

## Studi Aktivitas Antioksidan dan Inhibitor $\alpha$ -Glukosidase Ekstrak Fenolik Daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) dari Taman Nasional Meru Betiri

### *Antioxidant Activity Study And $\alpha$ -glucosidase Inhibitor Phenolic Leaf Extract Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) From Meru National Park Betiri*

Jainur Rochman<sup>\*</sup>, Tri Agus Siswoyo, A.A. Istri Ratnadewi  
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

<sup>\*</sup>Email: jjelicious@gmail.com

#### ABSTRACT

Study activities phenolic extract of *bungur* leaf as an antioxidant and inhibitor for the enzyme  $\alpha$ -glucosidase was performed by spectrophotometric method. The extraction was carried out by three solvents with different polarity level in order to get three types of extracts namely hexane extract *Bungur* (HB), ethyl acetate extract *Bungur* (EAB), and the methanol extract *Bungur* (MB). The units, used in the analysis, is the total phenolic that standardized in gallic acid. The antioxidant activity of phenolic extracts *Bungur* leaf can be seen from its ability to reduce free radicals through the damping test DPPH radical, superoxide anion, and hydroxyl. Potential extract phenolic leaf *Bungur* as an inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase were analyzed by inhibition of  $\alpha$ -glucosidase, but in this study also tested the inhibition of the enzyme  $\alpha$ -amylase because both of these enzymes worked on the digestive system and hydrolyze carbohydrates. The results generally showed that the methanol extract of leaves *Bungur* potential as antioxidants that compared with standard vitamin C. In addition, it had as well as potential for inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase that compared akarbosa standard, which is expected to be a natural antidiabetic agent.

**Keywords:** phenolic, bungur, antioxidant, inhibitor,  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glukosidase

#### PENDAHULUAN

Saat ini pola penyakit mulai bergeser dari penyakit infeksi ke arah sindrom metabolik. Diabetes Melitus (DM) adalah sindrom metabolik yang secara global prevalensi cukup tinggi. Pada tahun 2003 prevalensi global DM usia 20 sampai 79 tahun mencapai 149 juta jiwa (5,1%) dan diperkirakan mencapai 333 juta (6,3%) pada tahun 2025 (International Diabetes Federation, 2003).

Perkembangan diabetes dan komplikasi yang terjadi diketahui dimediasi oleh stres oksidatif (Dewanjee *et al.*, 2009). Stres oksidatif ini terjadi karena sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh tidak mampu mengatasi peningkatan produksi spesies oksigen reaktif dalam tubuh. Peningkatan produksi spesies oksigen reaktif ini disebabkan tingginya kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia), karena menurut Wolff (1993), glukosa dapat mengalami reaksi autooksidasi yang dapat menghasilkan produk berupa senyawa oksigen reaktif seperti hidrogen

peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ), dan radikal anion superoksida ( $\bullet O_2$ ). Peningkatan produksi dan ketidakefektifan penangkapan spesies oksigen reaktif ini beresiko pada kerusakan organel sel, kenaikan peroksidasi lipid, dan meningkatkan resistensi insulin. Hal ini yang menyebabkan munculnya berbagai komplikasi pada penderita diabetes (Maritim *et al.*, 2003).

Berdasarkan data dari International Diabetes Federation (2003), sebagian besar penderita diabetes melitus (85-95%) didominasi oleh pasien penderita DM tipe 2. Salah satu langkah strategis dalam terapi DM tipe 2 yaitu dengan menghambat kerja enzim yang menghidrolisis karbohidrat menjadi glukosa, seperti  $\alpha$ -glukosidase pada organ pencernaan. Dengan menginhibisi kerja enzim ini, maka dapat secara efektif mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks dan absorpsi glukosa oleh epitelium intestinal, sehingga dapat mencegah peningkatan kadar glukosa *postprandial* pada penderita diabetes tipe 2. Inhibisi kerja enzim dapat dilakukan dengan

adanya senyawa-senyawa inhibitor tertentu. (Shinde *et al.*, 2008).

Penderita diabetes memerlukan asupan antioksidan dalam jumlah besar karena peningkatan radikal bebas akibat hiperglikemia yang dapat memicu terjadinya berbagai komplikasi. Namun menurut Nadeesha *et al.* (2007) antioksidan sintetik memiliki efek toksikologi dan bersifat karsinogenesis. Oleh karena itu, banyak penelitian saat ini diarahkan untuk terapi menggunakan bahan alami untuk menghindari efek samping tersebut. Dengan adanya perpaduan antara inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dan antioksidan, diharapkan dapat memberikan efek farmakologis yang sinergis.

Tanaman merupakan sumber yang baik untuk obat. Informasi etnobotani melaporkan ada sekitar 800 sampai 1000 tanaman yang diperkirakan memiliki potensi antidiabetes (Rao *et al.*, 2010). Tanaman dapat menjadi sumber inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dan antioksidan alami. Sebagai kawasan hutan konservasi, Taman Nasional Meru Betiri memiliki kekayaan keanekaragaman hayati yang cukup banyak. Saat ini telah diketahui sebanyak 496 jenis tumbuhan, dan di antara berbagai tumbuhan tersebut, 239 jenis telah diidentifikasi sebagai tumbuhan obat. Sebagai salah satu institusi pendidikan terbesar di Jember, Universitas Jember memiliki kepentingan untuk menggali dan mengembangkan potensi TNMB yang ada di Jember sebagai bentuk Tri Dharma Perguruan Tinggi.

Bungur (*Lagerstroemia speciosa*) merupakan salah satu tanaman yang tumbuh di TNMB yang memiliki potensi sebagai obat. Secara tradisional, tanaman ini digunakan sebagai ramuan obat antidiabetes, namun penggunaannya belum begitu populer karena belum teruji secara ilmiah khususnya di Indonesia. Beberapa penelitian melaporkan adanya potensi ekstrak daun Bungur sebagai antidiabetes. Menurut Dalimartha (2003), daun Bungur memiliki kandungan senyawa fenolik seperti flavonoid dan tanin. Senyawa-senyawa fenolik menurut Patel *et al.* (2012) memiliki aktivitas antihiperglikemik. Senyawa fenolik seperti flavonoid juga merupakan salah satu agen antioksidan alami (Shan *et al.*, 2005). Oleh sebab itu pada penelitian ini akan dilakukan studi mengenai potensi ekstrak fenolik daun Bungur sebagai agen antidiabetik yang secara khusus ditinjau dari segi

aktivitasnya sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase sekaligus sebagai antioksidan.

## METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa*); heksana (Merck); etil asetat (Merck); metanol (Merck); akuades; reagen Folin-Ciocalteu (Merck); natrium karbonat (Merck); asam galat (Sigma-Aldrich); natrium nitrit (Merck); aluminium(III) klorida (Merck); natrium hidroksida (Merck); kuersetin (nacalai tasque); asam format (Merck); *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil* (DPPH) (nacalai tasque); etanol (Merck); vitamin C (nacalai tasque); *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) (nacalai tasque); Besi(III) klorida (Merck); hidrogen peroksida (Sigma-Aldrich); 2-deoksi-D-ribosa (Sigma-Aldrich); kalium dihidrogenfosfat (Merck); asam trikloroasetat (Merck); asam 2-tiobarbiturat (Merck); pirogalol (Sigma-Aldrich); Trizma-base (nacalai tasque); asam klorida (Merck); sukrosa (Merck); dimetilsulfoksida (Merck); natrium hidrogenfosfat (nacalai tasque); peroksidase (Sigma-Aldrich);  $\alpha$ -glukosidase (Sigma-Aldrich); glukosa oksidase (Sigma-Aldrich); 4-aminoantipirin (Sigma-Aldrich); fenol (Sigma-Aldrich); natrium klorida (Merck); Kalium natrium tartrat (Merck); *Soluble starch* (Merck); asam 3,5-dinitrosalisilat (Merck);  $\alpha$ -amilase (Sigma-Aldrich); kalium hidrogenfosfat (Merck); triton x-100 (Sigma-Aldrich); dan akarbosa (Glucobay).

### Pembuatan Simplisia Daun Bungur

Daun Bungur yang telah divalidasi oleh Lembaga Taman Nasional Meru Betiri dikeringkan selama 10 hari. Daun yang telah kering dan terpilih dipotong kecil-kecil kemudian diblender sehingga dihasilkan serbuk simplisia.

### Ekstraksi Simplisia Daun Bungur

Ekstraksi simplisia daun Bungur dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya. Ekstraksi dimulai dari pelarut yang nonpolar yaitu heksana, kemudian dilanjutkan dengan pelarut etil asetat, dan diakhiri dengan pelarut metanol. Waktu inkubasi untuk masing-masing pelarut adalah 72 jam dalam *shaker*. Perbandingan antara berat sampel dan volume pelarut adalah 1:5. Tiga macam ekstrak dihasilkan dari tahap ini yaitu heksana Bungur (HB), etil asetat Bungur (EAB), dan metanol Bungur (MB).

### Analisis Total Fenolik Ekstrak Daun Bungur

Penentuan kandungan total fenolik menggunakan metode yang dikemukakan oleh Taga *et al.* (1984) dan dihitung menggunakan standar asam galat. Sebanyak 50  $\mu$ L ekstrak HB, EAB, dan MB dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda.

Sebanyak 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, (w/v) ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi dan diinkubasi selama 2 menit. Selanjutnya ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  reagen Folin-Ciocalteu 50% (v/v) dan diinkubasi lagi selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Total fenolik masing-masing ekstrak ditentukan dalam mg asam galat *equivalent* (AGE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar asam galat.

#### Analisis Total Flavonoid Ekstrak Daun Bungur

Penentuan kandungan total flavonoid didasarkan pada metode yang dikemukakan oleh Chang *et al.* (2002). Sebanyak 150  $\mu\text{L}$  masing-masing ekstrak ditambahkan dengan 400  $\mu\text{L}$  akuades. Larutan ini ditambahkan dengan 30  $\mu\text{L}$   $\text{NaNO}_2$  5% (w/v) dan diinkubasi selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 30  $\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3$  10% (w/v) dan diinkubasi lagi selama 6 menit. Setelah itu ditambahkan 200  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  1 M dan 240  $\mu\text{L}$  akuades. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 415 nm. Total flavonoid masing-masing ekstrak ditentukan dalam mg kuersetin *equivalent* (KE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar kuersetin.

#### Analisis Peredaman Radikal DPPH Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Analisis peredaman radikal DPPH mengacu pada Soler-Rivas *et al.* (2000). Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  ekstrak dengan 5 konsentrasi yang berbeda untuk masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam 96-well plates. Setelah itu, ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  reagen DPPH 90  $\mu\text{M}$  (dalam metanol) dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan *Microplate reader* pada panjang gelombang 515 nm setelah 30 menit inkubasi. Persen peredaman radikal DPPH pada masing-masing konsentrasi ekstrak dihitung dengan persamaan:

$$\text{PersenPeredaman} = [(A_0 - A_1)/A_1] \times 100\% \quad (1)$$

$A_0$  adalah absorbansi kontrol dan  $A_1$  adalah absorbansi ekstrak. Hasil perhitungan persen peredaman pada tiap-tiap konsentrasi digunakan untuk membuat kurva linier dengan mengeplotkan persen peredaman dan log konsentrasinya. Persamaan linier yang dihasilkan adalah  $y = mx + c$  dan persamaan tersebut digunakan untuk menghitung nilai  $\text{IC}_{50}$  masing-masing ekstrak dengan persamaan:

$$\text{IC}_{50} = 10^{(50-c)/m} \quad (2)$$

Vitamin C digunakan sebagai standar positif.

#### Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Analisis peredaman radikal anion superoksida ditentukan berdasarkan autooksidasi pirogalol yang

mengacu pada Tang *et al.* (2010). Sebanyak 150  $\mu\text{L}$  larutan ekstrak dicampur dengan 1,75 mL buffer Tris-HCL 50 mM (pH 8,2). Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  pirogalol 10 mM (dilarutkan dalam HCl 10 mM). *Slope* reaksi autooksidasi pirogalol selama 4 menit ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 320 nm. Persen peredaman radikal anion superoksida dihitung dengan persamaan:

$$\text{PersenPeredaman} = [(S_0 - S_1)/S_1] \times 100\% \quad (3)$$

$S_0$  adalah *slope* kontrol dan  $S_1$  adalah *slope* ekstrak. Vitamin C digunakan sebagai standar positif.

#### Analisis Peredaman Radikal Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Analisis peredaman radikal hidroksil mengacu pada metode yang dikemukakan Halliwell dan Gutteridge (1999). Larutan yang terdiri atas 50  $\mu\text{L}$  2-deoksi-D-ribosa 28 mM (dalam buffer fosfat 20 mM; pH 7,4), 150  $\mu\text{L}$  ekstrak, 100  $\mu\text{L}$  EDTA 1 mM, 100  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$  10 mM, 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, dan 50  $\mu\text{L}$  asam askorbat 1 mM dimasukkan dalam *microtube* yang berbeda untuk masing-masing ekstrak lalu divortex. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu, ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  asam tiobarbiturat 1% dan 500  $\mu\text{L}$  asam trikloroasetat 2,8%. Larutan divortex dan diinkubasi lagi selama 20 menit pada suhu 100 °C untuk menghasilkan warna merah muda. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 532 nm setelah larutan dingin. Persen peredaman radikal hidroksil dihitung dengan persamaan 1. Vitamin C digunakan sebagai standar positif.

#### Analisis Penghambatan $\alpha$ -Amilase Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Analisis penghambatan  $\alpha$ -amilase dilakukan berdasarkan metode hashim *et al.* (2013) yang dimodifikasi. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ekstrak dimasukkan ke dalam dua *microtube* yang diberi label  $S^+$  dan  $S^-$ . Sebagai kontrol, 100  $\mu\text{L}$  DMSO juga dimasukkan ke dalam dua *microtube* yang diberi label  $C^+$  dan  $C^-$ . *Microtube* yang berlabel  $S^+$  dan  $C^+$  ditambahkan 150  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -amilase (0,1 u/mL) sedangkan yang berlabel  $S^-$  dan  $C^-$  ditambahkan 150  $\mu\text{L}$  buffer fosfat pH 6,9. Larutan diinkubasi selama 15 menit pada 37°C setelah divortex. Setelah itu, ditambahkan 250  $\mu\text{L}$  *soluble starch* 1% (w/v) ke dalam semua *microtube*. Larutan diinkubasi selama 15 menit pada 37°C setelah divortex. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan mendidihkan selama 1 menit. Setelah dingin, larutan dikosmosil lalu diambil 160  $\mu\text{L}$  dari masing-masing *microtube* kemudian dimasukkan ke *microtube* lain dengan label yang sama. Sebanyak 80  $\mu\text{L}$  reagen DNS ditambahkan ke dalam tiap-tiap *microtube*. Larutan dididihkan selama 15 menit untuk menentukan total gula reduksinya. Setelah itu diencerkan dengan 720  $\mu\text{L}$  akuades dan dipipet 200

$\mu\text{L}$  ke dalam 96-well plates untuk diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 540 nm. Akarbosa yang merupakan agen antihiperlipidemik yang banyak beredar di pasaran digunakan sebagai standarnya. Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase pada masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen inhibisi} = \left[ \frac{(C^+ - C^-) - (S^+ - S^-)}{(C^+ - C^-)} \right] \times 100\% \quad (4)$$

$C^+$  adalah kontrol sampel dengan enzim dan  $C^-$  adalah kontrol sampel tanpa enzim, sedangkan  $S^+$  adalah sampel dengan enzim dan  $S^-$  adalah sampel tanpa enzim.

#### Analisis Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Analisis penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan mengacu pada metode yang dikemukakan Miyazawa *et al.* (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  maltosa 0,125 M dimasukkan ke dalam *microtube* yang berlabel  $C^+$ ,  $C^-$ ,  $S^+$ , dan  $S^-$ . Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ekstrak dimasukkan ke dalam *microtube*  $S^+$  dan  $S^-$ , sedangkan  $C^+$  dan  $C^-$  ditambahkan dengan 100  $\mu\text{L}$  DMSO. Setelah itu, 190  $\mu\text{L}$  buffer fosfat pH 7 ditambahkan ke dalam setiap *microtube*. Campuran divortex lalu ditambahkan 10  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -glukosidase (1 u/mL) ke dalam *microtube*  $C^+$  dan  $S^+$  sedangkan  $C^-$  dan  $S^-$  ditambahkan akuabides. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam setelah divortex. Reaksi dihentikan dengan mendidihkannya selama 3 menit. Setelah dingin, Campuran dikosmosil lalu diambil 235  $\mu\text{L}$  dari masing-masing *microtube* untuk dimasukkan ke *microtube* lain dengan label yang sama. Sebanyak 750  $\mu\text{L}$  buffer fenol pH 7 ditambahkan ke dalam setiap *microtube*, dilanjutkan dengan penambahan 5  $\mu\text{L}$  peroksidase (0,5 unit/  $\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{L}$  aminoantipirin (4 mg/mL), dan 5  $\mu\text{L}$  glukosa oksidase (0,8 unit/  $\mu\text{L}$ ). Larutan divortex dan diinkubasi lagi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Hasil inkubasi dipipet 200  $\mu\text{L}$  dan dimasukkan ke dalam 96-well plates untuk diukur absorbansinya pada 500 nm dengan *microplate reader*. Persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dihitung dengan persamaan 4. Akarbosa digunakan sebagai standar positifnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Rendemen Maserasi Simplisia Daun Bungur

Rendemen hasil maserasi simplisia daun Bungur dihitung berdasarkan perbandingan antara berat ekstrak yang diperoleh dan berat simplisia yang dimaserasi dalam bentuk nilai persentase. Hasil perhitungan persen rendemen maserasi ditampilkan pada Tabel 1 berikut:

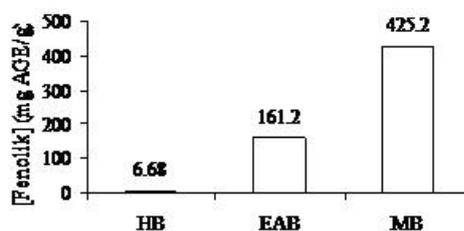
Tabel 1. Rendemen maserasi simplisia daun Bungur

Ekstrak	Rendemen (%)
HB	3,06
EAB	3,37
MB	17,9
Total	24,33

Kenaikan tingkat kepolaran pelarut diiringi kenaikan rendemen maserasi. Hal ini disebabkan pelarut polar seperti metanol selain mampu melarutkan senyawa polar juga dapat melarutkan senyawa yang kurang polar hingga nonpolar. Oleh karena itu pelarut metanol menghasilkan rendemen tertinggi.

#### Total Fenolik Ekstrak Daun Bungur

Analisis total fenolik ekstrak daun Bungur didasarkan pada kemampuannya mereduksi reagen Folin-Ciocalteu (FC). Senyawa fenolik yang terkandung pada daun Bungur akan mereduksi reagen FC yang berwarna kuning menghasilkan kompleks yang berwarna biru. Warna biru yang dihasilkan dari reaksi tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya yaitu 750 nm. Asam galat digunakan sebagai standar sehingga satuan perhitungan total fenolik adalah asam galat *equivalent* (AGE) per gram ekstrak. Hasil perhitungan total fenolik ekstrak daun Bungur ditampilkan oleh Gambar 1.



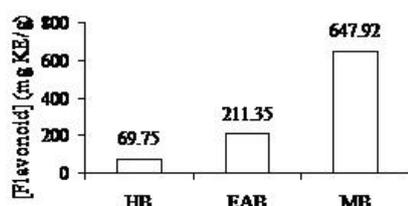
Gambar 1. Total fenolik ekstrak daun Bungur

Kandungan total fenolik ekstrak daun Bungur meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran pelarutnya. Ekstrak metanol Bungur

memiliki kandungan fenolik tertinggi karena metanol mampu melarutkan senyawa dari polar hingga nonpolar. Hal ini mungkin disebabkan karena kemampuan metanol yang bisa membentuk ikatan hidrogen, interaksi dipol-dipol, dan van der Waals.

### Total Flavonoid Ekstrak Daun Bungur

Analisis total flavonoid ekstrak daun Bungur didasarkan pada kemampuan gugus katekol flavonoid untuk mengkompleks dengan logam aluminium. Kompleks yang terbentuk berwarna kuning dengan panjang gelombang maksimum 415 nm untuk standar kuersetin. Semakin tinggi konsentrasi flavonoid dengan gugus katekol maka absorbansinya juga semakin meningkat. Hasil perhitungan total flavonoid ekstrak daun Bungur ditampilkan oleh Gambar 2.

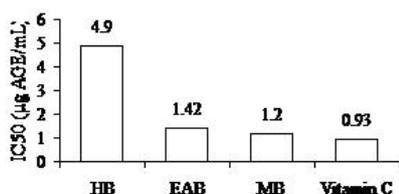


Gambar 2. Total flavonoid ekstrak daun Bungur

Sama halnya seperti pola pada total fenolik, kandungan total flavonoid juga meningkat seiring dengan dengan peningkatan kepolaran pelarutnya. Artinya pelarut paling polar yaitu metanol menghasilkan total flavonoid tertinggi.

### Peredaman Radikal DPPH Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Kemampuan ekstrak fenolik daun Bungur dalam meredam radikal DPPH dilihat dari nilai  $IC_{50}$  masing-masing ekstraknya. Nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil menunjukkan bahwa kemampuannya dalam mereduksi radikal DPPH lebih kuat. Hasil perhitungan nilai  $IC_{50}$  ekstrak daun Bungur ditunjukkan oleh Gambar 3.

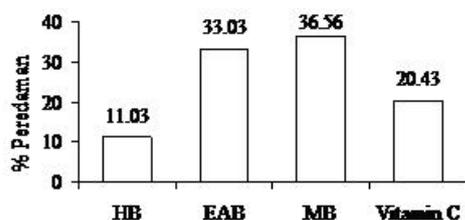


Gambar 3. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak fenolik daun Bungur

Kemampuan ekstrak fenolik daun Bungur dalam meredam radikal DPPH meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran senyawa fenoliknya. Ekstrak MB memiliki nilai  $IC_{50}$  terkecil yang artinya kemampuannya dalam meredam radikal DPPH paling baik sehingga dapat dikatakan paling potensial dibandingkan dua ekstrak lainnya. Namun jika dibandingkan dengan standar Vitamin C, aktivitasnya masih lebih rendah. Ekstrak MB mengandung senyawa fenolik yang paling polar dibandingkan dengan ekstrak EAB dan HB. Senyawa fenolik yang lebih polar memiliki jumlah substituen hidroksil yang lebih banyak, akibatnya senyawa fenolik dalam ekstrak MB mampu menyumbangkan lebih banyak atom hidrogen untuk mereduksi radikal DPPH dibandingkan dengan senyawa fenolik dalam EAB dan HB. Hal ini juga didukung oleh data total flavonoid dimana kenaikan total flavonoid juga diikuti dengan kenaikan aktivitasnya sebagai peredam radikal DPPH.

### Peredaman Radikal Anion Superoksida Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Radikal anion superoksida secara *in-vitro* dihasilkan dari reaksi autooksidasi pirogalol dalam kondisi basa. Terbentuknya radikal anion superoksida akan mengoksidasi ortoquinon yang merupakan produk pertama reaksi oksidasi pirogalol menjadi purpurogalin. Aktivitas radikal anion superoksida dapat diamati secara tidak langsung dari aktivitas produksi purpurogalin. Senyawa purpurogalin memiliki panjang gelombang maksimum 320 nm. Semakin tinggi konsentrasi radikal anion superoksida maka semakin tinggi pula produksi purpurogalin sehingga absorbansinya pada 320 nm juga meningkat. Aktivitas produksi purpurogalin setiap saat diamati dengan spektrofotometer UV-Vis selama 4 menit reaksi sehingga didapat nilai *slope* reaksi. Senyawa fenolik dapat bereaksi dengan radikal anion superoksida sehingga keberadaannya dapat menurunkan *slope* reaksi karena produksi purpurogalin juga menurun. Penurunan nilai *slope* digunakan untuk menghitung persen peredaman radikal anion superoksida oleh masing-masing ekstrak fenolik daun Bungur. Hasil perhitungan ditunjukkan oleh Gambar 4.

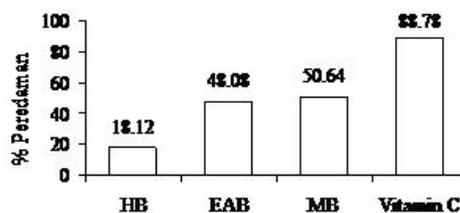


Gambar 4. Persen peredaman radikal anion superoksida oleh ekstrak fenolik daun Bungur

Kemampuan ekstrak fenolik daun Bungur dalam meredam radikal anion superoksida meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran senyawa fenoliknya. MB merupakan ekstrak yang paling kuat meredam radikal anion superoksida. Namun EAB juga memiliki potensi yang bagus karena kedua ekstrak ini memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal anion superoksida yang lebih baik dari vitamin C. Pola ini secara umum juga didukung dengan data total flavonoidnya.

#### Peredaman Radikal Hidroksil Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Radikal hidroksil secara *in-vitro* dihasilkan melalui reaksi Fenton. Radikal hidroksil yang terbentuk akan menyerang 2-deoksi-D-ribosa dan menghasilkan produk malondialdehid (MDA). Keberadaan senyawa fenolik menyebabkan terjadinya kompetisi dengan 2-deoksi-D-ribosa untuk bereaksi dengan radikal hidroksil. Terjadinya reaksi antara senyawa fenolik dengan radikal hidroksil menyebabkan tidak terbentuknya MDA sehingga menurunkan absorbansi larutan pada 532 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum dari MDA-ATB (produk reaksi antara MDA dan asam 2-tiobarbiturat). Artinya, kekuatan senyawa fenolik dalam meredam radikal hidroksil meningkat seiring penurunan absorbansinya. Persen peredaman masing-masing ekstrak dengan konsentrasi yang sama dibandingkan untuk menentukan ekstrak yang paling potensial. Hasil perhitungan persen peredaman ditunjukkan oleh Gambar 5.

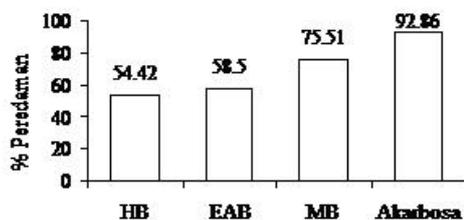


Gambar 5. Persen peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak fenolik daun Bungur

Kemampuan ekstrak fenolik daun Bungur dalam meredam radikal hidroksil meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran senyawa fenoliknya. MB merupakan ekstrak yang paling kuat meredam radikal hidroksil. Namun jika dibandingkan dengan standar Vitamin C, ketiga ekstrak tersebut aktivitasnya masih lebih rendah. Meskipun belum bisa dikatakan potensial namun ekstrak fenolik daun Bungur khususnya fraksi metanol memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal hidroksil. Pola peredaman radikal hidroksil oleh ekstrak fenolik daun Bungur ini secara umum didukung oleh data total flavonoidnya.

#### Penghambatan $\alpha$ -Amilase Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur

Potensi ekstrak fenolik daun Bungur sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase dapat dilihat dari nilai persen penghambatannya pada konsentrasi ekstrak yang sama. Semakin besar nilai persen penghambatannya, maka potensinya sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase semakin baik pula. Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase dihitung berdasarkan penurunan gula reduksi hasil reaksi hidrolisis pati terlarut oleh  $\alpha$ -amilase. Jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis ditentukan menggunakan reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS). DNS yang berwarna kuning akan direduksi oleh gula reduksi dan menghasilkan larutan yang berwarna coklat dengan panjang gelombang maksimum 540 nm. Adanya inhibitor  $\alpha$ -amilase dalam ekstrak akan menurunkan konsentrasi gula reduksi sehingga menyebabkan penurunan nilai absorbansi. Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh ekstrak fenolik daun Bungur ditampilkan oleh Gambar 6.



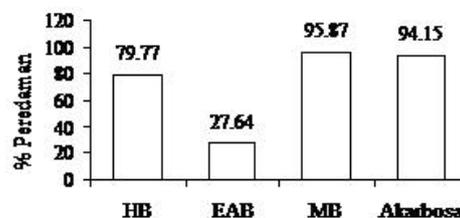
Gambar 6. Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh ekstrak fenolik daun Bungur

Kemampuan ekstrak fenolik daun Bungur dalam menghambat aktivitas  $\alpha$ -amilase meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran senyawa fenoliknya. Hal ini mungkin disebabkan karena senyawa yang paling aktif sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase berasal dari senyawa fenolik yang bersifat polar, sehingga ekstrak MB dengan kepolaran tertinggi mampu menghambat  $\alpha$ -amilase paling baik. Namun kepolaran tidak selamanya mendukung potensinya sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase karena enzim bersifat lebih spesifik daripada radikal sehingga struktur senyawa fenolik dalam ekstrak sangat mempengaruhi aktivitasnya sebagai inhibitor. Meskipun MB paling potensial dibandingkan dua ekstrak lainnya, namun aktivitasnya sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase masih lebih rendah daripada standar akarbosa.

**Penghambatan  $\alpha$ -Glukosidase Oleh Ekstrak Fenolik Daun Bungur**

Potensi ekstrak fenolik daun Bungur sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dapat dilihat dari nilai persen penghambatannya pada konsentrasi ekstrak yang sama. Semakin besar nilai persen penghambatannya, maka potensinya sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase semakin baik pula. Persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dihitung berdasarkan penurunan konsentrasi glukosa hasil reaksi hidrolisis maltosa oleh  $\alpha$ -glukosidase. Konsentrasi glukosa ditentukan menggunakan reaksi *coupling* enzim. Pertama glukosa dioksidasi oleh glukosa oksidase menghasilkan asam glukonat dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida yang terbentuk direaksikan dengan fenol dan aminoantipirin yang dikatalis oleh peroksidase menghasilkan larutan berwarna merah muda dengan panjang gelombang maksimum 500 nm. Adanya inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dalam ekstrak akan menurunkan konsentrasi glukosa sehingga

menyebabkan penurunan nilai absorbansi. Persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak fenolik daun Bungur ditampilkan oleh Gambar 7.



Gambar 7. Persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak fenolik daun Bungur

Kepolaran tidak selamanya mendukung potensi ekstrak fenolik daun Bungur sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase. Meskipun ekstrak MB yang memiliki kepolaran tertinggi mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase paling baik, hal ini tidak berlaku untuk ekstrak EAB. Ekstrak HB yang bersifat nonpolar justru memiliki persen penghambatan  $\alpha$ -glukosidase lebih tinggi dari pada EAB yang bersifat lebih polar. Sekali lagi enzim bersifat lebih spesifik dari radikal sehingga struktur dari senyawa fenolik dalam ekstrak akan sangat mempengaruhi aktivitasnya sebagai inhibitor.

Ekstrak MB memiliki potensi yang baik sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase karena mampu menghambat  $\alpha$ -glukosidase lebih baik dibandingkan standar akarbosa. Selain itu ekstrak MB juga dipilih sebagai ekstrak yang paling potensial sebagai agen antidiabetik karena mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dan  $\alpha$ -amilase paling baik dibandingkan dua ekstrak lainnya.

**KESIMPULAN**

Secara umum, ekstrak fenolik daun Bungur memiliki potensi sebagai antioksidan dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak MB merupakan ekstrak yang paling potensial sebagai antioksidan sekaligus sebagai inhibitor karena mampu meredam radikal DPPH, anion superoksida, dan hidrosil paling baik, dan mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase paling baik dibandingkan dengan ekstrak HB dan EAB, sehingga dapat dikatakan memiliki potensi jika digunakan sebagai agen antidiabetik dibandingkan dengan standar akarbosa.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan pada *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chang, W. C., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., & Kim, S. K. (2002). *Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants and Flavonoids*, Assay-guided Comparison. *Plant Sci.* Vol.163, pp.1161-1168.
- Dalimartha, S. (2003). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Jilid II. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Dewanjee, S., Das, A.K., Sahu, R., Gangopadhyay, M. (2009). *Anti-diabetic Activity of Diospyros peregrine Fruit: Effect on Hyperglycemia, Hyperlipidemia and Augmented Oxidative Stress in Experimental Type 2 Diabetes*. *Food Chem Toxicol*, Vol.4, pp. 2679-2685.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999). *Free radical in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford University Press. pp.639-45.
- Hashim, A., Khan, M. S., Khan, M. S., Baig, M. H., & Ahmad, S. (2013). *Antioxidant and Alpha Amylase Inhibitory Property of Phyllanthus Virgatus L: An In-Vitro and Molecular Interaction Study*. BioMed Research International, 2013.
- International Diabetes Federation. (2003). *Diabetes Atlas. Second Edition*. Belgium: Imprimerie L Vanmelle SA, Gent/Mariakerke.
- Patel, D. K., Kumar, R., & Hemalatha, D. L. (2012). *Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, pp. 239-250.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., Miyaza, M., yagi, N., & Taguchi, K. (2005). *Inhibitory Compounds of  $\alpha$ -Glukosidase Activity*, from *Arctium lappa* I. *J. Oleo Sci*, Vol.54 (11), pp. 589-594.
- Nadheesha, M. K. F., Bamunuarachichi, A., Edirisinghe, E. M. R. K. B. M., & Weerasinghe W. M. S. K. (2007). *Study on Antioxidant Activity of Indian Gooseberry Fruit and Seed*. *J. Sci.* Vol.3, pp. 83-92.
- Rao, M.U., Sreenivasulu, M., Chengaiah, B., Reddy, K.J., Chetty, C.M. (2010). *Herbal Medicines for Diabetes Mellitus: A Review*. *PharmTech Research*, Vol.2, pp. 1883-1892.
- Shan, Bin., Z, Cai, Yizhong Z., Sun, Mei., Corke, Harold. (2005). *Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents*. *J Agric Food Chem.* Vol.53, pp. 7749-7759.
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Bo, H., Kumar, S., et al. (2008). *Alpha-glucosidase Inhibitory Activity of Syzygium cumini (Linn.) Skeels Seed Kernel In Vitro and in Goto-Kakizaki (GK) Rats*. *Carbohydrate Research*, Vol.343, pp. 1278-1281.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., & Wichers, H.J. (2000). *An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of food stuffs*. *Phytochem. Anal*, Vol.11, pp. 330-338.
- Taga, M. S., Miller, E. E., & Prat, D. E. (1984). *Chia Seeds as a Source of Nature Lipid Antioxidant s*. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* Vol.61, pp. 928-931.
- Tang, X., He, Z., Day, Y., Xiong, Y.L., Xie, M., & Chen, J. (2010). *Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate*. *J. Agric. Food Chem.* Vol.58, pp.587-593.
- Wolff, S. P. (1993). *Diabetes Mellitus and free radicals: Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complication*. *British Medical Bulletin*, Vol.49 (3), pp. 642-432.