu ikatan glikosidik berupa jembatan O, jembatan S, jembatan N, dan jembatan C (Gunawan & Mulyani, 2004; Sirait, 2007). Jembatan antara glikon dan aglikon sangat mudah terurai oleh pengaruh asam, basa, enzim, air, dan panas. Semakin pekat kadar asam atau basa, maupun semakin panas lingkungannya, glikosida akan semakin mudah dan cepat terhidrolisis (Gunawan & Mulyani, 2004).

Dalam bentuk glikosida, senyawa ini larut dalam pelarut polar seperti air, tetapi jika telah terurai menjadi aglikonnya, senyawa tersebut larut dalam pelarut organik nonpolar (Gunawan & Mulyani, 2004). Selanjutnya dilakukan penyarian dengan larutan eter sebanyak tiga kali. Penyarian ini dilakukan untuk mempermudah pengamatan dengan memisahkan pengotor-pengotor yang bersifat nonpolar.

Setelah dilakukan penyarian, diperoleh larutan uji yaitu filtrat HCl untuk uji bagian gula. Filtrat HCl diuapkan dan ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk mengurangi kadar air yang tersisa di dalamnya. Filtrat kering yang didapatkan dilarutkan dengan metanol dan diuapkan kembali. Setelah diuapkan, filtrat dilarutkan dengan aquades dan diuji dengan pereaksi Molisch. Reaksi positif ditandai dengan munculnya cincin ungu di permukaan antara lapisan asam dan lapisan sampel.

Berdasarkan Tabel 4.13 terlihat bahwa fraksi metanol mengandung glikosida. Hasil positif hanya ditemukan pada fraksi yang bersifat polar. Hal ini dikarenakan glikosida umumnya tertarik pada suasana polar.

4.7.4 Tanin

Tanin merupakan senyawa fenol yang dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1987). Larutan FeCl_3 pada pengujian tanin dapat membedakan tanin terhidrolisis (gallotanin) dan tanin terkondensasi (proantosianin). Pada tanin terhidrolisis, larutan akan berubah warna menjadi biru atau biru kehitaman, sedangkan pada tanin terkondensasi berubah menjadi hijau tua. Tabel 4.13 menunjukkan fraksi yang mengandung tanin adalah fraksi metanol karena hasil pengujian memberikan warna hijau-violet yang menandakan adanya kandungan tanin terkondensasi.

4.7.5 Terpen

Sesuai dengan strukturnya, terpenoid pada umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lipid dan berada dalam sitoplasma sel tumbuhan. Ekstraksi senyawa terpenoid dari jaringan tumbuhan biasanya dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut petroleum eter, eter, atau kloroform (Sirait, 2007).

Pada penapisan ini, senyawa terpenoid ditarik dengan menggunakan pelarut eter, yang kemudian diuji dengan reaksi Liebermann-Bouchard. Hasil pengujian pada Tabel 4.13 menunjukkan bahwa fraksi yang mengandung senyawa terpenoid adalah fraksi petroleum eter, etil asetat, dan butanol. Pada pengujian fraksi butanol, sulit untuk menentukan hasil identifikasinya. Hal ini mungkin disebabkan karena kandungan senyawa dalam fraksi tersebut tidak banyak.

4.7.6 Saponin

Golongan senyawa saponin mempunyai beberapa sifat yang dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang metode penapisan yang sederhana. Sifat-sifat tersebut antara lain dapat menghasilkan busa setelah pengocokan yang kuat, kemampuan untuk menghemolisis sel darah merah, dan bersifat racun terhadap ikan (Robinson, 1983). Metode yang paling sederhana, cepat, sedikit

peralatan yang dibutuhkan, dan murah adalah dengan menggunakan indeks buih/busa. Reaksi identifikasi ini akan memberikan lapisan buih setinggi 1 cm atau lebih bila larutan uji ditambah air dan dikocok dalam tabung reaksi selama 10-15 detik dan selanjutnya dibiarkan selama 10 menit sebelum dilakukan pengamatan. Penambahan 1 tetes asam klorida 2N yang tidak menghilangkan buih menunjukkan hasil positif terhadap saponin. Dari hasil penapisan fitokimia, tidak satupun fraksi dari ekstrak etanol meniran yang memberikan hasil positif. Pada pengocokan kuat tidak dihasilkan busa pada semua fraksi.

4.7.7 Antrakuinon

Antrakuinon di alam kemungkinan dalam bentuk bebas, glikosida, atau antron (bentuk tereduksi). Untuk mengidentifikasi antrakuinon, perlu ditambahkan asam sulfat 2N dan dipanaskan terlebih dahulu untuk menghidrolisis antrakuinon yang berada dalam bentuk glikosidanya. Kemudian, larutan uji ditambah wash benzen, dikocok lalu didiamkan. Setelah itu lapisan wash benzen disaring. Hasil positif menunjukkan filtrat berwarna kuning, namun pada pengujian terhadap fraksi-fraksi ekstrak etanol meniran tidak terdapat satu pun filtrat yang berwarna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman meniran tidak mengandung antrakuinon.

4.8 Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi-fraksi ekstrak etanol meniran diuji secara kromatografi lapis tipis (KLT) kualitatif untuk melihat profil kromatogram dari setiap fraksi. Yang diuji adalah kandungan senyawa flavonoid pada fraksi-fraksi yang ada. Dipilih pengujian pada senyawa golongan flavonoid tujuannya untuk memastikan hasil penapisan fitokimia. Dari hasil penapisan, fraksi metanol tidak mengandung flavonoid. Sedangkan pada umumnya flavonoid terlarut dalam pelarut yang bersifat polar.

Tahap pertama dalam pelaksanaan KLT adalah penotolan larutan ekstrak pada lempeng silika gel dan ditunggu hingga cukup kering. Sementara itu, dilakukan penyiapan eluen untuk KLT. Eluen yang sesuai untuk setiap golongan senyawa dimasukkan ke dalam bejana KLT dengan tinggi larutan kurang dari 1

cm. Eluen ini didiamkan beberapa saat untuk menjenuhkan bejana agar pemisahan berlangsung dengan baik. Setelah jenuh, lempeng dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditutup dan dibiarkan hingga eluen terserap sampai kira-kira 0,5 cm di bawah tepi atas lempeng. Hasil pemisahan yang baik akan memperlihatkan adanya bercak yang jelas tanpa adanya ekor. Bercak yang terlihat dihitung nilainya dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak bercak}}{\text{jarak eluen}}$$

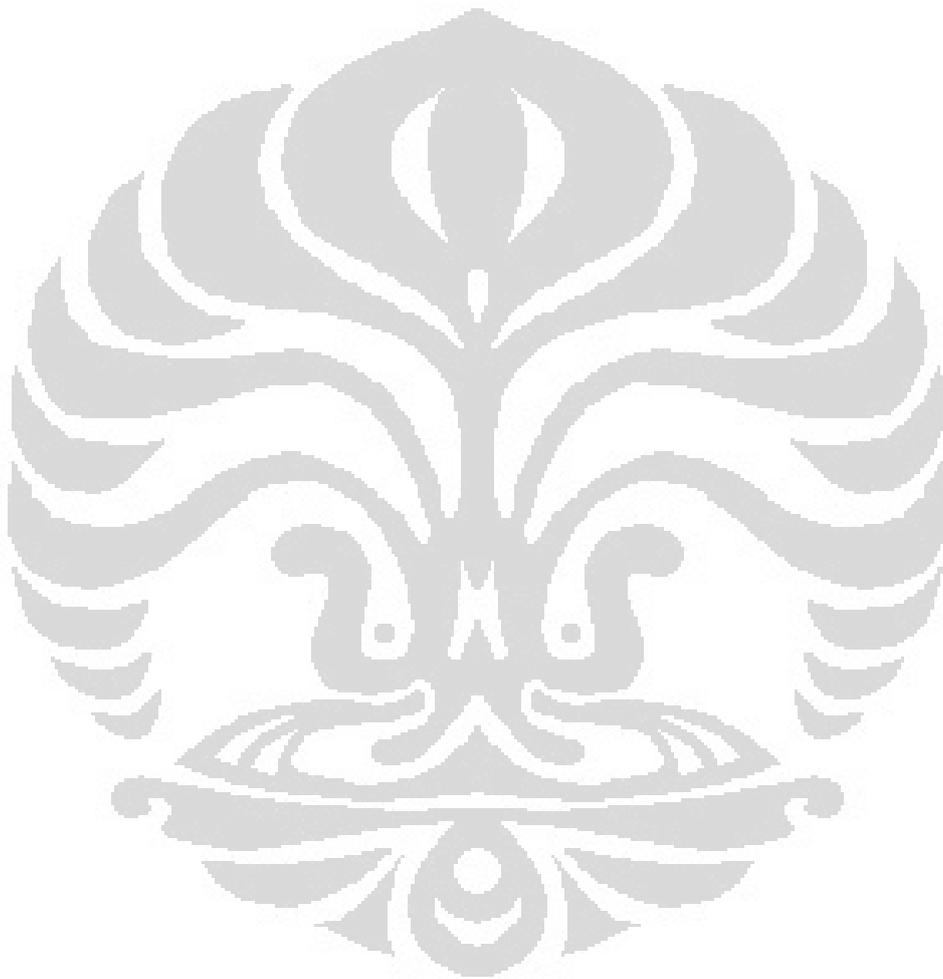
Pada fraksi metanol, pengujian flavonoid dengan KLT menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (7:3) menunjukkan hasil negatif karena tidak terlihat ada bercak pada kromatogram. Setelah penyemprotan dengan larutan penampak noda AlCl_3 juga tidak dapat dilihat adanya bercak yang menandakan fraksi metanol tidak mengandung flavonoid. Hal ini karena flavonoid sudah tersari dalam sebelumnya dan tidak tersari dalam fraksi metanol.

Untuk pengujian fraksi butanol, pada penapisan fitokimia diperoleh hasil positif flavonoid. KLT dilakukan menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (7:3). Bercak terlihat pada kromatogram setelah penyemprotan dengan AlCl_3 , namun tidak terlihat warna kuning seperti hasil positif flavonoid pada umumnya. Fluoresensi yang terlihat adalah warna merah dengan nilai R_f 0,66 dan 0,45.

Hasil penapisan fitokimia pada fraksi etil asetat menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mengandung flavonoid. Dengan KLT menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (7:3), dapat terlihat adanya bercak berwarna merah yang membuktikan adanya flavonoid dengan nilai R_f 0,56 dan 0,43. Warna ini terlihat pada kromatogram di bawah sinar UV 366 nm, baik sebelum disemprot dengan larutan penampak noda AlCl_3 maupun setelah penyemprotan. Hasil positif ini menandakan bahwa flavonoid dapat tersari pada fraksi etil asetat.

Pelaksanaan KLT untuk fraksi petroleum eter dilakukan untuk menguji flavonoid. Dari hasil penapisan, dalam fraksi petroleum eter teridentifikasi adanya flavonoid. Dengan KLT n-heksan:etil asetat (7:3), di bawah sinar UV 366 nm terlihat adanya fluoresensi warna merah pada kromatogram dengan R_f 0,87; 0,8; 0,65; 0,54; 0,4; dan 0,34. Selain itu juga terlihat adanya fluoresensi kuning di

bawah sinar UV 366 nm dengan nilai Rf 0,74; 0,47; dan 0,3 yang menunjukkan hasil positif flavonoid.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Fraksi herba meniran yang memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase paling kuat adalah fraksi metanol dengan nilai IC_{50} 1,67 ppm dengan mekanisme penghambatan kompetitif. Fraksi butanol, fraksi etil asetat, dan fraksi petroleum eter masing-masing memiliki nilai IC_{50} sebesar 1,95 ppm; 2,61 ppm; dan 20,57 ppm. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa fraksi metanol ekstrak etanol herba meniran mengandung glikosida, alkaloid, dan tanin.

5.2. Saran

Sebaiknya digunakan standar lain sebagai penghambat α -glukosidase, seperti *1-deoxinojirimycin* karena senyawa tersebut peka terhadap α -glukosidase yang berasal dari khamir, bakteri, dan usus tikus. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan karakterisasi senyawa aktif yang terdapat pada fraksi-fraksi ekstrak etanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) untuk pengembangan alternatif obat herbal.

DAFTAR ACUAN

- α -Glucosidase (α GLS-SE) from recombinant *E.coli*. August 6, 2011.
http://202.239.155.79/bio/j/rinsyou/images/pdf/27_alpha_glsse.pdf
- ASEAN. (2004). *Standard of ASEAN herbal medicines* (Vol 2). Jakarta: ASEAN Countries, 142-150.
- Backer, C.A. & van den Brink R. C. N. (1965). *Flora of Java* (Vol 1). Groningen NVP Noordhof.
- British Pharmacopoeia Commission. (2008). *British Pharmacopoeia*. London: The Stationery Office, 1.
- Chiasson J.L., Josse R.G., Gomis R., Hanefeld, Karasik A., & Lakso M. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: The STOP NIDDM randomized trial. *Lancet*, 359 (9323): 2072-2077.
- Chisholm-Burns, *et al.* (2008). *Pharmacotherapy principles & practice*. New York: McGraw Hill.
- Choudhary, M.I., *et al.* (2011). Cyclopeptide alkaloids of *Ziziphus oxyphylla* Edgew as novel inhibitor of α -glucosidase enzyme and protein glycation. *Phytochem. Lett.*
- Cihan, A.C., Ozcan, B., Tekin, N., & Cokmus, C. (2010). Characterization of a thermostable α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* F84a. *Formatex*.
- Corwin, E.J. (2008). *Handbook of pathophysiology, 3rd edition*. Ohio: Lippincott Williams & Wilkins, 558-559.
- Davis, Stephen N. (2006). *Goodman & Gilman's the pharmacologic basic of therapeutics* (11th ed.). New York: McGraw Hill.
- Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. (2007). *Farmakologi dan terapi edisi V*. Jakarta : Gaya Baru, 485-494.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1978). *Materia medika Indonesia Jilid II*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 77-82.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia edisi ketiga*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 9, 55.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1985). *Cara pembuatan simplisia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2005). *Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes mellitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 7-26.
- Dewi, R.T., *et al.* (2007). Inhibitory effect of Koji *Aspergillus terreus* on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science*, 18, 3131-3135.
- Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yees, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., & Posey, L.M. (1999). *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic approach* (6th ed.). New York: McGraw-Hill, 1333-1363.
- Ebadi, Manuchair. (2002). *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*. USA: CRC Press LLC.
- Eisenthal, R. & Danson, M.J. (Ed.). (2002). *Enzyme assays* (2nd ed.) *A practical approach*. New York: Oxford University.
- Elfahmi, Ruslan, K., Bos, R., Kayser, O., Woerdenbag, Herman J., Quax, Wim J. *Jamu: The Indonesian traditional herbal medicine* (chapter 2).
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3), 226-276.
- Fried, B. & Sherma, J. (1999). *Thin-layer chromatography fourth edition*. New York: Marcel Dekker, 1-2.
- Gandjar, I.G. & rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar Yogyakarta.
- Gunawan, Didik., & Mulyani, Sri. (2004). *Ilmu obat alam (Farmakognosi Jilid 1)*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Guyton, A. C., & Hall, J.E. (2006). *Textbook of medical physiology* (11th ed). Philadelphia : Elsevier Saunders.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia. Ter. Dari Phytochemical Methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung : Penerbit ITB.

- Hsui-Hui Chan, Han-Dong Sun, Reddy, M.V.B., & Tian-Shung Wu. (2010). Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. major. *Phytochemistry*, 71, 11-12.
- Iizuka, T., Moriyama, H., & Nagai, M. (2006). Vasorelaxant effect of methyl breviolincarboxylate from the leaves of *Phyllanthus niruri*. *Biol. Pharm. Bull*, 29(1), 177-179.
- Isa, E.P., Bialangi, N., & Alio, La. (2010). Ekstraksi dan identifikasi senyawa flavonoid pada tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan metode Kromatografi Lapis Tipis.
- James, E. F. R. (1982). *Martindale : The extra pharmacopoeia 28th edition*. London : The Pharmaceutical Press.
- Jeffery, G.H., Bassett, J., Mendham, J., & Denney, D.C. (1989). *VOGEL'S textbook of quantitative chemical analysis, 5th edition*.: Longman Scientific & Technical.
- Jong-Anurakkun, N., Bhandari, M.R., & Kawabata, J. (2006). A-Glucosidase inhibitors from Devil Tree (*Alstonia scholaris*). *Food Chemistry* 103 (2007), 1319-1323.
- Katzung, B.G. (2006). *Basic and Clinical pharmacology* (10th Ed.). San Fransisco: McGraw Hill.
- Kementrian Kesehatan RI. (2009). *Tahun 2030 prevalensi diabetes melitus di Indonesia mencapai 21,3 juta orang*, Oktober, 18 2011, pkl. 01.21. www.depkes.go.id
- Khare, C. P. (2007). *Indian medicinal plants: An illustrated dictionary*. New Delhi: Springer.
- Kikkoman. *α -Glucosidase (α GLS-SE) from recombinant E.coli*. [http://202.239.155.79/bio/j/rinsyou/images/pdf/27 alpha%20glcse.pdf](http://202.239.155.79/bio/j/rinsyou/images/pdf/27%20alpha%20glcse.pdf)
- Kimura, *et al.* (2003). Two potent competitive inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II. *Elsevier* 339, 1035-1040.
- Kok, Tjie. (1997). *Spektrofotometri UV-Vis: Aplikasi kuantitatif*. Ristal No. 14, 1-6.
- Koolman, J., & Roehm, K.H. (2005). *Color atlas of biochemistry*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 96.

- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011). α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. Haryana: *Pharmacognosy Review*, Vol 5, 19-29.
- K.Y. Kim, K.A. Nam, H. Kurihara, & S.M. Kim. (2007). Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupi elliptica*. *Phytochemistry* 69, 2820-2825.
- Lebovitz, H.E. (1998). Alpha-Glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes. *Diabetes Rev* 6(2), 132-145.
- Linn, William D., Wofford, Marion R., O'keefe, Mary E., & Posey, L. Michael. (2009). *Pharmacotherapy in primary care*. New York: McGraw Hill, 279-290.
- Manaf, Asman. (2010). *Use of acarbose to control postprandial hyperglycemia in reducing macrovascular complication*. Padang: Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
- Marieb, E.N., & Hoehn, K. (2007). *Human anatomy & physiology* (7th Ed.). Pearson Education.
- Masitoh, Siti. (2011). *Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol Beberapa Tanaman Obat Indonesia serta Uji Aktivitas Anti Diabetes Melitus melalui Penghambatan Enzim α -Glukosidase*. Skripsi Farmasi FMIPA UI, 3.
- Meier, J.J. (2009). *The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes*. Elsevier 23, 433-441.
- Melo, E.B., Gomes, A.d.S., & Carvalho, Ivone. (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: Chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62, 10277–10302.
- Ministry of Public Health. (2006). *Type 2 diabetes guidelines*. Beirut: Lebanese Society of Endocrinology Diabetes and Lipids, 3.
- Mogale, M.A., Lebelo, S.L., Thovhogi, N., de Freitas, A.N., & Shai, L.J., (2011). α -Amylase and α -glucosidase inhibitory effects of *Sclerocarya birrea* [(A.Rich) Hochst.] subspecies *caffra* (Sond) Kokwaro (Anacardiaceae) stem-bark extracts. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(66), 15033-15039.

- Molitch, M.E., & Umpierrez, G. (2007). Diabetes and incretin based therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 92(4).
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., & Rodwell, V.W. (2003). *Biokimia Harper* (Andry Hartono, Penerjemah). Jakarta: EGC.
- Murray, R.K., Granner, D.K., & Rodwell, V.W. (2006). *Harper's illustrated biochemistry 27th edition*. New York: McGraw-Hill.
- Naik, A., & Juvekar, A. (2003). Effects of Alkaloid Extract of *Phyllanthus niruri* on HIV Replication. *Indian Journal of Medical Sciences*, 57 (9), 387-393.
- Okoli, C.O., Ibiam, A.F., Ezike, A.C., Akah, P.A., & Okoye, T.C. (2010). Evaluation of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. *African Journal of Biotechnology*. Vol 9 (2), 99, 248-259
- Ranilla, L.G., Kwon, Y.I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Elsevier Ltd*. Vol 101, 4676-4689.
- Robinson, Trevor. (1983). *The organic constituents of higher plants (Their chemistry and interrelationships)*. Amherst : Cordus.
- Ross, I. A. (1999). *Medicinal plants of the world, chemical constituents, traditional and modern medicinal uses*. New Jersey: Humana Press.
- Rudiyanto, W. (2007). Efek ekstrak etanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap organ hati tikus setelah pemberian karbon tetraklorida (CCl₄). [http://arc.ugm.ac.id/files/Abst_\(3750-H-2007\).pdf](http://arc.ugm.ac.id/files/Abst_(3750-H-2007).pdf)
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of natural origin: A Textbook of pharmacognosy* (4th ed.). Swedia: Apotekarsocieten.
- Schäfer, Angelika., & Högger, Petra. (2007). Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabet. Res. Clini. Pract.*, 77, 41-46.
- Schwinghammer, T.L., & Koehler, J.M. (2009). *Pharmacotherapy casebook: A patient-focused approach* (7th ed.). New York: McGraw Hill.

- Shabeer, J., Srivasta, R.S., & Singh, S.K. (2009). Antidiabetik and antioxidant effect of various fractions of *Phyllanthus simplex* in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 124(1), 34-38.
- Shinde, Jayantrao., *et al.* (2008). α -Glucosidase Inhibitory Activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto–Kakizaki (GK) rats.. *Carbohydrate Research* 343, 1278–1281.
- Shoei-Sheng Lee, Hsiao-Ching Lin, & Chien-Kuang Chrn. (2008). Acylated flavonol monorhamnosides, α -glucosidase inhibitors, from *Machilus philippinensis*. *Phytochemistry*, 69, 2347–2353.
- Sigma. (1996). *Enzymatic assay of α -Gucosidase (EC.3.2.1.20)*. Desember 10, 2011. www.sigmaaldrich.com/.../alpha_glucosidase.../alpha_glucosidase_s ed.pdf
- Sio-Hong Lam, Jhong-Min Chen, Chao-Jou Kang, Chung-Hsiung Chen, & Shoei-Sheng Lee. (2008). α -Glucosidase inhibitors from the seeds of *Syagrus romanzoffiana*. *Phytochemistry*, 69, 1173–1178.
- Sirait, M. (2007). *Penuntun fitokimia dalam farmasi*. Bandung : Penerbit ITB.
- Soumyanath, A. (2006). *Traditional medicines for modern times: Antidiabetic plant*. Boca Raton : Taylor & Francis Group.
- Striegel, M.F., & Hill, Jo. (1996). *Thin layer chromatography for binding media analysis*. Los Angeles: The Getty Conservation Institute, 5-7.
- Sugiwati, Sri., Siswati Setiasih, & Efy Afifah. (2009). Antihyperglycemic activity of the mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] leaf extracts as an alpha-glucosidase inhibitor. *Makara Kesehatan* Vol. 13, No. 2, 74-78.
- Taylor, Leslie. (2003). *Technical Data Report for Chanca Piedra*. Austin: Saga Press.
- US Department of Health and Human Services. (2011). *National Diabetes Statistic, 2011*. Oktober 13, 2011, pkl. 21.57 WIB. <http://diabetes.niddk.nih.gov/DM/PUBS/statistics/#Diagnosed20>.
- U.S. Pharmacopeia*. Oktober, 5 2001, pkl. 13.02. http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_ris1s126.html#usp29nf24s0_ris1s277

Vildagliptin 50 mg: Terapi baru diabetes melitus tipe 2. November 29, 2011, pkl. 10.31 WIB.

<http://www.dexa-medica.com/newsandmedia/news/detail.php>.

Voight, R. (1995). *Buku pelajaran teknologi farmasi edisi V*. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, Indonesia.

Wall, P.E. (2005). *Thin layer chromatography, modern practical approach*. Cambridge: Thomas Graham House, 7.

Walker, Roger & Edwards, Clive. (2003). *Clinical pharmacy and therapeutics*. (3rd ed.). London: Churchill Livingstone.

Wells, B.G., DiPiro, J.T., Schwinghammer, T.L., & Hamilton, C.W. (2006). *Pharmacotherapy handbook* (6th ed). New York :McGraw Hill.

WHO. (2011). *Diabetes: Key Facts*. Juli 27, 2011, pkl. 17.13 WIB.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

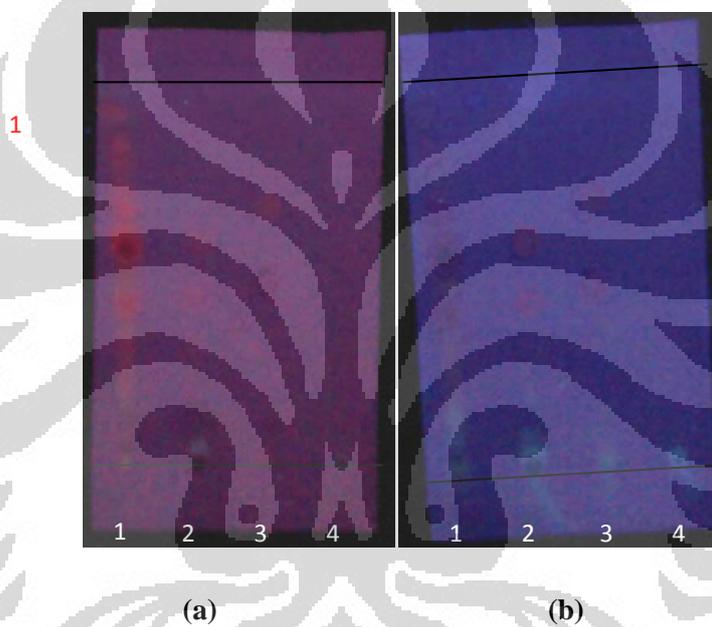
Widayati, Panca. (2008). Efek ekstrak etanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap penurunan kadar asam urat mencit putih jantan galur Balb-C hiperurisemia. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes (Estimates for the year 2000 and projections for 2030). *Diabet. Care*, 27, 1047–1053.

Yarnell, E., Abascal, K., & Rountree, R. *Clinical botanical medicine* (2nd ed.). Mary Ann Liebert.



Gambar 4.1. *Phyllanthus niruri* L.



Gambar 4.4. Kromatogram Flavonoid : (1) fraksi petroleum eter, (2) etil asetat, (3) butanol, dan (4) metanol dengan eluen n-heksan:etil asetat (7:3) sebelum (a) dan setelah (b) disemprot larutan penampak noda AlCl_3

Tabel 4.1. Susut pengeringan herba meniran

Tanaman	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Susut pengeringan (%)
Meniran	3780	1275	66,27

Tabel 4.2. Rendemen ekstrak

Nama simplisia	Bobot simplisia (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen ekstrak (%)
Herba meniran	1000	115,5	11,55

Tabel 4.3. Hasil optimasi unit enzim dengan konsentrasi substrat 15 mM, waktu inkubasi 15 menit, dan pH 7,0

Unit enzim	Uji (U)	Kontrol (K)	Rerata U-rerata K	Aktivitas Enzim	
				U/mL	U/mg
0,0279 U/ml	0,578	0,087	0,501	0,2952	24,60
	0,589	0,077			

Tabel 4.4. Optimasi aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, dan 30 mM (waktu inkubasi 15 menit; pH 7,0)

Konsentrasi Substrat		Absorbansi		Absorbansi Rerata	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2			U/mL	U/mg
30 mM	Uji (U)	0,620	0,632	0,625	0,5075	0,2990	24,92
	Kontrol (K)	0,118	0,119	0,118			
20 mM	Uji (U)	0,645	0,647	0,646	0,5770	0,3400	28,33
	Kontrol (K)	0,071	0,067	0,069			
15 mM	Uji (U)	0,720	0,685	0,702	0,6515	0,3839	31,99
	Kontrol (K)	0,044	0,058	0,051			
10 mM	Uji (U)	0,578	0,589	0,583	0,515	0,3034	25,29
	Kontrol (K)	0,077	0,060	0,068			
5 mM	Uji (U)	0,519	0,496	0,507	0,481	0,2834	23,62
	Kontrol (K)	0,024	0,029	0,026			
2,5 mM	Uji (U)	0,448	0,422	0,435	0,4185	0,2466	20,55
	Kontrol (K)	0,016	0,017	0,016			
1,25 mM	Uji (U)	0,307	0,322	0,314	0,2900	0,1709	14,24
	Kontrol (K)	0,029	0,020	0,024			
0,625 mM	Uji (U)	0,249	0,242	0,245	0,2345	0,1381	11,51
	Kontrol (K)	0,013	0,009	0,011			

Tabel 4.5. Optimasi aktivitas enzim dengan pH dapar fosfat 6,8, 7,0, dan 7,2 (waktu inkubasi 15 menit; konsentrasi substrat 15 mM)

pH dapar fosfat		Absorbansi (A)		Absorbansi	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2	Rerata		U/mL	U/mg
6,8	Uji (U)	0,438	0,471	0,454	0,3935	0,2318	19,31
	Kontrol (K)	0,061	0,061	0,061			
7,0	Uji (U)	0,578	0,589	0,583	0,5015	0,2955	24,625
	Kontrol (K)	0,087	0,077	0,082			
7,2	Uji (U)	1,114	1,150	1,132	1,0795	0,6361	53,014
	Kontrol (K)	0,057	0,048	0,052			

Tabel 4.6. Optimasi aktivitas enzim dengan waktu inkubasi 15, 20, dan 30 menit (konsentrasi substrat 15 mM; pH 7,0)

Waktu inkubasi		Absorbansi (A)		Absorbansi	U-K	Aktivitas Enzim	
		A1	A2	Rerata		U/mL	U/mg
15 menit	Uji (U)	0,578	0,589	0,583	0,5015	0,2955	24,625
	Kontrol (K)	0,087	0,077	0,082			
20 menit	Uji (U)	0,792	0,784	0,788	0,771	0,3407	28,39
	Kontrol (K)	0,019	0,015	0,017			
30 menit	Uji (U)	1,346	1,177	1,261	1,239	0,3650	30,42
	Kontrol (K)	0,026	0,019	0,022			

Tabel 4.7. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada akarbose sebagai pembanding (konsentrasi substrat 15 mM; waktu inkubasi 15 menit; pH 7,0)

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2	Rerata			
1% (50,25 ppm)	S1	0,543	0,527	0,535	0,4545	13,51	236,02
	S0	0,083	0,078	0,0815			
0,50% (25,125 ppm)	S1	0,534	0,562	0,548	0,473	9,99	
	S0	0,073	0,077	0,075			
0,25% (12,5625 ppm)	S1	0,575	0,545	0,560	0,487	7,32	
	S0	0,077	0,069	0,073			
0,125% (6,2812 ppm)	S1	0,580	0,584	0,582	0,502	4,47	
	S0	0,083	0,077	0,080			

Persamaan regresi $y = 4,2817 + 0,1937 x$

Tabel 4.8. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi petroleum eter

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi Rerata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2				
1% (50,45 ppm)	S1	0,388	0,325	0,356	0,0525	89,96	20,57
	S0	0,304		0,304			
0,50% (25,225 ppm)	S1	0,379	0,372	0,375	0,1955	62,61	
	S0	0,180		0,180			
0,25% (12,6125 ppm)	S1	0,463	0,414	0,438	0,3045	41,77	
	S0	0,126	0,142	0,134			
0,125% (6,3062 ppm)	S1	0,529	0,520	0,524	0,4055	22,46	
	S0	0,099	0,139	0,119			

Persamaan regresi $y = 19,88 + 1,46 x$

Tabel 4.9. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi etil asetat

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi Rerata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2				
1% (50,25 ppm)	S1	0,502	0,519	0,510	0,097	81,45	2,61
	S0	0,487		0,487			
0,50% (25,125 ppm)	S1	0,437	0,426	0,431	0,166	68,26	
	S0	0,265		0,265			
0,25% (12,5625 ppm)	S1	0,358	0,377	0,367	0,219	58,12	
	S0	0,148		0,148			
0,125% (6,2812 ppm)	S1	0,371	0,377	0,374	0,262	49,90	
	S0	0,112		0,112			

Persamaan regresi $y = 48,22 + 0,68 x$

Tabel 4.10. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi butanol

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi Rerata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2				
1% (50,3 ppm)	S1	0,379	0,388	0,3835	0,1015	80,59	1,95
	S0	0,282		0,282			
0,50% (25,15 ppm)	S1	0,360	0,368	0,364	0,177	66,15	
	S0	0,187		0,187			
0,25% (12,575 ppm)	S1	0,319	0,315	0,317	0,211	59,65	
	S0	0,106		0,106			
0,125% (6,2875 ppm)	S1	0,395	0,334	0,364	0,262	49,90	
	S0	0,102		0,102			

Persamaan regresi $y = 48,75 + 0,65 x$

Tabel 4.11. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi metanol

Konsentrasi		Absorbansi		Absorbansi Rerata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
		A1	A2				
1% (50,45 ppm)	S1	0,548	0,507	0,5275	0,359	31,36	1,67
	S0	0,173	0,164	0,1685			
0,50% (25,225 ppm)	S1	0,640	0,624	0,632	0,3795	3,44	
	S0	0,100	0,154	0,127			
0,25% (12,6125 ppm)	S1	0,599	0,647	0,623	0,5105	2,39	
	S0	0,088	0,137	0,1125			
0,125% (6,3062 ppm)	S1	0,643	0,643	0,643	0,500	4,39	
	S0	0,143	0,143	0,143			

Persamaan regresi $y = -4,97 + 32,79 x$

Tabel 4.12. Hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak dengan konsentrasi 0,25% dan 0,5%

Konsentrasi Substrat	Serapan			1/[S]	1/V0	1/V1	1/V2
	V0	V1	V2				
5 Mm	0,588	0,475	0,453	0,2	1,700	2,103	2,203
10 Mm	0,558	0,507	0,450	0,1	1,790	1,907	2,207
15 Mm	0,638	0,534	0,507	0,06	1,567	1,870	1,970
20 Mm	0,622	0,624	0,602	0,05	1,606	1,601	1,661

Keterangan : V0 = tanpa inhibitor; V1 = inhibitor 12,6125 ppm; V2 = inhibitor 25,22 ppm

Tabel 4.13. Hasil identifikasi kandungan kimia

Kandungan Kimia	Pereaksi Kimia	Ekstrak			
		P. Eter	Etil Asetat	Butanol	Metanol
Alkaloid	Mayer	-	-	-	+
	Bouchardart	-	-	-	+
	Dragendorf	-	-	-	+
Glikosida	Molisch	-	-	-	+
Flavonoid	Serbuk Zn	+	+	+	-
	Serbuk Mg	+	+	+	-
Terpen	Lieberman-Burchard	+	+	+	-
Tanin	FeCl ₃	-	-	-	+
Saponin	Air panas	-	-	-	-
Antrakuinon	Benzen-NaOH	-	-	-	-

Tabel 4.14. Pengaruh penambahan substrat terhadap penghambatan aktivitas α -glukosidase tanpa adanya penghambat

Konsentrasi	S1-S0 (V)	1/[Substrat]	1/V	K _M
5 mM	0,588	0,2	1,700	0,463
10 mM	0,558	0,1	1,790	
15 mM	0,638	0,06	1,567	
20 mM	0,622	0,05	1,606	

Persamaan regresi $y = 1,566 + 0,752 x$

Tabel 4.15. Pengaruh penambahan substrat terhadap penghambatan aktivitas α -glukosidase pada konsentrasi ekstrak 12,6125 ppm

Konsentrasi	S1-S0 (V)	1/[Substrat]	1/V	K _M
5 mM	0,475	0,2	2,103	3,499
10 mM	0,507	0,1	1,907	
15 mM	0,534	0,06	1,870	
20 mM	0,624	0,05	1,601	

Persamaan regresi $y = 1,598 + 5,591 x$

Tabel 4.16. Pengaruh penambahan substrat terhadap penghambatan aktivitas α -glukosidase pada konsentrasi ekstrak 25,22 ppm

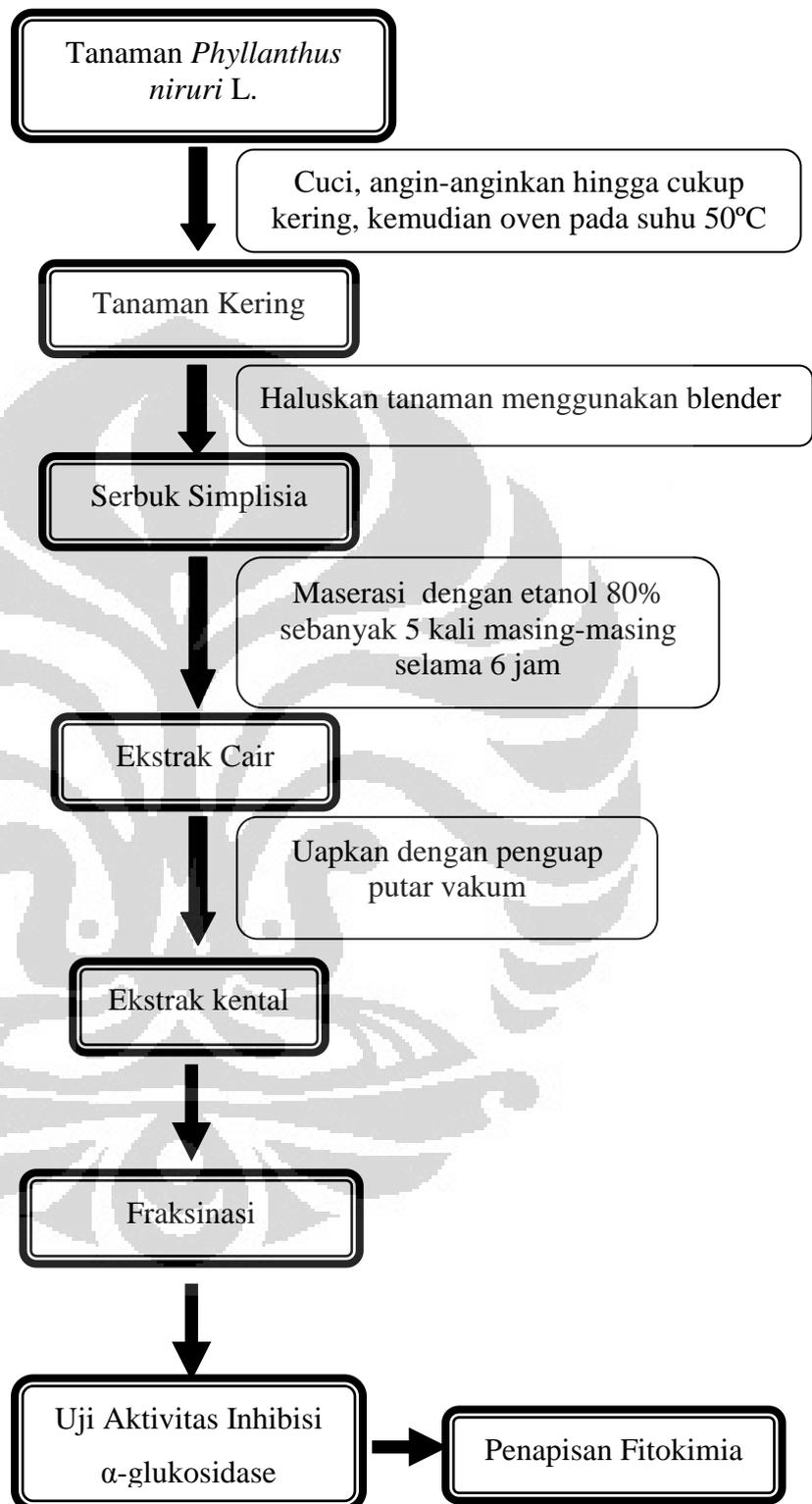
Konsentrasi	S1-S0 (V)	1/[Substrat]	1/V	K _M
5 mM	0,453	0,2	2,203	1,575
10 mM	0,450	0,1	2,207	
15 mM	0,507	0,06	1,970	
20 mM	0,602	0,05	1,661	

Persamaan regresi $y = 1,731 + 2,724 x$

Tabel 4.17. Nilai Rf hasil kromatografi lapis tipis terhadap senyawa flavonoid pada fraksi petroleum eter, etil asetat, dan butanol ekstrak etanol meniran

Fraksi	Warna bercak	Jarak yang ditempuh zat (cm)	Jarak yang ditempuh eluen (cm)	Nilai Rf
Petroleum eter	Merah	4,8	5,5	0,87
	Merah	4,4	5,5	0,8
	Kuning	4,1	5,5	0,74
	Merah	3,6	5,5	0,65
	Merah	3	5,5	0,54
	Kuning	2,6	5,5	0,47
	Merah	2,2	5,5	0,4
	Merah	1,9	5,5	0,34
Etil asetat	Kuning	1,65	5,5	0,3
	Merah	3,1	5,5	0,56
Butanol	Merah	2,4	5,5	0,43
	Merah	3,65	5,5	0,66
	Merah	3,1	5,5	0,45

Lampiran 1. Skema Kerja



Lampiran 2. Perhitungan unit larutan enzim

Label yang terdapat pada kemasan α -glukosidase adalah 16,5 mg; 26 % protein; 179 Unit/mg protein.

$$\text{Jumlah protein} = \frac{26}{100} \times 16,5 \text{ mg serbuk} = 4,29 \text{ mg protein}$$

Dari penelitian sebelumnya, diketahui unit enzim untuk pengujian harus kurang dari 0,05 U/mL agar serapannya berada dalam rentang 0,2-0,8. Selanjutnya dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan unit enzim yang akan digunakan. Dari hasil uji pendahuluan diperoleh unit enzim 0,0279 unit/mL dan unit enzim untuk larutan induk 55,848 unit, maka dapat dihitung jumlah enzim yang ditimbang adalah:

$$\text{Jumlah protein dalam 55,848 unit} = \frac{4,29 \text{ mg}}{179 \text{ Unit/mg}} \times 55,848 \text{ unit} = 0,312 \text{ mg}$$

$$\text{Jumlah yang ditimbang} = \frac{0,312 \text{ mg}}{0,26} = 1,2 \text{ mg serbuk}$$

1,2 mg α -glukosidase dilarutkan dalam 100 ml dapar fosfat berbagai pH (6,8; 7,0; dan 7,2) sehingga menjadi 0,5584 unit/mL.

Pengenceran larutan α -glukosidase

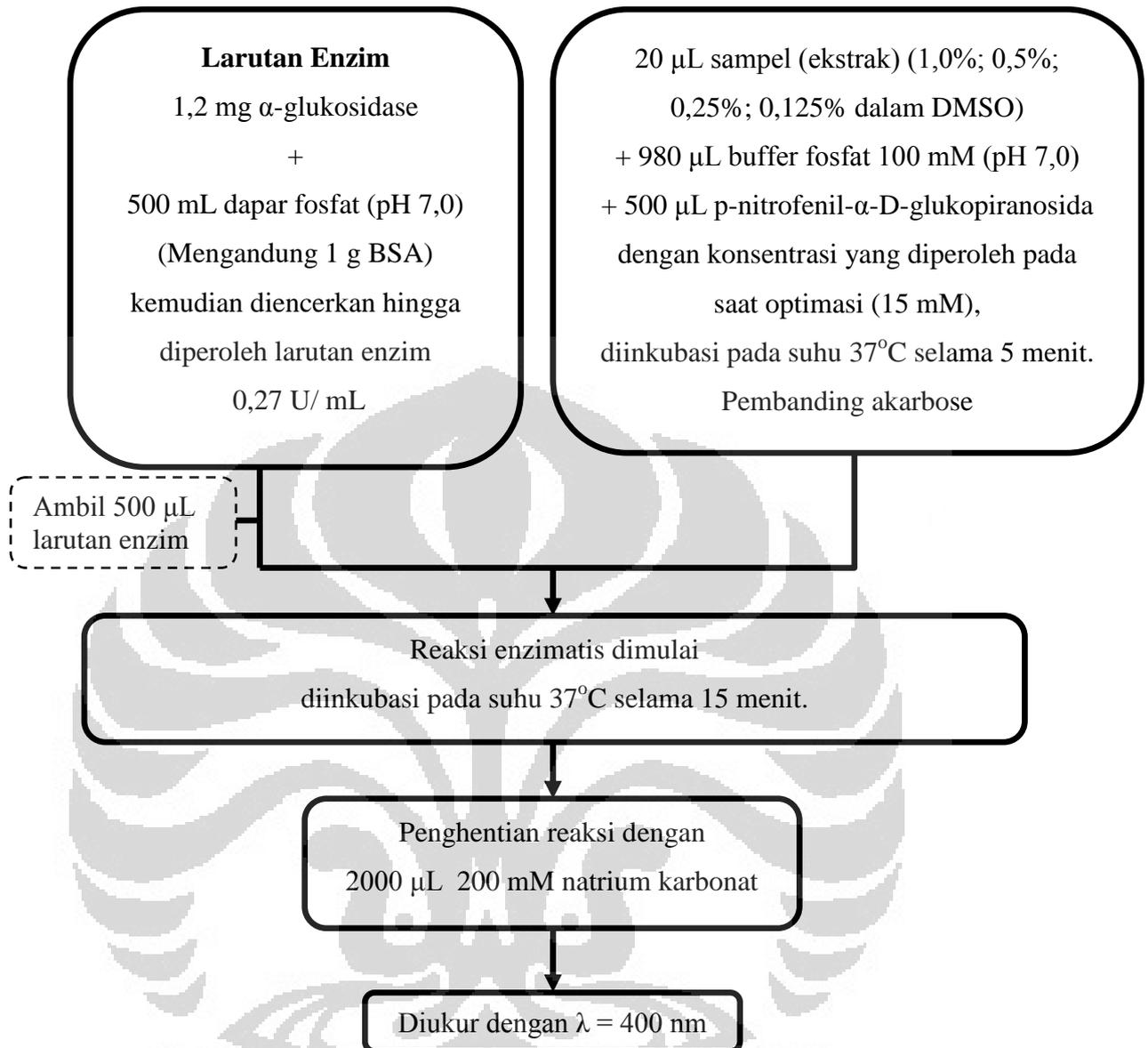
Pengenceran pertama, diambil 5,0 ml larutan enzim dan dilarutkan dengan dapar fosfat berbagai pH (6,8; 7,0; dan 7,2) hingga volume 10,0 ml.

$$\frac{5,0 \text{ ml}}{10,0 \text{ ml}} \times 0,5584 \text{ unit/ml} = 0,2792 \text{ unit/ml}$$

Pengenceran kedua, Diukur dengan $\lambda=400 \text{ nm}$ n dilarutkan dengan dapar fosfat berbagai pH (6,8; 7,0; dan 7,2) hingga volume 10,0 ml.

$$\frac{5,0 \text{ ml}}{10,0 \text{ ml}} \times 0,2792 \text{ unit/ml} = 0,0279 \text{ unit/ml (unit enzim yang digunakan untuk uji aktivitas penghambatan } \alpha\text{-glukosidase)}$$

Lampiran 3. Skema uji aktivitas penghambatan α -glukosidase



Lampiran 4. Penguap putar vakum



Lampiran 5. Spektrofotometer UV-Vis



Lampiran 6. Timbangan analitik



Lampiran 7. *Magnetic stirrer*



Lampiran 8. Lampu UV



Lampiran 9. Surat determinasi tanaman



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 (Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
 (Research Center for Biology)
 Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, Juli 2011

Nomor : /IPH.1.02/If.8/VII/2011
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Silvi Khairunnisa
 NPM : 0706264980
 Mhs. Univ. Indonesia
 Fak. MIPA
 Kampus UI Depok
 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Meniran	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Euphorbiaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.


 Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
 Dr. Joeni Setiyo Rahajoe
 NIP. 196706241993032004



Page 1 of 1

D:\Ident 2011\Silvi Khairunnisa.doc\JJA-DG

Lampiran 10. Sertifikat analisis α -glukosidase

Certificate of Analysis

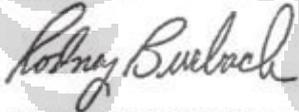
SIGMA-ALDRICH

Product Name	α -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder, ≥ 125 units/mg protein	
Product Number	G0660	
Product Brand	SIGMA	
CAS Number	9001-42-7	

TEST	SPECIFICATION	LOT 129K1426 RESULTS
% Protein (Biuret)	≥ 10	26
units/mg protein	≥ 125	179
units/mg protein	One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.8 at 37 deg C.	114
	≥ 50	
	One unit will convert 1.0 micromole of Maltose to 2.0 micromoles of D-Glucose per minute at pH 6.0 at 25 deg C.	

Recommended Retest Period _____
4 years

Specification Date:	APR 2009
Date of QC Release:	JAN 2010
Recommended Retest Date:	DEC 2013
Print Date:	JAN 25 2010



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

1/2