

# Studi In Vitro Senyawa Bioaktif Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Inhibitor $\alpha$ -Glukosidase

## In Vitro Study of Bioactive Compound Extract and Fraction of Red Betel Leaf (*Piper crocatum*) as $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor

Mustika, Weni<sup>1</sup>, Mega<sup>1</sup>, Safithri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran, UGJ

<sup>2</sup>Departemen Biokimia, IPB

E-mail korespondensi : Mustikaweni261192@gmail.com

### ABSTRAK

**Latar Belakang:** Daun sirih merah (*Piper crocatum*) dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai tanaman obat. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan menentukan efektivitas aktivitas ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air daun sirih merah (*Piper crocatum*) dalam menghambat enzim alfa glukosidase dan menentukan tipe penghambatannya terhadap enzim alfa glukosidase dengan metode Dixon. **Metode:** Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak etanol kemudian di fraksinasi dengan menggunakan 3 pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu air, etil asetat dan n-heksan. Penentuan aktivitas penghambatan enzim alfa glukosidase dengan metode Dixon. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat daun sirih merah memiliki aktivitas penghambatan paling baik dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksan dan fraksi air. **Simpulan:** Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh fraksi etil asetat daun sirih merah sebesar 743.80  $\mu$ g/mL, mekanisme penghambatan yang diperoleh adalah penghambatan kompetitif dengan nilai Ki sebesar 95  $\mu$ M.

**Kata Kunci:** Aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase, Dixon, *Piper crocatum*

### ABSTRACT

**Background:** *Piper crocatum* is used by the community as a medicinal plant. **Objective:** This study aimed to determine the effectiveness of the activity of ethanol extract, ethyl acetate fraction, n-hexane fraction and water fraction of red betel leaf (*Piper crocatum*) in inhibiting the alpha glucosidase enzyme and determine the type of inhibition of the alpha glucosidase enzyme using the Dixon method. **Method:** Extraction was carried out using 70% ethanol as a solvent. The ethanol extract was then fractionated using 3 solvents with different polarity levels, namely water, ethyl acetate and n-hexane. Determination of the inhibitory activity of the alpha glucosidase enzyme by the Dixon method. **Result:** The results showed that the ethyl acetate fraction of red betel leaf had the best inhibitory activity compared to 70% ethanol extract, n-hexane fraction and water fraction. **Conclusion:** The IC<sub>50</sub> value obtained by the ethyl acetate fraction of red betel leaf was 743.80 g/mL, the inhibitory mechanism obtained was competitive inhibition with a Ki value of 95 M.

**Keywords:** Inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase enzymes, Dixon, *Piper crocatum*

### LATAR BELAKANG

Diabetes Mellitus adalah salah satu permasalahan kesehatan terbesar di dunia. Diabetes Mellitus merupakan penyakit yang disebabkan gangguan metabolisme kronis tubuh yang cukup serius, penyakit ini ditandai dengan kadar glukosa darah tinggi. Pada 2021, Internasional Diabetes Federation (IDF) mencatat 537 juta orang dewasa menderita diabetes diseluruh dunia. Indonesia

menempati posisi ke-5 penderita diabetes terbanyak didunia setelah Tiongkok, India, Pakistan, dan Amerika Serikat <sup>[1]</sup>.

Karbohidrat yang kita konsumsi dalam makanan berperan dalam meningkatkan kadar glukosa darah. Karbohidrat yang diperoleh dari makanan akan dipecah oleh mekanisme enzimatik menjadi glukosa yang selanjutnya diedarkan ke darah. Dua enzim kunci yang berkaitan dengan pencernaan karbohidrat adalah  $\alpha$ -glukosidase dan  $\alpha$ -

amilase. Enzim  $\alpha$ -glukosidase banyak ditemukan dan terdistribusi secara luas pada serangga, mamalia tumbuhan, mikroorganisme dan di jaringan hewan [2], enzim ini mengkatalisis pemecah ikatan glikosidik oligosakarida menjadi senyawa yang dapat diserap monosakarida. Oleh karena itu enzim  $\alpha$ -glukosidase menjadi target pengobatan diabetes mellitus, khususnya diabetes mellitus tipe 2.

Kontrol hiperglikemia postprandial sangat penting dalam intervensi dini dan pencegahan komplikasi diabetes untuk manajemen diabetes tipe 2. Penghambatan enzim, seperti enzim  $\alpha$ -glukosidase di organ saluran pencernaan bermanfaat menunda penyerapan glukosa setelah makan [3], inhibitor  $\alpha$ -glukosidase menginduksi gejala hipoglikemik lebih kecil dibandingkan dengan agen penurunan glukosa oral lainnya. Penghambatan enzim ini menjadi salah satu strategi terbaik untuk mengurangi kenaikan postprandial glukosa darah [4].

Senyawa fenolik dari tanaman dilaporkan mampu menghambat kerja dari kedua enzim ini. Senyawa fenolik dapat berinteraksi di sisi aktif enzim  $\alpha$ -glukosidase sehingga karbohidrat tidak dapat berikatan di sisi aktif enzim glukosidase (penghambatan kompetitif) [5]. Tanaman tradisional Indonesia diketahui berkhasiat menurunkan kadar glukosa darah diabetes mellitus, salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antidiabetes adalah daun sirih merah. Daun sirih merah ini memiliki kandungan senyawa flavonoid, saponin, tannin dan minyak atsiri. Senyawa flavonoid ini

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas Ekstrak Etanol, Fraksi Etil Asetat, Fraksi etil asetat, Fraksi n-heksan, fraksi air daun sirih merah (*Piper crocatum*) dalam menghambat enzim alfa-glukosidase serta menentukan tipe penghambatannya secara in vitro.

## Metode

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) diperoleh dari kebun cikabayan Pusat Studi Biofarmaka Tropika (Trop BRC) LPPM IPB, etanol 70 % (Merck Germany), etil asetat (Merck Germany), n-heksan (EMSURE® EMD-Milipore Corporation), air, enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari rekombinan *Bacillus stearothermophilus* (Sigma G3651-250UN, Jerman), substrat p-nitrofenil-a-Dglukopiranosida (pNPG) (Sigma Aldrich, USA) dan akardiose (wako).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, oven, corong pisah, evaporator (HS-2005V), spektrofotometer (Hitachi tipe U-2800), pH meter (Eutech Instruments), vortex mixer (BI tipe 37600 mixer), *microplate reader* (Biotek Epoch) dan LC-MS/MS (QMicro QAA 842).

### Preparasi Sampel [6]

Daun sirih merah diperoleh dari perkebunan Cikabayan IPB. Daun sirih merah yang diambil adalah daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, sekitar 5 daun dari pucuk, karena terkait kandungan metabolit sekunder didalamnya. Daun yang diambil adalah sekitar 5 daun dari pucuk. Daun sirih merah dicuci lalu ditiriskan. Daun dirajang dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C selama 3 hari. Daun sirih merah yang sudah kering diblender dan disaring untuk mendapatkan simplisia dengan ukuran 100 mesh. Simplisia disimpan dalam plastik dalam suhu ruang.

### Pengukuran Kadar Air Simplisia [7]

Penentuan kadar air dilakukan sebanyak 3 kali ulangan, dengan cara cawan porselin dicuci bersih dan dikeringkan di dalam oven bersuhu 105°C selama 30 menit dan didinginkan dalam desikator. bobot kosong ditimbang, kemudian sebanyak 1 g sampel dimasukkan ke dalam cawan dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 105°C dan ditimbang sampai bobotnya konstan.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

A

Keterangan : A = bobot bahan sebelum dikeringkan (g)  
B = bobot bahan setelah dikeringkan (g)

### Ekstraksi Simplisia [6]

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, dengan cara merendam simplisia ke dalam pelarut dengan rasio 1:4. Sebanyak 25 g simplisia dilarutkan dalam 100 mL etanol 70% dengan kecepatan 130 rpm selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak disaring kemudian filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kasar. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Rendemen ekstrak dinyatakan dalam persen dan dihitung dengan menggunakan persamaan :

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot akhir sampel} \times 100\%}{\text{Bobot awal} \times (1 - \text{kadar air})}$$

### Fraksinasi Ekstrak secara Ekstraksi Cair-cair [8]

Ekstrak etanol 70% daun sirih merah difraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya, yaitu pelarut air, etil asetat dan n-heksan. sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 75 mL akuades lalu dimasukkan ke dalam corong pisah Pyrex 250 mL. Setelah itu, sebanyak 75 mL n-heksana ditambahkan lalu homogenkan. Campuran dihomogenkan dengan cara diputar-putar

secara horizontal pada corong pisah selama 5 menit, Campuran didiamkan hingga terlihat lapisan terpisah antara *n*-heksana dan air. Lapisan *n*-heksana yang terbentuk dipisahkan dalam botol terpisah begitu juga dengan lapisan air. Fraksinasi dengan *n*-heksana sebanyak 75 mL dilakukan hingga tiga kali ulangan. Fraksinasi dilakukan kembali dengan menambahkan sebanyak 75 mL etil asetat ke dalam air yang telah dipisahkan dari *n*-heksan lalu homogenkan. Campuran dihomogenkan dengan cara diputar-putar secara horizontal pada corong pisah selama 5 menit. Kemudian, keran corong pisah sesekali dibuka sehingga udara yang terperangkap keluar dan tekanan udara menurun. Campuran didiamkan hingga terlihat lapisan terpisah antara etil asetat dan air. Lapisan etil asetat yang terbentuk dipisahkan dalam botol terpisah begitu juga dengan lapisan air. Selanjutnya, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang diperoleh dari hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotatory evaporator pada suhu 50° C.

$$\text{Rendemen Fraksi (\%)} = \frac{\text{bobot akhir sampel}}{\text{bobot awal sampel}} \times \frac{\text{total bobot awal sampel}}{\text{Total bobot simplisia x (1-kadar air)}} \times 100\%$$

#### Uji Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase [9,10]

Sebanyak 10  $\mu$ l larutan standar, blanko dan sampel (konsentrasi 100-10000  $\mu$ g/mL) ke dalam sumur microplate reader dan ditambahkan dengan 50  $\mu$ L larutan bufer fosfat pH 7. Selanjutnya, sebanyak 25  $\mu$ l substrat berupa *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) 10 mM ditambahkan tiga menit sebelum uji dimulai. Reaksi diinisiasi dengan penambahan 25  $\mu$ l enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan konsentrasi 0.04 U/mL dalam bufer fosfat (pH 7.0) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM. Hasil reaksi diukur dengan microplate reader pada panjang gelombang 410 nm. Larutan akardose (konsentrasi 0.1-10  $\mu$ g/mL) digunakan sebagai kontrol positif dengan sistem reaksi sama seperti sampel. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Selanjutnya dilakukan perhitungan % inhibisi untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Sistem reaksi dapat diketahui pada Tabel 1.

| Reagen                          | Volume ( $\mu$ l) |                        |                  |                          |
|---------------------------------|-------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
|                                 | Tanpa Inhibitor   | Kontrol Tanpalnhibitor | Laju Terinhibisi | Kontrol Laju Terinhibisi |
| Pelarut                         | 10                | 10                     | -                | -                        |
| Sampel                          | -                 | -                      | 10               | 10                       |
| Buffer                          | 50                | 50                     | 50               | 50                       |
| Substrat                        | 25                | 25                     | 25               | 25                       |
| Enzim                           | 25                | -                      | 25               | -                        |
| Buffer                          | -                 | 25                     | -                | 25                       |
| Inkubasi 37°C 30 menit          |                   |                        |                  |                          |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 100               | 100                    | 100              | 100                      |

**Tabel 1.** Sistem reaksi inhibisi  $\alpha$ -glukosidase menggunakan persamaan Dixon

#### Uji Kinetika Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase [11]

Analisis kinetika inhibisi dari ekstrak dan fraksi daun sirih merah dilakukan dengan menggunakan persamaan Dixon. Untuk itu dalam pengujian ini digunakan dua volume substrat yang berbeda. Dengan menggunakan teknik ploting ini, maka nilai Ki akan diperoleh dengan mudah berdasarkan kurva linear dari vs [I], selain itu dengan menggunakan persamaan ini juga dapat diperoleh nilai IC<sub>50</sub>. Konsentrasi variasi enzim yang digunakan pada pengujian ini sama seperti pengujian aktivitas inhibisi  $\alpha$ -glukosidase pada tahap sebelumnya (100-10000  $\mu$ g/mL). Nilai Ki diperoleh dari perpotongan setiap kurva linear, sementara itu nilai IC<sub>50</sub> untuk masing-masing jumlah substrat akan diperoleh dari perpotongan masing-masing kurva dengan sumbu x. Set plate pada pengujian ini ditunjukkan pada Tabel 2.

| Reagen                          | Volume ( $\mu$ l) |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|
|                                 | Substrat 1        | Substrat 2 |
| Pelarut                         | -                 | -          |
| Sampel                          | 10                | 10         |
| Buffer                          | 50                | 50         |
| Substrat                        | 15                | 25         |
| Enzim                           | 25                | 25         |
| Buffer                          | -                 | -          |
| Inkubasi 37 °C selama 30 menit  |                   |            |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 100               | 100        |

**Tabel 2** Set pengujian kinetika inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase menggunakan persamaan Dixon

#### Analisis Data <sup>[12]</sup>

Data dianalisis menggunakan Analyses of Variance (ANOVA) dan diuji lanjut dengan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menggunakan program Microsoft Excel 2010 dan SPSS Statistics 16.0

#### Hasil dan Pembahasan

##### Kadar Air dan Rendemen Daun Sirih Merah

Kadar air simplisia menentukan mutu dan daya simpan dari simplisia tersebut, kadar air maksimal yang diperbolehkan BPOM harus dibawah 10<sup>[13]</sup>, untuk menghindari pertumbuhan mikroorganisme yang dapat menurunkan mutu dari simplisia. Hasil analisis kadar air menunjukkan kadar air simplisia yang diperoleh sebesar 6.7%. Hasil pengukuran kadar air didapatkan di bawah 10%, sehingga simplisia dapat disimpan dalam jangka waktu lama tanpa adanya kerusakan oleh mikroba<sup>[14]</sup>. Berdasarkan hasil yang diperoleh, rendemen ekstrak kasar etanol 70% sebesar 9.21%. Hasil ekstraksi, selanjutnya dilakukan pemisahan kandungan metabolit sekunder yang terkandung didalam ekstrak sesuai tingkat kepolarnya melalui proses fraksinasi cair-cair<sup>[15]</sup>.

Hasil rendemen hasil *rotary evaporator* diperoleh fraksi air sebesar 58.75%, fraksi n-heksan sebesar 12.50% dan fraksi etil asetat sebesar 4.68%. sedangkan rendemen hasil dari simplisia kering, rendemen tertinggi diperoleh fraksi air 4.56% dan rendemen terendah diperoleh dari fraksi etil asetat 0.42%. Fraksi air memiliki nilai rendemen paling tinggi, hal ini diduga bahwa senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak etanol lebih bersifat polar, sehingga kelarutan senyawa dari ekstrak etanol lebih banyak terlarut dalam pelarut air dibandingkan n-heksan. Perbedaan rendemen ini terjadi karena perbedaan kemampuan distribusi kandungan dalam daun sirih merah dalam pelarut yang berbeda kepolarnya<sup>[16]</sup>.

##### Aktivitas Inhibisi Ekstrak dan Fraksi *Piper crocatum* terhadap $\alpha$ -Glukosidase

Aktivitas antidiabetes dilakukan secara in vitro dengan cara menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase. Penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengurangi hiperglikemia postprandial, sehingga menunda penyerapan glukosa dan mengendalikan glukosa darah pada pasien diabetes <sup>[17]</sup>. Idealnya senyawa antidiabetes harus memiliki sifat hipoglikemik. Oleh karena itu pengujian penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase secara in-vitro dapat digunakan sebagai referensi dalam pengobatan diabetes.

Dalam rangka skrining agen atidiabetik aktif, beberapa obat tanaman dipilih. Kemampuan penghambatan daun sirih merah yang berasal dari ekstrak dan fraksi daun sirih merah diteliti. Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70%, pemilihan ekstrak etanol ini dikarenakan pelarut etanol aman digunakan (tidak toksik). Fraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air. Pemilihan fraksi daun sirih merah dipilih berdasarkan tingkat kepolaran, dari senyawa polar, semi polar dan senyawa non polar. Untuk membandingkan aktivitas penghambatan sampel, acarbose dipilih sebagai kontrol positif. Akarbose adalah obat sering digunakan dalam mengobati diabetes mellitus tipe 2. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak maupun fraksi daun sirih merah diukur untuk dapat melihat kemampuan inhibisi dari masing-masing sampel. Nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan konsentrasi sampel yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase, dengan demikian semakin kecil nilai IC<sub>50</sub>, maka kemampuan inhibisi dari sampel semakin baik.

Hasil uji penghambatan ekstrak dan fraksi daun sirih merah (Gambar 4-8) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling aktif dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 743.8 $\pm$ 42.43  $\mu$ g/mL (Tabel 6). Fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol diduga karena ekstrak etanol masih merupakan ekstrak kasar, yang memungkinkan kandungan senyawanya masih bersifat campuran sehingga menyebabkan kerja yang tidak sinergis antara senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak kasar etanol, serta pengaruh dari komponen kimia yang terdapat pada fraksi aktif etil asetat yang memiliki efek sinergis dalam menghambat enzim  $\alpha$  – glukosidase menjadikan fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan glukosidase lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol<sup>[18]</sup>. Nilai IC<sub>50</sub> paling rendah adalah fraksi etil asetat dibandingkan dengan fraksi lain, hal ini disebabkan beberapa faktor, diantaranya perbedaan kandungan metabolit sekunder dari fraksi etil asetat dan perbedaan tingkat kepolaran (polaritas) pelarut yang digunakan<sup>[19]</sup>. Etil

asetat merupakan golongan pelarut semi polar, sehingga etil asetat ini mampu menarik senyawa baik yang bersifat polar maupun nonpolar. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, jenis pelarut yang digunakan berpengaruh terhadap penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Pelarut yang menunjukkan adanya inhibisi terhadap  $\alpha$ -glukosidase secara in vitro adalah pelarut polar dan semi polar seperti air, metanol, etanol, aseton dan etil asetat. Hal tersebut juga didukung penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Dwitarsari [20] bahwa fraksi etil asetat (semi polar) biji *C. Bonduc* memiliki nilai  $IC_{50}$  yang rendah sebesar 803.95  $\mu\text{g/mL}$ , tetapi penggunaan pelarut non polar menghasilkan nilai  $IC_{50}$  yang lebih tinggi dengan menggunakan fraksi n-heksan biji *C. Bonduc* yaitu sebesar 18599.36  $\mu\text{g/mL}$ .

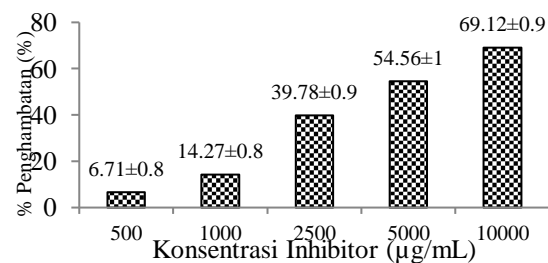
Meskipun fraksi etil asetat aktif sebagai antidiabetes dan memiliki nilai inhibisi paling tinggi dalam penelitian ini, namun kemampuan inhibisinya masih dibawah kemampuan inhibisi acarbose sebagai control positif. Akarbose adalah senyawa murni yang sudah terbukti memiliki kemampuan dalam menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase melalui mekanisme inhibisi kompetitif, sedangkan fraksi etil asetat daun sirih merah merupakan hasil fraksinasi dari ekstrak yang masih berupa senyawa campuran sehingga kemampuan inhibisinya kurang optimal. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Hanwar dan Firdaus yang menyatakan bahwa ekstrak kasar etanol memiliki kandungan metabolit sekunder terutama flavonoid yang lebih sedikit dibanding fraksi etil asetat, hal ini yang menyebabkan kemampuan penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase fraksi etil asetat lebih tinggi dibanding ekstrak kasar etanol dibuktikan dengan nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat (270.286  $\mu\text{g/mL}$ ) lebih rendah dibandingkan ekstrak kasar etanol (310.880  $\mu\text{g/mL}$ ) tetapi tidak lebih tinggi dibandingkan akarbose sebagai kontrol positif yang memiliki nilai  $IC_{50}$  31.626  $\mu\text{g/mL}$ , selain itu, hal ini juga disebabkan karena adanya kerja yang tidak sinergi antara senyawa metabolit sekunder pada ekstrak kasar etanol yang masih berupa senyawa campuran [18]. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata dari variasi konsentrasi dari sampel ekstrak dan fraksi daun sirih merah dengan nilai  $P < 0.05$ .

Aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$ , suatu sampel dikategorikan memiliki penghambatan sangat kuat jika nilai  $IC_{50} < 50$ , kuat jika memiliki nilai  $IC_{50} : 50-100$ , sedang jika memiliki nilai  $IC_{50} 100-250$  dan lemah jika memiliki nilai  $IC_{50} 250-500$  [21]. Berdasarkan hasil dari Tabel 1, fraksi etil asetat kurang aktif dalam menghambat enzim alfa glukosidase. Nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat sebesar 743.8 $\pm$ 42.43  $\mu\text{g/mL}$ . Menurut Molyneux bila  $IC_{50} \leq 1000$ , maka zat tersebut kurang aktif namun masih berpotensi sebagai penghambatan enzim  $\alpha$ -

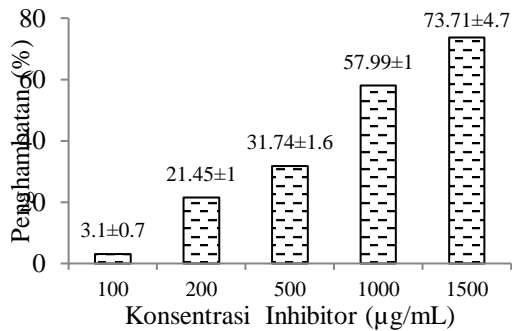
glukosidase [22]. Hal ini disebabkan karena fraksi etil asetat masih berupa fraksi campuran.

Daun sirih merah masih memiliki kemampuan dalam menghambat enzim glukosidase, hal ini diduga karena kandungan senyawa bioaktif golongan terpenoid, fenol, alkaloid flavonoid yang terdapat pada sirih merah mampu menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase [6]. Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya dari hasil penambatan molekuler fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat mengandung senyawa columbin. Senyawa columbin merupakan senyawa golongan diterpenoid. Senyawa golongan diterpenoid memiliki kemampuan menurunkan kadar glukosa darah. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Imanta dan Hidajati melaporkan bahwa daun sambiloto mengandung banyak senyawa diterpenoid, yaitu *andropgraphoide* [23]. Menurut Chao dan Lin, studi in vitro dan in vivo pada tikus diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin (STZ) menunjukkan bahwa penghambatan  $\alpha$ -glukosidase bertanggung jawab atas aktivitas antidiabetes ekstrak etanol sambiloto [24]. Senyawa bioaktif yang terdapat pada sambiloto (golongan diterpenoid) mampu berikatan dengan baik dengan reseptor  $\alpha$ -glukosidase adalah 14-deoksiandrografolida dan 19-Oasetilandrografolida. Ligan 14-deoksiandrografolida dengan nilai energi -8,0 kkal/mol dan 19-Oasetilandrografolida dengan nilai energi -8,7 kkal/mol juga memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan akarbose, yaitu -7,6 kkal/mol [25].

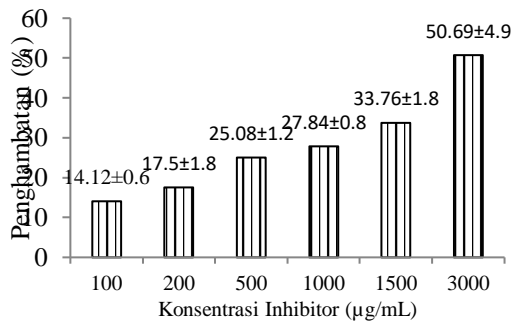
**Gambar 1.** Aktivitas Penghambatan Ekstrak Etanol 70%



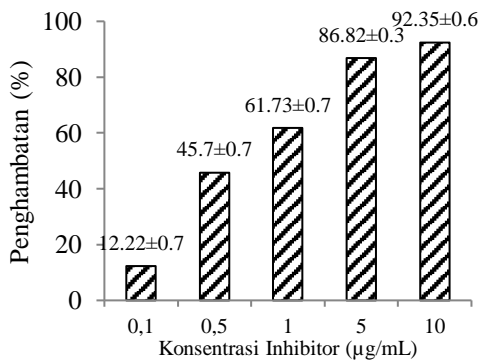
**Gambar 2.** Aktivitas Penghambatan Fraksi n-heksan



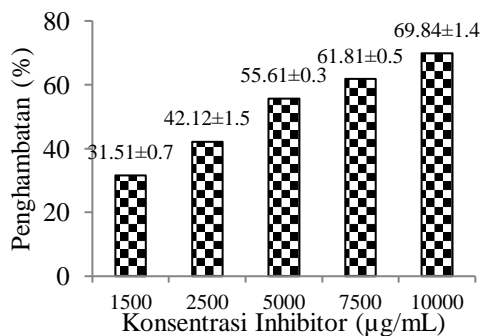
**Gambar 3.** Aktivitas Penghambatan Fraksi Etil Asetat



**Gambar 4.** Aktivitas Penghambatan Fraksi Air



**Gambar 5** Aktivitas Penghambatan Akarbose



| Sampel             | IC <sub>50</sub> (µg/mL)      |
|--------------------|-------------------------------|
| Eksrak Etanol 70%  | 3808.30 ± 81.25 <sup>d</sup>  |
| Fraksi n-Heksan    | 3793.50 ± 103.46 <sup>d</sup> |
| Fraksi Etil Asetat | 743.80 ± 42.43 <sup>b</sup>   |
| Fraksi Air         | 2730.39 ± 353.92 <sup>c</sup> |
| Akarbose           | 0.70 ± 0.05 <sup>a</sup>      |

**Tabel 3.** Rata-rata IC<sub>50</sub> pada jenis sampel inhibitor pada konsentrasi substrat 15 mM

### Kinetika Inhibisi Enzim α-Glukosidase

Studi kinetika enzim dilakukan untuk menilai aktivitas antidiabetes dari komponen tanaman. Untuk mengetahui mekanisme penghambatan fraksi etil asetat daun sirih merah berbagai konsentrasi substrat digunakan. Untuk menganalisis mekanisme yang mendasari penghambatan enzim α-glukosidase, konstanta penghambatan (Ki) ditentukan dengan plot Dixon (gambar 6). Konstanta inhibitor diwakili oleh perpotongan garis sebagai substrat dan plot Dixon [26]. Kinetika enzim hanya dilakukan pada fraksi teraktif, yaitu fraksi etil asetat. Untuk memastikan penurunan aktivitas enzim diakibatkan karena kemampuan tanaman dalam menghambat kerja enzim α-glukosidase bukan disebabkan karena factor pengganggu yang lainnya, maka dilakukan uji pendahuluan, yaitu optimasi konsentrasi substrat.

Konsentrasi substrat optimum yang dipilih adalah 10 mM dan 15 mM. Konsentrasi substrat ini dipilih berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya yang dilakukan oleh Rahayu dengan konsentrasi substrat 2 mM, 5 mM, 10 mM dan 15 mM. Konsentrasi substrat 10 mM merupakan konsentrasi substrat yang optimum. Selain itu, penelitian lain menunjukkan konsentrasu substrat optimum pada konsentrasi 10 mM dan 20 mM dengan variasi konsnetrasi substrat yang digunakan adalah 0.625 mM, 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM dan 20 mM [27]. Pada konsentrasi 10 mM dan 20 mM hasil absorbansi tidak berubah. Berdasarkan penelitian tersebut, variasi konsentrasi yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM dan 25 mM. Hasil yang diperoleh konsentrasi substrat optimum pada konsentrasi 10 mM dan 15 mM. Hasil pengujian kinetika enzim menunjukkan bahwa nilai Ki dari fraksi etil asetat diperoleh sebesar 95 µM. Nilai Ki menunjukkan pengikatan kompleks kompleks enzim-inhibitor. Semakin kecil nilai Ki, maka semakin banyak terbentuknya ikatan kompleks enzim-inhibitor, sehingga dapat diartikan bahwa semakin kecil nilai Ki, kemampuan inhibisi semakin baik [20]. Nilai Ki fraksi etil asetat jika dibandingkan dengan nilai Ki hasil penelitian lain yang disajikan pada tabel 6 masih cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena fraksi etil asetat masih fraksi campuran, sehingga masih banyak senyawa lain yang mengganggu kemampuannya. Dibandingkan dengan nilai Ki dari fraksi etil asetat

daun *Qingzhuan tea*, fraksi etil asetat daun sirih merah memiliki nilai  $K_i$  yang lebih tinggi, dimana nilai  $K_i$  *Qingzhuan tea* (teh hitam) sebesar 77.10  $\mu\text{g/mL}$ . Hal ini disebabkan kandungan dari katekin pada daun *Qingzhuan tea* [4]

Untuk mengetahui tipe penghambatan dari persamaan Dixon, dapat dilihat melalui grafik perpotongan garis yang terbentuk. Apabila perpotongan garis terjadi di atas sumbu X, (kompetitif), jika perpotongan garis terjadi tepat di sumbu Y (non kompetitif) dan jika tidak terjadi perpotongan atau garis yang diperoleh sejajar (un kompetitif) [28]. Hasil Gambar 9 menunjukkan bahwa tipe penghambatan adalah kompetitif, karena perpotongan garis terjadi di atas sumbu X. Untuk memperkuat penelitian kami, senyawa columbin yang ditemukan pada fraksi etil asetat daun sirih merah dengan metode LC-MS. Senyawa columbin dimasukkan ke dalam structural kristal enzim  $\alpha$ -glukosidase (PDB: 3A4A) menggunakan Autodoc Vina dengan melakukan penambatan molekuler disekitar sisi aktif enzim, yaitu : Asp69, His112, Arg213, Asp215, Glu277, His351, Arg442 and Asp352 [29]. Mendukung pengikatan langsung senyawa columbin ke dalam kantong pengikatan substrat. Analisis interaksi hidrofobik mengungkapkan senyawa *Columbin* memiliki interaksi hidrofobik dengan asam amino Arg315, Glu411, he159, Arg442, Tyr158 dan Phe303 [30].

Senyawa *Columbin* berinteraksi dengan residu katalitik His280, Asp242 dan Ser240. Senyawa *Columbin* membentuk empat ikatan hidrogen dengan Asp242, Ser240 dan His280, ikatan tersebut menstabilkan kompleks ligan dengan protein. Pengikatan senyawa columbin pada situs aktif menyebabkan substrat tidak terikat di situs aktif enzim, yang dapat memperlambat aktivitas

protein [31]. Adanya interaksi hidrofobik dengan asam amino Arg315, Glu411, Phe159, Arg442, Tyr158 dan Phe303 menyebabkan penutupan kantong untuk mencegah pintu masuk substrat, yang selanjutnya bertindak sebagai sifat penghambat kompetitif [30].

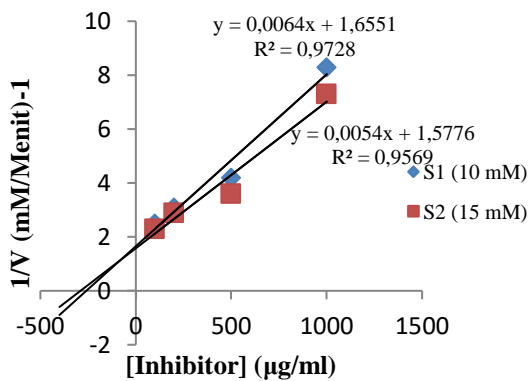
| Sampel                              | Referensi            |  |  |
|-------------------------------------|----------------------|--|--|
|                                     | Ki ( $\mu\text{M}$ ) | Sampel   | Ki ( $\mu\text{M}$ )<br>Daftar Pustaka |
| Fraksi Etil Asetat Daun Sirih Merah | 95                   | Ekstrak air daun perdu ( <i>Eucommia ulmoides</i> )          | 8.5<br>Zhenhua et al. 2014             |
|                                     |                      | Ekstrak Metanol daun Lidah buaya ( <i>Chinese Aloes</i> )    | 2.16<br>Zhenhua et al. 2014            |
|                                     |                      | Ekstrak Air Bunga Matahari ( <i>Matricaria Recutital</i> )   | 8.5<br>Zhenhua et al. 2014             |
|                                     |                      | Akar Mulberry ( <i>Cudrania Tricuspidata</i> )               | 12.4<br>Zhenhua et al. 2014            |
|                                     |                      | Ekstrak Air akar <i>Anemarrhene Rhizoma</i>                  | 158<br>Zhenhua et al. 2014             |
|                                     |                      | Fraksi Etil Asetat Biji Kebiul ( <i>Caesalpinia bonduc</i> ) | 18.12<br>Dwitasari et al. 2017         |

**Tabel 4.** Nilai  $K_i$  Berbagai Jenis Tanaman

## Simpulan

Hasil analisis in vitro menunjukkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan paling baik dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksan dan air. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh fraksi etil asetat daun sirih merah sebesar 743.80  $\mu\text{g/mL}$ , mekanisme penghambatan kompetitif dengan menunjukkan nilai  $K_i$  95  $\mu\text{M}$ .

**Gambar 6.** Tipe Penghambatan Fraksi Etil Asetat Menggunakan Metode Dixon



## Daftar Pustaka

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Ninth Edition 2021. IDF. 2021
2. Afandy Maudy Audina. 2017. Isolasi dan Pemurnian Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa* VAR. *Glutinosa*) serta Amobilisasi dengan Matriks Ca-Alginat - Kitosan secara Mikroenkapsulasi [Skripsi]
3. Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Bo, H., Kumar, S., et al. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory activity of *syzygium cumini* (Linn). Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Research* 343, 1278-1281.
4. Liu S, Yu Z, Zhu H, Zhang W, Chen Y. 2016. In Vitro  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity of Isolated Fraction From Water Extract of Qingzhuang Dark Tea. *Complementary and Alternative Medicine*. 16:378-386
5. Williamson G. 2013. Possible Effect of Dietary Polyphenol on sugar Absorption and Digestion. *Molecular Nutrition Food Research*. 57: 48-57
6. Alfarabi M, Bintang M, Suryani, Safitri M. 2010. The Comparative Ability of Antioxidant Activity of *Piper crocatum* in Inhibiting Fatty Acid Oxidation and Free Radical Scavenging. *Hayati Journal of Biosciences*. Vol 17(4) :201-204
7. [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2007. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition. AOAC International. Gaithersburg
8. Firdaus I, Retnowati R, Sutrisno. 2015. Fraksinasi ekstrak metanol daun manga kasturi (*Mangifera casturi* kosterm) dengan pelarut n-butanol. *Kimia Student Journal*. 1(1): 785-790.
9. Sancheti S, Sandesh S, Seo SY. 2009. *Chaenomeles sinensis* : a potent  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase inhibitor. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 4(1): 8-11.
10. Sugiwati S, Setiasih S, Afifah E. 2009. Antihyperglycemic activity of the mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (scheff.) Boerl.] leaf extracts as an  $\alpha$  glucosidase inhibitor. *Makara Journal of Health Research*. 13: 74-78.
11. Dixon M. 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Journal*. 55(1): 170.
12. Mattjik AA. 2002. Rancangan Percobaan. Bogor: IPB Pr.
13. BPOM. 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 13 Tahun 2014 tentang Pedoman Uji Klinik Obat Herbal. Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
14. Manoi, F. 2006. Pengaruh Cara Pengeringan Terhadap Mutu Simplisia Sambiroto. *BALITRO*. 17 (1), 1-5.
15. Uthia R, Arifin H, & Efrianti F. 2017. Pengaruh hasil fraksinasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap aktivitas susunan saraf pusat pada mencit putih jantan. *Jurnal Farmasi Higea*. 9(1):85-95.
16. Senja, Yulia Rima. (2014). Perbandingan Metode Ekstraksi dan Variasi Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas antioksidan Ekstrak Kubis Ungu (*Brassica oleracea* L var. *capitata* f. *Rubra*). *Journal of Faculty of Pharmacy Universitas Gadjah Mada*. Vol 19 (1):43-48.
17. Bosenberg LH, Van Zyl DG : 2008. The mechanism of action of oral antidiabetic drugs : A review of recent literature. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa (JEMDSA)*, 13 (3)/Dec, PP 80-88
18. Hanwar D, Firdaus KA. 2018. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap Penghambatan Enzim  $\alpha$ Glukosidase secara In Vitro. *The 8th University Research Colloquium 2018*. University Muhammadiyah Purwokerto : 406-411
19. Mangela O, Ridhay A, Musafira. 2016. Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembelekan (*Lantana camara* L) Berdasarkan tingkat Kepolaran Pelarut. *Jurnal Kovalen*. 2 (3):16-23
20. Dwitari O, Sasongko DHS, Safitri M. 2017. Identifikasi Senyawa Bioaktif dan Aktivitas Inhibisi  $\alpha$  Glukosidase dari Ekstrak Biji Keblu (*Caesalpinia bonduc*) secara In Vitro. *Jurnal Current Biochemistry*. 4(3):1-12
21. Badarinath A, Rao K, Chetty CS, Ramkanth S, Rajan T, Gnanaprakash K. A Review on In-vitro Antioxidant Methods : Comparisons, Correlations, and Considerations. 2010. *International Journal of PharmTech Research* : 1276-1285.
22. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science of Technology*. 26(2):211-219.
23. Imanta E dan Hidajati N. 2017. Uji Biolarvasida Nyamuk *Aedes aegypti* dari Hasil Isolasi Ekstrak Metanol Daun Sambilo (*Andrographis paniculata* NESS). *Journal of Chemistry*. 6(1): 36-41
24. Chao WW, Lin BF. 2010. Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (*Chuanxinlian*). *Journal of Chinese Medicine*. 5(17):1-15.



25. Rachmania RA, Supandi, Larasati OA. 2015. Analisis In Silico Senyawa Diterpenoid Lakton Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Pada Reseptor Alpha Glucosidase Sebagai Antidiabetes Tipe II. *Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol 12
26. Masataka yoshino & Keiko Murakami. 2009. A Graphical Method for Determining Inhibition Constant. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 26:6, 1288-1290
27. Zuhro F, Puspitasari E, Muslichah S, Hidayat MA. 2015. Aktivitas inhibitor  $\alpha$ glukosidase ekstrak etanol 70% daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.). *Pustaka Kesehatan*. 4(1): 1-7
28. Son HU, Lee SH. 2013. Comparison of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition by *Cudrania tricuspidata* According to Harvesting Time. *Biomedical Reports Journal*. 1 : 624-628
29. Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., and Osaki, S.2010. Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *FEBS Journal*.277 (20):4205–4214
30. Mustika Weni. 2020. Molecular Docking of Active Compounds Piper Crocatum on The Alpha-Glucosidase Enzyme as Antidiabetic. *Indonesia Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 7(2): 64-72
31. LavleN, Shukla, P, Panchal, A. ROLE of flavonoids and saponins in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of Pharmaceutical Science Bioscientific Res*. 6 : 535–541.