



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN FITOKIMIA DAN UJI PENGHAMBATAN
AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE DARI FRAKSI PALING AKTIF
EKSTRAK METANOL HERBA MENIRAN
(*Phyllanthus niruri* L.)**

SKRIPSI

**APRILYA TRI SUSANTI
0806453503**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN FITOKIMIA DAN UJI PENGHAMBATAN
AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE DARI FRAKSI PALING
AKTIF EKSTRAK METANOL HERBA MENIRAN
(*Phyllanthus niruri* L.)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

**APRILYA TRI SUSANTI
0806453503**

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

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, Juli 2012



Aprilya Tri Susanti

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Aprilya Tri Susanti
NPM : 0806453503
Tanda Tangan : 
Tanggal : Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Aprilya Tri Susanti
NPM : 0806453503
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Penapisan Fitokimia dan Uji Penghambatan
Aktivitas α -Glukosidase dari Fraksi Paling Aktif
Ekstrak Metanol Herba Meniran (*Phyllanthus*
niruri L.)

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. Abdul Mun'im, M.S., Apt. ()

Pembimbing II : Dr. Arry Yanuar, M.Si. ()

Penguji I : Dr. Berna Elya, M.S., Apt. ()

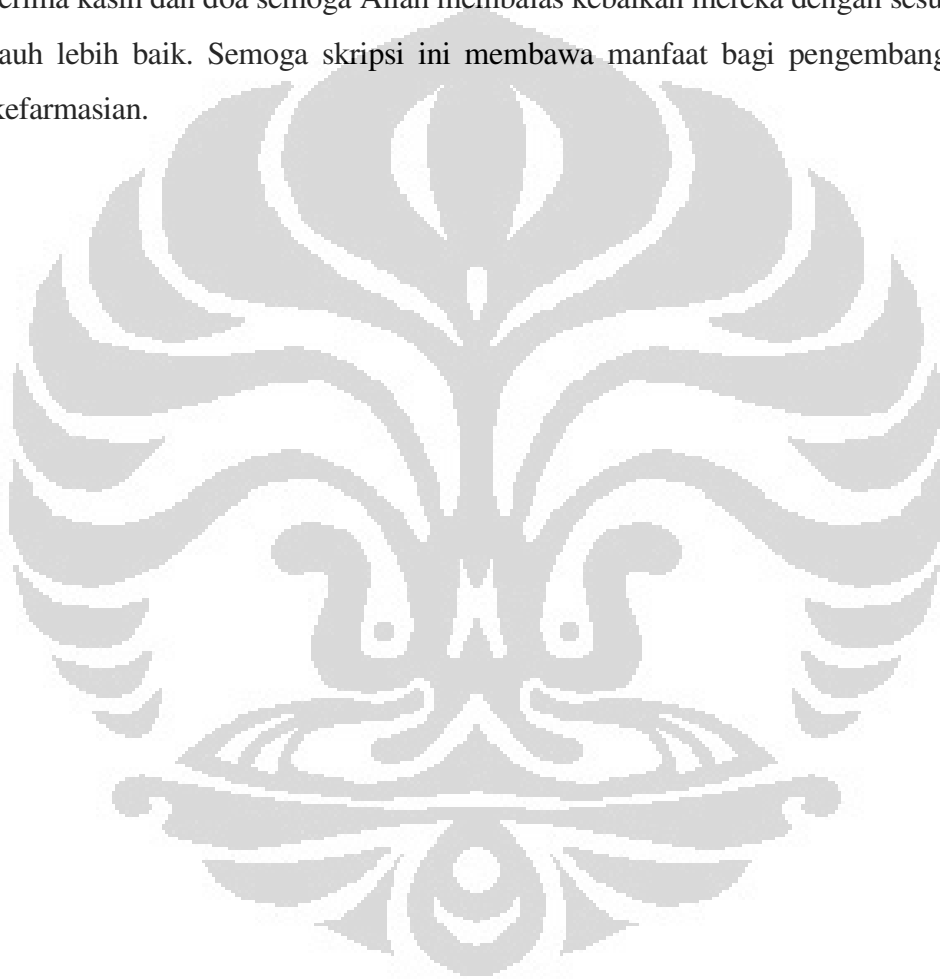
Penguji II : Drs. Hayun, M.Si. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 2 Juli 2012

penelitian ini, Elsa, Nita, Indah, Devin, Mamik, Rahmi, Mei, SUJA ‘Huhahuha’, dan juga keluarga besar Farmasi 2008 atas kebersamaan dan dukungan selama penelitian ini;

- (8) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Tak ada sesuatu yang lebih berharga yang dapat diberikan penulis selain ucapan terima kasih dan doa semoga Allah membalas kebaikan mereka dengan sesuatu yang jauh lebih baik. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu kefarmasian.



Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Aprilya Tri Susanti
NPM : 0806453503
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 :
Penapisan Fitokimia dan Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase dari Fraksi Paling Aktif Ekstrak Metanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

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 : Juli 2012
Yang menyatakan



(Aprilya Tri Susanti)

ABSTRAK

Nama : Aprilya Tri Susanti
Program Studi : Farmasi
Judul : Penapisan Fitokimia dan Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase dari Fraksi Paling Aktif Ekstrak Metanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Diabetes melitus dianggap sebagai suatu masalah kesehatan yang serius. Komplikasi diabetes melitus seperti komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular, sering menimbulkan kecacatan dan kematian. Inhibitor α -glukosidase dapat digunakan sebagai terapi diabetes melitus karena memiliki potensi untuk menormalkan kadar gula darah. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase yang kuat dengan $IC_{50} = 2,32 \mu\text{g/mL}$. Penelitian lainnya menunjukkan bahwa fraksi metanol dari ekstrak etanol herba meniran merupakan fraksi paling aktif ($IC_{50} = 1,67 \mu\text{g/mL}$). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi-fraksi dari ekstrak metanol herba meniran dan golongan senyawa dari fraksi paling aktif. Serbuk herba meniran direfluks berturut-turut dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol. Ekstrak metanol dikromatografi menggunakan fase diam Sephadex LH-20 dan metanol 50% sebagai eluennya. Enam fraksi terpilih diuji penghambatan aktivitas α -glukosidase. Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan microplate reader. Nilai IC_{50} dari fraksi paling aktif adalah $18,82 \mu\text{g/mL}$. Fraksi ini memiliki jenis penghambatan nonkompetitif. Penapisan fitokimia menunjukkan bahwa fraksi paling aktif mengandung flavonoid dan glikosida.

Kata kunci : diabetes melitus, inhibitor α -glukosidase, herba meniran, penapisan fitokimia
xiv+76 halaman; 21 gambar; 19 tabel; 8 lampiran
Daftar Pustaka : 54 (1965-2012)

ABSTRACT

Name : Aprilya Tri Susanti
Program Study : Pharmacy
Title : Phytochemical Screening and Inhibitory Assay on Alpha-Glucosidase by The Most Active Fraction of Methanolic Extract of Phyllanthus niruri L. Herb

Diabetes mellitus is recognized as a serious global health problem. The complications of diabetes mellitus such as microvascular and macrovascular complications, often resulting in morbidity and mortality. α -Glucosidase inhibitors have been used as therapy of diabetes mellitus because of the potential to normalize blood-glucose level. The previous study showed the ethanolic extract of Phyllanthus niruri herb had a potent α -glucosidase inhibitory activity with $IC_{50}=2.32 \mu\text{g/mL}$. The other study showed the methanolic fraction from ethanolic extract of Phyllanthus niruri herb as the most active fraction ($IC_{50}= 1.67 \mu\text{g/mL}$). This research aims to know α -glucosidase inhibitory activity from fractions of methanolic extract of Phyllanthus niruri herb and the class compounds from the most active fraction. The powder of Phyllanthus niruri herb was refluxed by n-hexane, ethyl acetate, and methanol, successively. The methanolic extract was chromatographed by Sephadex LH-20 as stationery phase and 50% methanol as mobile phase. Selected six fractions were assayed for α -glucosidase inhibition activity. The α -glucosidase inhibition assay was performed by spectrophotometric method with microplate reader. The IC_{50} value of the most active fraction was $18.82 \mu\text{g/mL}$. This fraction had a noncompetitive inhibitory activity. Phytochemical screening showed the most active fraction contained flavonoid and glycoside.

Key Words : diabetes mellitus, α -glucosidase inhibitor, Phyllanthus niruri, phytochemical screening.
xiv+76 pages ; 21 pictures; 19 tables; 8 appendixes
Bibliography : 54 (1965-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Phyllanthus niruri L. (Meniran)	4
2.2 Diabetes Mellitus.....	6
2.3 Enzim	9
2.4 Metode Pemisahan	17
2.5 Mikroplat	22
2.6 Penapisan Fitokimia.....	24
3. METODE PENELITIAN	28
3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian	28
3.2 Alat.....	29
3.3 ProsedurPelaksanaan.....	29
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1 Penyiapan Bahan Uji.....	40
4.2 Ekstraksi Simplisia	40
4.3 Fraksinasi Ekstrak	41
4.4 Uji Pendahuluan	43
4.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	44
4.6 Uji Kinetika PenghambatanAktivitas α -Glukosidase	47
4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia	49
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR ACUAN	51

DAFTAR GAMBAR

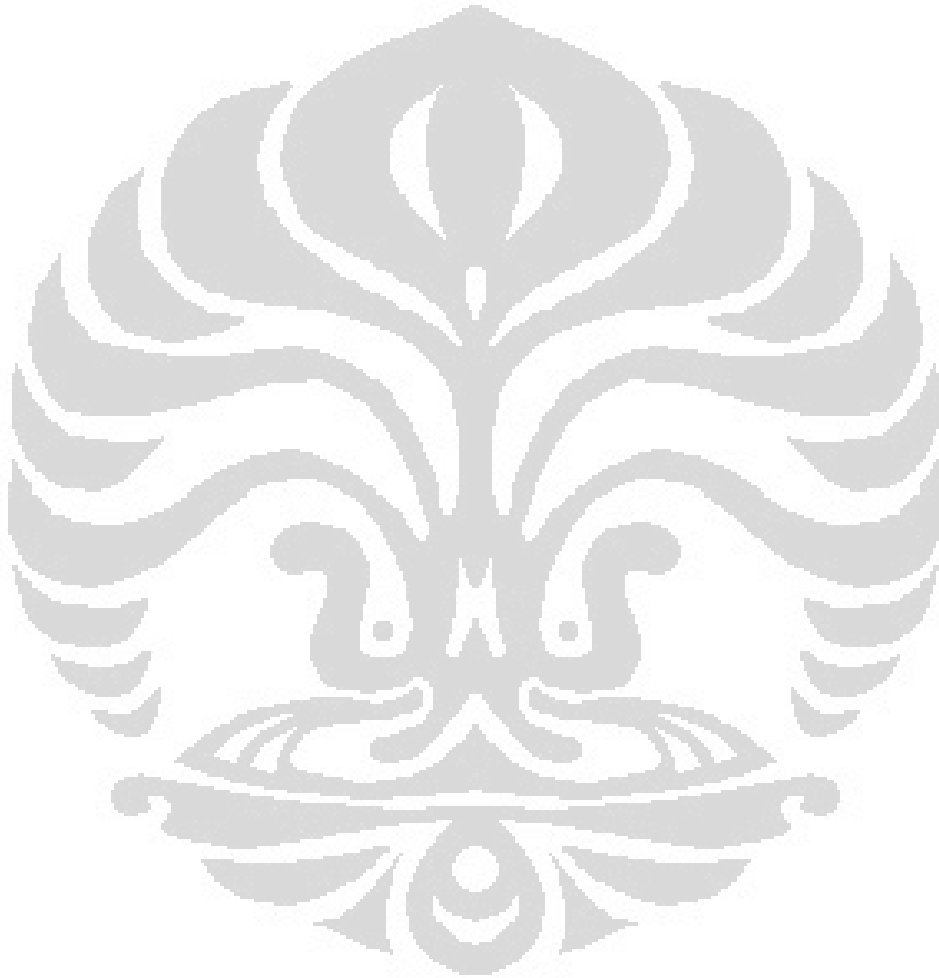
Gambar 2.1.	Struktur filantin dan hipofilantin.....	5
Gambar 2.2.	Struktur kimia akarbose.....	11
Gambar 2.3.	Mekanisme inhibisi kompetitif	12
Gambar 2.4.	Mekanisme inhibisi nonkompetitif	13
Gambar 2.5.	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi yang dikatalisis oleh enzim	13
Gambar 2.6.	Plot resiprokal ganda atau Lineweaver-Burk	15
Gambar 2.7.	Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi kompetitif.....	15
Gambar 2.8.	Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi nonkompetitif.....	16
Gambar 2.9.	Reaksi enzimatis α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida	16
Gambar 2.10.	Prinsip spektroskopi UV-Vis.....	23
Gambar 2.11.	Variabel ketebalan cairan sampel dalam microplate (A) dibandingkan dengan ketebalan cairan sampel dalam kuvet (B) ...	24
Gambar 4.1.	Tanaman meniran (<i>Phyllanthus niruri</i> L.).....	40
Gambar 4.2.	Grafik optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat.....	43
Gambar 4.3.	Grafik optimasi aktivitas enzim dengan beberapa waktu inkubasi ..	44
Gambar 4.4.	Grafik penghambatan aktivitas α -glukosidase dari ekstrak herba meniran dan akarbose	46
Gambar 4.5.	Grafik penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi dari ekstrak metanol herba meniran	47
Gambar 4.6.	Grafik uji kinetika penghambatan aktivitas α -glukosidase fraksi B	48
Gambar 4.7.	Kromatogram flavonoid fraksi B (1) dan standar <i>Gendarussa</i> Folium (2) dengan eluen butanol: asam asetat: air (4:1:5), saat sebelum (a) dan sesudah (b) disemprot larutan penampak noda $AlCl_3$ 5% di bawah sinar UV 366 nm	55
Gambar 4.8.	Identifikasi flavonoid fraksi B (a) dan standar <i>Orthosiphonis</i> Folium (b) dengan pereaksi serbuk seng.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Penambahan reagen uji pada optimasi	31
Tabel 3.2. Prosedur uji penghambatan aktivitas α -glukosidase	35
Tabel 3.3. Prosedur penentuan kinetika penghambatan enzim	36
Tabel 4.1. Rendemen ekstrak herba meniran	56
Tabel 4.2. Rendemen fraksi dari ekstrak metanol herba meniran.....	56
Tabel 4.3. Optimasi aktivitas enzim dengan beberapa konsentrasi substrat	57
Tabel 4.4. Optimasi aktivitas enzim dengan beberapa waktu inkubasi	57
Tabel 4.5. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada akardose	58
Tabel 4.6. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak etil asetat.....	59
Tabel 4.7. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak metanol	60
Tabel 4.8. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak n-heksana.....	61
Tabel 4.9. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi B.....	62
Tabel 4.10. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi C.....	63
Tabel 4.11. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi D.....	64
Tabel 4.12. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi E.....	65
Tabel 4.13. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi F.....	66
Tabel 4.14. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi M.....	67
Tabel 4.15. Hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim pada fraksi B	67
Tabel 4.16. Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten fraksi B 25,0 μ g/mL.....	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram alir penelitian	69
Lampiran 2. Skema ekstraksi	70
Lampiran 3. Skema fraksinasi.....	71
Lampiran 4. Skema uji penghambatan aktivitas α -glukosidase.....	72
Lampiran 5. Cara perhitungan unit larutan α -glukosidase	73
Lampiran 6. Surat determinasi tanaman	74
Lampiran 7. Sertifikat analisis α -glukosidase.....	75
Lampiran 8. Sertifikat analisis PNPG	76



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya (Dipiro, Talbert, Yees, Matzke, Wells, & Posey, 2005). Diabetes yang tidak terkontrol dengan baik dapat menimbulkan komplikasi akut dan kronis. Komplikasi yang sering terjadi antara lain, hipoglikemia, hiperglikemia, komplikasi makrovaskular (jantung koroner, penyakit pembuluh darah otak, dan penyakit pembuluh darah perifer) dan komplikasi mikrovaskular (Dirjen Binar Depkes RI, 2005).

International Diabetes Federation (2011) menyebutkan bahwa jumlah penderita diabetes diperkirakan akan meningkat dari 366 juta pada 2011 menjadi 552 juta pada 2030, jika tidak segera diatasi. Ini setara dengan sekitar tiga kasus baru setiap sepuluh detik atau hampir sepuluh juta per tahun. IDF juga memperkirakan bahwa sebanyak 183 juta orang tidak menyadari bahwa mereka mengidap diabetes. Indonesia yang diketahui sebagai salah satu negara dengan prevalensi diabetes melitus tinggi, menempati urutan keempat sebagai negara dengan penderita diabetes terbesar setelah Amerika Serikat, China, dan India (Dimiyati, 2011).

Dari beberapa tipe diabetes, DM tipe 2 merupakan tipe diabetes dengan kasus terbanyak yaitu sekitar 90% dari penderita diabetes (Williams dan Pickup, 2004). Penanganan DM melalui pemberian obat hipoglikemik oral (Dirjen Binar Depkes RI, 2005). Target terapi DM adalah menormalkan kadar glukosa darah secara konsisten sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya komplikasi (Chisholm-Burns, et al.,2008).

Salah satu golongan obat hipoglikemik oral adalah golongan penghambat α -glukosidase (akarbose dan miglitol). Obat golongan ini bekerja secara kompetitif menghambat kerja maltase, isomaltase, sukrase, dan glukoamilase sehingga dapat menunda penguraian sukrosa dan karbohidrat kompleks di usus

halus. Efek utama yang timbul akibat aksi ini ialah dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa darah postprandial (Dipiro, et al., 2005).

Efek samping utama obat golongan penghambat α -glukosidase adalah perut kembung dan gangguan gastrointestinal lainnya. Gangguan penyerapan karbohidrat menyebabkan peningkatan massa karbohidrat di usus besar, yang dapat menyebabkan produksi gas yang cukup besar, diare, dan sakit perut. Beberapa studi yang telah dilakukan menunjukkan adanya potensi peningkatan risiko penyakit kardiovaskular pada pasien dengan gangguan toleransi glukosa, meskipun penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengkonfirmasi hal ini. Penghambat α -glukosidase juga dapat meningkatkan kadar transaminase hati meskipun sedikit (Fowler, 2010).

Pencarian obat hipoglikemik terus dilakukan. Adanya efek samping dari obat golongan penghambat α -glukosidase mendorong banyak penelitian yang dilakukan mengenai skrining penghambat α -glukosidase pada hasil alam, terutama tanaman. Hal ini bertujuan untuk mengembangkan sumber obat baru yang lebih alami, lebih aman, efektif dan efisien bagi penderita diabetes (Joo, et al., 2006).

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai obat antidiabetes adalah meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Tanaman ini lebih banyak dikenal karena efeknya sebagai hepatoprotektor dan immunomodulator. Pada penelitian *in vitro* terdahulu telah terbukti bahwa ekstrak etanol 80% dari herba meniran memiliki kemampuan penghambatan aktivitas α -glukosidase yang kuat dengan nilai IC_{50} = 2,32 μ g/mL (Masitoh, 2011). Penelitian fraksinasi telah dilakukan oleh Khairunnisa (2012) yang menyatakan bahwa fraksi metanol dari ekstrak etanol memiliki kemampuan penghambatan aktivitas α -glukosidase paling kuat (IC_{50} = 1,67 μ g/mL). Uji *in vivo* juga telah dilakukan terhadap tikus diabetes yang diinduksi oleh aloksan (Okoli, Ibiam, Ezike, Akah, Okoye, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa herba meniran berkhasiat sebagai obat antidiabetes.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, peneliti ingin mengetahui fraksi paling aktif dari ekstrak metanol herba meniran yang mampu menghambat aktivitas α -glukosidase. Peneliti berharap dengan diketahuinya fraksi paling aktif dari ekstrak metanol herba meniran dapat dijadikan dasar untuk melanjutkan ke tahap isolasi dan karakterisasi senyawa yang mempunyai kemampuan

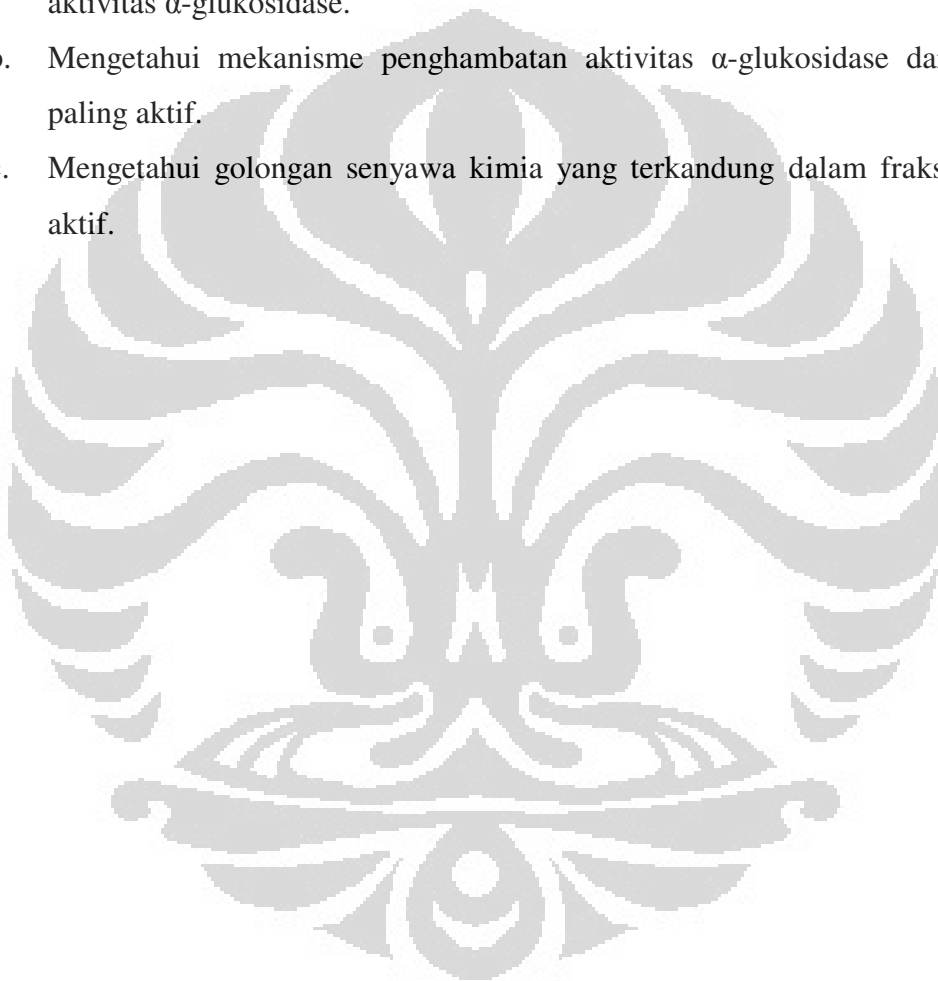
Universitas Indonesia

penghambatan α -glukosidase sehingga dapat diperoleh senyawa aktif yang dapat digunakan untuk pengobatan antidiabetes.

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- a. Mengetahui fraksi paling aktif dari ekstrak metanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yang memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas α -glukosidase.
- b. Mengetahui mekanisme penghambatan aktivitas α -glukosidase dari fraksi paling aktif.
- c. Mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi paling aktif.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Phyllanthus niruri* L. (Meniran)

2.1.1 Klasifikasi

Spesies *phyllanthus* telah banyak digunakan dalam pengobatan Ayurvedic selama lebih dari 2000 tahun (Ebadi, 2007). Berikut klasifikasi *Phyllanthus niruri*

L.:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: <i>Phyllanthus</i>
Jenis	: <i>Phyllanthus niruri</i> L. (Backer & van den Brink, 1965)
Sinonim	: <i>Phyllanthus carolinianus</i> , <i>P. sellowianus</i> , <i>P. fraternus</i> , <i>P. kirganella</i> , <i>P. lathyroides</i> , <i>P. lonphali</i> , <i>Lymphanthus niruri</i> (Taylor, 2003), <i>P. amarus</i> (Daniel, 2006)
Nama daerah	: Meniran (Sunda), Meniran ijo (Jawa), Dokong anak (Malaysia) (PT Eisai Indonesia, 1986)

2.1.2 Morfologi

Meniran merupakan tumbuhan terna, tumbuh tegak, tinggi 50 cm sampai 1 m, bercabang terpenjar, cabang mempunyai daun tunggal berseling. Batang berwarna hijau pucat atau hijau kemerahan. Bentuk daun bundar telur sampai bundar memanjang, panjang daun 5 mm sampai 10 mm, lebar 2,5 mm sampai 5 mm, ujung bundar atau runcing, permukaan daun bagian bawah berbintik-bintik kelenjar. 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, helaian mahkota bunga berbentuk bundar telur terbalik, panjang 0,75 mm sampai 1 mm, berwarna merah pucat. Bunga betina letaknya di bagian atas ketiak daun,

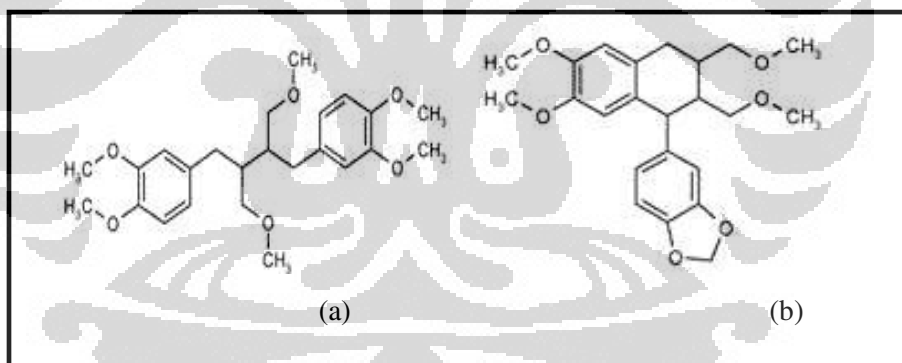
gagang bunga 0,75 mm sampai 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bundar telur sampai bundar memanjang, tepi berwarna hijau muda, panjang 1,25 mm sampai 2,5 mm (Depkes RI, 1978).

2.1.3 Ekologi dan Persebaran

Tumbuhan ini terdapat di India, Cina, Malaysia, Filipina, dan Australia. Meniran tersebar hampir di seluruh Indonesia pada ketinggian tempat antara 1 m sampai 1000 m di atas permukaan laut. Tumbuhan ini merupakan gulma yang tumbuh secara liar di tempat terbuka, pada tanah gembur yang mengandung pasir, di ladang, di tepi sungai, dan tepi pantai (Depkes RI, 1978).

2.1.4 Kandungan Kimia

Herba meniran mengandung lignan, alkaloid, dan bioflavonoid (Ebadi, 2007). Konstituen utama tumbuhan ini berupa lignan filantin (0,5%) dan hipofilantin (hingga 0,2%) (Daniel, 2006).



[Sumber : Ram, 2001]

Gambar 2.1. Struktur (a) filantin dan (b) hipofilantin

2.1.5 Khasiat

Daun meniran dapat digunakan sebagai obat ayas, malaria, sembelit, tekanan darah tinggi, haid tidak teratur, dan sariawan. Akarnya dapat digunakan untuk mengatasi mulas dan gigi nyeri. Herba meniran berguna untuk mengatasi kencing kurang lancar, kencing nanah, raja singa, ginjal nyeri, mencret, demam,

Universitas Indonesia

tetanus, darah kotor, kejang gagau, kencing mengandung putih telur, dan kencing batu (PT Eisai Indonesia, 1986). Meniran diketahui memiliki kemampuan hepatoprotektif dikarenakan kandungan lignannya. Tanaman ini juga memiliki kemampuan sebagai antivirus hepatitis B, hipoglikemik, antidiuretik, dan hipotensif (Daniel, 2006).

2.2 Diabetes Melitus

2.2.1 Definisi

Diabetes melitus merupakan suatu penyakit metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah akibat kegagalan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya (Flaws, Kuchinski, Casañas, 2002). Diabetes melitus yang ditandai dengan hiperglikemia dapat menyebabkan komplikasi seperti retinopati, neuropati, nefropati, dan penyakit jantung (Hsieh et al., 2010).

2.2.2 Klasifikasi

Umumnya, diabetes melitus diklasifikasikan menjadi 4 tipe, diantaranya:

2.2.2.1 Diabetes Melitus Tipe 1

Diabetes Melitus tipe 1 disebut juga insulin-dependent diabetes melitus (IDDM), penyakit hiperglikemia akibat ketiadaan insulin. Secara umum, penyakit ini disebabkan karena destruksi otoimun sel-sel β pulau Langerhans (destruksi otoimun ini dapat timbul setelah infeksi virus atau setelah pajanan obat atau toksin), sehingga terjadi defisiensi insulin absolut. Oleh karena itu, pengobatan dasar diabetes melitus tipe 1 melalui penggantian insulin (Sukandar, Andrajati, Sigit, Adnyana, Setiadi, & Kusnandar, 2008).

2.2.2.2 Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes Melitus tipe 2 disebut juga sebagai noninsulin dependent diabetes melitus (NIDDM), penyakit hiperglikemia yang ditandai dengan insensitivitas atau resistensi sel terhadap insulin dan defisiensi insulin relatif. Individu yang mengidap diabetes tipe 2 tetap menghasilkan insulin, namun sering terjadi keterlambatan dalam sekresi insulin setelah makan dan berkurangnya jumlah total

insulin yang dikeluarkan. Hal ini cenderung semakin parah seiring dengan penambahan usia pasien. Umumnya pasien dengan diabetes melitus tipe 2 sering asimtomatik. Beberapa faktor resiko diabetes melitus tipe 2 adalah riwayat keluarga (faktor keturunan), obesitas, jarang olahraga, hipertensi, riwayat penyakit gangguan vaskuler dan diabetes melitus gestasional (Dipiro, et al., 2005). Pengobatan penyakit ini adalah dengan diet yang dikombinasikan dengan olahraga (khususnya bagi sebagian pasien diabetes melitus tipe 2 dengan berat badan yang berlebih) atau pemberian obat antidiabetes oral.

2.2.2.3 Diabetes Melitus Gestasional

Diabetes Melitus Gestasional (GDM) terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes. Sekitar 50% wanita pengidap kelainan ini akan kembali ke status nondiabetes setelah kehamilan berakhir. Penyebab diabetes gestasional dianggap berkaitan dengan peningkatan kebutuhan kadar estrogen, energi, dan hormon pertumbuhan selama kehamilan. Estrogen dan hormon pertumbuhan merangsang pengeluaran/penggunaan insulin secara terus-menerus dan berlebihan (seperti yang terjadi pada pasien diabetes tipe 2) yang akhirnya menyebabkan penurunan responsivitas sel terhadap insulin (Corwin, 2001). Diabetes gestasional dapat menimbulkan efek negatif pada kehamilan dengan meningkatkan risiko malformasi kongenital, lahir mati, dan bayi bertubuh besar, yang dapat menimbulkan masalah pada persalinan.

2.2.2.4 Diabetes Tipe Lain

Selain dari 3 tipe diabetes melitus tersebut, terdapat tipe diabetes lainnya yaitu diabetes yang disebabkan oleh infeksi, efek samping obat, endokrinopati, kerusakan pankreas dan kelainan genetik (Dipiro, et al., 2005).

2.2.3 Terapi Diabetes Melitus

2.2.3.1 Terapi Nonfarmakologi

Penderita diabetes diharapkan dapat mengontrol kadar glukosa darah secara teratur dan mempertahankan berat badan yang normal. Hal ini dikarenakan

pada penderita diabetes dengan berat badan berlebih, kadar glukosa darah sulit dikendalikan. Penurunan berat badan dapat mengurangi resistensi insulin dan meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin. Adapun terapi nonfarmakologi yang dapat dilakukan untuk memperoleh berat badan dan kadar glukosa darah yang normal adalah diet, olahraga, dan berhenti merokok (Tjay & Rahardja, 2007).

2.2.3.2 Terapi Farmakologi

Antidiabetik oral diindikasikan bagi pasien diabetes tipe 2 jika diet dan olahraga tidak cukup menurunkan kadar gula darah yang tinggi. Terapi farmakologi untuk penyakit diabetes melitus meliputi:

a. Insulin

Sediaan insulin umumnya diperoleh dari sapi atau babi. Dengan berbagai teknik isolasi dan modifikasi diperoleh bermacam-macam sediaan dengan sifat yang berbeda berdasarkan mula dan masa kerjanya, diantaranya: insulin mula kerja cepat dengan masa kerja singkat (rapid-acting insulin), insulin mula kerja cepat (short-acting insulin), insulin masa kerja sedang (intermediate-acting insulin), dan insulin masa kerja panjang (long-acting insulin).

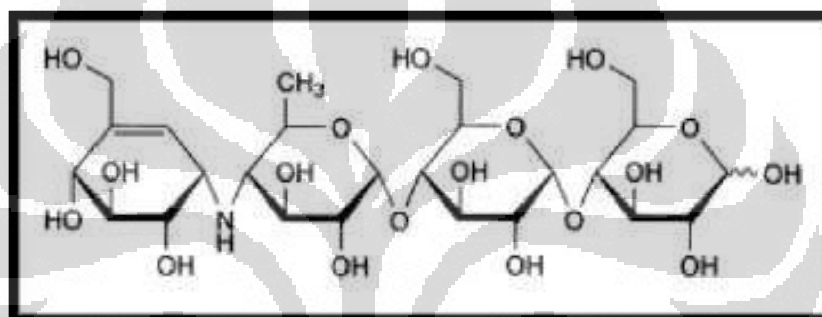
Mekanisme kerja insulin adalah menurunkan kadar glukosa darah dengan menstimulasi pengambilan glukosa perifer dan menghambat produksi glukosa hepatic (Sukandar, et al., 2008). Efek samping yang sering terjadi pada penggunaan insulin adalah hipoglikemik dan berat badan bertambah (Dipiro, et al, 2005).

b. Hipoglikemik Oral

Pemilihan obat hipoglikemik oral yang tepat sangat menentukan keberhasilan terapi diabetes. Pemberian hipoglikemik oral dapat dilakukan dengan menggunakan satu jenis obat atau kombinasi dari dua jenis obat (Depkes RI, 2005). Berdasarkan mekanisme kerjanya, obat hipoglikemik oral dapat dibagi menjadi 3 golongan, yaitu:

Salah satu obat yang termasuk golongan inhibitor α -glukosidase ini adalah akarbose. Akarbose merupakan obat golongan inhibitor α -glukosidase yang paling sering digunakan untuk terapi diabetes melitus tipe 2 apabila diet tidak cukup menurunkan kadar glukosa darah (Holman, et al., 1999).

Akarbose merupakan suatu oligosakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis* (Bayer, 2008). Akarbose berupa serbuk berwarna putih dengan berat molekul 645,6 dan pKa 5,1 yang bersifat larut dalam air. Rumus empiriknya adalah $C_{25}H_{43}NO_{18}$ dengan struktur kimia sebagai berikut:



[Sumber : The British Farmacopeia Commission, 2008]

Gambar 2.2. Struktur kimia akarbose

2.3.3 Mekanisme Inhibisi Enzim (Seager, Slabaugh, 2008)

Inhibitor enzim adalah suatu zat yang dapat menurunkan kecepatan reaksi katalisis dari suatu enzim. Berdasarkan mekanisme inhibisi enzim, inhibitor enzim diklasifikasikan menjadi dua, yaitu irreversible dan reversible. Inhibisi irreversible terjadi ketika terbentuknya ikatan kovalen dengan gugus fungsi spesifik enzim sehingga menyebabkan enzim menjadi inaktif. Sejumlah racun yang sangat mematikan berperan sebagai inhibitor irreversible. Salah satu contoh inhibitor irreversible adalah ion sianida (CN^-).

Inhibitor reversible dapat berikatan dengan inhibitor secara bolak-balik. Ada dua tipe inhibitor reversible yaitu kompetitif dan nonkompetitif. Inhibisi kompetitif terjadi ketika berikatan dengan bagian aktif enzim sehingga akan berkompetisi dengan substrat untuk mengikat enzim. inhibitor kompetitif biasanya

Universitas Indonesia

- 1) Obat-obat yang meningkatkan sekresi insulin, meliputi obat hipoglikemik oral golongan sulfonilurea dan glinida (meglitinida dan turunan fenilalanin).
- 2) Sensitiser insulin (obat-obat yang dapat meningkatkan sensitifitas sel terhadap insulin), meliputi obat-obat hipoglikemik golongan biguanida dan tiazolidindion, yang dapat membantu tubuh untuk memanfaatkan insulin secara lebih efektif.
- 3) Inhibitor katabolisme karbohidrat, antara lain inhibitor α -glukosidase yang bekerja menghambat absorpsi glukosa dan umum digunakan untuk mengendalikan hiperglikemia post-prandial (post-meal hyperglycemia) yang merupakan faktor resiko penyebab komplikasi kardiovaskular (Ceriello, 2005).

2.3 Enzim (Seager, Slabaugh, 2008)

Enzim memiliki peranan yang penting pada organisme hidup melalui tiga sifat utamanya, yaitu enzim memiliki kekuatan katalitik yang besar, reaksi enzim spesifik dalam mengkatalisasi, dan aktivitas enzim sebagai katalis dapat diatur. Katalis merupakan zat yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia namun tidak ikut bereaksi. Enzim merupakan katalis yang mempercepat reaksi kimia dengan menurunkan energi aktivasi dan memungkinkan suatu reaksi kimia mencapai keseimbangan dengan lebih cepat.

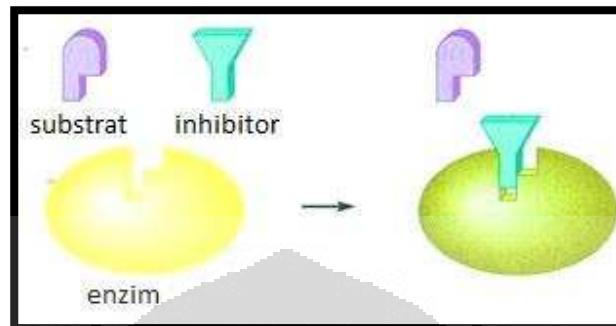
Enzim memiliki molekul yang besar dibandingkan dengan molekul substrat. Molekul enzim dan substrat harus kontak dan berinteraksi pada bagian yang kecil di permukaan enzim. Lokasi pada enzim yang menjadi tempat substrat terikat dan terjadinya proses katalisis disebut active site. Kompleks yang terbentuk ketika substrat dan enzim berikatan disebut kompleks enzim-substrat (ES). Jika kompleks ES terbentuk, konversi substrat menjadi produk dapat terjadi.

Reaksi umum:



Keterangan: E = enzim, S = substrat, ES = kompleks enzim-substrat, P = produk/ hasil reaksi.

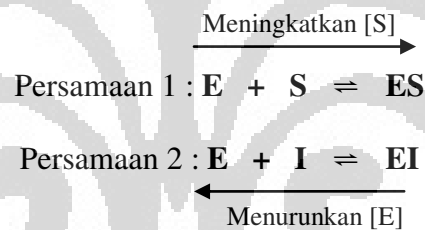
memiliki struktur yang mirip dengan substrat. Contoh dari inhibisi kompetitif adalah inhibisi suksinat dehidrogenase oleh malonat.



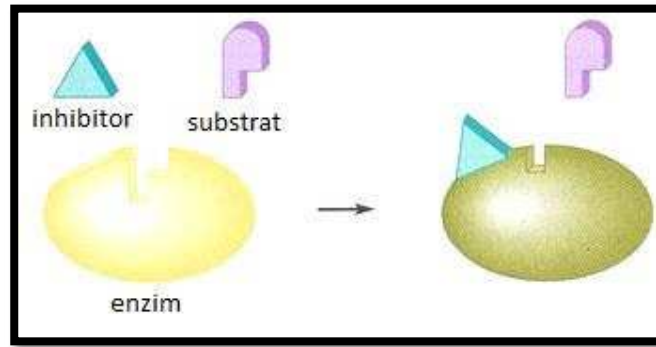
[Sumber : Seager, Slabaugh, 2008, telah diolah kembali]

Gambar 2.3 Mekanisme inhibisi kompetitif

Inhibisi kompetitif dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Hal ini terlihat dari persamaan Le Chatelier di bawah ini.



Inhibitor nonkompetitif tidak memiliki kemiripan dengan substrat dan berikatan dengan permukaan enzim pada sisi selain sisi aktif. Interaksi yang terjadi antara enzim dengan inhibitor nonkompetitif menyebabkan bentuk tiga dimensi enzim dan sisi aktif enzim berubah. Enzim hanya sebentar mengikat substrat atau substrat tidak cocok untuk berikatan dengan sisi aktif. Tidak seperti inhibisi kompetitif, inhibisi nonkompetitif tidak dapat diatasi melalui penambahan substrat karena penambahan substrat tidak memiliki efek pada ikatan enzim-inhibitor.

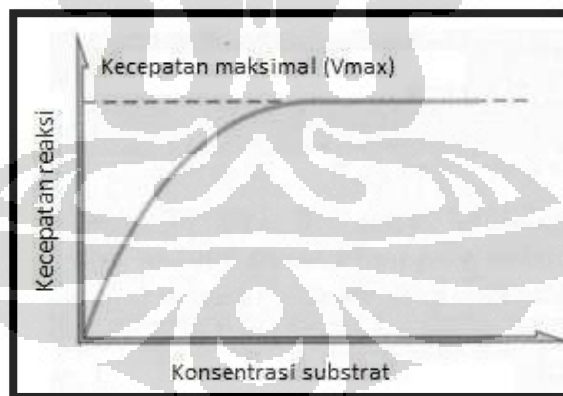


[Sumber : Seager, Slabaugh, 2008, telah diolah kembali]

Gambar 2.4. Mekanisme inhibisi nonkompetitif

2.3.4 Penentuan Kinetika Inhibisi Enzim

Konsentrasi substrat sangat berpengaruh terhadap kecepatan reaksi katalisis suatu enzim. Pada awalnya, kecepatan reaksi sebanding dengan peningkatan konsentrasi substrat. Akan tetapi, pada konsentrasi tertentu, kecepatan reaksi akan tetap konstan. Kecepatan maksimum reaksi ini (V_{max}) terjadi karena enzim telah jenuh dengan substrat dan tidak dapat bekerja lebih cepat di bawah kondisi tersebut (Seager, Slabaugh, 2008).



[Sumber : Seager, Slabaugh, 2008, telah diolah kembali]

Gambar 2.5. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi yang dikatalisis oleh enzim

Persamaan Michaelis-Menten memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan reaksi yang bervariasi dengan variasi konsentrasi substrat.

Universitas Indonesia

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

Keterangan : v_i = kecepatan awal reaksi, V_{\max} = kecepatan maksimal reaksi, $[S]$ =konsentrasi substrat, K_m = konstanta Michaelis

K_m adalah konsentrasi substrat dengan v_i separuh dari kecepatan maksimal ($V_{\max}/2$) yang dapat dicapai pada konsentrasi tertentu enzim. Pengukuran nilai V_{\max} dan perhitungan K_m sering memerlukan konsentrasi substrat yang sangat tinggi untuk mencapai kondisi jenuh (secara praktik, sulit dilakukan). Hal ini dapat diatasi dengan membuat bentuk persamaan linier Michaelis-Menten dan memungkinkan V_{\max} dan K_m diekstrapolasikan dari data kecepatan awal yang diperoleh pada konsentrasi substrat lebih rendah daripada konsentrasi jenuh (Murray, Granner, & Rodwell, 2009). Dimulai dari persamaan (2.1)

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

dibalik

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

faktor

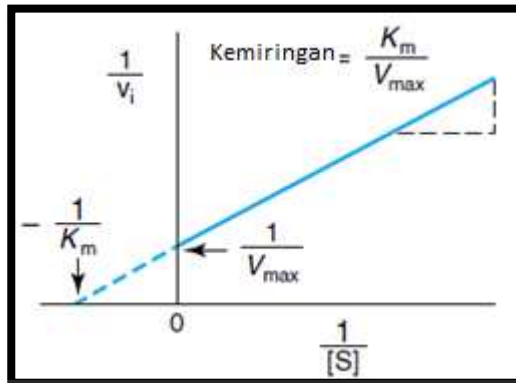
$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} \quad (2.3)$$

dan disederhanakan

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.4)$$

Persamaan (2.4) adalah persamaan dalam suatu garis lurus, $y = ax + b$, di mana $y = 1/v_i$ dan $x = 1/[S]$. $1/v_i$ sebagai fungsi y (absorbansi sampel) sebanding dengan $1/[S]$ sebagai fungsi dari x (jumlah substrat) sehingga memberikan garis lurus yang memotong sumbu y adalah $1/V_{\max}$ dan dengan kecuraman K_m/V_{\max} (Murray, Granner, & Rodwell, 2009). Plot seperti itu disebut Plot resiprokal-ganda atau Lineweaver-Burk (Gambar 2.6).

Universitas Indonesia



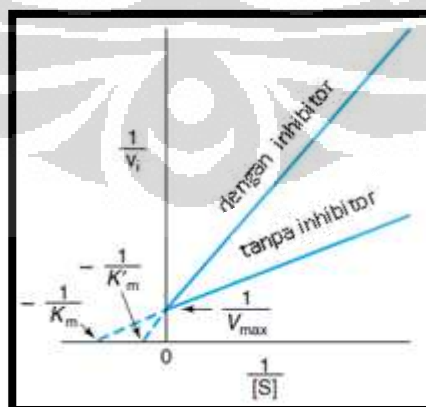
[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.6. Plot resipokal-ganda atau Lineweaver-Burk

Metode Lineweaver-Burk membedakan antara inhibisi kompetitif dan non kompetitif berdasarkan pada apakah peningkatan konsentrasi substrat akan mengatasi inhibisi atau tidak. Kinetika inhibisi enzim ditentukan dengan meningkatnya konsentrasi substrat baik dengan atau tanpa adanya inhibitor.

2.3.4.1 Inhibisi kompetitif

Pada inhibisi kompetitif klasik, garis yang menghubungkan titik-titik data eksperimen bertemu di sumbu y (Gambar 2.7). Perpotongan sumbu y $= 1/V_{max}$, pola ini menunjukkan bahwa ketika $1/[S]$ mendekati 0, v_i tidak bergantung pada keberadaan inhibitor.



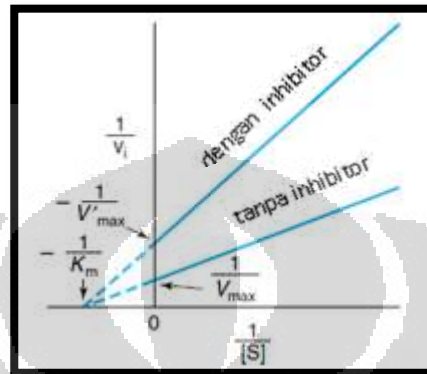
[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.7. Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi kompetitif

Universitas Indonesia

2.3.4.2 Inhibisi nonkompetitif

Pada inhibisi nonkompetitif, pengikatan inhibitor tidak mempengaruhi pengikatan substrat. Inhibitor nonkompetitif menurunkan nilai V_{\max} , tetapi tidak mempengaruhi K_m (Gambar 2.8).

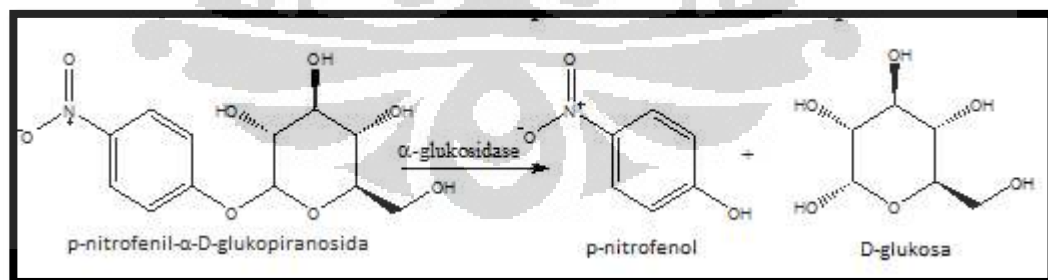


[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.8 Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi nonkompetitif

2.3.5 Uji Inhibisi Aktivitas α -Glukosidase

Uji inhibisi aktivitas α -glukosidase dilakukan secara *in vitro* dengan reaksi enzimatik dan pengukuran secara spektrofotometri. α -Glukosidase akan menghidrolisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi p-nitrofenol (berwarna kuning) dan D-glukosa.



[Sumber : Kikkoman, n.d., telah diolah kembali]

Gambar 2.9. Reaksi enzimatik α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil pengukuran absorbansi p-nitrofenol (berwarna kuning). Intensitas warna kuning yang terbentuk ditentukan absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer double beam pada panjang gelombang 400 nm. Apabila inhibitor memiliki kemampuan menghambat aktivitas α -glukosidase maka p-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang.

2.4 Metode Pemisahan

2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan senyawa kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Pada ekstraksi bahan aktif dari simplisia, pelarut harus berdifusi dan senyawa aktif harus cukup larut dalam pelarut, sehingga akan tercapai kesetimbangan antara larut (zat yang terlarut, solut) dan pelarut. Kecepatan untuk mencapai kesetimbangan tersebut umumnya tergantung pada suhu, pH, ukuran partikel, dan gerakan partikel (Depkes RI, 2000). Berikut adalah dua cara ekstraksi:

2.4.1.1 Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses mengekstrakkan simplisia dengan menggunakan pelarut selama waktu tertentu dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

Kelebihan dari metode ini adalah alat dan caranya sederhana, juga dapat digunakan untuk simplisia yang tahan dan tidak tahan akan pemanasan. Kekurangan dari metode ini adalah waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama dan pelarut yang dibutuhkan cukup banyak.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk simplisia yang tahan dan tidak tahan

akan pemanasan. Kekurangan dari metode ini adalah membutuhkan waktu yang lama dan pelarut dalam jumlah yang banyak. Keberhasilan proses perkolasi dipengaruhi oleh selektivitas pelarut, kecepatan aliran pelarut, dan temperatur.

2.4.1.2 Cara Panas

a. 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. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk mengekstraksi simplisia yang tahan terhadap pemanasan langsung, proses ekstraksi lebih cepat, dan jumlah hasil ekstraksi yang diperoleh lebih banyak.

b. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk mengekstraksi simplisia yang tidak tahan terhadap pemanasan langsung secara sempurna. Kekurangan dari metode ini adalah terbatas pada ekstraksi dengan pelarut murni dan tidak dapat digunakan untuk ekstraksi dengan campuran pelarut, misalnya heksan-diklorometan (1:1), atau pelarut yang diasamkan atau dibasakan.

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C. Kelebihan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk simplisia yang tidak tersari dengan baik pada temperatur ruangan.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit). Kelebihan dari metode infus adalah metode ini merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana, alat dan cara yang digunakan sederhana, efisien, dan hanya membutuhkan waktu yang singkat. Kekurangan dari metode ini adalah ekstrak yang diperoleh kurang stabil dan mudah tercemar oleh bakteri dan jamur sehingga tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam pada suhu kamar.

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air. Kelebihan dari metode infus adalah metode ini merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana, alat dan cara yang digunakan sederhana, efisien, dan hanya membutuhkan waktu yang singkat. Kekurangan dari metode ini adalah ekstrak yang diperoleh kurang stabil dan mudah tercemar oleh bakteri dan jamur sehingga tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam pada suhu kamar.

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut adalah selektivitas, kemudahan bekerja, ekonomis, ramah lingkungan, dan keamanan.

Proses ekstraksi akan menghasilkan produk yang disebut dengan ekstrak. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000).

2.4.2 Kromatografi

2.4.2.1 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan teknik kromatografi klasik yang telah dikembangkan sejak tahun 1900 oleh Tsweet. Kromatografi kolom termasuk kromatografi adsorpsi. Kromatografi adsorpsi merupakan teknik kromatografi asli. Kromatografi adsorpsi telah banyak digunakan untuk memisahkan sampel terutama sampel organik. Namun, sampel yang bersifat sangat polar dan sampel ionik biasanya tidak memberikan hasil pemisahan yang sangat baik.

Fase diam yang dapat digunakan silika, alumina, dan karbon. Silika merupakan fase diam yang paling banyak digunakan. Selain fase diam, fase gerak juga berpengaruh dalam kromatografi adsorpsi. Fase gerak dapat memberikan perubahan besar terhadap karakteristik retensi sampel. Variasi retensi sampel dapat dilakukan dengan mengubah komposisi fase gerak (Hurtubise, 2002).

2.4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapisan tipis digunakan pada pemisahan zat secara cepat dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca (Depkes RI, 1995a). Sistem ini segera populer karena memberikan banyak keuntungan, misalnya peralatan yang diperlukan sedikit, murah, sederhana, waktu analisis cepat dan daya pisah cukup baik. Derajat retensi pada kromatografi lempeng biasanya dinyatakan sebagai faktor retensi, R_f :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa pelarut}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}} \quad (2.5)$$

Harga R_f dipengaruhi oleh macam penyerap, ketebalan, metode arah pengembangan, kadar dan jumlah cuplikan, dan jarak yang ditempuh bercak.

a. Fase diam

Pada semua prosedur kromatografi, kondisi optimum untuk suatu pemisahan merupakan hasil kecocokan antara fase diam dan fase gerak.

Keistimewaan KLT adalah lapisan tipis fase diam dan kemampuan pemisahannya (Sudjadi, 1988).

b. Fase gerak

Sistem pelarut untuk KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering kita mencoba-coba saja karena waktu yang diperlukan sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran pelarut organik yang dipakai untuk memisahkan molekul yang mempunyai satu dan dua gugus fungsi dengan cara kromatografi cair padat pada lapisan silika gel atau alumina aktif. Dalam beberapa kasus, pelarut tunggal memberikan hasil yang memuaskan. Akan tetapi, pada sebagian besar kasus, satu pelarut berikut yang di atasnya (kepolaran lebih rendah) tidak dapat menggerakannya cukup jauh. Karena itu kita harus mencampur pelarut untuk memperoleh untuk memperoleh kepolaran yang diinginkan.

c. Metodologi

KLT pada kaca objek (atau pelat siap pakai yang dipotong-potong menjadi pelat kecil) dapat memisahkan campuran yang mengandung sampai empat komponen dalam waktu lima menit memakai alat gelas laboratorium yang normal. Lapisan mudah dibuat, umumnya tidak memerlukan pengaktifan dan menghasilkan pemisahan yang tajam.

d. Penotolan cuplikan

Campuran yang akan dikromatografi harus dilarutkan di dalam pelarut yang agak nonpolar untuk ditotolkan pada lapisan. Hampir segala macam pelarut dapat dipakai, tetapi yang terbaik yang bertitik didih antara 50°C dan 100°C. Hal ini dikarenakan mudah ditangani dan mudah menguap dari lapisan. Air hanya dipakai jika tidak ada pilihan lain. Penotolan dapat dilakukan dengan kapiler halus yang dibuat dari pipa kaca. Cuplikan, berupa larutan, harus ditotolkan sekitar 8-10 mm dari salah satu ujung lempeng. Pelarut yang dipakai untuk penotolan harus betul-betul dihilangkan dari lapisan sebelum dikromatografi, jika perlu dengan penyemprot udara panas.

e. Pengembangan kromatogram

Lapisan yang telah ditotoli cuplikan ditaruh di dalam bejana kecil yang berisi pelarut yang tingginya beberapa mm. Tinggi pelarut di dalam bejana harus di bawah tempat penotolan pada pelat. Bejana ditutup dengan penutup atau dengan lembaran aluminium, dan pelarut dibiarkan merambat naik sampai kira-kira tiga perempat pelat. Pengembangan memerlukan waktu sekitar 5 menit, bergantung penjerap dan pelarut. Jika bercak mempunyai harga R_f yang lebih kecil dari 0,5, lapisan harus dikeringkan dan dikromatografi sekali lagi.

f. Metode identifikasi

Jika semua senyawa yang dikromatografi berwarna, dengan mudah kita dapat melihat apakah campuran terpisah dan seberapa jauh pemisahan itu. Jika beberapa atau semua senyawa tanwarna, hal yang biasanya kita jumpai, bercak harus ditampakkan dengan beberapa cara atau pereaksi. Cara penampakan dapat berupa metode khas (dirancang untuk menunjukkan gugus fungsi khusus pada jenis senyawa) atau metode umum yang menunjukkan sembarang senyawa organik. Metode umum yang dipakai pada pelat kecil ialah penjerapan uap iodium, pemakaian sinar UV, dan pemakaian sinar UV pada lapisan yang mengandung indikator fluoresensi (Gritter, et al., 1991).

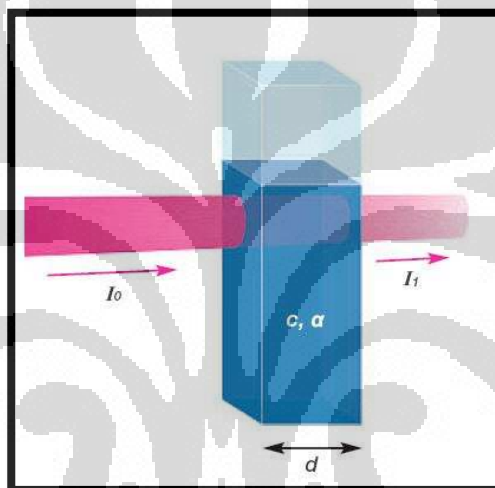
2.5 Mikroplat

Pengukuran aktivitas enzim penting dilakukan, terutama pada bidang bidang biokimia dan diagnostik. Pengujian enzim merupakan hal yang penting dilakukan karena berkaitan dengan kerja enzim yang memegang peranan penting dalam makhluk hidup, termasuk manusia, hewan, tanaman, dan beberapa prokariot. Pengukuran aktivitas enzim memerlukan suatu metode yang dapat menentukan jumlah produk yang terbentuk dari reaksi enzim-substrat yang sebanding dengan jumlah substrat yang dikonsumsi (Joo H. Kang, Je-Kyun Park 2005).

Reaksi enzim dimulai ketika enzim dan substrat bercampur dalam well (sumuran). Hasil reaksi enzimatik diukur dengan microplate reader selama 1

menit. Apabila data yang diperoleh memperlihatkan peningkatan absorbansi bertahap, bukan fluktuasi, hal ini menunjukkan bahwa reaksi dalam tiap sumuran berlangsung sempurna (Joo H. Kang, Je-Kyun Park, 2005).

Pada spektrofotometri UV-Vis biasa, absorbansi atau OD (optical density) bergantung pada panjang gelombang (λ) dan tebal sampel dalam kuvet (d). Absorbansi di atas 1,0 harus dihindari dalam pengukuran karena adanya perbedaan pembacaan yang cukup besar menunjukkan hanya sedikit transmisi yang mencapai sampel. Oleh karena itu, disarankan untuk mengencerkan sampel hingga memperoleh absorbansi di bawah 1,0 (Greiner Bio-One, 2004).



[Sumber: Greiner Bio-One, 2004]

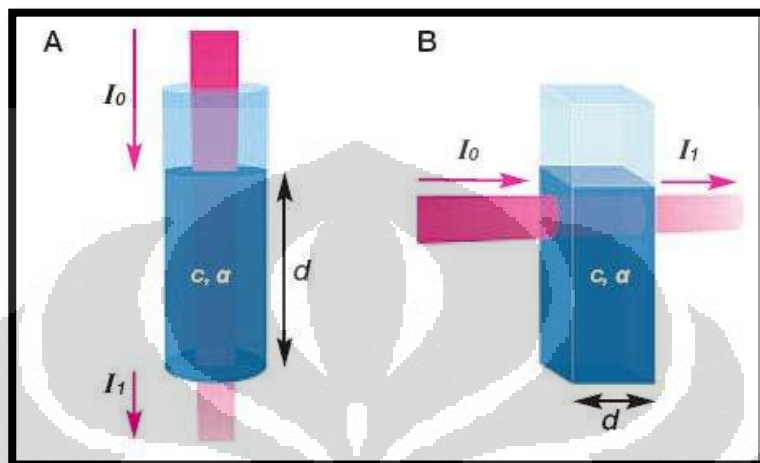
Gambar 2.10. Prinsip spektroskopi UV-Vis

Keterangan: I_0 : Intensitas berkas sinar sebelum melewati sampel; I_1 : Intensitas berkas transmisi (berkas sinar setelah melewati sampel); c : konsentrasi molekul yang terlarut; α : koefisien ekstingsi Molar, d : tebal sampel dalam kuvet

Pada spektrofotometri UV-Vis yang menggunakan mikroplat, ketebalan cairan sampel ditentukan dari jumlah dan tinggi larutan sampel yang mengisi tiap sumuran. Pengukuran OD pada sumuran microplate dapat dibandingkan secara langsung dengan pengukuran menggunakan kuvet dengan cara hasil dari sumuran microplate harus dihitung ulang dengan tebal sampel 1 cm karena hampir semua

kuvet memiliki tebal standar 1 cm (Greiner Bio-One, 2004). Perhitungan ulang dapat dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$OD_{\lambda 1cm} = \frac{OD_{\lambda sample}}{d [cm]} \quad (2.6)$$



[Sumber: Greiner Bio-One, 2004]

Gambar 2.11. Variabel ketebalan cairan sampel dalam microplate (A) dibandingkan dengan ketebalan cairan sampel dalam kuvet (B)

2.6 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia 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, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon (Harborne, 1987).

2.6.1 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, serta dapat dideteksi dengan cara pengendapan menggunakan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat. Alkaloid sebagian besar berbentuk kristal padat dan sebagian

kecil berupa cairan pada suhu kamar, memutar bidang polarisasi dan terasa pahit (Harborne, 1987).

2.6.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang umumnya terdapat pada tumbuhan berpembuluh. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Biasanya dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa ialah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang sudah dihidrolisis. Proses ekstraksi flavonoid dilakukan dengan etanol mendidih untuk menghindari oksidasi enzim (Harborne, 1987). Pendeteksian adanya senyawa ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air atau etanol yang menimbulkan warna hijau atau hitam kuat.

2.6.3 Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun dari isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan memiliki kerangka karbon yang dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit isopren ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap, triterpen, dan sterol. Secara umum terpen larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpen diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform. Saponin dan glikosida jantung merupakan golongan senyawa triterpen atau steroid yang terdapat dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987). Senyawa ini biasanya diidentifikasi dengan reaksi Liebermann-Bouchardat (anhidrat asetat- H_2SO_4) yang memberikan warna hijau kehitaman sampai biru.

2.6.4 Tanin

Tanin merupakan senyawa yang umum terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, memiliki gugus fenol, rasa sepat dan mampu menyamak kulit karena kemampuannya menyambung-silang protein. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air. Secara kimia,

Universitas Indonesia

tanin dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis.

Tanin terkondensasi secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987). Tanin diidentifikasi dengan cara pengendapan menggunakan larutan gelatin 10%, campuran natrium klorida-gelatin, besi (III) klorida 3%, dan timbal (II) asetat 25%.

2.6.5 Saponin

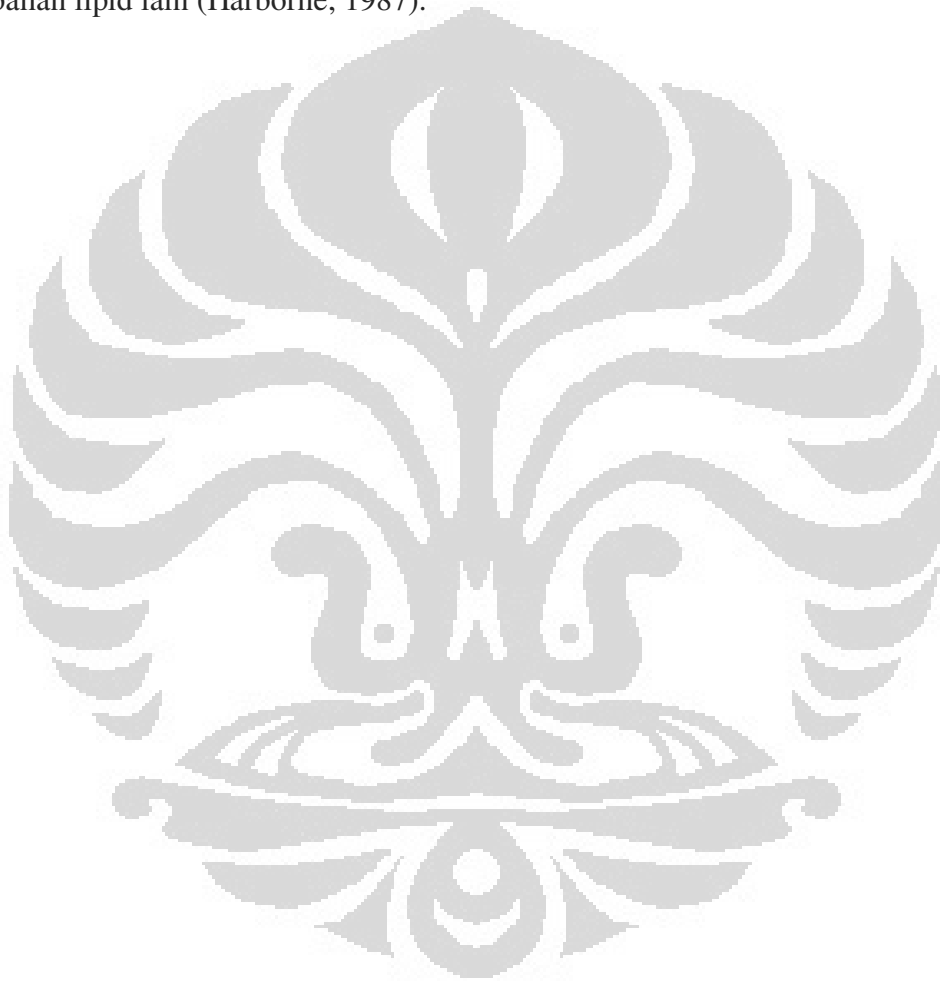
Saponin adalah glikosida triterpen yang merupakan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Pada konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus (Harborne, 1987). Identifikasi saponin dapat dilakukan dengan mengocok ekstrak bersama air hangat di dalam tabung reaksi dan akan timbul busa yang dapat bertahan lama, setelah penambahan HCl 2N busa tidak hilang.

2.6.6 Glikosida

Glikosida merupakan suatu senyawa yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Pada umumnya glikon berupa glukosa, fruktosa, laktosa, galaktosa dan manosa. Dapat pula berupa gula khusus seperti samentosa, oleandrosa, simarosa dan rutinosa. Sedangkan aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus -OH dalam bentuk alkoholis atau fenolis. Glikosida dapat dibedakan menjadi α -glikosida dan β -glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk β -glikosida. Kegunaan glikosida bagi tanaman adalah untuk cadangan gula sementara, sedangkan bagi manusia umumnya digunakan untuk obat jantung, diuretika, dan prekursor hormon steroid.

2.6.7 Kuinon dan Antrakuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan memiliki kromofor dasar. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dibagi menjadi empat kelompok, diantaranya adalah benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon dan isoprenoid. Kelompok benzokuinon, naftokuinon dan antrakuinon diperlukan hidrolisis asam untuk melepas kuinon bebasnya. Sedangkan kuinon isoprenoid yang terlibat dalam respirasi sel dan fotosintesis diperlukan cara khusus untuk memisahkannya dari bahan lipid lain (Harborne, 1987).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, dari bulan Februari hingga Juni 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO), Bogor dan dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Cibinong.

3.2.2 Bahan Kimia

Enzim α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* recombinant (Sigma Aldrich, USA), substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Jepang), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), bovine serum albumin (BSA) (Merck, Jerman), akarbosa (PT Dexa Medica), natrium karbonat (Merck, Jerman), kalium hidrogenfosfat (Merck, Jerman), kalium dihidrogenfosfat (Analar), natrium hidroksida (Univar, USA), asam klorida (Merck, Jerman), ammonium hidroksida (Merck, Jerman), iodium (Merck, Jerman), kalium iodida (Merck, Jerman), kloroform, bismut (III) nitrat (Merck, Jerman), besi (III) klorida, anisaldehyd, aluminium (III) klorida, vanillin, kalium hidroksida, asam asetat glasial, asam sulfat (Merck, Jerman), α -naftol, aseton, natrium hidroksida (Univar, USA), etanol 96%, n-heksana, etil asetat, butanol, metanol, akuades, air bebas CO₂, air demineralisata.

3.3 Alat

Plate reader (BioTek Elx808), oven (Hotpack vacuum oven), timbangan analitik (AND HR-200), rotary vacuum evaporator (Buchii), pH meter (Eutech Instruments), pipet mikro (Eppendorf), multichannel pipet (Finnpipet), alkoholmeter, inkubator (Mettler), kolom (Sephadex LH-20), spektrofotometer UV-Vis (T80+ UV/VIS spektrometer, PG Instrument Ltd), kuvet kuarsa (Merck), lempeng aluminium kromatografi lapis tipis (Merck, TLC Silica Gel 60 F₂₅₄), chamber, Spektrofotometer UV-Vis (Camag), sonikator (Elmasonic S 60 H), vortex-mixer (Model VM-2000), dan alat-alat gelas lainnya.

3.4 Prosedur Pelaksanaan

3.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap seperti diperlihatkan pada diagram alir penelitian (Lampiran 1) yang terdiri dari: tahap pertama ekstraksi simplisia, kedua fraksinasi ekstrak metanol, ketiga optimasi aktivitas α -glukosidase, keempat uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dari ekstrak dan fraksi, kelima uji kinetika penghambatan α -glukosidase dari fraksi paling aktif, dan keenam identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi paling aktif.

3.4.2 Prosedur Kerja

3.4.2.1 Penyiapan Simplisia

Simplisia herba meniran diperoleh dalam bentuk serbuk dengan ukuran 50 mesh. Berdasarkan informasi dari pihak Balitro, herba meniran yang diperoleh disortasi, dibersihkan dari pengotor dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Setelah selesai dicuci, herba meniran ditiriskan pada temperatur kamar. Herba tersebut kemudian dirajang, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di bawah sinar matahari mulai pukul 08.00 hingga 11.00. Setelah pukul 11.00, herba meniran dijemur dengan ditutup kain hitam. Proses pengeringan memerlukan waktu 5 hari dan sesekali herba dimasukkan ke dalam lemari pengering. Setelah herba meniran kering, simplisia diserbukkan dan diayak dengan ayakan 50 mesh.

3.4.2.2 Ekstraksi

Serbuk herba meniran sebanyak 1 kg diekstraksi dengan cara refluks. Cara ekstraksi dilakukan secara bertingkat. Pelarut pertama yang digunakan adalah n-heksana. Proses ekstraksi diulang sebanyak 7 kali. Ampas dipisahkan dari filtrat dengan penyaringan. Ampas hasil ekstraksi pertama dikeringkan lalu direfluks kembali dengan pelarut etil asetat. Proses refluks dengan etil asetat diulang 7 kali. Ampas hasil ekstraksi kedua direfluks dengan pelarut metanol dan diulang sebanyak 6 kali.

Pada saat refluks pertama kali, dibutuhkan pelarut sebanyak 3 liter. Sedangkan pada refluks berikutnya, pelarut yang dibutuhkan sebanyak 2 liter. Refluks dilakukan selama 30 menit dihitung setelah tetesan pelarut tetap.

Seluruh filtrat yang terkumpul dari masing-masing pelarut diuapkan dengan rotary vacuum evaporator pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan metanol. Skema ekstraksi dapat dilihat pada Lampiran 2. Ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan metanol yang diperoleh masing-masing ditimbang untuk menghitung rendemen dan kemudian disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya. Selanjutnya, ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui rendemennya.

3.4.2.3 Fraksinasi Ekstrak

Ekstrak metanol *Phyllanthus niruri* difraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam Sephadex LH-20 ($\phi = 3,7$ cm; $t = 37$ cm) dan fase gerak metanol 50%. Setiap 20 mL eluat ditampung dalam tabung reaksi. Setiap fraksi diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis. Fraksi-fraksi dengan pola absorbansi yang sama digabung. Fraksi-fraksi yang telah digabungkan dikentalkan menggunakan rotary vacuum evaporator. Setelah kental, hasil gabungan fraksi dengan jumlah yang cukup (di atas 100 mg), dilakukan pengujian penghambatan aktivitas α -glukosidase. Fraksi dengan nilai IC_{50} paling kecil diuji kandungan golongan senyawa kimia di dalamnya. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.2.4 Uji Pendahuluan (Basuki, Dewiyanti, Artanti, & Kardono, n.d.)

Uji pendahuluan dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada berbagai variasi konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, dan 20 mM, sedangkan variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 15, 20, 30, dan 40 menit. pH dan suhu tidak dioptimasi.

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 2 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), 63 μ L dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi masing-masing 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, dan 20 mM. Inkubasi awal dilakukan selama 5 menit pada suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 25 μ L larutan enzim dan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 100 μ L natrium karbonat 200 mM. p-Nitrofenol yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada λ 405 nm dengan microplate reader. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.1).

Tabel 3.1. Penambahan reagen uji pada optimasi

Reagen	Volume (μ L)	
	Uji	Kontrol
DMSO	2	2
Dapar fosfat	63	63
Substrat	10	10
Inkubasi 37°C, 5 menit		
Enzim	25	-
Natrium karbonat 200 mM	-	100
Inkubasi 37°C, 30 menit		
Enzim	-	25
Natrium karbonat 200 mM	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405$ nm		

3.4.2.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan sesuai dengan kondisi optimasi yang diperoleh. Skema uji dapat dilihat pada Lampiran 4. Berikut ini ialah prosedur dalam menentukan penghambatan aktivitas α -glukosidase:

a. Penyiapan Larutan Akarbose

Sebanyak 50,0 mg akarbose dilarutkan dalam 10,0 mL dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi larutan 5000 ppm.

b. Penyiapan Larutan Sampel

Sebanyak 10,0 mg ekstrak atau fraksi kental dilarutkan dengan 2-3 mL dimetil sulfoksida kemudian dicukupkan volumenya dengan dapar fosfat pH 6,8 pada labu ukur 10,0 mL sehingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm.

c. Pengujian Kontrol Blanko (KB)

Sebanyak 2 μ L larutan dimetil sulfoksida (DMSO) ditambah dengan 63 μ L dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μ L larutan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNP-G) 10 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian, ditambahkan 100 μ L Na₂CO₃ 200 mM dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 25 μ L larutan enzim 0,049 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada λ 405 nm.

d. Pengujian Blanko

Sebanyak 2 μ L larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 63 μ L dapar fosfat (pH 6,8) dan 10 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 25 μ L larutan enzim 0,049 U/mL, dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 100 μ L 200

mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm.

e. Pengujian Kontrol Blanko

Sebanyak 2 μL larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 63 μL dapar fosfat (pH 6,8) dan 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 100 μL 200 mM natrium karbonat, dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, tambahkan 25 μL larutan enzim 0,049 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm.

f. Pengujian Sampel

Sebanyak 2-20 μL larutan sampel (ekstrak) ditambah dengan 45-63 μL dapar fosfat (pH 6,8) dan 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,049 U/mL, dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 100 μL 200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm.

g. Pengujian Kontrol Sampel

Sebanyak 2-20 μL larutan sampel (ekstrak) ditambah dengan 45-63 μL dapar fosfat (pH 6,8) dan 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian tambahkan 25 μL 200 mM natrium karbonat dan inkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, tambahkan 25 μL larutan enzim 0,049 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm.

h. Pengujian Standar / Pembeding

Sebanyak 2-10 μL larutan standar (akarbose) ditambah dengan 55-63 μL dapar fosfat (pH 6,8) dan 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 25 μL larutan enzim 0,049 U/mL, dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, tambahkan 100 μL 200 mM natrium karbonat. Larutan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm.

i. Pengujian Kontrol Standar / Pembeding

Sebanyak 2-10 μL larutan standar (akarbose) ditambah dengan 55-63 μL dapar fosfat (pH 6,8) dan 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian tambahkan 100 μL 200 mM natrium karbonat dan inkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, tambahkan 25 μL larutan enzim 0,049 U/mL. Larutan diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm.

Tabel 3.2. Prosedur uji penghambatan aktivitas α -glukosidase

Reagen	Volume (μL)			
	B_1	B_0	S_1	S_0
Sampel / inhibitor	-	-	2-20	2-20
DMSO	2	2	-	-
Dapar fosfat	63	63	45-63	45-63
Substrat	10	10	10	10
Inkubasi 37°C, 5 menit				
Enzim	25	-	25	-
Natrium karbonat	-	100	-	100
Inkubasi 37°C, 30 menit				
Enzim	-	25	-	25
Natrium karbonat	100	-	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405 \text{ nm}$				

Keterangan : B_1 = Blanko, B_0 = Kontrol Blanko, S_1 = Sampel dan Standar (akarbose), S_0 = Kontrol Sampel dan Kontrol Standar (akarbose)

Aktivitas inhibitor α -glukosidase dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{C-S}{C} \times 100\% \quad (3.3)$$

Keterangan: S = absorbansi sampel (S_1-S_0)

C = absorbansi kontrol (DMSO), (B_1-B_0)

IC_{50} 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 sebagai berikut.

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

3.4.2.6 Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Uji kinetika penghambatan aktivitas enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, dan 20 mM (Tabel 3.6).

Tabel 3.3. Prosedur penentuan kinetika penghambatan enzim

Reagen	Volume (μ L)	
	Tanpa Inhibitor	Dengan Inhibitor
Ekstrak	-	5
DMSO	2	-
Dapar	63	63
Substrat	2,5-20	2,5-20
Inkubasi 37°C, 5 menit		
Enzim	25	25
Inkubasi 37°C, 30 menit		
Na ₂ CO ₃	100	100
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405$ nm		

Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Tetapan kinetika Michaelis-Menten dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah $1/[S]$ dan y adalah $1/A$. Jenis inhibisi dapat juga dilihat dari bentuk plot Lineweaver-Burk (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

3.4.2.7 Penapisan fitokimia dengan KLT

Fraksi paling aktif diuji kandungan golongan senyawa kimia di dalamnya dengan menggunakan KLT yang disemprot dengan penampak bercak tertentu dan pereaksi kimia.

a. Identifikasi alkaloid

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen kloroform-metanol (85:15). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot Dragendorff LP. Hasil positif akan menunjukkan warna jingga-coklat. (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984). Kontrol positif yang digunakan adalah *Chinae Cortex*.

b. Identifikasi flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot $AlCl_3$. Hasil positif akan menunjukkan warna kuning pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984). Kontrol positif yang digunakan adalah *Gendarussae Folium*.

Selain dengan KLT, identifikasi flavonoid, dapat dilakukan dengan cara : 4 mg ekstrak ditambahkan 4 mL etanol 95% hingga ekstrak larut (larutan b).

- 1) Ambil 2 mL larutan b ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian tambahkan 2 mL HCl 2N, diamkan 1 menit. Kemudian tambahkan 10 tetes HCl pekat P. Kocok perlahan, kemudian diamkan 2-5 menit. Terbentuk warna merah intensif (positif flavonoid). Kontrol positif yang digunakan adalah *Orthosiphonis Folium*.
- 2) Ekstrak ditambahkan aseton, larutkan. Kemudian tambahkan sedikit serbuk halus asam borat dan asam oksalat, panaskan hati-hati dan hindari pemanasan berlebihan. Kemudian tambahkan 10 mL eter. Amati dengan sinar ultraviolet 366nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif (positif flavonoid) (Depkes RI, 1995b).

c. Identifikasi terpenoid/sterol

Identifikasi terpenoid/sterol dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen benzen-etil asetat (90:10). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot anisaldehyd-

sam sulfat. Hasil positif akan menunjukkan warna biru kuat, hijau, merah, atau coklat pada cahaya tampak setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984). Kontrol positif yang digunakan adalah *Caryophylli Flos*.

d. Identifikasi tanin

Identifikasi tanin dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot larutan FeCl_3 10%. Hasil positif akan menunjukkan warna hijau-kehitaman (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984). Kontrol positif yang digunakan adalah *Theae Folium*.

e. Identifikasi saponin

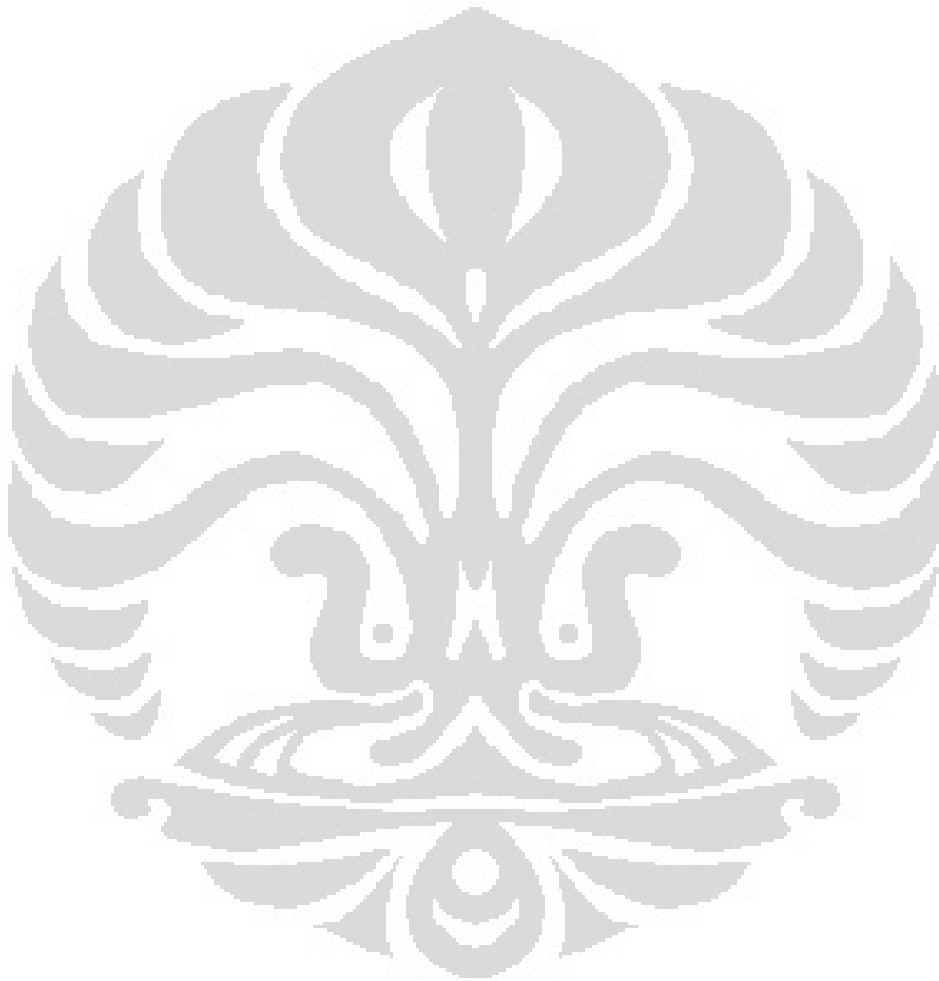
Identifikasi saponin dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (50:10:40). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot anisaldehyd-asam sulfat %. Hasil positif akan menunjukkan warna biru, biru-ungu, atau kekuningan pada cahaya tampak setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984). Kontrol positif yang digunakan adalah *Liquiritae Radix*.

f. Identifikasi antrakuinon

Identifikasi antrakuinon dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen etil asetat-metanol-aquades (100:17:13). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penyemprot anisaldehyd-asam sulfat. Warna merah pada cahaya tampak atau fluoresensi kuning di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984). Kontrol positif yang digunakan adalah *Rhei Radix*.

g. Identifikasi glikosida

Untuk identifikasi glikosida dilakukan dengan reaksi Molisch. Sebanyak 1 ml larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diuapkan di atas penangas air. Sisa ditambahkan 1 ml air dan 5 tetes Molisch LP lalu ditambahkan secara hati-hati 10 tetes asam sulfat P. Jika terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya ikatan gula (reaksi Molisch) (Depkes RI, 1979).



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Penyiapan Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah herba meniran. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia Edisi I (2008), herba meniran atau phyllanthi herba adalah seluruh bagian di atas tanah *Phyllanthus niruri* L. Simplisia herba meniran didapatkan dari Balitro (Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik), Bogor. Simplisia diperoleh dalam bentuk serbuk dengan ukuran 50 mesh. Simplisia yang didapatkan dari Balitro telah dideterminasi di LIPI Cibinong (Lampiran 1).



[Sumber : Dokumentasi pribadi]

Gambar 4.1. Tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

4.2 Ekstraksi Simplisia

Ekstraksi dilakukan secara bertingkat dengan cara refluks. Cara refluks dipilih karena golongan senyawa yang akan diuji tahan terhadap pemanasan. Cara panas ini telah digunakan pada penelitian sebelumnya oleh Masitoh (2011) dan cara refluks sudah biasa digunakan untuk uji aktivitas α -glukosidase. Keuntungan lainnya adalah cara ini memerlukan waktu yang cepat.

Ekstraksi dilakukan secara bertingkat dengan menggunakan pelarut yang meningkat kepolarannya, yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Ekstraksi

bertingkat merupakan ekstraksi yang selektif karena bagian tanaman diekstraksi menggunakan pelarut dengan kepolaran mengikuti prinsip like dissolve like. Pelarut n-heksana dipilih karena sifatnya yang nonpolar berguna untuk menarik senyawa-senyawa lipofilik seperti alkana, asam lemak, pigmen, lilin, sterol, beberapa terpenoid, alkaloid, dan kumarin. Pelarut etil asetat dengan kepolaran medium digunakan untuk menarik senyawa-senyawa semi polar seperti, beberapa alkaloid, dan flavonoid. Sementara, pelarut metanol digunakan untuk menarik senyawa-senyawa yang lebih polar seperti glikosida flavonoid, tanin, dan beberapa alkaloid. Kelebihan dari ekstraksi secara selektif ini adalah pemisahan lebih awal metabolit yang ada dalam bahan (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

Refluks dilakukan selama 30 menit dihitung setelah tetesan pelarut konstan. Filtrat hasil ekstraksi disaring dengan menggunakan penyaring Buchner agar terpisah dari ampasnya. Prosedur ekstraksi yang ideal sebaiknya exhaustive (habis-habisan) agar ekstrak yang diperoleh mengandung metabolit dalam jumlah yang besar (Sarker, Latif, & Gray, 2006). Ekstraksi dilakukan berulang terhadap ampas hingga warna ekstrak memudar. Ekstraksi dengan n-heksana dan etil asetat masing-masing dilakukan sebanyak 7 kali, sedangkan ekstraksi dengan metanol dilakukan sebanyak 6 kali.

Filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan rotary vacuum evaporator hingga didapatkan ekstrak kental. Rotary vacuum evaporator merupakan alat yang digunakan untuk menguapkan pelarut dalam jumlah banyak secara efisien dari suatu campuran (Raaman, 2006). Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang untuk menghitung persen rendemen. Data rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.1.

4.3 Fraksinasi Ekstrak

Ekstrak kental metanol yang diperoleh dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Fase diam berupa sephadex LH-20 dan sebagai fase gerak digunakan metanol 50%. Pemisahan dengan sephadex LH-20 bekerja dengan prinsip memisahkan sampel berdasarkan perbedaan berat molekul (BM). BM yang besar akan terelusi terlebih dahulu, dilanjutkan dengan BM yang

lebih kecil (Muchtar, Yusmeiarti, Yeni, 2008). Sephadex LH-20 dapat memisahkan komponen lebih selektif dan dapat digunakan kembali. Eluen dipilih campuran metanol dan air karena sephadex LH-20 didesain untuk pelarut organik atau campuran pelarut organik dengan air.

Sistem yang digunakan dalam kromatografi kolom ini adalah sistem basah, baik untuk pembuatan kolom maupun penyiapan sampel. Pembuatan kolom dilakukan dengan mensuspensikan sephadex LH-20 dalam metanol 96%, lalu dimasukkan perlahan ke dalam kolom kromatografi. Tinggi kolom yang dibuat 37 cm dan diameter 3,7 cm. Setelah fase diam sudah berada dalam kolom kromatografi, campuran eluen mulai diturunkan bertahap hingga metanol 50%. Penurunan campuran eluen secara bertahap merupakan cara yang efisien dan menjamin eluen dalam kolom merupakan eluen yang diinginkan.

Ekstrak kental metanol ditimbang saksama 5 gram dan disuspensikan dalam metanol 50%. Eluen yang ada di atas kolom disisakan sedikit diatas permukaan kolom lalu sampel dimasukkan atas kolom dilakukan dengan hati-hati. Eluat ditampung dalam tabung reaksi 20 mL dan diperoleh 101 fraksi. Fraksi-fraksi ini dilihat absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis. Penggabungan fraksi menggunakan spektrofotometer UV-Vis karena metanol dan air merupakan pelarut yang dapat digunakan untuk pengukuran dengan spektrofotometer (Williams, Fleming, 1995) dan cepat. Berdasarkan kesamaan pola absorbansi, diperoleh 22 fraksi gabungan. Hasil fraksi gabungan dikentalkan dengan rotary vacuum evaporator dibantu dengan hotpack vacuum. Hotpack vacuum diperlukan karena sulitnya menguapkan eluen (metanol-air). Fraksi gabungan yang telah kental dipilih 6 fraksi dengan jumlah fraksi di atas 100 mg untuk dilakukan uji penghambatan aktivitas α -glukosidase. Data rendemen fraksi dapat dilihat dalam Tabel 4.2.

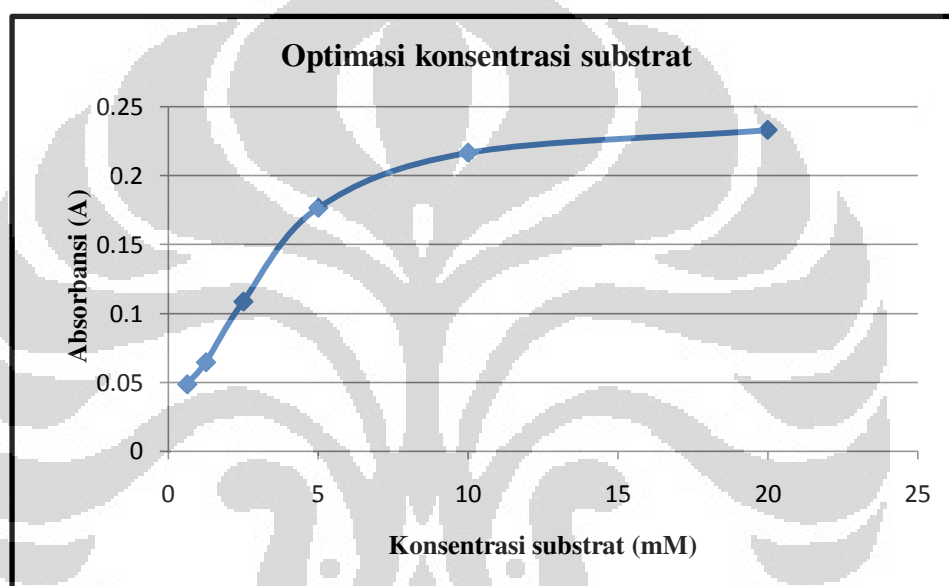
4.4 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi optimal kerja enzim. α -Glukosidase yang digunakan berasal dari *Saccharomyces cereviceae* recombinant. Sertifikat analisis α -Glukosidase terlampir pada Lampiran 7.

Universitas Indonesia

Adanya data mengenai pH optimum dan suhu stabilitas enzim memudahkan peneliti karena tidak perlu melakukan optimasi dalam hal pH dan suhu.

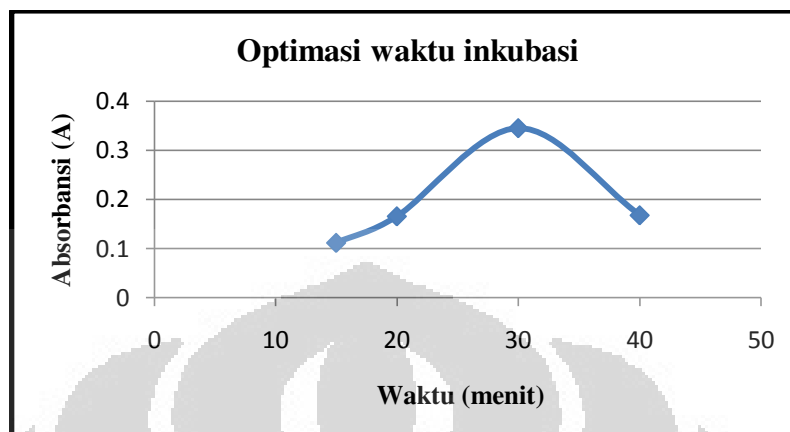
Uji pendahuluan dilakukan sebelum uji penghambatan aktivitas α -glukosidase. Konsentrasi substrat perlu dioptimasi untuk mengetahui pada konsentrasi berapa semua sisi aktif enzim terikat oleh substrat dan tidak lagi akan menghasilkan produk. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan natrium karbonat (Kikkoman, 2001) karena pada suasana basa reaksi enzimatik akan terhenti.



Gambar 4.2. Grafik optimasi aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat

Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa konsentrasi substrat optimum adalah 10 mM. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 20 mM substrat telah jenuh berikatan dengan enzim. Data serapan optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.3. Setelah ditetapkan konsentrasi substrat 10 mM sebagai konsentrasi optimum, optimasi waktu inkubasi dapat dilakukan. Optimasi waktu inkubasi awalnya hanya akan dilakukan pada tiga titik, yaitu 15, 20, dan 30 menit. Akan tetapi, hingga waktu inkubasi 30 menit belum menunjukkan kondisi optimum sehingga dilakukan percobaan waktu inkubasi 40 menit. Hasilnya,

terjadi penurunan absorbansi yang signifikan. Data serapan optimasi waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 4.4.



Gambar 4.3. Grafik optimasi aktivitas enzim dengan beberapa waktu inkubasi

Penurunan absorbansi yang terjadi pada waktu inkubasi 40 menit diperkirakan karena terbentuknya produk inhibitor dari reaksi enzim. Produk inhibitor dapat menghambat aktivitas enzim. Produk inhibitor tersebut adalah α -D-glukosa. Pernyataan ini didukung oleh Xiaojie Yao, Mauldin, dan Byers (2003) yang menyatakan bahwa 25 analog D-glukosa yang diuji memiliki peran sebagai penghambat reversibel dari α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* recombinant. Berdasarkan hasil yang diperoleh, waktu inkubasi optimum yang digunakan untuk uji penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase adalah 30 menit.

4.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

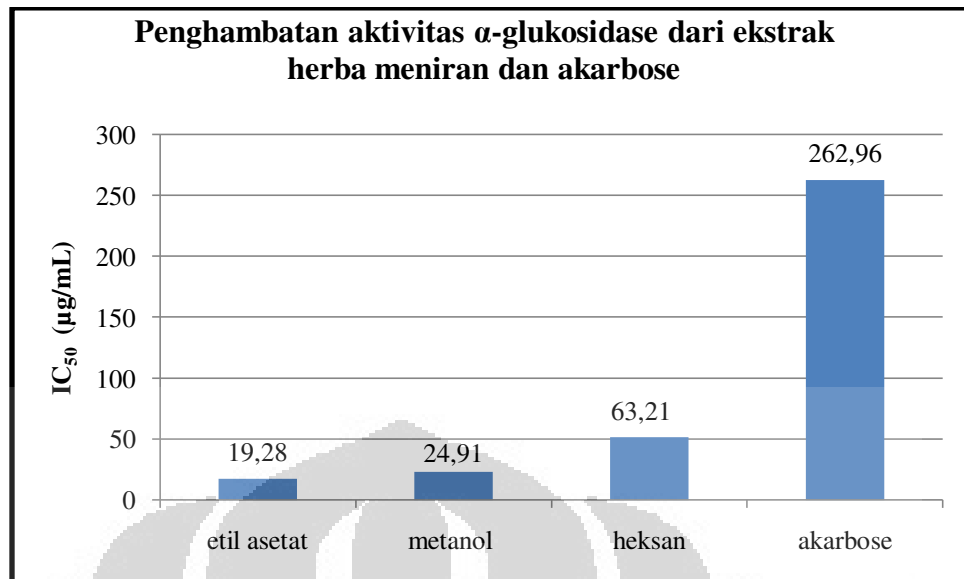
Penghambatan aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan nilai absorbansi sampel (S) dengan blanko (B). Larutan sampel (S_1) diinkubasi selama 5 menit bersama dengan dapar fosfat (pH 6,8) dan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 10 mM. Setelah itu, campuran direaksikan dengan α -glukosidase 0,049 U/mL dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Kemudian, ditambahkan natrium karbonat untuk menghentikan reaksi enzimatik tersebut. 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 absorbansi pada panjang gelombang sekitar 405 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. Produk yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida diukur serapannya pada panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum 405 nm.

Proses inkubasi terdiri dari dua tahap. Tahap pertama, inkubasi selama 5 menit bertujuan untuk memberikan waktu bagi larutan uji untuk mencapai suhu 37°C . Sedangkan pada tahap kedua, inkubasi selama 30 menit untuk reaksi enzimatik. Unit enzim yang digunakan dalam uji pendahuluan ini adalah 0,049 U/mL. Perhitungan unit larutan enzim dapat dilihat dalam Lampiran 5.

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.

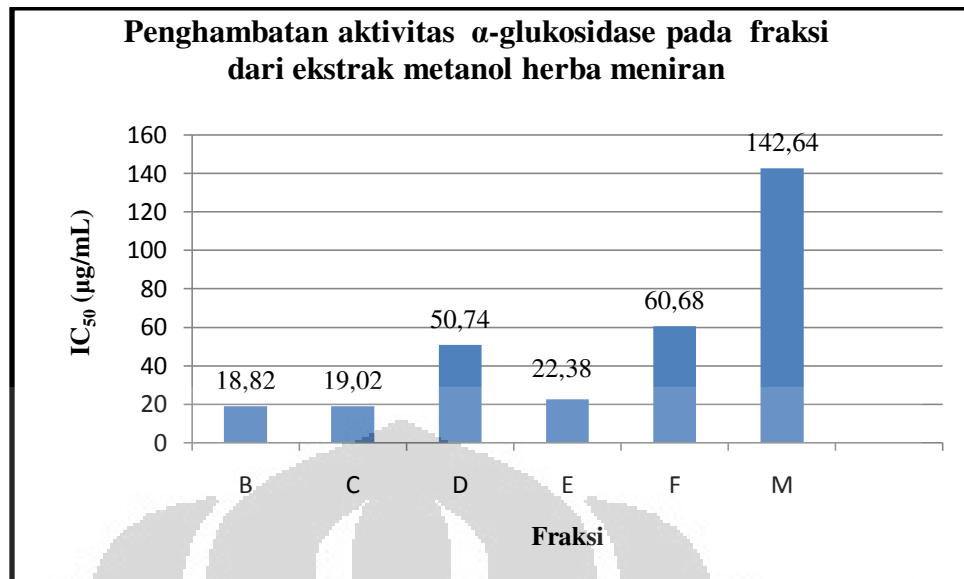
Ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan metanol masing-masing diuji penghambatan aktivitas α -glukosidase dan diperoleh data sebagai berikut.



Gambar 4.4. Grafik penghambatan aktivitas α -glukosidase dari ekstrak herba meniran dan akarbose

Berdasarkan grafik di atas, terlihat bahwa ekstrak metanol merupakan ekstrak paling aktif kedua dengan nilai IC₅₀ sebesar 24,91 µg/mL. Sedangkan, akarbose sebagai pembanding memiliki nilai IC₅₀ sebesar 262,96 µg/mL. Penelitian lain menyebutkan bahwa akarbose memiliki nilai IC₅₀ sebesar 217 µg/mL (Wu, et al., 2012). Pengujian tersebut menggunakan α -glukosidase yang berasal dari jamur dan pengujian dilakukan dengan microplate reader.

Setelah ketiga ekstrak diuji, fraksi ekstrak metanol diperoleh fraksi-fraksi yang digabungkan dengan spektrofotometri UV-Vis. Fraksi-fraksi gabungan yang ada dipilih untuk diuji kemampuan penghambatan α -glukosidase. Fraksi dipilih berdasarkan jumlahnya yang diatas 100 mg karena selanjutnya fraksi yang aktif akan diuji kandungan senyawa kimia di dalamnya. Berdasarkan hasil pengujian, terlihat bahwa fraksi B merupakan fraksi paling aktif dengan IC₅₀ = 18,82 µg/mL, diikuti oleh fraksi C dan fraksi E.

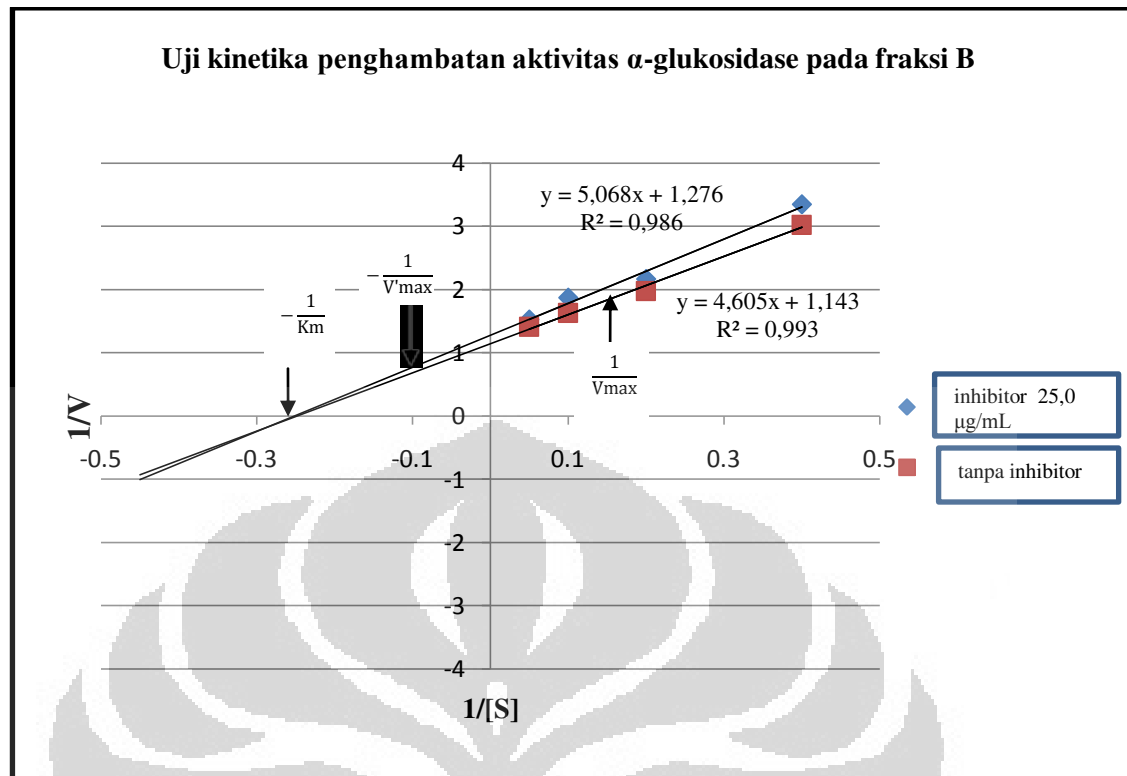


Gambar 4.5. Grafik penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi dari ekstrak metanol herba meniran

Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase menggunakan microplate reader. Microplate reader ini dipilih karena pengukuran enzimatik dapat berlangsung dengan cepat dan banyaknya sampel yang diukur lebih banyak. Selain itu, jumlah sampel yang digunakan jauh lebih sedikit karena dalam satuan mikroliter. Akan tetapi, metode ini juga memiliki kekurangan. Jumlah sampel yang terlalu sedikit menyebabkan adanya kesalahan sedikit saja akan sangat mempengaruhi hasil pengukuran enzimatik.

4.6 Uji 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 2,5 mM, 5 mM, 10 mM dan 20 mM.



Gambar 4.6. Grafik uji kinetika penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi B

Hasil uji kinetika penghambatan enzim menunjukkan bahwa fraksi B dari ekstrak metanol herba meniran memiliki tipe penghambatan nonkompetitif. Pernyataan tersebut dapat dilihat dari Gambar 4.6. yang memperlihatkan antara sistem tanpa inhibitor dengan sistem yang mengandung inhibitor 25,0 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai K_m yang sama. Inhibitor yang memiliki tipe penghambatan nonkompetitif tidak memiliki kemiripan dengan substrat dan berikatan dengan permukaan enzim pada sisi selain sisi aktif (Seager, Slabaugh, 2008). Pengujian lain yang memiliki tipe penghambatan nonkompetitif terhadap α -glukosidase adalah ekstrak air dari *Rhus chinensis* (Chinese gall) (Shim, et al., 2003) dan ekstrak air dari *Cymbopogon martinii* (Roxb.) (Ghadyale, Takalikar, Haldavnekar, Arvindekar, 2012).

4.7 Identifikasi Kandungan Kimia

Kandungan kimia fraksi B yang diidentifikasi adalah alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, antrakuinon, dan ikatan gula. Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi B mengandung flavonoid dan ikatan gula. Adanya flavonoid dalam herba meniran sesuai dengan literatur. Penelitian yang dilakukan oleh Sabir dan Rocha (2008) menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari daun meniran mengandung flavonoid. Pendeteksian flavonoid dilakukan dengan menggunakan KLT dengan pembanding *Gendarussae Folium* (Gambar 4.7.) Selain KLT, dilakukan juga uji dengan menggunakan serbuk oksalat-asam borat dan serbuk seng (4.8.)

Flavonoid sering terdapat dalam bentuk glikosida (Robinson, 1995). Kemungkinan besar, flavonoid dalam fraksi B adalah flavonoid dalam bentuk glikosida. Oleh sebab itu, pengujian glikosida dilakukan dengan reaksi Molisch yang menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya cincin ungu. Hasil positif dari reaksi Molisch menunjukkan bahwa senyawa memiliki ikatan gula. Pada reaksi Molisch, dibutuhkan asam sulfat P untuk menghidrolisis karena glikosida mudah terhidrolisis menjadi aglikon (bagian bukan gula) dan glikon (bagian gula).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

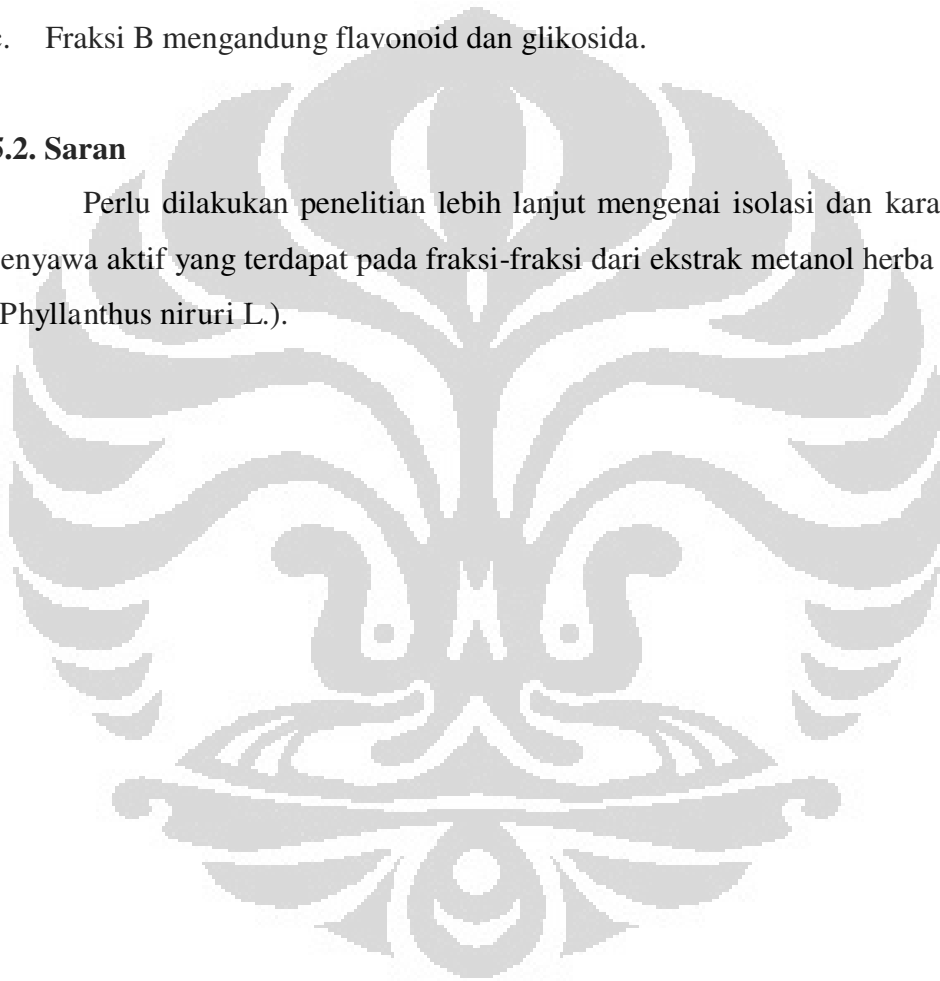
5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini, antara lain:

- a. Fraksi teraktif dari ekstrak metanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) adalah fraksi B dengan nilai IC_{50} 18,82 μ g/mL.
- b. Fraksi B memiliki tipe penghambatan nonkompetitif.
- c. Fraksi B mengandung flavonoid dan glikosida.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan karakterisasi senyawa aktif yang terdapat pada fraksi-fraksi dari ekstrak metanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.).



DAFTAR ACUAN

- Backer, A.C. & van den Brink, B.C.R. (1965). *Flora of Java (Vol 1)*. The Netherlands: NVP Noordhof-Groningen.
- Basuki, T., Dewiyanti, I. D., Artanti, N., & Kardono, L. (n.d.). Evaluasi aktivitas daya hambat terhadap enzim alfa glukosidase dari ekstrak kulit batang, daun, bunga dan buah kemuning (*Murraya paniculata* (L.) JACK.).
- Bayer. (2008). *Precose (acarbose tablets)*. USA: Bayer Healthcare Pharmaceuticals.
- Ceriello, A. (2005). Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes* 54, 1–7.
- Chisholm-Burns, M.A., et al. (2008). *Pharmacotherapy principles and practice*. New York : McGraw-Hill.
- Corwin, E.J. (2001). *Buku saku patofisiologi (Brahm U. Pendit, Penerjemah)*. Jakarta: EGC.
- Coulson, C.J. (1994). *Molecular mechanism of drugs action (2nd ed.)*. London: Taylor & Francis.
- Daniel, M. (2006). *Medicinal Plants Chemistry and Properties*. USA: Science.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1978). *Materia Medika Indonesia jilid II*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Materia Medika Indonesia jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan RI. (2005). *Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes melitus*. Jakarta: Dirjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan
- Dimiyati, V. (2011, Nov 14). Diabetes, RI Urutan Empat Terbesar. *Jurnal Nasional*, 9.Februari 14, 012. <http://www.jurnas.com/halaman/9/2011-11-14/188943>.

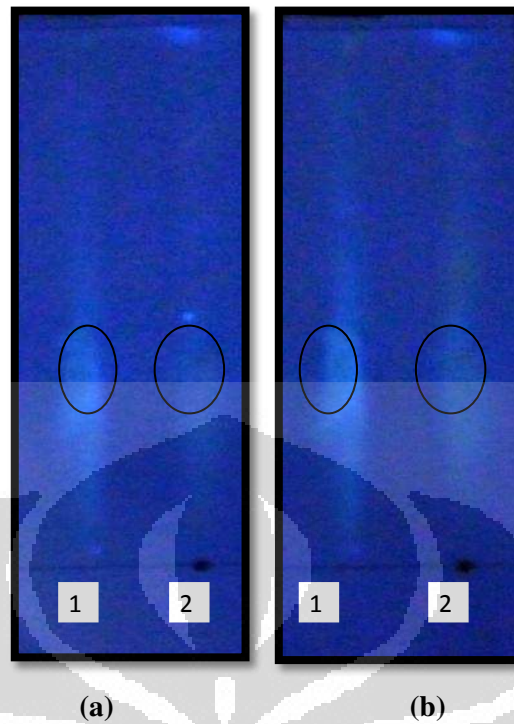
- Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., & Posey, L.M. (2005). *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. New York: McGraw-Hill Companies.
- Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian Dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2005). *Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes melitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ebadi, M. (2007). *Pharmacodynamic basis of herbal medicine second edition*. North Dakota: CRC Press.
- Flaws, B., Kuchinski, L., Casañas, R.J. (2002). *The treatment of diabetes mellitus with chinese medicine*. Western Ave : Blue Poppy Press.
- Fowler, M.J. (2010). *Diabetes Treatment: Oral Agents*. *Clinical Diabetes* 28, 2010.
- Ghadyale, V., Takalikal, S., Haldanevkar, V., Arvindekar, A. (2012). Effective control of postprandial glucose leve; through inhibition of intestinal alpha glucosidase by *Cymbopogon martini* (Roxb.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 1-6.
- Greiner Bio-One. (2004). *Application note UV/VIS spectroscopy in microplates*. USA.
- Gritter, R., Bobbit, J., & Schwarting, A. (1985). *Pengantar kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode fitokimia*. (Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Holman, R.R., Cull C.A., & Turner R.C. (1999). A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care* 22, 960-964.
- Hsieh, P.C., Huang, G.J., Ho Y.L., Lin, Y.H., Huang, S.S., Chiang, Y.C., Tseng, M.C., Chang, Y.S. (2010). Activities of antioxidant, α -glucosidase inhibitors and aldose reductase inhibitors of the aqueous extracts of four *Flemingia* species in Taiwan. *Botanical Studies* 51, 293-302.
- Hurtubise, R.J. (2002). *Adsorption Chromatography*. Jack Cazes (Ed.). *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker.
- International Diabetes Federation. (2011). One adult in ten will have diabetes by 2030. Februari 14, 2012. International Diabetes Federation's 5th edition of the *Diabetes Atlas*. <http://www.idf.org/media-events/press-releases/2011/diabetes-atlas-5th-edition>.

- Johson, D.S., Jie Jack Li. (2007). *The art of drug synthesis*. USA: John Wiley & Sons.
- Joo H. Kang., Je-Kyun Park. (2005). Development of a microplate reader compatible microfluidic device for enzyme assay. *Sensors and Actuators B* 107, 980–985.
- Joo, H.J., et al. (2006). The hypoglycemic effect of *Saururus chinensis* Baill in animal models of diabetes melitus. *Food Science and Biotechnology* 15, 413-417.
- Kikkoman. (2001). α -Glucosidase (α GLS-SE) from recombinant E. Coli. 95-98.
- Linn, W.D., Wofford, M.R., O’Keefe, M.E., & Pose, L.M. (2009). *Pharmacotherapy in primary care*. New York: McGraw-Hill.
- Masitoh,S. (2011). Penapisan fitokimia ekstrak etanol beberapa tanaman obat Indonesia serta uji aktivitas anti diabetes melitus melalui penghambatan *enzim* α -glukosidase. Depok: Universitas Indonesia.
- Muchtar, H., Yusmeiarti, Yeni, G. (2008). Pengaruh jenis absorban dalam proses isolasi katechin gambir. *Jurnal Riset Industry* 2, 14-23.
- Murray, R.K., Granner, D.K.,& Rodwell, V.W. (2009). *Biokimia harper edisi 27* (Brahm U. Pendit, Penerjemah). Jakarta: EGC.
- Okoli, C. O., Ibiam, A. F., Ezike, A. C., Akah, P. A., dan Okoye, T. C. (2010). Evaluation of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. *African Journal of Biotechnology* 9, 248-259.
- PT Eisai Indonesia. (1986). *Medicinal herb index in Indonesia*. Japan: PT Eisai Indonesia.
- Raaman, N. (2006). *Phytochemical Techniques*. New Delhi: New India Publishing Agency.
- Ram, V.J. (2001). Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents. *Drug News Perspect* 14, 353.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan organik tumbuhan tinggi edisi keenam* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Sabir, S.M., Rocha, J.B.T. (2008). Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. *Food Chemistry* 111, 845-851.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. (2006). *Natural product isolation* (2nd ed.). USA: Humana Press.

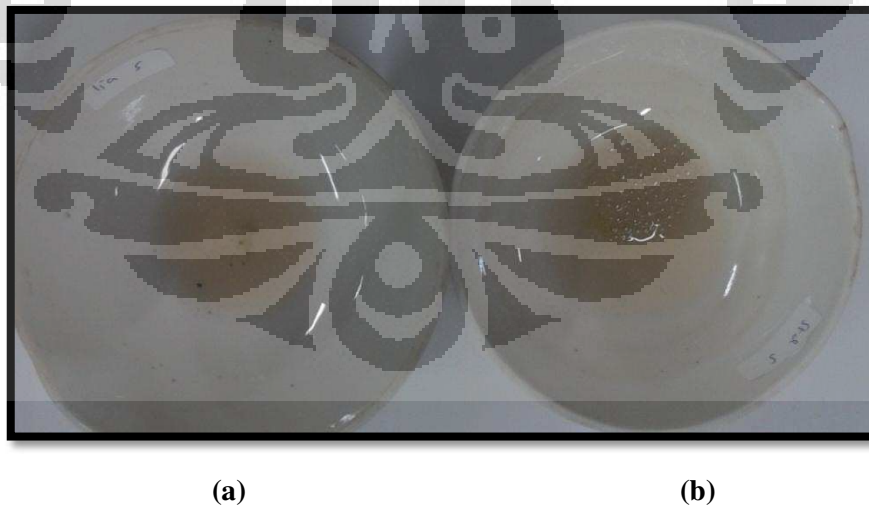
- Seager, L.S., Slaubaugh, M.R. (2008). Organic and biochemistry for today. USA: Thomson Learning.
- Shim, et al. (2003). Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of Ethnopharmacology* 85, 283-287.
- Sudjadi. (1988). Metode Pemisahan. Yogyakarta: Kanisius.
- Sukandar, E.Y., Andrajati, R., Sigit, J.I., Adnyana, I.K., Setiadi, A.A.P., & Kusnandar. (2008). *Isofarmakoterapi*. Jakarta: PT. ISFI.
- Taylor, Leslie. (2003). Technical data report for Chanca piedra. Austin: Saga Press.
- The British Pharmacopoeia Commission. (2008). *British pharmacopoeia 2009*. London: Crown.
- Tjay, T.H., & Rahardja, K. (2007). *Obat-obat penting*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, EM. (1984). *Plant drug analysis*. Springer: Jerman.
- Williams, D.H., Fleming, Ian. (1995). *Spectroscopic methods in organic chemistry (5th ed.)*. Great Britain : Bath Press.
- Williams, G. dan Pickup, J.C. (2004). *Handbook of diabetes (3rd ed.)*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Wu, et al. (2012). The α -glucosidase inhibiting isoflavones isolated from *Belamcanda chinensis* leaf extract. *Records of Natural Product* 2, 110-120.



GAMBAR



Gambar 4.7. Kromatogram flavonoid fraksi B (1) dan standar *Gendarussae Folium* (2) dengan eluen butanol: asam asetat: air (4:1:5), saat sebelum (a) dan sesudah (b) disemprot larutan penampak noda AlCl_3 5% di bawah sinar UV 366 nm



Gambar 4.8. Identifikasi flavonoid fraksi B (a) dan standar *Orthosiphonis Folium* (b) dengan pereaksi serbuk seng



Tabel 4.1. Rendemen ekstrak herba meniran

Ekstrak	Berat simplisia (g)	Berat ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
n-heksana	2017,5	107,2	5,31
Etil asetat		62,4	3,09
Metanol		175,5	8,70

Tabel 4.2. Rendemen fraksi dari ekstrak metanol herba meniran

Fraksi	Berat ekstrak metanol (mg)	Berat fraksi (mg)	Rendemen (%)
B	5132,8	837,6	16,32
C		536,2	10,44
D		124	2,42
E		114,8	2,24
F		111,1	2,16
M		101,5	1,98

Tabel 4.3. Optimasi aktivitas enzim dengan beberapa konsentrasi substrat

Konsentrasi Substrat (mM)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	U-K
		A ₁	A ₂			
0,625	Uji (U)	0,058	0,048	0,053	13,34	0,0485
	Kontrol (K)	0,003	0,006	0,0045	47,14	
1,25	Uji (U)	0,069	0,071	0,07	2,02	0,0645
	Kontrol (K)	0,011	0	0,0055	141,42	
2,5	Uji (U)	0,118	0,116	0,117	1,21	0,1085
	Kontrol (K)	0,008	0,009	0,0085	8,32	
5	Uji (U)	0,172	0,182	0,177	3,99	0,1765
	Kontrol (K)	0,001	0	0,0005	141,42	
10	Uji (U)	0,22	0,226	0,223	1,90	0,2165
	Kontrol (K)	0,003	0,01	0,0065	76,15	
20	Uji (U)	0,259	0,239	0,249	5,68	0,233
	Kontrol (K)	0,016	0,016	0,016	13,34	

Tabel 4.4. Optimasi aktivitas enzim dengan beberapa waktu inkubasi

Waktu Inkubasi (menit)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	U - K
		A ₁	A ₂			
15	Uji (U)	0,113	0,114	0,1135	0,62	0,1115
	Kontrol (K)	0,003	0,001	0,002	70,71	
20	Uji (U)	0,193	0,188	0,1905	1,856	0,1655
	Kontrol (K)	0,025	0,025	0,025	0	
30	Uji (U)	0,345	0,362	0,3535	3,40	0,345
	Kontrol (K)	0,002	0,015	0,0085	108,15	
40	Uji (U)	0,169	0,187	0,178	7,15	0,1676
	Kontrol (K)	0,098	0,11	0,0104	81,59	

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo); % RSD= Standar deviasi relatif.

Tabel 4.5. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada akarbose

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
		A_1	A_2						
50,0	S_1	0,499	0,549	0,524	6,75	0,512	12,7768	262,96	
	S_0	0,011	0,013	0,012	11,79				
100,0	S_1	0,458	0,476	0,467	2,73	0,458	21,9761		
	S_0	0,011	0,007	0,009	31,43				
150,0	S_1	0,433	0,413	0,423	3,34	0,401	31,6865		
	S_0	0,024	0,02	0,022	12,86				
200,0	S_1	0,372	0,383	0,3375,	2,30	0,354	39,693		
	S_0	0,029	0,018	0,0235	33,10				
250,0	S_1	0,356	0,326	0,341	6,22	0,311	47,0187		
	S_0	0,026	0,034	0,03	18,86				
B (Blanko)						0,587			
Persamaan regresi						$y = 4,77 + 0,172 x$			

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian

Tabel 4.6. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak etil asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A ₁	A ₂					
10,9	S ₁	0,722	0,735	0,7285	1,26	0,421	36,67	19,28
	S ₀	0,299	0,316	0,3075	3,91			
21,8	S ₁	0,701	0,724	0,7125	2,28	0,2976	55,21	
	S ₀	0,384	0,445	0,4145	10,41			
32,7	S ₁	0,645	0,621	0,633	2,68	0,203	69,54	
	S ₀	0,431	0,429	0,43	0,33			
43,6	S ₁	0,623	0,609	0,616	1,61	0,107	83,87	
	S ₀	0,512	0,506	0,509	0,83			
54,5	S ₁	0,578	0,588	0,583	1,21	0,012	98,20	
	S ₀	0,566	0,575	0,5705	1,12			
B (Blanko)						0,6645		
Persamaan regresi						$y = 23,18 + 1,391 x$		

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo); S₁= Sampel; S₀= Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.7. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak metanol

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
10,7	S_1	0,437	0,422	0,4295	2,47	0,355	45,89	24,91
	S_0	0,074	0,075	0,0745	0,95			
26,75	S_1	0,432	0,42	0,426	1,99	0,338	48,48	
	S_0	0,053	0,123	0,088	56,25			
53,5	S_1	0,589	0,495	0,542	12,26	0,25	61,90	
	S_0	0,304	0,28	0,292	5,81			
80,25	S_1	0,305	0,376	0,3405	14,74	0,153	76,68	
	S_0	0,142	0,233	0,1875	34,32			
107,0	S_1	0,341	0,311	0,326	6,51	0,076	88,41	
	S_0	0,256	0,244	0,25	3,394			
B (Blanko)						0,6561		
Persamaan regresi						$y = 38,44 + 0,464 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.8. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak n-heksana

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
12,2	S_1	0,496	0,496	0,496	0	0,4875	25,41	63,21
	S_0	0,007	0,01	0,0085	24,96			
24,4	S_1	0,436	0,5	0,468	9,67	0,4595	30,90	
	S_0	0,005	0,012	0,0085	58,23			
30,5	S_1	0,446	0,442	0,444	0,64	0,4345	34,66	
	S_0	0,012	0,007	0,0095	37,22			
61	S_1	0,379	0,391	0,385	2,20	0,3695	44,44	
	S_0	0,013	0,018	0,0155	22,81			
91,5	S_1	0,236	0,261	0,2485	7,11	0,222	66,62	
	S_0	0,032	0,021	0,0265	29,35			
B (Blanko)						0,665		
Persamaan regresi						$y = 18,52 + 0,498 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.9. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi B

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
10,0	S_1	0,444	0,437	0,4405	1,12	0,352	46,35	18,82
	S_0	0,086	0,091	0,0885	3,99			
25,0	S_1	0,42	0,365	0,3925	9,91	0,32	51,23	
	S_0	0,064	0,081	0,0725	16,58			
50,0	S_1	0,305	0,286	0,2955	4,55	0,2235	65,94	
	S_0	0,076	0,068	0,072	7,86			
75,0	S_1	0,108	0,179	0,1435	34,99	0,0745	88,64	
	S_0	0,075	0,063	0,069	12,30			
100,0	S_1	0,105	0,121	0,113	10,01	0,0395	93,98	
	S_0	0,075	0,072	0,0735	2,89			
B (Blanko)						0,6561		
Persamaan regresi						$y = 39,1 + 0,579 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.10. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi C

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
10,20	S_1	0,392	0,394	0,393	0,36	0,386	36,93	19,02
	S_0	0,006	0,008	0,007	20,20			
25,50	S_1	0,357	0,361	0,359	0,79	0,347	43,30	
	S_0	0,011	0,013	0,012	11,79			
51,0	S_1	0,229	0,230	0,2295	0,31	0,2155	64,79	
	S_0	0,015	0,013	0,014	10,10			
76,50	S_1	0,175	0,108	0,1415	14,49	0,1230	79,90	
	S_0	0,024	0,020	0,0185	15,29			
102,0	S_1	0,102	0,107	0,1045	3,38	0,0795	87,01	
	S_0	0,029	0,021	0,025	22,63			
B (Blanko)						0,612		
Persamaan regresi						$y = 31,51 + 0,972 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.11. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi D

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
10,9	S_1	0,515	0,473	0,494	6,01	0,4825	18,91	50,74
	S_0	0,008	0,015	0,0115	43,04			
27,25	S_1	0,385	0,369	0,377	3,00	0,3535	40,59	
	S_0	0,027	0,020	0,0235	39,12			
54,5	S_1	0,267	0,265	0,266	0,53	0,253	57,48	
	S_0	0,012	0,014	0,013	10,88			
81,75	S_1	0,201	0,195	0,198	2,14	0,184	69,08	
	S_0	0,016	0,012	0,014	20,20			
109,0	S_1	0,176	0,166	0,171	4,14	0,106	82,18	
	S_0	0,068	0,062	0,065	6,53			
B (Blanko)						0,595		
Persamaan regresi						$y = 19,20 + 0,607 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.12. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi E

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
10,3	S_1	0,312	0,391	0,3515	15,89	0,347	43,94	22,38
	S_0	0,005	0,004	0,0045	15,71			
25,75	S_1	0,297	0,313	0,305	3,71	0,282	54,44	
	S_0	0,019	0,027	0,023	24,60			
51,5	S_1	0,294	0,324	0,309	6,87	0,245	60,42	
	S_0	0,055	0,073	0,064	19,89			
77,25	S_1	0,275	0,289	0,282	3,51	0,19	69,30	
	S_0	0,100	0,084	0,092	12,30			
103,0	S_1	0,225	0,243	0,234	5,44	0,102	83,52	
	S_0	0,130	0,134	0,132	2,14			
B (Blanko)						0,619		
Persamaan regresi						$y = 41,18 + 0,394 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.13. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi F

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
10,5	S_1	0,448	0,474	0,461	3,99	0,4405	28,37	60,68
	S_0	0,026	0,015	0,0205	37,94			
26,25	S_1	0,481	0,469	0,475	1,79	0,4235	31,14	
	S_0	0,056	0,047	0,0515	12,36			
52,5	S_1	0,45	0,471	0,4605	3,22	0,3345	45,61	
	S_0	0,136	0,116	0,126	11,22			
78,75	S_1	0,431	0,437	0,434	0,98	0,243	60,49	
	S_0	0,196	0,186	0,191	3,70			
105,0	S_1	0,427	0,400	0,4135	4,62	0,183	70,24	
	S_0	0,24	0,221	0,2305	5,83			
B (Blanko)						0,615		
Persamaan regresi						$y = 41,18 + 0,394 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.14. Penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi M

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
10,20	S_1	0,663	0,661	0,662	0,21	0,615	1,60	142,64
	S_0	0,05	0,044	0,047	9,03			
25,50	S_1	0,711	0,676	0,6935	3,57	0,568	9,12	
	S_0	0,134	0,117	0,1255	9,58			
51,0	S_1	0,737	0,725	0,731	1,16	0,5155	17,52	
	S_0	0,221	0,21	0,2155	3,61			
76,50	S_1	0,797	0,813	0,805	1,41	0,448	28,32	
	S_0	0,343	0,371	0,357	5,55			
102,0	S_1	0,909	0,924	0,9165	1,16	0,407	34,88	
	S_0	0,544	0,475	0,5095	9,58			
B (Blanko)						0,625		
Persamaan regresi						$y = 0,075 + 0,35 x$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel; % RSD= Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

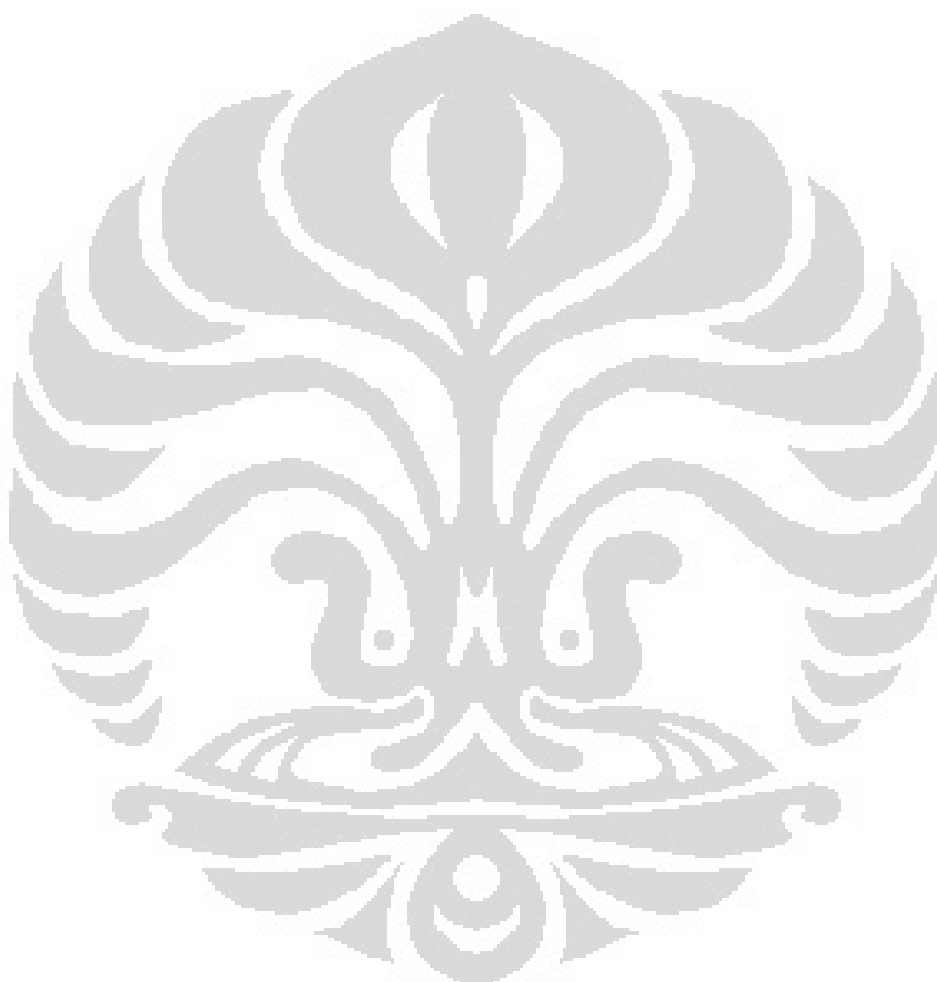
Tabel 4.15. Hasil uji kinetika penghambatan aktivitas enzim fraksi B

Konsentrasi Substrat (mM)	Serapan			1/S	1/ V_0	1/ V_1	1/ V_2
	V_0	V_1	V_2				
20	0,711	0,656	0,564	0,05	1,406	1,524	1,773
10	0,615	0,534	0,464	0,1	1,626	1,873	2,155
5	0,506	0,462	0,358	0,2	1,976	2,164	2,793
2,5	0,331	0,299	0,322	0,4	3,021	3,344	3,106

Keterangan : V_0 = Tanpa inhibitor; V_1 = inhibitor 25,0 $\mu\text{g/mL}$; V_2 = inhibitor 50,0 $\mu\text{g/mL}$

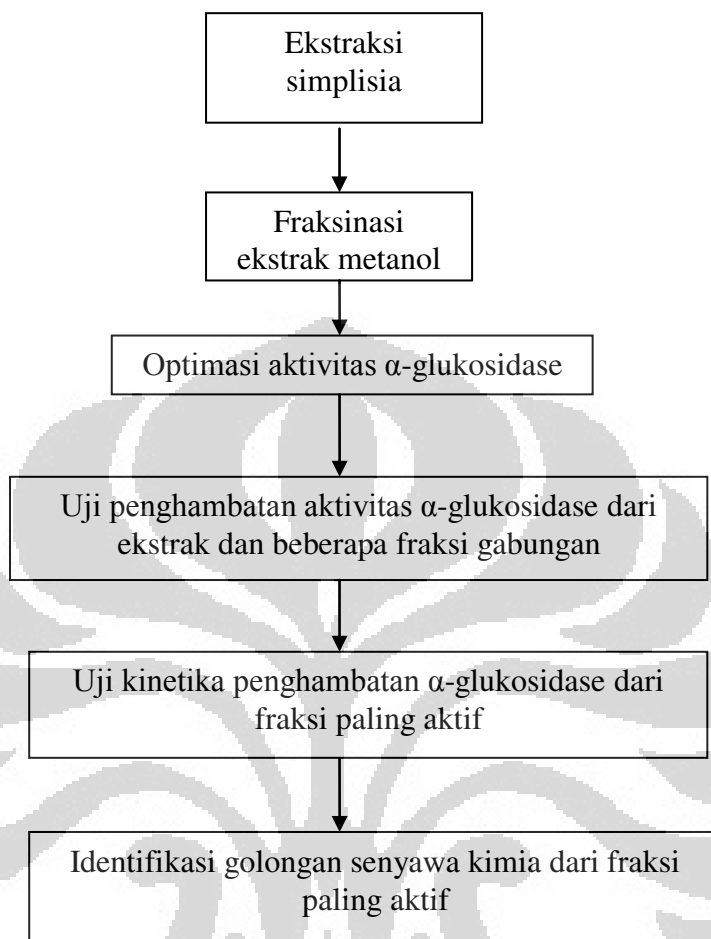
Tabel 4.16. Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten fraksi B 25,0 $\mu\text{g/mL}$

	a	b	V_{\max}	K_m
Tanpa inhibitor	1,143	4,605	0,87	4,03
Inhibitor 25,0 $\mu\text{g/mL}$	1,276	5,068	0,78	3,97

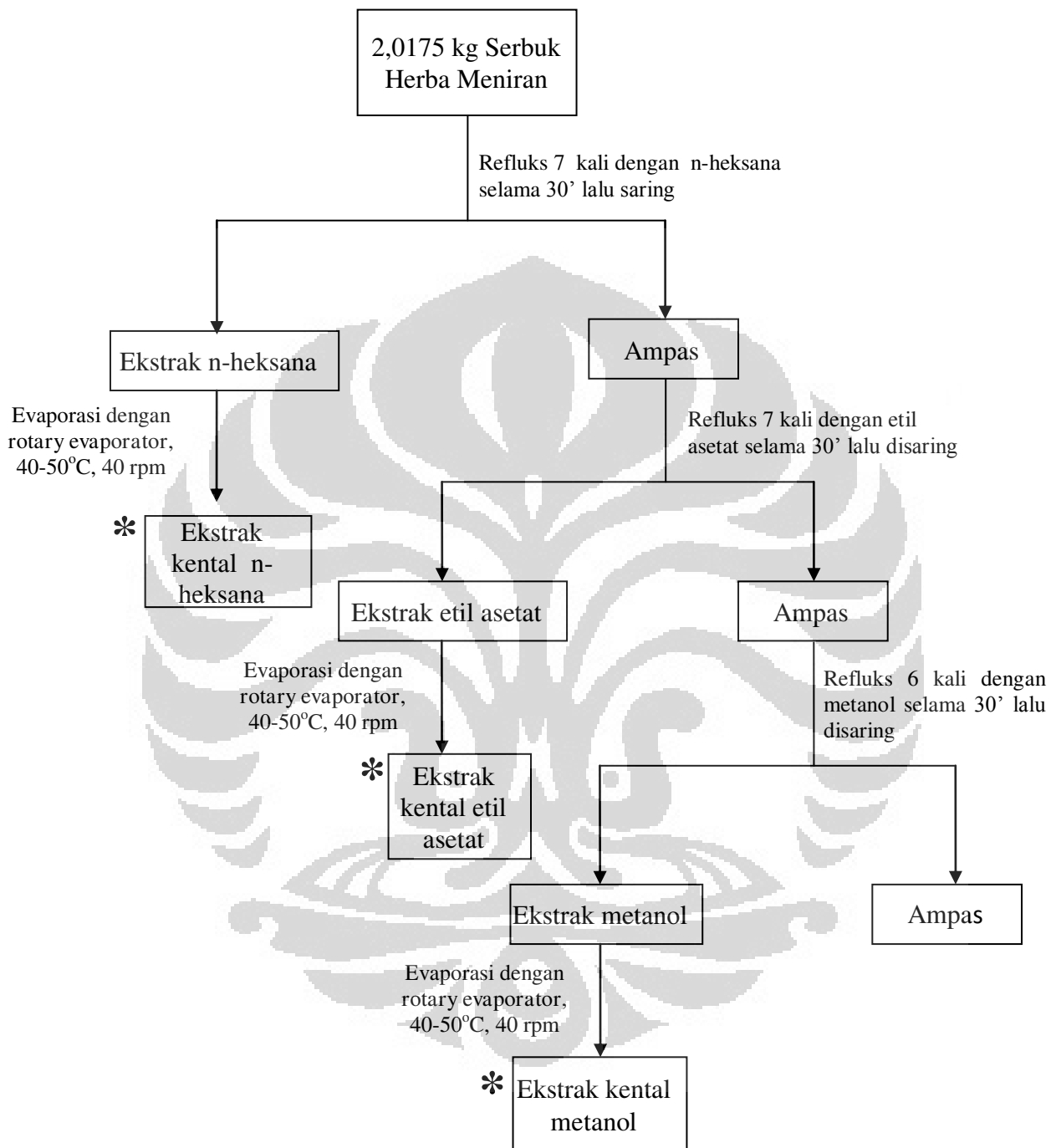




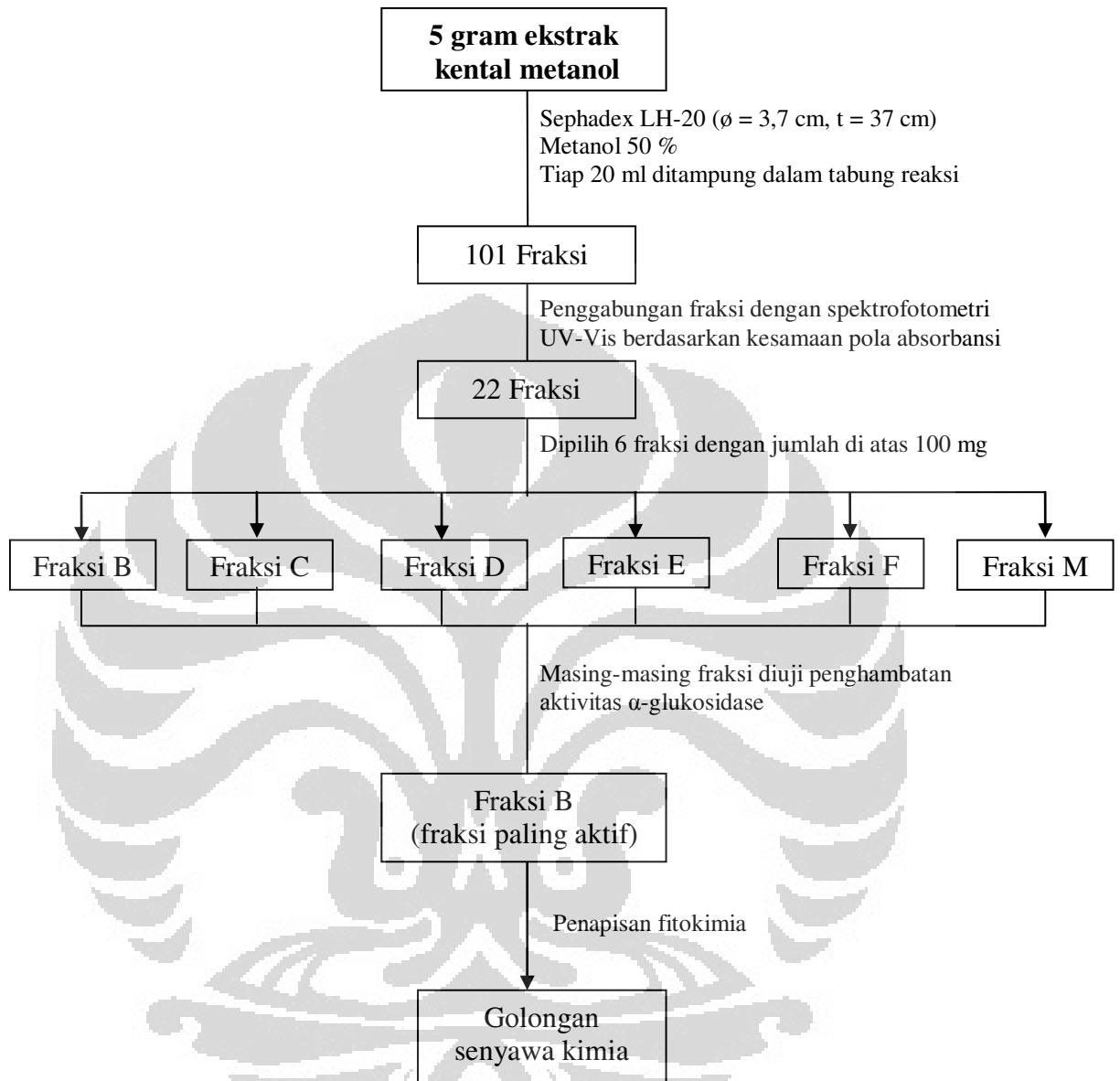
LAMPIRAN

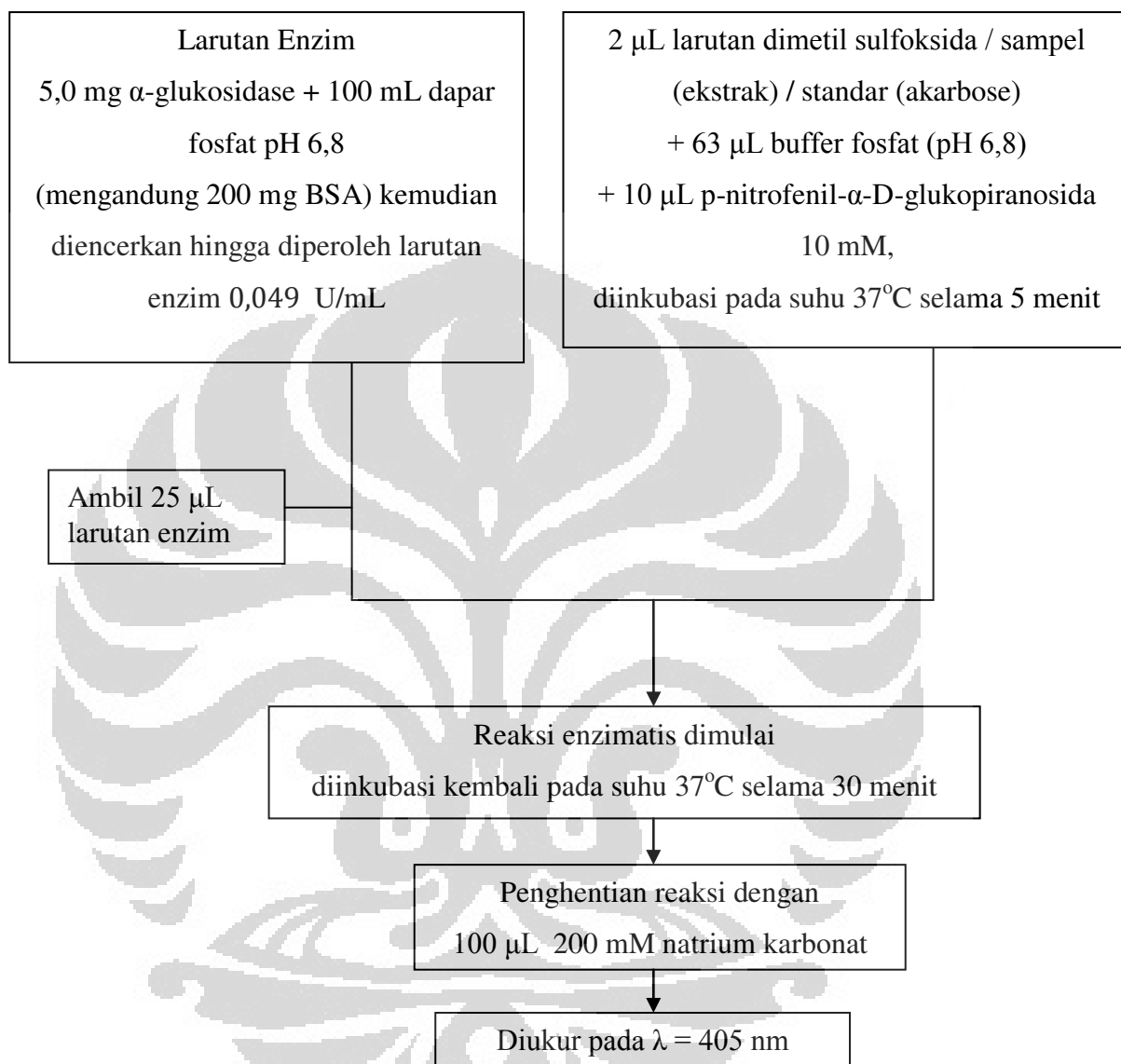
Lampiran 1. Diagram alir penelitian

Lampiran 2. Skema ekstraksi



* Diuji penghambatan aktivitas α -glukosidase.

Lampiran 3. Skema fraksinasi

Lampiran 4. Skema uji penghambatan aktivitas α -glukosidase

Lampiran 5. Cara perhitungan unit larutan α -glukosidase

Label yang terdapat pada kemasan α -glukosidase adalah 15,2 mg; 23 % protein; 215 Unit/mg protein

$$\text{Jumlah protein} = \frac{23}{100} \times 15,2 \text{ mg serbuk} = 3,496 \text{ mg protein.}$$

Penimbangan α -glukosidase untuk pengujian sejumlah 5,0 mg serbuk

$$\frac{5,0 \text{ mg serbuk}}{15,2 \text{ mg serbuk}} \times 3,496 \text{ mg protein} = 1,15 \text{ mg protein}$$

$$1,15 \text{ mg protein} \times 215 \frac{\text{U}}{\text{mg protein}} = 247,25 \text{ U}$$

$$\text{Larutan induk} = \frac{247,25 \text{ U}}{100 \text{ mL}} = 2,4725 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

5,0 mg α -glukosidase dilarutkan dalam 100 mL dapar fosfat pH (6,8) sehingga menjadi larutan induk 2,4725 Unit/mL.

Pengenceran larutan α -glukosidase


Pengenceran dilakukan dengan mengambil 5,0 mL larutan enzim dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH (6,8) hingga volume 100,0 mL.

$$\frac{2,0 \text{ mL}}{100,0 \text{ mL}} \times 2,4725 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = 0,04945 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

Untuk memudahkan pengujian, tiap 5,0 mL larutan enzim 0,049 U/mL dimasukkan ke dalam hematokrit cap dan diletakkan dalam suhu 2-8°C.

(unit enzim yang digunakan untuk uji aktivitas penghambatan α -glukosidase).

Lampiran 6. 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, 8 Maret 2012

Nomor : 35//IPH.1.02/II.8/III/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan


Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i), Aprilya Tri Susanti
 Mhs. Univ. Indonesia
 Jakarta

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. Jocni Setiyo Rahajoe
 NIP. 196706241993032004

Page 1 of 1

Lampiran 7. Sertifikat analisis α -glukosidase

SIGMA-ALDRICH sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* - recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder, \approx 125 units/mg protein

Product Number: G0660
 Lot Number: SL00M061V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 9001-42-7
 MDL Number: MPC000081321
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 04 JAN 2012
 Recommended Retest Date: JAN 2016

Test	Specification	Result
% Protein (Biorad)	\times 10	23
units/mg protein	\geq 125	215
One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.0 at 37 °deg C.	\geq 50	120
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 Refeat Period		
4 years		

Robney Burbach
 Robney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1 Page 1 of 1

Lampiran 8. Sertifikat analisis PNPG

SIGMA-ALDRICH **SIGMA**
Industriestrasse 26, 51104/1 Buchs (SG), Switzerland
Tel: +41 81 756 2511 Fax: +41 81 756 5449

Certificate of Analysis

Product Name: 4-NITROPHENYL α -D-GLUCOPYRANOSIDE
Purity: $\geq 99\%$

Product Number: N1377
Product Brand: Sigma
Molecular Formula: $C_{17}H_{15}NO_5$
Molecular Mass: 301.25
CAS Number: 3787-28-0

TEST	SPECIFICATION	LOT: BCBG2931V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	$\geq 99\%$	99.0 %
SPECIFIC ROTATION (20/D)	210 - 220 DEGREES	210.1 DEGREES
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW-GREEN	VERY FAINT YELLOW-GREEN
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	20 MG/ML IN METHANOL	20 MG/ML IN METHANOL

QC RELEASE DATE: 09/AUG/11
RECOMMENDED RETEST DATE: JUL/16

Claudia Geitner
 Dr. Claudia Geitner
 Manager Quality Control
 Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis - Product N1377 Lot BCBG2931V Page 1 of 1