

Aktivitas Inhibitor α -Amilase Ekstrak Etanol Tanaman Brotowali (*Tinospora crispa* L.)

α -Amilase Activity Extract Ethanol Of Brotowali Plant (*Tinospora crispa* L.)

Sri Pujiyanto, Wijanarka, Budi Raharja dan Via Anggraeni

Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika
Universitas Diponegoro Semarang
Corresponding Author, E-mail: spbio92@gmail.com

Abstract

Brotowali plant (*Tinospora crispa* L.) is a traditional Indonesian medicinal plant which has many benefits including for diabetes drugs. Diabetes mellitus (DM) is a metabolic abnormality caused by an increase in blood sugar levels. The purpose of this study was to determine the activity of α -amylase inhibitors of Brotowali (*T. crispa* L.) ethanol extract of plants. Extraction is done by maceration followed by evaporation. The extract obtained was tested for α -amylase inhibitor activity. The α -amylase inhibition test is based on the breakdown of starch substrates into maltose and glucose which is then determined by spectrophotometer after administration of DNS. Tests are carried out on controls and samples. As a substrate is 0.5% starch solution in 100 ml of sterile aquades. The reaction mixture was incubated 25 ° C for 10 minutes. The reaction is stopped by adding 2 ml of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). All the mixed solutions are then heated to 100 ° C for 5 minutes and allowed to cool. The change in color of the solution is then measured for its absorbance at a wavelength of 540 nm. As a comparison used a control test that did not use extract samples. The results of α -amylase inhibitor activity test showed that ethanol extract with a concentration of 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ had the highest inhibitory activity value of 95.06% compared to extract concentration of 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The results of testing the effect of substrate concentration showed that 0.5% starch concentration had the highest inhibitory value of 9.52% compared to 2%, 1% and 0.25% concentrations

Key words: *Brotowali plant, α -amylase, ethanol extract*

Abstrak

Tanaman brotowali (*Tinospora crispa* L.) merupakan tanaman obat tradisional Indonesia yang memiliki banyak khasiat diantaranya untuk obat diabetes. Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit abnormalitas metabolisme yang disebabkan oleh peningkatan kadar gula darah. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas inhibitor α -amilase ekstrak etanol tanaman Brotowali (*T. crispa* L.). Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dilanjutkan dengan evaporasi. Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas inhibitor α -amilase. Uji penghambatan α -amilase dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat amilum menjadi maltosa dan glukosa yang selanjutnya ditentukan dengan spektrofotometer setelah pemberian DNS. Pengujian dilakukan pada kontrol dan sampel. Sebagai substrat adalah larutan amilum 0,5% dalam 100 ml aquades steril. Campuran reaksi diinkubasi 25°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 ml 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Semua larutan yang telah dicampurkan kemudian dipanaskan 100°C selama 5 menit dan dibiarkan dingin. Perubahan warna larutan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai pembanding digunakan uji kontrol yang tidak menggunakan sampel ekstrak. Hasil pengujian aktivitas inhibitor α -amilase menunjukkan bahwa ekstrak etanol dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mempunyai nilai aktivitas inhibisi tertinggi yaitu 95,06 % dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hasil pengujian pengaruh konsentrasi substrat menunjukkan bahwa konsentrasi amilum 0,5% mempunyai nilai inhibisi paling tinggi yaitu 9,52 % dibandingkan dengan konsentrasi 2%, 1% dan 0,25%.

Kata kunci : *Tanaman Brotowali, α -amylase, ekstrak ethanol*

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit abnormalitas metabolisme yang disebabkan oleh peningkatan kadar gula darah (glukosa) seseorang di dalam tubuh yang melebihi batas normal (hyperglycemia). Hyperglycemia terjadi akibat dari

penurunan sekresi insulin baik secara total maupun sebagian. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memprediksi adanya peningkatan jumlah penyandang DM yang cukup besar untuk tahun-tahun mendatang. Berdasarkan data WHO, Indonesia merupakan urutan terbesar ke-4 dalam

jumlah penderita DM di dunia. Sebagian besar masyarakat di Indonesia menggunakan obat tradisional dari tanaman dalam mengobati berbagai macam penyakit seperti DM. Penggunaan tanaman obat secara tradisional pada umumnya memiliki efek samping yang jauh lebih rendah tingkat bahayanya dibandingkan dengan obat-obat sintetik atau kimiawi. Penggunaan tanaman sebagai obat relatif lebih ekonomis. Brotowali (*Tinospora crispa* L.) merupakan salah satu tanaman obat untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti diabetes. Brotowali (*T. crispa*) berasal dari Asia Tenggara dan digunakan sebagai obat antidiabetes. Bagian tanaman ini yang digunakan sebagai obat yaitu daun, batang, akar dan kulit batang.

Brotowali (*T. crispa*) merupakan tanaman yang sudah dikenal sebagai obat. Daunnya digunakan untuk mengobati rematik. Batangnya digunakan untuk menstimulasi sekresi empedu, diuretik, penyakit kulit, antidiabetes, antipiretik, antimalaria, diare, memperbaiki sistem pencernaan, merangsang nafsu makan, batuk, demam dan cacingan. Kombinasi batang dan akarnya digunakan untuk penawar racun. Kulit batangnya digunakan untuk antialergi, antispasmodik dan antilepra. Air rebusan daunnya sering dimanfaatkan untuk mencuci luka pada kulit atau gatal-gatal. Sedangkan rebusan daun dan batangnya dipergunakan untuk menurunkan kadar glukosa darah pada penyakit DM. Secara kimia, brotowali (*T. crispa*) mengandung alkaloid, diterpenoid, flavonoid, fenol, lakton dan lignin. Komponen utama yang telah diidentifikasi aktif adalah terpenoid dan terpenoid glikosida. Senyawa terpenoid glikosida yang berperan menurunkan serum gula darah pada diabetes tipe kedua adalah borapetoside C dan borapentol B. (Rosidah, 2015). Batang brotowali (*T. crispa*) mengandung senyawa alkaloid 2,22 %, barberin, zat pahit, kolumbin, glukosid dan pikokarotin (Dweck, 2006).

Penelitian ini dilakukan dengan menguji ekstrak etanol tanaman brotowali (*T. crispa*) untuk mengetahui konsentrasi pengenceran ekstrak dan konsentrasi substrat amilum yang paling baik kemampuan inhibitor α -amilasena yang diharapkan mampu dijadikan alternatif sumber penghasil obat DM. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas inhibitor α -amilase ekstrak etanol tanaman Brotowali (*Tinospora crispa* L.) dalam menghambat kerja enzim α -amilase.

METODE PENELITIAN

Penanganan sampel tanaman

Langkah pertama yaitu, batang brotowali (sebaiknya yang sehat dan tidak cacat) dipotong-potong menggunakan gunting dengan ukuran sekitar 2-3 cm. Sampel batang kemudian dijemur dibawah sinar matahari sampai kering.

Ekstraksi tanaman

Sampel potongan-potongan tanaman brotowali yang sudah kering dimasukkan kedalam erlenmeyer, kemudian direndam dengan etanol sampai tergenang. Setelah dilakukan perendaman selama 24 jam larutan yang terbentuk diambil dan dipindahkan kedalam tabung erlenmeyer lain dan ditutup dengan rapat menggunakan plastik yang diikat karet. Langkah ini dilakukan sampai berulang-ulang sampai larutan yang terbentuk berwarna bening. Larutan yang telah terkumpul kemudian dievaporasi menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu 50 °C selama 6 jam. Evaporasi ini menguapkan pelarut etanol sehingga menyisakan ekstrak.

Uji inhibitor α -amilase

Uji penghambatan enzim α -amilase dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna, yang diukur absorbansinya selama periode waktu tertentu. Pengujian dilakukan dengan 2 uji yaitu uji kontrol dan uji sampel. Sampel inhibitor (ekstrak) pada uji sampel sebesar 25 μ l, sedangkan uji kontrol 0 μ l. Enzim α -amilase 100 unit dilarutkan dalam 1 ml buffer (1000 μ l) pH 7. Kemudian dipisahkan kedalam 4 tabung eppendorf yang masing-masing dengan konsentrasi 25 unit/0,25 ml. Saat pengambilan larutan enzim yaitu pada satu tabung berisi 25 unit/0,25 ml ditambah 50 ml buffer dengan konsentrasi 0,5 unit/ml. Masing-masing uji sebesar 475 μ l. Pelarut ditambahkan DMSO pada uji kontrol sebesar 25 μ l, sedangkan uji sampel sebesar 0 μ l. Reaksi campuran diinkubasi 25°C selama 10 menit. Sebagai substrat amilum 0,5% dalam 100 ml aquades steril. Substrat amilum masing-masing uji 500 μ l. Reaksi campuran diinkubasi 25°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan 2 ml 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Semua larutan yang telah dicampurkan kemudian direbus 100°C selama 5 menit dan dibiarkan dingin. Larutan yang dihasilkan dengan perubahan warna kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai pembanding digunakan uji kontrol yang tidak menggunakan sampel ekstrak. Pelarut ekstrak menggunakan DMSO, maka pada uji kontrol ditambah pelarut DMSO.

Uji Pengaruh konsentrasi inhibitor α -amilase

Pengaruh konsentrasi inhibitor α -amilase dilakukan dengan memberikan pengaruh konsentrasi pengenceran ekstrak dan konsentrasi substrat amilum yang bervariasi.

Pengaruh konsentrasi ekstrak. Ekstrak yang sudah didapat diambil sebanyak 10 mg dalam 1 ml larutan DMSO dengan konsentrasi 10 mg/ml. Ekstrak kemudian diencerkan dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Masing-masing konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disiapkan. Campuran reaksi terdiri dari 25 μl ekstrak yang sudah diencerkan pada setiap konsentrasi dan enzim 475 μl . Campuran reaksi kemudian diinkubasi 25°C selama 10 menit. Campuran reaksi ditambahkan substrat amilum 0,5% sebesar 500 μl . Campuran reaksi kemudian diinkubasi 25°C selama 10 menit. Campuran reaksi dihentikan dengan 2 mL pereaksi 3,5 asam dinitrosalisilat. Tabung reaksi dipanaskan selama 5 menit dalam waterbath dan didinginkan sampai suhu ruang. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer.

Pengaruh konsentrasi substrat amilum. Substrat amilum 2% dilakukan pengenceran hingga konsentrasinya menjadi 2%, 1%, 0,5%, dan 0,25%. Campuran reaksi terdiri dari 25 μl ekstrak yang sudah diencerkan pada setiap konsentrasi dan enzim 475 μl . Campuran reaksi kemudian diinkubasi 25°C selama 10 menit. Campuran reaksi ditambahkan substrat amilum dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 2%, 1%, 0,5%, dan 0,25% sebesar 500 μl . Substrat amilum 2% yaitu terdiri dari 2 gram amilum/100 ml aquades. Campuran reaksi kemudian diinkubasi 25°C selama 10 menit. Campuran reaksi dihentikan dengan 2 mL pereaksi 3,5 asam dinitrosalisilat. Tabung reaksi dipanaskan selama 5 menit dalam waterbath dan didinginkan sampai suhu ruang. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Brotowali (*Tinospora crispa* L.) merupakan tanaman obat herbal dari family Menispermaceae yang mempunyai beberapa manfaat diantaranya dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit salah satunya menurunkan kadar gula darah atau Diabetes mellitus (DM). Beberapa manfaat yang dikandung pada brotowali (*T. crispa*) berkaitan dengan banyaknya jenis senyawa kimia yang dikandungnya antara lain alkaloid, damar

lunak, pati, glikosida, pikroretosid, harsa, zat pahit pikroretin, tinokrisposid, berberin, palmatin, kolumbin dan kaokulin atau pikrotoksin. Brotowali (*T. crispa*) menjadi salah satu tanaman alternatif pengobatan DM.

Menurut Rasan (1998), Brotowali (*T. crispa*) hampir selalu ditemukan pada pedagang obat tradisional dan disebutkan mempunyai khasiat untuk mengobati beberapapenyakit antara lain kudis, infeksi cacing kremi, radang usus buntu, penyakit rajasinga, cacar air, penyakit kuning, kholera, trakhoma dan diabetes. Bahkan di India, brotowali digunakan sebagai tonikum, diuretikum dan afrodisiak. Kulit batangnya mengandung alkaloid berberindan kolumbin, pati, glikosida, palmitin dan mt pahit pikroretin serta harsa. Penggunaan brotowali (*T. crispa*) sebagai obat tradisional terhadap diabetes dilakukan sejak awal abad ke-20 ini, dimana batangnya diolah menjadi bentuk tepung yang dijual dalam bungkus "cachet" (ouwels), dengan nama Ouwel Antidiabetik, untuk pemberian secara oral.

Brotowali (*T. crispa*) menjadi salah satu tanaman alternatif pengobatan DM karena sudah terbukti mampu menurunkan kadar glukosa dalam darah. Menurut Rasan (1998), Penelitian tentang kemungkinan digunakannya brotowali (*T. crispa*) sebagai obat alternatif untuk mengendalikan DM tipe II (Non Insulin Dependent Diabetes mellitus), telah dilakukan di Malaysia oleh Noor, yang melaporkan bahwa efek hipoglikemik dari tanaman ini terjadi karena adanya kenaikan kadar insulin plasma akibat pemberian pada hewan percobaan. Penelitian ini dilanjutkan di Inggris oleh Bambang Kiranadi, yang mempelajari elektrofisiologi membran sel-sel B, dan melaporkan bahwa efek insulinotropik dari brotowali (*T. crispa*) adalah terjadi karena tanaman ini mengadakan blokade pada saluran Catt di membran sel B Langerhans sehingga Ca^{++} menumpuk dalam ruang intraseluler, sehingga insulin disekresi.

Penelitian ini dilakukan dengan menguji aktivitas inhibitor α -amilase ekstrak etanol tanaman brotowali (*T. crispa*) dengan 2 perlakuan yaitu perbedaan konsentrasi pengenceran ekstrak dan perbedaan konsentrasi substrat amilum. Perbedaan konsentrasi pengenceran ekstrak yang dilakukan pada penelitian ini yaitu 1000; 500; 250; 125 dan 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Perbedaan konsentrasi substrat amilum pada penelitian ini yaitu 2%; 1%; 0,5% dan 0,25%. Ekstraksi brotowali (*T. crispa*) dilakukan dengan cara batangnya dipotong-potong, lalu dijemur di bawah sinar matahari sampai kering. Batang yang akan diekstraksi harus dari tanamana yang sehat dan setelah penjemuran batang harus dipastikan dalam

kondisi kering sempurna. Menurut Depkes RI (2000) Ekstrak tanaman obat yang dibuat dari simplisia, dapat digunakan sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak yang dibuat harus memenuhi standar mutu, mulai bahan baku, proses sampai pengujian produk. Beberapa faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak diantaranya yaitu faktor kimia seperti jenis dan jumlah senyawa kimia, metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan. Untuk mendapatkan ekstraksi yang menyeluruh dan mendapatkan senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas farmakologi maka pemilihan pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi merupakan faktor yang penting.

Ekstraksi brotowali (*T. crispa*) dilakukan dengan metode maserasi (perendaman). Menurut Yulianingtyas (2016), metode maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena selain murah dan mudah dilakukan, dengan perendaman sampel tanaman akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Menurut Diantika (2014), Semakin lama waktu maserasi, kuantitas bahan yang terekstrak juga akan semakin meningkat dikarenakan kesempatan untuk bersentuhan antara bahan dengan pelarut makin besar sehingga hasilnya akan bertambah sampai titik jenuh larutan.

Batang brotowali (*T. crispa*) yang sudah kering sempurna dimasukkan kedalam erlenmeyer, kemudian direndam dengan pelarut etanol sampai batang tergenang selama 24 jam. Hasil perendaman brotowali (*T. crispa*) selama 24 jam diambil dengan disaring, kemudian dipindahkan kedalam botol sampel. Etanol merupakan pelarut polar yang akan larut dalam air karena air bersifat polar. Menurut Arifianti (2014), Jenis pelarut pengestraksi juga mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak, sesuai konsep like dissolve like, dimana senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Pelarut ideal yang sering digunakan adalah etanol atau campurannya dengan air yang merupakan pelarut pengestraksi yang mempunyai extractive power yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti alkohol, saponin dan flavonoid. Etanol 96% merupakan pelarut pengestraksi yang terpilih untuk pembuatan ekstrak sebagai bahan baku

sediaan herbal medicine. Menurut BPOM (2005), yang menjelaskan bahwa untuk ekstraksi suatu bahan yang akan digunakan sebagai obat harus menggunakan etanol sebagai pelarutnya. Alasan lainnya adalah karena etanol mudah menguap, murah, mudah didapat dan cukup aman. Prinsip dari ekstraksi sendiri adalah penarikan senyawa-senyawa dalam tanaman oleh pelarut yang sesuai, baik dari segi keamanan dan keoplarannya.

Hasil perendaman yang sudah disaring tersebut kemudian di uapkan atau evaporasi yang bertujuan untuk memisahkan ekstrak dari pelarutnya yaitu etanol. Proses penguapan ini dilakukan dengan menggunakan alat rotary vacum evaporator pada suhu 50°C selama 3 jam. Hasil penguapan ini adalah 4,5493 gram ekstrak kental berwarna coklat kehitaman. Menurut Rivai (2013), Maserat dipisahkan dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Penyarian diulangi sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak yang sudah didapat mulai dilakukan pengujian aktivitas inhibitor α -amilase yaitu ekstrak diambil sebanyak 10 mg dalam larutan DMSO dengan konsentrasi 10 mg/ml. Menurut Gaylord (2007). DMSO adalah salah satu pelarut organik paling kuat yang dapat melarutkan berbagai bahan organik dan polimer secara efektif. Menurut Jacob dan de la Torre (2015), Dimethyl sulfoxide (DMSO) yang juga dikenal dengan nama methylsulfinylmethane atau sulfinyl-bis-methane tersusun dari atom sulfur pada pusatnya, sedangkan dua buah gugus metil, atom oksigen, dan sebuah pasangan elektron bebas terletak pada sudutnya.

Ekstrak yang sudah dilarutkan dalam DMSO kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, dan 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Masing-masing ekstrak yang sudah dilakukan pengenceran disiapkan. Pengujian α -amilase dilakukan dengan 2 jenis uji yaitu uji sampel dan uji kontrol. Masing masing ekstrak konsentrasi 1000, 500, 250, 125 dan 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dilakukan uji reaksi inhibisi dengan komposisi bahan uji sampel yaitu 25 μl sampel ekstrak brotowali yang sudah diencerkan ditambah dengan 475 μl enzim. Uji kontrol untuk reaksi inhibisi dilakukan tanpa menggunakan sampel ekstrak brotowali (*T. crispa*), sampel tersebut diganti dengan pelarut sampel yaitu DMSO 25 μl yang ditambah dengan 475 μl enzim. Campuran bahan tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Campuran bahan tersebut kemudian ditambah 500 μl substrat amilum 0,5 %

dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Campuran bahan tersebut kemudian ditambah dengan 2 ml larutan DNS yang berfungsi untuk menghentikan reaksi yang terjadi pada campuran bahan tersebut.

Menurut Khairina (2015), DNS merupakan reagen dinitro salisilat. Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk membuat reagen DNS adalah asam 3,5- dinitrosalisilat, NaOH, Na₂SO₃, Na-K-tartarat, fenol, dan akuades. DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 540 nm. Tujuan penambahan DNS membentuk NO₂ tereduksi dan menghasilkan warna merah bata, yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 520 nm.

Tabung reaksi yang berisi campuran bahan tersebut kemudian dipanaskan sampai mendidih dengan menggunakan hitter selama 5 menit dan didinginkan. Proses selanjutnya yaitu mengukur nilai absorbansi uji kontrol dan uji sampel dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 540nm. Menurut Rahmansyah (2003), proses reduksi DNS terhadap gula pereduksi berjalan cepat dan sempurna diperlukan pemanasan 100° C selama 15 menit, sehingga diperoleh pembentukan warna yang lebih intensif. Dalam suasana alkali gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540–550 nm. Menurut Neldawati (2013), Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan, atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu.



Gambar 1. pengujian pengaruh konsentrasi pengenceran ekstrak etanol brotowali.

Hasil nilai absorbansi kontrol dan absorbansi sampel digunakan untuk menghitung % inhibisi atau kemampuan daya hambatnya. Menurut Charissa (2016), Pengukuran aktivitas penghambatan dapat ditentukan dari % inhibisi dihitung dengan rumus berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Pengujian inhibitor α -amilase dengan pengaruh perbedaan konsentrasi substrat amilum dilakukan dengan berbagai konsentrasi yaitu 2%, 1%, 0,5% dan 0,25%. Konsentrasi pengenceran ekstrak yang digunakan pada pengujian ini yaitu 500 μ l. Langkah kerja yang dilakukan sama dengan pengujian inhibitor α -amilase dengan pengaruh perbedaan konsentrasi pengenceran ekstrak, yang berbeda adalah komposisi sampel yang digunakan hanya satu konsentrasi yaitu 500 μ l dan konsentrasi substrat amilum dibuat berbagai konsentrasi yaitu 2%, 1%, 0,5% dan 0,25%.

Pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak

Uji inhibitor α -amilase dilakukan dengan membuat pengenceran ekstrak. Konsentrasi pengenceran ekstrak yang digunakan yaitu 1000, 500, 250, 125 dan 62,5 μ g/mL. Konsentrasi pengenceran ekstrak yang berbeda ini berfungsi untuk membandingkan dan mengetahui aktivitas inhibitor α -amilase yang paling baik, serta untuk mengetahui ekstrak etanol tanaman brotowali (*T. crispa*) dapat menghasilkan inhibitor α -amilase yang menghambat kerja enzim amilase. Pengujian aktivitas inhibitor α -amilase menggunakan spektrofotometer sehingga diketahui nilai absorbansi kontrol dan absorbansi sampelnya. Nilai absorbansi kontrol dan absorbansi sampel tersebut digunakan untuk menghitung % inhibisi atau kemampuan menghambatnya. Rumus perhitungannya yaitu absorbansi kontrol dikurangi dengan absorbansi sampel, lalu dibagi absorbansi kontrol dan dikalikan 100 %.

Tabel 1. Perhitungan aktivitas inhibitor dengan pengaruh konsentrasi ekstrak

Konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)	Abs Kontrol	Abs Sampel	Inhibitor (%)
1000	0,830	0,041	95,06
500	0,841	0,047	94,41
250	0,769	0,055	92,84
125	0,773	0,409	47,08
62,5	0,632	0,830	-31,32

Dari tabel diatas menunjukkan hasil perhitungan % inhibitor, hal ini dapat diketahui bahwa ekstrak etanol tanaman brotowali mempunyai aktivitas inhibitor α -amilase. Aktivitas inhibitor α -amilase ini mampu menghambat kerja enzim amilase sehingga mampu menurunkan kadar gula darah. Aktivitas inhibitor α -amilase dari ekstrak ini sangat baik karena nilai % inhibitorynya lebih dari 50 % bahkan mendekati 100 %. Menurut Rosidah (2015) rebusan daun dan batang Brotowali dipergunakan untuk menurunkan kadar glukosa darah pada penyakit DM. Secara kimia tanaman brotowali mengandung alkaloid, diterpenoid, flavonoid, fenol, lakton dan lignin. Komponen utama yang telah diidentifikasi aktif adalah terpenoid dan terpenoid glikosida. Senyawa terpenoid glikosida yang berperan menurunkan serum gula darah pada diabetes tipe kedua adalah borapetoside C dan borapentol B.

Berdasarkan pengujian inhibitor α -amilase dengan menggunakan spektrofotometer didapatkan hasil konsentrasi pengenceran ekstrak 1000 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai absorbansi kontrol 0,830; nilai absorbansi sampel 0,041 dan aktivitas inhibitor 95,06 %. Konsentrasi pengenceran ekstrak 500 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai absorbansi kontrol 0,841; nilai absorbansi sampel 0,047 dan aktivitas inhibitor 94,41 %. Konsentrasi pengenceran sampel 250 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai absorbansi kontrol 0,769; nilai absorbansi sampel 0,055 dan aktivitas inhibitor 92,84 %. Konsentrasi pengenceran ekstrak 125 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai absorbansi kontrol 0,773; nilai absorbansi sampel 0,409 dan aktivitas inhibitor 47,08 %. Konsentrasi pengenceran ekstrak 62,5 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai absorbansi kontrol 0,632; nilai absorbansi sampel 0,830 dan aktivitas inhibitor -31,32 %. Menurut Hilma (2015), Inhibisi enzim α -

amilase dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antidiabetes. Persen inhibisi digunakan untuk menentukan persentase hambatan dari suatu bahan yang dilakukan terhadap aktivitas enzim α -amilase. Nilai persen inhibisi dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel (S) dengan absorbansi blanko (B).

Tabel tersebut menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi pengenceran ekstrak maka semakin besar juga nilai inhibitor atau aktivitas inhibitor α -amilase. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi pengenceran ekstrak maka semakin rendah nilai % inhibitor atau aktivitas inhibitor α -amilase. Nilai aktivitas inhibitor α -amilase tertinggi sebesar 95,06 % yaitu pada konsentrasi pengenceran ekstrak 1000 $\mu\text{g/mL}$ yang artinya memiliki kemampuan menghambat enzim amilase paling bagus daripada konsentrasi pengenceran 500, 250, 125 dan 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Nilai aktivitas inhibitor α -amilase terendah sebesar -31,32 yaitu pada konsentrasi pengenceran 62,5 $\mu\text{g/mL}$ yang artinya tidak dapat menghambat enzim α -amilase karena nilainya negatif, dan dapat menjadi aktivator enzim α -amilase. Menurut Pujawati (2012) Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat menaikkan kecepatan reaksi enzimatik mencegah adanya inhibitor, inhibitor adalah senyawa atau ion yang dapat menghambat aktivitas enzim. Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya

Menurut Wahyuntari (2011), Inhibitor α -amilase telah diteliti memiliki kemampuan menghambat enzim α -amilase pankreas manusia sehingga dapat dimanfaatkan untuk terapi kegemukan dan pengobatan penyakit DM tipe II. Menurut Elmaniar (2017), Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan maka semakin tinggi aktivitas penghambatan enzim (daya inhibisi).

Pengaruh perbedaan konsentrasi substrat amilum

Tabel 2. Perhitungan aktivitas inhibitor dengan pengaruh substrat amilum

Konsentrasi amilum (%)	Abs Kontrol	Abs Sampel	Inhibitor (%)
2	1,272	1,266	0,47
1	0,836	0,882	-5,50

0,5	0,189	0,171	9,52
0,25	0,041	0,049	-19,51

Uji inhibitor α -amilase dilakukan dengan membuat perbedaan konsentrasi substrat amilum. Konsentrasi substrat amilum yang digunakan yaitu 2 %, 1 %, 0,5 % dan 0,25 % Konsentrasi substrat amilum yang berbeda ini berfungsi untuk membandingkan dan mengetahui konsentrasi substrat amilum yang paling baik dalam menghambat aktivitas enzim amilase. Pengujian aktivitas inhibitor α -amilase menggunakan spektrofotometer sehingga diketahui nilai absorbansi kontrol dan absorbansi sampelnya. Nilai absorbansi kontrol dan absorbansi sampel tersebut digunakan untuk menghitung % inhibisi atau kemampuan menghambatnya. Rumus perhitungannya yaitu absorbansi kontrol dikurangi dengan absorbansi sampel, lalu dibagi absorbansi kontrol dan dikalikan 100 %

Konsentrasi substrat amilum yang paling baik menggunakan pelarut etanol. Konsentrasi substrat amilum 2 % pelarut etanol memiliki nilai absorbansi kontrol 1,272; nilai absorbansi sampel 1,266 dan aktivitas inhibitor 0,47 % yang menunjukkan bahwa konsentrasi amilum 2 % ini kurang mampu menghambat aktivitas enzim amilase. Konsentrasi substrat amilum 0,5 % pelarut etanol memiliki nilai absorbansi kontrol 0,189; nilai absorbansi sampel 0,171 dan aktivitas inhibitor 9,52 %, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut mempunyai aktivitas inhibitor α -amilase, tetapi pengaruhnya hanya sedikit mrnghambat karena nilai aktivitas inhibitornya rendah. Konsentrasi substrat amilum 1 % pelarut etanol memiliki nilai absorbansi kontrol 0,836; nilai absorbansi sampel 0,882 dan aktivitas inhibitor -5,50. Konsentrasi substrat amilum 0,25 % pelarut etanol memiliki nilai absorbansi kontrol 0,041; absorbansi sampel 0,049 dan aktivitas inhibitor -19,51. Konsentrasi substrat amilum 1% dan 0,25 % memiliki nilai aktivitas inhibitor negatif hal ini menunjukan bahwa konsentrasi substrat amilum 1% dan 0,25% tidak mempunyai aktivitas inhibitor α -amilase dan konsentrasi ini merupakan aktivator enzim α -amilase yang meningkatkan kerja enzim amilase sehingga menaikkan kadar gula dalam darah.

Menurut Yanti (2016), Aktivitas enzim meningkat sebanding dengan kenaikan konsentrasi substrat dan mencapai aktivitas maksimum. Peningkatan tersebut meningkatkan jumlah enzim-substrat, namun pada konsentrasi tertentu akan berada pada kondisi jenuh ketika tidak ada lagi enzim bebas

yang tersedia. Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi hingga tercapai nilai maksimal V_{max} . Peningkatan lebih lanjut konsentrasi substrat tidak meningkatkan laju reaksi karena enzim telah jenuh oleh substrat. Setelah konsentrasi optimum diperoleh, aktivitas enzim mengalami penurunan yang disebabkan oleh penghambatan aktivitas enzim. Menurut Soeka (2015) Tingkat hidrolisis pati oleh α -amilase tergantung pada beberapa kondisi seperti konsentrasi substrat, pH, suhu, aktivator dan inhibitor. Mekanisme kerja enzim juga ditentukan oleh konsentrasi substrat yang tersedia. Jika konsentrasi substratnya sedikit, kecepatan kerja enzim juga rendah. Sebaliknya, jika konsentrasi substrat yang tersedia banyak, kerja enzim juga cepat. Pada keadaan substrat berlebih, kerja enzim tidak sampai menurun tetapi konstan

KESIMPULAN

Penghambatan enzim amilase terjadi pada konsentrasi pengenceran ekstrak 1000, 500, 250 dan 125 $\mu\text{g/mL}$ yaitu berturut turut sebesar 95,06%; 94,41%; 92,84% dan 47,08%. Tidak terjadi penghambatan enzim amilase pada konsentrasi pengenceran ekstrak 62, 5 $\mu\text{g/mL}$. Penghambatan tertinggi enzim amilase terjadi pada konsentrasi pengenceran ekstrak 1000 $\mu\text{g/mL}$ yaitu sebesar 95,06%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian dini dibiayai dengan dana DPA FSM Universitas Diponegoro Nomor: 7825/UN7.P2/KU/2016 tanggal 30 Desember 2016 MAK 01.01.06.516112 sesuai dengan Perjanjian Tugas Pelaksanaan Penelitian Para Dosen di Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro No.1643C /N7.5.8/PP/2017 tanggal 3 April 2017 .

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, [W.](#), [Ibrahim J.](#), and [Syed N. A.](#) 2016. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson: A Review of Its Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Aspects. *Front Pharmacol.* 7 (1): 59-65.
- Amanatie, E. S. 2015. Structure Elucidation of the Leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *Jurnal Sains dan Matematika.* 23 (4): 101-106.
- Arifianti, L. Rice D. O., dan Idha K. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon*

- stamineus Benth. *E-Journal Planta Husada*. 2 (1): 1-4.
- Diantika, F., Sandra M. S., dan Rini Y. 2014. Pengaruh Lama Ekstraksi Dan Konsentrasi Pelarut Etanol Terhadap Ekstraksi Antioksidan Biji Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Effect Of Long Extraction And Concentration And Concentration Of Ethanol Solvent Extraction Antioxidant Cocoa Beans (*Theobroma Cacao L.*). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 15 (3): 159-164.
- Dweck, A. C. dan Cavin J. P. 2006. A review of Andawali (*Tinospora crispa*). *Personal Care Magazine*. 7 (1): 1-3.
- Elmaniar, R., dan Muhtadi. 2017. Aktivitas Penghambatan Enzim A-Glukosidase Oleh Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas L.*). *Jurnal Urecol Proceeding*. 42 (7): 745-761.
- Fatimah, R. N. 2015. Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal MAJORITY*. 4 (5): 93-96.
- Gaylord, C. C.. 2007. *Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Solubility Data*. GCC Press, USA.
- Jacob, S. W. dan de la Torre J.C. 2015. *Dimethyl Sulfoxide in Trauma and Disease*. CRC Press, Florida.
- Judge, N. and Svensson B. 2006. Review Proteinaceous Inhibitor of Carbohydrate Active Enzymes in Cereals : Implication in Agriculture, Cereal Processing and Nutrition. *Journal Science Food Agriculture*. 86 (11): 1573-1586.
- Khairina, A. dan Leny Y. 2015. Pengaruh Variasi Lama Penyimpanan Umbi Bengkuang (*Pachirhizus Erozus*) Terhadap Kadar Glukosa Darah *Rattus Norvegicus* The Effects Of Storage Time Variaton Of Jicama's Tuber(*Pachirhizus Erozus*) On *Rattus Norvegicus* Blood Glucose Unesa. *Journal of Chemistry*. 4 (1): 31-36.
- Marewa, L. W. 2015. *Kencing Manis (DM) DI Sulawesi Selatan*. Yayasan Pustaka Obor Indonesia, Jakarta.
- Muchid, A., Fatimah U. dan Nur G. 2005. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit DM*. Direktorat Bina Farmasi Komunitas Dan Klinik Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian Dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Neldawati, R. dan Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Journal Pillar Of Physics*. 2 (1) :76-83.
- Perkeni. 2006. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe-2 di Indonesia*. Penerbit PERKENI, Jakarta.
- Pujawati S. 2012. *Seleksi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi Sebagai Penghasil Enzim Amilase*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Putri, N. H. K. dan Muhammad A. I. 2013. Hubungan Empat Pilar Pengendalian Dm Tipe 2 Dengan Rerata Kadar Gula Darah. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. 1 (2): 234-243.
- Rasan, M. 1998. Pengaruh Brotowali [*Tinospora Crispa (L.) Miers*] Terhadap Metabolisme Glukosa Pada Kelinci. *Jurnal Warta Tanaman Obat Indonesia*. 4 (2): 17-19.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat*. Depkes RI, Jakarta.
- Rivai, H., Ernita W. S. dan Rusdi. 2013. Pengaruh Perbandingan Pelarut Etanol-Air Terhadap Kadar Senyawa Fenolat Total Dan Daya Antioksidan Dari Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*) *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. 18 (1): 35-42.
- Rosidah, I., Hismiatty B., Rima M. dan Olivia B. P. 2015. Pengaruh Kondisi Proses Ekstraksi Batang Brotowali (*Tinospora Crispa (L) Hook.F & Thomson*) Terhadap Aktivitas Hambatan Enzim Alfa Glukosidase. *Media Litbangkes*. 25 (4): 203-210.
- Soeka, Y. S. 2015. Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam menghasilkan enzim α -amilase The ability *Bacillus licheniformis* to produce α -amylase enzyme. *Jurnal Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 1 (5): 1162-1166.
- Suryawati, S. dan Herni S. 2007. Efek Anti Malaria Ekstrak Brotowali (*Tinospora Crispa*) Pada Mencit Yang Di Infeksi *Plasmodium Berghei*. *Jurnal Wijaya Kusuma*. 1 (1): 13-22.
- Wahyuntari, B. 2011. Penghambat α -Amilase : Jenis, Sumber, dan Potensi Pemanfaatannya dalam Kesehatan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 12 (2): 197-201.
- Yanti, A. R., Sri T. R. dan Resta D. S. 2016. Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase secara In-Vitro oleh Isolat 6,4'-Dihidroksi-4-Metoksibenzofenon-2-O- β -D Glukopiranosida(C₂₀H₂₂O₁₀) yang Diisolasi dari Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa (Scheff.)*). *Jurnal Pharm Sci*. 3 (1): 1-11.

Yulianingtyas, A. dan Bambang K. Optimasi Volume Pelarut Dan Waktu Maserasi Pengambilan Flavonoid Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*). *Jurnal Teknik Kimia*. 10 (2): 58-64.