



**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS
ANTIHIPERLIPIDEMIA SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :

Mardiyatul Afifah

NIM 132210101114

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS
ANTIHIPERLIPIDEMIA SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi (S1) dan
mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

Mardiyatul Afifah

NIM 132210101114

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibunda Muti'atul Choiro dan Ayahanda Sidi tercinta, untuk doa, kesabaran, kerja keras dan kasih sayangnya;
2. Segenap keluarga besar yang senantiasa memberikan semangat, dukungan dan motivasi;
3. Bapak/Ibu Guru TK Dharma Wanita Persatuan, SD Negeri Kesek 01, Madrasah Diniyah Al-Islah, MTs Negeri 2 Surabaya, SMK Farmasi Sekesal Surabaya, serta Bapak/Ibu Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember;
4. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

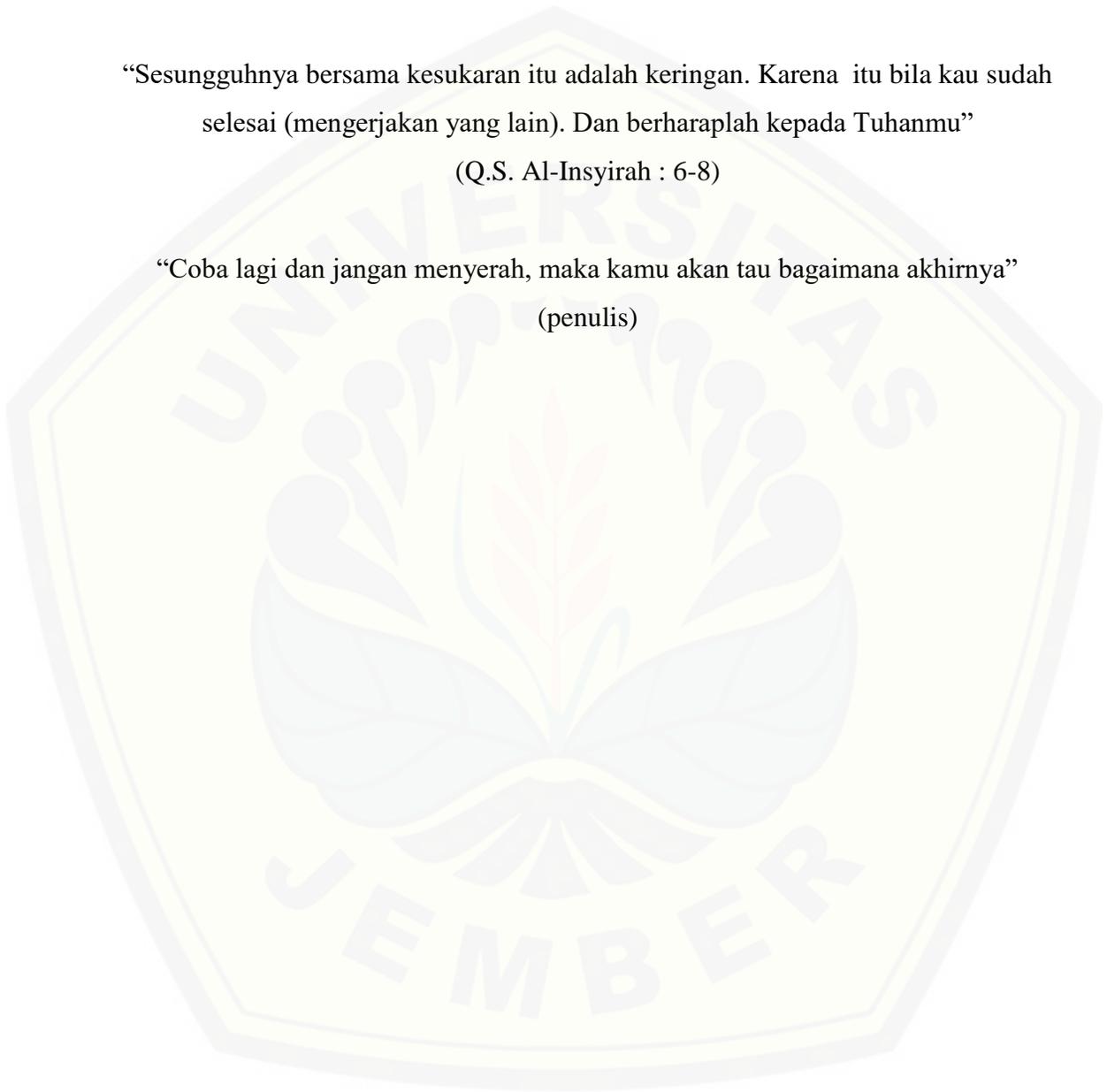
MOTTO

“Sesungguhnya bersama kesukaran itu adalah keringan. Karena itu bila kau sudah selesai (mengerjakan yang lain). Dan berharaplah kepada Tuhanmu”

(Q.S. Al-Insyirah : 6-8)

“Coba lagi dan jangan menyerah, maka kamu akan tau bagaimana akhirnya”

(penulis)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Mardiyatul Afifah

NIM : 132210101114

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Pengembangan dan Validasi Metode Uji Aktivitas Antihiperlipidemia Secara *In Vitro*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 17 Januari 2018

Yang menyatakan,

Mardiyatul Afifah

NIM 132210101114

SKRIPSI

**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE UJI
AKTIVITAS ANTIHIPERLIPIDEMIA SECARA *IN VITRO***

Oleh :

Mardiyatul Afifah

NIM 132210101114

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Lestyo Wulandari, S.Farm., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Dwi Koko Pratoko, S.Farm, M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Pengembangan dan Validasi Uji Aktivitas Antihiperlipidemia secara *In Vitro*" karya Mardiyatul Afifah telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 25 Januari 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Pembimbing Utama

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.
NIP 197604142002122001

Pembimbing Anggota

Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP 198504282009121004

Tim Penguji

Penguji I

Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.
NIP 196902011994031002

Penguji II

Indah Yulia N., S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 198407122008122002

Mengesahkan

Dekan



Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.
NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Pengembangan dan Validasi Metode Uji Aktivitas Antihiperlipidemia secara *In Vitro*; Mardiyatul Afifah, 132210101114; 77 Halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember

Hiperlipidemia termasuk salah satu kelainan sistem metabolisme yang terjadi pada jutaan orang di dunia. Penyakit ini dapat meningkatkan angka kematian dini karena merupakan faktor resiko terjadinya berbagai macam penyakit seperti penyakit jantung, stroke, dan hipertensi. Penggunaan obat-obatan hiperlipidemia diberikan untuk membantu menormalkan fungsi metabolisme. Obat-obat sintetik ini memiliki kekurangan berupa efek samping yang akan timbul jika digunakan dalam jangka panjang. Penggunaan bahan-bahan yang berasal dari tanaman menjadi salah satu alternatif untuk mengobati berbagai penyakit karena relatif tidak memberikan efek samping bagi tubuh serta cenderung lebih murah. Salah satu tanaman yang dapat dijadikan sebagai antihiperlipidemia adalah daun sirih merah (*Piper crocatum*) karena mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu quersetin yang dapat menghambat kerja lipase dengan baik. Banyak peneliti yang telah melakukan pengujian aktivitas antihiperlipidemia dengan enzim lipase pada berbagai macam ekstrak tanaman secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, tetapi dari beberapa penelitian tersebut memiliki perbedaan kondisi analisis serta konsentrasi ujinya. Validasi serta pengembangan atau modifikasi perlu dilakukan guna menyesuaikan dengan kondisi laboratorium yang digunakan.

Penelitian dimulai dari studi pustaka mengenai ekstrak, selanjutnya dilakukan optimasi kondisi analisis, validasi metode dan pengujian aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak tanaman. Penentuan ekstrak dimulai dengan pengumpulan literatur mengenai aktivitas ekstrak daun sirih merah. Optimasi kondisi analisis dilakukan untuk memperoleh kondisi yang optimum untuk analisis. Tahap selanjutnya dilakukan

validasi metode analisis dengan variabel analisa meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi (BD & BK), presisi, dan akurasi. Setelah itu dilakukan uji aktivitas antihiperlipidemia dengan enzim lipase pada ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* dengan menggunakan metode analisis yang telah diuji validitasnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk metode uji aktivitas antihiperlipidemia pada standar orlistat dan ekstrak daun sirih merah dengan metode Spektrofotometri UV-Vis adalah panjang gelombang maksimum yang dipilih yaitu 404 nm, waktu inkubasi enzim-inhibitor berada pada menit ke-15, waktu inkubasi enzim, inhibitor dan substrat berada pada menit ke-30, konsentrasi substrat 3 mg/mL, konsentrasi enzim 0,025 mg/mL, dan konsentrasi uji yang digunakan ialah 20 ppm untuk orlistat dan 120 ppm untuk ekstrak daun sirih merah. Uji aktivitas antihiperlipidemia menggunakan enzim lipase dari ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dapat memberikan hasil analisis yang linier dengan koefisien korelasi (r) = 0,9970, V_{x0} = 4,5779% dan X_p = 4,9097 ppm untuk standar orlistat dan koefisien korelasi (r) = 0,9972, V_{x0} = 4,4317% dan X_p = 28,5465 ppm untuk daun sirih merah; kepekaan dengan nilai batas deteksi = 4,9097 ppm dan batas kuantitasi = 14,7289 ppm untuk standar orlistat, dan nilai batas deteksi = 28,5465 ppm dan batas kuantitasi = 85,6394 ppm untuk ekstrak daun sirih merah; presisi dengan RSD uji presisi repeatibilitas standar dan sampel berturut-turut adalah sebesar 3,842 % ; 2,373 %. dan RSD uji presisi antara standar orlistat dan sampel berturut-turut adalah sebesar 3,842%; 3,554% dan 2,373%; 4,157% dan akurat dengan melihat peningkatan kurva sebanding dengan peningkatan persen adisi. Metode yang sudah dinyatakan valid, selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas ekstrak daun sirih hijau. Pada daun sirih hijau diperoleh IC_{50} sebesar 202,526 ppm. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode untuk uji aktivitas antihiperlipidemia menggunakan enzim lipase pada ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* ialah valid.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengembangan dan Validasi Uji Aktivitas Antihiperlipidemia secara *In Vitro*". Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis menyadari dan mengakui bahwa upaya, doa, arahan, bimbingan, dan dukungan dari keluarga maupun dosen pembimbing serta pihak-pihak lainnya sangat membantu dalam terselesaikannya skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari S.Farm., M.Farm., Apt. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Dosen pembimbing akademik penulis, Bapak Dwi Nurahmanto, S.Farm., M.Sc., Apt. yang selalu membimbing penulis dalam menempuh pendidikan;
3. Ibu Lestyo Wulandari S.Farm., M.Farm., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan Bapak Dwi Koko Pratoko, S.Farm, M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi ini.
4. Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D., Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt., dan Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku dosen penguji yang dengan senantiasa memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan; staff,

karyawan dan teknisi laboratorium atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;

6. Orang tua tercinta, Ibu Muti'atul Choירו dan Bapak Sidi yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis; adik Faris Abdul Choir dan seluruh keluarga besar penulis yang selalu menjadi penyemangat penulis;
7. Nina, Nia, Chita, Lisa, Ratna, almarhum Sugi, dan seluruh teman-teman seperjuangan Angkatan 2013 (Farmasetamol) Fakultas Farmasi Universitas Jember yang tidak dapat disebutkan satu per satu;
8. Keluarga besar BEM Fakultas Farmasi Universitas Jember, ISMAFARSI (nasional maupun wilayah Jatim-Bali) dan MPA Pring Kuning atas ilmu non akademis yang saya dapatkan selama menempuh kuliah di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
9. Teman-teman KKN 52 gelombang 1 T.A. 2016/2017 yang menjadi tempat berkeluh kesah tentang skripsi masing-masing;
10. Teman-teman Kelas Inspirasi Jember 5 terutama Rombel 12 yang memberikan inspirasi kepada penulis untuk segera menyelesaikan studi dan menggapai cita-cita penulis;
11. Dian, Fifin, Nadhika, Elma, Lolyta, Risma, Luthfi, Nimas, Pandura, Yunita, Widy, Bayu, Cindy, Puput, Intan, Reza, Zaki atas doa dan semangatnya;
12. Seluruh teman-teman di Fakultas Farmasi Universitas Surabaya angkatan 2012 yang menjadi pengingat bagi penulis selama mengerjakan penelitian untuk tidak mengulangi kesalahan kedua kalinya, yaitu menyerah;
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR PERSAMAAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Manfaat.....	5
1.5 Batasan Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Hiperlipidemia	6
2.2 Antihiperlipidemia.....	7
2.2.1 HMG CoA Reduktase Inhibitor.....	7
2.2.2 Resin.....	8
2.2.3 Fibrat	8
2.2.4 Lipase Inhibitor.....	9

2.3 Enzim Lipase.....	10
2.4 Ekstrak.....	12
2.5 Tanaman Sirih	13
2.5.1 Sirih Merah	13
2.5.2 Sirih Hijau.....	16
2.6 Pengujian Aktivitas Antihiperlipidemia	18
2.7 Spektrofotometri UV-Visible (UV-Vis)	19
2.7.1 Prinsip	19
2.7.2 Instrumentasi.....	21
2.8 Validasi Metode Analisis.....	25
2.8.1 Linieritas	26
2.8.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	27
2.8.3 Selektivitas / Spesifisitas	28
2.8.4 Presisi	29
2.8.5 Akurasi	30
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	32
3.1 Jenis Penelitian	32
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	32
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	32
3.3.1 Alat Penelitian.....	32
3.3.2 Bahan Penelitian	32
3.4 Rancangan Penelitian.....	32
3.4.1 Rancangan Percobaan	32
3.4.2 Alur Penelitian	33
3.5 Prosedur Penelitian	34
3.5.1 Penentuan Sampel.....	34
3.5.2 Pembuatan Ekstrak	34
3.5.3 Optimasi Kondisi Analisis	34

3.5.4 Validasi Metode Analisis.....	37
3.5.5 Penentuan Aktivitas Antihiperlipidemia	39
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
4.1 Optimasi Kondisi Analisis	41
4.1.1 Optimasi Panjang Gelombang	41
4.1.2 Optimasi Waktu Inhibisi.....	43
4.1.3 Optimasi Konsentrasi Substrat	44
4.1.4 Optimasi Konsentrasi Enzim	45
4.1.5 Optimasi Konsentrasi Uji	46
4.2 Validasi Metode Analisis.....	47
4.2.1 Linieritas	48
4.2.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	50
4.2.3 Presisi.....	51
4.2.4 Akurasi	53
4.3 Uji Aktivitas Antihiperlipidemia Ekstrak Daun Sirih Hijau.....	54
BAB 5. PENUTUP.....	57
5.1 Kesimpulan.....	57
5.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Mekanisme kerja penghambatan lipase	9
Gambar 2. 2 Hidrolisis lemak netral yang dikatalis oleh lipase	10
Gambar 2. 3 Pencernaan lemak.....	11
Gambar 2. 4 Tanaman sirih merah.....	14
Gambar 2. 5 Tanaman sirih hijau.....	16
Gambar 2. 6 Instrumentasi Spektrofotometri UV-Vis.....	22
Gambar 3. 1 Alur penelitian.....	33
Gambar 4. 1 Reaksi hidrolisis p-NPB.....	42
Gambar 4. 2 <i>Scanning</i> panjang gelombang 380-800 nm.....	43
Gambar 4. 3 Optimasi waktu inhibisi enzim	44
Gambar 4. 4 Optimasi konsentrasi substrat	45
Gambar 4. 5 Optimasi konsentrasi enzim.....	46
Gambar 4. 6 Kurva linieritas konsentrasi vs %inhibisi standar orlistat	49
Gambar 4. 7 Kurva linieritas konsentrasi vs %inhibisi ekstrak daun sirih merah. 50	
Gambar 4. 8 Profil %Adisi vs IC_{50}	53
Gambar 4. 9 Campuran larutan uji aktivitas inhibitor antihiperlipidemia.....	54
Gambar 4. 10 Kurva %inhibisi ekstrak daun sirih hijau.....	55
Gambar 4. 11 Nilai IC_{50} hambatan lipase orlistat, ekstrak daun sirih merah dan ekstrak daun sirih hijau	56

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Konsentrasi analit berbanding %RSD	30
Tabel 2. 2 Persen perolehan kembali analit pada konsentrasi yang berbeda	31
Tabel 4. 1 Optimasi konsentrasi uji orlistat	47
Tabel 4. 2 Optimasi konsentrasi uji ekstrak daun sirih merah.....	47
Tabel 4. 3 Hasil uji linieritas standar orlistat	48
Tabel 4. 4 Hasil uji linieritas ekstrak daun sirih merah	49
Tabel 4. 5 Hasil uji presisi repeatabilitas standar orlistat	51
Tabel 4. 6 Hasil uji presisi repeatabilitas ekstrak daun sirih merah	52
Tabel 4. 7 Hasil uji presisi antara standar orlistat.....	52
Tabel 4. 8 Hasil uji presisi antara ekstrak daun sirih merah	52
Tabel 4. 9 Hasil Uji Akurasi.....	53

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1 Hukum Lambert-Beer	20
Persamaan 2.2 Batas deteksi	27
Persamaan 2.3 Batas kuantitasi	27
Persamaan 2.4 Persen perolehan kembali	31
Persamaan 3.1 Persentasi penghambatan	40
Persamaan 3.2 Regresi linier	40

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperlipidemia termasuk salah satu kelainan sistem metabolisme yang terjadi pada jutaan orang di dunia (Supriyatna *et al.*, 2015). Menurut Dipro *et al.* (2008), hiperlipidemia merupakan abnormalitas komponen utama lipid dalam plasma berupa peningkatan total kolesterol, LDL (*low-density lipoprotein*), dan trigliserida atau penurunan konsentrasi HDL (*high-density lipoprotein*) atau kombinasi dari semuanya. Prevalensi hiperlipidemia di Indonesia berdasarkan data Riskesdas 2013 menunjukkan bahwa penduduk berusia >15 tahun dengan kondisi kolesterol total abnormal sebesar 35,9%, kadar HDL yang rendah sebesar 22,9%, kadar LDL di atas nilai optimal dengan kategori gabungan *near optimal-borderline* sebesar 60,3% dan kategori tinggi-sangat tinggi 15,9%, trigliserida abnormal dengan kategori *borderline* tinggi 13,0% dan kategori tinggi-sangat tinggi 11,9% (Kementrian Kesehatan RI, 2013). Pada penelitian yang dilakukan di empat kota besar di Indonesia, hiperlipidemia lebih banyak diderita wanita lanjut usia dibandingkan pria lanjut usia (Kamsa *et al.*, 2005). Penyakit ini dapat meningkatkan angka kematian dini karena merupakan faktor resiko terjadinya berbagai macam penyakit seperti penyakit jantung, stroke, dan hipertensi. Penggunaan obat-obatan hiperlipidemia diberikan untuk membantu menormalkan fungsi metabolisme (Supriyatna *et al.*, 2015).

Obat-obat hiperlipidemia yang sering digunakan terdiri dari obat-obat golongan *HMG CoA reduktase inhibitor*, resin, dan fibrat. Obat-obat sintetik ini memiliki kekurangan berupa efek samping yang akan timbul jika digunakan dalam jangka panjang. Misalnya, obat golongan statin yang memiliki efek samping seperti miopati dan rbdomiolisis karena terjadi disfungsi ginjal (Syamsudin, 2011). Berdasarkan hal di atas, penggunaan bahan-bahan yang berasal dari tanaman menjadi salah satu alternatif untuk mengobati berbagai penyakit karena relatif tidak memberikan efek

samping bagi tubuh serta cenderung lebih murah (Mardiana, 2012). Dari penelitian yang telah dilaporkan, beberapa tanaman yang memiliki aktivitas sebagai antihiperlipidemia antara lain kedelai detam 1 dan daun jati belanda (Hidayat *et al.*, 2014), daun gambir (Yunarto *et al.*, 2015), buah jambu biji (Carolia dan Ghaisani, 2016) dan daun sirih merah (Poetra, 2015).

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) mampu mengobati berbagai macam penyakit, salah satunya sebagai antihiperlipidemia. Penelitian yang dilakukan Poetra (2015) membuktikan bahwa pemberian ekstrak sirih merah terhadap tikus jantan Sprague Dawley obesitas mampu menurunkan kadar trigliserida darah, kadar kolesterol darah, bobot badan, dan konsumsi pakan selama 2 minggu dengan dosis 1260 mg/kg bobot badan dan 1890 mg/kg bobot badan. Daun sirih merah mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu quersetin (Parfati dan Windono, 2016) yang dapat menghambat kerja lipase dengan baik (Ruiz *et al.*, 2006).

Ada beberapa teknik yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antihiperlipidemia yaitu secara *in silico* (Ramachandran *et al.*, 2013), *in vitro* (Dechakhamphu dan Wongchum, 2015) dan *in vivo* (Thirumalai *et al.*, 2014). Pengujian secara *in silico* merupakan metode uji yang mudah dilakukan karena hanya membutuhkan suatu program komputer, namun metode ini biasa digunakan untuk mengawali penemuan senyawa obat baru dan hanya sebatas memprediksi aktivitas suatu senyawa sebelum disintesis karena uji ini dilakukan dengan melalui simulasi komputer (Hardjono, 2013). Pengujian secara *in vivo* merupakan uji yang dilakukan pada organisme hidup (hewan coba) yang memiliki karakteristik tertentu yang relatif serupa dengan manusia, namun metode pengujian ini memiliki keterbatasan yakni perlunya persetujuan bioetika. Dalam menggunakan hewan percobaan untuk penelitian diperlukan pengetahuan yang cukup dalam hal penanganan dan perawatan karena hewan coba akan mengalami penderitaan bahkan kematian sehingga perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi (Ridwan, 2013). Pengujian secara *in vitro* lebih sering dilakukan karena waktu yang dibutuhkan relatif lebih

singkat, bahan uji yang dibutuhkan lebih sedikit sehingga biaya yang dikeluarkan relatif lebih rendah, tetapi pada uji ini perlu mengoptimalkan kondisi secara tepat sesuai dengan kondisi organisme hidup (Widowati dan Mudahar, 2009).

Pengujian aktivitas antihiperlipidemia secara *in vitro* dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya yaitu dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (Lamb *et al.*, 1977), HPLC (Itoh *et al.*, 2009) dan Spektrofotometri UV-Vis (Dechakhamphu dan Wongchum, 2015). Ketiga metode analisis instrumental ini merupakan metode terpilih dan memadai untuk mengantisipasi permasalahan yang terkait dengan sangat kecilnya kadar senyawa yang dianalisis dan kompleksnya matriks sampel yang dianalisis (Mulja dan Suharman, 1995).

Pengembangan metode analisis biasanya didasarkan pada literatur yang telah ada dengan menggunakan instrumen yang sama atau hampir sama. Pengembangan metode biasanya membutuhkan pemilihan syarat-syarat metode tertentu dan memutuskan jenis alat apa yang akan digunakan dan mengapa digunakan alat tersebut (Gandjar dan Rohman, 2007). Suatu metode analisis yang baru atau metode analisis yang dimodifikasi, sebelum dapat diusulkan untuk menggantikan metode analisis lama atau digunakan sebagai metode analisis standar, harus dibuktikan validitasnya. Modifikasi metode analisis merupakan proses pengembangan metode dari prosedur pengujian yang telah ada dengan alasan tertentu untuk memberikan hasil yang akurat dan dapat dipercaya sesuai metode yang ditetapkan (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2012). Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode analisis perlu dilakukan untuk mendapatkan suatu metode analisis yang dapat dipercaya dan hasil analisisnya mendekati kebenaran/sahih (Harmita, 2004).

Dalam penelitian ini dilakukan validasi uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun sirih merah dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Keuntungan utama spektrofotometer UV-Vis adalah bahwa metode ini memberikan cara sederhana

untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil (Basset, 1994). Dari beberapa penelitian uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak tanaman secara *in vitro* dengan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan kondisi analisis yang berbeda satu dengan yang lain seperti yang dilakukan Dechakhamphu dan Wongchum (2015) dan Apriliani (2015), dan belum pernah dilakukan validasi sehingga perlu dilakukan modifikasi metode analisis untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium dan perubahan reagen yang digunakan.

Suatu metode analisis yang dimodifikasi harus divalidasi untuk membuktikan bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis tertentu serta validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Rohman, 2009). Pada penelitian ini, parameter validasi yang diuji meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi dan akurasi. Metode analisis yang telah divalidasi nantinya diharapkan dapat memperkecil timbulnya kesalahan seperti presisi dan akurasinya yang rendah serta dapat digunakan untuk penelitian uji aktivitas antihiperlipidemia pada berbagai macam sampel.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang dapat diambil dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Bagaimana kondisi optimum uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis ?
- b. Apakah uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dapat memberikan hasil analisis yang valid yaitu linier, peka, presis dan akurat ?
- c. Berapa nilai aktivitas antihiperlipidemia (IC_{50}) ekstrak daun sirih hijau yang diuji dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah :

- a. Mengetahui kondisi optimum uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.
- b. Menentukan validitas metode yang meliputi parameter kelinieritasan, kepekaan, keseksamaan serta keakuratan pada uji aktivitas antihiperlipidemia ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.
- c. Menentukan aktivitas antihiperlipidemia (IC₅₀) ekstrak daun sirih hijau yang diuji dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat sebagai berikut:

- a. Menghasilkan suatu metode yang valid untuk pengujian aktivitas antihiperlipidemia secara *in vitro* menggunakan spektrofotometri UV-Vis.
- b. Memberikan informasi mengenai potensi aktivitas antihiperlipidemia sampel ekstrak tanaman.

1.5 Batasan Penelitian

Adapun batasan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- a. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak jadi yang diekstraksi dengan metode ultrasonikasi dan maserasi.
- b. Ekstrak tanaman yang digunakan untuk validasi metode menggunakan ekstrak daun sirih merah, sedangkan metode yang telah tervalidasi tersebut digunakan untuk pengujian sampel ekstrak daun sirih hijau.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hiperlipidemia

Hiperlipidemia atau juga dikenal dengan dislipidemia merupakan abnormalitas komponen utama lipid dalam plasma berupa peningkatan total kolesterol, LDL (*low-density lipoprotein*), dan trigliserida atau penurunan konsentrasi HDL (*high-density lipoprotein*) atau kombinasi dari semuanya (Dipiro *et al.*, 2008). Hiperlipidemia merupakan keadaan meningkatnya kadar lipoprotein atau trigliserid atau keduanya di dalam darah. Keadaan ini merupakan faktor risiko utama untuk penyakit kardiovaskular seperti angina, infark miokard dan stroke (Tao, 2014). Seseorang dikatakan mengalami hiperlipidemia apabila kadar kolesterol total ≥ 240 mg/dL, LDL ≥ 160 mg/dL, HDL ≤ 40 mg/dL, dan Trigliserida ≥ 200 mg/dL (Dipiro *et al.*, 2008). Meskipun elevasi kolesterol LDL dianggap sebagai indikator terbaik untuk risiko aterosklerosis, dislipidemia juga bisa ditemukan dengan adanya elevasi kolesterol total (hiperkolesterolemia), trigliserida (hipertrigliserida), atau rendahnya kadar kolesterol HDL. Kelainan di dalam lipoprotein plasma dan gangguan metabolisme lipid merupakan faktor risiko yang paling kuat untuk aterosklerosis (Syamsudin, 2011).

Hiperlipidemia dibagi menjadi dua kelompok yaitu hiperlipidemia primer dan hiperlipidemia sekunder. Hiperlipidemia primer dibagi dalam dua kelompok besar yaitu hiperlipidemia monogenik karena kelainan gen tunggal yang diturunkan serta hiperlipidemia yang dikarenakan gabungan faktor-faktor genetik dengan faktor lingkungan. Hiperlipidemia sekunder disebabkan karena adanya penyakit seperti diabetes melitus yang tidak terkontrol, hipotiroidisme, penyakit obstruksi hati, dan disproteinemia atau penggunaan obat-obatan seperti kortikosteroid, estrogen, endogen, diuretik, serta penghambatan adenoreseptor beta (Gunawan, 2012).

Mekanisme penurunan kadar LDL dalam plasma terjadi ketika enzim HMG-CoA (β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A) reduktase yang berfungsi untuk mengubah

HMG-CoA menjadi asam mevalonat yang selanjutnya menjadi kolesterol ini dihambat. Penghambatan enzim HMG-CoA reduktase dapat mengurangi sintesis kolesterol dalam hati, sehingga akan terjadi peningkatan jumlah reseptor LDL. LDL kemudian masuk ke hati dan diekskresi melalui empedu sehingga kadar LDL dalam plasma menurun (National Cholesterol Education Program, 2002).

2.2 Antihiperlipidemia

Obat-obat antihiperlipidemia merupakan obat yang digunakan untuk menurunkan kadar lipid plasma. Tindakan menurunkan kadar lipid plasma merupakan salah satu tindakan yang ditujukan untuk menurunkan risiko aterosklerosis. Pengobatan hiperlipidemia terutama ditujukan pada pasien dengan riwayat aterosklerosis prematur dalam keluarga dan dengan adanya faktor risiko lain seperti adanya diabetes melitus, hipertensi dan kebiasaan merokok. Adapun obat-obat yang dapat digunakan sebagai antihiperlipidemia adalah obat golongan *HMG-CoA reduktase inhibitor*, Resin, Fibrat, dan *Lipase inhibitor*.

2.2.1 HMG CoA Reduktase Inhibitor

Statin (penghambat HMG-CoA reduktase) saat ini merupakan hipolipidemik yang paling efektif dan aman untuk menurunkan kolesterol. Pada dosis tinggi, statin juga dapat menurunkan trigliserida yang disebabkan oleh peninggian VLDL (Gunawan, 2012). Statin menghambat 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktase untuk biosintesis kolesterol. Penghambatan enzim ini menyebabkan penekatan pembentukan mevalonat. Dengan dosis terapi, statin menurunkan namun tidak menghambat biosintesis kolesterol secara sempurna. Sebagai respon terhadap inhibisi sintesis kolesterol, hepatosit menyebabkan upregulasi ekspresi reseptor LDL. Hal ini menyebabkan peningkatan LDL dari plasma. Bioavailabilitas atorvastatin, fluvastatin, pravastatin dan rosuvastatin berkisar antara 14-34%, sementara bioavailabilitas lovastatin dan simvastatin hanya sekitar 5% karena efek *first-past* yang ekstensif (Syamsudin, 2011).

2.2.2 Resin

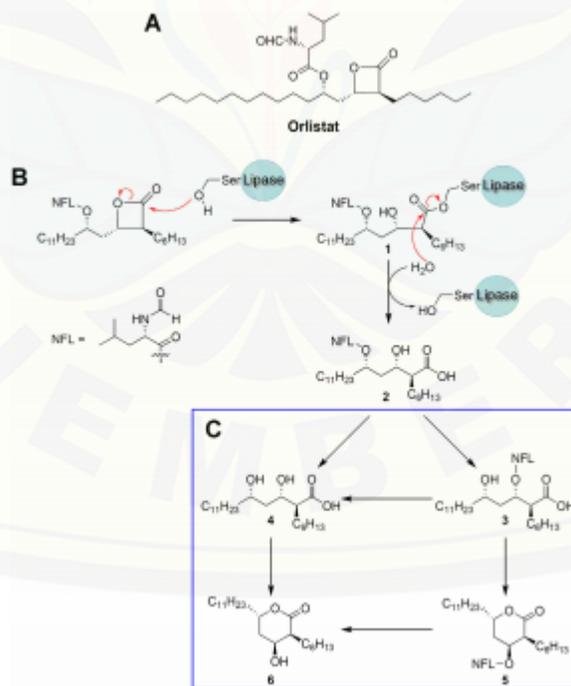
Sekuestran asam empedu adalah sekelompok obat yang digunakan untuk mengikat komponen empedu tertentu di dalam traktus gastrointestinalis. Obat ini mengganggu sirkulasi asam empedu enterohepatik dengan cara mengasingkan dan mencegah reabsorpsi dari usus. Sebagai bagian dari digesti normal, hati mengembalikan kolesterol ke dalam asam empedu. Asam empedu bergerak memasuki usus di mana sebagian besar akan direabsorpsi dan dikembalikan ke hati. Obat resin asam empedu mengikat ke asam empedu saat bergerak melalui usus sehingga asam empedu keluar dari tubuh melalui feses dan tidak masuk kembali ke dalam aliran darah. Sebagai respon, hati mengubah lebih banyak kolesterol menjadi asam empedu, dan asam empedu yang dihasilkan ini juga dibersihkan dari dalam tubuh melalui feses. Hasilnya didapatkan kolesterol LDL jahat yang dibuang secara efektif dari dalam hati dan darah (Syamsudin, 2011).

2.2.3 Fibrat

Gemfibrozil dan fenofibrat adalah kongener asam fibrat generasi pertama turunan clofibrate. Gemfibrozil diyakini berfungsi terutama sebagai ligan pengatur transkripsi inti *peroxisome proliferator-activated receptor-alpha* (PPAR- α). Gemfibrozil diduga meningkatkan lipolisis lipoprotein trigliserida melalui lipase lipoprotein. Lipolisis intraseluler dalam jaringan adiposa menurun. Terdapat suatu penurunan kadar LDL dalam plasma, sebagian terjadi karena penurunan ekskresi oleh hati. Diduga fenofibrat juga berfungsi sebagai ligan untuk PPAR- α (Katzung, 2002). Akibat interaksi obat ini dengan PPAR- α , terjadi peningkatan oksidasi asam lemak, sintesis lipoprotein lipase dan penurunan ekspresi Apo C-III. Peningkatan kadar lipoprotein lipase meningkatkan kadar klirens lipoprotein yang kaya trigliserida. Penurunan produksi Apo C-II hati akan menurunkan VLDL. HDL meingkat secara moderat karena peningkatan ekspresi Apo A-I dan Apo A-II (Gunawan, 2012).

2.2.4 Lipase Inhibitor

Orlistat merupakan obat sintetik turunan lipstatin, suatu inhibitor alami lipase yang diproduksi oleh *Streptomyces toxytrincini*. Orlistat merupakan obat penurun berat badan yang bekerja secara lokal pada sistem pencernaan (Dipiro *et al.*, 2008). Orlistat sebagai inhibitor kompetitif pada lipase saluran cerna terutama lambung dan pankreas akan membentuk ikatan kovalen dengan situs serin aktif lipase kemudian menginaktivasi situs tersebut sehingga terjadi hidrolisis lemak makanan (Lunagariya *et al.*, 2014). Penghambatan enzim lipase dapat meningkatkan ekskresi lemak dalam feses. Selama penggunaan orlistat kemungkinan terjadi efek samping seperti sakit pada perut, diare dan flatulensi. Orlistat dikontraindikasikan pada pasien dengan sindrom malabsorpsi, kolestasis, ibu menyusui dan tidak direkomendasikan pada ibu hamil. Orlistat tidak direkomendasikan untuk diresepkan bersama dengan obat golongan fibrat, acarbose atau metformin (Dipiro *et al.*, 2008).

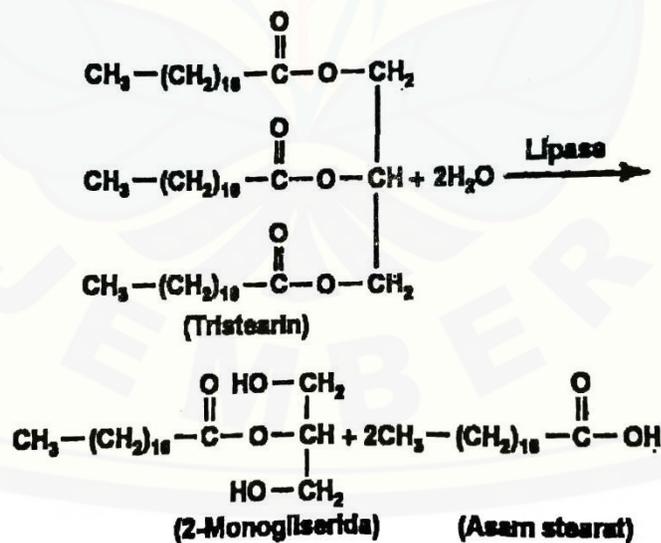


Gambar 2. 1 (A) Struktur orlistat; (B) Mekanisme kerja penghambatan lipase; (C) Produk hasil degradasi (Bénarouche *et al.*, 2014)

2.3 Enzim Lipase

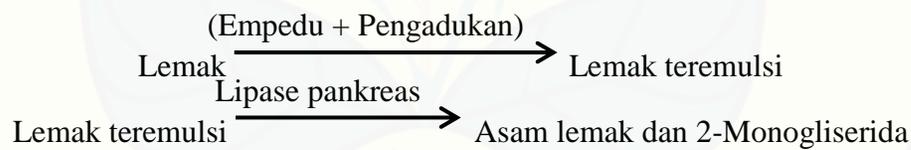
Lipase (triasilgliserol asilhidrolase, E.C. 3.1.1.3) adalah enzim-enzim yang mengkatalisis hidrolisis ester gliserol pada permukaan lemak air. Dalam sistem pelarut organik, lipase juga diketahui dapat mengkatalisasi sintesis ester (Klibanov, 1989). Enzim ini juga digunakan dalam hidrolisis triasilgliserol (TAG) menghasilkan diasilgliserol (DAG) dan asam lemak bebas (Winarno, 2002).

Lipase pankreas merupakan enzim yang larut dalam air. Enzim ini disintesis oleh sel-sel parenkim pankreas dan ditransfer ke permukaan luminal usus halus untuk menghidrolisis substratnya. Substrat enzim lipase pankreas berupa lemak atau minyak dari makanan dalam bentuk triasilgliserol (trigliserida) yang akan dihidrolisis menjadi monogliserida dan asam lemak bebas rantai panjang. Lipase pankreas menghidrolisis 50-70% dari total lemak dari asupan makanan (Birari dan Bhutani, 2007). Enzim lipase memecah lipid dengan memutuskan ikatan ester yang merupakan ikatan tulang punggung gliserol pada substrat. Monogliserida yang dihasilkan akan digunakan untuk kerja oleh otot dan sebagian disimpan dalam jaringan adiposa (Santoso, 2001).



Gambar 2. 2 Hidrolisis lemak netral yang dikatalis oleh lipase (Guyton dan Hall, 2007)

Lipase pankreas bekerja pada daerah permukaan minyak air dan titik-titik lipid yang teremulsi secara halus dibentuk oleh gerakan mekanis dalam usus dengan adanya garam empedu. Semakin aktif kerja enzim tersebut maka lemak dan minyak yang dihidrolisis akan semakin banyak sehingga semakin banyak pula monogliserida yang dihasilkan. Sebagai akibatnya, monogliserida yang diserap oleh usus halus dan kemudian disimpan sebagai cadangan lemak dalam jaringan adiposa pun akan meningkat. Hal ini dapat memicu penumpukan lemak dalam jaringan tersebut dan menyebabkan kegemukan atau obesitas (Fitriyani, 2009). Lipase pankreas terdapat dalam jumlah sangat banyak di dalam getah pankreas, cukup untuk mencerna semua trigliserida selama 1 menit (Guyton dan Hall, 2007). Pada penderita gangguan lipase akan terjadi peningkatan kadar trigliserida dalam darah. Kadar kilomikron dan VLDL (*very-low-density lipoprotein*, mengandung sejumlah besar triasilgliserol) meningkat karena keduanya tidak dicerna dengan kecepatan normal oleh lipase kemudian terjadi penimbunan lemak intrasel dan menimbulkan terjadinya hiperlipidemia (Marks *et al.*, 2000).



Gambar 2. 3 Pencernaan lemak (Guyton dan Hall, 2007)

Aktivitas lipase dinyatakan dengan satuan unit (U), dimana satu unit aktivitas lipase setara dengan 1 μmol asam lemak bebas yang dihasilkan dari hidrolisis substrat yang dikatalisis oleh enzim lipase tiap satuan menit. Aktivitas optimum dari enzim lipase dapat diperoleh pada kondisi optimum. Perlu dilakukan pengukuran aktivitas enzimatik pada variasi temperatur dan pH, sehingga akan diketahui aktivitas lipase di setiap rentang temperatur dan pH yang ditentukan (Handayani dan Sulisty, 2005).

2.4 Ekstrak

Ekstrak merupakan sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014).

Menurut Saifudin *et al.* (2011), ekstrak tumbuhan adalah material yang diperoleh dengan cara menyari bahan tumbuhan dengan pelarut tertentu. Terdapat 3 jenis ekstrak, yaitu ekstrak cair yaitu jika hasil ekstraksi masih bisa dituang dan biasanya kadar air lebih dari 30%, ekstrak kental yaitu jika memiliki kadar air antara 5-30%, dan ekstrak kering yaitu jika mengandung kadar air kurang dari 5%.

Untuk mendapatkan ekstrak perlu dilakukan proses ekstraksi. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987).

Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk melakukan ekstraksi menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2000) :

- a. Maserasi, adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu (terus menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.
- b. Perkolasi, adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

- c. Refluks, adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.
- d. Soxhlet, adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
- e. Digesti, adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C.
- f. Infus, adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).
- g. Dekok, adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^\circ\text{C}$) dan temperatur sampai titik didih air.
- h. Destilasi uap, adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

2.5 Tanaman Sirih

2.5.1 Sirih Merah

a. Klasifikasi Sirih Merah

Tanaman sirih merah merupakan tanaman yang termasuk kedalam famili Piperaceae. Menurut Backer (1963) dalam sistematik (taksonomi) sirih merah (*Piper crocatum*) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub kelas : Magnoliidae
Ordo : Piperales
Famili : Piperaceae (suku sirih-sirihan)
Genus : Piper
Spesies : *Piper crocatum*



Gambar 2. 4 Tanaman sirih merah (sumber: www.plantamor.com)

b. Morfologi Sirih Merah

Tanaman sirih merah tumbuh menjalar sama halnya dengan sirih hijau. Batang tanaman berbentuk bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Batangnya bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Di setiap buku tumbuh bakal akar. Daunnya bertangkai berbentuk jantung dengan bagian atas meruncing, tepi rata, serta memiliki permukaan mengkilap atau tidak berbulu. Panjang daun bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak warna putih keabu-abuan. Bagian bawah

daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlendir, rasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih (Sudewo, 2010).

Tanaman sirih merah diketahui tumbuh di berbagai daerah di Indonesia, seperti di lingkungan keraton Yogyakarta dan di lereng Merapi sebelah timur, serta di Papua, Jawa Barat, Aceh dan beberapa daerah lainnya. Tanaman sirih merah tidak dapat tumbuh subur di daerah panas, melainkan dapat tumbuh baik ditempat berhawa dingin. Sirih merah dapat tumbuh baik di tempat yang teduh dan tidak terlalu banyak terkena sinar matahari. Jika terkena sinar matahari langsung pada siang hari secara terus-menerus, maka warna merah daunnya bisa menjadi pudar, buram dan kurang menarik. Batangnya juga akan cepat mengering, tetapi jika disiram secara berlebihan akar dan batang akan cepat membusuk (Sudewo, 2010).

c. Kandungan dan Efek Farmakologi Sirih Merah

Sirih merah merupakan tanaman herba yang secara empiris dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit seperti diabetes mellitus, hepatitis, batu ginjal, menurunkan kolesterol, mencegah stroke, asam urat, hipertensi, radang liver, radang prostat, radang mata, keputihan, maag, kelelahan, nyeri sendi dan memperhalus kulit (Manoi, 2007). Daun sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid, senyawa polifenolat, tanin dan minyak atsiri (Sudewo, 2010). Skrining fitokimia yang dilakukan Hartini *et al* (2013) pada ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. diketahui mengandung minyak atsiri, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid. Menurut Poetra (2015), pemberian ekstrak sirih merah mampu menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida darah tikus Sprague Dawley jantan obesitas dengan dosis 1260 mg/kg bobot badan dan 1890 mg/kg bobot badan dalam waktu 2 minggu. Daun sirih merah mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu quersetin (Parfati dan Windono, 2016) yang dapat menghambat kerja lipase dengan baik (Ruiz *et al*, 2006).

2.5.2 Sirih Hijau

a. Klasifikasi Sirih Hijau

Tanaman sirih hijau diklasifikasikan berdasarkan taksonomi sebagai berikut (Dwivedi dan Tripathi, 2014) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliphyta
Kelas	: Magnolipsida
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper betle</i>



Gambar 2. 5 Tanaman sirih hijau (sumber: www.plantamor.com)

b. Morfologi Sirih Hijau

Sirih hijau termasuk tumbuh-tumbuhan memanjat. Memiliki panjang batang antara 5-15 m. Daun berseling atau tersebar, bertangkai, daun penumpu cepat rontok, dan meninggalkan tanda bekas berbentuk cincin. Helaian daun bulat telur sampai

memanjang, dengan pangkal daun berbentuk jantung, atau pangkal yang miring dan ujung meruncing berukuran 2-20 cm. Bunga berkelamin 1, berumah 1 atau 2. Bulir berdiri sendiri, di ujung dan berhadapan dengan daun. Daun pelindungnya berbentuk lingkaran, bulat telur terbalik atau bulat telur memanjang, Panjang \pm 1 mm. Bulir jantan: tangkai 1,5-3 cm. Benang sari 2, sangat pendek. Bulir betina: tangkai 2,5-6 cm, kepala putih 3-5. Buah buni dengan ujung bebas dan membulat. Bulir masak berambut abu-abu, rapat, tebalnya sekitar 1-1,5 cm. Biji berbentuk lingkaran. Tanaman ini banyak tumbuh liar dalam semak atau banyak ditanam di halaman rumah penduduk (Van Steenis, 2008).

c. Kandungan dan Efek Farmakologi Sirih Hijau

Bagian yang paling sering digunakan pada tanaman sirih adalah daunnya, Daun sirih mengandung minyak atsiri yang terdiri dari betlephenol, kavikol, seskuiterpen, hidoksikavikol, cavibetol, estragol, eugenol dan karvakrol. Daun sirih hijau juga mengandung enzim diastase, gula dan tannin. Daun sirih yang masih muda mengandung diastase, gula dan minyak atsiri yang lebih banyak jika dibandingkan dengan daun sirih yang lebih tua, sedangkan kandungan taninnya relatif sama (Moeljanto dan Mulyono, 2003).

Beberapa manfaat daun sirih dalam pengobatan yaitu diantaranya untuk menghilangkan bau badan, mimisan, membersihkan mata yang gatal atau merah, koreng atau gatal-gatal, dan sebagai obat sariawan. Air rebusan daun sirih juga dipercaya dapat menghilangkan bau mulut jika dikumur-kumur. Khasiat daun sirih lainnya yaitu dapat mengurangi jerawat apabila dibasuh ke muka. Daun sirih yang dimakan dengan pinang dan kapur juga diyakini mampu menguatkan gigi agar tidak mudah tanggal (Muhlisah, 2007).

Daun sirih selain mempunyai kemampuan sebagai antiseptic, mempunyai kekuatan sebagai antioksidasi dan fungisida. Minyak atsiri dan ekstraknya mampu melawan beberapa bakteri gram positif dan gram negatif. Pemanfaatan daun sirih untuk

obat disebabkan minyak atsiri yang dikandungnya. Berdasarkan penelitian, sepertiga dari minyak atsiri tersebut terdiri dari fenol dan sebagian besar adalah kavikol. Kavikol inilah yang memberikan bau khas daun sirih dan memiliki daya pembunuh bakteri lima kali lipat dari fenol biasa (Moeljanto dan Mulyono, 2003).

2.6 Pengujian Aktivitas Antihiperlipidemia

Umumnya ada tiga kategori teknik dalam penelitian yang biasa digunakan untuk pengujian suatu aktivitas senyawa yaitu secara *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo*. Pengujian secara *in vivo* seperti yang dilakukan Thirumalai *et al.* (2014), merupakan pengujian atau percobaan dengan menggunakan hewan coba yang memiliki karakteristik yang relatif serupa dengan manusia, dimana hewan coba sebelumnya diinduksi dengan diet tinggi lemak kemudian diadministrasikan bahan uji pada dosis tertentu selama beberapa waktu tertentu dan diamati paramater hiperlipidemianya seperti kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, HDL dan kolesterol VLDL. Pengujian secara *in vivo* memiliki kekurangan yakni perlunya persetujuan bioetika. Dalam menggunakan hewan percobaan untuk penelitian diperlukan pengetahuan yang cukup dalam hal penanganan dan perawatan karena hewan coba akan mengalami penderitaan bahkan kematian sehingga perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi (Ridwan, 2013).

Uji secara *in silico* merupakan uji atau percobaan yang dilakukan dengan melalui simulasi computer. Uji *in silico* biasa digunakan untuk mengawali penemuan senyawa obat baru dan untuk meningkatkan efisiensi dalam optimasi aktivitas senyawa induknya. Energi interaksi molekul antara reseptor dan ligan ini dilakukan dengan melihat nilai *Rerank Score* pada suatu program. Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan *docking* molekul kandidat senyawa obat dengan reseptor yang dipilih. *Docking* adalah upaya untuk menselaraskan antara ligan yang merupakan molekul kecil ke dalam reseptor yang merupakan molekul protein yang besar, dengan memperhatikan sifat keduanya satu sama lain. Uji secara *in silico* memiliki kelemahan yaitu hanya

dapat memprediksi aktivitasnya karena dilakukan hanya dengan melalui simulasi komputer (Hardjono, 2013).

Pengujian aktivitas secara *in vitro* (dari bahasa Latin yang artinya di dalam kaca) mengacu pada teknik yang dilakukan di lingkungan terkendali di luar organisme hidup. Jenis percobaan ini dapat dilakukan dalam tabung reaksi atau piring kultur sel. Banyak percobaan dalam biologi seluler dilakukan di luar organisme atau sel (Xu dan Khor, 2011). Contoh pengujian antihiperlipidemia secara *in vitro* bisa dilakukan dengan kultur sel seperti yang dilakukan Takahashi *et al.* (2011) yaitu dengan mengevaluasi kadar trigliserida dan kolesterol yang disekresi dari sel hepatoma HepG2. Pengujian dengan cara ini memiliki kelemahan karena membutuhkan keahlian dan konsisi khusus dalam melakukan kultur sel. Cara lain yang dapat digunakan adalah dengan kolorimetri. Kolorimetri adalah suatu teknik pengukuran berdasarkan absorbansi cahaya oleh zat berwarna baik warna yang berasal dari zat itu sendiri maupun warna yang terbentuk akibat reaksi dengan zat lain, sehingga cara ini lebih mudah dilakukan (Khopkar, 1990). Uji *in vitro* lebih sering dilakukan karena waktu yang dibutuhkan relatif lebih singkat, bahan uji yang dibutuhkan lebih sedikit sehingga biaya yang dikeluarkan relatif lebih rendah (Widowati dan Mudahar, 2009).

2.7 Spektrofotometri UV-Visible (UV-Vis)

2.7.1 Prinsip

Spektrofotometri adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu sedangkan fotometer mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi panjang gelombang. Kelebihan spektrofotometer dengan fotometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat lebih di deteksi dan cara ini diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating atau celah optis. Pada fotometer filter dari berbagai warna yang mempunyai

spesifikasi melewati trayek pada panjang gelombang tertentu (Gandjar dan Rohman, 2007). Spektrofotometri UV-Vis adalah alat yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah UV-Vis (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).

Spektrofotometri UV-Vis ini memiliki banyak manfaat untuk penentuan konsentrasi senyawa-senyawa yang dapat menyerap radiasi pada daerah ultraviolet (200 – 400 nm) atau daerah sinar tampak (400 – 800 nm). Analisis ini dapat digunakan yakni dengan penentuan absorbansi dari larutan sampel yang diukur. Prinsip penentuan spektrofotometer UV-Vis adalah aplikasi dari Hukum Lambert-Beer (Tahir, 2008), yaitu:

$$A = -\log T = -\log I_t/I_0 = \epsilon \cdot b \cdot C \dots\dots\dots (2. 1)$$

Dimana : A = Absorbansi dari sampel yang akan diukur

T = Transmittansi

I₀ = Intensitas sinar masuk

I_t = Intensitas sinar yang diteruskan

ε = Koefisien ekstingsi

b = Tebal kuvet yang digunakan

C = Konsentrasi dari sampel

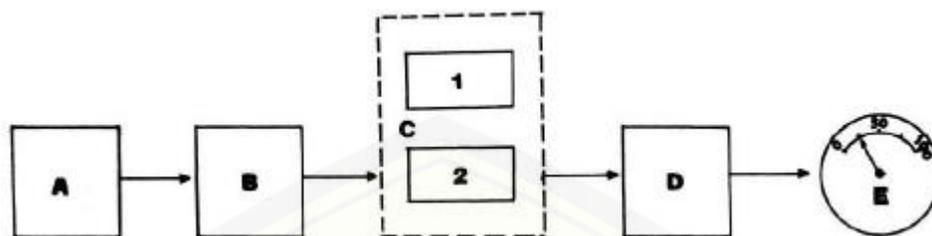
Analisis kualitatif spektrofotometri UV-Vis menghasilkan data berupa panjang gelombang maksimal, intensitas, efek pH dan pelarut yang kesemuanya dapat dibandingkan dengan data yang sudah dipublikasikan sebelumnya. Sedangkan pada analisis kuantitatif dilakukan pengukuran suatu berkas radiasi yang dikenakan pada larutan sampel (cuplikan) yang dikenal dengan Absorban (A) dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan yang dikenal dengan transmittan (%T). Intensitas atau kekuatan radiasi cahaya sebanding dengan jumlah foton melalui satu satuan luas penampang per detik (Gandjar dan Rohman, 2007).

Analisis fisiko-kimia dengan alat ini pada dasarnya mengamati interaksi antara atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang 380 nm – 780 nm merupakan radiasi yang dapat diterima oleh panca indera mata manusia, sehingga dikenal sebagai cahaya tampak (*visibel*), sedangkan di luar rentang panjang gelombang cahaya tampak, REM sudah tidak dapat ditangkap panca indera manusia (Mulja dan Suharman, 1995).

Ada tiga macam distribusi elektron di dalam suatu senyawa organik yaitu orbital elektron pi (π), sigma (σ) dan elektron tidak berpasangan (n). Serapan cahaya oleh molekul pada daerah sinar tampak tergantung pada energi elektronik molekul. Penyerapan sejumlah energi menghasilkan transisi elektron dari orbital dasar ke orbital yang berenergi lebih tinggi dalam keadaan tereksitasi yang lebih dikenal sebagai orbital elektron *antibonding* (Mulja dan Suharman, 1995).

2.7.2 Instrumentasi

Pada umumnya konfigurasi dasar setiap spektrofotometer UV-Vis berupa susunan peralatan optik yang tersusun sedemikian rupa dan memegang fungsi dan peranan masing-masing yang saling terkait fungsi dan peranannya. Setiap fungsi dan peranan tiap bagian dituntut ketelitian dan ketepatan yang optimal, sehingga akan diperoleh hasil pengukuran yang tinggi tingkat ketelitian dan ketepatannya. Instrumentasi Spektrofotometri UV-Vis ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2. 6 Instrumentasi Spektrofotometri UV-Vis (Triyati, 1985)

Keterangan :

A : sumber cahaya

B : monokromator

C : sel absorpsi (tempat larutan)

C1 : blangko

C2 : pelarut

D : detektor

E : meter atau rekorder

Sumber-sumber cahaya berupa lampu deuterium digunakan untuk daerah UV pada panjang gelombang dari 190-350 nm, sementara lampu halogen kuarsa atau lampu tungsten digunakan untuk daerah visibel pada panjang gelombang antara 350-900 nm (Gandjar dan Rohman, 2007).

Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Monokromator pada spektrofotometer UV-Vis biasanya terdiri dari celah (*slit*) masuk-filter-prisma-kisi (*grating*)-celah-keluar. Celah monokromator adalah bagian yang pertama dan terakhir dari suatu sistem optik monokromator pada spektrofotometer UV-Vis. Celah dibuat dari logam yang kedua ujungnya diasah dengan cermat sehingga sama. Lebar celah masuk dan celah keluar harus sama yang dapat diatur dengan memutar tombol mekanik atau diatur dengan sistem elektronik (Mulja dan Suharman, 1995).

Susunan peralatan selanjutnya adalah filter optik yang berfungsi untuk menyerap cahaya berwarna yang sesuai dengan warna filter optik yang dipakai. Adanya filter

optik akan menghasilkan pita cahaya sangat sempit sehingga kepekaan analisisnya lebih tinggi, sehingga akan didapatkan cahaya yang hampir monokromatis sehingga akan mengikuti hukum Lambert-Beer. Prisma dan kisi (*grating*) merupakan bagian monokromator yang terpenting. Pada prinsipnya prisma dan kisi akan mendispersi radiasi elektromagnetik sebesar mungkin supaya didapatkan resolusi yang baik dari radiasi polikromatis. Susunan peralatan spektrofotometri UV-Vis yang terakhir adalah detektor. Kualitas detektor akan menentukan kualitas spektrofotometer UV-Vis. Fungsi detektor adalah mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi sinyal elektronik (Mulja dan Suharman, 1995).

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometer UV-Vis terutama untuk senyawa yang semula tidak berwarna yang akan dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis karena senyawa tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa yang berwarna. Menurut Gandjar dan Rohman (2007), berikut adalah tahap-tahap yang harus diperhatikan:

a. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan, yaitu reaksinya selektif dan sensitif, cepat, kuantitatif, reproduibel, dan hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama.

b. Waktu operasional

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.

Pada saat awal terjadi reaksi absorbansi senyawa yang berwarna ini meningkat sampai waktu tertentu sehingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama waktu

pengukuran maka ada kemungkinan senyawa yang berwarna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warnanya turun. Alasan inilah maka untuk pengukuran senyawa berwarna (hasil suatu reaksi kimia) harus dilakukan pada waktu operasional.

c. Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Memilih panjang gelombang maksimal dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu. Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal, yaitu:

- 1) Pada panjang gelombang maksimal, kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang maksimal tersebut perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar.
- 2) Disekitar panjang gelombang maksimal bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer akan terpenuhi.
- 3) Jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali ketika digunakan panjang gelombang maksimal.

d. Pembuatan kurva baku

Seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dibuat dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). Bila hukum Lambert-Beer terpenuhi, maka kurva baku berupa garis lurus. Kemiringan atau slope α (absorptivitas) atau (absorptivitas molar). Kurva baku sebaiknya sering diperiksa ulang. Penyimpangan dua garis lurus biasanya dapat disebabkan oleh kekuatan ion yang tinggi perubahan suhu dan reaksi ikatan yang terjadi.

e. Pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan

Absorban yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittan. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa kesalahan dalam pembacaan T adalah 0,001 atau 0,5% (kesalahan fotometrik).

2.8 Validasi Metode Analisis

Menurut Harmita (2004), validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduisibel, dan tahan pada kisaran analisis yang akan dianalisis. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi ketika:

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu
- b. Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi
- c. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu
- d. Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analisis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda
- e. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku

(Gandjar dan Rohman, 2007).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis meliputi kecermatan (*accuracy*), keseksamaan (*precision*), selektivitas atau

spesifisitas, linieritas dan rentang, serta batas deteksi dan batas kuantitasi (Harmita, 2004).

2.8.1 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50 – 150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0 – 200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko (Harmita, 2004). Sedangkan menurut Indrayanto dan Yuwono (2003), pengujian linieritas direkomendasikan menggunakan 5-10 konsentrasi standar dengan rentang 80-120%, 25-200% atau 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan.

Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda (Gandjar dan Rohman, 2007). Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $Y = a + bX$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004). Penggunaan nilai r saja sebagai parameter linieritas tidak digunakan lagi karena nilai r tidak mengindikasikan linieritas, sehingga harus ditambah dengan parameter lain seperti nilai standar deviasi (V_{xo}) dan X_p . Persyaratan data linieritas untuk validasi metode bisa diterima jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) lebih besar dari 0,99 atau memiliki nilai koefisien variasi fungsi (V_{xo}) yang lebih kecil dari 5% (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

2.8.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). Penentuan BD dan BK dapat dilakukan dengan menggunakan 5-10 tingkat konsentrasi analit yang relatif rendah (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Menurut ICH (*International Conference on Harmonization*) (1994), penentuan BD dan BK dapat menggunakan 4 cara yaitu :

a. Metode *Sinyal to Noise*

Batas Deteksi adalah konsentrasi yang menghasilkan puncak dengan ketinggian minimal dua atau tiga kali lebih tinggi dari noise.

b. Inspeksi Visual

Batas Deteksi ditentukan oleh analisis sampel yang berisi konsentrasi analit dan batas deteksi merupakan konsentrasi minimum dimana analit masih terdeteksi.

c. Standar Deviasi dari Respon Berdasarkan Standar Deviasi Blangko

Pengukuran besarnya respon latar belakang analisis dilakukan dengan menganalisis blangko dan menghitung standar deviasi dari respon blangko. Selain itu, batas deteksi dan batas kuantitasi juga dapat ditentukan dari rasio standar deviasi respon blangko menggunakan standar deviasi residual dari garis kalibrasi atau standar deviasi intercept (s) dan slope (S) melalui rumus :

$$\text{Batas deteksi} = 3,3 \frac{s}{S} \dots\dots\dots (2. 2)$$

$$\text{Batas kuantitasi} = 10 \frac{s}{S} \dots\dots\dots (2. 3)$$

d. Standar Deviasi dari Respon Berdasarkan Kemiringan Kurva Kalibrasi

Sebuah kurva kalibrasi tertentu dievaluasi dengan menggunakan larutan yang mengandung analit dalam kisaran batas deteksi. Residual standar deviasi dari garis regresi atau standar deviasi dari intersep dari y dapat digunakan sebagai standar

deviasi. Pada pendekatan ini, nilai parameter linieritas seperti r , V_{xo} dan X_p harus terpenuhi terlebih dahulu.

2.8.3 Selektivitas / Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cecair, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. (Harmita, 2004).

ICH membagi spesifisitas dalam 2 kategori, yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, spesifisitas ditunjukkan dengan kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan antar senyawa yang mempunyai struktur molekul yang hampir sama. Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadat, spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah 2 senyawa yang berdekatan. Senyawa-senyawa tersebut biasanya adalah komponen utama atau komponen aktif dan atau suatu pengotor. Jika dalam suatu uji terdapat suatu pengotor (*impurities*) maka metode uji harus tidak terpengaruh dengan adanya pengotor ini (Gandjar dan Rohman, 2007).

Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan. Yang pertama adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain. Cara kedua dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama. Penggunaan detektor UV pada panjang gelombang yang spesifik merupakan cara yang efektif untuk melakukan pengukuran selektivitas. Deteksi analit secara selektif dengan detektor UV dapat ditingkatkan dengan menggunakan teknik derivatisasi dan

dilanjutkan dengan pengukuran pada panjang gelombang tertentu yang spesifik terhadap derivat yang dihasilkan (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.8.4 Presisi

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita, 2004). Menurut ICH (1994), penentuan presisi dapat dilakukan pada 3 kategori yaitu :

a. Repeatabilitas

Repeatabilitas (*Intra-assay precision*) ditunjukkan dengan presisi dibawah kondisi percobaan yang sama meliputi laboratorium, analisis serta peralatan yang dilakukan pada waktu yang singkat. Repeatabilitas dapat dinilai dengan pengukuran minimal 9 kali yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalnya 3 konsentrasi/3 replikasi) atau dapat dinilai dengan suatu pengukuran sebanyak minimal 6 kali pada 100% dari konsentrasi uji.

b. Presisi Antara

Presisi antara (*Intermediate precision*) dilakukan pada hari yang berbeda atau oleh analisis berbeda atau dilakukan dengan peralatan berbeda namun dalam laboratorium yang sama.

c. Reprodusibilitas

Reprodusibilitas merupakan presisi yang dilakukan pada laboratorium berbeda, biasanya untuk menstandarisasi metode (memverifikasi bahwa metode memberikan hasil yang sama dengan menggunakan fasilitas yang berbeda).

Dari ketiga kategori di atas, repeatibilitas dan presisi antara wajib dilakukan (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini bersifat fleksibel tergantung konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan

kondisi laboratorium. Koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita, 2004). Kriteria presisi penerimaan uji presisi ditunjukkan pada tabel di bawah ini.

Analit (%)	Unit	RSD (%)
100	100%	1,3
10	10%	1,9
1	1%	2,7
0,01	0,1%	3,7
0,001	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,0001	10 pmm (mg/kg)	7,3
0,00001	1 ppm (mg/kg)	11
0,000001	100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15
0,0000001	10 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	21
0,00000001	1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	30

Tabel 2. 1 Konsentrasi analit berbanding %RSD (Huber, 2007)

2.8.5 Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

- Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*), yaitu pengukuran sejumlah analit bahan murni yang ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. Penentuan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80%-120% dari kadar analit yang diperkirakan.
- Metode penambahan standar atau pembandingan (*standard addition method*), yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Penambahan analit ditentukan dengan

menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30%-60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{C_F - C_A}{C^*A} \times 100 \dots\dots\dots (2.4)$$

Keterangan :

C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C^*A = konsentrasi analit yang ditambahkan

(Harmita, 2004).

Rentang nilai *mean recovery* yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel 2.2 dibawah ini.

Analit (%)	Unit	Mean Recovery (%)
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0,01	0,1%	95-105
0,001	100 ppm (mg/kg)	90-107
0,0001	10 pmm (mg/kg)	80-110
0,00001	1 ppm (mg/kg)	80-110
0,000001	100 ppb (µg/kg)	80-110
0,0000001	10 ppb (µg/kg)	60-115
0,00000001	1 ppb (µg/kg)	40-120

Tabel 2. 2 Persen perolehan kembali (% *recovery*) analit pada konsentrasi yang berbeda (AOAC, 1998)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan Agustus 2016 sampai November 2017.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), *ultrasonicator* (Elmasonic), oven, kuvet, timbangan analitik digital, blender, batang pengaduk, corong, dan seperangkat alat gelas.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih merah dan sirih hijau, metanol teknis, enzim lipase pankreas (SIGMA L3126), p-nitrofenil butirat (p-NPB) (SIGMA N9876), *Tris(hydroxymethyl)aminomethane* (SIGMA 252859), HCl 1,0 N (Merck), Asetonitril (Merck), orlistat (Sigma), akuades.

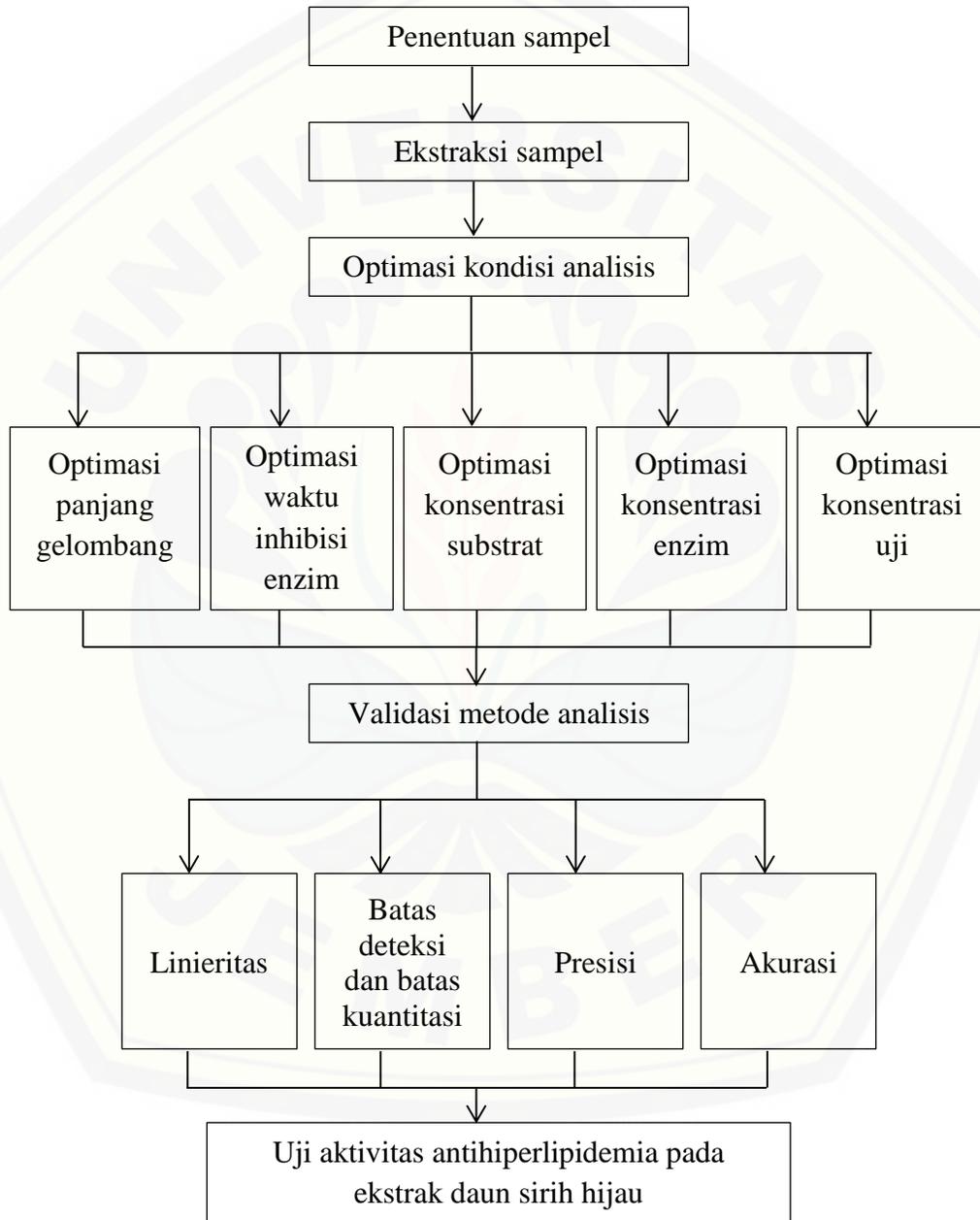
3.4 Rancangan Penelitian

3.4.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode dan uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun tanaman menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu tahap pertama dilakukan optimasi kondisi analisis untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis. Selanjutnya dilakukan validasi metode analisis dengan variabel analisa meliputi linieritas, Batas Deteksi dan Batas

Kuantitasi (BD & BK), presisi, dan akurasi. Setelah metode valid, kemudian dilakukan uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun tanaman secara *in vitro*.

3.4.2 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur penelitian

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Penentuan Sampel

Sampel diperoleh dari ekstrak daun sirih hijau dan sirih merah yang sudah tersedia di laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah diidentifikasi. Tahap awal dalam proses *sampling* adalah melakukan studi pustaka terhadap ekstrak daun yang tersedia dan menentukan ekstrak manakah yang akan digunakan. Penentuan sampel dilakukan berdasarkan tujuan peneliti yaitu memvalidasi metode dan menguji aktivitas antihiperlipidemia secara *in vitro*. Dari hasil studi pustaka dipilih sampel ekstrak daun sirih hijau dan sirih merah dimana ekstrak daun sirih merah digunakan untuk validasi metode dan setelah metode valid, uji aktivitas antihiperlipidemia dilakukan pada ekstrak daun sirih hijau.

3.5.2 Pembuatan Ekstrak

Daun yang telah kering diangin-anginkan, kemudian di oven terlebih dahulu dan dioven selama 10 - 15 menit untuk menghilangkan kelembaban pada daun. Daun yang sudah kering diblender hingga daun menjadi serbuk. Serbuk daun ditimbang sebanyak 80 gram diletakkan di dalam erlenmeyer. Serbuk dibagi menjadi 2 bagian sehingga masing-masing erlenmeyer berisi 40 gram serbuk. Sebanyak 400 ml metanol ditambahkan pada masing-masing erlenmeyer kemudian di ekstraksi dengan ultrasonikator selama 1 jam. Hasil ekstraksi kemudian dimaserasi selama 24 jam. Ekstrak cair yang didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 60 °C untuk menguapkan pelarut dan diperoleh ekstrak kental.

3.5.3 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi optimasi panjang gelombang maksimum, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, waktu inkubasi dan konsentrasi uji.

a. Optimasi panjang gelombang maksimum

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* panjang gelombang pada spektrofotometer UV-Vis. 30 µg enzim lipase konsentrasi 2,5 mg/mL dilarutkan kedalam akuades. Larutan ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit kemudian dilakukan *scanning* panjang gelombang pada spektrofotometer UV-Vis antara 380-800 nm. Spektra yang dihasilkan pada *scanning* ini merupakan spektra sebelum enzim direaksikan dengan substrat. Selanjutnya sebanyak 10 µL substrat *p-nitrophenylbutyrate* (p-NPB) konsentrasi 10 mmol/L ditambahkan kedalam larutan enzim dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit (Dechakhamphu dan Wongchum, 2015). Larutan enzim dan substrat yang telah bereaksi ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 380-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penilaian panjang gelombang maksimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi.

b. Optimasi waktu inhibisi

Optimasi waktu inhibisi dilakukan untuk melihat kecepatan reaksi enzim untuk menghidrolisis substrat apabila diberi inhibitor. Optimasi waktu inhibisi enzim dilakukan dengan mereaksikan enzim dengan inhibitor kemudian diinkubasi selama 15 menit, kemudian ditambahkan substrat dan akuades, diinkubasi pada suhu 37°C dan diukur absorbansinya selama setiap 15 menit selama 60 menit. Penilaian waktu inkubasi optimum dipilih ketika absorbansinya tetap.

c. Optimasi konsentrasi substrat

Optimasi konsentrasi substrat dilakukan untuk mengetahui berapa banyak substrat yang habis bereaksi dengan enzim pada pengujian aktivitas. Optimasi dilakukan dengan mereaksikan enzim 0,025 mg/mL dengan substrat berbagai konsentrasi yaitu 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL, 2,5 mg/mL, 3 mg/mL, 3,5 mg/mL, 4 mg/mL dan 4,5 mg/mL. Enzim diinkubasi kemudian ditambahkan substrat dan akuades. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C, selanjutnya diamati

absorbansinya pada panjang gelombang optimum. Penilaian konsentrasi substrat yang optimum dipilih ketika kurva sudah mencapai *steady state*.

d. Optimasi konsentrasi enzim

Optimasi konsentrasi enzim dilakukan untuk mendapatkan nilai absorbansi hambatan pada rentang 0,2-0,8 pada proses pengujian aktivitas. Pada penelitian ini dilakukan optimasi pada dua konsentrasi enzim yang berbeda yaitu 0,025 mg/mL dan 0,0375 mg/mL. Enzim masing-masing konsentrasi diinkubasi, kemudian ditambahkan substrat dengan konsentrasi dari hasil optimasi dan ditambahkan pula akuades. Larutan diinkubasi pada suhu 37°C sesuai hasil optimasi waktu inkubasi enzim dan substrat, selanjutnya diamati absorbansinya pada panjang gelombang optimum.

e. Optimasi konsentrasi uji

Optimasi konsentrasi uji dilakukan untuk menentukan konsentrasi uji standar orlistat dan sampel ekstrak daun sirih merah. Preparasi larutan standar dan sampel dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu orlistat dan ekstrak daun sirih merah kemudian dilarutkan dalam metanol. Konsentrasi larutan standar yang dibuat adalah 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm dan 1000 ppm. Sedangkan sampel ekstrak dibuat konsentrasi 100 ppm, 500 ppm, 900 ppm, 1300 ppm, 1700 ppm, 2100 ppm dan 2500 ppm.

Enzim dipipet dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi. Masing-masing inhibitor (standar orlistat dan ekstrak daun sirih merah) ditambahkan kedalam larutan enzim, diinkubasi pada suhu 37°C. Larutan yang telah diinkubasi ini kemudian ditambah substrat dan akuades dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang hasil optimasi. Konsentrasi uji optimum dipilih ketika absorbansinya berada diantara 0,2-0,8.

3.5.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis pada uji aktivitas antihiperlipidemia dalam ekstrak daun sirih merah dan sirih hijau dengan spektrofotometri UV-Vis meliputi berbagai parameter yaitu: linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan akurasi.

a. Linieritas

Membuat larutan standar orlistat dalam metanol dengan 8 tingkat konsentrasi dalam rentang 25-200% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Larutan standar dibuat dengan menimbang sejumlah tertentu standar orlistat kemudian dilarutkan dengan metanol, lalu diencerkan sejumlah tertentu sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan. Larutan standar dan sampel dengan berbagai konsentrasi selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi. Larutan yang telah diinkubasi ini kemudian ditambah subtrat dan akuades dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang hasil optimasi. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung %inhibisi dan dilihat nilai parameter linieritas dan rentang dengan program validasi. Nilai parameter yang dihitung adalah r mendekati 0,999, X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil dan V_{X0} antara 0-5% (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

b. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan membuat larutan standar orlistat dalam metanol dengan 8 tingkat konsentrasi dibawah konsentrasi linieritas. Larutan standar dan sampel dengan berbagai konsentrasi selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi. Larutan yang telah diinkubasi ini kemudian ditambah subtrat dan akuades dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang hasil optimasi. Nilai absorbansi yang didapat digunakan untuk menghitung %inhibisi dan dilihat nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dengan program validasi, kemudian ditentukan dilai X_p -nya dimana LOD merupakan nilai X_p dan LOQ adalah 10/3 dari LOD (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

c. Presisi

Parameter presisi yang dilakukan meliputi repeatabilitas dan presisi antara. Uji presisi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kurva baku pada 6 tingkat konsentrasi antara 80%-180% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Kemudian dilakukan preparasi standar dan sampel untuk repeatabilitas dengan menimbang sejumlah standar orlistat dan sampel ekstrak daun sirih merah (3x replikasi) dan dilarutkan dalam metanol. Larutan standar dan sampel dengan berbagai konsentrasi selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi, ditambahkan substrat dan akuades, diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Selanjutnya diamati absorbansinya pada panjang gelombang hasil optimasi.

Prosedur diatas dilakukan sebanyak tiga kali pada dua hari yang berbeda untuk menentukan presisi antara. Hasil yang diperoleh kemudian dihitung %inhibisi, nilai IC_{50} , SD dan RSD dimana nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan (AOAC, 1998).

d. Akurasi

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Pengujian akurasi dilakukan dengan dua tahap yaitu pembuatan sampel adisi dengan penambahan standar sebanyak 30%, 45% dan 60% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi dan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas. Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur, kemudian dilarutkan dengan metanol (tidak sampai tanda batas). Selanjutnya dilakukan adisi dengan larutan standar dengan konsentrasi 30%, 45% dan 60% dari konsentrasi analit yang terkandung dalam sejumlah sampel yang ditimbang. Kemudian ditambahkan metanol sampai tanda dan kocok sampai homogen. Masing-masing sampel adisi dibuat sebanyak 3 replikasi.

Sampel adisi selanjutnya direaksikan dengan enzim dan diinkubasi. Larutan yang telah diinkubasi ini kemudian ditambah substrat dan akuades dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang hasil optimasi. Nilai absorbansi yang didapat ini digunakan untuk menghitung % inhibisi dan IC₅₀. Nilai parameter akurasi ditentukan dengan melihat profil kenaikan nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel akurasi.

3.5.5 Penentuan Aktivitas Antihiperlipidemia

Pengujian aktivitas antihiperlipidemia mengacu pada metode penelitian yang telah dilakukan Dechakhamphu dan Wongchum (2015). Pengujian pada ekstrak daun sirih hijau diawali dengan melakukan preparasi larutan ekstrak yaitu dengan menimbang sejumlah tertentu sampel ekstrak daun sirih hijau (replikasi 3 kali) kemudian dilarutkan dalam metanol. Preparasi enzim lipase dengan konsentrasi 2,5 mg/ml dilakukan dengan melarutkan 25 mg enzim lipase dengan 10 ml dapar Tris-Hcl 1,0 M pH 7,0. Substrat p-NPB konsentrasi 23,9 mmol/L (bobot molekul = 209,20) dibuat dengan menimbang 50 mg p-NPB dan dilarutkan dengan 10 ml Asetonitril.

Pengujian aktivitas antihiperlipidemia dilakukan dengan cara mereaksikan 100 µL larutan ekstrak daun sirih hijau pada berbagai konsentrasi dengan enzim dan diinkubasi pada suhu 37°C. Larutan yang telah diinkubasi ini kemudian ditambah substrat dan akuades dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang hasil optimasi. Aktivitas lipase ditentukan dengan mengukur hidrolisis p-NPB menjadi p-nitrofenol menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang sesuai hasil optimasi. Pengujian dilakukan dengan replikasi 3 kali.

Persentase penghambatan lipase dihitung dengan persamaan 3.1 :

$$I\% = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ uji}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \dots\dots\dots(3. 1)$$

Keterangan:

$I\%$: persentase penghambatan lipase

$A \text{ blanko}$: absorbansi pengujian tanpa sampel uji

$A \text{ uji}$: absorbansi pengujian dengan sampel uji

Setelah didapatkan persentase penghambatan dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier menggunakan persamaan:

$$y = a + bx \dots\dots\dots(3. 2)$$

Keterangan:

x = konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)

y = persentase penghambatan lipase (%)

Aktivitas antihiperlipidemia dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas lipase. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat ditulis beberapa kesimpulan sebagai berikut.

- a. Kondisi optimum uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometer UV-Vis yaitu panjang gelombang 404 nm; konsentrasi enzim 0,025 mg/mL; konsentrasi substrat 3 mg/mL; waktu inhibisi enzim oleh inhibitor 30 menit; konsentrasi uji 26 ppm untuk orlistat dan 120 ppm untuk ekstrak daun sirih merah.
- b. Uji aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak daun sirih merah secara *in vitro* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dapat memberikan hasil analisis yang valid yaitu linier, peka, presis dan akurat.
- c. Ekstrak daun sirih hijau memiliki aktivitas antihiperlipidemia dengan nilai IC_{50} sebesar 202,526 ppm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengembangan metode validasi yang lain seperti ketangguhan metode (ruggedness), kekuatan (robustness) maupun uji SST (System Suitability Test) agar metode ini dapat dilakukan kapanpun, dimanapun dan oleh siapapun.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1998. *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA: Arlington, Virginia.
- Apriliani, F. Y. 2016. Potensi Ekstrak Daun Timo (*Kleinhovia hospita*) sebagai Antioksidan dan Antihiperlipidemia: Metode DPPH dan Penghambatan Lipase *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Backer, C. A. 1963. *Flora of Java*. Groningen: N.V.P.Noordhoff.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). 2012. *Penerapan Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik*. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.03.1.33.12.12.8195 Tahun 2012. Jakarta: BPOM.
- Basset, J. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Birari, R. B., dan K. K. Bhutani. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug discovery today*. 12(19): 879-889.
- Bustanji, Y., M. Mohammad, M. Hudaib, K. Tawaha, I. M. Al-Masri, H. S. Alkhatib, A. Issa, dan F. Q. Alali. 2011. Screening of some medicinal plants for their pancreatic lipase inhibitory potential. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(2): 81-88.
- Carolina, N., dan U. M. Ghaisani. 2016. *Psidium guajava* sebagai antihipertensi dan antihiperlipidemia: efek pada penurunan tekanan darah dan pengontrol profil lipid. *Medical Journal of Lampung University [MAJORITY]*. 5(1): 134-139.
- Dechakhamphu, A., dan N. Wongchum. 2015. Screening for anti-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(12): 1042-1045.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi keempat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Farmakope Indonesia*. Edisi kelima. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Dipiro, J. T., R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells, dan L. M. Posey. 2008. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. Seventh Edition. United States of America: The McGraw-Hill Companies.
- Fitriyani, A. 2009. Uji *In Vitro* Ekstrak Air dan Etanol dari Buah Asam Gelugur, Pimpang Lengkuas, dan Kencur sebagai Inhibitor Aktivitas Lipase Pankreas. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Gandjar, I. G., dan A. Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gunawan, S. G. 2012. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi kelima. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Guyton, A. C., dan J. E. Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Handayani, R., dan J. Sulistyono. 2005. Transesterifikasi ester asam lemak melalui pemanfaatan teknologi lipase. *Biodiversitas*. 6: 164-167.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung : ITB Bandung.
- Hardjono, S. 2013. Sintesis dan uji Aktivitas antikanker senyawa 1-(2-klorobenzoiloksi) urea dan 1-(4-klorobenzoiloksi) urea. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*. 2(1): 16-20.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 117-135.
- Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Hartini, Y. S., S. Wahyuono, S. Widyarini, dan A. Yuswanto. 2013. Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 11(2): 108-115.
- Hidayat, M., S. Soeng, dan S. Prahastuti. 2014. Pengujian aktivitas inhibitor lipase ekstrak etanol dan hasil fraksinasi dari kedelai detam 1 dan daun jati belanda. *Chimica et Natura Acta*. 2(1): 76-82.
- ICH (*International Conference on Harmonisation*). 1994. *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)*. European Union, Japan,USA: ICH Expert Working Group.

- Indrayanto, G., dan M. Yuwono. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- Itoh, M., Y. Abe, Y. Iwama, F. Kimura, M. Satoh, M. Shoji, ... dan K. Hata. 2009. HPLC analysis of lipoproteins in culture medium of hepatoma cells: an in vitro system for screening antihyperlipidemic drugs. *Biotechnology letters*. 31(7): 953-957.
- Kamsu, S., Purwastyastuti, Y. S. P. Rumawas, dan W. Lukito. 2005. Nutritional status of hyperlipidemics elderly in Indonesia according to body mass Index (study in four Indonesian big cities). *Medical Journal of Indonesia*. 14(2): 97-100.
- Katzung, B. G. 2002. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Penerbit Salemba Medika.
- Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI
- Khopkar, S.M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Klibanov, A. M. 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in biochemical sciences*. 14(4): 141-144.
- Lamb, R. G., S. D. Wyrick, dan C. Piantadosi. 1977. Hypolipidemic activity of in vitro inhibitors of hepatic and intestinal sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase and phosphatidate phosphohydrolase. *Atherosclerosis*. 27(2): 147-154.
- Lunagariya, N. A., N. K. Patel, S. C. Jagtap, dan K. K. Bhutani. 2014. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI J*. 13: 897-921.
- Manoi, F. 2007. Sirih Merah sebagai Tanaman Obat Multi Fungsi. *Warta Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*. 13(2): 17-19.
- Mardiana, L. 2012. *Daun Ajaib Tumpas Penyakit*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Marks, D. B., A. D. Marks, dan C. M. Smith. 2000. *Biokomia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Moeljanto, R. D. dan Mulyono. 2003. *Khasiat dan Manfaat Daun Sirih: Obat Mujarab dari Masa ke Masa*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Muhlisah, F. 2007. *Tanamn Obat Keluarga (TOGA)*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Mulja, M., dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.

- National Cholesterol Education Program. 2002. *Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*. National Institutes of Health.
- Nawari. 2010. *Analisis Regresi dengan MS Excel 2007 dan SPSS 17*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.
- Parfati, N., dan Windono, T. 2017. Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Kajian Pustaka Aspek Botani, Kandungan Kimia, dan Aktivitas Farmakologi. *Media Pharmaceutica Indonesiana (MPI)*. 1(2): 106-115.
- Poetra, G. T. 2015. Kadar Biomarker Darah Tikus Obesitas yang Diberi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*). Skripsi. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Ramachandran, V., R. Saravanan, dan P. Senthilraja. 2013. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of asiatic acid in diabetic rats, role of HMG CoA: in vivo and in silico approaches. *Phytomedicine*. 21(3): 225-232.
- Ridwan, E. 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *J Indon Med Assoc*. 63(3): 112-116.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Ruiz, C., S. Falcocchio, E. Xoxi, L. Villo, G. Nicolosi, F. I. J. Pastor, P. Diaz, dan L. Saso. 2006. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 40(3): 138-143.
- Saifudin A., V. Rahayu, dan H. Y. Teruna. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Santoso, A. 2001. Down regulation of mammary lipoprotein lipase activity by ribonucleid acid and protein synthesis inhibitors. *Anales Bogorienses*. 8: 31-36.
- Sudewo, B. 2010. *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Supriyatyna, R. M. Febriyanti, Dewanto, I. Wijaya, dan F. Ferdiansyah. 2015. *Fitoterapi Sistem Organ: Pandangan Dunia Barat terhadap Obat Herbal Global*. Yogyakarta: Deepublish.
- Syamsudin. 2011. *Buku Ajar: Farmakoterapi kardiovaskular dan renal*. Jakarta: Salemba Medika

- Tahir, I. 2008. *Arti Penting Kalibrasi pada Proses Pengukuran Analitik: Aplikasi pada Penggunaan pHmeter dan Spektrofotometer UV-VIS*. Yogyakarta: Laboratorium Kimia Dasar UGM.
- Takahashi, J., G. Toshima, Y. Matsumoto, F. Kimura, T. Kiuchi, K. Hamada, dan K. Hata. 2011. In vitro screening for antihyperlipidemic activities in foodstuffs by evaluating lipoprotein profiles secreted from human hepatoma cells. *Journal of natural medicines*. 65(3-4): 670-674.
- Tao, L. 2014. *Sinopsis Organ System Kardiovaskular: Pendekatan dengan Sistem Terpadu dan Disertai Kumpulan Kasus Klinik*. Tangerang: Karisma Publishing Group.
- Thirumalai, T., N. Tamilselvan, dan E. David. 2014. Hypolipidemic activity of Piper betel in high fat diet induced hyperlipidemic rat. *Journal of Acute Disease*. 3(2): 131-135.
- Triyati, E. 1985. Spektrofotometer ultra violet dan sinar tampak serta aplikasinya dalam oseanologi. *Jurnal Oseana*. 10(1): 39-47.
- Van Steenis, C. G. G. J. 2008. *Flora*. Jakarta: Pradnya Paramita.
- Widowati, L., dan H. Mudahar. 2009. Uji aktivitas ekstrak etanol 50% umbi keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) BI) terhadap sel kanker payudara mcf-7 *in vitro*. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 19(1): 9-14.
- Winarno, F. G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Xu, J. L., dan K. A. Khor. 2011. Plasma spraying for thermal barrier coatings: processes and applications. *Thermal Barrier Coatings, Woodhead Pub Limited, Cambridge*. 99-111.
- Yunarto, N., B. Elya, dan L. Konadi. 2015. Potensi fraksi etil asetat ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) sebagai antihiperlipidemia. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 5(1): 1-10.

LAMPIRAN

Lampiran A. Perhitungan Penyiapan Bahan-bahan

1. Larutan Dapar Tris HCl 1,0 M pH 7,0

a) Massa *Tris(hydroxymethyl)aminomethane* 1,0 M

$$\text{Rumus : } M = \frac{\text{Massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{V}$$

$$g = \frac{\text{Massa} \times \text{BM} \times V}{1000}$$

$$g = \frac{1,0 \times 121,14 \times 500}{1000} = 60,57 \text{ g dalam 500 mL akuades.}$$

2. Larutan Enzim Lipase

$$\frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 2,5 \text{ mg/mL (ditimbang 25 mg enzim, dilarutkan dalam dapar 10 mL)}$$

3. Larutan Substrat p-NPB

$$\frac{50 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 5 \text{ mg/mL}$$

$$\text{mmol} = \frac{\text{massa}}{Mr} = \frac{50}{209,20} = 0,239 \text{ mmol}$$

$$\text{mM} = \frac{\text{mmol}}{L}$$

$$= \frac{0,239}{0,01} = 23,9 \text{ mM}$$

4. Larutan Standar Orlistat

Larutan induk standar orlistat 500 ppm

$$\text{Induk : } \frac{5 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 500 \text{ ppm (5 mg orlistat dilarutkan dalam 10 mL metanol)}$$

Pengenceran :

$$1. \frac{75 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 37,5 \text{ ppm}$$

$$2. \frac{150 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 75 \text{ ppm}$$

$$3. \frac{225 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 112,5 \text{ ppm}$$

$$4. \frac{300 \mu\text{L}}{1000 \text{ mL}} \times 500 \text{ ppm} = 150 \text{ ppm}$$

$$5. \frac{375 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 187,5 \text{ ppm}$$

$$6. \frac{450 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 225 \text{ ppm}$$

$$7. \frac{525 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 262,5 \text{ ppm}$$

$$8. \frac{600 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} \times 500 \text{ ppm} = 300 \text{ ppm}$$

5. Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah

Ekstrak 2500 ppm

$$\text{Induk : } \frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 2500 \text{ ppm (25 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL metanol)}$$

Pengenceran :

$$1. \frac{90 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 225 \text{ ppm}$$

$$2. \frac{180 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 450 \text{ ppm}$$

$$3. \frac{270 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 675 \text{ ppm}$$

$$4. \frac{360 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 900 \text{ ppm}$$

$$5. \frac{450 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 1125 \text{ ppm}$$

$$6. \frac{540 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 1350 \text{ ppm}$$

$$7. \frac{630 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 1575 \text{ ppm}$$

$$8. \frac{720 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 1800 \text{ ppm}$$

6. Larutan Ekstrak Daun Sirih Hijau

Ekstrak 2500 ppm

$$\text{Induk : } \frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 2500 \text{ ppm (25 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL metanol)}$$

Pengenceran :

$$1. \frac{30 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 75 \text{ ppm}$$

$$2. \frac{150 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 375 \text{ ppm}$$

$$3. \frac{300 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 750 \text{ ppm}$$

$$4. \frac{450 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 1125 \text{ ppm}$$

$$5. \frac{600 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 1500 \text{ ppm}$$

$$6. \frac{750 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 1875 \text{ ppm}$$

$$7. \frac{900 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2500 \text{ ppm} = 2250 \text{ ppm}$$

Lampiran B. Data Optimasi

1. Panjang Gelombang

480.0	0.284	459.5	0.273	459.0	0.281	458.5	0.289
458.0	0.298	457.5	0.306	457.0	0.314	456.5	0.323
456.0	0.332	455.5	0.341	455.0	0.352	454.5	0.362
454.0	0.373	453.5	0.384	453.0	0.395	452.5	0.406
452.0	0.413	451.5	0.431	451.0	0.445	450.5	0.457
450.0	0.468	449.5	0.480	449.0	0.493	448.5	0.507
448.0	0.523	447.5	0.539	447.0	0.555	446.5	0.570
446.0	0.536	445.5	0.602	445.0	0.612	444.5	0.635
444.0	0.652	443.5	0.669	443.0	0.686	442.5	0.704
442.0	0.722	441.5	0.741	441.0	0.759	440.5	0.778
440.0	0.799	439.5	0.821	439.0	0.843	438.5	0.865
438.0	0.886	437.5	0.907	437.0	0.927	436.5	0.947
436.0	0.967	435.5	0.988	435.0	1.010	434.5	1.033
434.0	1.054	433.5	1.075	433.0	1.096	432.5	1.117
432.0	1.139	431.5	1.161	431.0	1.182	430.5	1.202
430.0	1.222	429.5	1.243	429.0	1.263	428.5	1.283
428.0	1.305	427.5	1.325	427.0	1.346	426.5	1.365
426.0	1.384	425.5	1.402	425.0	1.420	424.5	1.438
424.0	1.454	423.5	1.471	423.0	1.489	422.5	1.503
422.0	1.517	421.5	1.532	421.0	1.547	420.5	1.561
420.0	1.575	419.5	1.590	419.0	1.604	418.5	1.616
418.0	1.627	417.5	1.636	417.0	1.648	416.5	1.656
416.0	1.664	415.5	1.672	415.0	1.680	414.5	1.689
414.0	1.697	413.5	1.702	413.0	1.706	412.5	1.712
412.0	1.717	411.5	1.721	411.0	1.726	410.5	1.728
410.0	1.733	409.5	1.736	409.0	1.738	408.5	1.740
408.0	1.745	407.5	1.745	407.0	1.748	406.5	1.748
406.0	1.748	405.5	1.750	405.0	1.750	404.5	1.750
404.0	1.753	403.5	1.753	403.0	1.753	402.5	1.753
402.0	1.750	401.5	1.750	401.0	1.750	400.5	1.748
400.0	1.745	399.5	1.743	399.0	1.740	398.5	1.738
398.0	1.738	397.5	1.736	397.0	1.731	396.5	1.728
396.0	1.726	395.5	1.724	395.0	1.721	394.5	1.717
394.0	1.712	393.5	1.708	393.0	1.704	392.5	1.702
392.0	1.699	391.5	1.695	391.0	1.691	390.5	1.686
390.0	1.684	389.5	1.680	389.0	1.674	388.5	1.668
388.0	1.662	387.5	1.660	387.0	1.654	386.5	1.650
386.0	1.646	385.5	1.640	385.0	1.635	384.5	1.629
384.0	1.625	383.5	1.618	383.0	1.613	382.5	1.609
382.0	1.602	381.5	1.595	381.0	1.590	380.5	1.585
380.0	1.635	379.5	1.762	379.0	1.848	378.5	1.845
378.0	1.839	377.5	1.836	377.0	1.833	376.5	1.827
376.0	1.824	375.5	1.827	375.0	1.827	374.5	1.824
374.0	1.818	373.5	1.816	373.0	1.821	372.5	1.821
372.0	1.818	371.5	1.813	371.0	1.810	370.5	1.810
370.0	1.813	369.5	1.813	369.0	1.810	368.5	1.810
368.0	1.813	367.5	1.816	367.0	1.818	366.5	1.818
366.0	1.818	365.5	1.821	365.0	1.827	364.5	1.830
364.0	1.830	363.5	1.830	363.0	1.833	362.5	1.839
362.0	1.842	361.5	1.848	361.0	1.854	360.5	1.857
360.0	1.863	359.5	1.867	359.0	1.873	358.5	1.876
358.0	1.893	357.5	1.886	357.0	1.893	356.5	1.896
356.0	1.899	355.5	1.899	355.0	1.903	354.5	1.917
354.0	1.917	353.5	1.910	353.0	1.910	352.5	1.917
352.0	1.925	351.5	1.932	351.0	1.938	350.5	1.936
350.0	1.943	349.5	1.955	349.0	1.967	348.5	1.967
348.0	1.967	347.5	1.967	347.0	1.958	346.5	1.953
346.0	1.975	345.5	1.975	345.0	1.958	344.5	1.947
344.0	1.963	343.5	1.963	343.0	1.955	342.5	1.943
342.0	1.947	341.5	1.963	341.0	1.963	340.5	1.955
340.0	1.991	339.5	2.097	339.0	2.161	338.5	2.161
338.0	2.161	337.5	2.161	337.0	2.161	336.5	2.161
336.0	2.161	335.5	2.155	335.0	2.155	334.5	2.174
334.0	2.194	333.5	2.168	333.0	2.149	332.5	2.149
332.0	2.143	331.5	2.143	331.0	2.155	330.5	2.194
330.0	2.187	329.5	2.149	329.0	2.125	328.5	2.125
328.0	2.137	327.5	2.174	327.0	2.168	326.5	2.149
326.0	2.143	325.5	2.143	325.0	2.137	324.5	2.131
324.0	2.149	323.5	2.168	323.0	2.161	322.5	2.137
322.0	2.114	321.5	2.131	321.0	2.143	320.5	2.137
320.0	2.131	319.5	2.097	319.0	2.071	318.5	2.081
318.0	2.092	317.5	2.081	317.0	2.071	316.5	2.060
316.0	2.051	315.5	2.018	315.0	1.987	314.5	1.995
314.0	2.000	313.5	1.987	313.0	1.975	312.5	1.958
312.0	1.943	311.5	1.928	311.0	1.910	310.5	1.893
310.0	1.876	309.5	1.860	309.0	1.867	308.5	1.893
308.0	1.870	307.5	1.802	307.0	1.783	306.5	1.810
306.0	1.810	305.5	1.786	305.0	1.762	304.5	1.736
304.0	1.708	303.5	1.682	303.0	1.654	302.5	1.627
302.0	1.599	301.5	1.567	301.0	1.535	300.5	1.499
300.0	1.493	299.5	1.517	299.0	1.509	298.5	1.467
298.0	1.425	297.5	1.360	297.0	1.334	296.5	1.287
296.0	1.297	295.5	1.226	295.0	1.199	294.5	1.132
294.0	1.083	293.5	1.000	293.0	0.986	292.5	0.892

2. Waktu Inkubasi

a. Optimasi waktu inkubasi enzim

t (menit)	Absorbansi
0	0,052
5	0,177
10	0,238
15	0,274
20	0,279
25	0,279
30	0,298
35	0,296
40	0,299
45	0,282
50	0,288
55	0,296
60	0,297

b. Optimasi waktu inkubasi enzim dan substrat

t (menit)	Absorbansi
0	0,109
15	0,555
30	0,875
45	0,913
60	0,959

3. Optimasi Konsentrasi Substrat

Substrat (mg/mL)	Absorbansi
0,5	0,137
1	0,338
1,5	0,484
2	0,653
2,5	1,52
3	1,631
3,5	1,689
4	1,699
4,5	1,699

4. Konsentrasi Enzim

Enzim dengan konsentrasi 0,025 mg/mL

Substrat (mg/mL)	Absorbansi
0,5	0,137
1	0,338
1,5	0,484
2	0,653
2,5	1,52
3	1,631
3,5	1,689
4	1,699
4,5	1,699

Enzim dengan konsentrasi 0,0375 mg/mL

Substrat (mg/mL)	Absorbansi
0,5	0,135
1	0,278
1,5	0,402
2	0,517
2,5	0,710
3	0,957
3,5	1,064
4	1,171
4,5	1,346

5. Optimasi Konsentrasi Uji

a. Standar Orlistat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi blanko	Absorbansi Uji		
		R1	R2	R3
6,67	0,847	0,523	0,566	0,531
13,33	0,847	0,499	0,544	0,496
26,67	0,847	0,426	0,474	0,432
53,33	0,847	0,329	0,339	0,322
80	0,847	0,336	0,331	0,322
106,67	0,847	0,337	0,328	0,340
133,33	0,847	0,325	0,331	0,336

b. Ekstrak daun sirih merah

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi blanko	Absorbansi Uji		
		R1	R2	R3
13,33	0,863	0,660	0,679	0,654
66,67	0,863	0,541	0,557	0,555
120	0,863	0,419	0,401	0,404
173,33	0,863	0,252	0,310	0,279
226,67	0,863	0,157	0,151	0,180
280	0,863	0,009	0,010	-0,008
333,33	0,863	-0,073	-0,061	-0,070

Lampiran C. Data Validasi

1. Linieritas

a. Linieritas Standar Orlistat

Konsentrasi (ppm)	Abs Uji			Abs Blanko	%Inhibisi		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3		Rep 1	Rep 2	Rep 3
5	0,678	0,674	0,687	0,804	15,672	16,169	14,552
10	0,629	0,621	0,632	0,804	21,766	22,761	21,393
15	0,570	0,552	0,583	0,804	29,104	31,343	27,488
20	0,479	0,494	0,483	0,804	40,423	38,557	39,925
25	0,429	0,443	0,438	0,804	46,642	44,901	45,522
30	0,387	0,392	0,378	0,804	51,866	51,244	52,985
35	0,340	0,348	0,330	0,804	57,711	56,716	58,955
40	0,286	0,303	0,275	0,804	64,428	62,313	65,796

b. Linieritas Ekstrak Daun Sirih Merah

Konsentrasi (ppm)	Abs Uji			Abs Blanko	%Inhibisi		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3		Rep 1	Rep 2	Rep 3
30	0,608	0,642	0,618	0,817	25,581	21,420	24,357
60	0,558	0,583	0,574	0,817	31,701	28,641	29,743
90	0,502	0,495	0,509	0,817	38,556	39,412	37,699
120	0,394	0,407	0,384	0,817	51,775	50,184	52,999
150	0,297	0,305	0,300	0,817	63,647	62,668	63,280
180	0,248	0,235	0,240	0,817	69,645	71,236	70,624
210	0,138	0,125	0,132	0,817	83,109	84,700	83,843
240	0,073	0,084	0,079	0,817	91,065	89,718	90,330

2. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

a. BD dan BK Standar Orlistat

```

Method          : DL - QL
Number of data  : 8
DL value        : 4,90966400
QL value        : 14,72899000
  
```

b. BD dan BK Ekstrak Daun Sirih Merah

```

Method      : DL - QL
Number of data : 8
DL value    : 28,54647000
QL value    : 85,63942000

```

3. Akurasi

Adisi	Kons (ppm)	Absorbansi Uji			Absorbansi blanko	% Inhibisi		
		R1	R2	R3		R1	R2	R3
30%	30	0,475	0,476	0,485	0,817	41,860	41,738	40,636
	60	0,444	0,438	0,447	0,817	45,654	46,389	45,288
	90	0,399	0,389	0,400	0,817	51,163	52,387	51,040
	120	0,331	0,337	0,326	0,817	59,486	58,752	60,098
	150	0,276	0,275	0,270	0,817	66,218	66,340	66,952
	180	0,230	0,231	0,217	0,817	71,848	71,726	73,439
	210	0,173	0,176	0,167	0,817	78,825	78,458	79,559
	240	0,114	0,106	0,099	0,817	86,047	87,026	87,883
45%	30	0,436	0,444	0,449	0,817	46,634	45,655	45,043
	60	0,393	0,403	0,414	0,817	51,897	50,673	49,327
	90	0,355	0,360	0,368	0,817	56,548	55,936	54,957
	120	0,287	0,302	0,308	0,817	64,871	63,036	62,301
	150	0,207	0,231	0,214	0,817	74,663	71,726	73,399
	180	0,174	0,183	0,185	0,817	78,703	77,601	77,356
	210	0,100	0,109	0,111	0,817	87,760	86,659	86,414
	240	0,030	0,030	0,039	0,817	96,328	96,328	95,226
60%	30	0,426	0,428	0,421	0,817	47,858	47,613	48,470
	60	0,383	0,392	0,383	0,817	53,121	52,020	53,121
	90	0,334	0,344	0,347	0,817	59,119	57,895	57,528
	120	0,271	0,278	0,285	0,817	66,830	65,973	65,116
	150	0,190	0,200	0,213	0,817	76,744	75,520	73,929
	180	0,144	0,159	0,170	0,817	82,375	80,539	79,192
	210	0,112	0,118	0,130	0,817	86,291	85,557	84,088
	240	0,029	0,037	0,052	0,817	96,450	95,471	93,635

Perhitungan sampel uji akurasi dengan metode standar adisi dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Nilai IC_{50} ekstrak daun sirih merah adalah 117,273 ppm (rata-rata nilai IC_{50} dari hasil uji presisi hari ke-1), sedangkan nilai IC_{50} standar orlistat adalah 31,024 ppm. Maka :

$$117,273 \text{ ppm ekstrak daun sirih merah} = 31,024 \text{ ppm standar orlistat}$$

Pembuatan larutan induk ekstrak daun sirih merah 2500 ppm :

$$\frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 2500 \text{ ppm}$$

1. Adisi 30%

$$\frac{30}{100} \times 2500 \text{ ppm} = 750 \text{ ppm ekstrak daun sirih merah}$$

Maka konsentrasi standar orlistat yang dibutuhkan :

$$\frac{750 \text{ ppm}}{117,273 \text{ ppm}} \times 31,024 \text{ ppm} = 198,409 \text{ ppm standar orlistat}$$

Standar orlistat yang ditimbang :

$$198,409 \text{ ppm} = \frac{x}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm}$$

$$x = 1,984 \text{ mg}$$

Cara kerja :

- a) Menimbang 25 mg ekstrak daun sirih merah, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 10 mL
- b) Menimbang 1,984 mg standar orlistat, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berisi larutan ekstrak daun sirih merah, sehingga telah dilakukan adisi 30% ke dalam sampel ekstrak.
- c) Menambahkan metanol sampai tanda batas.
- d) Mengencerkan sampai konsentrasi ekstrak 225 ppm, 450 ppm, 675 ppm, 900 ppm, 1125 ppm, 1350 ppm, 1575 ppm, 1800 ppm.

2. Adisi 45%

$$\frac{45}{100} \times 2500 \text{ ppm} = 1125 \text{ ppm ekstrak daun sirih merah}$$

Maka konsentrasi standar orlistat yang dibutuhkan :

$$\frac{1125 \text{ ppm}}{117,273 \text{ ppm}} \times 31,024 \text{ ppm} = 297,613 \text{ ppm standar orlistat}$$

Standar orlistat yang ditimbang :

$$297,613 \text{ ppm} = \frac{x}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm}$$

$$x = 2,976 \text{ mg}$$

Cara kerja :

- a) Menimbang 25 mg ekstrak daun sirih merah, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 10 mL
- b) Menimbang 2,976 mg standar orlistat, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berisi larutan ekstrak daun sirih merah, sehingga telah dilakukan adisi 45% ke dalam sampel ekstrak.
- c) Menambahkan metanol sampai tanda batas.
- d) Mengencerkan sampai konsentrasi ekstrak 225 ppm, 450 ppm, 675 ppm, 900 ppm, 1125 ppm, 1350 ppm, 1575 ppm, 1800 ppm.

3. Adisi 60%

$$\frac{60}{100} \times 2500 \text{ ppm} = 1500 \text{ ppm ekstrak daun sirih merah}$$

Maka konsentrasi standar orlistat yang dibutuhkan :

$$\frac{1500 \text{ ppm}}{117,273 \text{ ppm}} \times 31,024 \text{ ppm} = 396,818 \text{ ppm standar orlistat}$$

Standar orlistat yang ditimbang :

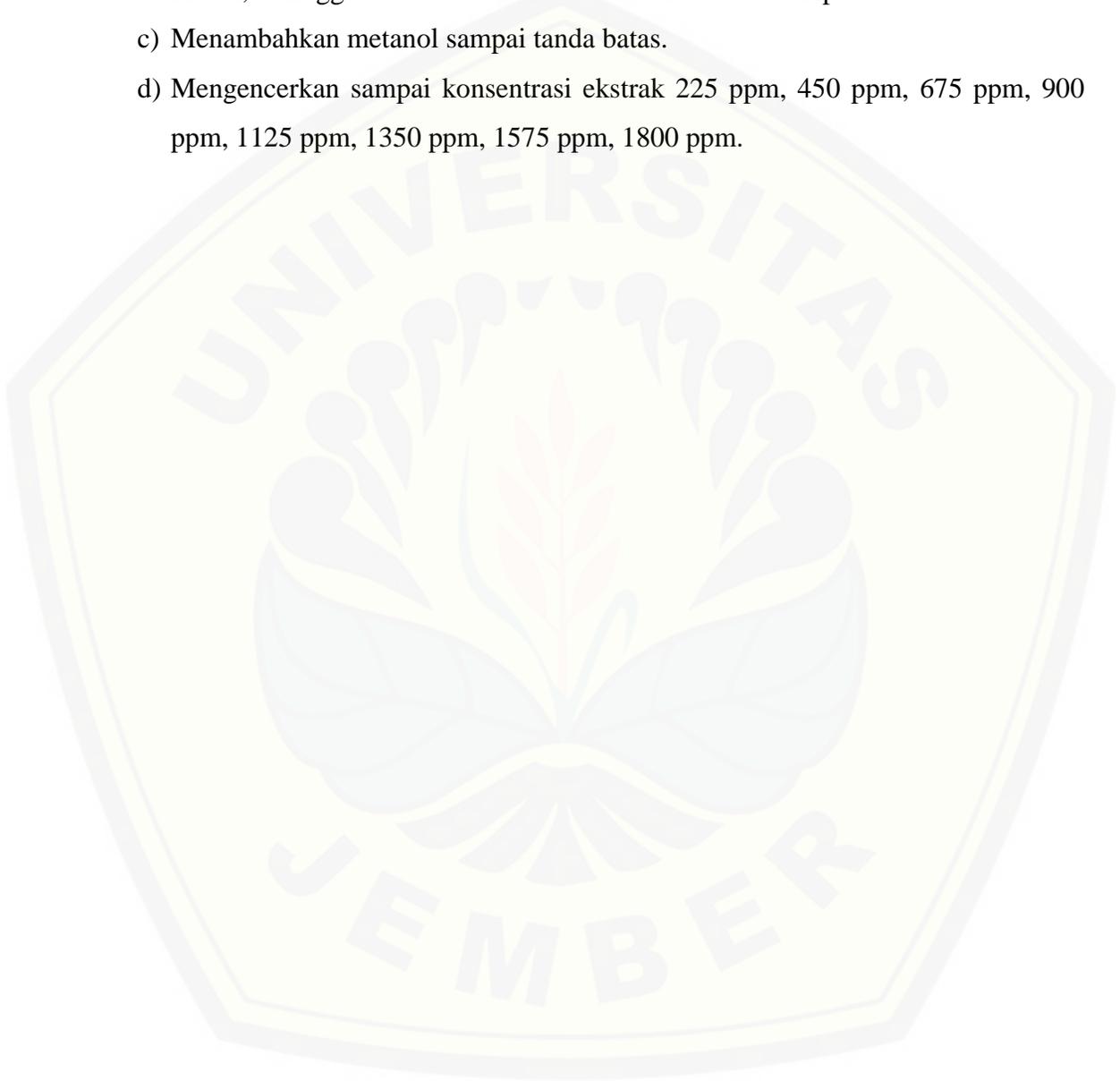
$$396,818 \text{ ppm} = \frac{x}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm}$$

$$x = 3,968 \text{ mg}$$

Cara kerja :

- a) Menimbang 25 mg ekstrak daun sirih merah, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 10 mL

- b) Menimbang 3,968 mg standar orlistat, melarutkan dengan metanol kemudian memasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berisi larutan ekstrak daun sirih merah, sehingga telah dilakukan adisi 60% ke dalam sampel ekstrak.
- c) Menambahkan metanol sampai tanda batas.
- d) Mengencerkan sampai konsentrasi ekstrak 225 ppm, 450 ppm, 675 ppm, 900 ppm, 1125 ppm, 1350 ppm, 1575 ppm, 1800 ppm.



Lampiran D. Uji Aktivitas pada Daun Sirih Hijau

Kons (ppm)	Absorbansi Uji			Absorbansi blanko	%Inhibisi			IC ₅₀
	R1	R2	R3		R1	R2	R3	
10	0,476	0,472	0,488	0,682	30,205	30,791	28,446	
50	0,439	0,440	0,450	0,682	35,631	35,484	34,044	
100	0,413	0,414	0,422	0,682	39,443	39,296	38,123	
150	0,385	0,383	0,378	0,682	43,548	43,842	44,575	202,526
200	0,355	0,347	0,345	0,682	47,947	49,120	49,413	
250	0,317	0,306	0,315	0,682	53,519	55,132	53,812	
300	0,270	0,261	0,253	0,682	60,411	61,730	62,903	

Contoh perhitungan IC₅₀ :

1. Menghitung %inhibisi

%inhibisi diperoleh dengan rumus :

$$\%inhibisi = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ uji}}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

A blanko = absorbansi enzim dan substrat tanpa inhibitor

A uji = absorbansi enzim, inhibitor dan substrat

$$\%inhibisi (1) = \frac{0,682 - 0,476}{0,682} \times 100\%$$

$$= 30,205\%$$

$$\%inhibisi (2) = \frac{0,682 - 0,439}{0,682} \times 100\%$$

$$= 35,631\%$$

$$\%inhibisi (3) = \frac{0,682 - 0,413}{0,682} \times 100\%$$

$$= 39,443\%$$

$$\% \text{inhibisi (4)} = \frac{0,682 - 0,385}{0,682} \times 100\%$$

$$= 43,548\%$$

$$\% \text{inhibisi (5)} = \frac{0,682 - 0,355}{0,682} \times 100\%$$

$$= 47,947\%$$

$$\% \text{inhibisi (6)} = \frac{0,682 - 0,317}{0,682} \times 100\%$$

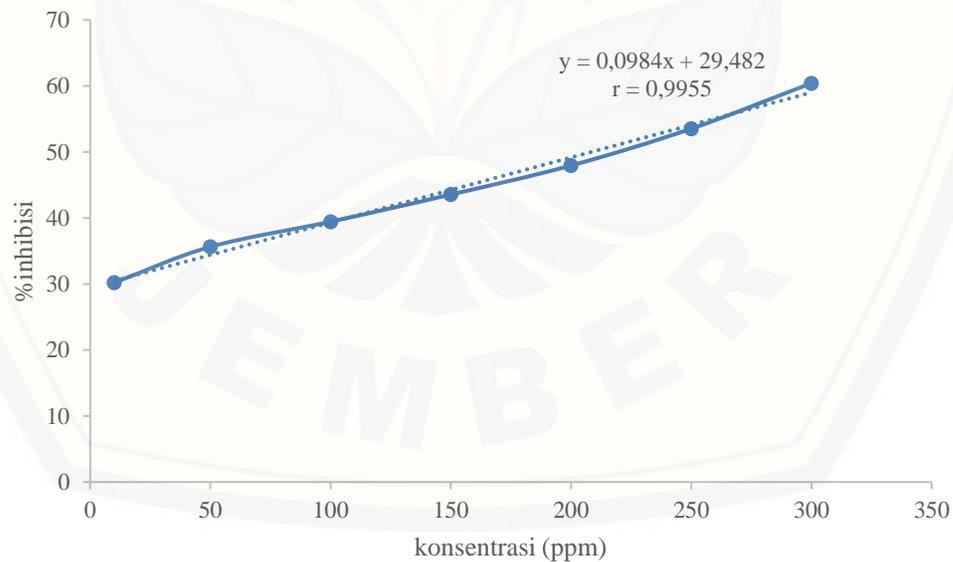
$$= 53,519\%$$

$$\% \text{inhibisi (7)} = \frac{0,682 - 0,270}{0,682} \times 100\%$$

$$= 60,411\%$$

2. Membuat persamaan regresi linier

Setelah diperoleh %inhibisi dari masing-masing konsentrasi inhibitor, dibuat regresi linier antara konsentrasi inhibitor dalam kuvet (x) dengan %inhibisi (y), sehingga didapat persamaan regresi linier.



3. Menghitung nilai IC₅₀

Persamaan regresi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ dengan rumus :

$$x = \frac{y-a}{b} \text{ dimana } y = 50$$

$$\begin{aligned} x &= \frac{50 - 29,482}{0,0984} \\ &= 208,516 \text{ ppm} \end{aligned}$$

