



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE
HASIL FRAKSINASI EKSTRAK ETIL ASETAT HERBA
MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L.) DAN PENAPISAN
FITOKIMIA FRAKSI TERAKTIF**

SKRIPSI

**NITA KARTIKA
0806398511**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE
HASIL FRAKSINASI EKSTRAK ETIL ASETAT HERBA
MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L.) DAN PENAPISAN
FITOKIMIA FRAKSI TERAKTIF**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**NITA KARTIKA
0806398511**

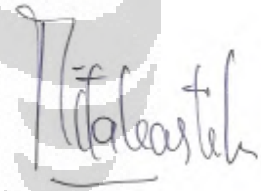
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

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



Nita Kartika

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Nita Kartika

NPM : 0806398511

Tanda Tangan :



Tanggal : 18 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nita Kartika
NPM : 0806398511
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Hasil Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan Penapisan Fitokimia Fraksi Teraktif.

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

Pembimbing I : Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt.

Pembimbing II : Dr. Rani Sauriasari., S.Si., Apt., M.Sc

Penguji I : DR. Katrin, MS.

Penguji II : Dra. Azizahwati, MS., Apt.

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 18 Juli 2012

Universitas Indonesia

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

- (1) Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Ibu Dr. Rani Sauriasari., S.Si., Apt., M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (4) Ibu Prof. Dr. Endang Hanani., Apt., M.S selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama saya menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (5) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (6) Kedua orang tua, Bapak H. Trisnowibowo dan Ibu Hj. Tien Martini yang tidak pernah henti mendoakan dan memberikan semangat demi kelancaran dan kesuksesan skripsi yang telah dijalani.
- (7) Kakak dan Adik, Esti Adilestari dan Riska Trianjani yang telah memberikan semangat selama proses penelitian.

- (8) Sahabat seperjuangan, Wardah, Trias, Indah, Lia, Elsa, Mamik, Devin, Mei, Rahmi, Yudhi, Kurniawan, Mayang, Fathia, Suesti, Anisa, Bian, Winnie, dan Novia yang telah setia membantu, menemani, dan berbagi suka dan duka selama penelitian ini. Serta keluarga besar Farmasi 2008 yang melengkapi kebersamaan selama di Farmasi.
- (9) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu per satu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi yang masih membutuhkan banyak masukan dan saran yang bersifat membangun ini dapat berguna bagi para pembaca. Akhir kata, semoga pencarian ilmu tidak pernah berhenti selama hayat di kandung badan.

Penulis
Juli, 2012

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

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

Nama : Nita Kartika
NPM : 0806398511
Program Studi : Sarjana
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Departemen : Farmasi

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

Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Hasil Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan Penapisan Fitokimia Fraksi Teraktif.

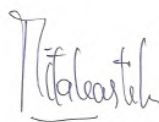
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 18 Juli 2012

Yang menyatakan



(Nita Kartika)

ABSTRAK

Nama : Nita Kartika
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase Hasil Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan Penapisan Fitokimia Fraksi Teraktif.

Diabetes adalah suatu keadaan kadar glukosa tinggi dalam darah. Salah satu terapi farmakologi dalam pengobatan diabetes melitus adalah dengan menghambat α -glukosidase yang bertanggung jawab terhadap pemecahan ikatan oligosakarida atau disakarida menjadi monosakarida. Ekstrak etanol, metanol, dan etil asetat herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) diketahui memiliki penghambatan aktivitas terhadap α -glukosidase yang baik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui fraksi teraktif yang dapat menghambat α -glukosidase dan mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalamnya. Substrat (p-nitrofenol- α -D-glukopiranosida) dan enzim akan menghasilkan p-nitrofenol yang berwarna dan memberikan serapan pada panjang gelombang 405 nm dengan metode mikroplat. Hasil menunjukkan bahwa salah satu fraksi dari ekstrak etil asetat memiliki nilai IC_{50} terbaik dengan nilai 31,85 μ g/mL. Pada fraksi tersebut mengandung senyawa glikosida, dan terpen.

Kata Kunci :diabetes mellitus, α -glukosidase, herba meniran, penapisan fitokimia, *Phyllanthus niruri* (L.), tanaman obat.
xvii + 83 halaman : 29 gambar ; 18 tabel ; 11 lampiran.
Daftar Acuan : 42 (1978 – 2012)

ABSTRACT

Name : Nita Kartika
Program Study : Pharmacy
Title : Alpha-Glucosidase Inhibitory Assay from Fractination of Ethyl Acetate Extract of *Phyllanthus niruri* L. and Phytochemical Screening the Active Fraction

Diabetes is a condition of high glucose levels in blood. One pharmacologic therapy used in treating diabetes mellitus is inhibiting α -glucosidase which responsible for hydrolysis the oligosaccharides or disaccharides into monosaccharide. Extract methanol, ethanol, and ethyl acetate of *Phyllanthus niruri* are known to have inhibitory activity against α -glucosidase. The purpose of this study was to determine the active fraction that can inhibit α -glucosidase and discover the compounds contained in the active fraction. The substrate (p-nitrophenol- α -D-glucopiranoside) and enzyme will produce p-nitrophenol which has yellow color and gives absorption at wavelength 405 nm with microplate reader. The result showed that one of fraction of Ethyl Acetate extract has the best IC₅₀ value, 31,85 μ g/mL. This fraction contained glycosides, and terpenes.

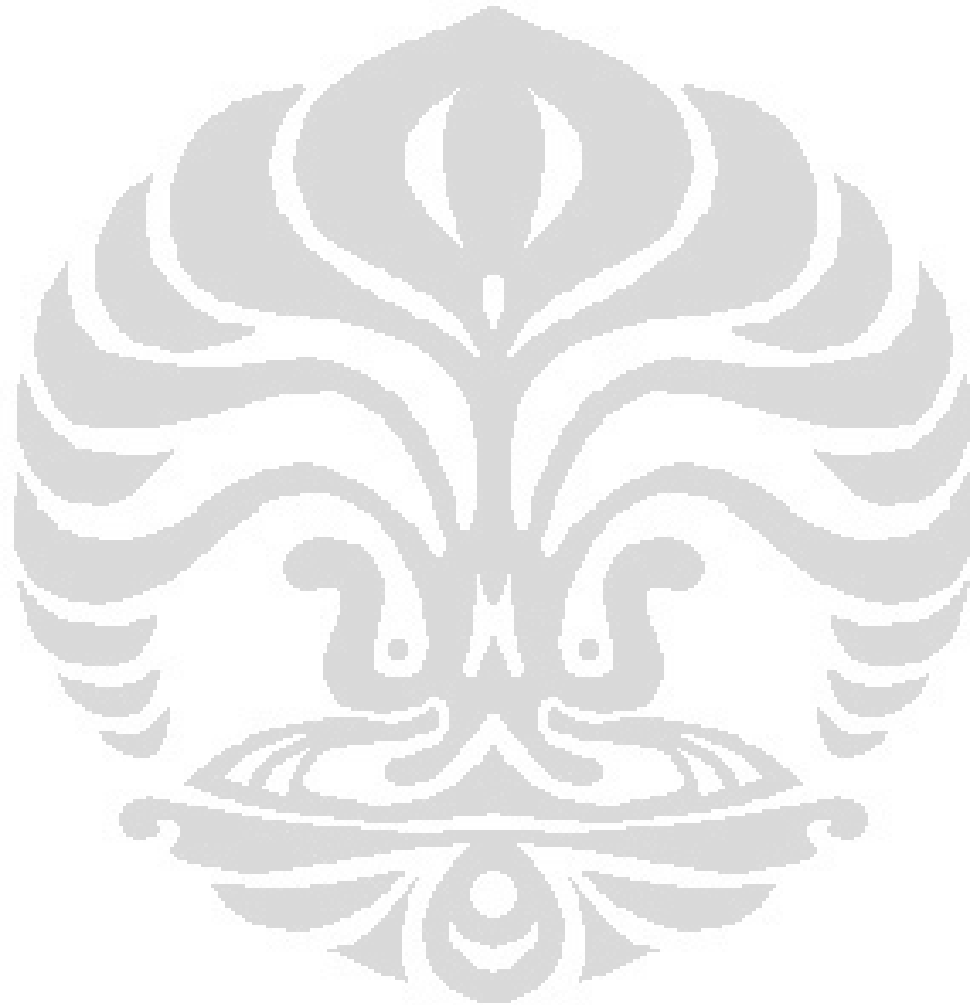
Key word :diabetes mellitus, α -glucosidase, meniran herb, phytochemical screening, *Phyllanthus niruri* (L.), medicinal plant.
xvii + 83 pages : 29 pictures; 18 tables; 11 appendics.
Bibliography : 42 (1978 – 2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBEAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Manfaat Penelitian.....	2
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Diabetes Melitus.....	3
2.2 Terapi Diabetes.....	4
2.2.1 Terapi Farmakologi dengan Insulin.....	4
2.2.2 Terapi Farmakologi dengan Antidiabetik Oral.....	4
2.2.3 Terapi Inkretin	6
2.2.4 Terapi Nonfarmakologi	6
2.3 Enzim.....	7
2.3.1 Kinetika Enzim.....	9
2.3.2 Inhibitor Enzim.....	10
2.3.3 Analisa Kinetika Membedakan Inhibisi Kompetitif dan Nonkompetitif.....	11
2.4 α -Glukosidase.....	13
2.5 Akarbose sebagai Penghambat Enzim α -Glukosidase	13
2.6 Meniran	14
2.6.1 Klasifikasi.....	14
2.6.2 Deskripsi.....	15
2.6.3 Ekologi dan Penyebaran	15
2.6.4 Bagian Tanaman yang Digunakan sebagai Obat.....	16
2.6.5 Kandungan Kimia.....	16
2.6.6 Manfaat.....	17

2.7	Simplisia.....	17
2.8	Ekstrak dan Ekstraksi	18
2.8.1	Ekstrak	18
2.8.2	Ekstraksi	18
2.9	Golongan Senyawa Fitokimia	19
2.10	Kromatografi	21
2.10.1	Kromatografi Lapis Tipis	21
2.10.2	Kromatografi Kolom	22
2.11	Mikroplat	23
2.11.1	Spektrofotometri UV-Vis	23
2.11.2	Spektroskopi UV/Vis dalam <i>Microplate</i>	24
3.	METODOLOGI PENELITIAN	26
3.1	Alat	26
3.2	Bahan	26
3.2.1	Bahan Uji	26
3.2.2	Bahan Kimia	26
3.3	Prosedur Pelaksanaan	27
3.3.1	Ekstraksi Simplisia	27
3.5.2	Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom	27
3.5.3	Penyiapan Larutan Pereaksi.....	28
3.5.4	Uji Optimasi Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	31
3.5.4.1	Penentuan Optimasi Konsentrasi Substrat.....	31
3.5.4.2	Penentuan Optimasi Waktu Inhibisi	32
3.5.5	Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	33
3.5.5.1	Pengujian Sampel	33
3.5.5.2	Pengujian Kontrol Sampel	34
3.5.5.3	Pengujian Standar Akarbose	34
3.5.5.4	Pengujian Kontrol Standar Akarbose	35
3.5.5.5	Pengujian Blanko	35
3.5.5.6	Pengujian Kontrol Blanko	36
3.5.5.7	Perhitungan Penghambatan Aktivitas Enzim	36
3.6	Penapisan Fitokimia	37
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1	Penyiapan Bahan Uji	41
4.2	Ekstraksi Simplisia	41
4.3	Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom	42
4.4	Uji Kondisi Optimasi Penghambatan α -Glukosidase	44
4.5	Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	46
4.6	Uji Kinetika Penghambatan α -Glukosidase	49
4.7	Penapisan Fitokimia	52

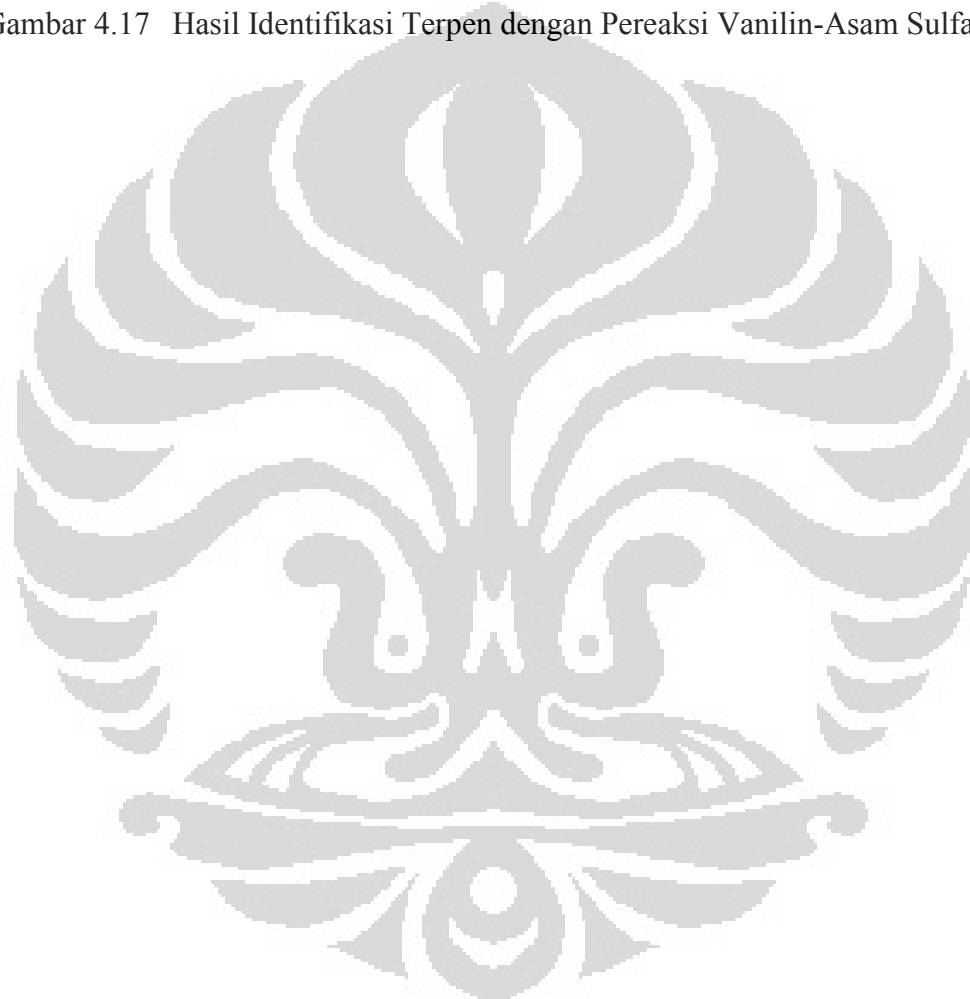
5. KESIMPULAN DAN SARAN	55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran.....	55
DAFTAR ACUAN.....	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim	9
Gambar 2.2	Plot timbal-balik ganda atau plot Lineweaver-Burk yang digunakan untuk mengevaluasi K_m dan V_{max}	10
Gambar 2.3	Plot Lineweaver-Burk dari inhibisi kompetitif.....	12
Gambar 2.4	Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi nonkompetitif.....	13
Gambar 2.5	Struktur Akarbose.....	14
Gambar 2.6	Meniran.....	14
Gambar 2.7	Struktur Phyllanthin.....	14
Gambar 2.8	Struktur Hipophyllanthin.....	16
Gambar 2.9	Struktur Niranthine.....	16
Gambar 2.10	Prinsip Spektroskopi UV/Vis.....	23
Gambar 2.11	Variasi Jalur Sampel dalam Sumuran <i>Microplate</i> (A) dan Jalur Sampel pada Kuvet (B).....	24
Gambar 2.12	Hasil Jalur Sampel dengan Perbedaan Volume Sampel pada Sumuran <i>Microplate</i>	25
Gambar 4.1	Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi A (1-22), Fase Diam Silika, Fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 9 : 1	60
Gambar 4.2	Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi B (23-57), Fase Diam Silika, Fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 7 : 3	60
Gambar 4.3	Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi C (58-67), Fase Diam Silika, Fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 7 : 3	60
Gambar 4.4	Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi D (68-74), Fase Diam Silika, Fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 3 : 7	61
Gambar 4.5	Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi E (75-69), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 3 : 7	61
Gambar 4.6	Pola Kromatogram Lapis Tipis Penggabungan Fraksi F (95-105), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 7 : 3	61
Gambar 4.7	Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi G (106-127), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 5 : 5	62
Gambar 4.8	Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi H (128-150), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 5 : 5	62
Gambar 4.9	Grafik Optimasi Konsentrasi Substrat.....	45

Gambar 4.10	Grafik Optimasi Waktu Inkubasi.....	46
Gambar 4.11	Grafik Perbandingan Nilai IC ₅₀ dari Ekstrak n-Heksan, Etil Asetat, dan Metanol.....	48
Gambar 4.12	Perbandingan Nilai IC ₅₀ dari Akarbose dan Fraksi A, B, C, dan D ..	49
Gambar 4.13	Grafik Uji Kinetika dengan Konsentrasi Ekstrak 20 µg/MI.....	50
Gambar 4.14	Grafik Uji Kinetika dengan Konsentrasi Ekstrak 50 µg/MI.....	51
Gambar 4.15	Hasil Identifikasi Glikosida dengan Pereaksi Mollisch.....	63
Gambar 4.16	Hasil Identifikasi Terpen dengan Pereaksi Anisaldehyd – Asam Sulfat.....	63
Gambar 4.17	Hasil Identifikasi Terpen dengan Pereaksi Vanilin-Asam Sulfat.....	64

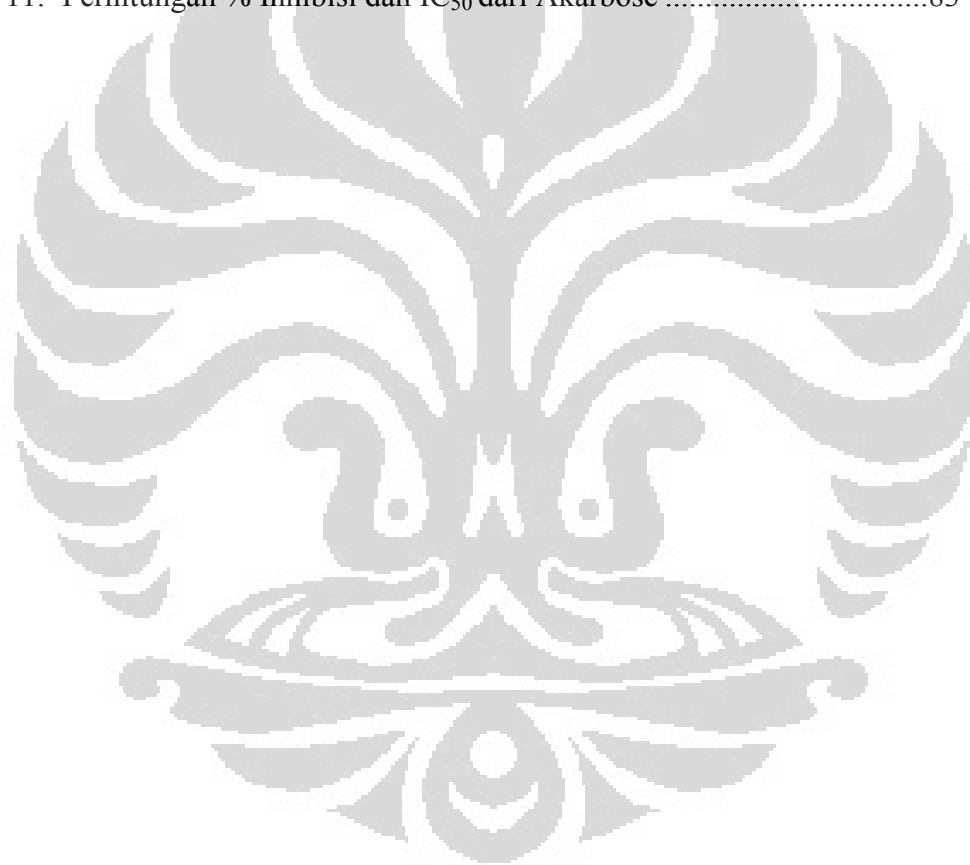


DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat	32
Tabel 3.2 Prosedur Optimasi Waktu Inkubasi	33
Tabel 3.3 Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase	36
Tabel 4.1 Rendeman Ekstrak	65
Tabel 4.2 Rendemen Fraksi	65
Tabel 4.3 Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim	65
Tabel 4.4 Hasil Optimasi Waktu Inkubasi	66
Tabel 4.5 Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Heksan	66
Tabel 4.6 Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Etil Asetat	67
Tabel 4.7 Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Metanol	67
Tabel 4.8 Hasil Uji Aktivitas Fraksi B	68
Tabel 4.9 Hasil Uji Aktivitas Fraksi C	68
Tabel 4.10 Hasil Uji Aktivitas Fraksi E	69
Tabel 4.11 Hasil Uji Aktivitas Fraksi G	69
Tabel 4.12 Hasil Uji Kinetika Tanpa Inhibitor	70
Tabel 4.13 Hasil Uji Kinetika pada Konsentrasi Ekstrak 20 $\mu\text{g/mL}$	70
Tabel 4.14 Hasil Uji Kinetika pada Konsentrasi Ekstrak 50 $\mu\text{g/mL}$	70
Tabel 4.15 Hasil Uji Aktivitas Akarbose	71

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja	72
Lampiran 2.	Sertifikat Analisis α -Glukosidase.....	73
Lampiran 3.	Sertifikat Analisis p-Nitrofenol- α -D-Glukopiranosida	74
Lampiran 4.	Surat Determinasi	75
Lampiran 5.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Ekstrak Heksan	76
Lampiran 6.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Ekstrak Etil Asetat	77
Lampiran 7.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Ekstrak Metanol	78
Lampiran 8.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Fraksi B	79
Lampiran 8.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Fraksi C	80
Lampiran 9.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Fraksi E	81
Lampiran 10.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Fraksi G	82
Lampiran 11.	Perhitungan % Inhibisi dan IC_{50} dari Akarbose	83



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berkembang pesatnya teknologi dan ilmu pengetahuan telah menyebabkan perubahan gaya hidup yang dapat memicu masalah kesehatan. Perubahan gaya hidup tersebut mencakup pada perubahan pola makan, dari pola makan tradisional dengan banyak mengonsumsi serat sayuran menjadi pola makan yang mengandung banyak protein, lemak, gula, dan garam. Perubahan pola makan ini dapat menyebabkan timbulnya penyakit, diantaranya hiperurisemia, diabetes melitus, obesitas, dan lain lain. Diabetes merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh perubahan pola makan dan gaya hidup, khususnya makan makanan yang mengandung gula yang tinggi (Corwin, 2009). Selain itu obesitas juga dapat menjadi pemicu timbulnya penyakit diabetes (Wild, 2004).

Diabetes adalah suatu keadaan glukosa tinggi dalam darah. Penyakit diabetes melitus ini dapat menimbulkan komplikasi jangka panjang yang disebabkan langsung oleh tingginya konsentrasi glukosa darah. Komplikasi diabetes tersebut mengenai hampir semua organ tubuh diantaranya berdampak pada sistem kardiovaskular, gangguan penglihatan, kerusakan ginjal, dan sistem saraf perifer (Corwin, 2009). Terjadinya komplikasi tersebut sering kali menjadi penyebab kematian (*International Diabetes Federation*, 2006). Oleh karena itu, kadar glukosa darah menjadi penting untuk diperhatikan.

α -Glukosidase adalah enzim yang berada pada usus halus yang bertanggung jawab dalam pengubahan karbohidrat menjadi glukosa. Salah satu terapi diabetes melitus yaitu mengurangi kadar glukosa darah dengan menghambat kerja enzim α -glukosidase. Banyak penelitian mengenai tanaman yang ditujukan untuk mengobati diabetes melitus dengan metode penghambatan α -glukosidase, diantaranya *Cecropia obtusifolia* Bertol., *Acosmium panamense* (Benth) Yacolev., *Malea depressa* (Baill)

R.E. Fries. (Andrade-cetto, 2007), *Phaleria macocarpa* (Scheff.) Boerl. (Sugiwati, 2009), dan *Cinnamomum zeylanicum* (Shihabudeen, 2011).

Phyllanthus niruri L. atau dikenal dengan meniran merupakan tanaman obat yang telah digunakan sejak dahulu. Secara tradisional, tanaman meniran ini digunakan untuk mengobati *jaundice*, *gonorrhoea*, haid, dan diabetes. Selain itu juga digunakan secara topikal untuk mengobati luka dan gatal pada kulit (Joseph, 2011; PROSEA, 1999; Grover, 2002).

Penelitian terdahulu menyatakan bahwa ekstrak metanol dari tanaman meniran dapat menurunkan kadar glukosa darah (Khavisankar, 2011), ekstrak etanol memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase (Masitoh, 2011), dan fraksi etil asetat juga memiliki penghambatan aktivitas yang baik terhadap α -glukosidase (Khairunnisa, 2012). Pada penelitian ini dilakukan pengujian penghambatan aktivitas α -glukosidase dari fraksi ekstrak etil asetat herba meniran dan mengetahui kandungan senyawa dari fraksi teraktif.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi teraktif dari ekstrak etil asetat dari herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dalam menghambat aktivitas α -glukosidase serta mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalamnya.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam fraksi teraktif dari ekstrak etil asetat herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dalam menghambat aktivitas α -glukosidase sebagai pengobatan antidiabetes.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

Diabetes berasal dari bahasa Yunani yang berarti mengalirkan atau mengalihkan, sedangkan melitus berasal dari bahasa Latin yang berarti manis atau madu. Maka diabetes melitus dapat diartikan individu yang mengalirkan volume urin yang banyak dengan kadar gula yang tinggi. Diabetes melitus adalah penyakit hiperglikemia yang ditandai dengan ketiadaan insulin atau penurunan sensitivitas sel terhadap insulin (Corwin, 2009). Diabetes melitus dikelompokkan menjadi beberapa kategori utama, yaitu tipe 1, tipe 2, dan gestasional diabetes (Corwin, 2009).

a. Diabetes melitus tipe 1

Diabetes melitus tipe 1 adalah penyakit hiperglikemia akibat ketiadaan absolut insulin. Sebelumnya, tipe diabetes ini disebut sebagai diabetes melitus dependen insulin (IDDM). Individu pengidap penyakit ini harus mendapatkan insulin pengganti. Diabetes tipe 1 ini terjadi akibat destruksi autoimun sel-sel beta pulau Langerhans (Corwin, 2009; Cook, 2008).

b. Diabetes melitus tipe 2

Diabetes melitus tipe 2 adalah hiperglikemia yang disebabkan insensitivitas seluler terhadap insulin. Selain itu, terjadi defek sekresi insulin ketidakmampuan pankreas untuk menghasilkan insulin yang cukup yakni mempertahankan glukosa plasma yang normal. Pada tipe ini, insulin tetap dihasilkan oleh sel-sel beta pankreas. Sebelumnya tipe diabetes melitus tipe ini disebut diabetes melitus tidak tergantung insulin (NIDDM) (Corwin, 2009; Cook, 2008).

c. Gestasional diabetes

Gestasional diabetes adalah diabetes yang terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes. Penyebab diabetes ini berkaitan dengan kebutuhan energi dan kadar estrogen serta hormon pertumbuhan yang terus-menerus tinggi selama kehamilan. Hormon pertumbuhan dan estrogen

menstimulasi pelepasan insulin yang berlebihan mengakibatkan penurunan responsivitas seluler (Corwin, 2009; Cook, 2008).

d. Diabetes Tipe Lain

Diabetes tipe ini dapat disebabkan oleh infeksi efek samping obat, endokrinopati, kerusakan pankreas, dan kelainan genetik (Dipiro et al, 1999).

2.2 Terapi Diabetes

Tujuan terapi diabetes adalah untuk mengurangi gejala hiperglikemi, mengurangi komplikasi kronis dan akut dari kadar glukosa darah yang tinggi, meminimalkan hipoglikemi, dan menjaga kualitas hidup pasien secara keseluruhan.

2.2.1. Terapi Farmakologi dengan Insulin

Insulin merupakan obat utama untuk diabetes mellitus tipe 1. Terapi ini dapat dilakukan dengan menginjeksikan insulin dengan berbagai cara, antara lain intravena, intramuskular, dan subkutan. Efek samping fisiologis yang utama dalam terapi ini adalah hipoglikemi. Umumnya terjadi karena dosis insulin terlalu besar, tidak tepatnya waktu makan dengan waktu tercapainya kadar puncak insulin, atau karena adanya faktor yang dapat meningkatkan sensitivitas insulin, misalnya insufisiensi adrenal atau pituitary, ataupun kerja fisik berlebihan (Farmakologi dan Terapi, 2007).

2.2.2. Terapi Farmakologi dengan Antidiabetik Oral (Farmakologi dan Terapi, 2007)

Terapi ini terdapat 5 golongan obat yang dapat digunakan untuk diabetes mellitus antara lain golongan sulfonilurea, meglitinid, biguanid, penghambat α -glukosidase, dan tiazolidinedion.

a. Golongan Sulfonilurea

Golongan ini terdapat 2 generasi. Generasi pertama terdiri dari tolbutamid, tolazamid, asetoheksimid, dan klorpropamid. Generasi kedua terdiri dari glibenklamid, glipizid, glikazid, dan glimepirid. Golongan ini bekerja dengan merangsang sekresi insulin dari granul sel-sel β -Langerhans pancreas selain itu juga meningkatkan sensitivitas jaringan terhadap insulin yang menyebabkan peningkatan aksi insulin. Obat golongan ini berinteraksi dengan saluran kalium

yang sensitif terhadap ATP pada sel β . Ikatan ini menyebabkan depolarisasi yang akan membuka saluran kalsium, sehingga kalsium dapat masuk ke dalam sel dan terjadi pelepasan insulin.

b. Golongan Meglitinid

Golongan ini terdiri dari repaglinid dan nateglinid yang mekanisme kerjanya sama dengan sulfonilurea tetapi struktur kimianya sangat berbeda. Obat golongan ini memiliki onset dan durasi aksi yang jauh lebih singkat (Chrisholm-Burns, 2008). Meglitinid tidak menstimulasi pelepasan insulin dari sel β secara langsung, tetapi bekerja dengan memediasi penutupan saluran kalium yang sensitive terhadap ATP sel β -pankreas yang akan menyebabkan depolarisasi sehingga menstimulasi pelepasan insulin.

c. Golongan Biguanid

Biguanid, fenformin, buformin, metformin, merupakan obat diabetes golongan biguanid. Metformin mengurangi kadar glukosa darah terutama dengan menurunkan produksi glukosa hati dan meningkatkan aksi insulin pada otot dan lemak. Mekanisme metformin dalam menurunkan produksi glukosa hati melalui pengurangan glukoneogenesis. Golongan ini bukan termasuk obat hipoglikemik melainkan antihiperglikemik, tidak merangsang sekresi insulin, dan umumnya tidak menyebabkan hipoglikemi.

d. Golongan Tiazolidinedion

Golongan ini bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin dan dapat menurunkan produksi glukosa oleh hati. Obat ini dapat meningkatkan transport glukosa ke otot dan jaringan adiposa.

e. Penghambat α -Glukosidase

α -Glukosidase bertanggung jawab dalam perubahan oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida sehingga pada akhirnya akan diabsorpsi. Penghambatan α -glukosidase ini akan membatasi kadar glukosa melalui keterlambatan proses hidrolisis karbohidrat dan absorpsi monosakarida. Contoh obatnya antara lain akarbose dan miglitol.

2.2.3 Terapi Inkretin (Molitch & Umpierrez, 2007)

Inkretin adalah obat yang dapat mempengaruhi efek GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*) dalam mengontrol kadar gula darah. GLP-1 merupakan hormon yang menstimulasi insulin dan menghambat sekresi glukagon. Terdapat dua jenis terapi inkretin, yaitu *incretin mimetics* dan *DPP-IV inhibitor*.

a. *Incretin mimetic*

Incretin mimetic merupakan agonis GLP-1, bekerja dengan menstimulasi insulin dan menghambat sekresi glukagon. Contoh obat ini adalah exenatid. Efek samping yang sering terjadi adalah mual, muntah, dan diare.

b. *DPP-IV inhibitor (Dipeptidyl Peptidase-4 Activity Inhibitors (DPP-4))*

DPP-IV merupakan enzim yang dapat mendegradasi GLP-1. Penghambat *DPP-IV* bekerja dengan menghambat degradasi GLP-1 sehingga GLP-1 tetap berada dalam darah dan dapat bekerja menurunkan gula darah. Contoh dari obat ini adalah sitagliptin dan vildagliptin.

2.2.4 Terapi Nonfarmakologi

a. Diet

Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi seimbang antara karbohidrat, protein, lemak, serta serat tinggi, kalori rendah sampai sedang, dan pembatasan konsumsi lemak jenuh (Dipiro et al, 2008).

b. Olahraga

Olahraga yang disertai dengan diet dapat meningkatkan pemakaian glukosa oleh sel sehingga dapat menurunkan kadar glukosa dan berat badan yang pada akhirnya akan meningkatkan kepekaan terhadap insulin.

c. Pengaturan berat badan

Penurunan berat badan yang cukup terbukti mengurangi resiko kardiovaskular, mengurangi resistensi insulin, dan memperbaiki respon sel-sel β terhadap stimulus glukosa (Chrisholm-Burns et al, 2008).

2.3 Enzim

Enzim adalah polimer biologis yang berfungsi sebagai katalis pada perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) (Murray, et al, 2006). Katalis adalah substansi yang meregulasi dan mempercepat reaksi biokimia tetapi tidak ikut beraksi atau mengalami perubahan dalam reaksi tersebut (Marieb, Hoehn, 2007). Enzim juga merupakan katalisator yang efektif dan selektif. Enzim bersifat efektif karena dapat meningkatkan laju reaksi hingga setidaknya 10^6 kali dibandingkan jika tidak dikatalisis. Selain itu juga bersifat selektif, tidak seperti katalis yang digunakan dalam bidang kimia sintetik, enzim bersifat spesifik baik bagi tipe reaksi yang dikatalisis maupun substrat atau substrat-substrat yang berhubungan erat (Murray, et al, 2006).

Molekul lain yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat maka dapat menempati sisi aktif enzim dan bekerja sebagai inhibitor enzim (Marieb, Hoehn, 2007).

Enzim diklasifikasikan berdasarkan tipe reaksi. Nama-nama yang paling sering digunakan untuk kebanyakan enzim menjelaskan tipe reaksi yang dikatalisis, diikuti oleh akhiran *-ase*. Contohnya, dehidrogenase (mengeluarkan atom-atom hidrogen), protease (menghidrolisis protein), dan isomerase (mengatalisis tata ulang dalam konfigurasi). Pemoifikasi dapat terletak di depan atau di belakang nama enzim untuk menjelaskan substrat enzim (contoh : xantin oksidase), sumber enzim (contoh : ribonuklease pankreas), pengaturannya (contoh : lipase peka-hormon), atau suatu gambaran dari mekanisme kerjanya (protease sistein) (Murray et al, 2009).

Faktor-faktor yang memengaruhi aktivitas enzim adalah suhu, pH, dan konsentrasi substrat.

a. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan laju reaksi baik yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis oleh enzim dengan meningkatkan energy kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Kombinasi tumbukan yang lebih sering dan lebih berenergi serta produktif ini akan meningkatkan laju reaksi (Murray et al, 2006).

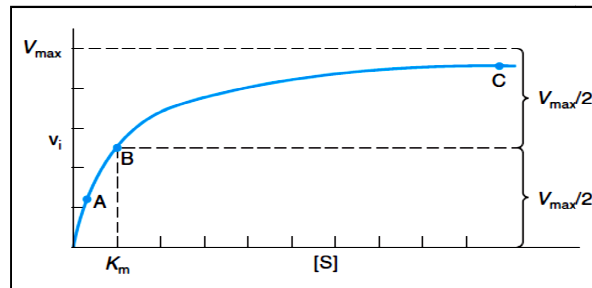
Energi panas juga dapat meningkatkan energy kinetik enzim hingga ke suatu titik yang melebihi hambatan energi untuk merusak interaksi nonkovalen yang mempertahankan struktur tiga-dimensi enzim. Rantai polipeptida kemudian mulai terurai, atau mengalami denaturasi, disertai hilangnya kemampuan katalitik enzim (Murray et al, 2006).

b. pH

Hampir semua laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim memperlihatkan ketergantungan yang signifikan pada konsentrasi ion hidrogen (pH). Hubungan aktivitas dengan konsentrasi ion hidrogen (pH) mencerminkan keseimbangan antara denaturasi enzim pada pH tinggi atau rendah dan efek pada keadaan bermuatan dari enzim, substrat, atau keduanya. Penambahan gugus-gugus bermuatan akan memengaruhi secara negatif pengikatan substrat sehingga katalisis akan melambat atau lenyap (Murray et al, 2006).

c. Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi akan bertambah seiring meningkatnya konsentrasi substrat hingga tercapai suatu keadaan yang enzimnya dikatakan jenuh oleh substrat. Kecepatan awal yang terukur akan mencapai suatu nilai maksimal dan tidak dipengaruhi lagi oleh peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut karena substrat terdapat dalam jumlah yang berlebihan. Seperti pada gambar 2.2 menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan v_i , hingga tercapai nilai maksimal V_{maks} . Peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak meningkatkan v_i karena enzim telah jenuh oleh substrat (Murray et al, 2006).



[Sumber : Murray, et al, 2006]

Gambar 2.1 Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim.

2.3.1 Kinetika Enzim

Penentuan kinetika penghambatan aktivitas enzim diukur dengan meningkatkan konsentrasi substrat baik saat tidak ada inhibitor, maupun terdapat inhibitor dengan beberapa konsentrasi. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data plot Lineweaver-Burk yang dihitung berdasarkan kinetika Michaelis-Menten.

Persamaan Michaelis-Menten (2.1) memperlihatkan secara matematis hubungan antara kecepatan awal reaksi v_i dan konsentrasi substrat $[S]$ seperti pada persamaan 2.2.

V_{max} adalah kecepatan reaksi yang diekstrapolasikan ke konsentrasi substrat tak-terhingga dan Konstanta Michaelis-Menten (K_m) adalah konsentrasi substrat dimana v_i sama dengan separuh V_{max} (Marks et al, 1996). Nilai K_m dan V_{max} dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Michaelis-Menten ini.

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

dibalik menjadi,

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

difaktorkan,

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

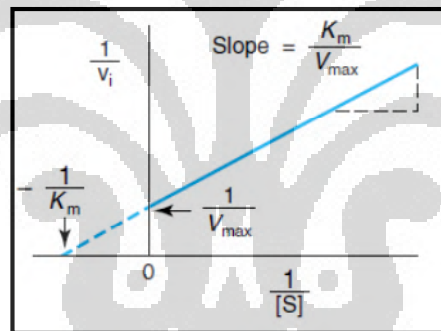
disederhanakan menjadi,

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{maks}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.4)$$

Keterangan:

v_i = Kecepatan reaksi awal
 V_{maks} = Kecepatan maksimal
 K_m = Konstanta Michaelis
 $[S]$ = Konsentrasi substrat

Persamaan 2.4 adalah persamaan garis lurus, $y = ax + b$, di mana $y = 1/v_i$ dan $x = 1/[S]$. $1/v_i$ sebagai fungsi y (absorbansi sampel) sebidang dengan $1/[S]$ sebagai fungsi dari (jumlah substrat) sehingga memberikan garis lurus yang memotong sumbu y adalah $1/V_{maks}$ dan dengan kecuraman K_m/V_{maks} . Plot seperti itu disebut Plot resiprok-al-ganda atau Lineweaver-Burk (Gambar 2.3).



[Sumber : Murray, et al, 2006]

Gambar 2.2 Plot timbal-balik ganda atau plot Lineweaver-Burk yang digunakan untuk mengevaluasi K_m dan V_{max}

2.3.2 Inhibitor Enzim

Metode Lineweaver-Burk membedakan antara inhibisi kompetitif dan non kompetitif berdasarkan pada apakah inhibisi menghilang atau tidak menghilang ketika konsentrasi substrat ditingkatkan. Kinetika inhibisi enzim ditentukan dengan meningkatnya konsentrasi substrat baik ada atau tidak adanya inhibitor.

2.3.3 Analisis Kinetika Membedakan Inhibisi Kompetitif dan Non-Kompetitif

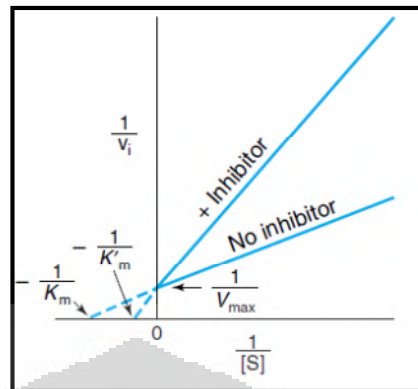
Inhibitor dapat diklasifikasikan berdasarkan tempat kerja enzim, apakah inhibitor tersebut memodifikasi enzim secara kimiawi, atau pada parameter kinetik yang dipengaruhinya. Secara kinetis, untuk membedakan dua jenis inhibitor tersebut dapat dilakukan peningkatan konsentrasi substrat yang akan mengatasi inhibisi atau tidak. Plot timbal balik ganda membedakan antara inhibitor kompetitif dan nonkompetitif serta mengevaluasi konstanta inhibisi, dengan dilakukan penentuan v_i pada beberapa konsentrasi substrat baik dengan atau tanpa adanya inhibitor. (Murray, et al, 2006).

a. Inhibisi kompetitif

Inhibitor kompetitif dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Pada jenis inhibisi kompetitif klasik ini inhibitor akan menempati tempat pengikatan substrat, sehingga menghalangi substrat untuk menduduki sisi aktif tersebut. Oleh karena itu, umumnya struktur inhibitor kompetitif ini memiliki kemiripan dengan struktur substrat (analog substrat).

Suatu inhibitor kompetitif dan substrat menimbulkan efek timbal balik pada konsentrasi kompleks EI (enzim-inhibitor) dan ES (enzim-substrat). Inhibitor kompetitif bekerja dengan menurunkan jumlah molekul enzim bebas yang tersedia untuk mengikat substrat dimana untuk membentuk ES dan akan menghasilkan produk.

Untuk inhibisi kompetitif klasik, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu disumbu y (Gambar2.4). Karena perpotongan sumbu y = $1/V_{max}$, pola ini menunjukkan bahwa ketika $1/[S] = 0$, v_i tidak bergantung pada inhibitor. Namun perpotongan garis di sumbu x bervariasi sesuai dengan konsentrasi inhibitor – dan bahwa $-1/K'_m$ lebih kecil daripada $1/K_m$, K'_m (“ K_m yang terlihat”) menjadi lebih besar jika konsentrasi inhibitor meningkat. Oleh karena itu inhibitor kompetitif tidak berefek pada V_{max} , tetapi meningkatkan K'_m , K_m yang tampak untuk substrat.



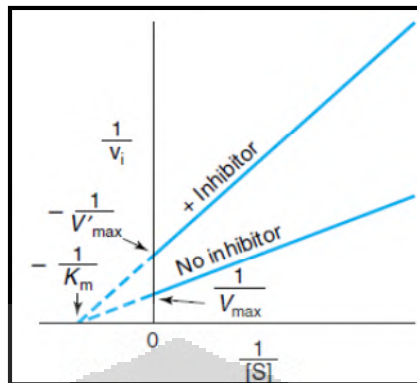
[Sumber : Murray, et al, 2006]

Gambar 2.3 Plot Lineweaver-Burk dari inhibisi kompetitif

b. Inhibisi non kompetitif

Pengikatan inhibitor pada inhibisi nonkompetitif ini tidak mempengaruhi pengikatan substrat, maka kompleks EI (enzim-inhibitor) dan kompleks EIS (enzim-inhibitor-substrat) dapat terbentuk namun efisiensi terbentuknya produk dari kompleks EIS menurun. Struktur dari inhibitor dan substrat umumnya tidak atau sedikit memiliki kesamaan karena keduanya mengikat enzim di bagian yang berbeda.

Untuk inhibisi non kompetitif sederhana, enzim (E) dan enzim-inhibitor (EI) memiliki afinitas yang sama terhadap substrat (S) dan kompleks EIS menghasilkan produk pada kecepatan yang hampir dapat diabaikan (gambar 2.5). Inhibisi non kompetitif yang lebih kompleks terjadi ketika pengikatan *Inhibitor* (I) memengaruhi afinitas enzim terhadap substrat yang menyebabkan garis memotong di kuadran III atau IV pada plot timbal-balik ganda.



[Sumber : Murray et al, 2006]

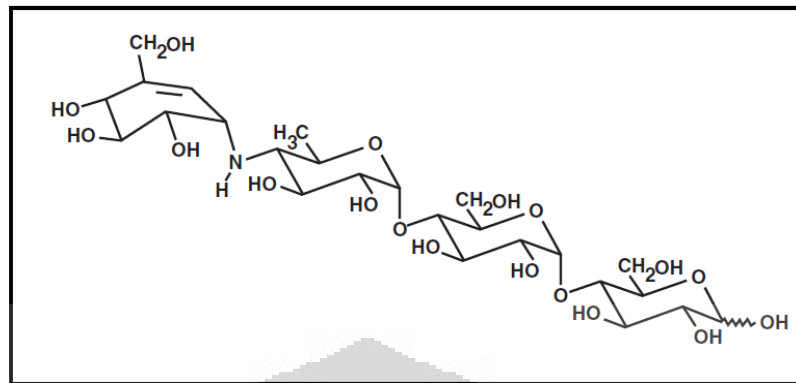
Gambar 2.4 Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi nonkompetitif

2.4 α -Glukosidase

α - Glukosidase merupakan kumpulan enzim yang terikat pada membran usus halus villi yang memecah ikatan oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida. Adapun yang termasuk enzim ini adalah maltase, isomaltase, sukrase, dan laktase (Soumyanath, 2006).

2.5 Akarbose sebagai Penghambat α -Glukosidase

Obat golongan penghambat α -glukosidase dapat memperlambat absorpsi monosakarida di intestine. Dengan menghambat kerja enzim α -glukosidase di usus halus, dapat mencegah peningkatan glukosa plasma pada orang normal dan pasien diabetes melitus. Salah satunya adalah akarbose yang merupakan oligosakarida yang berasal dari mikroba. Akarbose secara kompetitif menghambat α -glukosidase karena mengandung ikatan glikosidik dalam strukturnya (Farmakologi dan Terapi, 2007).



[Sumber : Bayer Health Care Pharmaceutical, 2011]

Gambar 2.5 Struktur Akarbose

2.6 Meniran



Gambar 2.6 Meniran

2.6.1 Klasifikasi (PROSEA, 1999; Jones & Luchsinger, 1987)

Kerajaan	: Plantae
Sub kerajaan	: Tracheobionta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta (Angiospermae)
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Sub kelas	: Rosidae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: Phyllanthus

Jenis	: <i>Phyllanthus niruri</i> L.
Sinonim	: <i>Phyllanthus amarus</i> Schum.
Nama Indonesia	: Meniran
Nama Daerah	: Meniran (Jawa), memeniran (Sunda)

2.6.2 Deskripsi

Meniran (*Phyllanthus niruri*) adalah tanaman yang tumbuh tegak, bercabang-cabang, dan tingginya antara 30 – 50 cm. Bagian batang tanaman berbentuk bulat dengan tinggi kurang dari 50 cm, berwarna hijau, diameternya \pm 3 mm. Berdaun majemuk, dengan letak berseling, berbentuk bulat telur (oval), ujung daunnya tumpul, pangkalnya membulat, tepi daun yang rata, memiliki anak daun 13- 24, panjang \pm 1,5 cm, lebar \pm 7 mm, dan berwarna hijau. Tanaman meniran ini memiliki bunga tunggal yang terdapat pada ketiak daun menghadap ke arah bawah, menggantung dan berwarna putih, memiliki daun kelopak yang berbentuk bintang, mahkota bunga kecil dan berwarna putih. Buahnya berbentuk kotak, bulat pipih, dan licin dengan diameter \pm 2 mm serta berwarna hijau. Biji dari tanaman ini kecil, keras, berbentuk ginjal, dan berwarna coklat. Perakarannya tunggang yang berwarna putih (Joseph, 2011; Daniel, 2006; Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978).

2.6.3 Ekologi dan Penyebaran

Tanaman meniran ini terdapat di India, Cina, Malaysia, Filipina, dan Australia. Tumbuh tersebar hampir di seluruh Indonesia pada ketinggian tempat antara 1 m sampai 1000 m di atas permukaan laut. Tumbuh liar di tempat terbuka, pada tanah gembur yang mengandung pasir, di ladang, di tepi sungai, dan di pantai (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989).

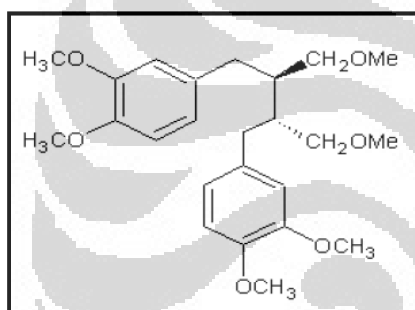
2.6.4 Bagian Tanaman yang Digunakan sebagai Obat

Bagian tanaman meniran yang dapat dimanfaatkan sebagai obat yaitu pada bagian akar (radiks), batang, daun (folium), bunga (flos), aerial atau herba (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989)

2.6.5 Kandungan Kimia

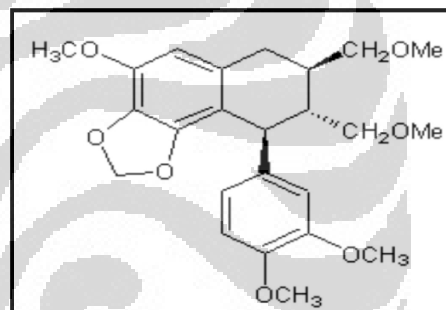
Tanaman meniran ini kaya berbagai kandungan kimia, antara lain : phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nitetrali, nirurin, nirurinetin, norsecurinine, phyllanthenol, phylliniruin, phylltetrin, quercitrin, quercetin, asam ricinoleat, rutin, asam salisilat metal ester, asam garlat, asam askorbat, hinokinin, hidroksi niranthin, isolinetralin, isokuersetin (Joseph, 2011; National Agency of Drug and Food Control The Republic Indonesia, 2004; Departemen Kesehatan Republik Indonesia 1989; Departemen Kesehatan Republik Indonesia 1978).

Nayak (2010) menyatakan bahwa isolasi senyawa phyllanthin diperoleh dari ekstrak metanol sedangkan Nair (2008) dan Murugaiyah (2008) isolasi senyawa hypophyllanthin dan niranthin diperoleh dari ekstrak etanol.



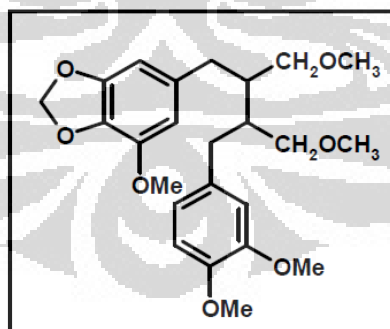
[Sumber : Nayak, 2010]

Gambar 2.7 Struktur Phyllanthin



[Sumber : Nair, 2008]

Gambar 2.8 Struktur Hypophyllanthin



[Sumber : Murugaiyah, 2008]

Gambar 2.9 Struktur Niranthin

2.6.6 Manfaat

Secara tradisional, tanaman *Phyllanthus niruri* digunakan sebagai tanaman obat *jaundice*, *gonorrhoea*, haid, dan diabetes (Joseph, 2011). Selain itu digunakan sebagai diuretik untuk mengobati gangguan ginjal, pengencer dahak untuk batuk pada anak-anak, tonik untuk perut, pusing, migrain, dan diabetes. Secara topikal dapat digunakan untuk mengobati penyakit kulit (PROSEA, 1999; Departemen Kesehatan, 1989; Departemen Kesehatan, 1978).

2.7 Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun, dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan alam yang dikeringkan. Berdasarkan sumbernya, simplisia dibedakan menjadi tiga macam, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelican (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan (isi sel) yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelican adalah simplisia yang berupa bahan pelican yang belum diolah dengan cara sederhana atau belum berupa zat kimia murni (Materia Medika, 1995).

Simplisia nabati harus bebas dari serangga, fragmen hewan, atau kotoran hewan, tidak boleh menyimpang bau dan warnanya, tidak boleh mengandung lendir dan cendawan, atau menunjukkan tanda-tanda pengotoran lain, tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya. Jika dalam beberapa hal khusus ada sedikit penyimpangan dari beberapa ketentuan mengenai morfologi dan mikroskopik yang tertera dalam Materia Medika Indonesia, sedangkan semua persyaratan lain dipenuhi maka simplisia yang bersangkutan dapat dianggap memenuhi persyaratan Materia Medika Indonesia (Materia Medika, 1995; Farmakope Indonesia, 1979).

2.8 Ekstrak dan Ekstraksi

2.8.1 Ekstrak

Berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi III, ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstrak kering harus mudah digerus menjadi serbuk.

2.8.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Terdapat beberapa macam cara ekstraksi, yaitu cara dingin (maserasi dan perkolasi) dan cara panas (refluks, sokletasi, digesti, infusa, dan dekok).

2.8.2.1 Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan peyarian maserat pertama dan seterusnya.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahapan maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai perkolat yang jumlahnya 1-5 kali jumlah bahan.

2.8.2.2. Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur pada 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 proses ekstraksi sempurna.

b. Sokletasi

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

c. Digesti

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

d. Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90° C selama 15 menit (Farmakope Indonesia Edisi IV, 1995).

e. Dekok

Dekok adalah ekstraksi seperti infusa pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan temperatur 100⁰C (titik didih air).

2.9 Golongan Senyawa Fitokimia

a. Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang mengandung nitrogen yang terdapat dalam cincin heterosiklik, tetapi tidak semuanya (amin alifatik, contohnya efedrin, meskalin), dan bersifat basa seperti ditunjukkan oleh namanya. Alkaloid dalam tumbuhan biasanya berada dalam bentuk garamnya (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

b. Flavonoid

Flavonoid terdapat pada semua tumbuhan berpembuluh. Flavonoid memiliki gugus fenol dimana dalam tumbuhan berada dalam bentuk glikosida dan aglikon. Dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa adalah bagian aglikonnya yang sebelumnya telah dihidrolisis (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

c. Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang terbentuk dari satuan isoprene ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$) dan memiliki kerangka karbon yang dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit isopren (C_5) (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

Terpenoid terdiri dari beberapa jenis diantaranya monoterpen, seskuiterpen, diterpen, triterpen, dan sterol. Golongan monoterpen terbentuk dari dua satuan isoprene dan biasanya mempunyai sepuluh atom karbon. Pada seskuiterpen adalah senyawa C_{15} , biasanya dianggap berasal dari tiga satuan isoprene. Golongan monoterpen dan seskuiterpen ini biasanya merupakan komponen minyak atsiri. Golongan diterpen merupakan senyawa C_{20} , yang berasal dari empat satuan isoprene. Titik didih dari diterpen tinggi sehingga biasanya tidak ditemukan dalam minyak atsiri. Golongan triterpenoid merupakan senyawa C_{30} . Sedangkan pada sterol memiliki inti steroid. Golongan triterpenoid atau sterol bersifat tidak menguap (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

Secara kimia, terpen larut dalam lemak. Biasanya terpenoid diekstraksi dengan menggunakan pelarut eter minyak bumi, eter, atau kloroform, dan dapat dipisahkan secara kromatografi pada silika gel atau alumina menggunakan pelarut tersebut (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

d. Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang umumnya berada dalam bentuk glikosida. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer yang tidak larut air. Di dalam tumbuhan, letak tanin terpisah dari protein dan enzim sitoplasma (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

Tanin terbagi menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi, tidak seperti tanin terhidrolisis dimana tidak terhidrolisis menjadi molekul sederhana dan tidak mengandung gula. Sedangkan tanin terhidrolisis dapat terhidrolisis dengan asam atau enzim seperti tanase.

Terbentuk dari sejumlah molekul asam fenolat seperti galat dan asam heksahidrodifenat yang bergabung karena ikatan ester dan terdapat inti gula (Harborne, 1987; Evans, 2002).

e. Saponin

Saponin merupakan glikosida triterpen yang sifatnya menyerupai sabun, merupakan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air dan pada konsentrasi rendah dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah (Robinson, 1995).

f. Glikosida

Glikosida merupakan suatu senyawa yang mudah terhidrolisis, bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan bukan gula (aglikon atau genin). Gula yang biasa ditemui dalam glikosida adalah glukosa (Robinson, 1995). Bagian aglikon merupakan senyawa metabolit sekunder, seperti flavonoid atau kumarin (Harborne, 1987).

2.10 Kromatografi

2.10.1 Kromatografi Lapis Tipis (Touchstone, Dobbins, 1983)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu teknik yang paling sering digunakan untuk melakukan pemisahan karena mudah digunakan, dapat menganalisis jumlah sampel yang banyak sekali waktu, jumlah pelarut yang diperlukan sedikit, sensitivitasnya tinggi, pemisahannya cepat, dan relatif murah. KLT dapat digunakan untuk memastikan kemurnian dari senyawa, memisahkan dan mengidentifikasi komponen dalam suatu campuran, atau sebagai analisis kuantitatif dari satu atau lebih komponen yang ada.

Zat penyerap yang umum digunakan dalam KLT ini antara lain silika gel, alumina, kieselguhr (*diatomaceous earth*) dan selulosa. Silika gel merupakan bahan penyerap yang paling sering digunakan untuk KLT ini.

Ukuran standar lempeng untuk KLT adalah 20 x 20 cm. Pada umumnya pemisahan, jarak tempuh fase gerak pada lapis tipis tersebut adalah 15 cm. Sampel

ditotolkan pada lapis tipis tersebut berjarak 1 – 2 cm dari tepi bawah lempeng. Pemisahan dilaksanakan dengan melewati sebuah pelarut, fase gerak, melalui lempeng tipis KLT. Fase gerak ditentukan berdasarkan tipe senyawa yang akan dipisahkan dan tipe zat penyerap yang digunakan untuk pemisahan. Komposisi dari fase gerak dapat berupa tunggal, pelarut murni atau kompleks yang terdiri dari 3 – 4 campuran pelarut dengan perbandingan tertentu. Setelah pelarut selesai dielusikan pada lempeng, kemudian kromatogram dikeringkan dan lokasi bercak dapat diketahui dengan beberapa cara, diantaranya dengan visualisasi di bawah sinar ultraviolet, juga dengan reagen semprot yang akan memberukan warna atau senyawa yang berfluoresensi. Kemudian nilai Rf ditentukan untuk mengetahui posisi senyawa pada kromatogram tersebut, dihitung dengan persamaan :

$$R_f = \frac{\text{jarak bercak senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut}}$$

Nilai Rf berada pada rentang antara 0 hingga 0,999. Untuk menunjukkan posisi relative terhadap posisi dari senyawa lain, standar (x), maka nilai Rx dapat dihitung berdasarkan persamaan :

$$R_x = \frac{\text{jarak bercak senyawa}}{\text{jarak bercak standar}}$$

Nilai Rx dapat lebih dari 1.

2.10.2 Kromatografi Kolom

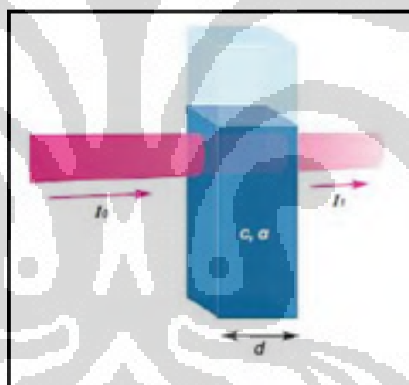
Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi cair yang baik digunakan untuk pemisahan campuran dengan skala besar yaitu lebih dari 1 gram. Pada kromatografi kolom, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca. Kromatografi kolom terbagi dua jenis yaitu kromatografi kolom lambat dan kromatografi kolom dipercepat. Pada kromatografi kolom dipercepat, pelarut pengembang didorong dengan cepat (dengan tekanan gas) melalui kolom bergaris tengah besar tetapi pendek

yang berisi penjerap basah yang ukuran partikelnya dikendalikan dengan ketat (Gritter Roy J et al, 1985).

2.11 Mikroplat

2.11.1 Spektrofotometri UV-Vis (Greiner Bio-One, 2004)

Microplate transparan atau *microplate* dengan bagian bawah yang transparan umumnya digunakan dalam spektroskopi UV-Vis. UV-Vis adalah jenis spektroskopi yang menggunakan cahaya tampak dan berdekatan dengan rentang UV untuk menentukan konsentrasi dan karakterisasi dari zat yang terlarut. Umumnya molekul menyerap cahaya pada rentang *visible* atau UV pada panjang gelombang tertentu. Penyerapan cahaya (Gambar 2.11) adalah proses fisik dimana jumlah cahaya yang diserap terabsorpsi bergantung pada konsentrasi senyawa (c), ketebalan lapisan cairan (d), dan koefisien absorpsi (α) pada panjang gelombang tertentu.



Gambar 2.10 Prinsip Spektroskopi UV/Vis.

Dalam spektroskopi, peristiwa fisik transmisi cahaya melewati sampel dapat digambarkan dengan pecahan cahaya pada panjang gelombang tertentu yang melewati sampel. Jika I_0 adalah intensitas cahaya yang datang maka I_1 adalah intensitas cahaya yang ditransmisikan, maka transmitansi (T) didefinisikan sebagai :

$$T = \frac{I_1}{I_0}$$

Transmitansi juga digambarkan sebagai dengan cahaya absorbansi, A atau *densitas optic OD*.

$$A = OD = - \log_{10} \frac{I_1}{I_0}$$

Semakin tinggi densitas optic dari sampel maka semakin meningkatnya absorbansi dan menurunnya transmisi cahaya. Transmisi sering dinyatakan dalam presentase.

Hukum Lambert-Beer (Greiner Bio-One, 2004)

Absorpsi cahaya pada larutan sampel bergantung pada konsentrasi molekul yang terlarut (c) koefisien ekstinsi (α) pada panjang gelombang (λ) dan ketebalan sampel (d). Dengan mengetahui koefisien ekstinsi dan ketebalan sampel, maka konsentrasi sampel dapat ditentukan dengan persamaan Lambert-Beer. Hukum ini juga dapat digunakan untuk menentukan koefisien ekstinsi.

Hukum Lambert-Beer,

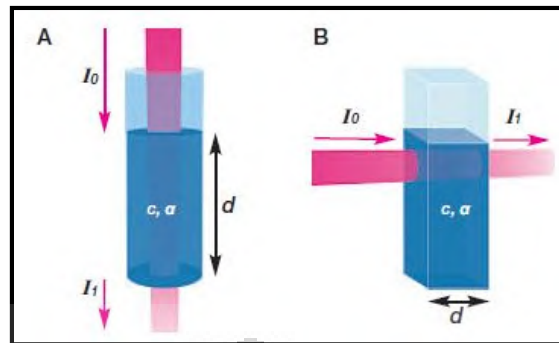
$$A = - \log_{10} \frac{I_1}{I_0} = c \cdot \alpha \cdot d$$

Penentuan koefisiem ekstinsi,

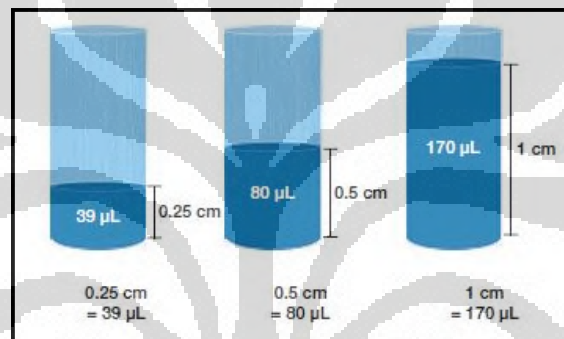
$$\alpha = \frac{A}{c \cdot d}$$

2.11.2 Spektroskopi UV/Vis dalam *Microplate* (Greiner Bio-One, 2004)

Panjang jalur sampel pengukuran transmisi pada standar kuvet adalah 1 cm karena hampir semua kuvet memiliki tebal standar 1 cm. Berbeda dengan pengukuran densitas optik pada *microplate*, panjang jalur ditentukan berdasarkan jumlah dan ketinggian cairan sampel yang terisi dalam sumuran (Gambar 2.12 dan Gambar 2.13).



Gambar 2.11 Variasi Jalur Sampel dalam Sumuran *Microplate* (A) dan Jalur Sampel pada Kuvet (B)



Gambar 2.12 Hasil Jalur Sampel dengan Perbedaan Volume Sampel pada Sumuran *Microplate*

Pengukuran densitas optik pada sumuran *microplate* dibandingkan secara langsung dengan pengukuran menggunakan kuvet, hasil dari sumuran *microplate* harus dihitung ulang dengan panjang jalur 1 cm. Perhitungan ulang dapat dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{OD } 1 \text{ cm} = \frac{\text{OD sampel}}{d \text{ (cm)}}$$

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, *rotary vacuum evaporator* (Janke & Kunkel IKA, Jerman), oven (Hotpack Vacuum Oven), labu *evaporator*, timbangan analitik digital, *chamber* KLT, lempeng KLT, kolom kromatografi, silika gel, pipet mikro (Finnipipete dan Socorex), pH meter (Eutech Instruments), *microplate reader* (Plate reader BioTek ELx808), *plate 96 well*, dan lain lain.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba meniran sebanyak 2 kg yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Bogor, yang telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI) (Lampiran 4).

3.2.2 Bahan Kimia

α -Glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* recombinan (Sigma Aldrich, USA), p-Nitrofenil- α -D-Glukopiranosida (PNPG) (Sigma Aldrich, USA), bovine serum albumin (BSA) (Merck, Jerman), akarbose (Dexa, Indonesia), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), dikalium hidrogen fosfat (Merck, Jerman), natrium karbonat (Merck, Jerman), NaOH, dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), n-heksan, etil asetat, metanol.

3.3 Prosedur Pelaksanaan

3.3.1 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia kering sebanyak ± 2 kg (2017,5 gram) direfluks dengan cara ekstraksi bertingkat menggunakan pelarut non polar (heksan), dilanjutkan dengan pelarut semi polar (etil asetat), dan pelarut polar (metanol).

Proses refluks pertama kali memerlukan pelarut sebanyak 3 liter, sedangkan untuk refluks berikutnya memerlukan pelarut sebanyak 2 liter. Suhu saat proses refluks dijaga $70 - 80^{\circ}\text{C}$ dimana proses refluks dilakukan selama 30 menit dihitung setelah adanya tetesan pada ujung bagian bawah kondensor. Filtrat ekstraksi kemudian disaring, bagian ampas direfluks kembali dengan pelarut yang sama. Proses ini dilakukan sebanyak 7 kali.

Ekstraksi pertama menggunakan pelarut heksan. Refluks dilakukan selama 30 menit. Filtrat ekstraksi disaring, bagian ampas direfluks kembali dengan pelarut heksan yang baru. Proses ini dilakukan sebanyak 7 kali. Kemudian bagian ampas dikeluarkan dari labu refluks untuk dikeringkan. Ampas yang telah kering direfluks kembali dengan pelarut etil asetat. Proses refluks juga dilakukan selama 30 menit. Filtrat ekstraksi disaring, bagian ampas direfluks kembali dengan pelarut etil asetat yang baru. Proses ini dilakukan sebanyak 7 kali. Kemudian bagian ampas dikeluarkan dari labu refluks untuk dikeringkan. Ampas yang telah kering tersebut direfluks kembali dengan pelarut metanol. Proses refluks juga dilakukan selama 30 menit. Filtrat ekstraksi disaring, bagian ampas direfluks kembali dengan pelarut metanol yang baru. Proses ini dilakukan sebanyak 6 kali.

Masing-masing filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Setelah diperoleh ekstrak kental kemudian ditimbang sehingga diperoleh nilai rendemen dari masing-masing ekstrak.

3.5.2 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak kental etil asetat, kemudian dipisahkan senyawa yang terkandung di dalamnya dengan kromatografi kolom. Preparasi sampel dilakukan dengan cara kering dan preparasi fase diam dilakukan dengan cara basah. Fase diam yang

digunakan adalah silika dan fase gerak yang digunakan adalah gradien n-heksan dan etil asetat kemudian dilanjutkan gradien etil asetat dan metanol yang ditingkatkan kepolarannya sebanyak 5% setelah penambahan eluen 400 mL. Namun, ketika terjadi pemisahan yang baik (terbentuknya pita pada kolom) pada perbandingan eluen tertentu, eluen yang diberikan tidak dinaikkan kepolarannya hingga pita tersebut turun. Setelah pita turun kemudian eluen dinaikkan kembali kepolarannya. Hasil fraksinasi ditampung di vial berdasarkan pita yang terbentuk, namun jika tidak terbentuk pita ditampung tiap 50 mL.

Hasil fraksinasi tersebut dilihat pola kromatogramnya dengan KLT, fraksi yang memiliki pola kromatogram yang mirip dapat digabung. Fraksi yang telah digabung kemudian dikeringkan dan ditimbang untuk mengetahui nilai rendemen pada tiap fraksi. Fraksi yang memiliki bobot lebih dari 100 mg yang akan diuji aktivitasnya terhadap α -glukosidase dengan *microplate reader*. Penapisan fitokimia dilakukan untuk fraksi yang memiliki nilai IC_{50} yang paling kecil.

3.5.3 Penyiapan Larutan Pereaksi

a. Larutan Uji Fraksi dan Ekstrak Herba Meniran

Hasil penggabungan fraksi dan ekstrak etil asetat ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) secukupnya kemudian dicukupkan larutannya hingga 10 ml dengan dapar fosfat pH 6,8 sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1000 ppm. Larutan ekstrak 1000 ppm diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, dan 10 ppm.

b. Perhitungan Unit Enzim dan Pembuatan Larutan α -Glukosidase

Perhitungan unit enzim :

Sertifikat analisis α -glukosidase menyatakan bahwa dalam kemasan enzim mengandung 23 % protein dan 215 U/mg protein. Label pada kemasan α -glukosidase menyatakan bahwa mengandung 15,2 mg solid.

Jumlah protein total di dalam kemasan :

$$23\% \times 15,2 \text{ mg} = 3,496 \text{ mg protein}$$

$$15,2 \text{ mg solid} \rightarrow 3,496 \text{ mg protein}$$

$$x \text{ mg solid} \rightarrow 1 \text{ mg protein}$$

$$x = \frac{15,2 \text{ mg solid}}{3,496 \text{ mg protein}} = 4,348 \text{ mg solid}$$

Maka, dalam 215 U/mg protein mengandung 4,348 mg solid.

Aktivitas enzim yang diinginkan adalah 0,05 U/mL diperoleh dari hasil pengenceran larutan induk 2,5 U/mL.

$$\frac{2 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \times 2,5 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = 0,05 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

Larutan induk 2,5 U/mL = $\frac{250 \text{ U}}{100 \text{ mL}}$, maka jumlah enzim yang ditimbang sebanyak:

$$\frac{250 \text{ U}}{215 \text{ U}} \times 4,348 \text{ mg solid} = 5,05 \text{ mg.}$$

Preparasi larutan pembawa :

Larutan pembawa enzim dibuat dengan cara 200 mg bovine serum albumin (BSA) dilarutkan dalam 100 ml dapar fosfat pH 6,8.

Preparasi larutan α -glukosidase:

Preparasi larutan α -glukosidase dilakukan dalam kotak es dan menggunakan es batu untuk menjaga suhu tetap dingin ($2-8^{\circ}\text{C}$) agar enzim tidak rusak. Alat-alat yang digunakan seperti botol timbang, labu ukur, pipet volum sebelumnya dimasukkan ke dalam lemari es terlebih dulu.

α -Glukosidase sebanyak 5 mg ditimbang dengan menggunakan botol timbang, kemudian dilarutkan dengan larutan pembawa dalam kondisi dingin secukupnya dan dicukupkan volumenya hingga 100,0 mL. Kemudian larutan induk tersebut dipipet sebanyak 2,0 mL dan dicukupkan volumenya dengan larutan pembawa dengan kondisi dingin hingga 100,0 mL, diperoleh aktivitas enzim 0,05 U/mL.

Larutan induk enzim disimpan dalam lemari pendingin pada suhu -20°C dan dapat bertahan selama beberapa bulan, dan larutan enzim setelah pengenceran disimpan dalam suhu $2-8^{\circ}\text{C}$ dan dapat bertahan selama beberapa minggu.

c. Perhitungan dan Pembuatan Larutan Substrat

BM p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG): 301,25 (Sigma, 2011)

1. Dibuat larutan PNPG 100 mL dengan konsentrasi 20 mM

$$\text{mM} = \frac{\text{mg}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{\text{mL}} \quad (3.1)$$

$$\text{mg} = \frac{\text{mM} \times \text{BM} \times \text{mL}}{1000} \quad (3.2)$$

$$\text{mg} = \frac{20 \times 301,25 \times 50,0}{1000} = 301,25 \text{ mg}$$

Larutan substrat 20 mM dibuat dengan cara sebanyak 301,25 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida ditimbang kemudian dilarutkan dan dicukupkan volumenya hingga 50 mL akuades. Larutan substrat 20 mM diencerkan sehingga diperoleh larutan substrat 10 mM; 5 mM; 2,5 mM; 1,25 mM, dan 0,625 mM.

d. Larutan Standar Akarbose

Larutan akarbose digunakan sebagai pembanding. Akarbose ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,8 dan dicukupkan volumenya hingga 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi standar akarbose 100 ppm. Larutan akarbose 100 ppm diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan akarbose 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, 10 ppm.

e. Dapar Posfat pH 6,8 (United States Pharmacopeial Convention, 2007)

1) Kalium dihidrogenposfat 0,2 M

Kalium dihidrogenposfat 0,2 M dibuat dengan melarutkan 6,805 g kalium dihidrogenposfat dalam air demineralisata bebas CO_2 hingga 250,0 mL.

2) Natrium hidroksida 0,2 M

Natrium hidroksida 0,2 M dibuat dengan melarutkan 1,6 g NaOH dalam air demineralisata bebas CO₂ hingga 200,0 mL.

3) Larutan dapar posfat pH 6,8

Larutan dapar posfat pH 6,8 dibuat dengan mencampurkan 125,0 mL kalium dihidrogenposfat 0,2 M dengan 56,0 mL natrium hidroksida 0,2 M kemudian diencerkan dengan air demineralisata bebas CO₂ hingga 500,0 mL.

3.5.4 Uji Optimasi Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

3.5.4.1 Penentuan Optimasi Konsentrasi Substrat

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 2 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), 63 μ L dapar fosfat pH optimum dan 10 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi masing-masing 20 mM, 10 mM, 5mM, 2,5 mM, 1,25 mM, dan 0,625 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Untuk larutan uji, tambahkan 25 μ L larutan enzim dengan konsentrasi 0,05 U/ml dengan *multichannel* dan selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37° C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 100 μ L 200 mM natrium karbonat. Larutan diukur serapannya pada λ 405 nm dengan *microplate reader*. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

Tabel 3.1 Prosedur Optimasi Konsentrasi Substrat

Reagen	Volume (μL)	
	U_1	K_1
DMSO	2	2
Dapar fosfat pH 6,8	63	63
Substrat (20 mM, 10 mM, 5mM, 2,5 mM, 1,25 mM, dan 0,625 mM)	10	10
Inkubasi pada suhu 37°C, 5 menit		
Enzim (0,05 U/ml)	25	-
Natrium karbonat 200 Mm	-	100
Inkubasi pada suhu 37°C, 30 menit		
Enzim (0,05 U/mL)	-	25
Natrium karbonat 200 mM	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405 \text{ nm}$		

3.5.4.2 Penentuan Optimasi Waktu Inkubasi

Masing-masing campuran reaksi terdiri dari 2 μL dimetil sulfoksida (DMSO), 63 μL dapar fosfat pH optimum dan 10 μL p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dengan konsentrasi 10 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Untuk larutan uji, tambahkan 25 μL larutan enzim dengan konsentrasi 0,05 U/ml dan selanjutnya diinkubasi selama 40, 30, 20, dan 10 menit pada suhu 37° C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 100 μL 200 mM natrium karbonat. Larutan diukur serapannya pada λ 405 nm dengan *microplate reader*. Pada uji larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim.

Tabel 3.2 Prosedur Optimasi Waktu Inkubasi

Reagen	Volume (μL)	
	U_1	K_1
DMSO	2	2
Dapar fosfat pH 6,8	63	63
Substrat (konsentrasi optimum)	10	10
Inkubasi pada suhu 37°C, 5 menit		
Enzim (0,05 U/ml)	25	-
Natrium karbonat 200 mM	-	100
Inkubasi pada suhu 37°C (40, 30, 20, dan 15 menit)		
Enzim (0,05 U/mL)	-	25
Natrium karbonat 200 mM	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405 \text{ nm}$		

3.5.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

3.5.5.1 Pengujian Sampel

Pengujian sampel meliputi ekstrak dan fraksi gabungan dilakukan dalam berbagai konsentrasi yaitu untuk ekstrak heksan dilakukan pada konsentrasi 75, 50, 25, 20, dan 10 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak etil asetat dilakukan pada konsentrasi 50, 40, 30, 20, dan 10 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak metanol dilakukan pada konsentrasi 100, 75, 50, 25, dan 10 $\mu\text{g/mL}$, dan fraksi gabungan B, C, E, dan G dilakukan pada konsentrasi 50, 40, 30, 20, dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Untuk memperoleh konsentrasi akhir yang diinginkan di dalam sumuran, jumlah sampel dan dapar posfat pH 6,8 yang diambil bervariasi bergantung pada konsentrasi sampel. Konsentrasi 100, 75, 50, 40, 30, 25, 20, dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dapat diperoleh dengan mengambil sampel berturut-turut sebanyak sebanyak 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, dan 2 μL dan dapar posfat pH 6,8 berturut-turut sebanyak 45, 50, 55, 57, 59, 60, 61, dan 63 μL .

Prosedur uji penghambatan sampel dilakukan dengan cara mengambil 45-63 μL larutan dapar fosfat pH 6,8, 10 μL p-Nitrofenil α -Dglukopiranosida (PNPG) dan 2-20 μL larutan sampel lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C. Kemudian

ditambahkan 25 μL larutan enzim. Larutan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37° C. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 100 μL natrium karbonat 0,2 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm. Hitung % inhibisi pada setiap konsentrasi ekstrak dan IC_{50} pada setiap sampel.

3.5.5.2 Pengujian Kontrol Sampel

Pengujian kontrol sampel, konsentrasi sampel yang digunakan juga bervariasi seperti pada pengujian sampel oleh karena itu variasi volume sampel dan dapar posfat pH 6,8 yang diambil juga bervariasi. Untuk memperoleh konsentrasi 100, 75, 50, 40, 30, 25, 20, dan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dilakukan dengan mengambil sampel berturut-turut sebanyak sebanyak 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, dan 2 μL dan dapar posfat pH 6,8 berturut-turut sebanyak 45, 50, 55, 57, 59, 60, 61, dan 63 μL .

Prosedur pengujian kontrol sampel dilakukan dengan mengambil larutan dapar posfat pH 6,8 sebanyak 45-63 μL , 10 μL p-Nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG) dan 2-20 μL larutan sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 100 μL natrium karbonat 0,2 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37° C. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 25 μL larutan enzim. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

3.5.5.3 Pengujian Standar Akarbose

Pengujian akarbose dilakukan dalam berbagai konsentrasi yaitu 50, 40, 30, 20, dan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Untuk memperoleh konsentrasi tersebut maka volume akarbose dan dapar posfat yang diambil bervariasi. Konsentrasi 50, 40, 30, 20, dan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dapat diperoleh dengan mengambil larutan akarbose berturut-turut sebanyak 10, 8, 6, 4, dan 2 μL dan dapar posfat pH 6,8 berturut-turut sebanyak 55, 57, 59, 61, dan 63 μL .

Prosedur pengujian akarbose dilakukan dengan mengambil larutan dapar posfat pH 6,8 sebanyak 55-63 μL , 10 μL p-Nitrofenil α -Dglukopiranosida (PNPG) dan 2-10 μL larutan akarbose lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C. Kemudian ditambahkan 25 μL larutan enzim. Larutan diinkubasi kembali selama 30

menit pada suhu 37° C. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 100 µL natrium karbonat 0,2 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm. Hitung nilai % inhibisi pada setiap konsentrasi akarbose dan nilai IC₅₀ akarbose.

3.5.5.4 Pengujian Kontrol Standar Akarbose

Pengujian kontrol akarbose, konsentrasi akarbose yang digunakan juga bervariasi seperti pada pengujian akarbose oleh karena itu variasi volume sampel dan dapar posfat pH 6,8 yang diambil juga bervariasi. Untuk memperoleh konsentrasi 50, 40, 30, 20 dan 10 µg/mL dilakukan dengan mengambil sampel berturut-turut sebanyak 10, 8, 6, 4, dan 2 µL dan dapar posfat pH 6,8 berturut-turut sebanyak 55, 57, 59, 61, dan 63 µL.

Prosedur pengujian kontrol akarbose dilakukan dengan mengambil larutan dapar posfat pH 6,8 sebanyak 55-63 µL, 10 µL p-Nitrofenil α-Dglukopiranosida (PNPG) dan 2-10 µL larutan akarbose diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C. Kemudian ditambahkan 100 µL natrium karbonat 0,2 M untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37° C. Setelah masa inkubasi selesai, segera ditambahkan 25 µL larutan enzim. Larutan diukur serapannya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

3.5.5.5 Pengujian Blanko

Sejumlah 2 µL DMSO ditambah dengan 63 µL dapar posfat (pH 6,8) dan 10 µL p-Nitrofenil α-D-glukopiranosida (PNPG), diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C. Ke dalam larutan, ditambahkan 25 enzim 0,05 U/ml, dan kemudian diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37° C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 100 µL natrium bikarbonat. Blanko diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

3.5.5.6 Pengujian Kontrol Blanko

Sejumlah 2 μL DMSO ditambah dengan 63 μL dapar posfat (pH 6,8) dan 10 μL p-Nitrofenil α -glukopiranosida (PNPG), diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C. Ke dalam larutan, ditambahkan 100 μL natrium bikarbonat, dan kemudian diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37° C. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 25 μL enzim 0,05 U/ml. Kontrol blanko diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Tabel 3.3 Prosedur Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Reagen	Volume (μL)			
	Blanko	Kontrol Blanko	Sampel	Kontrol Sampel
Inhibitor	-	-	2 - 20	2 - 20
DMSO	2	2	-	-
Dapar Fosfat (pH 6,8)	63	63	45 - 63	45 - 63
Substrat	10	10	10	10
Inkubasi selama 5 menit pada suhu 37° C				
Natrium karbonat	-	100	-	100
Enzim	25	-	25	-
Inkubasi 30 menit pada suhu 37° C				
Natrium karbonat	100	-	100	-
Enzim	-	25	-	25

3.5.5.7 Perhitungan Penghambatan Aktivitas Enzim

Aktivitas penghambatan α -glukosidase dapat dihitung melalui persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = \left(1 - \frac{B}{A} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

A : Perubahan serapan larutan uji tanpa ekstrak (dengan enzim) – kontrol blanko (tanpa enzim)

B : Perubahan serapan larutan uji dengan ekstrak uji (dengan enzim) – kontrol sampel (tanpa enzim)

Sebagai kontrol positif, digunakan akardose dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 yang dihitung melalui persamaan regresi linier, $y = a + bx$.

3.6 Penapisan Fitokimia

a. Identifikasi alkaloid (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Ekstrak kental beberapa mg dilarutkan dengan 10 ml campuran air suling dan HCl 2 N (9:1), dipanaskan selama 2 menit. Selanjutnya disaring dan 1 ml filtrat digunakan sebagai larutan percobaan yang selanjutnya dilakukan sebagai berikut:

- 1) Ditambahkan 2 tetes Bouchardat LP. Hasil positif dengan terbentuk endapan coklat sampai hitam.
- 2) Ditambahkan 2 tetes Mayer LP. Hasil positif dengan terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol.
- 3) Ditambahkan 2 tetes Dragendorff LP. Hasil positif terbentuk endapan jingga coklat.

Identifikasi alkaloid juga dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak kloroform : metanol = 85 : 15. Reagen semprot yang digunakan adalah Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna oranye atau coklat (Wagner et al., 1984).

b. Identifikasi flavonoid (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 4 ml etanol 95% hingga ekstrak larut.

- 1) 2 ml larutan uji ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 ml HCl 2N, didiamkan 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Dikocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Terbentuk warna merah intensif (positif flavonoid).
- 2) 2 ml larutan uji ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Dikocok perlahan. Terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron).
- 3) Ekstrak ditambahkan aseton, dilarutkan. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat dan asam oksalat, dipanaskan hati-hati dan hindari pemanasan berlebihan. Kemudian ditambahkan 10 ml eter. Diamati dengan sinar

ultraviolet 366nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif (positif flavonoid).

Identifikasi flavonoid juga dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak butanol : asam asetat glasial : air = 4 : 1 : 5. Reagen semprot yang digunakan adalah AlCl_3 . Hasil positif ditunjukkan saat difluoresensi berwarna kuning (Wagner et al., 1984).

c. Identifikasi terpen (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 5 mL larutan eter, kemudian diuapkan di dalam cawan penguap, ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat, kemudian 1 tetes asam sulfat pekat. Filtrat mengandung sterol/ terpen apabila terbentuk warna merah-hijau-violet-biru.

Identifikasi terpen juga dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak benzene : etil asetat = 9 : 1. Reagen semprot yang digunakan adalah anisaldehyd-asam sulfat dan vanillin-asam sulfat. Setelah dielusi lalu dipanaskan, jika terbentuk bercak warna ungu menunjukkan bahwa hasil positif (Wagner et al., 1984).

d. Identifikasi tanin (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Beberapa mg ekstrak kental ditambahkan 15 ml air panas. Kemudian panaskan hingga mendidih selama 5 menit. Disaring filtrat (filtrat c)

- 1) Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1 % menghasilkan warna hijau violet.
- 2) Ditambahkan beberapa tetes gelatin membentuk endapan putih.
- 3) Dijenuhkan dengan Na asetat ditambah FeCl_3 1% menghasilkan warna biru tinta atau hitam, menunjukkan adanya tanin galat.

Identifikasi tanin juga dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak butanol : asam asetat glasial : air = 4 : 1 : 5. Reagen semprot yang digunakan adalah FeCl_3 . Hasil positif ditunjukkan saat terbentuk bercak berwarna hijau kehitaman setelah disemprotkan reagen (Wagner et al., 1984).

e. Identifikasi saponin (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 menit. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

Identifikasi saponin juga dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak butanol : asam asetat glasial : air = 5 : 1 : 4. Reagen semprot yang digunakan adalah anisaldehyd - asam sulfat. Hasil positif ditunjukkan saat terbentuk bercak berwarna ungu setelah dipanaskan (Wagner et al., 1984).

f. Identifikasi glikosida (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 20 ml etanol 70%, kemudian ditambahkan 25 ml air dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4M, dikocok, didiamkan selama 5 menit dan saring. Filtrat disari tiga kali, tiap kali dengan 20 ml campuran (3:1) kloroform P dan isopropanol. Kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C. Sisa dilarutkan dengan 2 ml metanol.

1) Larutan percobaan sebanyak 1 ml diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dengan 2 ml air dan 5 tetes Mollisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 2 ml asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (Reaksi Molisch).

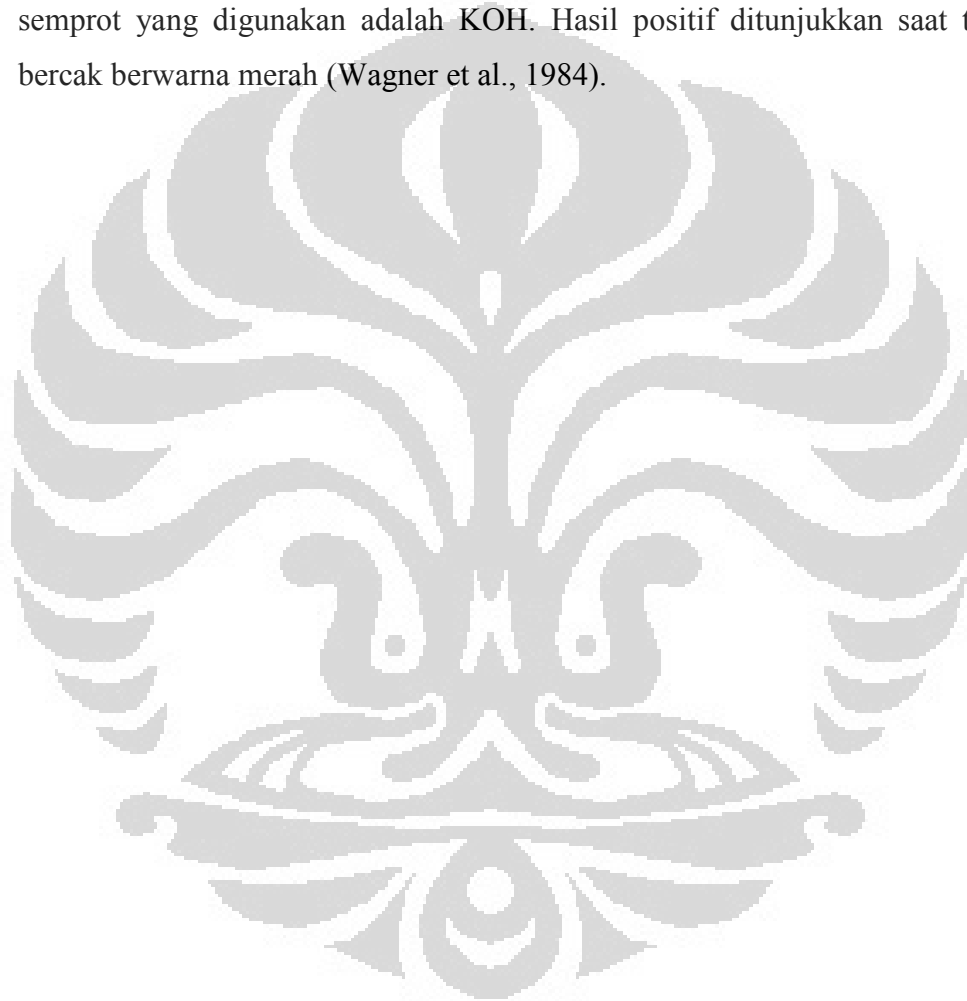
g. Identifikasi antrakuinon (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Beberapa mg ekstrak kental ditambahkan 10 ml air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring. Kedalam 5 ml filtrat ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N, terbentuk warna merah (positif kuinon).

Beberapa mg ekstrak dilarutkan dengan 5 ml asam sulfat 2N, dipanaskan sebentar kemudian didinginkan. Ditambahkan 10 ml benzen P, dikocok,

didiamkan. Lapisan benzena dipisahkan, disaring, filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Lapisan benzena dikocok dengan 1 ml sampai 2 ml natrium hidroksida 2N, didiamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzena tidak berwarna.

Identifikasi antrakuinon juga dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak etil asetat : metanol : air = 100 : 17 : 13. Reagen semprot yang digunakan adalah KOH. Hasil positif ditunjukkan saat terbentuk bercak berwarna merah (Wagner et al., 1984).



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan Uji

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah meniran yang diperoleh dari BALITRO. Bagian yang digunakan dari meniran adalah herba atau seluruh bagian tanaman yang berada di atas permukaan tanah. Herba meniran yang telah diperoleh lalu disortir untuk dipisahkan dari pengotor-pengotor dan dicuci hingga bersih dengan air mengalir. Kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan selama kurang lebih 5 hari dan sesekali dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40^o C selama 1 jam untuk mempercepat proses pengeringan. Setelah tanaman sudah kering lalu diserbukkan dengan mesin penggiling dan diayak dengan ayakan 50 Mesh.

4.2 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia sebanyak \pm 2 kg (2017,5 gram) diekstraksi dengan cara panas, yaitu dengan refluks. Proses ekstraksi dilakukan secara bertingkat mulai dari pelarut non polar (heksan), dilanjutkan dengan pelarut semi polar (etil asetat), dan polar (metanol).

Refluks dilakukan selama 30 menit dihitung setelah terbentuk tetesan pada ujung bagian bawah kondensor yang menunjukkan bahwa pelarut telah menguap dan mengalami pendinginan karena adanya air pada kondensor. Filtrat yang diperoleh kemudian disaring, bagian ampas akan direfluks lebih lanjut dengan pelarut yang sama. Proses refluks dilakukan sebanyak 7 kali. Filtrat yang telah disaring kemudian diuapkan dengan bantuan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental (ekstrak tidak dapat mengalir).

Ekstraksi pertama menggunakan pelarut heksan sebagai ekstrak non polar yang bertujuan untuk menarik klorofil yang terkandung dalam simplisia herba meniran. Setelah diperoleh warna ekstrak yang konstan, kemudian ampas simplisia dikeluarkan dari labu refluks untuk dikeringkan di dalam lemari asam. Ampas yang telah kering kemudian diekstraksi kembali dengan pelarut semi polar yaitu etil asetat

yang bertujuan untuk menarik senyawa-senyawa semipolar seperti flavonoid. Refluks dilakukan selama 7 kali, bagian ampas dikeluarkan lagi dari labu refluks untuk dikeringkan dan akan dilakukan proses ekstraksi dengan pelarut polar, yaitu metanol.

Masing-masing ekstrak kental dari tiap pelarut kemudian ditimbang dan dihitung untuk mengetahui persen rendemennya. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Departemen Kesehatan, 2000). Setelah ditimbang diperoleh masing-masing berat ekstrak heksan, etil asetat, dan metanol berturut-turut sebanyak 107,2 g, 62,4 g, dan 175,5 g. Dengan demikian dapat dihitung masing-masing rendemen yang diperoleh dari ekstraksi ini yaitu 5,31 %, 3,09%, dan 8,7 % , kemudian ekstrak disimpan pada suhu ruang.

4.3 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dipisahkan senyawanya dengan kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan adalah silika dan fase gerak yang digunakan adalah gradien heksan : etil asetat kemudian dilanjutkan gradien etil asetat : metanol.

Fase gerak kromatografi kolom yang digunakan mulai dari heksan 100 % hingga metanol 100% yang ditingkatkan kepolarannya sebanyak 5% setelah menambahkan eluen sebanyak 400 ml. Namun, ketika terjadi pemisahan yang baik (terbentuknya pita-pita pada kolom) pada perbandingan tertentu, eluen yang diberikan tidak dinaikkan kepolarannya hingga pita turun. Setelah pita turun kemudian eluen dinaikkan kembali kepolarannya.

Hasil fraksi kromatografi kolom diperoleh sebanyak 150 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut digabung dengan melihat pola kromatogramnya dengan kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sesuai (Gambar 4.1-Gambar 4.8). Untuk fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama dapat disatukan. Setelah fraksi digabung, diperoleh beberapa fraksi gabungan sebanyak 8 fraksi (fraksi A, B, C, D, E, F, G, dan H). Fraksi A merupakan hasil penggabungan fraksi 1-22 dengan menggunakan eluen heksan dan etil asetat dengan perbandingan 9 : 1 (Gambar 4.1), fraksi B merupakan hasil penggabungan fraksi 23-57 dengan menggunakan eluen heksan dan etil asetat

dengan perbandingan 7 : 3 (Gambar 4.2), fraksi C merupakan hasil penggabungan fraksi 58-67 dengan menggunakan eluen heksan dan etil asetat dengan perbandingan 7 : 3 (Gambar 4.3), fraksi D merupakan hasil penggabungan fraksi 68-74 dengan menggunakan fase gerak heksan dan etil asetat dengan perbandingan 3 : 7 (Gambar 4.4), fraksi E merupakan hasil penggabungan fraksi 75-94 dengan menggunakan fase gerak etil asetat dan metanol dengan perbandingan 7 : 3 (Gambar 4.5), fraksi F merupakan hasil penggabungan fraksi 95-105 dengan menggunakan fase gerak etil asetat dan metanol dengan perbandingan 7 : 3 (Gambar 4.6), fraksi G merupakan hasil penggabungan fraksi 106-127 dengan menggunakan fase gerak etil asetat dan metanol dengan perbandingan 5 : 5 (Gambar 4.7), dan fraksi H merupakan hasil penggabungan fraksi 128-150 dengan menggunakan fase gerak etil asetat dan metanol dengan perbandingan 5 : 5 (Gambar 4.8).

Hasil fraksi penggabungan tersebut kemudian ditimbang dan dihitung untuk melihat nilai rendemen dari tiap fraksi gabungan tersebut. Berat dari masing-masing fraksi A, B, C, E, F, G, dan H berturut-turut sebesar 0,0659, 0,2366, 0,5572, 0,0132, 1,0781, 0,0429, 0,9284, dan 1,7726 gram serta memiliki nilai rendemen berturut-turut sebesar 0,191%, 0,686%, 1,615%, 0,038%, 3,125%, 0,124%, 2,691%, dan 5,138%. Fraksi yang memiliki berat di atas 100 mg terdapat 5 buah yaitu fraksi B, C, E, G, dan H. Namun fraksi H merupakan hasil sisa kromatografi kolom karena pada fraksi tersebut menggunakan fase gerak metanol 100% yang merupakan eluen terakhir dari proses fraksinasi tersebut. Dimana tidak ada pemisahan yang baik. Oleh karena itu fraksi H tidak dilakukan uji aktivitas

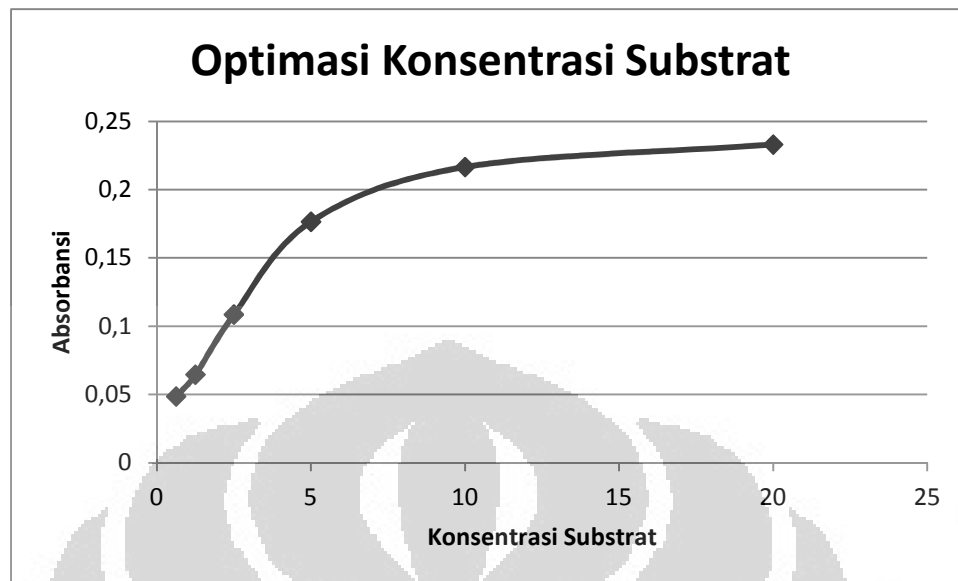
Keempat fraksi gabungan tersebut kemudian diuji aktivitasnya penghambatannya terhadap α -glukosidase. Fraksi teraktif yang memiliki IC_{50} yang paling kecil kemudian diuji kinetiknya untuk mengetahui jenis inhibisinya yaitu inhibisi kompetitif atau non-kompetitif dan dilakukan identifikasi kimia untuk mengetahui golongan senyawa apa saja yang terkandung di dalam fraksi tersebut. Oleh karena itu fraksi yang dipilih yang memiliki berat di atas 100 mg.

4.4 Uji Kondisi Optimasi Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Sebelum melakukan uji penghambatan aktivitas α -glukosidase pada ekstrak dan fraksi, dilakukan uji optimasi terlebih dulu untuk mengetahui kondisi dimana enzim dapat bekerja secara optimum. Pada uji optimasi ini, dilakukan optimasi konsentrasi substrat p-nitrofenil-D-glukopiranosida dan waktu inkubasi. Tujuan dari optimasi konsentrasi substrat adalah untuk mengetahui konsentrasi substrat dimana enzim telah jenuh oleh substrat, dan optimasi waktu inkubasi adalah untuk mengetahui waktu optimum dimana enzim telah habis bereaksi dengan substrat.

Variasi konsentrasi substrat yang digunakan dalam uji optimasi konsentrasi substrat ini adalah 20, 10, 5, 2,5, 1,25, dan 0,625 mM dan variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 10, 20, dan 30 menit. Pengujian optimasi pertama yang dilakukan adalah penentuan konsentrasi substrat yang optimum dimana enzim bekerja secara optimal yang kemudian konsentrasi substrat optimum digunakan untuk menentukan optimasi waktu inkubasi.

Substrat sebanyak 10 μ L dengan berbagai konsentrasi (20, 10, 5, 2,5, 1,25, dan 0,625 mM) dan dapar posfat (pH 6,8) masing dimasukkan ke dalam sumuran lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37⁰ C, kemudian ditambahkan larutan enzim (0,05 U/ml) dan diinkubasi kembali pada suhu 37⁰ C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, untuk menghentikan reaksi enzimatik yang terjadi ditambahkan natrium karbonat 0,2 M sebanyak 100 μ L. Produk yang dihasilkan kemudian diukur dengan *microplate reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Untuk mengoreksi hasil serapan uji dilakukan dengan membuat control dimana posisi penambahan natrium karbonat ditukar dengan enzim, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu untuk melihat apakah aktivitas enzim berhenti setelah ditambahkan natrium karbonat sehingga tidak ada produk yang terbentuk. Data dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan grafik dapat dilihat pada gambar berikut.

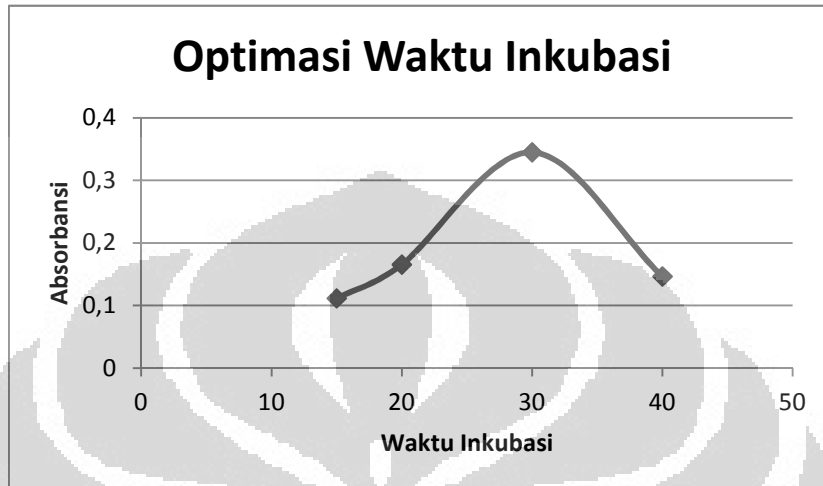


Gambar 4.9 Grafik Optimasi Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi akan bertambah seiring meningkatnya konsentrasi, dapat terlihat pada Gambar 4.3 bahwa pada konsentrasi substrat 0,625 hingga 10 mM kecepatan reaksi berlangsung cepat kemudian melemah pada 20 mM. Hal ini menunjukkan bahwa pada substrat dengan konsentrasi 10 mM telah mencapai kecepatan yang maksimal dan dengan penambahan substrat tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan reaksi. Oleh karena itu kondisi optimal konsentrasi substrat yang dipilih adalah 10 mM.

Pengujian optimasi waktu inkubasi dilakukan selama 15, 20, 30, dan 40 menit dimana substrat sebanyak 10 μ L dengan konsentrasi 10 mM dan dapar posfat (pH 6,8) sebanyak 63 μ L dimasukkan ke dalam sumuran lalu diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 5 menit, kemudian ditambahkan larutan enzim (0,05 U/ml) dan diinkubasi kembali pada suhu 37⁰ C selama 15, 20, dan 30 menit. Setelah inkubasi selesai dilakukan penambahan natrium karbonat untuk menghentikan reaksi enzimatik yang terjadi sebanyak 100 μ L dengan konsentrasi 0,2 M. Produk yang dihasilkan kemudian diukur dengan *microplate reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Untuk mengoreksi hasil serapan uji dilakukan dengan membuat control dimana posisi penambahan natrium karbonat ditukar dengan enzim, penambahan natrium karbonat

dilakukan terlebih dahulu untuk melihat apakah aktivitas enzim berhenti setelah ditambahkan natrium karbonat sehingga tidak ada produk yang terbentuk. Data dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan grafik dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.10 Grafik Optimasi Waktu Inkubasi

Dari grafik terlihat bahwa dengan meningkatnya waktu inkubasi maka absorbansi yang terukur juga semakin meningkat, menunjukkan bahwa produk yang terbentuk semakin banyak. Namun pada menit ke-40 terjadi penurunan absorbansi, hal ini disebabkan terbentuknya p-nitrofenil dan α -D-glukosa yang merupakan produk inhibitor karena memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida. Oleh karena itu yang waktu optimum yang digunakan untuk pengujian adalah 30 menit.

4.5 Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Uji aktivitas dilakukan untuk melihat nilai persen inhibisi serta mengetahui kekuatan penghambatannya terhadap enzim tersebut dengan melihat nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas enzim. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 50, 40, 30, 20, dan 10 ppm.

Ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan DMSO secukupnya dan dicukupkan volumenya hingga 10 ml dengan dapar posfat (pH 6,8)

sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 1000 $\mu\text{g/mL}$, kemudian diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 100, 75, 50, 40, 30, 25, 20, dan 10 $\mu\text{g/mL}$.

Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase ini dilakukan pada masing-masing ekstrak heksan, etil asetat, metanol, dan empat fraksi gabungan (fraksi B, fraksi C, fraksi E, dan fraksi G).

Pengamatan penghambatan aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan nilai absorbansi sampel (S) dengan blanko (B). Volume sampel dan dapar posfat pH 6,8 yang digunakan berbeda-beda bergantung pada konsentrasi sampel yang digunakan. Untuk memperoleh konsentrasi sampel 100, 75, 50, 40, 30, 25, 20, dan 10 $\mu\text{g/mL}$, maka volume sampel yang diambil berturut-turut sebanyak 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, dan 2 μL dan volume dapar posfat pH 6,8 yang diambil berturut-turut sebanyak 45, 50, 55, 57, 59, 60, 61, dan 63 μL .

Larutan uji sampel (S1) sebanyak 2-20 μL diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit bersama dengan dapar posfat (pH 6,8) 45-63 μL dan substrat 10 mM sebanyak 10 μL . Kemudian, ditambahkan larutan enzim α -glukosidase (0,05 U/mL) sehingga terjadi reaksi enzimatik dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi enzimatik dihentikan setelah inkubasi selesai dengan menambahkan natrium karbonat sebanyak 100 μL dengan konsentrasi 0,2 M. Produk yang terbentuk dari reaksi enzimatik tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm. Kontrol sampel (S0) dilakukan untuk mengetahui apakah ada senyawa lain yang terukur pada panjang gelombang tersebut sehingga dapat mengganggu pengamatan, oleh karena itu kontrol digunakan untuk mengoreksi hasil serapan yang terukur selain produk yang terbentuk. Larutan blanko (B1) adalah larutan uji tanpa ekstrak dan dilakukan dengan prosedur yang sama seperti larutan uji sampel, kontrol blanko (B0) pun juga dilakukan untuk mengoreksi absorbansi yang terukur pada larutan uji. Kontrol dilakukan dengan menukar posisi penambahan natrium karbonat dan enzim, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dulu agar tidak terjadi reaksi enzimatik sehingga tidak terbentuk produk, maka selain produk dapat terukur absorbansinya pada panjang gelombang tersebut.

Hasil uji aktivitas ekstrak metanol diperoleh nilai IC_{50} sebesar 23,31 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak etil asetat diperoleh nilai IC_{50} sebesar 17,68 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak heksan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 51,77 $\mu\text{g/mL}$. Pada Gambar 4.5 terlihat bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan yang paling baik diantara ekstrak lainnya adalah ekstrak etil asetat dengan nilai IC_{50} 17,68 $\mu\text{g/mL}$.

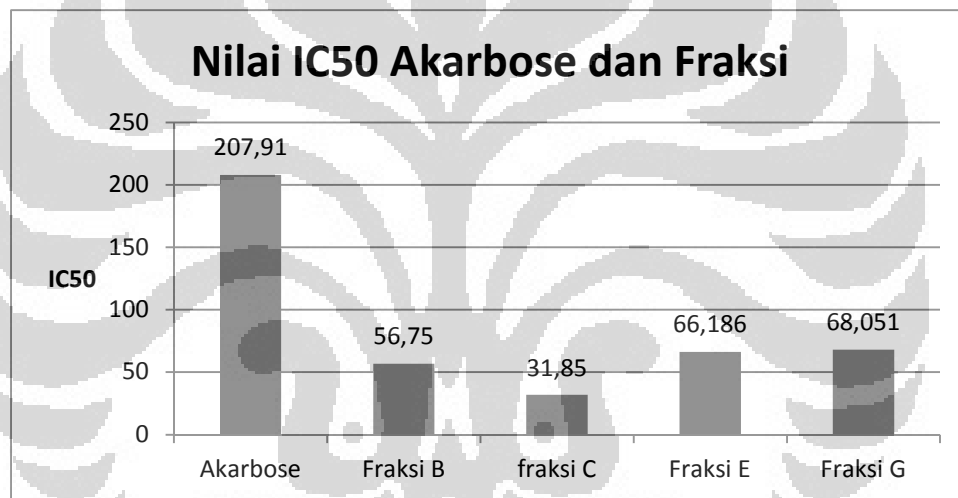


Gambar 4.11 Grafik Perbandingan Nilai IC_{50} dari Ekstrak n-Heksan, Etil Asetat, dan Metanol

Pada hasil uji aktivitas fraksi B diperoleh nilai IC_{50} sebesar 56,75 $\mu\text{g/mL}$, fraksi C diperoleh nilai IC_{50} sebesar 31,85 $\mu\text{g/mL}$, fraksi E diperoleh nilai IC_{50} sebesar 66,186 $\mu\text{g/mL}$, dan fraksi G diperoleh nilai IC_{50} sebesar 68,051 $\mu\text{g/mL}$. Dari data tersebut menunjukkan bahwa fraksi yang paling aktif dalam menghambat aktivitas α -glukosidase adalah fraksi C karena memiliki nilai IC_{50} yang paling rendah diantara yang lainnya, dimana dengan konsentrasi 31,85 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghambat 50% aktivitas enzim. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} yang baik, yaitu 2,61 $\mu\text{g/mL}$ (Khairunnisa, 2012). Fraksi etil asetat (hasil fraksinasi dengan partisi cair-cair) memiliki nilai IC_{50} yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai IC_{50} fraksi C (hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom), hal ini dapat terjadi karena pada fraksi etil asetat yang dilakukan dengan partisi cair-cair mengandung berbagai macam senyawa yang dapat

menghambat aktivitas α -glukosidase sehingga memiliki efek sinergis. Oleh karena itu nilai IC_{50} yang diperoleh lebih kecil dibandingkan dengan hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom.

Sebagai pembanding, digunakan akarbose karena telah digunakan di pasaran untuk mengobati diabetes dengan metode penghambatan α -glukosidase. Pada saat reaksi enzimatik, akarbose menghambat substrat secara kompetitif. Sisi akarbose yang menduduki tapak katalitik enzim adalah daerah ikatan amida. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa akarbose memiliki nilai IC_{50} sebesar 207,91 (lihat tabel 4.13). Perbandingan nilai IC_{50} antara fraksi B, C, E, G, dan akarbose dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.12 Perbandingan Nilai IC_{50} dari Akarbose dan Fraksi B, C, E, dan G

Berdasarkan nilai IC_{50} , akarbose memiliki penghambatan aktivitas enzim yang rendah. Hal ini disebabkan enzim dan akarbose yang digunakan berasal dari sumber yang berbeda. α -Glukosidase berasal dari *Saccharomyces cereviceae* sedangkan akarbose efektif menghambat α -glukosidase yang berada pada usus tikus (Kim, et al., 2008; Shinde, et al., 2008).

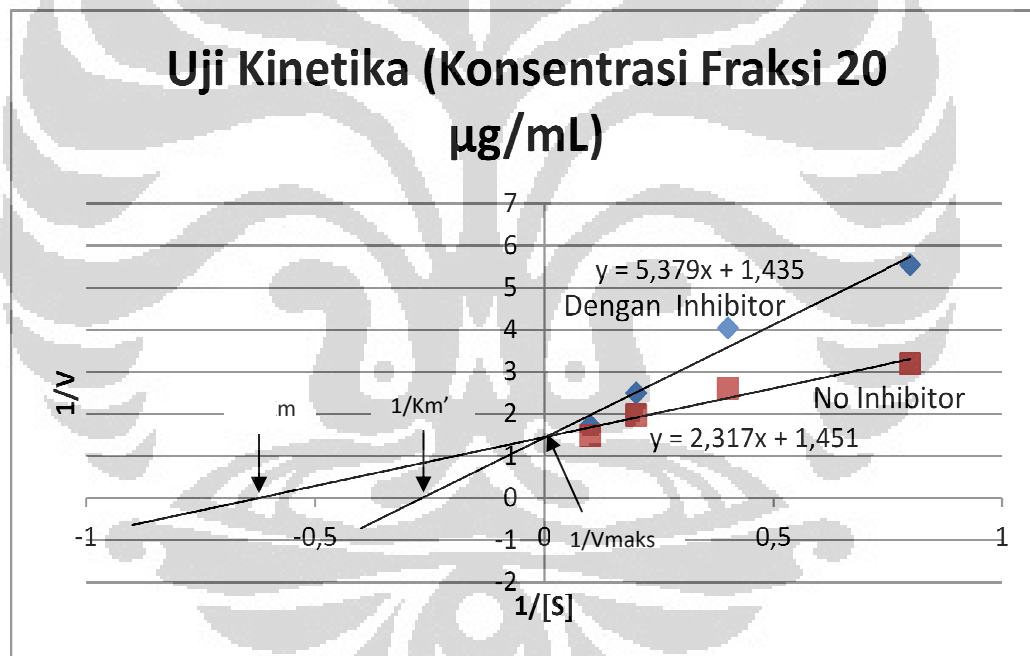
4.6 Uji Kinetika Penghambatan α -Glukosidase

Uji kinetika enzim dilakukan untuk melihat jenis hambatan yang dilakukan oleh inhibitor (fraksi) terhadap enzim. Uji kinetika ini dilakukan dengan

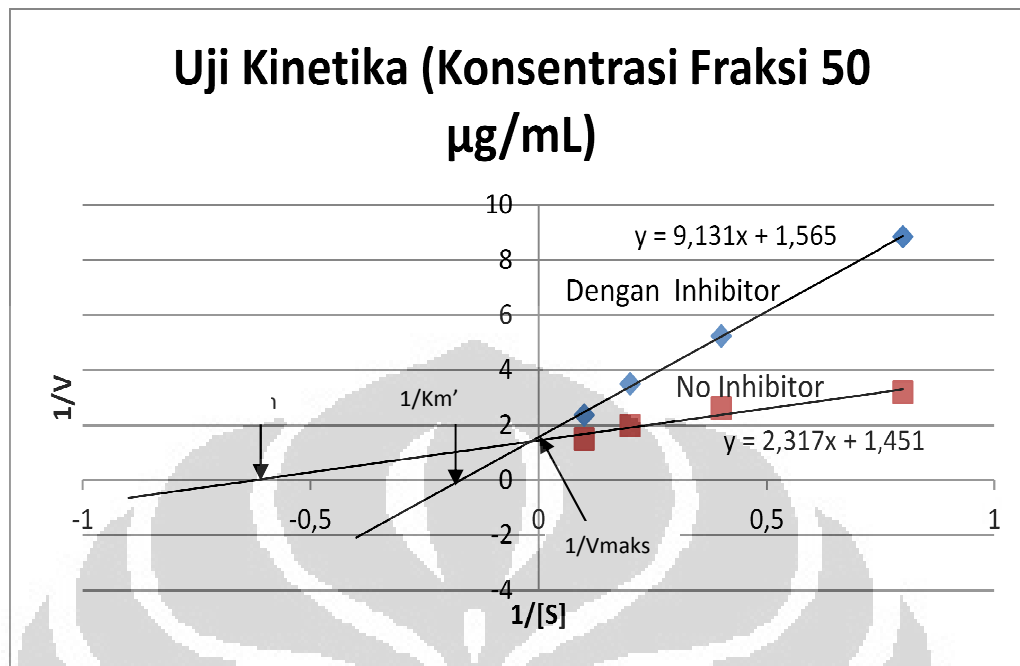
memvariasikan konsentrasi substrat baik tanpa inhibitor maupun dengan adanya inhibitor.

Untuk menganalisis kinetika enzim, dapat menggunakan plot Lineweaver-Burk, dimana sumbu x adalah satu per konsentrasi substrat ($1/S$) sedangkan sumbu y adalah kecepatan reaksi enzim ($1/V$). Kinetika enzim dapat diketahui dengan meningkatkan konsentrasi substrat, variasi konsentrasi yang digunakan adalah 10, mM, 5 mM, 2,5 mM, dan 1,25 mM.

Hasil uji kinetika dari fraksi C yang merupakan fraksi teraktif menunjukkan bahwa jenis inhibisi dari fraksi tersebut adalah kompetitif, dapat dilihat pada Gambar 4.10 (dengan konsentrasi fraksi 20 $\mu\text{g/mL}$) dan Gambar 4.11 (dengan konsentrasi fraksi 50 $\mu\text{g/mL}$).



Gambar 4.13 Grafik Uji Kinetika dengan Konsentrasi Ekstrak 20 $\mu\text{g/mL}$



Gambar 4.14 Grafik Uji Kinetika dengan Konsentrasi Ekstrak 50 $\mu\text{g/mL}$

Dari grafik terlihat bahwa jenis inhibisi yang terjadi adalah kompetitif klasik, dimana terjadi perpotongan antara garis dengan berbagai konsentrasi ekstrak dan tanpa inhibitor pada sumbu y, yaitu pada $1/V_{\text{maks}}$. Hal ini menunjukkan bahwa jika $1/S$ mendekati 0, maka v_i (kecepatan reaksi) tidak bergantung pada keadaan inhibitor. Inhibisi kompetitif klasik terjadi pada tapak pengikatan substrat. Kecepatan pembentukan produk bergantung hanya pada konsentrasi enzim (E) dan substrat (S). Jika penghambat (I) berikatan sangat erat dengan enzim, maka hanya ada sedikit konsentrasi enzim bebas yang tersedia untuk berikatan dengan substrat yang akan membentuk produk. Jika jumlah substrat ditingkatkan, maka dapat meningkatkan kemungkinan bahwa enzim akan lebih banyak berikatan dengan substrat dibandingkan dengan penghambat. Pada konsentrasi substrat yang cukup tinggi, konsentrasi E-I menjadi kecil dan hampir tidak ada sehingga kecepatan reaksi yang dikatalisis akan sama seperti keadaannya tanpa ada penghambat (Murray, 2009).

Inhibisi kompetitif terjadi jika memiliki nilai V_{maks} yang sama baik tanpa inhibitor maupun dengan inhibitor. Pada Tabel 4.11 menunjukkan bahwa nilai V_{maks} dan K_m tanpa adanya inhibitor berturut-turut sebesar 0,6891 dan 1,5968, pada tabel

4.12 dengan adanya inhibitor ($20 \mu\text{g/mL}$) memberikan nilai V_{maks} dan K_m sebesar 0,6968 dan 3,7484, dan pada tabel 4.13 dengan adanya inhibitor ($50 \mu\text{g/mL}$) memberikan nilai V_{maks} dan K_m sebesar 0,6389 dan 5,8345. Dari data tersebut menunjukkan bahwa nilai K_m baik tanpa inhibitor maupun dengan inhibitor memiliki nilai yang berbeda, tetapi memiliki kemiripan nilai V_{maks} . Oleh karena itu fraksi C memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase secara kompetitif.

4.7 Penapisan Fitokimia

Dari uji aktivitas diketahui bahwa fraksi yang memiliki penghambatan aktivitas enzim terbaik dengan nilai IC_{50} terkecil adalah fraksi C yang kemudian akan dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang ada di dalam fraksi tersebut. Beberapa golongan senyawa diketahui memiliki efek hipoglikemik diantaranya alkaloid, glikosida, terpen, flavonoid, dan lain sebagainya (Ebadi,2002).

Hasil identifikasi kimia menunjukkan bahwa untuk alkaloid, tannin, flavonoid, saponin, dan antrakuinon tidak memberikan hasil yang positif. Sedangkan pada terpen dan glikosida memberikan hasil positif.

4.7.1 Alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi Mayer dan Dragendorff, hasil positif dinyatakan dengan terbentuknya endapan. Hasil identifikasi senyawa uji dengan metode Dragendorff dan Mayer menunjukkan bahwa pada fraksi B tidak terdapat senyawa alkaloid, karena setelah direaksikan dengan Mayer dan Dragendorff tidak menimbulkan endapan, dan dengan pereaksi semprot Dragendorff pun tidak memberikan bercak berwarna kuning.

4.7.2 Flavonoid

Hasil identifikasi flavonoid pada senyawa uji dengan metode penambahan aseton, asam borat, asam oksalat, dan dietil eter tidak memberikan warna kuning saat difluoresensi. Selain itu juga, identifikasi dilakukan dengan menggunakan

kromatografi lapis tipis. Fase gerak yang digunakan adalah butanol : asam asetat glasial : air = 4 : 1 : 5. Setelah dielusi dan disemprotkan dengan reagen $AlCl_3$ tidak memberikan fluoresensi berwarna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut tidak mengandung senyawa flavonoid.

4.7.3 Glikosida

Hasil identifikasi glikosida pada sampel uji menggunakan pereaksi Mollisch memberikan hasil yang positif dengan terbentuknya cincin diantara lapisan sampel dan asam sulfat setelah penambahan asam sulfat pekat (lihat Gambar 4.15). Hal ini menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut mengandung senyawa glikosida.

4.7.4 Tanin

Identifikasi tanin dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis, fase gerak yang digunakan adalah butanol : asam asetat glasial : air = 4 : 1 : 5. Setelah dielusi dan disemprotkan dengan reagen $FeCl_3$ memberikan hasil negatif karena tidak terbentuk bercak berwarna hijau kehitaman. Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel tidak mengandung tanin, selain itu karena polaritas antara tanin dan sampel berbeda, dimana tanin bersifat polar sedangkan sampel bersifat semi polar, maka dalam sampel tidak mengandung tanin.

4.7.5 Saponin

Identifikasi senyawa saponin dilakukan dengan menambahkan air panas pada ekstrak uji dan dikocok kuat selama 10 detik. Namun tidak terbentuk buih setelah pengocokan. Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel tidak mengandung saponin.

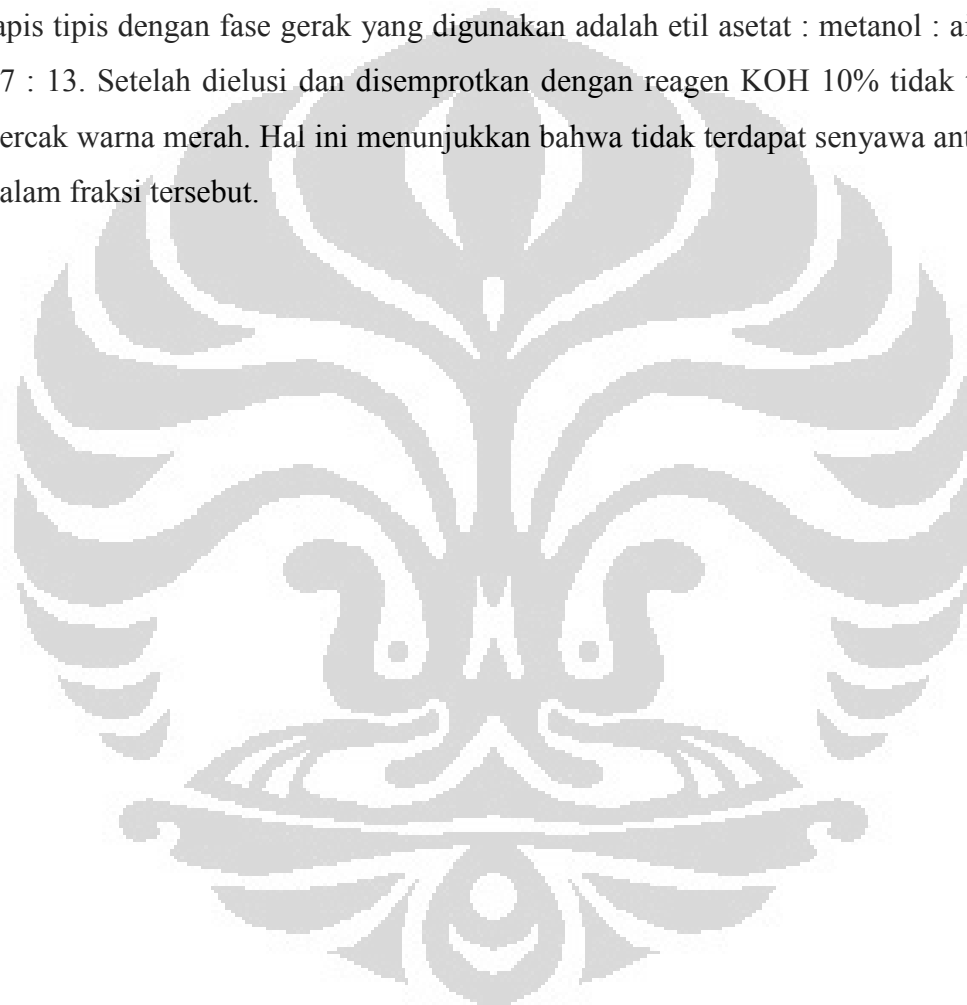
4.7.6 Terpen

Hasil identifikasi terpen menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan fase gerak yang digunakan adalah campuran benzene dan etil asetat dengan perbandingan 9 : 1 memberikan bercak berwarna ungu setelah disemprotkan reagen anisaldehyd (lihat Gambar 4.16). Pereaksi semprot lain yang digunakan adalah asam

sulfat 5% dan larutan vanillin 1% juga memberikan hasil positif dengan munculnya bercak berwarna ungu (lihat Gambar 4.17). Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel mengandung senyawa terpen.

4.7.7 Antrakuinon

Hasil identifikasi senyawa antrakuinon menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : metanol : air = 100 : 17 : 13. Setelah dielusi dan disemprotkan dengan reagen KOH 10% tidak terbentuk bercak warna merah. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat senyawa antrakuinon dalam fraksi tersebut.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Fraksi dari ekstrak etil asetat herba meniran yang memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase terkuat adalah fraksi gabungan C dengan nilai IC_{50} sebesar 31,85 $\mu\text{g/mL}$ dengan jenis inhibisi kompetitif. Fraksi gabungan A, C, dan D masing-masing memiliki penghambatan aktivitas α -glukosidase berturut-turut sebesar 56,75, 66,186, dan 86,051 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil identifikasi senyawa pada fraksi teraktif dari ekstrak etil asetat yaitu fraksi C mengandung senyawa glikosida dan terpen.

5.2 Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi senyawa dari fraksi aktif herba meniran untuk mengetahui senyawa yang ada dalam fraksi tersebut yang dapat menghambat aktivitas α -glukosidase sehingga dapat dikembangkan sebagai obat antidiabetes.

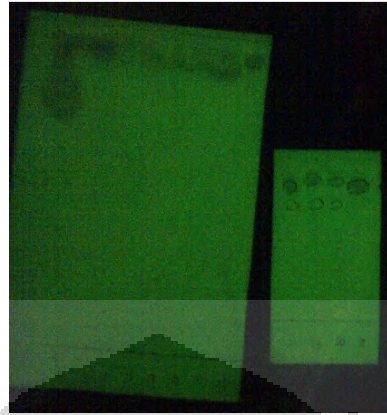
DAFTAR ACUAN

- Bayer Health Care Pharmaceutical. (2011). *PRECOSE (Acarbose Tablet)*. Bayer Health Care Pharmaceutical Inc.
- Cook, Christopher L., Johnson, John T., Wade, William E. (2008). *Pharmacotherapy Principle & Practice*. Marie A. Chisolm-Burns, et al. (Ed.). *Diabetes Melitus*. New York : McGraw-Hill Companies.
- Corwin. (2009). *Buku Saku Patofisiologi* (Nike Budhi Subekti, Penerjemah). Jakarta : Buku Kedokteran EGC.
- Chisolm-Burns, Marie A., et al. (Ed.). (2008). *Pharmacotherapy principles & practice*. New York : McGraw-Hill.
- Daniel, M. (2006). *Medicinal Plants Chemistry and Properties*. New Hampshire : Science Publisher.
- Departemen Farmakologi dan Terapeutik, Fakultas kedokteran, Universitas Indonesia. (2007). *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta : UI Press.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1978). *Materia Medika Indonesia Jilid II*. Jakarta : Author, 22-25
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta : Author, 665.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Vademekum Bahan Obat Alam*. Jakarta : Author, 211-216.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Author, 739.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta : Author, 3-6.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Author.
- Dipiro, J.T., et al. (1999). *Pharmacoteraphy : A Pathophysiologic Approach* (6th ed.). New York : McGraww-Hill, 1333-1363.
- Ebadi, Manuchair. (2002). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. USA : CRC Press LLC.

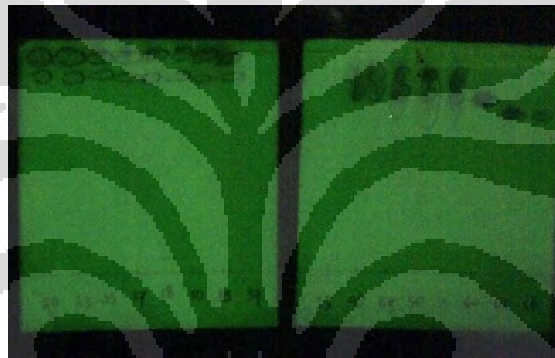
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3), 226-276.
- Greiner Bio-One. (2004). Application Note UV/VIS Spectroscopy in Microplates. USA.
- Grover, J.K., Yadav, S., Vats. (2002). Medicinal Plants of India with Anti-Diabetic Potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81 : 81 – 100.
- Harborne, J. B. (1978). *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro, Penerjemah). Bandung : ITB.
- Jones, S.B., Luchsinger, A.E. (1987). *Plant systematic* (2nd ed.). New York : McGraw-Hill Companies, Inc, 368-369.
- Joseph, B., Raj, S.J. (2011). An Overview : Pharmacognostic Properties of *Phyllanthus amarus* Linn. *International Journal of Pharmacology* 7 (1) : 40–45.
- Khairunnisa, Silvi. (2012). Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi-Fraksi Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Melalui Penghambatan aktivitas α -Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif. Depok : Universitas Indonesia.
- Khan, F. A., Hussain, Iqbal., Farooq, Shahid., Ahmad, Majed., Arif, Muhammad., Rehman, Inayat Ur. (2011). Phytochemical of Screening of Some Pakistan Medicinal Plants. *Middle-East Journal of Scientific Research* 8 (3) : 575 – 578.
- Khavishankar, G.B., Lakshmidevi, N., Murthy, S. Mahadeva., Prakash, H.S., Niranjana, S.R. (2011). Diabetes and Medicinal Plants-A Review. *International Journal Pharm Biomed Science* 2 (3), 65 – 80.
- Kim, K. Y., K. A, Nam., H. Kurihara, & S. M. Kim. (2008). Potent α -Glicosidase Inhibitors Purified from the Red Alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*, 69, 2820 – 2825.
- Masitoh, Siti. (2011). *Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol Beberapa Tanaman Obat Indonesia serta Uji Aktivitas Antidiabetes melalui penghambatan Enzim α -Glukosidase*. Depok : Universitas Indonesia
- Marieb, E.N., Hoehn, K. (2007). *Human Anatomy & Physiology* (7th Ed). Pearson Education.

- Mollitch, Mark E., Umpierrez, Guillermo. (2007). Diabetes and Incretin-Based Therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92 (4) : 1-2.
- Murray, Robert K. (2009). *Biokimia Harper*. (Edisi ke-27. Brahm U. Pendit, Penerjemah.). Jakarta : EGC.
- Murugaiyah, Vikneswaran. (2008). *Phytochemical, Pharmacological, and Pharmacokinetic Studies of Phyllanthus Niruri Linn Lignans as Potensial Antihyperuremic Agents*. Malaysia : Universiti Sains Malaysia.
- Nair, Rakhee R., Abraham, Regin Susan. (2008). Integrating the Science of Pharmacology and Bio Informatics Phyllanthus “The Wonder Plant”. *Advance Biotech* : 28 – 30.
- Nayak, Preeti Sagar., Upadhyay, Anubha., Dwivedi, Sunil Kumar., Rao, Sathrupa. (2010). Quantitative Determination of Phyllanthin in *Phyllanthus amarus* by High Performance Thin Layer Chromatography. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (5): 353 – 358.
- National Agency of Drug and Food Control The Republic of Indonesia. (2004). *Monograph of Indonesian Medicinal Plant Extract Volume 1*. Jakarta : Author.
- PROSEA. (1999). *Plant Resources of South-East Asia 12 (1) Medicinal and Poisonous Plants I*. Netherland : Prosea Foundation.
- PROSEA. *Detil Data Ceiba pentandra* Gaertn..
<http://www.proseanet.org/prohati2/browser.php?docsid=398>
- Robinson, Trevor. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung : ITB
- Sermakkani, M., Thangapandian, V. (2010). Phytochemical Screening for Active Compounds in *Pedaliium Murex* L. *Recent Research in Science and Technology* 2 (1) : 110 – 114.
- Shinde, Jayantrao., et al. (2008). α -Glucosidase Inhibitory Activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels Seed Kernel In Vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Research* 343 : 1278 – 1281.
- Sigma. (1996). *Enzymatic assay of α -Gucosidase (EC.3.2.1.20)*. Desember 10, 2011. www.sigmaaldrich.com/.../alpha_glucosidase.../alpha_glucosidase_sed.pdf.

- Silverstein, Robert M., Webster, Francis X., Kiemle, David J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Coumpounds*. (Ed. ke-7). Hoboken NJ : John Wiley & Sons, Inc.
- Soumyanath, Amala. (2006). *Traditional medicines for modern times : Antidiabetic plant*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Touchstone, Joseph C., Dobbins, Murrel F. (1983). *Practice Thin Layer Chromatography*. (Ed. ke-2). Canada : John Wiley & Sons.
- United States Pharmacopoeial Convention *ed. 30*. (2007).
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. (1984). *Plant Drug Analysis* (Thomas A. Scott, Translator). New York : Springer Veriag Berlin Heidelberg.
- Wild, Sarah., Roglic, Gojka., Green, Anders., Sicree, Richard., King, Hilary. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and Projections for 2030. *Diabetes Care 27 (5), 1047 - 1053*



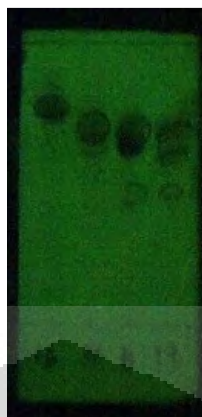
Gambar 4.1 Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi A (1-22), Fase Diam Silika, Fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 9 : 1



Gambar 4.2 Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi B (23-57), Fase Diam Silika, Fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 7 : 3



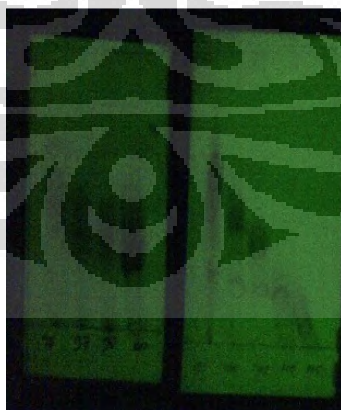
Gambar 4.3 Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi C (58-67), Fase Diam Silika, Fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 7 : 3



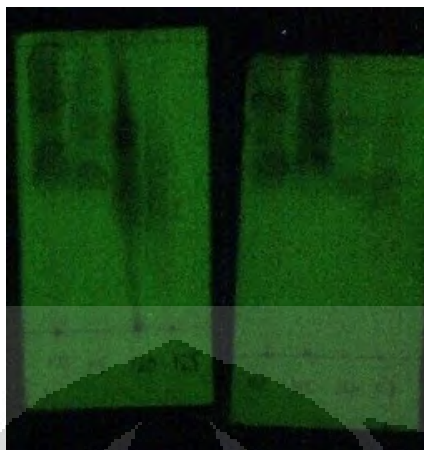
Gambar 4.4 Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi D (68-74), Fase Diam Silika, fase Gerak Heksan dan Etil Asetat dengan Perbandingan 3 : 7



Gambar 4.5 Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi E (75-94), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 7 : 3



Gambar 4.6 Pola Kromatogram Lapis Tipis Penggabungan Fraksi F (95-105), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 7 : 3



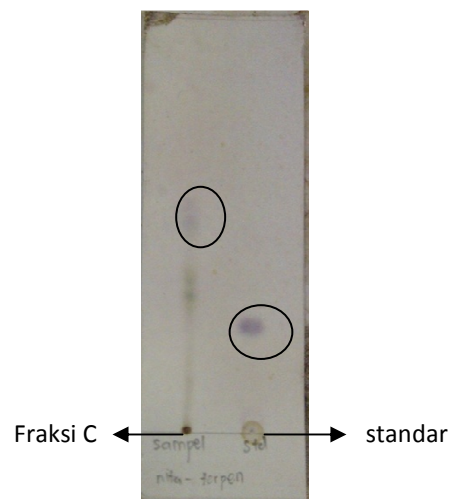
Gambar 4.7 Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi G (106-127), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 5 : 5



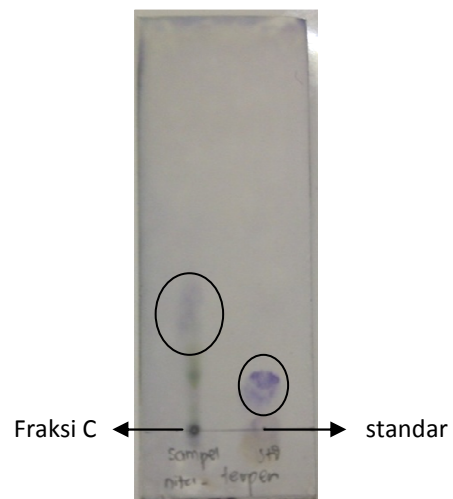
Gambar 4.8 Pola Kromatografi Lapis Tipis Penggabungan Fraksi H (128-150), Fase Diam Silika, Fase Gerak Etil Asetat dan Metanol dengan Perbandingan 5 : 5



Gambar 4.15 Hasil Identifikasi Glikosida dengan Pereaksi Mollisch



Gambar 4.16 Hasil Identifikasi Terpen, Fase Gerak Benzen dan Etil Asetat dengan Perbandingan 9 : 1, Reagen Semprot Anisaldehyd, Pembanding Caryophylli Flos



Gambar 4.17 Hasil Identifikasi Terpen, Fase Gerak Benzen dan Etil Asetat dengan Perbandingan 9 : 1, Reagen Semprot Vanilin-H₂SO₄, Pembanding Caryophylli Flos

Tabel 4.1 Rendeman Ekstrak

Ekstrak	Bobot Simplisia (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendeman (%)
n-Heksan	2017,5	107,2	5,31
Etil Asetat	2017,5	62,4	3,09
Metanol	2017,5	175,5	8,7

Tabel 4.2 Rendemen Fraksi

Fraksi	Bobot Ekstrak (gram)	Bobot Fraksi (gram)	Rendemen (%)
A	34,5	0,0659	0,191
B		0,2366	0,686
C		0,5572	1,615
D		0,0132	0,038
E		1,0781	3,125
F		0,0429	0,124
G		0,9284	2,691
H		1,7726	5,138

Tabel 4.3 Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim

Konsentrasi Substrat (mM)		Serapan			U - K
				Serapan Rata-rata	
20	Uji (U)	0,259	0,239	0,249	0,233
	Kontrol (K)	0,016	0,016	0,016	
10	Uji (U)	0,22	0,226	0,223	0,2165
	Kontrol (K)	0,003	0,01	0,0065	
5	Uji (U)	0,172	0,182	0,177	0,1765
	Kontrol (K)	0,001	0	0,0005	
2,5	Uji (U)	0,118	0,116	0,117	0,1085
	Kontrol (K)	0,008	0,009	0,0085	
1,25	Uji (U)	0,069	0,071	0,07	0,0645
	Kontrol (K)	0,011	0	0,0055	
0,625	Uji (U)	0,058	0,048	0,053	0,0485
	Kontrol (K)	0,003	0,006	0,0045	

Tabel 4.4 Hasil Optimasi Waktu Inkubasi

Waktu Inkubasi (menit)		Serapan		Serapan Rata-rata	U - K
15	Uji (U)	0,113	0,114	0,1135	0,1115
	Kontrol (K)	0,003	0,001	0,002	
20	Uji (U)	0,193	0,188	0,1905	0,1655
	Kontrol (K)	0,025	0,025	0,025	
30	Uji (U)	0,345	0,362	0,3535	0,345
	Kontrol (K)	0,002	0,015	0,0085	
40	Uji (U)	0,11	0,187	0,1485	0,1465
	Kontrol (K)	0,001	0,001	0,002	

Tabel 4.5 Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Heksan

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	S1-S0	% Inhibisi	IC ₅₀
75	Uji (S1)	0,236	0,261	0,2485	0,222	66,6165	51,8161
	Kontrol (S0)	0,032	0,021	0,0265			
50	Uji (S1)	0,379	0,391	0,385	0,3695	44,4361	
	Kontrol (S0)	0,013	0,018	0,0155			
25	Uji (S1)	0,446	0,442	0,444	0,4345	34,6617	
	Kontrol (S0)	0,012	0,007	0,0095			
20	Uji (S1)	0,436	0,5	0,468	0,4595	30,9023	
	Kontrol (S0)	0,005	0,012	0,0085			
10	Uji (S1)	0,496	0,496	0,496	0,4875	25,4135	
	Kontrol (S0)	0,01	0,007	0,0085			
Blanko	Uji (B1)	0,682	0,664	0,673	0,665		
	Kontrol (B0)	0,001	0,015	0,008			

$$y = 0,607x + 18,52$$

Tabel 4.6 Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Etil Asetat

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	S1 – S0	% Inhibisi	IC ₅₀
50	Uji (S1))	0,578	0,588	0,583	0,0125	98,2	17,679
	Kontrol (S0)	0,566	0,575	0,5705			
40	Uji (S1))	0,623	0,609	0,616	0,107	83,87	
	Kontrol (S0)	0,512	0,506	0,509			
30	Uji (S1))	0,645	0,621	0,633	0,203	69,54	
	Kontrol (S0)	0,431	0,429	0,43			
20	Uji (S1))	0,701	0,724	0,7125	0,298	55,21	
	Kontrol (S0)	0,384	0,445	0,4145			
10	Uji (S1))	0,722	0,735	0,7285	0,421	36,6701	
	Kontrol (S0)	0,299	0,316	0,3075			
Blanko	Uji (B1)	0,678	0,665	0,6715	0,66		
	Kontrol (B0)	0,013	0,01	0,0115			

$$y = 1,517x + 23,18$$

Tabel 4.7 Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Metanol

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	U - K	% Inhibisi	IC ₅₀
100	Uji (S1)	0,341	0,311	0,326	0,076	88,4146	23,31
	Kontrol (S0)	0,256	0,244	0,25			
75	Uji (S1)	0,305	0,376	0,3405	0,153	76,6804	
	Kontrol (S0)	0,142	0,233	0,1875			
50	Uji (S1)	0,598	0,495	0,5465	0,2545	61,8961	
	Kontrol (S0)	0,304	0,28	0,292			
25	Uji (S1)	0,432	0,42	0,426	0,338	48,438	
	Kontrol (S0)	0,053	0,123	0,088			
10	Uji (S1)	0,437	0,422	0,4295	0,355	45,8924	
	Kontrol (S0)	0,074	0,075	0,0745			
Blanko	Uji (B1)	0,675	0,667	0,671	0,656		
	Kontrol (B0)	0,013	0,017	0,015			

$$y = 0,496 x + 38,44$$

Tabel 4.8 Hasil Uji Aktivitas Fraksi B

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	S1 – S0	% Inhibisi	IC ₅₀
50	Uji (S1)	0,64	0,649	0,6445	0,3515	45,42	56,751
	Kontrol (S0)	0,276	0,31	0,293			
40	Uji (S1)	0,678	0,578	0,628	0,3665	43,09	
	Kontrol (S0)	0,27	0,253	0,2615			
30	Uji (S1)	0,613	0,623	0,618	0,3855	39,75	
	Kontrol (S0)	0,257	0,208	0,2325			
20	Uji (S1)	0,629	0,623	0,626	0,449	30,28	
	Kontrol (S0)	0,177	0,177	0,177			
10	Uji (S1)	0,605	0,619	0,612	0,463	28,11	
	Kontrol (S0)	0,138	0,16	0,149			
Blanko	Uji (B1)	0,521	0,781	0,651	0,644		
	Kontrol (B0)	0,001	0,013	0,007			

$$y = 0,474x + 23,10$$

Tabel 4.9 Hasil Uji Aktivitas Fraksi C

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	S1 – S0	% Inhibisi	IC ₅₀
50	Uji (S1)	0,543	0,508	0,5255	0,243	64,56	31,85
	Kontrol (S0)	0,29	0,275	0,2825			
40	Uji (S1)	0,555	0,441	0,498	0,266	60,527	
	Kontrol (S0)	0,248	0,216	0,232			
30	Uji (S1)	0,574	0,567	0,5705	0,335	50,211	
	Kontrol (S0)	0,242	0,229	0,2355			
20	Uji (S1)	0,533	0,505	0,519	0,387	42,29	
	Kontrol (S0)	0,167	0,097	0,132			
10	Uji (S1)	0,613	0,597	0,605	0,532	22,95	
	Kontrol (S0)	0,067	0,079	0,073			
Blanko	Uji (B1)	0,664	0,69	0,677	0,673		
	Kontrol (B0)	0,002	0,006	0,004			

$$y = 1,012x + 17,77$$

Tabel 4.10 Hasil Uji Aktivitas Fraksi E

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	S1 – S0	% Inhibisi	IC ₅₀
50	Uji (S1)	0,168	0,161	0,1645	0,1483	77,699	33,384
	Kontrol (S0)	0,027	0,005	0,016			
40	Uji (S1)	0,329	0,287	0,308	0,292	56,087	
	Kontrol (S0)	0,025	0,007	0,016			
30	Uji (S1)	0,429	0,405	0,417	0,3951	40,584	
	Kontrol (S0)	0,038	0,006	0,0219			
20	Uji (S1)	0,491	0,485	0,488	0,4594	30,919	
	Kontrol (S0)	0,037	0,021	0,029			
10	Uji (S1)	0,685	0,411	0,5481	0,5214	21,5954	
	Kontrol (S0)	0,041	0,012	0,0265			
Blanko	Uji (B1)	0,675	0,737	0,706	0,665		
	Kontrol (B0)	0,004	0,078	0,041			

$$y = 1,373x + 4,164$$

Tabel 4.11 Hasil Uji Aktivitas Fraksi G

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	S1 – S0	% Inhibisi	IC ₅₀
50	Uji (S1)	0,439	0,452	0,4455	0,3485	39,0423	68,0508
	Kontrol (S0)	0,079	0,115	0,097			
40	Uji (S1)	0,507	0,453	0,48	0,401	30,804	
	Kontrol (S0)	0,077	0,081	0,079			
30	Uji (S1)	0,526	0,502	0,514	0,4675	19,327	
	Kontrol (S0)	0,043	0,05	0,0465			
20	Uji (S1)	0,532	0,517	0,5245	0,2995	14,94	
	Kontrol (S0)	0,43	0,02	0,225			
10	Uji (S1)	0,509	0,562	0,5355	0,512	11,648	
	Kontrol (S0)	0,028	0,019	0,0235			
Blanko	Uji (B1)	0,548	0,615	0,5815	0,5795		
	Kontrol (B0)	0,001	0,003	0,002			

$$y = 0,706x + 1,951$$

Tabel 4.12 Hasil Uji Kinetika Tanpa Inhibitor

Konsentrasi Substrat	S1 - S0 (V)	1/S	1/V	Vmax	Km
20	0,685	0,05	1,4598	0,6891	1,5968
10	0,669	0,1	1,4948		
5	0,506	0,2	1,9763		
2,5	0,382	0,4	2,6144		
1,25	0,313	0,8	3,1948		

$$y = 2,317x + 1,451$$

Tabel 4.13 Hasil Uji Kinetika pada Konsentrasi Ekstrak 20 µg/mL

Konsentrasi Substrat	S1 - S0 (V)	1/S	1/V	Vmax	Km
20	0,607	0,05	1,64744	0,6968	3,7484
10	0,581	0,1	1,7212		
5	0,4	0,2	2,5		
2,5	0,267	0,4	3,7453		
1,25	0,144	0,8	6,9444		

$$y = 5,379x + 1,435$$

Tabel 4.14 Hasil Uji Kinetika pada Konsentrasi Ekstrak 50 µg/mL

Konsentrasi Substrat	S1 - S0 (V)	1/S	1/V	Vmax	Km
20	0,455	0,05	2,1978	0,6389	5,8345
10	0,422	0,1	2,36967		
5	0,285	0,2	3,508		
2,5	0,191	0,4	5,2356		
1,25	0,113	0,8	8,8468		

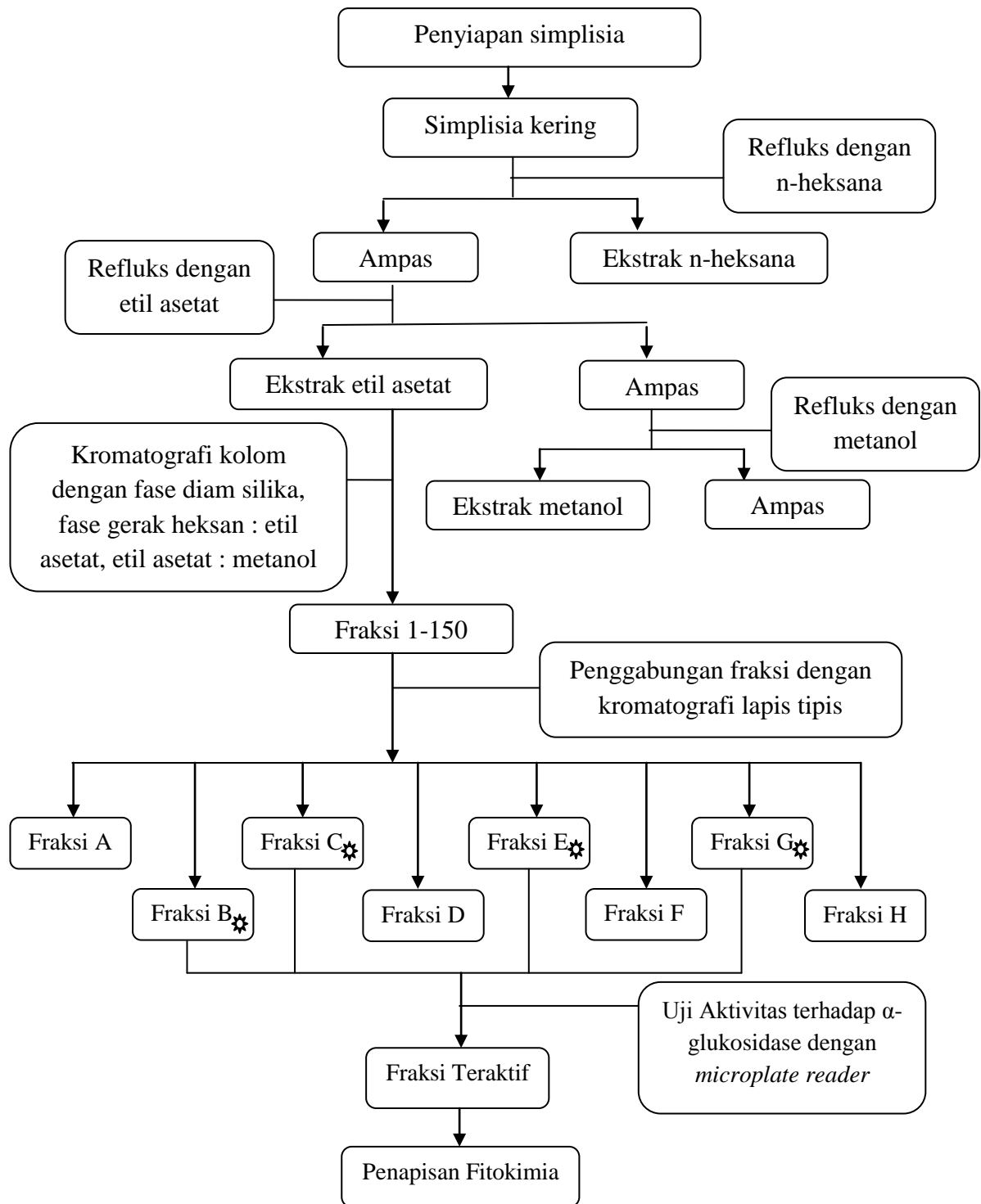
$$y = 9,207x + 1,104$$

Tabel 4.15 Hasil Uji Aktivitas Akarbose

Konsentrasi Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan		Serapan Rata-rata	U - K	% Inhibisi	IC50
50	Uji (S1))	0,456	0,394	0,425	0,415	13,179	207,916
	Kontrol (S0)	0,02	0,01	0,015			
40	Uji (S1))	0,479	0,4324	0,4557	0,4371	9,676	
	Kontrol (S0)	0,024	0,0132	0,0186			
30	Uji (S1))	0,502	0,4406	0,4713	0,4427	7,376	
	Kontrol (S0)	0,033	0,1242	0,0286			
20	Uji (S1))	0,538	0,452	0,495	0,4513	5,576	
	Kontrol (S0)	0,08	0,0074	0,0437			
10	Uji (S1))	0,639	0,555	0,597	0,462	3,376	
	Kontrol (S0)	0,155	0,115	0,135			
Blanko	Uji (B1)	0,5	0,484	0,492	0,478		
	Kontrol (B0)	0,018	0,01	0,014			

$$y = 0,237x + 0,724$$

Lampiran 1. Skema Kerja



Lampiran 2. Sertifikat Analisis α -Glukosidase

SIGMA-ALDRICH[®]

sigma-aldrich.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, ≥ 125 units/mg protein

Product Number: **G0660**

Lot Number: **SLBB4081V**

Brand: **SIGMA**

CAS Number: **9001-42-7**

MDL Number: **MFCD00081321**

Storage Temperature: **Store at 2 - 8 °C**

Quality Release Date: **04 JAN 2012**

Recommended Retest Date: **JAN 2016**

Test	Specification	Result
% Protein (Biuret)	≥ 10	23
units/mg protein	≥ 125	215
One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.8 at 37 deg C.		
units/mg protein	≥ 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 Retest Period	-----	-----
4 years		



Rodney 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 3. Sertifikat Analisis p-Nitrofenol- α -D-Glukopiranosida

SIGMA-ALDRICH		SIGMA Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449
Certificate of Analysis		
Product Name:	4-NITROPHENYL α -D-GLUCOPYRANOSIDE	
	>= 99 %	
Product Number:	N1377	
Product Brand:	Sigma	
Molecular Formula:	C ₁₂ H ₁₃ NO ₅	
Molecular Mass:	301.25	
CAS Number:	3767-28-0	
TEST	SPECIFICATION	LOT BCBG2931V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	≥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	
 Dr. Claudia Geltner Manager Quality Control Buchs, Switzerland		
<p><small>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.</small></p>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product N1377 Lot BCBG2931V	Page 1 of 1

Lampiran 4. Surat Determinasi



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 : 352/IPH.1.02/If.8/III/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Nita Kartika
 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. Joeni Setijoe Rahajoe
 NIP. 196706241993032004

Lampiran 5. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Ekstrak Heksan

Diketahui serapan blanko = 0,665

Pada konsentrasi 75 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,222}{0,665} \times 100\% = 66,6165 \%$$

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,3695}{0,665} \times 100\% = 44,4361 \%$$

Pada konsentrasi 25 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,4345}{0,665} \times 100\% = 34,6617 \%$$

Pada konsentrasi 20 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,4595}{0,665} \times 100\% = 30,9023 \%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,4875}{0,665} \times 100\% = 25,4135 \%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 0,607 x + 18,52$$

dimana,

$$a = 18,52$$

$$b = 0,607$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 18,52}{0,607} = 51,8161 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 6. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Ekstrak Etil Asetat

Diketahui serapan blanko = 0,660

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,660 - 0,0125}{0,660} \times 100\% = 98,2\%$$

Pada konsentrasi 40 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,660 - 0,107}{0,660} \times 100\% = 83,87\%$$

Pada konsentrasi 30 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,660 - 0,203}{0,660} \times 100\% = 69,54\%$$

Pada konsentrasi 20 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,660 - 0,298}{0,660} \times 100\% = 55,21\%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,660 - 0,421}{0,660} \times 100\% = 36,6701\%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 1,517 x + 23,18$$

dimana,

$$a = 23,18$$

$$b = 1,517$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 23,18}{1,517} = 17,679 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 7. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Ekstrak Metanol

Diketahui serapan blanko = 0,656

Pada konsentrasi 100 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,656 - 0,076}{0,656} \times 100\% = 88,4146\%$$

Pada konsentrasi 75 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,656 - 0,153}{0,656} \times 100\% = 76,6804\%$$

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,656 - 0,2545}{0,656} \times 100\% = 61,8961\%$$

Pada konsentrasi 25 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,656 - 0,338}{0,656} \times 100\% = 48,438\%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,656 - 0,355}{0,656} \times 100\% = 45,8924\%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 0,496 x + 38,44$$

dimana,

$$a = 38,44$$

$$b = 0,496$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 38,44}{0,496} = 23,31 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 8. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Fraksi B

Diketahui serapan blanko = 0,644

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,644 - 0,3515}{0,644} \times 100\% = 45,42\%$$

Pada konsentrasi 40 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,644 - 0,3665}{0,644} \times 100\% = 43,09\%$$

Pada konsentrasi 30 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,644 - 0,3855}{0,644} \times 100\% = 39,75\%$$

Pada konsentrasi 20 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,644 - 0,449}{0,644} \times 100\% = 30,28\%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,644 - 0,463}{0,644} \times 100\% = 28,11\%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 0,474 x + 23,10$$

dimana,

$$a = 23,10$$

$$b = 0,474$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 23,10}{0,474} = 56,751 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 8. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Fraksi C

Diketahui serapan blanko = 0,673

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,673 - 0,243}{0,673} \times 100\% = 64,65\%$$

Pada konsentrasi 40 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,673 - 0,266}{0,673} \times 100\% = 60,527\%$$

Pada konsentrasi 30 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,673 - 0,335}{0,673} \times 100\% = 50,211\%$$

Pada konsentrasi 20 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,673 - 0,387}{0,673} \times 100\% = 42,29\%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,673 - 0,532}{0,673} \times 100\% = 22,95\%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 1,012 x + 17,77$$

dimana,

$$a = 17,77$$

$$b = 1,012$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 17,77}{0,012} = 31,85 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 9. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Fraksi E

Diketahui serapan blanko = 0,665

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,1483}{0,665} \times 100\% = 77,699\%$$

Pada konsentrasi 40 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,292}{0,665} \times 100\% = 56,087\%$$

Pada konsentrasi 30 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,3951}{0,665} \times 100\% = 40,584\%$$

Pada konsentrasi 20 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,4594}{0,665} \times 100\% = 30,919\%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,5214}{0,665} \times 100\% = 21,5954\%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 1,373 x + 4,164$$

dimana,

$$a = 4,164$$

$$b = 1,373$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 4,164}{1,373} = 33,384 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 10. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Fraksi G

Diketahui serapan blanko = 0,5795

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,5795 - 0,3485}{0,5795} \times 100\% = 39,0423\%$$

Pada konsentrasi 40 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,5795 - 0,401}{0,5795} \times 100\% = 30,804\%$$

Pada konsentrasi 30 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,5795 - 0,4675}{0,5795} \times 100\% = 19,327\%$$

Pada konsentrasi 20 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,665 - 0,2995}{0,665} \times 100\% = 14,94\%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,5795 - 0,512}{0,5795} \times 100\% = 11,648\%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 0,706 x + 1,951$$

dimana,

$$a = 1,951$$

$$b = 0,706$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 1,951}{0,706} = 68,0508 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 11. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ dari Akarbose

Diketahui serapan blanko = 0,478

Pada konsentrasi 50 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,415}{0,478} \times 100\% = 13,179\%$$

Pada konsentrasi 40 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,4317}{0,478} \times 100\% = 9,676\%$$

Pada konsentrasi 30 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,4427}{0,478} \times 100\% = 7,376\%$$

Pada konsentrasi 20 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,4513}{0,478} \times 100\% = 5,576\%$$

Pada konsentrasi 10 ppm

$$\% \text{inhibisi} = \frac{0,478 - 0,462}{0,478} \times 100\% = 3,376\%$$

Dengan memasukan konsentrasi tersebut sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y maka dapat diperoleh regresi linier :

$$y = 0,237 x + 0,724$$

dimana,

$$a = 0,724$$

$$b = 0,237$$

sehingga,

$$IC_{50} = \frac{50 - 0,724}{0,237} = 207,916 \mu\text{g/mL}$$