



CURRENT BIOCHEMISTRY

ISSN: 2355-7877

e-ISSN: 2355-7931

Journal homepage: <http://journal.ipb.ac.id/index.php/cbj>

Journal E-mail: [current.biochemistry@gmail.com](mailto:current.biochemistry@gmail.com)

**CB** Current  
Biochemistry

## Potency of Ethanol Extracts of Palm Seeds (*Phoenix dactylifera* L.) as Antidiabetic with Inhibition Kinetics Parameter

(Potensi Ekstrak Etanol Biji Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) sebagai Antidiabetes dengan Parameter Kinetika Inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase)

Lisa Giovanny<sup>1\*</sup>, Faliha Arinda Lestari<sup>1</sup>, Nurul Marfira<sup>1</sup>, Laksmi Ambarsari<sup>1</sup>, Siti Warnasih<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, IPB University, Bogor 16680

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Pakuan University, Bogor 16143

Received: 11 July 2019 ; Accepted: 20 December 2019

Corresponding author : Lisa Giovanny; Department of Biochemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, IPB University, Bogor 16680; Email: [lisagiovanny08@gmail.com](mailto:lisagiovanny08@gmail.com)

### ABSTRACT

Date seeds are one of the byproducts of the date palm juice industry which has the potential for further processing. Date seeds contain active compounds that are known to have ability to inhibit  $\alpha$ -Glucosidase. This study aims to measure the activity of 70% ethanol extract and the fraction of date palm seeds with a mechanism in inhibiting  $\alpha$ -Glucosidase. The measurement of inhibitory activity was carried out by extracting date palm seeds using water and 70% ethanol. The extraction product was then fractionated with nhexane, ethyl acetate, nbutanol, and water. Then the total phenolic and flavonoid contents were calculated for each extract and fraction. Measurement of  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activity was performed based on reaction of substrate to enzyme by the addition of inhibitors. The results showed that the ethanol extract had the highest total phenolic and flavonoid contents, which were 76.86 mg GAE / g and 21.19 mg QE / g, respectively. The n-hexane fraction exhibited the best inhibitory activity based on the  $IC_{50}$  value, which was 12.69 mg/L. The kinetics of inhibition of 70% ethanol extract of the date palm seeds are mixed inhibition.

**Keywords:**  $\alpha$ -Glucosidase, Date seeds, Flavonoids, Kinetic inhibition, Phenolic

### ABSTRAK

Biji kurma merupakan salah satu hasil samping dari industri sari kurma yang berpotensi untuk diolah lebih lanjut. Biji kurma mengandung senyawa aktif yang diketahui mampu menghambat  $\alpha$ -Glukosidase. Penelitian ini bertujuan mengukur aktivitas ekstrak etanol 70% dan fraksi biji kurma dengan mekanisme dalam menginhibisi  $\alpha$ -Glukosidase. Aktivitas inhibisi diukur dengan mengekstraksi biji kurma menggunakan pelarut air dan etanol 70%. Hasil ekstraksi kemudian difraksinasi dengan pelarut nheksana, etil asetat, nbutanol, dan air. Selanjutnya dilakukan perhitungan total fenolik dan flavonoid masing-masing ekstrak dan fraksi. Pengukuran aktivitas inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase diukur berdasarkan reaksi substrat terhadap enzim dengan penambahan inhibitor. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki total fenolik dan flavonoid tertinggi, yaitu masing-masing sebesar 76.86 mg GAE/g dan 21.19 mg QE/g. Fraksi

*n*-heksana memiliki aktivitas inhibisi yang paling baik dilihat dari nilai  $IC_{50}$ , yaitu sebesar 12.69 mg/L. Kinetika inhibisi ekstrak etanol 70% biji kurma adalah inhibisi campuran (*mixed inhibition*).

**Kata kunci:** *α*-Glukosidase, Biji kurma, Fenolik, Flavonoid, Kinetika inhibisi

## 1. PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu masalah kesehatan global terbesar pada abad ke-21. Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyakit mematikan di dunia. Menurut *International Diabetes Federation* (IDF) pada tahun 2017, penderita DM dunia mencapai 425 juta jiwa. Indonesia sendiri menduduki posisi ke-6 negara dengan penderita diabetes tertinggi di dunia. Sebanyak 325 dari 425 juta jiwa penderita diabetes dunia menderita diabetes melitus tipe 2. Diabetes adalah penyakit kronis yang terjadi ketika pankreas tidak memproduksi cukup insulin (hormon yang mengatur gula darah atau glukosa), atau ketika tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang telah diproduksi secara efektif (WHO 2016). Menurut National Health Service (NHS) pada tahun 2014, diabetes tipe 2 adalah tipe DM yang paling umum. Sebanyak 88,3% pengidap diabetes menderita diabetes tipe 2.

Berbagai upaya telah dilakukan untuk menangani kejadian DM, salah satunya dengan menghambat kerja  $\alpha$ -Glukosidase yang merupakan enzim kunci dalam pencernaan karbohidrat.  $\alpha$ -Glukosidase berperan dalam mengatalisis tahap akhir pencernaan disakarida dan pati pada proses diet. Maka dari itu, proses inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase dianggap efektif untuk menunda pemecahan karbohidrat dalam usus halus serta mampu menurunkan kadar abnormal glukosa darah pada penderita diabetes (Kazeem et al. 2013).

Penghambatan kerja  $\alpha$ -Glukosidase biasa dilakukan melalui konsumsi obat komersial yang beredar di masyarakat. Obat komersial yang biasa digunakan untuk menghambat  $\alpha$ -Glukosidase, di antaranya acarbose, viglibose, dan miglitol. Namun

konsumsi obat komersial tersebut memberikan efek samping, seperti mual, muntah, kejang perut, serta hepatotoksitas. Maka dari itu, pengembangan obat diabetes masih dikembangkan lebih lanjut. Beberapa inhibitor terhadap  $\alpha$ -Glukosidase sedang dikembangkan sebagai alternatif bagi penggunaan obat komersial yang beredar di masyarakat (Lai et al. 2012). Biji kurma (*Phoenix dactylifera* L) merupakan salah satu kekayaan hayati yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai alternatif bagi penggunaan obat antidiabetes yang aman dan efektif. Biji kurma memiliki berat total 5.610% dari total bobot buah kurma tergantung tingkat kematangan, varietas dan kelas. Indonesia merupakan salah satu negara importir buah kurma terbesar di dunia. Impor buah kurma yang dilakukan Indonesia pada Januari dan Februari 2018 mencapai 10.4 juta ton. Impor buah kurma dilakukan untuk memenuhi kebutuhan lokal dengan berbagai jenis pengolahan, salah satunya adalah pengolahan buah kurma sebagai sari kurma yang digunakan sebagai suplemen kesehatan. Salah satu produsen sari kurma di wilayah Bogor menggunakan 15002000 Kg buah kurma untuk memproduksi 7200 botol per harinya. Besarnya impor buah kurma di Indonesia tentunya juga akan menimbulkan limbah biji kurma yang cukup besar dan belum termanfaatkan dengan maksimal. Selain itu, kini di tengah masyarakat juga tengah berkembang tren mengonsumsi biji kurma dalam bentuk sediaan kopi yang dipercaya memiliki efek yang baik bagi kesehatan tubuh.

Penelitian yang dilakukan oleh Abiola et al. (2015) menunjukkan bahwa biji kurma mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, saponin, antrakuinon dan tanin. Flavonoid, saponin, antrakuinon,

diketahui memiliki kemampuan menghambat aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase (Santoni *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2009). Selain itu, menurut Khan *et al.* (2016) ekstrak air, etanol, metanol dan aseton memiliki kemampuan dalam menghambat  $\alpha$ -Glukosidase. Belum ada penelitian yang membuktikan bahwa ekstrak etanol 70% biji kurma mampu menghambat  $\alpha$ -Glukosidase yang berperan dalam penyakit diabetes. Penelitian ini bertujuan menguji dan mengukur aktivitas penghambatan ekstrak etanol 70% biji kurma terhadap  $\alpha$ -Glukosidase sebagai model penyakit diabetes secara *in vitro* dengan mekanisme inhibisi kinetika inhibisi terhadap  $\alpha$ -Glukosidase.

## 2. METODOLOGI

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini, di antaranya, hammer mill, evaporator (HS 2005V), spektrofotometer (Hitachi tipe U2800), pH meter (Eutech Instruments), vortex mixer (BI tipe 37600 mixer), microplate reader (Biotek Epoch).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini, di antaranya biji kurma yang diperoleh dari industri sari kurma AlJazira Bogor,  $\alpha$ -Glukosidase dari *Aspergillus* sp. (SigmaAdrich Co), paranitrofenil- $\alpha$ -Dglukopiranosida (pNPG) (SigmaAdrich Co), pnitrofenol, kuersetin, FollinCiocalteu, asam galat, alumunium foil.

### **Preparasi biji kurma (Zubaidah dan Sari 2015)**

Biji kurma dibersihkan terlebih dahulu, kemudian dipanaskan di dalam oven yang telah diatur pada suhu 50°C selama 24 jam. Setelah kering, biji kurma dihaluskan lalu diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh.

### **Penentuan kadar air (AOC 2007)**

Penentuan kadar air sampel biji kurma dilakukan dengan pengeringan di dalam oven. Cawan porselin mulamula dikeringkan pada suhu

105 °C selama 30 menit kemudian didinginkan di dalam desikator selama 15 menit. Selanjutnya porselin yang telah dingin ditimbang pada neraca analitik. Sebanyak 3 g sampel dimasukkan ke dalam cawan porselin yang telah dikeringkan lalu dipanaskan pada suhu 105 °C selama 3 jam kemudian didinginkan di dalam desikator selama 15 menit lalu ditimbang. Pemanasan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

### **Ekstraksi Biji Kurma (Modifikasi Lumempouw *et al.* 2012)**

Ekstraksi diawali dengan membuat ekstrak etanol biji kurma. Sebanyak 125 g simplisia biji kurma dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 500 mL, kemudian dimaserasi menggunakan 250 mL etanol 70% dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah itu, maserat disaring. Selanjutnya, ampas diremaserasi (sebanyak dua kali ulangan) menggunakan pelarut dan kecepatan yang sama selama 24 jam, lalu maserat kembali disaring sehingga diperoleh filtrate hasil maserasi. Selanjutnya dilakukan pembuatan ekstrak air biji kurma. Sebanyak 50 g simplisia dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 500 mL lalu direfluks menggunakan 100 mL akuades pada suhu 90 °C selama 1 jam. Setelah itu campuran disaring. Ampas digunakan untuk proses refluks kembali dengan kondisi yang sama. Setelah itu, campuran disaring sehingga diperoleh filtrat hasil refluks. Ekstraksi dilakukan secara triplo. Filtrat hasil ekstraksi dipisahkan dengan evaporator pada suhu 50 °C hingga menjadi pasta. Ekstrak disimpan dalam wadah tertutup pada suhu 4 °C.

### **Fraksinasi ekstrak etanol biji kurma (Firdausi *et al.* 2015 dengan modifikasi)**

Fraksinasi ekstrak etanol biji kurma dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama, sebanyak 10 gram ekstrak etanol biji kurma

dilarutkan dalam 50 ml nheksana dan 50 mL akuades secara bergantian sehingga ekstrak larut seutuhnya. Kemudian, campuran dipisahkan dengan corong pisah. Selanjutnya campuran didiamkan hingga terlihat lapisan antara nheksana dengan air. Fraksi nheksana dengan fraksi air kemudian dipisahkan. Fraksi air yang diperoleh kemudian difraksinasi kembali dengan 50 ml nheksana. Proses ini dilakukan secara triplo dengan pelarut yang sama. Namun, pelarut nheksana diganti dengan pelarut etil asetat lalu pelarut nbutanol sehingga pada tahap akhir akan diperoleh 4 jenis fraksi, yaitu fraksi nheksana, fraksi etil asetat, fraksi nbutanol dan fraksi air. Fraksi fraksi yang diperoleh, yaitu fraksi nheksana, fraksi etil asetat dan fraksi nbutanol, dipekatkan dengan evaporator. Fraksifrakasi yang diperoleh dihitung persentase rendemennya lalu disimpan dalam wadah tertutup dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu  $\leq 4$  °C.

#### **Penentuan Kandungan Total Fenolik (Javanmardi *et al.* 2003 dengan modifikasi)**

Penentuan kandungan fenolik menggunakan reagen FollinCiocalteu. Sebanyak 0.2 mL ekstrak dan masing-masing fraksi (nheksana, nbutanol, etil asetat dan air) secara triplo dengan konsentrasi 200 mg/L, 2.5 ml reagen FollinCiocalteu 10% dan 2 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7.5% dicampurkan dan diinkubasi selama 30 menit.

Absorban larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Total fenolik ekstrak biji kurma diekspresikan sebagai milligram (mg) asam galat ekuivalen per gram bobot ekstrak kering (mg GAE/g ekstrak biji kurma). Asam galat pada konsentrasi (0, 25, 50, 75, 100, 125 mg/L) digunakan sebagai standar.

#### **Penentuan Total Flavonoid (Chang *et al.* 2002 dengan modifikasi)**

Penentuan kadar total flavonoid ekstrak biji kurma menggunakan metode spektrofotometri UVVis. Kuersetin digunakan dalam pembuatan kurva kalibrasi. Sebanyak 10 mg kuersetin dilarutkan dalam 80% metanol, kemudian diencerkan menjadi 25, 50 dan 100 mg/L. Masing-masing standar dan ekstrak sebanyak 0.5 mL ditambahkan 1.5 mL etanol 95%, 0.1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 mL kalium asetat 1 M dan 2.8 mL air suling. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian dibaca absorbansinya pada  $\lambda$  415 nm.

#### **Uji Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase (Sancheti *et al.* 2009)**

Campuran reaksi terdiri atas 10  $\mu$ L sampel (konsentrasi 10005000 mg/L), 50  $\mu$ L larutan buffer fosfat 0.1 M (pH 7), 25  $\mu$ L substrat pNPG (pnitrofenilDglukopiranosida) 10 mM dan reaksi diinisiasi dengan penambahan 25  $\mu$ l enzim  $\alpha$ -Glukosidase dengan konsentrasi 0.1 U/mL dalam bufer fosfat (pH 7.0). Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM. Hasil reaksi diukur dengan microplate reader pada panjang gelombang 410 nm. Larutan akarbose (konsentrasi 0.110  $\mu$ g/mL) digunakan sebagai kontrol positif. Percobaan dilakukan secara triplo. Selanjutnya dilakukan perhitungan % inhibisi untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Sistem reaksi dapat diketahui pada Tabel 1.

#### **Kinetika Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase (Kazeem *et al.* 2013)**

Penentuan kinetika inhibisi  $\alpha$  Glukosidase dilakukan dengan membuat kurva standar pnitrofenol terlebih dahulu. Sebanyak 0.6995 g Pnitrofenol dilarutkan dengan buffer fosfat 0.1 M pH 7. Kemudian stok pnitrofenol tersebut diencerkan ke berbagai konsentrasi dan diukur menggunakan spektrofotometer UVVis pada panjang gelombang 400 nm.

Selanjutnya, penentuan kinetika inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase dilakukan dengan menggunakan dua set reaksi, yaitu reaksi dengan inhibisi dan reaksi tanpa inhibisi.

Set reaksi dengan inhibisi berisi 10  $\mu$ L sampel dengan inhibisi terbaik ( $IC_{50}$  terbaik) yang dicampur dengan 50  $\mu$ L buffer fosfat 0,1 M pH 7, 25  $\mu$ L substrat pNPG (p-nitrofenil Dglukopiranosida) pada berbagai konsentrasi. Kemudian reaksi diinisiasi dengan menambahkan 25  $\mu$ L enzim  $\alpha$ -Glukosidase. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan  $Na_2CO_3$  20 mM sebanyak 100  $\mu$ L.

Set reaksi tanpa inhibisi berisi 10  $\mu$ L pelarut yang dicampur dengan 50  $\mu$ L bufer fosfat 0,1 M pH 7, 25  $\mu$ L substrat pNPG (p-nitrofenil Dglukopiranosida) pada berbagai konsentrasi. Reaksi diinisiasi dengan menambahkan 25  $\mu$ L enzim  $\alpha$ -Glukosidase. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan  $Na_2CO_3$  20 mM sebanyak 100  $\mu$ L.

### 3. HASIL

#### Kadar air, rendemen ekstrak dan fraksi biji kurma

Kadar air simplisia biji kurma diperoleh dengan menggunakan metode gravimetri sebanyak tiga kali ulangan

mengacu pada AOAC 2007. Metode ini dilakukan dengan mengeringkan simplisia pada oven dengan suhu 105 °C selama 3 jam. Kadar air yang diperoleh dalam penelitian ini sebesar 0.13 % (Tabel 1). Rendemen ekstrak air biji kurma diperoleh dengan menggunakan metode refluks. Rendemen ekstrak air biji kurma diperoleh sebesar 0.96%. Rendemen ekstrak etanol 70% diperoleh dengan menggunakan metode maserasi, yaitu dengan cara melarutkan simplisia biji kurma ke dalam pelarut etanol 70% selama 3x24 jam menggunakan shaker pada kecepatan 130 rpm dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Rendemen ekstrak etanol 70% diperoleh sebesar 2.82% (Tabel 1). Ekstrak etanol 70% kemudian difraksinasi secara bertingkat menggunakan empat pelarut dengan derajat kepolaran yang berbeda. Fraksinasi ekstrak etanol 70% dilakukan menggunakan empat pelarut berdasarkan urutan derajat ketidakpolarannya, yaitu nheksana untuk pelarut nonpolar, etil asetat untuk pelarut semipolar, nbutanol untuk pelarut semipolar dan air untuk pelarut polar. Keempat fraksi kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Fraksi air memiliki rendemen tertinggi, yaitu sebesar 0.94% dan fraksi nheksana memiliki rendemen terendah, yaitu 0.01% (Tabel 1).

**Tabel 1** Kadar air, rendemen ekstrak dan fraksi kurma

Pengujian	Hasil rerata (%)
Kadar air simplisia biji kurma	0.13
Rendemen ekstrak air	0.96
Rendemen ekstrak etanol 70%	2.82
Rendemen fraksi dan simplisia	
n-heksana	0.01
Etil asetat	0.03
n-butanol	0.22
Air	0.4

### Total fenolik ekstrak dan fraksi biji kurma

Penentuan kadar total fenolik biji kurma dilakukan menggunakan reagen Follin-Ciaocalteu. Pengukuran total fenolik menggunakan standar asam galat. Persamaan garis yang diperoleh dari data Absorbansi standar adalah  $Y = 0.003x + 0.006$  dengan nilai  $R^2$  sebesar 0.996. Ekstrak etanol memiliki nilai total fenolik tertinggi, yaitu sebesar 76.86 mg GAE/g sedangkan fraksi nheksana memiliki nilai total fenolik terendah, yaitu sebesar 0.25 mg GAE/g.

### Total Flavonoid Ekstrak dan Fraksi Biji Kurma

Penentuan kadar total flavonoid biji kurma dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UVVis. Pengukuran total flavonoid menggunakan standar kuersetin. Persamaan garis yang diperoleh dari data absorbansi standar adalah  $Y = 0.0047x + 0.001$  dengan nilai  $R^2$  sebesar 0.999. Kadar total flavonoid dihitung berdasarkan satuan mg

QE/g. Ekstrak etanol memiliki nilai total flavonoid tertinggi, yaitu sebesar 21.19 mg QE/g sedangkan fraksi nheksana memiliki nilai total fenolik terendah, yaitu sebesar 0.04 mg QE/g.

### Aktivitas Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase Ekstrak dan Fraksi Biji Kurma

Kemampuan ekstrak dan fraksi biji kurma dalam menghambat  $\alpha$ -Glukosidase dapat ditentukan berdasarkan persen inhibisi (Gambar 38) dan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel (Tabel 2).  $IC_{50}$  merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak atau fraksi biji kurma yang mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ glukosidase sebesar 50%. Data penelitian menunjukkan bahwa semua sampel baik ekstrak dan fraksi memiliki aktivitas inhibisi terhadap  $\alpha$ -Glukosidase. Fraksi nheksana memiliki nilai  $IC_{50}$  tertinggi, yaitu sebesar 12.69  $\mu$ g/mL, sedangkan ekstrak air memiliki nilai  $IC_{50}$  terendah, yaitu sebesar 7480.09  $\mu$ g/mL (Tabel 2).

**Tabel 2** Nilai  $IC_{50}$  ekstrak dan fraksi biji kurma

Sampel	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)
Ekstrak air	7480.090
Ekstrak etanol 70%	15.425
Fraksi n-heksana	12.690
Fraksi etil asetat	13.220
Fraksi n-butanol	141.457
Fraksi air	186.606
Akarbose	0.004

### Kinetika Inhibisi $\alpha$ Glukosidase

Penentuan tipe inhibisi dilakukan menggunakan dua macam set reaksi, yaitu set reaksi inhibisi dan set reaksi non inhibisi yang direaksikan dengan berbagai konsentrasi substrat. Inhibitor (ekstrak etanol 70%) dengan konsentrasi 1000 mg/L ditambahkan ke dalam set inhibisi, sehingga diperoleh plot yang berbeda antara aktivitas enzim tanpa inhibitor dan aktivitas enzim dengan inhibitor. Analisis

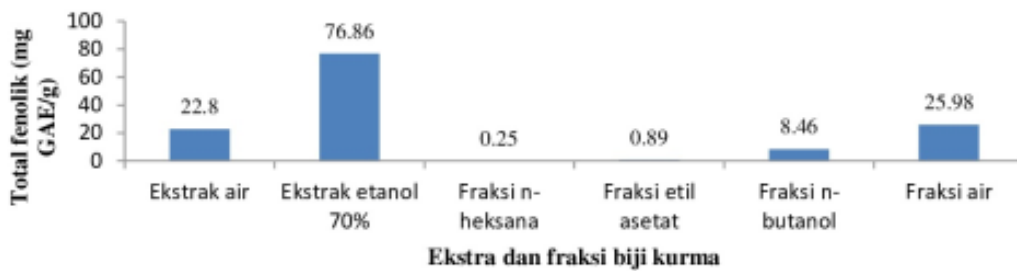
kinetika inhibisi ditentukan melalui kurva LineweaverBurk (Gambar 10). Data penelitian menunjukkan bahwa jenis inhibisi yang bekerja adalah inhibisi campuran (*mixed inhibition*). Hal ini dilihat dari penurunan kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) dan kenaikan tetapan MichaelisMenten ( $K_m$ ) (Tabel 3) akibat penambahan ekstrak etanol 70% biji kurma.

**4. PEMBAHASAN**

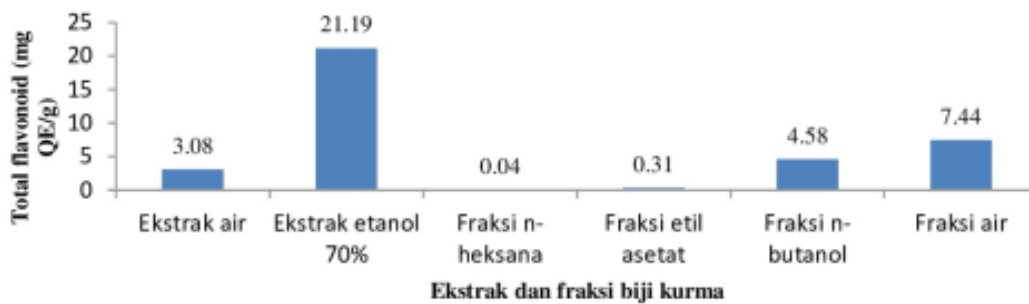
**Kadar air, rendemen ekstrak dan fraksi biji kurma**

Penentuan kadar air dilakukan untuk mengetahui batasan maksimal kandungan air pada suatu bahan. Beberapa metode yang dapat digunakan dalam penentuan kadar air, di antaranya destilasi, titrasi dan gravimetri. Metode yang digunakan dalam penentuan kadar air pada penelitian ini adalah metode gravimetri. Penentuankadar air simplisia sangat penting untuk dilakukan guna menentukan daya simpan, karena kadar air akan memengaruhi cepat lambatnya proses pembusukan dan ketengikan suatu bahan yang diakibatkan oleh proses mikrobiologis,

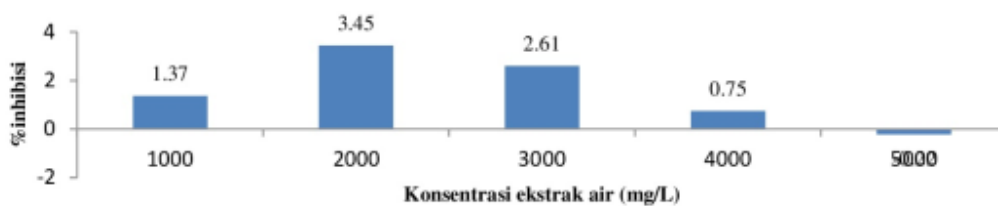
kimiawi, maupun enzimatik. Semakin kecil kadar air pada suatu bahan, maka daya simpan simplisia juga akan semakin lama serta akan semakin baik dalam mempertahankan sifat senyawa yang terkandung dalam simplisia tersebut. Penentuan kadar air juga penting dilakukan untuk suatu bahan yang akan dimanfaatkan sebagai obat tradisional. BPOM (2014) menyatakan bahwa suatu bahan dapat dikatakan memenuhi persyaratan mutu obat tradisional apabila memiliki kadar air  $\leq 10\%$ . Kadar air bahan lebih dari 10% akan menyebabkan terjadinya proses enzimatik dan kerusakan oleh mikroba (Manoi 2006).



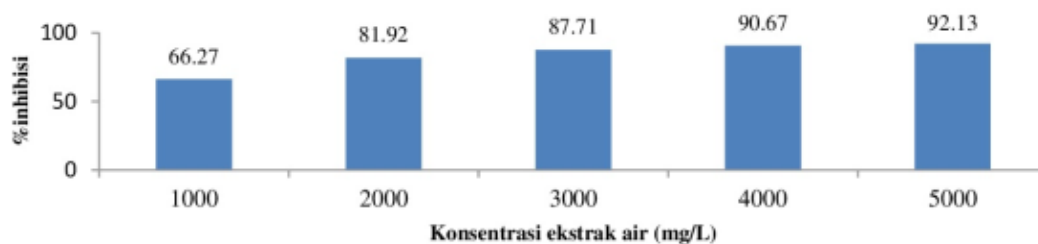
**Gambar 1** Kadar total fenolik ekstrak dan fraksi biji kurma



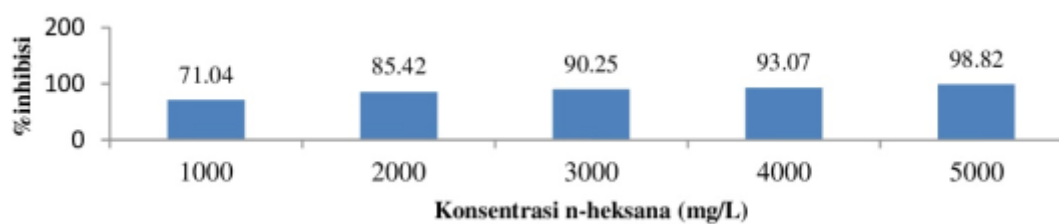
**Gambar 2** Kadar total flavonoid ekstrak dan fraksi biji kurma



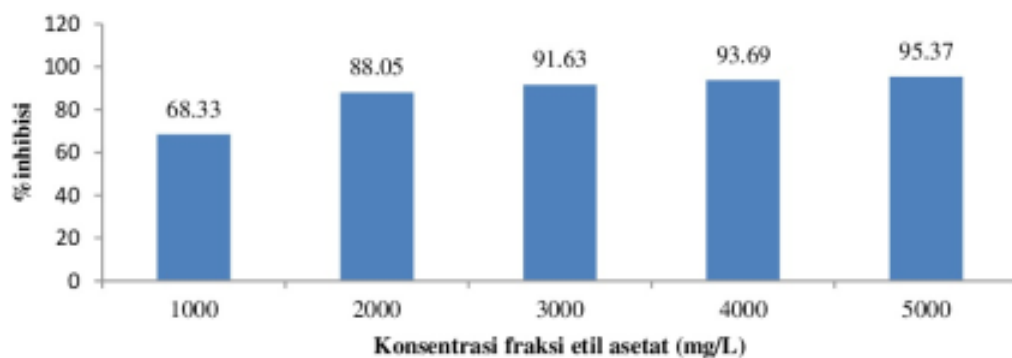
**Gambar 3** Aktivitas penghambatan ekstrak air



**Gambar 4** Aktivitas penghambatan ekstrak etanol 70%



**Gambar 5** Aktivitas penghambatan fraksi n-heksana

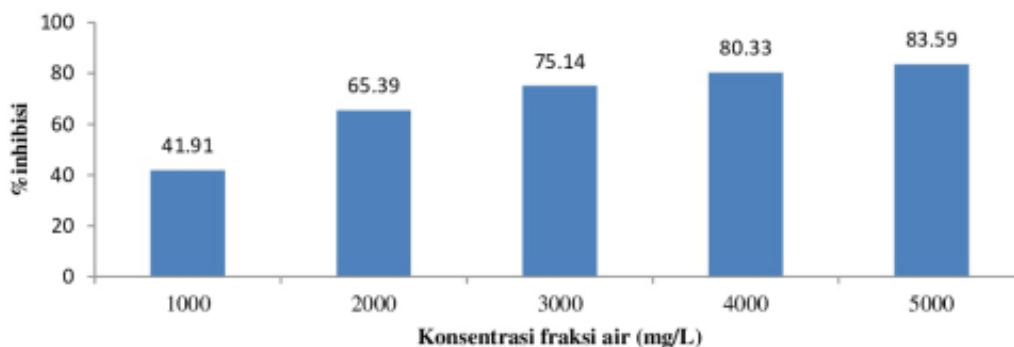


**Gambar 6** Aktivitas penghambatan fraksi etil asetat

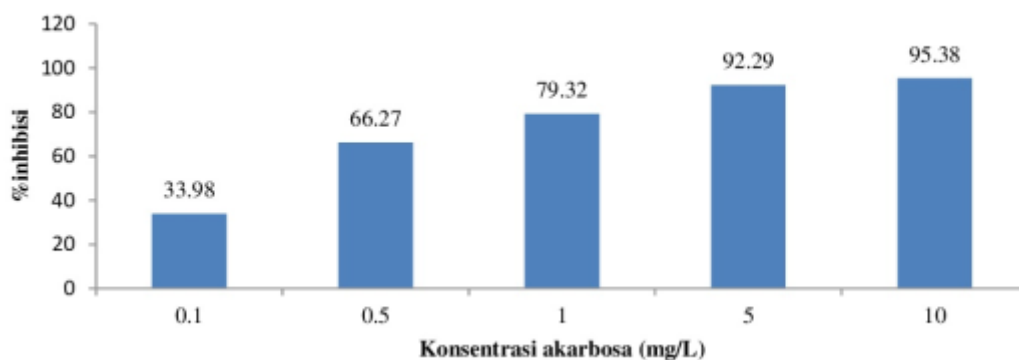


**Gambar 7** Aktivitas penghambatan fraksi nbutanol

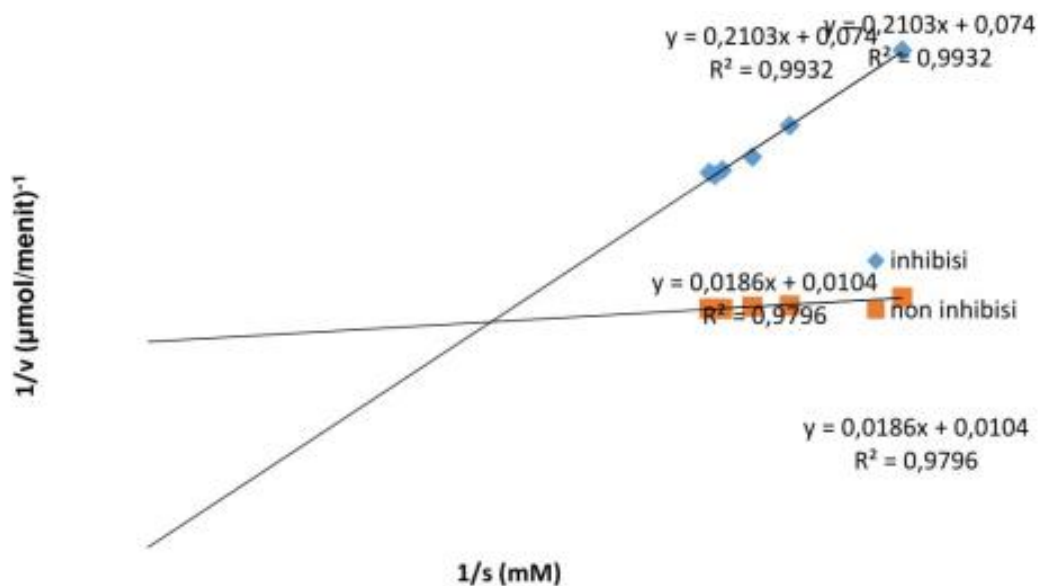




Gambar 8 Aktivitas penghambatan fraksi air



Gambar 9 Aktivitas penghambatan akarbosa



Gambar 10 Tipe inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase oleh ekstrak etanol 70% biji kurma (*Phoenix dactylifera* L.) 1000 ppm

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air simplisia biji kurma mencapai

0.13%. Nilai kadar air tersebut termasuk ke dalam kategori nilai kadar air yang rendah,

sesuai dengan persyaratan yang dinyatakan oleh BPOM (2014). Besarnya nilai kadar air dipengaruhi juga oleh metode pengeringan yang dilakukan pada suatu penelitian. Menurut Manoi (2006), pengeringan yang dilakukan dengan metode kering angina menghasilkan simplisia dengan kadar air yang masih tinggi, sedangkan pengeringan dengan cara kombinasi sinar matahari dan blower memberikan hasil mutu simplisia terbaik dalam penelitiannya.

Setelah penentuan mutu dan kualitas melalui pengukuran kadar air, sampel kemudian diekstraksi. Ekstraksi merupakan langkah awal dalam proses isolasi senyawa kimia (Mangal 2012). Terdapat beberapa jenis teknik umum dalam proses ekstraksi, namun penelitian ini menggunakan metode refluks untuk ekstraksi air dan metode maserasi untuk ekstrak etanol 70%. Refluks merupakan metode ekstraksi dengan cara pemanasan (Siregar 2009). Maserasi merupakan metode umum dalam pengerjaan ekstraksi, karena cukup mudah untuk dilakukan dan peralatan yang dibutuhkan juga cukup sederhana (Prasetyo 2015). Pemilihan etanol 70% sebagai pelarut banyak disarankan, karena kemampuannya mengekstrak senyawa polifenol dan aman bagi manusia (Al Hashmi 2012). Metode refluks menggunakan akuades untuk mengekstraksi sampel. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam untuk meningkatkan rendemen yang diperoleh. Tabel 1 menunjukkan bahwa perbedaan metode ekstraksi akan menghasilkan rendemen ekstrak yang berbeda. Rendemen ekstrak etanol 70% lebih tinggi dibandingkan rendemen ekstrak air. Ada beberapa faktor yang menyebabkan perbedaan persentase rendemen, yaitu jenis pelarut, lama waktu ekstraksi, ukuran partikel, temperatur, serta proses pengadukan (Hidayat et al. 2016; Maulida dan Guntarti 2015; Pambayun et al. 2007). Etanol 70% bersifat semipolar. Derajat kepolaran tersebut diharapkan mampu

mengekstrak lebih banyak metabolit sekunder yang larut dalam pelarut semipolar, seperti katekin, epikatekin, prosianidin B3, prosianidin B4 (Zhao et al. 2009).

Ekstrak kasar etanol 70% difraksinasi secara bertingkat menggunakan pelarut dengan derajat kepolaran yang berbeda bertujuan memisahkan campuran dengan memanfaatkan perbedaan kelarutan zat yang akan dipisahkan antara larutan asal dengan pelarut pengekstrak. Metode ini melibatkan suatu larutan antara dua fase yang tidak saling tercampur (Mirwan dan Arriono 2010). Fraksinasi hanya dilakukan terhadap ekstrak etanol 70%. Menurut Zhao et al. (2009) ekstrak etanol yang difraksinasi akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang mampu menghambat  $\alpha$ -Glukosidase. Penelitian ini menggunakan metode fraksinasi caircair dengan corong pisah, dengan prinsip *like dissolve like* (Mirwan 2013). Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi ekstrak etanol 70% biji kurma adalah nheksana, etil asetat, nbutanol dan air. Pemilihan keempat pelarut tersebut dikarenakan masing-masing pelarut mampu mewakili tingkat kepolaran yang berbedabeda, sehingga diharapkan mampu memisahkan komponen senyawa kimia sesuai dengan sifatnya (Septiani 2017). Rendemen fraksi terbesar terdapat pada fraksi air, sedangkan rendemen fraksi terkecil terdapat pada fraksi nheksana (Tabel 1). Menurut Septiani (2017) nilai rendemen fraksi menunjukkan jumlah metabolit sekunder yang terekstrak di dalam pelarut berdasarkan derajat kepolarannya.

### **Total Fenolik dan Total Flavonoid Ekstrak dan Fraksi Biji Kurma**

Pengukuran total fenolik bertujuan untuk mengetahui jumlah keseluruhan senyawa golongan fenolik yang berada di dalam ekstrak maupun fraksi biji kurma. Metode yang digunakan dalam penentuan total fenolik adalah FoliinCiocalteu. Reagen

FollinCiaocalteu memiliki peran sebagai agen pengoksidasi (Chen *et al.* 2012). Asam galat merupakan standar yang secara umum digunakan dalam penentuan total fenolik (Dai dan Mumper 2010).

Data dari penelitian ini menunjukkan ekstrak etanol 70% memiliki total fenolik yang paling tinggi, sedangkan total fenolik terendah terdapat pada fraksi nheksana (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan pelarut yang berbeda memengaruhi kandungan total fenolik. Ekstrak etanol 70% memiliki kandungan total fenolik lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut lainnya. Senyawa fenolik tergolong senyawa polar (Andriani *et al.* 2011). Pelarut etanol bersifat semipolar (Nanik dan Eka 2011) sehingga senyawa fenolik lebih banyak terjerap pada ekstrak etanol.

Penentuan kandungan total flavonoid bertujuan untuk mengukur jumlah senyawa bioaktif golongan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi biji kurma. Metode yang digunakan pada penentuan total flavonoid adalah aluminium klorida. Prinsip kerja metode ini adalah aluminium klorida akan membentuk kompleks asam tidak stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (Chang *et al.* 2002). Kompleks tersebut kemudian akan membentuk warna kuning (Purnama 2015). Penggunaan kuersetin sebagai standar dikarenakan senyawa tersebut mampu mencapai absorbansi maksimum pada panjang gelombang 415 nm sehingga tepat untuk dijadikan standar dalam pengukuran flavonoid (Chang *et al.* 2002).

Data dari penelitian ini menunjukkan ekstrak etanol 70% memiliki kandungan total flavonoid yang paing tinggi sedangkan fraksi nheksana memiliki kandungan total flavonoid terendah. Ekstrak etanol 70% memiliki kandungan total flavonoid tertinggi dibandingkan dengan pelarut lainnya. Hal ini dikarenakan senyawa flavonoid merupakan

senyawa yang bersifat nonpolar, yang mana ekstrak dengan pelarut etanol bersifat semipolar (Nanik dan Eka 2011) sehingga senyawa flavonoid lebih banyak terjerap pada ekstrak etanol.

### **Kinetika Inhibisi $\alpha$ Glukosidase**

Sebagian besar enzim memiliki sifat kinetik tertentu yang sama. Ketika enzim ditambahkan ke substrat, reaksi dengan cepat menyeimbangkan laju yang dirusaknya. Ketika substrat [S] meningkat, aktivitas enzim meningkat secara hiperbolik untuk mendekati laju maksimum  $V_{max}$ ). Selain  $V_{maks}$ , parameter kinetika enzim lainnya adalah tetapan MichaelisMenten ( $K_m$ ).  $K_m$  merupakan konsentrasi substrat saat kecepatan enzim mencapai setengahnya (Nelson dan Cox 2012).

Hasil pengukuran kinetika enzim  $\alpha$ -Glukosidase dipetakan pada plot Lineweaver Burk. Data penelitian menunjukkan adanya penambahan inhibitor mengakibatkan penurunan  $V_{maks}$  dan terjadi peningkatan konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) (Tabel 3). Menurut Crown *et al.* (2017) proses inhibisi enzim campuran (mixed inhibition) ditandai dengan kenaikan konstanta MichaelisMenten dan penurunan  $V_{maks}$ . Jika dibandingkan, akarbosa sebagai inhibitor komersial  $\alpha$ -Glukosidase memiliki jenis inhibisi kompetitif.

Enzim dapat mengalami dua jenis penghambatan sekaligus, yakni gabungan dari inhibisi kompetitif dan inhibisi nonkompetitif. Jenis inhibisi gabungan ini disebut dengan inhibisi campuran (*mixed inhibition*) (Strelow *et al.* 2012). Inhibitor kompetitif tidak mengakibatkan perubahan dalam nilai  $V_{maks}$  namun meningkatkan nilai konstanta Michaelis-menten ( $K_m$ ). Inhibitor nonkompetitif dapat mengikat enzim bebas maupun kompleks enzim substrat, yang mana akibat pengikatan ini mengakibatkan penurunan nilai  $V_{max}$  secara jelas namun

tidak menyebabkan perubahan pada nilai Km. Sehingga, inhibisi campuran dapat terjadi jika

terjadi peningkatan nilai Km yang diikuti dengan penurunan nilai Vmaks

**Tabel 3** Hasil perhitungan Vmaks dan Km berdasarkan persamaan LineweaverBurk

Reaksi	A	b	R <sup>2</sup>	Vmaks (µmol/menit)	Km (mM)
Inhibisi	0.074	0.210	0.993	13.510	2.840
Non Inhibisi	0.010	0.018	0.979	100.000	1.800

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) DIKTI.

### DAFTAR PUSTAKA

[AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2007. Official Methods of Analysis Ed.18. Washington DC: Association of Official Analytical Chemist.

Abiola M, Adeosun, Sarah O, Oni, Osasenaga M, Ighodaro, Okikiola HD, Omotayo MO. 2015. Phytochemical, minerals and free radical scavenging profiles of *Phoenix dactylyfera* L. seed extract. J. Taibah University Medical Science:1-6.

AlHashimi AG. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L extract. Afri J. Food Sci. 6(21):506511. [BPOM] Badan Pengawasan Obat dan Makanan. 2010. Acuan Sediaan Herbal Volume 5 Edisi 1. Jakarta: BPOM.

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chem JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food and Drug Analysis. 10(3): 178-182. Chen CM, Lin CY, Lin LC, Wan TC. 2012. Antioxidant activity and total phenolic content of various *Toona sinensi* extracts. African Journal of Biotechnology. 11(73):

1383113837.

DOI:

10.5897/AJB12.2086.

Crown OO, Olayeriju OS, Kolawole AO, Akinmoladum AC, Olaleye MT, Akindahunsi AA. 2017. *Mobola plim* seed methanolic extracts exhibit mixed type inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro*. Asian Pacific J. of Tropical Biomedicine. 7(12): 1079-1084.

Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. J. Molecules. 15: 7313--7352. DOI: 10.3390/molecules15107313.

Firdausi I, Retnowati R, Sutrisno. 2015. Fraksinasi ekstrak metanol daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) dengan pelarut nbutanol. Kim Stud J. 1(1): 785-790.

Hidayat N, Dewi IA, Hardani DA. 2016. Ekstraksi minyak melati (*Jasminum sambac*) (kajian jenis pelarut dan lama ekstraksi). J. Indust. 4(2): 82-88.

International Diabetes Federation [IDF]. 2015. IDF diabetes atlas (7th ed.). IDF.

Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of *Iranian Ocimum* accessions. J. Food Chemistry. 83:547-550.

Kazeem MI, Adamson JO, Ogunwande IA. 2013. Modes of inhibition of amylase and glucosidase by

- aqueous extract of *Morinda lucida* benth leaf. J. BioMed Res Inter. 2013; 16. DOI: 10.1155/2013/527-570.
- Lai YC, Chen CK, Tsai SF, Lee SS. 2012. Triterpenes as  $\alpha$ glucosidase inhibitors from *Fagus hayatae*. J. Phytochemistry. 74:206- 211.
- Lumempouw LI, Suryanto E, Paendong JJE. 2012. Aktivitas anti UVB ekstrak fenolik dari tongkol jagung (*Zea mays* L.). J. MIPA Unsrat Onl: 1(1): 1-4.
- Maulida R, Guntarti A. 2015. Pengaruh ukuran partikel beras hitam (*Oryza sativa* L.) terhadap rendemen ekstrak dan kandungan total antosianin. J. Pharmacia. 5(1): 9-16.
- National Health Service [NHS]. 2014. Scottish diabetes survey 2014.
- Pambayun R, Gardjito M, Sudarmadji S, Kuswanto KR. 2007. Kandungan fenol dan sifat antibakteri dari berbagai jenis ekstrak produk gambir (*Uncaria gambir* Roxb). J. Maj Farm Indones. 3:141-146.
- Sancheti S, Sandesh S, Seo SY. 2009. *Chaenomelos sinensis* : a potent  $\alpha$  and  $\beta$  glucosidase inhibitor. American Journal of Pharmacology and Toxicology.4(1): 8-11.
- Septiani R. 2017. Ekstrak dan fraksi daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) sebagai antioksidan dengan metode 2,2difenil1 pikrilhidrazil [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Strelow J, Dewe W, Iversen PW, Brooks HB, Radding JA, McGee J, Weidner J. (2012). Mechanism of Action Assays for Enzymes. In J. McGee & J. Weidner (Eds.), Assay Guidance Manual.
- Zubaidah E dan Sari DP. 2015. Pengaruh penambahan kacang hijau pada media beras IR36 terhadap pigmen dan lovastatin angkak. Jurnal Pangan Agroindustri. (3). 3: 962-971.