

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes kini menjadi masalah kesehatan di dunia. Penderita diabetes mencapai sekitar 422 juta orang di seluruh dunia dan sebanyak 1,5 juta kematian setiap tahunnya (WHO, 2023). Diabetes merupakan penyakit gangguan metabolisme pada sistem endokrin (Ghahramani et al., 2016). Diabetes adalah suatu penyakit akibat kekurangan insulin yang menyebabkan peningkatan kadar gula darah (hiperglikemik). Berdasarkan data laporan IDF (*International Diabetic Federation*) pada tahun 2021, sebanyak 19,46 juta orang di Indonesia mengidap penyakit ini dan menempati urutan ke-5 di dunia (Magliano et al., 2021). Pengobatan yang dilakukan oleh penderita diabetes biasanya menggunakan obat antidiabetes secara oral atau dengan suntikan insulin. Tetapi, pengobatan tersebut memiliki efek samping pada tubuh sehingga para penderita diabetes menggunakan obat tradisional atau herbal untuk mengendalikan kadar glukosa (Sangkal, 2021). Tumbuhan merupakan objek yang sering dijadikan sebagai obat tradisional atau herbal. Salah satu diantaranya adalah sambiloto.

Sambiloto termasuk tumbuhan yang mulai dibudidayakan oleh masyarakat, karena mudah tumbuh di dataran rendah sampai tinggi, dimana sambiloto yang ditanam di dataran rendah (10-300 m) sampai menengah (300-600 m) dapat menghasilkan bobot kering 19,7-104,3 g/tanaman, sedangkan di dataran tinggi (600-1500 dpl) hanya menghasilkan 5,3 g/tanaman (Januwati dan Yusron, 2004).

Sambiloto memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, terpenoid, alkaloid dan andrografolid. Kandungan senyawa flavonoid dan andrografolid pada sambiloto memiliki peran penting sebagai antidiabetes (Jarukamjorn dan Nemoto, 2008). Flavonoid adalah golongan senyawa yang bersifat protektif terhadap kerusakan sel β pankreas sebagai penghasil insulin, mengembalikan sensitivitas reseptor insulin pada sel dan meningkatkan sensitivitas insulin (Bisala et al., 2019).

Sambiloto adalah tumbuhan obat yang telah lama digunakan sebagai bahan obat tradisional. Okkhuarobo et al., (2014) melaporkan bahwa sambiloto merupakan salah satu tumbuhan obat yang paling sering digunakan secara tradisional untuk pengobatan berbagai penyakit seperti diabetes, tekanan darah tinggi, maag, kusta, kanker dan malaria. Masyarakat Indonesia menggunakan sambiloto untuk obat diare, darah tinggi, tifus, kencing manis dan sariawan. Bagian tumbuhan yang sering digunakan yaitu daun, dimana daun sambiloto biasanya direbus (Sari et al., 2017).

Berdasarkan hasil penelitian Wardatun (2011), akar sambiloto yang diekstraksi dengan etanol 75% memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan sebesar 78,32%. Selain memiliki aktivitas antioksidan, ekstrak etanol akar sambiloto juga memiliki aktivitas antikolesterol. Pengujian menggunakan mencit menunjukkan terjadinya penurunan kadar *low-density* lipoprotein hewan uji sebesar 46,5% (Wibowo dan Sutrisna, 2020). Selain itu, daun sambiloto juga memiliki bioaktivitas sebagai imunostimulator, antidiabetes, antibakteri dan antioksidan (Silalahi, 2020). Ekstrak *n*-heksana dari daun sambiloto menunjukkan aktivitas imunostimulator pada mencit dengan menggunakan metode *bioassay guided isolation*, dengan nilai imunglobin G, yang

diperoleh yaitu $1,257 \pm 0,16$ (Rahayu, 2015). Penelitian Prihatini et al., (2019), terkait uji antidiabetes ekstrak alkohol 70% sambiloto, ciplukan dan pegagan menunjukkan bahwa pemberian dosis kecil ekstrak campuran (57,6 mg/200g BB) memiliki efek yang dapat menurunkan kadar gula darah puasa pada tikus, sedangkan untuk dosis sedang (115,2 mg/200g BB) dan dosis besar (230,4 mg/200g BB) cenderung tidak memiliki menurunkan kadar gula darah puasa pada tikus.

Batang sambiloto juga memiliki bioaktivitas seperti antioksidan, antibakteri dan antifungi. Penelitian Gurupriya dan Cathrine (2016), ekstrak kloroform batang sambiloto menunjukkan bioaktivitas terhadap *Escherichia coli* dengan zona hambat $9,70 \pm 0,67$ mm dan bioktivitas antijamur pada *Candida tropicalis* dengan zona hambat $8,10 \pm 0,56$ mm. Penelitian lain juga dilakukan oleh Polash et al., (2017) yang menunjukkan adanya bioaktivitas antioksidan pada ekstrak air, etanol dan *n*-heksana batang sambiloto. Aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh dari ekstrak air dengan nilai IC_{50} yaitu $4,42 \mu\text{g/ml}$, karena jumlah flavanoid dan fenol dalam ekstrak air lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol dan *n*-heksana.

Menurut Rafi et al., (2020). Batang sambiloto memiliki banyak senyawa aktif, karena batang sambiloto mengandung 31 metabolit sekunder yang terdiri dari 12 senyawa flavonoid, 16 senyawa diterpenoid lakton, dan 3 asam fenolat. Penelitian terkait aktivitas antidiabetes ekstrak pada batang sambiloto belum pernah dilaporkan, oleh karena itu dilakukan penggunaan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan metanol dimana pelarut tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda sehingga dapat memengaruhi kandungan total senyawa bioaktif yang diperoleh (Megha et al., 2014). Selain itu, pelarut tersebut bersifat volatil, stabil dan selektif. Pengujian antidiabetes dilakukan secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*.

Pengujian secara *in vitro* dilakukan melalui penghambatan enzim α -amilase. Enzim tersebut berperan dalam pemecahan karbohidrat menjadi glukosa pada saluran pencernaan, sehingga dapat meningkatkan kadar gula darah (Pangemanan et al., 2022). Pengujian *in vitro* dilakukan dengan menghitung nilai persen inhibisi dan nilai IC_{50} . Ekstrak yang mempunyai aktivitas antidiabetes paling aktif secara *in vitro* kemudian dilakukan pengujian secara *in silico* dan *in vivo*. Ekstrak yang diuji telah dianalisis dengan menggunakan GC-MS untuk mengetahui senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Pengujian *in silico* dilakukan dengan metode penambatan molekul terhadap enzim α -amilase (Puspita dan Laksmi, 2022). Pengujian secara *in vivo* dilakukan dengan metode induksi aloksan terhadap mencit (*mus musculus*), dimana aloksan berfungsi dalam menaikkan gula darah.

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka penelitian mengenai bioaktivitas antidiabetes batang sambiloto dilakukan dengan menggunakan beberapa pelarut. Pelarut yang digunakan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yakni pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol, serta pengkajian menyeluruh terhadap efek bioaktivitas sebagai antidiabetes dilakukan pada masing-masing ekstrak batang sambiloto secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. metabolit sekunder apa yang terdapat dalam hasil identifikasi ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol pada batang sambiloto melalui uji fitokimia, analisis FTIR dan analisis GC-MS?
2. apakah ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol pada batang sambiloto memiliki aktivitas sebagai antidiabetes secara *in vitro*?
3. apakah ekstrak aktif batang sambiloto memiliki aktivitas sebagai antidiabetes secara *in vivo*?
4. bagaimana interaksi senyawa pada ekstrak aktif batang sambiloto terhadap enzim α -amilase secara *in silico*?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk:

1. menentukan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto.
2. mengevaluasi aktivitas antidiabetes ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto secara *in vitro*.
3. mengevaluasi aktivitas antidiabetes ekstrak aktif batang sambiloto secara *in vivo*.
4. menentukan interaksi senyawa pada ekstrak aktif pada batang sambiloto terhadap enzim α -amilase secara *in silico*.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini:

1. memberikan informasi ilmiah mengenai bioaktivitas antidiabetes batang sambiloto.
2. menjadi referensi untuk peneliti selanjutnya mengenai batang sambiloto.

1.5. Hipotesis

Diabetes merupakan masalah kesehatan di dunia. Berdasarkan data laporan IDF (*International Diabetic Federation*) pada tahun 2021, terdapat 19,46 juta orang di Indonesia yang mengidap penyakit diabetes. Pengobatan diabetes biasanya menggunakan obat oral atau suntikan insulin yang memiliki efek samping pada tubuh, sehingga masyarakat menggunakan obat tradisional atau herbal untuk menurunkan kadar glukosa. Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional yaitu tumbuhan sambiloto. Sambiloto merupakan tumbuhan yang terkenal memiliki rasa pahit dan termasuk dalam family *Acanthaceae*. Masyarakat Indonesia menggunakan sambiloto untuk obat diare, darah tinggi, tifus, kencing manis dan sariawan. Beberapa penelitian menunjukkan ekstrak sambiloto mengandung senyawa flavonoid dan diterpenoid sehingga memiliki bioaktivitas. Berdasarkan penelitian Wibowo dkk, (2020) ekstrak etanol akar sambiloto menunjukkan bioaktivitas sebagai antikolesterol, hasil pengujian

menunjukkan terjadinya penurunan kadar LDL (*low density lipoprotein*) hewan uji sebesar 46,5%. Selain itu, ekstrak etanol daun sambiloto juga menunjukkan bioaktivitas antidiabetes pada mencit jantan yang diinduksi glukosa, dengan dosis yang paling efektif dalam menurunkan kadar glukosa darah yaitu 400 mg/Kg BB (Ahidin dkk, 2022).

Batang sambiloto memiliki banyak senyawa aktif, karena batang sambiloto mengandung 31 metabolit sekunder yang terdiri atas 12 senyawa flavonoid, 16 senyawa diterpenoid lakton, dan 3 asam fenolat (Rafi dkk, 2020). Namun, penelitian terkait aktivitas antidiabetes ekstrak batang sambiloto belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bioaktivitas antidiabetes ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol dari batang sambiloto. Penelitian diawali dengan mengeringkan dan menghaluskan batang sambiloto yang kemudian diekstraksi dengan masing-masing pelarut. Ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol yang diperoleh dievaporasi hingga kental, kemudian uji pereaksi dan GC-MS dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Selanjutnya uji antidiabetes dilakukan secara *in vitro*, kemudian pengujian ekstrak aktif dilakukan secara *in vivo*, dan *in silico*.

Berdasarkan paparan pada latar belakang maka hipotesis penelitian ini adalah:

1. ekstrak *n*-heksana, etil asetat, metanol batang sambiloto mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, terpenoid, alkaloid dan steroid.
2. ekstrak *n*-heksana, etil asetat, metanol batang sambiloto memiliki aktivitas antidiabetes secara *in vitro* melalui penghambatan enzim α -amilase.
3. ekstrak aktif batang sambiloto dapat menurunkan kadar gula darah pada mencit yang telah diinduksi dengan aloksan.
4. senyawa pada ekstrak aktif batang sambiloto memiliki afinitas ikatan yang baik dengan enzim α -amilase.

BAB II

ANALISIS EKSTRAK BATANG SAMBILOTO SECARA *IN VITRO* SEBAGAI INHIBITOR ENZIM α -AMILASE

2.1 Abstrak

Latar belakang. diabetes melitus adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia. Pengobatan diabetes dilakukan secara oral atau dengan suntikan insulin, tetapi ini memiliki efek negatif pada tubuh, sehingga para penderita menggunakan obat tradisional atau herbal. Sambiloto adalah obat tradisional yang banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia. **Tujuan.** untuk menentukan aktivitas antidiabetes dari ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol dari batang sambiloto melalui penghambatan α -amilase. **Metode.** Uji aktivitas penghambat enzim α -amilase dilakukan menggunakan metode *in vitro*. **Hasil.** Ekstrak heksana, etil asetat, dan metanol dari batang sambiloto memiliki daya inhibisi terhadap enzim α -amilase dengan nilai IC_{50} masing-masing 38,33; 38,31; dan 28,21 mg/mL. Berdasarkan klasifikasi IC_{50} , ekstrak batang sambiloto dari heksana, etil asetat, dan metanol memiliki sifat antidiabetes yang sangat kuat,. **Kesimpulan.** Berdasarkan hasil analisis secara *in vitro* dapat disimpulkan bahwa ekstrak batang sambiloto dapat menjadi alternatif obat antidiabetes alami.

2.2 Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan gangguan metabolisme glukosa yang disebabkan oleh gangguan dalam tubuh, dimana penderita diabetes memiliki gula darah yang tinggi (hiperglikemia). Penyakit diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang dapat dikendalikan dengan memperhatikan asupan makanan yang seimbang. Penyebab penyakit ini adalah kerusakan fungsi sekresi insulin, kerja insulin ataupun keduanya, sehingga tubuh tidak dapat memproduksi insulin yang cukup (Elfahmi dan Santoso, 2019). Kekurangan insulin menyebabkan gangguan proses biokimia di dalam tubuh, dimana glukosa menumpuk di dalam darah akibat tidak diserap oleh sel tubuh dengan baik sehingga menimbulkan berbagai gangguan pada organ tubuh. Insulin berfungsi untuk membantu proses penghancuran dan penyerapan glukosa menjadi energi (Nirfandi et al., 2023).

Hiperglikemia juga disebabkan oleh kenaikan kadar gula darah postprandial karena aktivitas enzim α -amilase dalam memecah karbohidrat (Khan et al., 2023). Sebagian besar enzim α -amilase memotong karbohidrat rantai panjang baik secara endoamilase. Enzim α -amilase bekerja menghidrolisis ikatan α - 1,4 secara acak dibagian dalam molekul baik pada amilosa maupun amilopektin. Hasil pertama hidrolisis α -amilase adalah dekstrin, kemudian dekstrin tersebut terpecah lagi menjadi campuran antara glukosa, maltosa, maltotriosa, dan ikatan lain yang lebih Panjang (Damira et al., 2021).

Pengobatan penyakit diabetes menggunakan obat antidiabetes sintesis baik secara oral maupun dengan suntikan insulin. Penggunaan obat dalam jangka yang Panjang dapat menimbulkan efek samping yang sangat serius (priyanto dan Juwariah, 2021). Menurut Medina et al., (2018) obat diabetes memiliki efek samping terhadap

pencernaan, risiko hipoglikemia, serta berpotensi merusak organ vital seperti hati dan ginjal sehingga para penderita diabetes menggunakan obat tradisional atau herbal untuk mengendalikan kadar glukosa (Sangkal, 2021). Salah satu bahan yang digunakan dalam obat tradisional adalah tumbuhan. Penelitian tentang penggunaan tumbuhan herbal dalam pengobatan diabetes melitus telah dilakukan oleh beberapa peneliti dalam berbagai macam jenis tanaman. Berdasarkan penelitian Maliangkay & Rumondor (2018), ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) efektif sebagai antidiabetes dan dapat memperbaiki sel β -pankreas yang rusak. Efektivitas dosis terbaik sebagai antidiabetes yaitu dosis 150 mg/kgbb dibandingkan dosis 300 mg/kgbb.

Tumbuhan adalah bahan alami yang memiliki banyak manfaat, salah satunya digunakan untuk bahan obat karena mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antidiabetes, antikanker, antimalaria dan sebagainya (Anggraito et al., 2018). Menurut Tandil et al., (2021), salah satu tumbuhan yang bermanfaat sebagai obat adalah sambiloto (*Andrographis paniculata*).

Tumbuhan sambiloto menjadi salah satu tumbuhan herbal yang dipercaya memiliki banyak manfaat bagi kesehatan mulai dari mengatasi flu, menjaga kesehatan jantung, dan pencernaan, mencegah diabetes, hingga menyembuhkan infeksi (Bhatti et al., 2022). Beberapa penelitian melaporkan bahwa sambiloto mengandung banyak komponen senyawa aktif yang bermanfaat bagi kesehatan, seperti andrografolid, minyak atsiri dan flavonoid yang berfungsi untuk mencegah penggumpalan darah, menghambat dan menghancurkan inti kanker, anti bakteri, anti racun, serta anti infeksi, dapat juga digunakan sebagai antibiotik untuk melawan serangan bakteri dan virus (Sudewo, 2004). Andrografolid dapat ditemukan pada semua bagian sambiloto, terutama pada bagian daun. Kadar senyawa andrografolid dalam daun sebesar 7,43% dari berat keringnya (Sulistiyowati dan Rika, 2022). Andrografolid memiliki berbagai aktivitas seperti antidiabetes, antioksidan dan antiinflamasi, dan antivirus. Daun sambiloto memiliki manfaat sebagai antioksidan (Giri et al., 2020). Sambiloto merupakan tumbuhan yang juga memiliki aktivitas sebagai imunomodulator yang dapat memperbaiki dan meningkatkan kerja sistem imun tubuh (Priyani, 2020).

Masyarakat biasanya hanya menggunakan daun dan akar sambiloto saja sebagai obat, padahal batang sambiloto juga mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, glikosida flavonoid, saponin, tannin dan steroid (Rosidah, 2022). Ekstrak etanol batang sambiloto menunjukkan aktivitas antioksidan dengan daya antioksidan 75,93%. Berdasarkan penelitian Gurupriya dan cathrine (2016), terkait ekstrak kloroform batang sambiloto menunjukkan adanya bioaktivitas antibakteri pada bakteri *escherichia coli* dengan zona hambat $9,70 \pm 0,67$ mm dan aktivitas antifungi pada *candida tropicalis* dengan zona hambat $8,10 \pm 0,56$ mm. Kandungan senyawa dari batang sambiloto didapatkan melalui ekstraksi dengan berbagai pelarut.

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat. Maserasi bertingkat dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut berbeda secara berurutan, dimulai dengan pelarut non polar hingga polar (Istiqomah et al., 2021). Pelarut yang digunakan yaitu pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yakni *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Pelarut *n*-heksana yang bersifat non-polar akan menarik senyawa non-polar, etil asetat yang bersifat semi polar akan menarik senyawa yang bersifat semi polar dan metanol yang bersifat polar akan menarik senyawa yang bersifat

polar (Abubakar & Mainul, 2020). Menurut Novitasari (2016), pada saat perendaman akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang diakibatkan oleh tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik yang digunakan. Rendemen ekstrak dalam proses ekstraksi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti lama ekstraksi, konsentrasi pelarut dan jenis pelarut (Wijaya et al., 2022). Keuntungan dari metode maserasi bertingkat yaitu tidak ada proses pemanasan sehingga bahan alam tidak mudah terurai dan memungkinkan menarik lebih banyak komponen senyawa yang diinginkan berdasarkan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan (Srikandi et al., 2020). Pelarut yang digunakan merupakan pelarut dengan perbedaan polaritas yang berbeda-beda yaitu pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Penggunaan pelarut dengan perbedaan polaritas akan menarik lebih banyak senyawa dibandingkan dengan menggunakan satu pelarut saja (Zannou et al., 2022). Identifikasi penghambat α -amilase yang mungkin ada pada batang sambiloto diperlukan untuk mengetahui potensi antidiabetesnya. Berdasarkan penjelasan yang telah dipaparkan, maka dalam penelitian ini akan digunakan ekstrak batang sebagai antidiabetes alami. Penelitian diawali dengan mengkaji potensi penghambatan ekstrak batang sambiloto dan senyawa bioaktifnya terhadap enzim α -amilase melalui studi *in vitro* dan *in silico* sebagai inhibitor enzim α -amilase.

Uji aktivitas antidiabetes secara *in vitro* dilakukan dengan penghambat enzim α -amilase. Aktivitas enzim α -amilase dapat ditentukan dengan beberapa metode salah satunya adalah metode DNS. Uji ini didasarkan pada glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis pati. Glukosa akan bereaksi dengan karbonil bebas pada DNS (3,5 dinitrosalicilic acid) yang berwarna kuning dalam suasana basa akan terbentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat menjadi warna jingga kemerahan. Senyawa 3-amino-5-nitrosalisilat akan dideteksi oleh spektrofotometer UV-VIS (Suprijono et al., 2018). Kemudian dilakukan perhitungan nilai persen inhibisi serta nilai IC_{50} , ekstrak dengan aktivitas antidiabetes paling aktif dalam pengujian *in vitro* selanjutnya diujikan secara *in silico*. Prinsip dasar metode *in silico* adalah melakukan penambatan ligan atau senyawa obat terhadap target berupa enzim untuk mendapatkan afinitas ikatan (Benefenati et al, 2019).

Berdasarkan penelitian terkait sebelumnya, maka dilakukan penelitian mengenai ekstraksi batang sambiloto dan uji bioaktivitasnya sebagai penghambat enzim α -amilase secara *in vitro* dan *in silico*.

2.3 Metode

2.3.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu batang sambiloto, *n*-heksana (teknis), etil asetat (teknis), metanol (teknis), pereaksi Mayer (Nitro kimia) dan Dragendroff (Nitro kimia) untuk uji kualitatif alkaloid, magnesium dan asam klorida 1% untuk uji kualitatif flavonoid, pereaksi Lieberman-Buchard (Nitro kimia) untuk uji kualitatif terpenoid dan steroid, dimetil sulfoksida (Merck), buffer fosfat pH 6,8, dinitrosalisilat (Himedia), natrium kalium tartarat, NaOH, aquades, enzim α -amilase komersial berasal dari *human salivary*, akarbosa (OGB dexta), amilum (Pro analisis), tisu, label, kapas, aluminium foil dan kertas saring Whatman no. 41.

Alat yang digunakan yaitu wadah sampel, *blender* (philips), pompa vakum (GM), *rotary evaporator* (RE100s dlab), neraca analitik (Ohaus), corong buchner (Lutou), spektrofotometer GC-MS (QP2010 shimadzu), spektrofotometer Uv-Vis (T60), inkubator (Memmerth), oven (Genlab), spektrofotometer FT-IR (Prestige 21 shimadzu), botol semprot, dan peralatan gelas.

2.3.2 Preparasi Sampel

Sampel batang sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang masih segar dicuci bersih menggunakan air mengalir, kemudian dipotong kecil-kecil. Setelah itu, batang sambiloto dianginkan di dalam ruangan hingga kering dan dihaluskan menggunakan *blender* hingga menjadi serbuk.

2.3.3 Ekstraksi serbuk batang sambiloto

Ekstraksi batang sambiloto merujuk pada prosedur Benchaachoua et al. (2018). Ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat. Serbuk halus batang sambiloto (*Andrographis paniculata*) dimaserasi dengan beberapa pelarut yang memiliki perbedaan kepolaran. Serbuk sambiloto terlebih dahulu dimaserasi menggunakan *n*-heksana selama 3 × 24 jam disertai dengan pengadukan. Setelah 3 × 24 jam residu dipisahkan dari filtrat dan ampas simplisia dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Kemudian residu dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat selama 3 × 24 jam disertai pengadukan. Setelah 3 × 24 jam residu dipisahkan dari filtrat, kemudian residu kembali dikeringkan. Selanjutnya residu dimaserasi kembali dengan pelarut metanol selama 3 × 24 jam disertai pengadukan. Kemudian ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

2.3.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan dengan merujuk pada prosedur (Wahid dan Safwan, 2020)

1). Uji alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 3 mL HCL 1% dan 3 tetes pereaksi Dragendroff. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya endapan kuning jingga (orange)

2). Uji Flavonoid

Sebanyak 2 mL ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto ditambahkan 1 g serbuk magnesium dan ditambahkan 3-5 tetes asam klorida. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna coklat, kuning atau jingga.

3). Uji Steroid / Triterpenoid

Sebanyak 2 mL ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto ditambahkan 2 mL pereaksi Liebermann-Buchard. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Hasil uji positif steroid ditandai dengan perubahan larutan menjadi warna hijau dan hasil uji positif terpenoid ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah

2.3.5 Analisis Sampel Menggunakan Spektrofotometer *Fourier Transform Infra-Red* (FT-IR)

Identifikasi gugus fungsi ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR (Prestige-21 SHIMADZU) pada rentang bilangan gelombang 4000-500 cm^{-1} . Ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto masing-masing sebanyak $\pm 0,5$ mL ditetaskan di atas plat NaCl, lalu dianalisis menggunakan instrumen FTIR. Setelah itu, akan diperoleh puncak-puncak berbeda yang memberikan informasi terkait gugus fungsi pada sampel yang dianalisis dengan jumlah scan 300 dan resolusi 4.

2.3.6 Analisis Sampel Menggunakan *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy* (GC-MS)

Sampel diinjeksikan ke dalam kolom yang berukuran 30 m x 0,25 mm dengan film tipis 0,25 μM . Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan laju alir 1 ml/menit, injektor dioperasikan pada suhu 200°C dan suhu kolom oven di program di suhu 50 – 250°C pada kecepatan 10°C/menit mode injeksi. Kondisi MS yang digunakan: Voltase ionisasi 70 eV; temperatur sumber ion pada 250 °C; *mass range* dari 50-600. Kromatogram dan spektrum massa yang diperoleh dari senyawa yang belum diketahui kemudian dibandingkan dengan spektrum dari senyawa yang sudah diketahui yang terdapat pada *NIST library* (Maheswari *et al.*, 2017).

2.3.7 Uji Aktivitas Antidiabetes secara *In Vitro*

Uji aktivitas antidiabetes secara *in vitro* merujuk pada prosedur Alfiani (2022). Uji aktivitas inhibisi α -amilase dilakukan terhadap larutan kontrol (larutan tanpa sampel/standar), larutan kontrol positif (larutan akarbosa) dan larutan sampel (ekstrak).

2.3.7.1 Uji aktivitas enzim α -amilase

Buffer fosfat pH 6,8 sebanyak 250 μL ditambahkan dengan 125 μL α -Amilase 1 U/mL. campuran tersebut divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah inkubasi, campuran ditambahkan 125 μL pati 1% kemudian divortex dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 5 menit. Campuran ditambahkan 250 μL larutan DNS untuk menghentikan reaksi, lalu dihomogenkan dan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Larutan didinginkan sampai suhu ruang. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 497 nm.

2.3.7.2 Uji Inhibisi Enzim α -Amilase

Buffer fosfat pH 6,8 ditambahkan dengan 125 μL dan 125 μL α -Amilase 1 U/mL kemudian ditambahkan sebanyak 125 μL ekstrak *n*-heksana batang sambiloto dengan konsentrasi masing-masing 10.000, 5.000, 3.000 dan 1.000 ppm. Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah diinkubasi, campuran ditambahkan sebanyak 125 μL pati 1 %, kemudian divortex dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 5 menit. Campuran ditambahkan 250 μL larutan DNS untuk menghentikan reaksi lalu dihomogenkan dan dipanaskan dalam air mendidih selama 10

menit. Larutan didinginkan sampai suhu ruang. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 497 nm. Perlakuan yang sama untuk ekstrak etil asetat dan metanol.

2.3.9 Teknik Analisis Data

2.3.9.1 Perhitungan Persentase Hambatan Sampel Terhadap Enzim

Aktivitas inhibitor enzim α -amilase dari sampel dapat dihitung dengan rumus pada persamaan 1:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{K-S}{K} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

K = Absorbansi larutan kontrol (tanpa penambahan sampel)

S = Absorbansi larutan sampel (akar bosa, ekstrak batang sambiloto *n*-heksana, etil asetat dan metanol)

2.3.9.2 Perhitungan nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. persamaan regresi $y = bx + a$ yang diperoleh, digunakan untuk menentukan IC₅₀ dengan rumus pada persamaan 2:

$$\text{IC}_{50} = \frac{50 - a}{b} \quad (2)$$

2.4 Hasil dan Pembahasan

2.4.1 Ekstraksi Batang sambiloto

Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa kimia untuk menarik komponen-komponen senyawa yang diinginkan dari suatu sampel (Wong et al., 2023). Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi bertingkat. Maserasi bertingkat adalah proses penarikan senyawa pada sampel berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan secara bertahap (Haryanto, 2019). Pada tahapan ini, batang sambiloto terlebih dulu dikeringkan untuk mengurangi kadar air untuk meminimalisir kerusakan pada sampel serta memudahkan penyimpanan dalam jangka waktu yang lama (Skendi et al., 2023) dapat dilihat pada Gambar 2.1. Batang sambiloto yang telah kering selanjutnya dihaluskan hingga menjadi serbuk untuk memperluas daerah penyerapan sampel.



Gambar 2.1. (a) Sambiloto; (b) Batang Sambiloto; dan (c) Batang sambiloto kering (Dokumentasi Pribadi)

Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Penggunaan *rotary evaporator* menggunakan suhu yang tepat untuk mempertahankan senyawa aktif pada ekstrak. Suhu yang digunakan tidak boleh terlalu tinggi dan perputaran tidak boleh terlalu cepat. Penguapan akan terjadi pada suhu yang lebih rendah dari titik didih pelarutnya karena dilakukan dalam keadaan vakum (Saputra et al., 2022). Ekstrak kental dapat dilihat pada Gambar 2.2



Gambar 2.2. Ekstrak kental *n*-heksan, etil asetat dan metanol batang sambiloto (Dokumentasi Pribadi).

Rendemen adalah perbandingan jumlah ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi tanaman. Rendemen ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 2.1 yang menunjukkan perbedaan tingkat kepolaran pelarut berpengaruh terhadap rendemen yang dihasilkan. Ekstrak metanol memiliki rendemen paling tinggi yaitu 9,1% diikuti ekstrak etil asetat dan ekstrak *n*-heksana berturut-turut. Hal ini dikarenakan pelarut metanol mempunyai konstanta dielektrik yang tinggi sehingga dapat membuka dinding sel sehingga mengakibatkan hampir seluruh metabolit sekunder larut. Selain itu, rendemen dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti lama ekstraksi, konsentrasi pelarut dan jenis pelarut (Wijaya et al., 2022).

Tabel 2.1. Persentase rendemen ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto.

Sampel	Berat (g)	Rendemen (%)
Ekstrak <i>n</i> -heksan	4,297	0,9
Ekstrak etil asetat	6,543	1,3
Eskstrak metanol	45,802	9,1

2.4.2 Uji Fitokimia

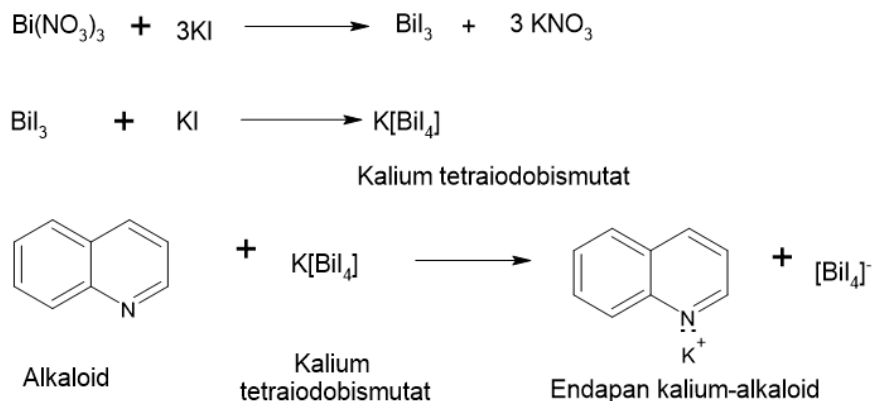
Uji fitokimia adalah teknik analisis kualitatif yang bertujuan untuk memberi penjelasan umum tentang kelompok senyawa yang terkandung dalam suatu sampel dengan melihat reaksi pengujian warna menggunakan suatu pereaksi warna sehingga dapat diketahui apakah senyawa yang diinginkan terdapat dalam ekstrak atau tidak (Rubianti et al., 2022). Hasil skrining fitokimia ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan methanol batang sambiloto dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Hasil skrining fitokimia ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto

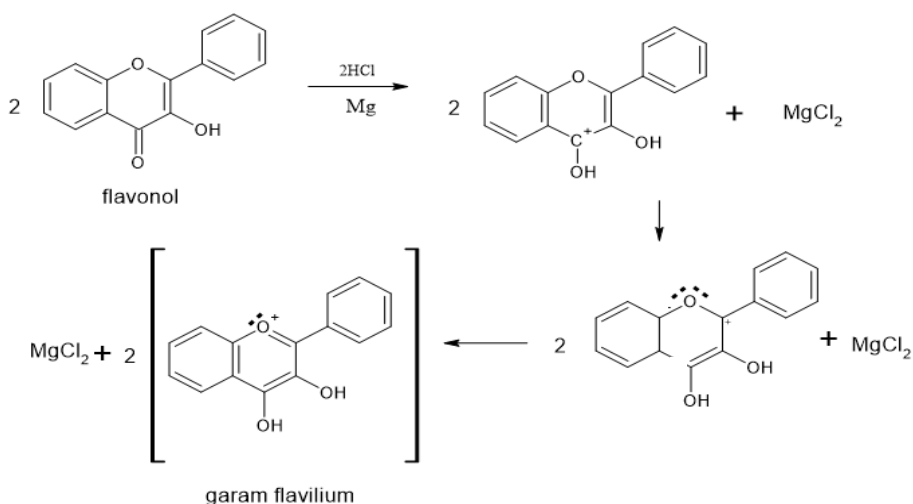
Senyawa metabolit sekunder	Pelarut		
	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Metanol
Alkaloid (Dragendroff)	+	+	-
Alkaloid (Mayer)	+	+	-
Flavonoid	-	-	+
Terpenoid	-	+	+
Steroid	+	-	-

Keterangan: + (mengandung senyawa); - (tidak mengandung senyawa)

Uji fitokimia senyawa alkaloid dilakukan dengan dua pengujian yakni dengan penambahan reagen Dragendroff dan reagen Mayer. Pengujian pada ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto dengan penambahan reagen dragendroff mengalami perubahan dengan terbentuknya endapan berwarna coklat yang mengindikasikan bahwa ekstrak tersebut mengandung alkaloid. Sedangkan ekstrak etil asetat dan metanol batang sambiloto dengan penambahan reagen mayer menunjukkan bahwa ekstrak tersebut positif mengandung alkaloid karena setelah penambahan reagen mayer pada larutan ekstrak terbentuk endapan putih. Terbentuknya endapan setelah penambahan reagen diduga karena nitrogen yang berada pada senyawa alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari reagen membentuk endapan kalium-alkaloid (Riasari et al., 2022). Mekanisme reaksi uji alkaloid dapat dilihat pada Gambar 2.3. Adapun pada ekstrak metanol tidak terbentuk endapan setelah penambahan reagen Mayer, menandakan ekstrak tidak mengandung senyawa golongan alkaloid.

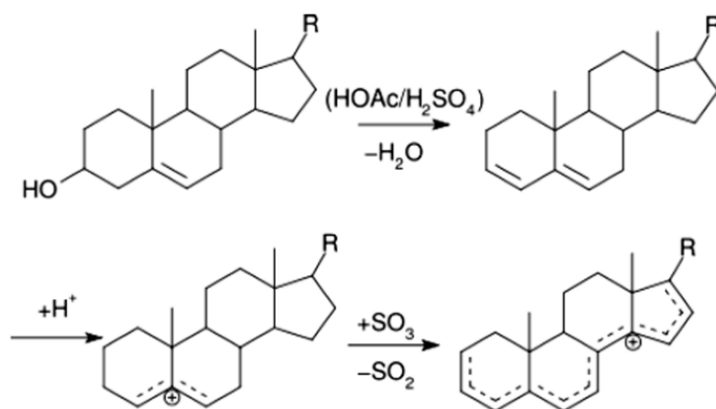
**Gambar 2.3.** Mekanisme reaksi uji Dragendroff

Uji flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi magnesium (Mg) dan asam klorida (HCl). HCl berfungsi untuk menghidrolisis senyawa flavonoid menjadi aglikonya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam klorida karena sifat elektroliknya. Hasil reduksi dengan Mg dan HCl pekat dapat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna jingga (Noviyanty dan Linda, 2020). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol batang sambiloto mengandung senyawa flavonoid. Mekanisme reaksi pengujian flavonoid dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Mekanisme reaksi uji flavonoid (Iskandar, 2020)

Skrining fitokimia senyawa steroid dan terpenoid dilakukan dengan penambahan reagen Lieberman-Burchard. Penambahan reagen Lieberman-burchard pada ekstrak etil asetat dan metanol terjadi perubahan warna menjadi ungu kecoklatan yang berarti bahwa ekstrak etil asetat dan metanol batang sambiloto positif mengandung terpenoid. Perubahan warna didasari oleh kemampuan senyawa terpenoid dan steroid membentuk warna apabila direaksikan dengan H₂SO₄ dalam larutan asam asetat anhidrat. Ekstrak etil asetat dan metanol menunjukkan perubahan warna larutan menjadi hijau yang mengindikasikan adanya senyawa steroid. Mekanisme reaksi uji terpenoid dan steroid dapat dilihat pada Gambar 2.5.



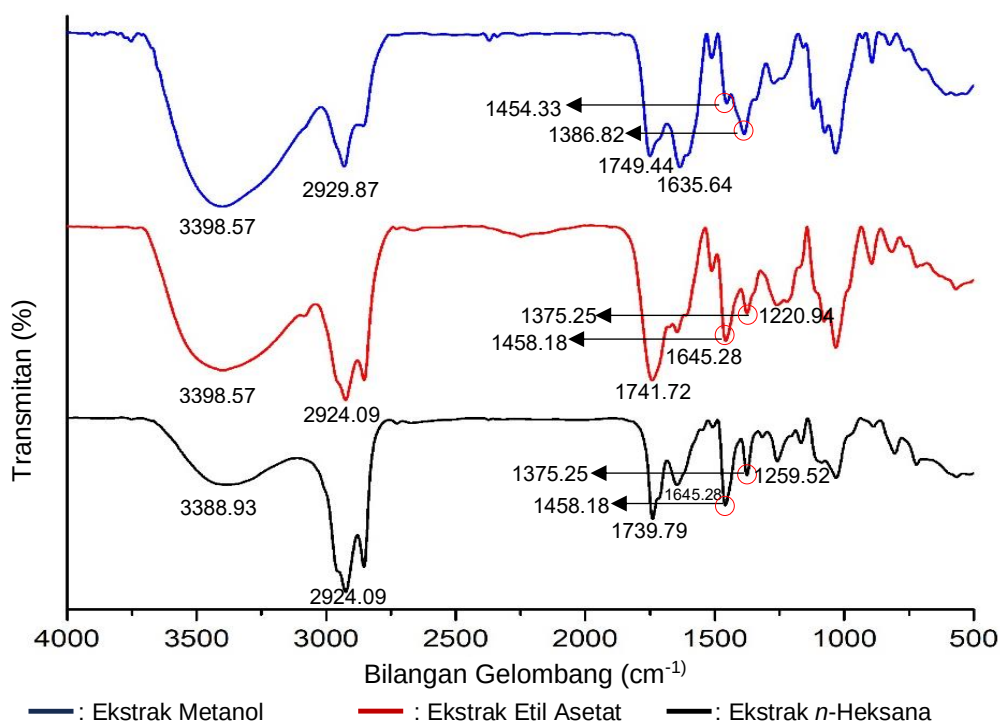
Gambar 2.5. Mekanisme reaksi uji terpenoid dan steroid (Zaini dan Shofia, 2020)

2.4.3 Identifikasi Ekstrak Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Identifikasi menggunakan spektrofotometer FT-IR dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa organik secara kualitatif dengan mengetahui gugus fungsi dari suatu senyawa

(Fitrianny et al., 2024). Analisis kualitatif dilakukan dengan melihat puncak-puncak spesifik yang menunjukkan jenis gugus fungsi yang dimiliki oleh ekstrak tersebut. Sinar inframerah memiliki rentang panjang gelombang dari 2,5 μm sampai 25 μm . Adapun frekuensi IR, memiliki rentang dari bilangan gelombang 400 cm^{-1} sampai 4000 cm^{-1} (Puspitasari, 2021). Spektrum IR ekstrak batang sambiloto dapat dilihat pada Gambar 2.6.

Berdasarkan Gambar 2.6, spektrum FTIR ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol batang sambiloto memberikan pola spektrum yang khas, serta memberikan pola spektrum yang mirip satu sama lain. Hal ini menandakan bahwa senyawa yang terkandung oleh ketiga jenis sampel tidak jauh berbeda. Hasil spektrum FTIR ekstrak batang sambiloto dengan pelarut etil asetat menunjukkan beberapa gugus fungsi. Pada bilangan gelombang 3388,93 cm^{-1} menunjukkan adanya serapan tajam yang diidentifikasi sebagai gugus N-H atau bisa juga sebagai gugus O-H (amina atau alkohol). Menurut Maidawati, (2022) pada bilangan gelombang 3200-3600 cm^{-1} dengan puncak yang melebar menunjukkan serapan khas vibrasi ulur gugus fungsi alkohol (O-H) atau gugus fungsi amina (N-H). Puncak selanjutnya berada pada bilangan 2924,09 cm^{-1} yang menunjukkan adanya regangan ikatan C-Hsp³. Serapan tajam pada bilangan gelombang 1739,79 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C=O dan terdapat ikatan C=C aromatik pada bilangan gelombang 1645,28 cm^{-1} .



Gambar 2.6. Spektrum FT-IR Ekstrak Batang Sambiloto

Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana batang sambiloto kemungkinan memiliki senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid. Hal ini sesuai dengan hasil uji fitokimia yang dilakukan sebelumnya dimana ekstrak *n*-heksana batang sambiloto positif mengandung senyawa alkaloid dan terpenoid. Hal

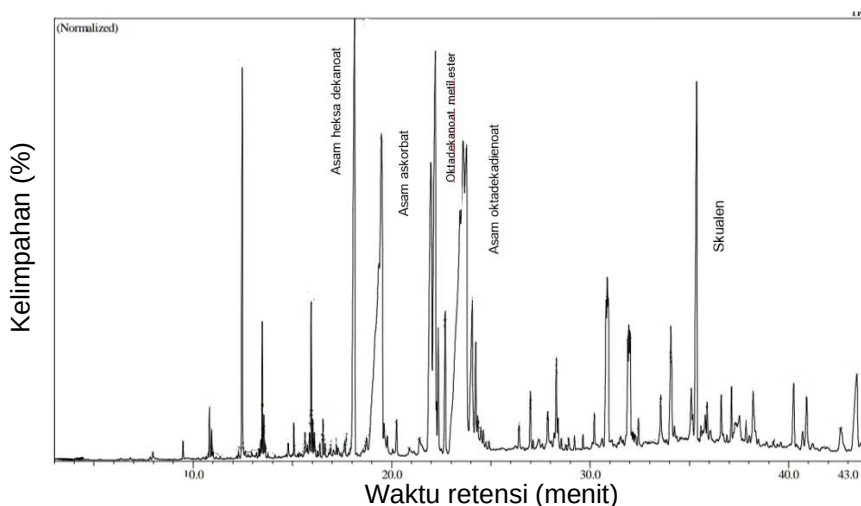
yang sama juga ditunjukkan pada serapan FT-IR ekstrak etil asetat dan metanol batang sambiloto. Serapan FT-IR ekstrak batang sambiloto dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Serapan FTIR ekstrak batang sambiloto dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		
	Ekstrak <i>n</i> -Heksana	Ekstrak Etil Asetat	Ekstrak Metanol
Vibrasi N-H/O-H	3388,93	3398,57	3398,57
Vibrasi C-Hsp ³	2924,09 dan 2854,65	2924,09 dan 2852,72	2929,87
Vibrasi C=O	1739,79	1741,72	1749,44
Vibrasi C=C	1645,28	1645,28	1635,64
Vibrasi C-H (-CH ₂ -)	1458,18	1458,18	1454,33
Vibrasi C-H (-CH ₃ -)	1375,25	1375,25	1386,82
Vibrasi C-N	1259,52	1220,94	1273,02

2.4.4 Analisis Sampel Batang Sambiloto Menggunakan Spektrofotometer GC-MS

Analisis GC-MS merupakan teknik analisis suatu senyawa aktif yang terdapat di dalam senyawa kimia. Teknik analisis senyawa ini menggunakan 2 metode yaitu metode kromatografi gas (GC) dan spektrometri massa (MS). *Gas Chromatography* berfungsi untuk menganalisis senyawa secara kuantitatif sedangkan *mass spectrometry* berfungsi untuk menganalisis struktur molekul dari senyawa. Hasil yang diperoleh berupa kromatogram, setiap puncak mewakili dari satu jenis senyawa. Persen area tertinggi dari hasil GC-MS menunjukkan senyawa tersebut merupakan senyawa spesifik yang terkandung dalam setiap ekstrak.



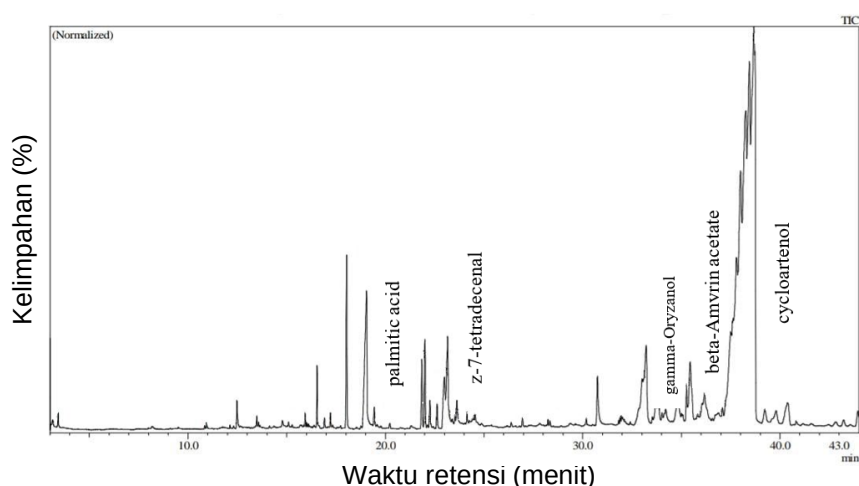
Gambar 2.7. Kromatogram GC-MS ekstrak *n*-heksana batang sambiloto

Hasil kromatogram ekstrak *n*-heksana batang sambiloto dapat dilihat pada Gambar 2.7 menunjukkan 87 puncak yang mewakili masing-masing senyawa berbeda pada sampel. Adapun 10 fitokomponen dengan persen area terluas dalam ekstrak *n*-heksana batang sambiloto dapat dilihat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Fitokomponen ekstrak *n*-heksana batang sambiloto menggunakan GC-MS

No	Waktu Retensi	Nama Senyawa	Area (%)
1	23,622	9,12-oktadekadienoat	20,33
2	19,501	Asam askorbat 2,6-diheksadekanoat	13,24
3	22,200	9-oktadekanoat, metil ester	13,02
4	35,373	skualen	5,79
5	18,132	Asam heksadekanoat	5,83
6	24,053	Asam oktadekanoat	3,89
7	30,887	Fenil-5-hidroksi-7,8-dimetoksi-2,3-dihidro-4H-benzopirena	3,85
8	31,969	7-hexyltridecan-10-ol	3,03
9	12,473	Fenol, 2,4-bis(1,1dimetietil)	2,61
10	37,535	9,19-siklolanost-24-en-3-ol, asetat	2,32

Senyawa yang paling dominan muncul pada waktu retensi 23,633 dengan presentase area sebesar 20,33%. Senyawa tersebut adalah asam oktadekadienoat atau asam linoleat. Asam linoleat merupakan asam lemak tak jenuh rantai panjang yang banyak ditemukan pada minyak tanaman. Asam linoleat merupakan asam lemak esensial karena tidak dapat diproduksi oleh tubuh (Ausi dan Baliana, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Yoon et al., (2021) menyatakan bahwa asam linoleat memiliki aktivitas antidiabetes, dimana dapat digunakan sebagai pengobatan diabetes melitus tipe 2.



Gambar 2.8. Kromatogram GC-MS ekstrak etil asetat batang sambiloto

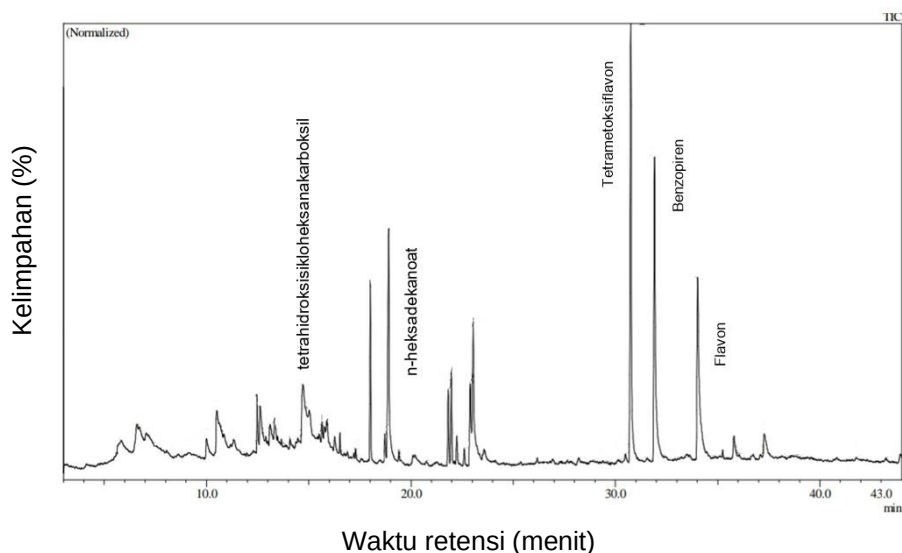
Hasil kromatogram dari ekstrak etil asetat batang sambiloto pada Gambar 2.8 menunjukkan adanya 73 senyawa. Adapun 10 fitokomponen dengan persen area terluas dalam ekstrak etil asetat batang sambiloto telah dianalisis menggunakan GC-MS dapat

dilihat pada Tabel 2.5. Senyawa yang memiliki persen area tertinggi adalah sikloartenol dengan presentase area sebesar 66,02% yang muncul pada waktu retensi 38,697. Senyawa tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder golongan steroid. Menurut Agustin et al., (2015), steroid merupakan senyawa nonpolar yang memiliki aktivitas antidiabetes, dimana senyawa steroid dapat menstimulasi keluarnya insulin dari pankreas sehingga akan menurunkan glukosa darah. Penelitian oleh Bhavsahr et al., (2024), menunjukkan bahwa senyawa sikloartenol dapat menurunkan gula darah pada penderita diabetes melitus tipe 2.

Keanekaragaman senyawa fitokimia dalam ekstrak tumbuhan memiliki peran penting terhadap aktivitasnya di bidang farmakologis. Fitokomponen dalam ekstrak etil asetat batang sambiloto telah dianalisis menggunakan GC-MS dapat dilihat pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5. Fitokomponen senyawa ekstrak etil asetat batang sambiloto menggunakan GC-MS

No	Waktu Retensi	Nama Senyawa	Area (%)
1	38,875	sikloartenol	66,02
2	19,047	Asam heksadekanoat	3,93
3	33,221	9,19-siklolanost-24-en-3-ol, (3 beta.) -	2,73
4	35,452	Olean-12-en-3-ol, asam, (3.beta.)-	2,13
5	23,160	7-tetradekana, (z)-	2,00
6	36,181	1,4-dimetil-3-2-(metil-1propenil)-4-vinil-1-siklopentena	1,89
7	18,037	Asam heksadekanoat, metil ester	1,77
8	33,008	9,19-siklolanost-24-en-3-ol, (3 beta.) -	1,72
9	22,991	10(e)-12(z)-asam linoleat	1,24
10	34,825	Asam asetat 17-(1,5-dimetil-hex-4-enil)-4,4,10,13,14-pentametil	1,20



Gambar 2.9. Kromatogram GC-MS ekstrak metanol batang sambiloto

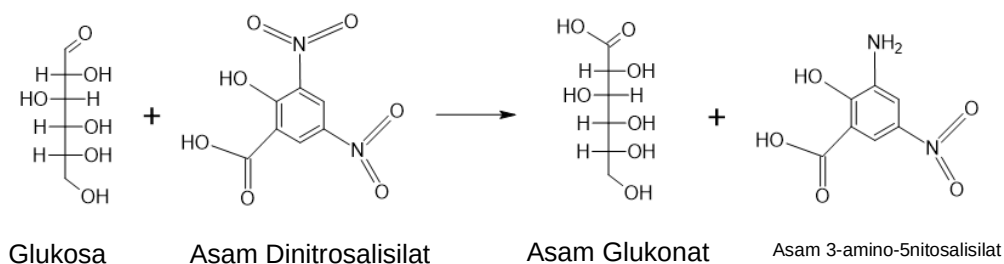
Hasil kromatogram dari ekstrak metanol batang sambiloto pada Gambar 2.9 menunjukkan adanya 89 senyawa yang mewakili masing-masing senyawa berbeda dalam ekstrak. Senyawa yang memiliki persen area tertinggi adalah 5-Hydroxy-3',4',6,7-tetramethoxyflavanone sebesar 8,96% yang muncul pada waktu retensi 30,753 menit. Senyawa tersebut merupakan golongan flavonoid. Adapun 10 fitokomponen dengan persen area terluas dalam ekstrak metanol batang sambiloto dapat dilihat pada Tabel 2.6.

Tabel 2.6. Fitokomponen senyawa ekstrak metanol batang sambiloto menggunakan GC-MS

No	Waktu Retensi	Nama Senyawa	Area (%)
1	30,753	5-hidroksi-3,4,6,7-tetrametoksiflavin	8,68
2	31,917	2-fenil-5-hidroksi-7,8-dimetoksi-2,3-dihidro-4H-benzopiren	7,64
3	34,026	Flavin,5-hidroksi-7,8-dimetoksi	6,84
4	18,909	n-heksadekanoat	6,00
5	14,720	1,3,4,5-asam tetrahidroksisikloheksanokarboksil	5,04
6	23,046	Cis-asam vaksenat	4,37
7	15,028	(E)-2,6-dimetoksi-4-(prop-1-en-1-yl)fenol	3,47
8	10,508	Fenol,2,6-dimetoksi-	3,24
9	5,833	1,2,3-propanetriol	2,56
10	12,634	1,2,3,5,6,8-heksahidro-4,7-azulen	2,42

2.4.5 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -amilase secara *In Vitro*

Uji penghambatan aktivitas enzim α -amilase dilakukan dengan menggunakan reagen dinitrosalisilat (DNS). Uji ini didasarkan pada glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis pati. Glukosa akan bereaksi dengan karbonil bebas pada reagen asam dinitrosalisilat (3,5 dinitrosalicic acid) yang berwarna kuning dalam suasana basa akan terbentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat menjadi warna jingga kemerahan dan kemudian diuji pada panjang gelombang 497 nm. Mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 2.10. Senyawa 3-amino-5-nitrosalisilat yang nantinya dapat dideteksi pada spektrometer UV-Vis (Suprijono et al, 2018).



Gambar 2.10 Reaksi glukosa dengan DNS

Uji penghambatan aktivitas enzim α -amilase dilakukan menggunakan larutan enzim 1 U/mL dan larutan substrat 1%. Pengujian dilakukan dengan 3 variasi ekstrak yaitu ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol serta 4 variasi konsentrasi masing-masing 10.000, 5.000, 3.000 dan 1.000 ppm dan sebagai kontrol positif digunakan akarbosa dengan konsentrasi yang sama.

Variasi konsentrasi bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi terhadap peningkatan daya hambat enzim α -amilase. Menurut Gaspers et al., (2022) semakin banyak ekstrak yang digunakan maka semakin sedikit pati terhidrolisis, sehingga glukosa yang dihasilkan semakin sedikit atau nilai absorbansi larutan sampel semakin menurun. Persen penghambatan ekstrak batang sambiloto dapat dilihat pada Tabel 2.7. Pengukuran aktivitas penghambat enzim dilakukan dengan membandingkan nilai absorbansi kontrol (aktivitas enzim) dan nilai absorbansi sampel. Nilai presentasi penghambatan terhadap enzim α -amilase dari ekstrak batang sambiloto menunjukkan semakin besar konsentrasi ekstrak, maka semakin besar persen penghambatan enzim α -amilase.

Tabel 2.7. Hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -amilase

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Penghambatan %	IC ₅₀ (mg/mL)
Ekstrak <i>n</i> -heksana	1.000	19,20	38,33
	3.000	43,65	
	5.000	48,4	
	10.000	51,16	
Ekstrak etil asetat	1.000	23,64	28,21
	3.000	29,51	
	5.000	36,07	
	10.000	43,66	
Ekstrak metanol	1.000	14,40	38,31
	3.000	28,90	
	5.000	41,26	
	10.000	52,47	
Akarbosa	1.000	3,93	49,69
	3.000	11,60	
	5.000	22,78	
	10.000	34,29	

Hasil dari nilai presentase penghambatan terhadap enzim α -amilase dari variasi konsentrasi digunakan untuk membuat persamaan regresi linear untuk menghitung nilai IC₅₀. Pengukuran IC₅₀ digunakan untuk mengetahui kemampuan penghambatan masing-masing ekstrak terhadap enzim, dimana nilai IC₅₀ diperoleh dari hasil pengukuran % penghambatan. Hasil pengujian yang dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki nilai IC₅₀ terendah yaitu 28,21 mg/mL, sehingga terlihat bahwa

ekstrak etil asetat batang sambiloto memiliki penghambat yang lebih baik dibandingkan dengan akar bosa.

Kategori kekuatan aktivitas antidiabetes dapat dilihat pada Tabel 2.8. Penelitian (Hidayah et al., 2023) ekstrak etil asetat daun nipah (*Nypa fruticans wurmb*) memiliki nilai IC_{50} 5,014 mg/mL yang lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} ekstrak *n*-heksana (135,48 mg/mL) dan ekstrak etanol (63,214 mg/mL) daun *nypa fruticans wurmb* terhadap enzim α -amilase. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat lebih baik dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase. Sejalan dengan hasil analisis GC-MS bahwa ekstrak etil asetat mengandung senyawa sikloartenol, dimana senyawa tersebut dapat menurunkan gula darah pada penderita diabetes melitus tipe 2 (Bhavsahr et al., 2024).

Tabel 2.8 Kategori kekuatan aktivitas antidiabetes (Rizki et al., 2022)

Kategori	Rentang (ppm)
Sangat kuat	< 50
Kuat	51-100
Sedang	101-250
Lemah	251-500
Tidak aktif	> 500

2.5 Kesimpulan

Hasil uji fitokimia ekstrak batang sambiloto *n*-heksana mengandung golongan metabolit sekunder alkaloid dan steroid, sedangkan ekstrak etil asetat mengandung senyawa alkaloid dan terpenoid, serta ekstrak metanol mengandung flavonoid dan terpenoid. Hal ini sejalan dengan analisis FTIR dan GC-MS.

Aktivitas penghambatan enzim α -amilase pada ekstrak batang sambiloto secara *in vitro* diperoleh hasil nilai IC_{50} pada ekstrak *n*-heksana, etil asetat, metanol batang sambiloto dan akar bosa berurutan adalah 38,33; 28,21; 38,21 dan 49,69 mg/mL. Ketiga ekstrak memiliki kategori sangat kuat dalam aktivitas antidiabetes dengan aktivitas terbaik yaitu ekstrak etil asetat.

2.6 Daftar Pustaka

- Abubakar, Abdullahi R, Mainul Haque. 2020. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purpose. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*. 12(1): 1-10. <https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS.175.19>.
- Agustin, D.D., & at al. 2015. Kualitas Hidup Pasien Kanker Payudara dengan Terapi Kombinasi Fluorouracil. Doxor.
- Alfiani, Lula Alda. 2022. Uji Aktivitas Penghambat Enzim α -Amilase oleh Ekstrak Herba Cipulukan (*Physalis Angulate L*) Secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*. 8(15): 335-346. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7049485>.

- Anggraito, Y. Ulung, R. Susanti, Retno Sri iswari, Ari Yuniastuti, Lisdiana, Nugrahaningsih WH. 2018. Metabolit Sekunder dari Tanaman. Universitas Negeri Semarang, Semarang.
- Ausi, Yudisa, Melisa Intan Barliana. 2016. Artikel Review: Kandungan dan Aktivitas Farmakologi Minyak Biji Semangka (*Citrullus lanatus*). *Farmaka Suplemen*. 14(2): 243–253. <https://doi.org/10.35799/jbl.v13i3.51968>.
- Benchachoua, A., Bessam., H., Saidi, I. 2018. Effects of Different Extraction Methods and Solvents on the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Silybum Marianum* Leaves Extracts. *International Journal of Medical Science Clinical Invention*, 5(3): 3641-3647. <https://doi.org/10.18535/ijmsci.v5i3.16>
- Bhatnagar, Anju. 2023. Phytochemical Screening of *Andrographis Paniculata* (Burm. F) Nees Leaf and Stem Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 12(4): 05-08. <https://doi.org/10.22271/phyto.2023.v12.i4c.14686>.
- Bhavsar, Drashti, Suraj Kutre, Priti Shikhare, Sunil Kumar, Santosh Kumar Behera, Siddheswar. 2024. Pharmacoinformatics approach for Type 2 Diabetes Mellitus Therapeutics Using Phytocompounds from *Costus* genus: an In silico Investigation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1(17). <https://doi.org/10.1080/07391102.2024.2330712>
- Damira, Nisa Firdha, Siska Alicia Farma, Yusni Atifah, Said Batungale. 2021. Activity of The Amylase Enzyme in Saliva and The Protease Enzyme in The *Rana esculenta* Pancreatic Secretions. *Prosiding SEMNAS*. 1. <https://doi.org/10.24036/prosemmasbio/v011/19>.
- Elfahmi, E., Santoso, W., & Anggardiredja, K. (2019). Uji Aktivitas Antidiabetes Produk Obat Herbal yang Mengandung Ekstrak Bratawali (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hoff.f & Thoms.). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 6(3): 213-219. <https://doi.org/10.25077/jsfk.6.3.213-219.2019>.
- Fitrianny, Eka, Lisa Adhani, Andi Nuraliyah. 2024. Phenol Extraction from Soursop Leaves (*Annona murcata*): Soxhletation and Distillation. *JBIORTech*. 1(1): 14–21. <https://doi.org/10.61511/jbiogritech.v1i1.2024.608>.
- Gasperz, Nelson, Eirene Grace Fransina, Anancy Reza Ngarbingan. 2022. Uji Aktivitas Penghambat Enzim α -Amilase dan Glukoamilase dari Ekstrak Etanol Daun Kirinyuh (*Chormolaena odorata* L.). *Jurnal Kimia Mulawarman*. 19(2): 5-57. <https://doi.org/10.30872/jkm.v19i2.1120>.
- Giri, Santosh Kumar, Sanjib Gorain, Surjyo Jyoti Biswas. 2020. Evaluation of Toxicity of Dichlorvos (Nuvan) to Fresh Water Fis *Anabas testudineus* and Possible Modulation by Crude Aqueous Extract of *Andrographa paniculata* Ness. *Journal of Fisheries and Life Science*. 5(2): 78-84. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>.
- Gurupriya, S., L. Cathrine. 2016. Antimicrobial Activity of *Andrographis Paniculata* Stem Extracts. *International Journal of Scientific and Engineering Research*. 7(8). ISSN 2229-5518.

- Hidayah, Nurul, Kharisma Jayak Pratam, Danang Raharjo. 2023. Aktivitas Penghambatan Enzim Alfa-Amilase Ekstrak dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa Fruticans Wurmb*). *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*. 9(25): 677-684. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10433927>.
- Iskandar, Dodi. 2020. Aplikasi Uji Skrining Fitokimia terhadap Daun Uncaria Tomentosa Sebagai Bahan Utama dalam Pembuatan The. *Jurnal Teknologi Technoscientia*. 12(2): 153–158. <https://doi.org/10.34151/technoscientia.v12i2.2659>.
- Istiqomah, Yahdi, Yuli Kusuma Dewi. 2021. Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kulit Batang Kesambi Menggunakan Metode Ekstraksi Bertingkat. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*. 3(1): 22–31. <https://doi.org/10.20414/spin.v3i1.3020>.
- Khan, B., Hamdani, S., Khalid, M., Ashfaq, K., Munawar, M., Tahir, A., Braga, A., Shawky, A., Alqahtani, M., Abourehab, G., Ibrahim, P., Sidhom. 2023. Exploring Probenecid Derived 1,3,4-Oxadiazole-Phthalimide Hybrid as α -Amylase Inhibitor. *Synthesis, Structural Investigation and Molecular Modeling Pharmaceuticals*, 16(3): 424. <https://doi.org/10.3390/ph16030424>
- Kholifa, Endah. Computational Analysis of the Physical and Pharmacokinetic Profile of the Pentagamavunon-1 Compound. *Duta Pharma Journal*. 2(1): 1–7. <https://doi.org/10.47701/djp.v2i1.1679>.
- Kilo, A.La, Aman, L.o., Sabhi i., 2019. Studi Potensi Pirazolin Tersubstitusi 1-N dari Thiomicarbazone Sebagai Antiamuba Melalui Uji In Silico. *Indonesian Journal of Chemical Research*. 7: 9-24. <https://doi.org/10.30598/ijcr.2019.7-akr>.
- Klara, Indah Kurnia, Rini Madyastuti Purwono, Pudji Achmad. 2023. In Silico Analysis of Secang Wood (*Caselpinia sappan L*) Flavonoid Compounds on α -Amylase Receptors as Antihyperglycemics. *Acta Veterinaria Indonesia*. 11(3): 210-219. <https://doi.org/10.29244/avi.11.3.210-219>
- Maidawati. 2022. Identifikasi dan Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Sicerek (*Clausena excavate*). *Jurnal Hasil Penelitian dan Pengkajian Ilmiah Eksakta*. 1(2): 98-104. <https://doi.org/10.47233/jppie.v1i2.579>.
- Maliangkay, Hendra P, Rolef Rumondor. 2018. Antidiabetic Effectiveness Test of Ethanol Extract of Mangosteen Peel (*Garcinia Mangostana L*) on White Rats (*Rattus Norvegicus*) Induced by Alloxan. *Journal of Chemistry Progress*. 11(1). <https://doi.org/10.35799/cp.11.1.2018.27909>.
- Nirfandi, Haikal, Khairum Nisa Berawi, Exsa Hadibrata. 2023. Hubungan Diabetes Meletus dan Meroko dengan kejadian Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). *Jurnal Medula*. 13(2): 171-173. <https://doi.org/10.53089/medula.v13i2.655>.
- Nursamsiar, Maya, MM., Akbar, A., Syamsu, N., Aiyi.A. 2020. In Silico Study of Aglycon Curculigoside and Its Derivatives as α -Amilase Inhibitors. *Current Biochemistry*. 7(1): 29-37. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v7i1.23062>
- Novitasi, Anik. 2016. Isolasi dan Identifikasi Saponin Pada Ekstrak Daun Mahkota Dewa dengan Ekstraksi Maserasi. *Jurnal Sains*. 6(12): 10-14.

- Noviyanti, Yuska, Asri Mei Linda. 2020. Profile of Phytochemistry Compound Metabolite Secondary Extract of South Flower Extract (*Melastoma malabathricum* L). *Journal of Pharmaceutical and Science*. 3(1): 1-6. <https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v3i1.34>.
- Priyani, Riska. 2020. Benefits of the Sambiloto Plant (*Andrographis paniculata*) on the Body's Immune System. *Journal of Medical and Health Science*. 7(3): 484-490. <https://doi.org/10.32831/jik.v10i1.376>.
- Priyanto, Agus, Titik Juwariah. 2021. Hubungan Self Care dengan Kestabilan Gula Darah Pasien Diabetes Mellitus Type II. *Jurnal Ilmu Kesehatan*, 10(1). <https://doi.org/10.32831/jik.v10i1.376>.
- Rachmawati, Rinaldi Idroes, Eko Suhartono, Nur Balqia Maulydia, Darusman. 2022. In Silico and In Vitro Analysis of Tacca Tubers (*Tacca leontopetaloides*) from Banyak Island, Aceh Singkili Regency, Inonesia, as Antihypercholesterolemia Agents. *Molecules*. 27(23): 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules27238605>.
- Riasari, Hesti, Sani Nurlaela Fitriansyah, Irna Siti, Hoeriah. 2022. Perbandingan Metode Fermentasi, Ekstraksi dan Kepolaran Pelarut terhadap Kadar total Flavanoid dan Steroid pada Daun Sukun (*Artocarpus altilis*). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi Indonesia*. 11(1): 1-17. <http://dx.doi.org/10.58327/jstfi.v11i1.165>.
- Rizki, Muhammad Ikhwan, Anna Khumaira Sari, Dewi Kartika, Amalia Khairunnisa. 2022. Determination of Total Phenolic Content and Test of Antioxidant Activity of Ethanol Fractions and Extracts of Cempedak Leaves (*Artocarpus integer*) using the DPPH Method. *Media Pharmaceutica Indonesia* 4(2): 168-178. <http://dx.doi.org/10.24123/mpi.v4i2.4937>.
- Rosidah. 2022. A Min-Review: Potential of *Andrographis paniculata* Ness as Immunostimulator in Fish Aquaculture. *Global Scientific Journals*. 10(6): 325-332. <http://dx.doi.org/10.35726/jvip.v5i1.7333>
- Rubianti, Irma, Nikman Azmin, Muh Nasir. 2019. Phytochemical Screening Analysis of Ethanol Extract of Golkas Leaves as a Traditional Medicinal Plant of the Bima Community. *JUSTER*. 1(2): 7-12. <https://doi.org/10.55784/juster.v1i2.67>.
- Sangkal, Ahlan. 2021. Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak Etanol Buah Pakoba Merah (*Syzygium* Sp) Sebagai Antidiabetes Toleransi Glukosa Peroral. *ChemistryProgress*. 14(2): 108-115. <https://doi.org/10.35799/cp.14.2.2021.37175>.
- Saputra, Agus, Meity Marviana Laut, Nemay Anggadewi Ndaong. 2024. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Lunasia Amara. *Jurnal Kajian Veteriner*. 12(1) :113-121. <https://doi.org/10.35508/jkv.v12i1.15438>
- Skendi, A., Bouloumpasi, E., Chatzopoulou, P., Biliaderis, C., Irakli, M., 2023. Comparison of Drying Methods for the Retention of Phenolic Antioxidants in Post-Distillation Solid Residues of Aromatic Plants. *Food Science and Technology*, 189(1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115463>.

- Sudewo, B., 2004. Tanaman Obat Populer Penggempur Aneka Penyakit. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Sulistyowati, Etty, Rika Sebtiana. 2022. Quantification of Andrografolid from Sambiloto. *Jurnal Farmasi*. 8(2): 11-16. <http://dx.doi.org/10.33772/pharmauho.v8i2.25>.
- Tandi, Erik Arya, Ratih Purnawati, Mir-a Kemila. 2021. Kadar Air Ekstrak Herba Sambiloto (*Andrographis Paniculata*) pada Variasi suhu pengeringan *Jurnal Permata Indonesia*. 1(1): 1-6. <https://doi.org/10.59737/jpi.v12i1.4>
- Wahid, A.R., dan Safwan. 2020. Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Terhadap Ekstrak Tanaman Ranting Patah Tulung (*Euphorbia Tirucalli* L). *Jurnal Ilmu Kefarmasian*. 1(1): 24-27. <https://doi.org/10.31764/lf.v1i1.1208>.
- Wijaya, Heri, Siti Jubaidah, Rukayyah. 2022. Comparison of Extraction Methods on the Yield of Turi Stem Extract (*Sesbania Grandiflora* L.) Using the Maceration and Soxhletation Methods. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*. 5(1): 1-11. <https://doi.org/10.35473/ijpnp.v5i1.1469>.
- Zaini, M. dan Shovia V. 2020. Skrining Fitokimia Ekstrak *Carica papaya radix*, *piper ornatum folium* dan *Nephelium lappaceum semen* Asal Kalimantan Selatan. *Jurnal Kajian Ilmiah Kesehatan dan Teknologi*. 2(1): 15-27. <https://doi.org/10.52674/jkikt.v2i1.30>.
- Zannou, Oscar, Hojjat Pashazadeh, Salam A Ibrahim, Ilkay Koca. 2022. Green and Highly Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidan Capacity from Kinkeliba by Natural Deep Eutectic Solvents. *Arabian Journal of Chemistry*. 15(5): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103752>.