



Inhibis Enzim α -Glukosidase dan α -Amilase dari Ekstrak Metanol Daun Buhu (*Garuga floribunda* Decne) Sebagai Antidiabetes

Nurvita Abdullah ^{1*}, Netty Ino Ischak ², La Alio ³, Yuszda K. Salimi ⁴, La Ode Aman ⁵,
Ahmad Kadir Kilo ⁶

¹⁻⁶ MIPA, Kimia, Universitas Negeri Gorontalo, Indonesia

Email penulis: nurvitaabdullah@gmail.com ^{1*}, netty.ischak@ung.ac.id ², la_alio@ung.ac.id ³

Alamat Kampus: Jl. Jend. Sudirman No.6, Dulalowo Tim., Kota Tengah, Kota Gorontalo
Gorontalo 96128

Korespondensi penulis: nurvitaabdullah@gmail.com

Abstract. *The *Garuga floribunda* (*Garuga floribunda* Decne) plant is one of the species known for its various medicinal properties. This research aims to investigate the inhibitory activity of α -glucosidase and α -amylase enzymes and to determine the optimum concentration of the methanol extract of *Garuga floribunda* leaves as an antidiabetic agent. The leaves extraction is obtained through an extraction process using methanol as the solvent and tested for its inhibitory activity against the α -glucosidase enzyme using the *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*-NPG) substrate and the α -amylase enzyme using the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) substrate. The method is UV-Vis spectrophotometry. The Phytochemical tests of this plant reveal the presence of flavonoids, alkaloids, saponins, tannins, steroids, and terpenoids. The inhibition test results show that the methanol extract of *Garuga floribunda* leaves exhibited significant inhibitory activity against both enzymes. The highest inhibition percentage against the α -glucosidase enzyme is 91.09%, indicating very high antidiabetic activity. Meanwhile, the inhibition against the α -amylase enzyme is 7.56%, showing no significant antidiabetic activity. The optimum concentration for inhibiting both enzymes is 1000 ppm.*

Keywords: *Flea, Inhibits, Enzyme, Antidiabetes*

Abstrak. Tumbuhan Buhu (*Garuga floribunda* Decne) merupakan salah satu spesies tumbuhan dengan beberapa khasiat obat. Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase dan enzim α -amilase serta mengetahui konsentrasi optimum dari ekstrak metanol daun buhu sebagai antidiabetes. Ekstrak daun buhu diperoleh melalui proses ekstraksi dengan pelarut metanol dan diuji aktivitas inhibisinya terhadap enzim α -glukosidase menggunakan substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*-NPG) dan α -amilase menggunakan substrat DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat). Metode yang digunakan adalah metode spektrofotometer UV-Vis. Uji fitokimia yang dihasilkan dari tumbuhan ini diantaranya senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid. Hasil uji inhibisi menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun buhu memiliki aktivitas inhibisi yang signifikan terhadap kedua enzim tersebut. Persentase inhibisi tertinggi terhadap enzim α -Glukosidase adalah 91,09 \pm 1,52 ppm, dikategorikan sangat aktif sebagai antidiabetes. Sedangkan terhadap α -amilase 5,33 \pm 0,79 ppm, tidak aktif sebagai antidiabetes.

Kata kunci: Buhu, Inhibisi, Enzim, Antidiabetes

1. LATAR BELAKANG

Garuga floribunda Decne merupakan salah satu spesies tumbuhan dengan beberapa khasiat obat. Tumbuhan ini merupakan salah satu obat tradisional yang masih sering digunakan oleh masyarakat Gorontalo khususnya di pedesaan, karena khasiatnya yang dipercaya sangat ampuh untuk mengobati berbagai penyakit, seperti mengobati TBC, penyakit paru-paru dan kanker, dan diabetes (Buenavista & Mateo, 2017). Tumbuhan ini mengandung metabolit sekunder penting yaitu siklik diarilheptanoid dengan multibioaktivitas seperti antibakteri, antikanker, antioksidan, antidiabetes dan antiinflamasi (Supriati et al., 2021).

Diabetes melitus adalah sekelompok gangguan metabolisme dengan gejala umum hiperglikemia. Dari penyakit tersebut, merupakan kelompok penyakit metabolit yang ditandai dengan hiperglikemia, yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. Permulaan diabetes melibatkan beberapa proses patologis, mulai dari penghancuran sel pancreas akibat defisiensi insulin hingga kelainan yang menyebabkan resistensi insulin. Prevalensi global diabetes diperkirakan akan meningkat 2,8% pada tahun 2000 menjadi 4,4% pada tahun 2030. Prevalensi diabetes mellitus juga diperkirakan akan meningkat di Indonesia. Peningkatan dari 8,4% pada tahun 2000 menjadi, 21,3% pada tahun 2030 (Fajarna et al., 2022).

Efek antidiabetes dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yaitu stimulasi sel β -Langerhans untuk memproduksi insulin dan penghambat aktivitas enzim. α -glukosidase dan enzim α -amilase bertanggung jawab atas pemecah karbohidrat menjadi glukosa di usus kecil manusia. Dengan menghambat aktivitas enzim, dapat memperlambat pemecahan karbohidrat di usus dan mengurangi penyerapan gula darah (Minarni et al., 2013).

Enzim α -glukosidase adalah enzim yang terlibat dalam konversi karbohidrat (oligosakarida) menjadi glukosa. Karbohidrat dipecah oleh enzim di mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana, yang kemudian diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan gula darah. Proses pencernaan karbohidrat menyebabkan pelepasan (Putri, 2015).

Enzim α -amilase merupakan pancreas utama (5-6 %) dan produk saliva. Selain itu, enzim α -amilase juga terdapat pada mikroorganisme. Enzim α -amilase adalah endoenzim, yang bekerja dengan menghidrolisis pati pada ikatan α -1,4-glukosidik menjadi monosakarida. Enzim α -amilase secara acak membelah ikatan α -1,4 di dalam molekul amilosa dan amilopektin (Julianto, 2019).

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian terhadap tanaman buhu (*Garuga floribunda* Decne) dengan memanfaatkan daun dari tumbuhan tersebut. Untuk mengetahui bagaimana “Inhibisi Enzim α -Glukosidase dan α -Amilase dari Ekstrak Metanol Daun Buhu (*Garuga floribunda* Decne) Sebagai Antidiabetes,”

2. KAJIAN TEORITIS

Garuga floribunda Dence, Biasanya dikenal sebagai “buhu” di Provinsi Gorontalo. Tumbuhan ini ditemukan di Asia Tenggara, Australia Utara (Queensland Utara, Semenanjung Cape York, Australia Barat Laut) dan Pasifik Barat pada ketinggian hingga Sekitar 400 meter di atas permukaan laut (Buenavista & Mateo, 2017). *Garuga floribunda* Decne merupakan pohon yang digunakan oleh tiga suku terbesar di Sulawesi. Tersebar luas

di Indonesia meliputi Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur, Nusa Tenggara, Kalimantan Timur Laut, Sulawesi, Maluku dan Irian Jaya, tumbuh di hutan primer dan hutan sekunder (Arini, 2017).

Metabolit sekunder menghasilkan sejumlah besar senyawa spesifik (sekitar 200.000 senyawa) yang secara fungsional tidak penting untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan tanaman, tetapi yang diperlukan tanaman untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan. Metabolisme sekunder mengacu pada metabolisme primer dalam hal bahan penyusun dan enzim, untuk biosintesis (Julianto, 2019). Berbagai senyawa yang timbul dari metabolit sekunder tanaman dapat diklasifikasikan ke dalam beberapa golongan senyawa alam, antara lain alkaloid, terpenoid, steroid, dan flavonoid.

Antidiabetes merupakan suatu aktivitas yang diberikan oleh senyawa tertentu yang dapat mengobati penyakit diabetes. Pengujian aktivitas antidiabetes ini bisa dilakukan pada tanaman herbal, pengujian aktivitas antidiabetes diuji dengan tiga cara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico* (Nugraha & Hasanah, 2018). Banyak tanaman mengandung senyawa bioaktif seperti glikosida, alkaloid, terpenoid dan flavonoid, yang memiliki efek antoksidan dan antidiabetes (Meila & Noraini, 2017).

Pengujian potensi antidiabetes menggunakan metode untuk menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Metode ini digunakan karena enzim α -glukosidase merupakan enzim yang mengurangi karbohidrat menjadi glukosa. Penghambat enzim mengurangi penyerapan glukosa di usus kecil, yang memengaruhi glukosa darah dan menurunkan kelebihan gula darah dalam tubuh (Sinulingga et al., 2020).

Mekanisme antidiabetes melibatkan pengaturan kadar gula darah. Beberapa obat antidiabetes bekerja dengan cara meningkatkan produksi insulin oleh pankreas, sementara yang lain meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin. Mekanisme pengobatan diabetes melibatkan pengaturan gula darah. Beberapa obat diabetes meningkatkan produksi insulin dipankreas, sementara obat lain meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin.

Penelitian sebelumnya tentang penghambatan enzim α -glukosidase yang bertujuan untuk mengetahui penghambat enzim α -glukosidase pada ekstrak metanol buah kiwi (*Actinidia Deliciosa*). Buah kiwi mengandung saponin yang ditandai dengan terbentuknya busa, positif flavonoid yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning (jingga) dan positif alkaloid dengan terbentuknya warna coklat pada uji wagner. Pengujian aktivitas penghambat enzim α -glukosidase menggunakan metode spektrofotometri. Hasil uji aktivitas penghambat enzim α -glukosidase pada acarbose menunjukkan nilai 13,672 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan ekstrak metanol buah kiwi menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 7,219 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa

ekstrak metanol buah kiwi memiliki aktivitas penghambat enzim α -glukosidase lebih besar dari pada akarbosa (Meila & Noraini, 2017).

3. METODE PENELITIAN

Preparasi Sampel

Daun Buhu (*Garuga floribunda* Decne) dikumpulkan, dibersihkan, dipisahkan dari tangkainya, dan ditimbang untuk mengetahui berat sampel. Daun dicuci dengan air mengalir, ditempatkan dalam wadah berlubang agar air mengalir keluar dan sirkulasi udara baik. Setelah itu, daun dirajang dan dikeringkan dengan diangin-anginkan. Selanjutnya daun dihaluskan menjadi serbuk simplisia dan disimpan dalam wadah bersih yang tertutup rapat untuk melindungi dari sinar matahari.

Pemisahan

a. Tahap Ekstraksi

Sampel dari daun buhu berupa serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi, kemudian dimaserasi dengan 2 L metanol. Proses perendaman selama 24 jam. Filtrat hasil penyaringan ditampung dan dilakukan maserasi kembali terhadap residu (ampas) selama 24 jam menggunakan pelarut metanol. Ekstrak disaring kembali dan dilakukan maserasi terhadap residu yang dihasilkan dengan perlakuan yang sama sebanyak 3 kali (3 kali 24 jam). Filtrat yang dihasilkan dikumpulkan dan uapkan menggunakan *Vacum Rotary Evaporator* (penguapan putar vakum) pada suhu 40°C untuk menghasilkan ekstrak pekat metanol. Kemudian ekstrak yang diperoleh dihitung % rendemen yang didapatkan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat akhir sampel (g)}}{\text{berat awal sampel (g)}} \times 100\%$$

b. Tahap Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan menggunakan metode partisi cair-cair. Ekstrak kental metanol disuspensikan dengan metanol-air dengan perbandingan (1:2). Kemudian dipisahkan menggunakan pelarut n-heksan sehingga mendapatkan fraksi n-heksan dan fraksi air. Selanjutnya, fraksi air dipartisi dengan pelarut etil asetat untuk mendapatkan fraksi etil asetat.

Uji Inhibisi Enzim α -Glukosidase dan α -Amilase

Pengujian daya hambat enzim α -glukosidase dan α -amilase dilakukan dengan melarutkan enzim dalam buffer fosfat (pH 7) yang mengandung 200 mg serum bovin

albumin, lalu diencerkan 25 kali. Ekstrak yang diuji adalah ekstrak *n*-heksan : etil aseta (90:10), *n*-heksan :etil aseta (95:5), *n*-heksan, etil asetat. Uji ini mengukur kemampuan sampel menghambat konversi *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*-NPG) menjadi *p*-nitrofenol dan α -glukopiranosida yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning. Semakin tinggi hambatan, semakin cerah warna yang dihasilkan. Sampel ekstrak dilarutkan dalam DMSO pada konsentrasi 100, 1000, dan 10.000 ppm. Reaksi dihentikan dengan penambahan Na₂CO₃ 200 mM dan diukur absorbansinya pada 410 nm. Percobaan dilakukan tiga kali dengan kontrol positif Acarbose. Tablet akarbosa digunakan sebagai kontrol positif. Akarbosa dilarutkan dalam buffer dan HCl 2 N (1:1) dan dibuat variasi konsentrasi enzim α -glukosidase 0,00078125 ppm, 0,0015625 ppm, 0,003125 ppm, 0,00625 ppm, 0,0125 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm. Larutan diambil sebanyak 1 μ L dan dimasukkan ke dalam campuran reaksi seperti dalam sampel ekstrak. Sedangkan untuk variasi konsentrasi enzim α -amilase 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm.

Tabel 1. Prosedur uji Aktivitas inhibisi α -glukosidase dan α -amilase

Reagen	Blanko	K	S ₀	S ₁
Ekstrak (μ L)	-	-	1	1
DMSO (μ L)	1	1	-	-
Buffer (μ L)	49	49	49	49
Substrat (μ L)	25	25	25	25
Inkubasi 37 ⁰ selama 5 menit				
Buffer (μ L)	25	-	25	-
Enzim (μ L)	-	25	-	25
Inkubasi 37 ⁰ selama 15 menit				
Na ₂ CO ₃ (μ L)	100	100	100	100

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Sampel ekstrak metanol daun buhu (*Garuga floribunda* Decne) fraksi *n*-Heksan dan etil asetat ini dilakukan dilaboratorium jurusan kimia Universitas Negeri Gorontalo, dan laboratorium Invilab Bioteknologi Rekayasa Indonesia.

Preparasi Sampel

Berat kering sampel yang diperoleh adalah 600 g. Daun buhu kering dihaluskan untuk mendapatkan simplisia. Hasil perhitungan rendemen daun simplisia buhu merupakan hasil

penelitian (Vellia, 2023) sebesar 8,57%. Hal ini menunjukkan bahwa pengeringan sampel menghilangkan kadar air sehingga terjadi penurunan berat sebesar 91,43%.

Ekstraksi Sampel

Daun buhu diekstraksi dengan metode perendaman dalam pelarut methanol selama 3 X 24 jam untuk melarutkan komponen kimia, setiap 24 jam ekstrak akan disaring menggunakan kertas saring dan corong, lalu direndam kembali dalam methanol. Filtrat yang dihasilkan diuap pada suhu 40-45°C. Ekstrak kental yang digunakan diperoleh dari hasil penelitian (Vellia, 2023), melalui proses penguapan adalah 48,8380 g. Rendemen yang diperoleh sebesar 16,27%. Hal ini menunjukkan bahwa pengeringan sampel menghilangkan kadar air sehingga terjadi penurunan berat sebesar 83,73%.

Fraksi Sampel

Metode distribusi cair-cair digunakan pada langkah fraksinasi. 38,6844 g disuspensikan dalam campuran air dan metanol. Kemudian dipartisi bertahap menggunakan larutan *n*-heksan dan etil asetat. Fraksi yang diperoleh kemudian diuapkan dengan evaporator pada suhu 40- 45°C, diperoleh fraksi *n*-heksan 4,6408 g dan fraksi etil asetat 11,6682 g. Hasil rendemen ekstrak dari fraksinasi penelitian (Vellia, 2023).

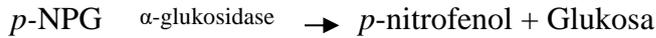
Sisa ekstrak kental metanol sebanyak 10,1536 g dilanjutkan untuk percobaan fraksinasi dan uji inhibisi enzim. Berdasarkan tabel, rendemen tertinggi diperoleh pada fraksi etil asetat dibanding fraksi *n*-heksan. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa daun buhu yang dihasilkan lebih cenderung bersifat polar berdasarkan jumlah ekstrak dan jenis pelarut yang digunakan dalam pengolahannya.

Uji Inhibisi Enzim α -Glukosidase dan α -Amilase

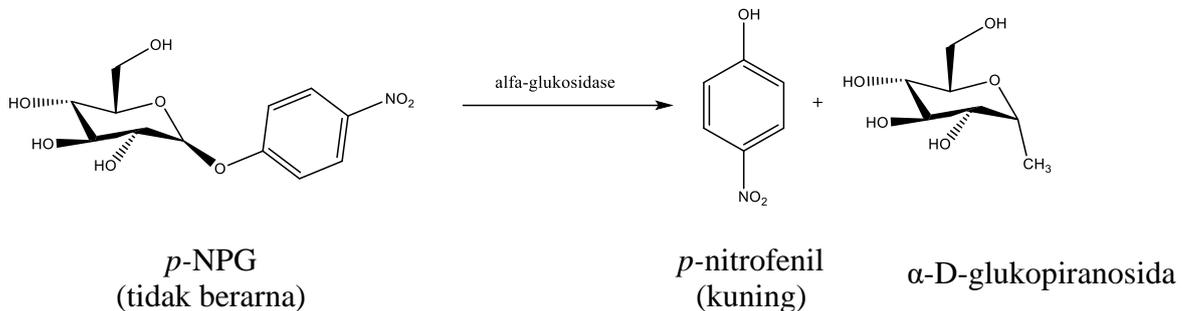
a. Uji Inhibisi Enzim α -Glukosidase

Uji inhibisi enzim α -glukosidase merupakan uji terhadap senyawa yang berpotensi sebagai antidiabetes karena penghambatan enzim α -glukosidase yang mampu menurunkan kadar glukosa darah. Uji ini bertujuan untuk menentukan bagaimana suatu senyawa (inhibitor) menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Enzim α -glukosidase adalah enzim yang memainkan peran penting dalam metabolisme karbohidrat, terutama dengan memecah disakarida dan oligosakarida menjadi glukosa. Pengujian α -glukosidase ini dilakukan secara *in vitro*. Menggunakan spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 410 nm. Dalam uji ini, enzim α -glukosidase menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi *p*-nitrofenol yang berwarna kuning dan glukosa (Sri, 2017).

p-NPG adalah senyawa yang terdiri dari *p*-nitrofenil (sebagai gugus kromofor) yang terikat pada glukosa. Berikut adalah reaksi enzimatisnya :



α -glukosidase memecah *p*-NPG menjadi *p*-nitrofenol dan glukosa. *p*-nitrofenol yang dihasilkan menunjukkan perubahan warna yang dapat diukur. Intensitas warna kuning yang terbentuk dari *p*-nitrofenol ditentukan absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 410 nm. Semakin tinggi kemampuan ekstrak tanaman menghambat aktivitas α -glukosidase, maka akan semakin berkurang *p*-nitrofenol yang terbentuk. Enzim α -glukosidase (Lesmanawati, 2017).



Gambar 1. Reaksi Enzimatis α -glukosidase dan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (Sri, 2017)

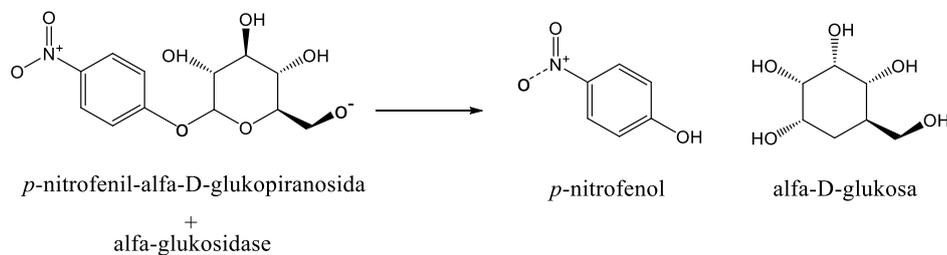
Pada penelitian ini fraksi etil asetat daun buhu kemungkinan dapat menghambat enzim α -glukosidase karena terdapat senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid berfungsi sebagai agen antihiperqlikenik dengan cara menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase terhadap sampel, perbandingan warna yang diperoleh sampel menunjukkan perubahan warna larutan menjadi kuning dengan intensitas warna yang berbeda, hal tersebut menunjukkan bahwa *p*-nitrofenol yang terbentuk semakin sedikit, sehingga kemampuan sampel dalam menghambat enzim α -glukosidase sangat kuat. Setiap fraksi diuji pada beberapa konsentrasi (100 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm) serta kontrol (Blank). Warna yang terlihat, yaitu perubahan menjadi kuning, menunjukkan terbentuknya produk reaksi *p*-nitrofenol- α -glukopiranosida yang dihidrolisis oleh enzim α -glukosidase. Perubahan warna menjadi kuning menunjukkan adanya aktivitas enzim α -glukosidase yang tidak terhambat. Warna kuning yang lebih gelap menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi, artinya fraksi yang diuji tidak mampu menghambat aktivitas enzim secara signifikan. Fraksi dengan sedikit atau tanpa perubahan warna menunjukkan adanya inhibisi aktivitas enzim α -glukosidase, yang artinya fraksi tersebut memiliki potensi sebagai penghambat enzim α -glukosidase. Pada gambar di atas, tampak bahwa

fraksi *n*-Heksan dan fraksi campuran *n*- Heksan :Etil Asetat dengan rasio 90:5 dan 90:10 cenderung lebih menghambat aktivitas enzim (warna yang lebih pucat atau hampir tidak ada perubahan), terutama pada konsentrasi yang lebih rendah (10000 ppm). Sementara itu, fraksi Etil Asetat menunjukkan aktivitas enzim yang relative lebih tinggi (warna kuning lebih pekat) pada konsentrasi yang sama, yang berarti menghambat enzim α -glukosidase oleh fraksi ini tidak seefektif lainnya (Wardani, 2017).

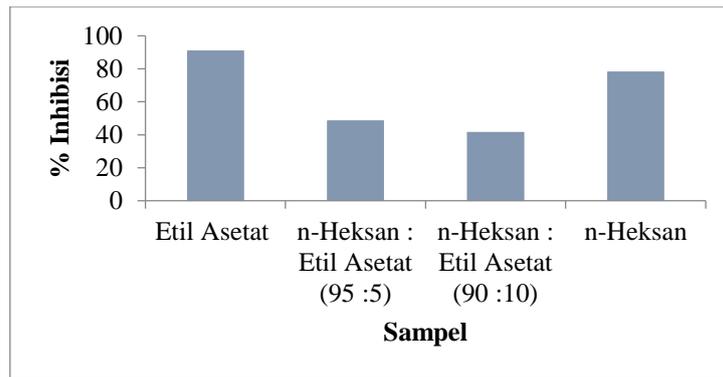
Akarbose sebagai pembanding menghasilkan intensitas warna kuning yang lebih pudar dibandingkan dengan sampel karena akarbose merupakan salah satu agen antidiabetes oral yang bisa digunakan dalam menurunkan kadar glukosa darah pada penderita diabetes tipe II, akarbose dikenal dengan nama Glucobay. Obat ini digunakan untuk menghambat kerja enzim yang memecah karbohidrat menjadi glukosa. Akarbose secara kompetitif menghambat hidrolisis enzimatis oligosakarida oleh enzim α -glukosidase di usus halus (Lesmanawati, 2017).

Enzim α -glukosidase berfungsi untuk menghidrolisis oligosakarida menjadi monosakarida terdapat pada dinding usus halus. Penghambatan kerja enzim ini secara efektif dapat mengurangi pencernaan karbohidrat dalam bentuk molekul besar seperti polisakarida dan oligosakarida menjadi molekul yang lebih sederhana seperti glukosa, sehingga absorpsi glukosa dapat dikurangi (N. Pratiwi, 2023).



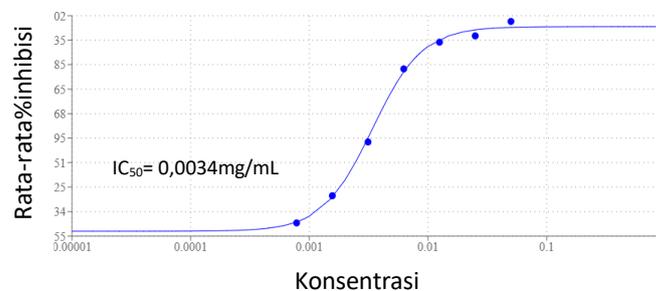
Gambar 2. Reaksi penghambatan enzim α -glukosidase (N. Pratiwi, 2023)

Pengukuran absorpsi *p*-nitrofenol dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut kemampuan dari semua sampel serta standar akarbose dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang dilakukan pada panjang gelombang 410 nm sebagai panjang gelombang optimum yang diperoleh (Ak et al., 2019). Hasil pengukuran aktivitas inhibisi dari sampel ekstrak, fraksinasi, dan akarbose



Gambar 3. Diagram batang persen inhibisi enzim α -glukosidase

Data selanjutnya dapat dibuat dalam bentuk grafik hubungan aktivitas inhibisi dengan konsentrasi sampel, dengan persentase aktivitas inhibisi. Hasil perbandingan dapat ditunjukkan pada gambar di bawah ini.



Gambar 4. Grafik kurva persentase penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase terhadap akarbose

Korelasi antara persentase penghambatan enzim α -glukosidase dan konsentrasi sampel menggambarkan hubungan antara jumlah sampel yang ditambahkan dan efektivitas penghambatan yang dihasilkannya terhadap enzim α -glukosidase. Umumnya, semakin tinggi konsentrasi sampel, maka semakin besar penghambatan yang terjadi. Iniberarti bahwa dengan meningkatnya konsentrasi sampel, jumlah inhibitor yang tersedia untuk menghambat enzim juga meningkat. Akibatnya, aktivitas enzim menurun dan persentase penghambatannya meningkat. Biasanya, hubungan antara konsentrasi sampel dan persentase penghambatan mengikuti kurva sigmoid. Pada konsentrasi rendah, penghambatan mungkin meningkat secara proposional dengan konsentrasi sampel, namun, pada konsentrasi tinggi, penghambatan mungkin mendekati nilai maksimum, dan penambahan lebih banyak sampel mungkin tidak meningkatkan penghambatan secara signifikan (Ariani, 2017).

Pada penelitian ini Acarbose digunakan sebagai pembanding. Alasan dipilihnya acarbose sebagai pembanding adalah karena akarbose telah digunakan secara luas sebagai obat antidiabetes di Indonesia serta mudah didapat dan banyak digunakan sebagai pembanding pada berbagai literatur lainnya. Akarbose yang digunakan sebagai Kontrol positif pada penelitian kali ini memiliki daya inhibisi sebesar 68,36%. Didalam tablet acarbose telah mengandung senyawa aktif yang secara efektif mampu menghambat kerja enzim α -glukosidase, sedangkan dalam ekstrak daun buhu masih mengandung campuran antara senyawa aktif dengan senyawa pengganggu lainnya. Senyawa-senyawa tersebut mungkin dapat meningkatkan kerja enzim α - glukosidase atau sebaliknya, yaitu dapat menghambat kerja senyawa aktif tersebut sehingga menjadi daya inhibisi menurun karena pembentukan produk yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan laju pengikatan inhibitor-enzim (Ak et al., 2019).

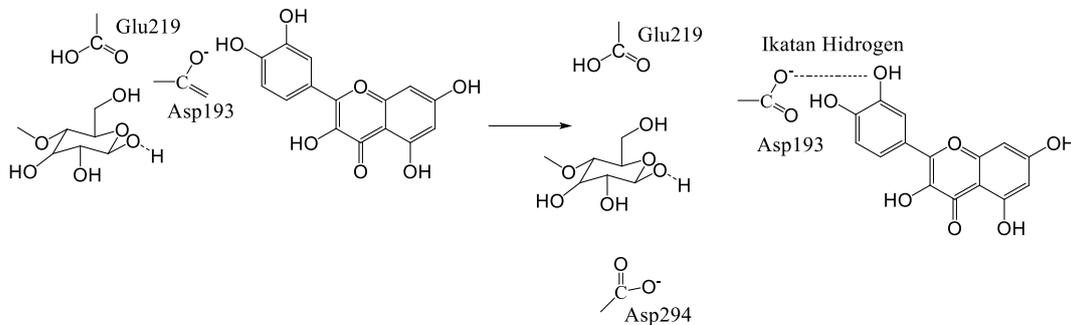
Hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ Acarbose adalah 0,0034. Semakin rendah IC₅₀ menunjukkan bahwa inhibitor lebih efektif karena dosis yang lebih rendah diperlukan untuk menghambat enzim hingga 50%, sebaliknya semakin tinggi IC₅₀ menunjukkan bahwa inhibitor kurang efektif karena diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk mencapai tingkat penghambatan yang sama (Eko Wirawan Budianto et al., n.d.) (Ak et al., 2019).

b. Uji Inhibisi α -Amilase

Uji inhibisi α -amilase digunakan untuk menilai kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat aktivitas enzim α -amilase. α -amilase adalah enzim yang memecah karbohidrat kompleks seperti pati menjadi gula sederhana seperti glukosa, yang kemudian diserap oleh tubuh. α -amilase adalah enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan glikosidik α - 1,4 pada molekul pati (amilosa dan amilopektin) menjadi oligosakarida dan gula sederhana seperti maltosa dan glukosa. Prinsip pengujian sampel yaitu semakin aktif fraksi yang digunakan, maka semakin sedikit pati yang terhidrolisis sehingga glukosa yang dihasilkan semakin sedikit, karena fraksi dapat menghambat aktivitas enzim α -amilase. Aktivitas α -amilase yang dihambat oleh fraksi tidak dapat bereaksi dengan substrat amilum, sehingga intensitas warna yang dihasilkan akan semakin berkurang (Melinda et al., 2023).

Mekanisme penghambatan α -Amilase dilakukan dengan dua cara. Pertama pembentukan kompleks antara inhibitor dan α -Amilase dengan membatasi aktivitas enzim. Kedua, memperlambat difusi glukosa dari sisi aktif, sehingga dapat menunda

pencernaan karbohidrat dan penyerapan glukosa. Dalam hal ini, akan terjadi kompetisi antara substrat dan inhibitor untuk masuk ke dalam sisi aktif enzim, Gugus OH pada cincin B senyawa flavonoid yang berperan sebagai inhibitor akan menyerang gugus C-O pada residu asam amino Asp193, sehingga mencegah enzim α -Amilase untuk menghidrolisis substrat (Daud et al., n.d.)



Gambar 5. Mekanisme pengikatan antara enzim α -Amilase dengan inhibitor flavonoid

Uji aktivitas penghambatan enzim α -Amilase masing-masing menggunakan variasi konsentrasi yang berbeda dari larutan sampel ekstraksi metanol dari tanaman daun Buhu (*Garuga floribunda* Decne) yaitu, 100 ppm, 1000 ppm, 10.000 ppm, konsentrasi yang digunakan berbeda untuk bisa membandingkan dan mengetahui konsentrasi mana yang paling bagus dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase.

Sedangkan larutan kontrol menggunakan campuran larutan yang tidak mengandung ekstrak metanol daun buhu. Pengujian aktivitas inhibisi α -amilase menggunakan spektrofotometri Uv-Vis untuk mengukur potensi inhibisi enzim oleh senyawa atau ekstrak tertentu. Pengukuran absorbansi yang dilakukan pada panjang gelombang 410 nm memungkinkan menilai jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi enzimatik, sehingga memberikan gambaran tentang seberapa kuat suatu senyawa yang menghambat aktivitas α -amilase (Amalia, 2015).

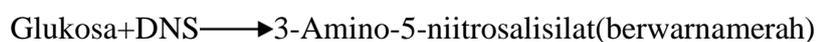
Perbedaan warna dalam uji inhibisi α -amilase memberikan indikasi visual tentang seberapa efektif senyawa atau ekstrak yang diuji dalam menghambat aktivitas enzim tersebut.

Setiap variasi konsentrasi dari larutan sampel dan larutan kontrol dalam pengujian aktivitas penghambatan α -amilase yaitu menggunakan konsentrasi 100, 1000, 10.000 bertujuan untuk mengevaluasi bagaimana efektivitas inhibisi bervariasi dengan perubahan konsentrasi. Hasil yang diperoleh dari pengujian ini, yaitu nilai persentase (%) penghambatan terhadap aktivitas enzim α -Amilase agar dapat digunakan untuk menghitung IC₅₀.

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas inhibisi enzim α -amilase, ke empat sampel menunjukkan perubahan warna larutan menjadi lebih terang dengan intensitas warna yang berbeda, hal tersebut menunjukkan bahwa fraksi dapat bereaksi dengan substrat amilum, sehingga kemampuan sampel dalam menghambat enzim α -amilase sangat kuat. Namun terdapat perbedaan pada intensitas warna yang dihasilkan oleh sampel a menghasilkan warna yang berbeda-beda pada setiap konsentrasinya di mana pada konsentrasi 100 ppm menghasilkan warna kuning terang menunjukkan bahwa sedikit atau tidak ada gula pereduksi yang dihasilkan ini bisa terjadi menunjukkan bahwa enzim α -amilase aktif dan berhasil menghidrolisis pati, kemudian pada konsentrasi 10.000 ppm menghasilkan warna merah bata dan kecoklatan menunjukkan bahwa kemungkinan besar warna ini berasal dari senyawa pigmen dalam ekstrak tumbuhan yang bereaksi dalam uji, atau sebagai hasil degradasi atau oksidasi senyawa dalam kondisi uji menunjukkan bahwa inhibitor tidak efektif dalam menghambat enzim atau konsentrasi inhibitor terlalu rendah atau tinggi untuk memberikan efek yang signifikan (Amalia, 2015).

Sedangkan untuk sampel b,c dan d memiliki intensitas warna yang hampir sama dikarenakan *n*-heksan sebagai pelarut non polar cenderung mengekstraksi lipofilik seperti karotenoid, klorofil atau senyawa lainnya yang umumnya berwarna kuning, orange, merah bata, dan coklat berbeda dengan akarbosa yang menghasilkan warna orange dikarenakan kemampuannya sebagian besar menghambat aktivitas enzim, namun masih memungkinkan sebagian kecil reaksi enzimatik terjadi, sehingga pereduksi gula tetap berbentuk dalam jumlah sedang. Hal ini menandakan bahwa akarbosa dapat menghambat enzim α -amilase.

Pengujian aktivitas penghambatan α -Amilase dilakukan menggunakan metode penambahan DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) yang mampu memecah pati menjadi gula sederhana, seperti glukosa dan maltosa. Berikut adalah reaksinya:



Reaksi ini adalah reaksi reduksi-oksidasi, di mana glukosa mereduksi DNS, mengubahnya dari warna kuning menjadi merah. Semakin banyak gula yang dihasilkan berarti aktivitas enzim α -Amilase tinggi.

Semakin banyak maltosa yang dihasilkan dari pemecahan pati, maka semakin banyak maltosa dan glukosa DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 410 nm. Prinsip pengujian metode DNS adalah untuk melihat reaksi antara maltosa dan

glukosa dengan DNS, sehingga menghasilkan warna yang kompleks dengan larutan uji dan menjadi indikator untuk menunjukkan adanya gula pereduksi. Pengukuran aktivitas penghambatan α -Amilase dilakukan pada panjang gelombang 410 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan jumlah masing-masing larutan (Sugiwati et al., 2009).

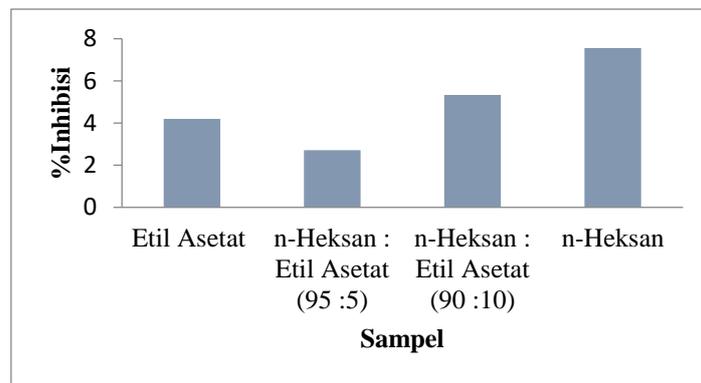
Prinsip pengujian sampel adalah semakin banyak ekstrak yang digunakan, maka semakin sedikit pati terhidrolisis, sehingga glukosa yang dihasilkan semakin sedikit dengan kata lain nilai absorbansi larutan sampel semakin menurun. Hal itu menunjukkan bahwa ekstrak dapat menghambat aktivitas enzim α -Amilase. Aktivitas dari enzim α -Amilase yang telah dihambat oleh ekstrak sampel tidak dapat bereaksi dengan substrat pati, sehingga intensitas warna yang dihasilkan akan semakin berkurang. Berdasarkan dari nilai absorbansinya yang telah diperoleh, nilai presentase (%) penghambatan terhadap aktivitas enzim α -Amilase dari ekstraksi metanol daun Buhu dapat dilihat pada Tabel 4.2

Berdasarkan data pada Tabel 4.2 dinyatakan bahwa fraksi *n*-heksan mempunyai aktivitas inhibitor α -amilase. Konsentrasi yang paling aktif yaitu konsentrasi yang menunjukkan % inhibisi paling besar. Aktivitas inhibitor α -amilase yang tertinggi pada konsentrasi 1000 ppm mempunyai nilai persen inhibisi sebesar 91,4% sedangkan nilai persen inhibisi terendah pada sampel b pada konsentrasi 1000 ppm yang mempunyai nilai persen inhibisi 2,71%. Semakin tinggi konsentrasi sampel yang digunakan maka semakin tinggi aktivitas penghambatan enzim (Sri, 2017).

Pengujian aktivitas enzim α -amilase terdiri dari dua tahap Tahap pertama, hidrolisis pati menjadi maltose yang dikatalis oleh enzim α -amilase. Tahap kedua, reduksi asam 3,5- dinitrosalisilat menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Reaksi hidrolisis pati (tahap 1) berlangsung pada suhu 37⁰C, pH 6,9 dan kondisi buffer fosfat. Kondisi ini sangat sesuai dengan kondisi reaksi dalam tubuh. Ketika larutan DNS ditambahkan pada larutan uji, reaksi hidrolisis pati terhenti karena terjadi perubahan pH larutan, dari pH netral menjadi basa. Fungsi penambahan DNS untuk memberikan reaksi kompleks yang membantu dalam pengukuran absorbansi larutan dan berfungsi menghentikan kerja enzim, sehingga enzim tidak memecah pati (Meila & Noraini, 2017).

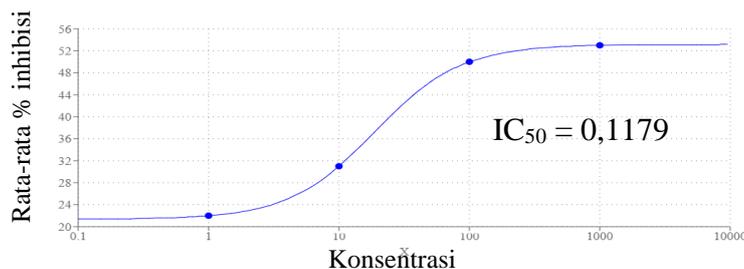
Reaksi reduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (tahap 2) berlangsung pada suasana basa dan suhu tinggi di atas 100⁰C. Tujuan pemanasan adalah untuk mengoptimalkan kerja DNS dan mempercepat reaksi dari DNS untuk menghentikan kerja enzim. Hasil pemanasan kemudian didinginkan untuk menghilangkan DNS yang telah digunakan

untuk menghentikan reaksi asam sulfat. Larutan kemudian diencerkan dengan aquades untuk mengurangi intensitas warna dari indicator DNS agar diperoleh hasil yang akurat dan diukur absorbansi larutan. Semakin aktif suatu sampel dalam menghambat kerja enzim α -amilase, maka semakin sedikit asam 3-amino- 5-nitrosalisilat yang dihasilkan. Semua larutan sampel yang diuji menunjukkan hasil negatif, yaitu tidak dapat menghambat kerja enzim α -amilase. Semakin tinggi konsentrasi maka daya inhibisi dari α -amilase semakin meningkat. Berikut adalah grafik perbandingan persentase inhibisi dari ke empat sampel dapat dilihat pada Gambar 4.9



Gambar 6. Diagram batang persentase inhibisi enzim α -amilase

Besarnya penghambatan kerja enzim α -amilase pada tumbuhan tertentu disebabkan karena adanya senyawa aktif yang berperan sebagai senyawa inhibitor. Konsentrasi yang semakin besar maka jumlah senyawa fitokimia yang berperan sebagai inhibitor semakin tinggi. Efek penghambatan α -amilase dari ekstrak tertentu erat kaitannya dengan keberadaansenyawa fitokimia seperti senyawa fenol, flavonoid, tanin, dan saponin. Semakin tinggi jumlah senyawa tersebut maka daya inhibisi α -amilase semakin besar, namun besarnya inhibisi tidak dapat dipengaruhi hanya dengan salah satu senyawa fitokimia. Hal ini dikarenakan semua senyawa fitokimia yang terkandung dalam ekstrak tertentu ikut berperan dalam menginhibisi kerja enzim. Berikut ini adalah Grafik dari acarbose yang telah di dapatkan.



Gambar 7. Grafik kurva persentase penghambatan aktivitas enzim α -amilase terhadap akarbose

Larutan pembanding yang digunakan sebagai control positif adalah acarbose. Acarbose memiliki nilai IC₅₀,1179 mg/mL. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ Acarbose dibandingkan dengan keempat ekstrak sampel memiliki perbedaan yang cukup jauh. Hal ini disebabkan karena di dalam tablet Acarbose telah mengandung senyawa aktif yang telah efektif dapat menghambat kerja enzim α -amilase, sedangkan di dalam ekstrak yang dimiliki masih mengandung senyawa campuran antara senyawa aktif dengan senyawa pengganggu lainnya. Senyawa pengganggu yang dimaksud dapat berupa activator atau senyawa sakarida yang berbentuk disakarida dan oligosakarida. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat menaikkan kecepatan reaksi enzimatik atau mencegah kerja inhibitor. Ion logam yang berperan sebagai activator adalah Ca²⁺, sedangkan ion logam yang berperan sebagai inhibitor adalah Na⁺, K⁺, Zn (Supriati et al., 2021).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil uji inhibisi enzim α -glukosidase oleh ekstrak metanol daun buhu (*Garuga floribunda* Decne) dalam penelitian ini didapat nilai % inhibisi dari ke empat sampel, dua sampel dikategorikan sangat aktif sebagai antidiabetes yaitu sampel Etil Asetat dengan nilai Inhibisi (91,09) dan *n*-Heksan dengan nilai Inhibisi (78,27), sedangkan pada enzim α -amilase ke dua sampel lainnya tidak aktif sebagai antidiabetes yaitu *n*-Heksan : Etil Asetat 95:5 dengan nilai Inhibisi (48,7) dan *n*-Heksan : Etil Asetat 90:10 dengan nilai Inhibisi (41,62). Dalam penelitian ini didapat nilai % inhibisi dari ke empat sampel dikategorikan tidak aktif sebagai antidiabetes. Konsentrasi yang optimum dari ekstrak metanol daun buhu (*Garuga floribunda* Decne) untuk enzim α -glukosidase dan enzim α -amilase sebesar 1000 ppm.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut seperti isolasi dan karakterisasi pada daun buhu (*Garuga floribunda* Decne) sehingga nantinya dapat dikembangkan sebagai obat diabetes mellitus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Program studi Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Gorontalo yang telah menyediakan tempat dalam proses penelitian ini.

DAFTAR REFERENSI

- AK, M. D., Juliani, J., Sugito, S., & Abrar, M. (2019). α -Amylase and α -Glucosidase inhibitors from plant extracts. *Jurnal Medika Veterinaria*, 13(2).
- Amalia, I. (n.d.). Eksplorasi senyawa aktif inhibitor α -Amilase dari ekstrak daun namnam (*Cynometra cauliflora*). *Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*.
- Ariani, N. (2017). Uji inhibisi aktivitas enzim α -Glukosidase secara *in vitro* dari ekstrak metanol dan fraksi-fraksinya daun *Cryptocarya densiflora ensiflora* Blume. *Universitas Negeri Jakarta*.
- Buenavista, D., & Mateo, M. (2017). Histochemical screening and medicinal potentials of *Garuga floribunda* in Mindanao Island, Philippines. *Annales of West University of Timisoara. Series of Biology*, 20(2), 147–152.
- Fajarna, F., Putri, S. K., & Irayana, N. I. (2022). Perbedaan kadar glukosa darah berdasarkan hasil pemeriksaan spektrofotometer dengan glukometer di UPTD Puskesmas Sukajaya Kota Sabang. *Jurnal SAGO Gizi dan Kesehatan*, 4(1), 89–96.
- Heliawati, L. (2018). *Kimia organik bahan alam*. Bogor: Universitas Pakuan.
- Julianto, T. S. (2019). *Fitokimia: Tinjauan metabolit sekunder dan skrining fitokimia*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.
- Lesmanawati, V. (2017). Uji aktivitas inhibisi enzim α -Glukosidase dari ekstrak metanol dan fraksi-fraksinya daun *Vitex trifolia* Linn asal Yogyakarta secara *in vitro*. *Universitas Negeri Jakarta*.
- Meila, O., & Noraini, N. (2017). Uji aktivitas antidiabetes dari ekstrak metanol buah kiwi (*Actinidia deliciosa*) melalui penghambatan aktivitas α -Glukosidase. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 3(2), 132–137.
- Melinda, N. A., Kusumo, D. W., & Sari, D. I. K. (2023). Aktivitas antidiabetes beberapa fraksi daun mimba (*Azadirachta indica*) secara *in vitro* berdasarkan penghambatan enzim α -Amilase. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 27(3), 82–87.
- Minarni, E., Armansyah, T., & Hanafiah, M. (2013). Daya larvasida ekstrak etil asetat daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(1).
- Nugraha, M. R., & Hasanah, A. N. (2018). Review artikel: Pengujian aktivitas antidiabetes. *Farmaka*, 16(3).
- Pratiwi, N. (n.d.). Aktivitas antidiabetes ekstrak etanol buah bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam.) secara *in vitro* melalui penghambatan α -Glukosidase.
- Putri, L. A. (2015). Uji aktivitas inhibisi alfa-Glukosidase fraksi etil asetat beberapa varian daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) daerah Jember sebagai antidiabetes.

- Sinulingga, S., Subandrate, S., & Safyudin, S. (2020). Uji fitokimia dan potensi antidiabetes fraksi etanol air benalu kersen (*Dendrophthoe petandra* (L.) Miq). *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 16(1), 76–83.
- Sri, W. (2017). *Biokimia enzim dan karbohidrat*. Unimal Press.
- Sugiwati, S., Setiasih, S., & Afifah, E. (2009). Antihyperglycemic activity of the *Mahkota Dewa* (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) leaf extracts as an α -Glucosidase inhibitor. *Makara Journal of Health Research*, 13(2), 74–78.
- Supriati, H. S., Abdullah, A., & Hidayat, M. (2021). Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun kayu kambing (*Garuga floribunda*, Decne) pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 5(2), 39–48.
- Vellia, C. P. (2023). Uji toksisitas ekstrak daun buhu (*Garuga floribunda* Decne) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Skripsi, Universitas Negeri Gorontalo*.
- Wardani, N. A. K. (2017). Enzim α -Amilase inhibitor pada ekstrak air kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) untuk penanggulangan diabetes melitus. *Jurnal Ilmu Pangan dan Hasil Pertanian*, 1(2), 50–59.