

## UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN ALFA AMILASE EKSTRAK DAUN TITHONIA DIVERSIFOLIA SECARA IN VITRO

<sup>1</sup>Sri Peni Fitriyaningsih, <sup>2</sup>Indra Topik Maulana, <sup>3</sup>Ratu Choesrina, <sup>4</sup>Desirian  
Dwiputri, <sup>5</sup>Ratih Aprilliani

<sup>1,2,3,4,5</sup>Fakultas MIPA, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranggamalela No. 1 Bandung 40116

e-mail: <sup>1</sup>sri.peni.f@unisba.ac.id

*Abstrak.* Ekstrak daun *Tithonia diversifolia* (*T. diversifolia*) terbukti pada penelitian secara *in vivo* dapat menurunkan glukosa darah. Daun *T. diversifolia* mengandung flavonoid, dimana dapat berpotensi menghambat alfa amilase dan alfa glukosidase. Penelitian ini menguji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -amilase ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksan daun *T. diversifolia* secara *in vitro* menggunakan metode penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase. Penelitian ini meliputi pengujian parameter standar simplisia dan skrining fitokimia, pengujian aktivitas antidiabetes. Semua ekstrak dapat menghambat aktivitas alfa amilase tapi tidak lebih baik dari akarbose.  $IC_{50}$  ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol berturut-turut sebesar 964,95, 855,423 dan 841,498  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan  $IC_{50}$  akarbose sebagai pembandingan sebesar 0,326  $\mu\text{g/mL}$ .

**Kata kunci :** daun *T. diversifolia*, penghambatan alfa amylase, *in vitro*

### 1. Pendahuluan

Diabetes mellitus (DM) adalah suatu gangguan metabolisme yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein akibat penurunan sekresi insulin atau penurunan sensitifitas insulin, atau keduanya dengan manifestasi klinis berupa hiperglikemik (Dipiro, 2008). Dan merupakan penyakit kronis progresif yang menjadi salah satu permasalahan medis. Data dari studi global menunjukkan bahwa jumlah penderita DM pada tahun 2012 mencapai 371 juta jiwa (International Diabetes Federaton, 2013). Pada tahun 2013, proporsi penduduk Indonesia yang berusia  $\geq 15$  tahun dengan DM adalah 6,9 persen. Prevalensi diabetes yang terdiagnosis dokter tertinggi terdapat di DI Yogyakarta (2,6%), DKI Jakarta (2,5%), Sulawesi Utara (2,4%), dan Kalimantan Timur (2,3%) (Kemenkes, 2014)

Salah satu tumbuhan yang diketahui memiliki aktivitas antidiabetes adalah daun *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray. Daun *T. diversifolia* merupakan tanaman tahunan asli dari Amerika Tengah. Tanaman ini sering disebut bunga matahari Meksiko, dari keluarga Asteraceae yang telah berabad-abad digunakan sebagai makanan dan obat tradisional. Beberapa aktivitas biologis dan farmakologis lainnya seperti antimalaria, antiinflamasi, *liver protection*, antiviral, antiproliferasi, analgetika, antioksidan, insektisida, sitotoksik, antimikroba, penyembuh luka dan gangguan pencernaan (Lawal *et. al.*, 2012; Kandungu *et. al.*, 2013). Ekstrak etanol 80% Nitobegiku (herbal *T. diversifolia*) dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes (Miura *et. al.*, 2005). Di Jepang, daun *T. diversifolia* pertama kalinya digunakan sebagai teh herbal antidiabetes (Grau, 1997).

Berdasarkan studi fitokimia yang dilakukan oleh Gama *et. al.* (2014) yang meneliti ekstrak etanol bunga *T. diversifolia* melaporkan bahwa bunga *T. diversifolia*

mengandung senyawa fenolat (tanin, flavonoid dan fenol total). Tadera *et. al.* (2006) telah membuktikan secara *in vitro*, flavonoid dari suatu senyawa dapat berpotensi menghambat alfa amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Alfa amilase dan alfa glukosidase merupakan enzim yang berfungsi mencerna karbohidrat menjadi karbohidrat sederhana dan glukosa. Sehingga aktivitas penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase dapat berfungsi menurunkan kadar glukosa darah dengan cara menunda absorpsi glukosa dan menghambat kenaikan glukosa darah post-prandial (Lhoret dan Chiasson, 2004).

Penurunan kadar glukosa darah oleh ekstrak daun *T. diversifolia* terbukti secara *in vivo* pada penelitian sebelumnya (Thongsom *et. al.*, 2013), namun belum diketahui mekanisme kerjanya. Berdasarkan hal tersebut, untuk mengkaji mekanisme kerja daun *T. diversifolia* sebagai antidiabetes antidiabetes ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksan daun *T. diversifolia* secara *in vitro*.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan yaitu apakah ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksan daun *T. diversifolia* memiliki aktivitas antidiabetes yang diuji secara *in vitro*. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antidiabetes ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksan daun *T. diversifolia* secara *in vitro* menggunakan metode penghambatan enzim alfa amilase. Sedangkan manfaat dari penelitian ini adalah dapat diperoleh informasi ilmiah tentang manfaat daun *T. diversifolia* sebagai antidiabetes dengan mekanisme inhibisi alfa amilase sehingga pemanfaatan daun *T. diversifolia* untuk kesehatan dapat lebih optimal.

## 2. Material dan Metoda

### 2.1 Bahan

Daun *T. diversifolia* yang diperoleh dari daerah Sukabumi dan dilakukan determinasi di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung; enzim alfa amylase.

### 2.2 Metoda Ekstraksi

Simplisia daun *T. diversifolia* diekstraksi secara bertingkat dengan metode refluks dan menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, berturut-turut diekstraksi menggunakan n-heksana, etil asetat, kemudian metanol. Lalu masing-masing ekstrak cair dipisahkan dengan bantuan *rotary vacuum evaporator* pada suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  sampai diperoleh ekstrak kental yang masih dapat dituang, kemudian dipisahkan kembali dengan batuan *waterbath* pada suhu  $\pm 60^{\circ}\text{C}$  hingga diperoleh ekstrak kental.

### 2.3 Uji Aktivitas Penghambatan Alfa Amilase

Pengujian dilakukan dengan menyiapkan larutan ekstrak n-heksana daun *T. diversifolia* dan acarbose sebagai pembanding. Konsentrasi ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun *T. diversifolia* yang digunakan yaitu 500 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm sedangkan konsentrasi acarbose yaitu 1 ppm, 2 ppm dan 3 ppm. Sebanyak 0,25 mL daun *T. diversifolia* ditambahkan 0,25 mL larutan enzim 1 U/mL, dihomogenkan, diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Setelah itu ditambahkan 0,25 mL larutan substrat (pati), dihomogenkan, diinkubasi kembali selama 10 menit. Larutan hasil inkubasi, ditambahkan 0,25 mL DNS lalu dipanaskan dalam penangas air  $93-95^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit sampai terbentuk warna merah kecoklatan. Larutan tersebut didinginkan sampai suhu ruang lalu ditambahkan 2,5 mL aquadeion. Lalu diukur

absorbansinya di panjang gelombang 540 nm (Odav *et al.*, 2010 dan Sigma, 1997). Panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang maksimum asam 3-amino-5-dinitrosalisilat. Serapan larutan yang diukur adalah serapan blanko kontrol negatif ( $C_0$ ), kontrol negatif ( $C_1$ ), serapan sampel dengan enzim ( $S_1$ ) dan blanko sampel uji ( $S_0$ ). Persentase inhibisi alfa amilase ditentukan dengan persamaan berikut :

$$\% \text{Inhibisi} = (K-B) - (S-S_0) / (K-B) \times 100$$

### 3. Hasil dan Pembahasan

Simplisia daun *T. diversifolia* diekstraksi secara bertingkat dengan metode refluks karena dapat dilakukan dalam waktu yang relatif lebih cepat. Rendemen secara berurutan untuk n-heksana, etil asetat dan metanol adalah : 2,747%; 4,183%; 11,633%. Kecilnya nilai ekstrak n-heksana disebabkan oleh polaritas pelarut n-heksana yang hanya dapat menarik senyawa-senyawa non polar dari daun *T. diversifolia*. Di samping itu nilai kadar sari larut etanol yang dimiliki simplisia (12,240%) lebih kecil dibandingkan dengan kadar sari larut air (20,810%). Hal ini menunjukkan jumlah senyawa kurang polar yang terdapat pada simplisia daun *T. diversifolia* lebih sedikit dibandingkan dengan senyawa polar.

Pada penelitian ini dilakukan juga standardisasi terhadap simplisia dan ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol berupa pengujian parameter standar spesifik, dimana hasilnya dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1**  
**Hasil Pengujian Parameter Standar Simplisia dan Ekstrak**

Parameter Pengujian	Hasil Uji			
	Simplisia	Ekstrak		
		n-heksana	Etil asetat	Metanol
Bobot jenis	-	0,669	0,900	0,801
Susut pengeringan	8,957%	-	-	-
Kadar Air	5,200%	-	-	-
Kadar Abu Total	11,918%	-	-	-
Kadar abu tidak larut asam	0,708%	-	-	-

**Keterangan:** (-) = tidak dilakukan pengujian

Bobot jenis merupakan suatu parameter standar yang penting untuk suatu ekstrak, dimana memberikan batasan besarnya masa per satuan volume, yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat yang masih dapat dituang (Depkes, 2000). Parameter standar susut pengeringan ditentukan untuk mengetahui batas maksimal atau rentang besarnya senyawa yang hilang saat proses pengeringan.

Pengujian kadar air dilakukan untuk menentukan rentang batasan kadar air pada suatu bahan yang menentukan kualitas suatu simplisia, dimana secara umum kandungan air yang terdapat pada simplisia sebaiknya kurang dari 10%. Kadar air yang bernilai >10% akan lebih cepat ditumbuhi mikroba, jamur atau serangga hingga akan mempercepat pembusukkan tanaman. Dan nilai kadar air yang didapat memenuhi

standar. Sedangkan penentuan kadar abu dari suatu bahan dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral dan zat-zat anorganik yang terdapat dalam simplisia (Depkes RI, 2000).

Penapisan fitokimia dilakukan sebagai tahap awal untuk mengetahui kandungan golongan senyawa kimia yang terdapat pada bahan. Penapisan fitokimia dilakukan pada simplisia dan ekstrak, untuk mengetahui pengaruh proses ekstraksi terhadap kandungan senyawa kimia yang terdapat pada simplisia.

**Tabel 2**  
**Hasil Penapisan Fitokimia**

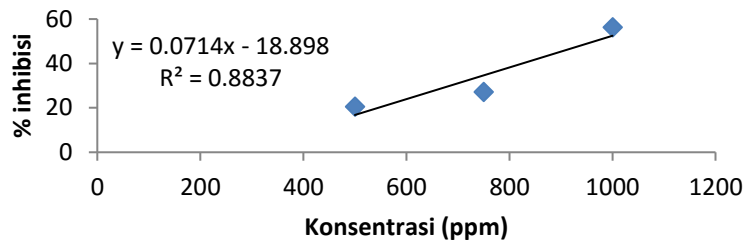
Senyawa	Simplisia	Ekstrak n-heksana	Ekstrak etil asetat	Ekstrak metanol
Alkaloid	(-)	(-)	(-)	(-)
Polifenolat	(+)	(-)	(+)	(+)
Flavonoid	(+)	(+)	(+)	(+)
Tanin	(+)	(-)	(+)	(+)
Kuinon	(+)	(-)	(+)	(+)
Saponin	(+)	(-)	(-)	(+)
Monoterpen/Sesquiterpen	(+)	(+)	(-)	(+)
Triterpen Steroid	(+)	(+)	(+)	(+)

**Keterangan :** (+)= Terdeteksi  
(-)= Tidak terdeteksi

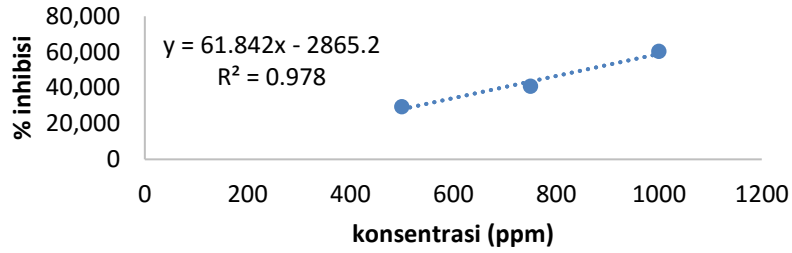
Jika dilihat dari tabel 2 pada simplisia dan ekstrak terdapat beberapa perbedaan kandungan senyawa. Kandungan senyawa yang terdeteksi pada simplisia dan ketiga ekstrak adalah flavonoid dan steroid.

Pengujian penghambatan alfa amilase dilakukan untuk mengetahui penurunan aktivitas enzim alfa amilase dalam memecah pati. Semakin banyak maltosa yang dihasilkan dari sebuah pati artinya semakin banyak pati yang terhidrolisis menjadi maltosa dan glukosa. Prinsip pengujian adalah melihat reaksi antara maltosa dan glukosa dengan DNS (3,5-dinitosalisilat) sehingga menghasilkan warna. Dan pemanasan pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 5 menit untuk menghentikan reaksi karena enzim terdenaturasi. Inkubasi dilakukan pada suhu 37<sup>0</sup>C karena merupakan suhu untuk enzim alfa amilase bekerja (Samudra *et al.*, 2015).

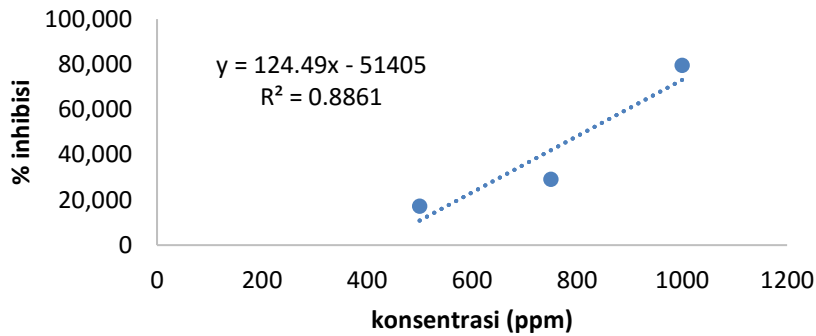
Untuk mendapatkan persamaan regresi linier maka dibuat kurva baku antara % inhibisi ekstrak dan juga akardose terhadap konsentrasi masing-masing.



**Gambar 1.** Kurva % inhibisi alfa amilase ekstrak n-heksana daun *T. Diversifolia*



**Gambar 2.** Kurva % inhibisi alfa amilase ekstrak etil asetat daun *T. diversifolia*



**Gambar 3.** Kurva % inhibisi alfa amilase ekstrak metanol daun *T. diversifolia*

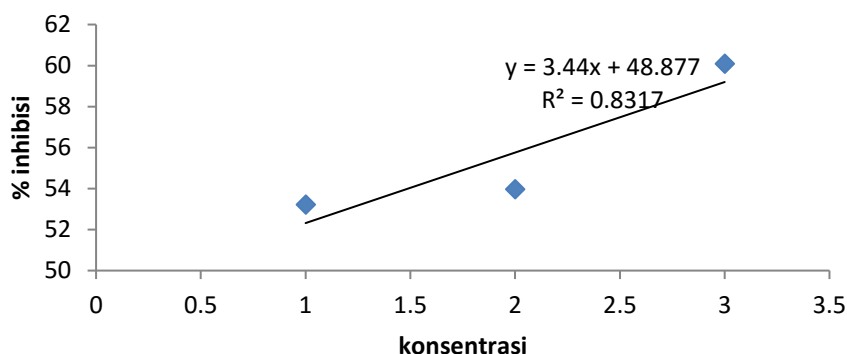
Dari persamaan regresi linier terdapat koefisien y sebagai  $IC_{50}$ , sedangkan koefisien x pada persamaan ini adalah konsentrasi ekstrak yang akan dicari nilainya. Dimana konsentrasi ekstrak tersebut merupakan konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim alfa amilase. Nilai % inhibisi dan  $IC_{50}$  dari masing-masing ekstrak dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini.

**Tabel 3**

**Nilai % Inhibisi dan IC50 Ekstrak n-Heksan, Etil asetat, Metanol Daun T. diversifolia**

Konsentrasi	% inhibisi			IC 50 (ppm)		
	Ekstrak n-heksan	Ekstrak etil asetat	Ekstrak metanol	Ekstrak n-heksan	Ekstrak etil asetat	Ekstrak methanol
500	20,53	29,394	17,282	964,950	855,423	814,498
750	27,16	40,840	29,082			
1000	56,22	60,315	79,528			

Pada penelitian ini digunakan akarbose sebagai pembanding. Acarbose merupakan obat antidiabetes yang dapat memperlambat absorpsi gula setelah makan yaitu dengan menunda hidrolisis karbohidrat, disakarida dan absorpsi glukosa; serta menghambat metabolisme sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (You *et al.*, 2012). Pembanding akarbose dibuat dengan 3 konsentrasi yaitu 1 ppm, 2 ppm, dan 3 ppm. Nilai % inhibisi dan IC<sub>50</sub> dari akarbose dapat dilihat pada tabel dan gambar 4 dibawah ini.



**Gambar 4.** Kurva % Inhibisi alfa amilase Akarbose

**Tabel 4**

**Nilai % Inhibisi dan IC<sub>50</sub> Akarbose**

Konsentrasi akarbose (ppm)	% inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
1	53,213	0,326
2	53,966	
3	60,090	

Nilai % inhibisi dari ekstrak ataupun akarbose meningkat seiring kenaikan konsentrasi, artinya disini konsentrasi mempengaruhi kekuatan efek yang dihasilkan. Dari hasil penelitian diatas didapat % inhibisi ketiga ekstrak adalah lebih kecil dibandingkan dengan akarbose, sehingga nilai IC<sub>50</sub> pada ketiga ekstrak akan lebih besar dari akarbose. Senyawa yang diduga memiliki peran dalam penghambatan enzim alfa amilase adalah senyawa flavonoid. Dimana pada penelitian Tadera *et al.*,(2005), membuktikan bahwa senyawa flavonoid dapat berperan sebagai inhibitor alfa amilase dan alfa glukosidase.

#### 4. Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ketiga ekstrak memiliki aktivitas antidiabetes dengan adanya aktivitas penghambatan alfa amilase tapi tidak lebih baik dari akarbose, dimana nilai IC<sub>50</sub> ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun *T. diversifolia* berturut-turut sebesar 964,95, 855,423 dan 841,498 µg/mL sedangkan IC<sub>50</sub> akarbose sebagai pembanding sebesar 0,326 µg/mL.

Untuk penelitian selanjutnya disarankan menggunakan enzim yang lebih spesifik yaitu enzim alfa glukosidase.

#### Daftar pustaka

- DepKes RI (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dipiro, J.T. (2008). *Pharmacotherapy Handbook*. Seventh edition. Mc Graw Hill Companies Inc., New York.
- Elufioye, T.O., O.I. Alatisse, F.A. Fakoya, J.M. Agbedahunsi, P.J. Houghton (2009). Toxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. Gray (Asteraceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 410-415.
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plant. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Gama, R.M., M. Guimarães, L.C. de Abreu, J. Armando-Junior (2014). Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray dry flowers. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(9):740-742.
- Grau, A., J. Rea. (1997). Yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.&Endl.) H. Robinson, in: M.Hermann, J. Heller. *Andean roots and tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon*. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21, IPK, Gatersleben/IPGRI, Rome, Italy, pp. 199–256.
- Hardoko, A. Febriani, T. Siratantri (2015). Aktivitas antidiabet secara invitro agar-agar, agarosa, dan agaropktin dari rumput laut *Gracilaria gigas*. *Jurnal Pengolahan Hasil perikanan Indonesia (JPHPI)*, 18(2):128-139.
- Harborne (1987). *Metode Fitokimia, Penentuan Modern Menganalisa Tumbuhan*, Terbitan ke-2. Terjemahan Padmawinata, K. dan Soediro, I. Bandung : Penerbit ITB. Hal: 71.
- Hutapea, J.R. (1994). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Jilid III*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia dan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kandungu, J., P. Anjarwalla, L. Mwaura, D.A. Ofori, R. Jamnadass, P.C. Severson dan P. Smith (2013). *Pesticidal Plant Leaflet Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray*. Kew Royal Botanic Gardens, World Agroforestry Centre.
- Kemkes RI (2014). *Riset Kesehatan Dasar: Riskesdas 2014*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Lawal, O.A., K. Adeleke, A.R. Opoku, A.O. Oyedeki (2013). *Volatile Constituent of the Flowers, Leaves, Stem and Roots of Tithonia diversifolia (Hemsely) A. Gray*. *Journal of essential oil-bearing plants JEOP*, 15(5): 816-821.
- Lhoret, R., and J.L. Chiasson (2004). Alpha-Glucosidase Inhibitors. In: Defronzo, R.A., E. Ferrannini, H. Keen and P. Zimmet (Eds.) *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Vol.1, third ed. John Wiley and Sons Ltd., UK., pp 901-914.
- Miura, T., K. Nosaka, H. Ishii, and T. Ishida (2005). Antidiabetic Effect of Nitobegiku, the Herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay Diabetic Mice, *Biol. Pharm. Bull.* 28(11):2152-2154.
- Odhav, B., T. Kandasamy, N. Khumalo. and H. Baijnath. (2010). Screening of African Traditional Vegetables for their Alpha-amylase Inhibitory Effect. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 4 No. 14.
- Samudra, A. G., A. E. Nugroho, A. Husni. (2015). Aktivitas Inhibisi ct-amilase Ekstrak Karagenan dan Senyawa Polifenol dari *Eucheuma denticulatum*. *Media Farmasi*. Vol. 12 No. 1.
- Sigma. (1997). *Enzymatic Assay of a-Amylase (EC 3.2.1.1)*. (<http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>). Diunduh pada tanggal 8 Februari 2016.
- Tadera, K., Y. Minami, K. Takamatsu, and T. Matsuoka (2006). Inhibition of α-

- Glukosidase and  $\alpha$ -Amylase of Flavonoids. *J Nutr. Sci. Vitaminol.*, 52: 149-153.
- Tjay, T.H. dan K. Rahardja (2007). *Obat-Obat Penting*. PT Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Wahyuntari, B. (2011). Penghambatan  $\alpha$ -Amilase: Jenis, Sumber, dan Potensi Pemanfaatannya dalam Kesehatan. *J. Tekhnol dan Industri Pangan*. Vol. XXII No. 2.
- You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y. and Lin, S. (2012). AntiDiabetic Activities of Phenolic Compounds in Muscadine Against AlphaGlucosidase and Pancreatic Lipase. *LWT - Food Science and Technology*, 46.