

SENYAWA INHIBITOR α -GLUKOSIDASE DAN ANTIOKSIDAN DARI KUMIS KUCING DENGAN PENDEKATAN METABOLOMIK BERBASIS FTIR

[*α -Glucosidase Inhibitor and Antioxidant Compounds from Orthosiphon stamineus Benth Using FTIR Based Metabolomics*]

Juliani¹⁾, Nancy D. Yuliana^{2,3)*}, Slamet Budijanto²⁾, C. Hanny Wijaya^{2,3)}, dan Alfi Khatib⁴⁾

¹⁾ Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾ Pusat Studi Biofarmaka LPPM, Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁴⁾ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, International Islamic University Malaysia, Malaysia

Diterima 22 April 2016 / Disetujui 24 Juni 2016

ABSTRACT

Plant is well known as an excellent source for bioactive compounds. Metabolomics was reported as a potential tool to accelerate plant active compounds identification. In this research, FTIR-based metabolomics method was used to identify active compounds with α -glucosidase inhibitory and antioxidant activity in aerial parts of *Orthosiphon stamineus* (OS) extract and its fractions. Chemical profile of OS methanolic extracts and hexane, chloroform, butanol, and water fractions were analyzed using infrared spectroscopy. OS extracts and fractions showed inhibitory activity against α -glucosidase enzymes with IC_{50} value 154.07 ± 30.60 - 465.83 ± 85.34 $\mu\text{g/mL}$ and antioxidant activity with IC_{50} value 7.41 ± 0.02 - 19.35 ± 0.09 $\mu\text{g/mL}$. Butanol fraction was the fraction with the highest α -glucosidase inhibitory activity and moderate antioxidant activity with IC_{50} value between 154.07 ± 30.60 $\mu\text{g/mL}$ and 10.84 ± 0.54 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The correlation between the biological activity and chemical composition data were analyzed using Orthogonal Projections to Latent Structures (OPLS). Based on the VIP (variable influence on projection), the coefficient value of the respective OPLS models, and IR database of compounds previously identified in OS, it was suggested that methoxy flavonoid (sinensetin and 5,6,7,3'-tetramethoxy-4'-hydroxy-8-C-prenylflavone), diterpenes (orthosiphols, orthoarisins, neoorthosiphols, staminols, and staminolactones) and triterpenes (ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid, hydroxybetulinic acid, maslinic acid, α -amyrin and β -amyrin) were identified as responsible compounds for the α -glucosidase inhibitory activity. Meanwhile phenolic (rosmarinic acid), methoxy flavonoid (eupatorin, sinensetin, 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone, salvigenin, 6-hydroxy-5,7,3'-trimethoxyflavone and 5,6,7,3'-tetramethoxy-4'-hydroxy-8-C-prenylflavone), diterpenes (orthosiphols, orthoarisins, neoorthosiphols, staminols, and staminolactones) and triterpenes (ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid, hydroxybetulinic acid, maslinic acid, α -amyrin and β -amyrin) were identified as responsible compounds for the antioxidant activity.

Keywords: α -glucosidase inhibitors, antioxidants, metabolomics, *Orthosiphon stamineus*

ABSTRAK

Tumbuhan merupakan salah satu sumber senyawa aktif yang potensial. Pendekatan metabolomik dilaporkan sebagai salah satu metode alternatif yang dapat mempercepat proses identifikasi komponen aktif dari tumbuhan. Pada penelitian ini, metode metabolomik berbasis FTIR digunakan untuk mengidentifikasi senyawa aktif dengan aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase dan antioksidan pada ekstrak dan fraksi tanaman kumis kucing (OS). Profil kimia ekstrak metanolik dan fraksi heksana, kloroform, butanol, dan air OS diukur dengan FTIR. Ekstrak dan fraksi OS menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} berkisar $154,07 \pm 30,60$ - $465,83 \pm 85,34$ $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} berkisar $7,41 \pm 0,02$ - $19,35 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$. Fraksi butanol adalah fraksi dengan aktivitas penghambatan α -glukosidase tertinggi dan aktivitas antioksidan menengah dengan nilai IC_{50} berturut-turut $154,07 \pm 30,60$ $\mu\text{g/mL}$ dan $10,84 \pm 0,54$ $\mu\text{g/mL}$. Korelasi antara data aktivitas biologis dan komposisi kimia dianalisis dengan *orthogonal projections to latent structures* (OPLS). Berdasarkan nilai VIP (*variable influence on projection*), nilai koefisien dari model OPLS, dan pangkalan data IR senyawa yang telah teridentifikasi pada OS. Metoksi flavonoid (sinensetin dan 5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenilflavon), diterpena (ortosifol, ortoarisin, neoortosifol, staminol, dan staminolakton), triterpena (asam ursolat, asam oleanolat, asam betulinat, asam hidroksibetulinat, asam maslinat, α -amirin dan β -amirin) diidentifikasi sebagai senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase sedangkan fenolik (asam rosmarinat), flavonoid (eupatorin, sinensetin, 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavan, salvigenin, 6-hidroksi-5,7,3'-trimetoksiflavan dan 5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenilflavan), diterpena (ortosifol, ortoarisin, neoortosifol, staminol, dan staminolakton), triterpena (asam ursolat, asam oleanolat, asam betulinat, asam hidroksibetulinat, asam maslinat, α -amirin dan β -amirin) diidentifikasi sebagai senyawa antioksidan.

Kata kunci: α -glukosidase inhibitor, antioksidan, metabolomik, *Orthosiphon stamineus*

*Penulis Korespondensi: E-mail: nancy_dewi@ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Diabetes merupakan penyakit akibat kesalahan metabolisme glukosa yang disebabkan oleh kekurangan sekresi insulin, resistensi terhadap insulin maupun keduanya. Indonesia menempati posisi ketujuh negara dengan penderita diabetes terbanyak di dunia (IDF, 2013). Kumis kucing merupakan tanaman obat tradisional Indonesia yang digunakan untuk mengobati diabetes dengan cara menghambat aktivitas enzim pencernaan salah satunya enzim α -glukosidase (Mohamed *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012). Selain anti hiperglikemik, tanaman kumis kucing kaya akan senyawa antioksidan (Akowuah *et al.*, 2005) sehingga kumis kucing berpotensi pula untuk menurunkan risiko komplikasi diabetes akibat stres oksidatif (Baynes dan Thorpe, 1999). Dari sejumlah penelitian teridentifikasi 116 senyawa aktif dari tanaman kumis kucing yang berasal dari kelompok monoterpena, diterpena, triterpena, saponin, flavonoid, minyak atsiri, dan asam organik (Adnyana *et al.*, 2013).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mempercepat proses identifikasi komponen aktif dari ekstrak tanaman adalah metode metabolomik (Yuliana *et al.*, 2011). Metabolomik merupakan analisis metabolit baik primer maupun sekunder secara menyeluruh di dalam suatu tanaman baik secara kuantitatif maupun kualitatif (Verpoorte *et al.*, 2007). Pada proses identifikasi senyawa aktif dengan metode metabolomik ini, sampel kering tanaman diekstraksi menggunakan berbagai pelarut (difraksinasi), masing-masing fraksi kemudian dibagi dua; untuk uji bioaktivitas dan untuk uji profil kimia. Kedua data ini dianalisis dengan teknik analisis multivariat data (MVDA), misalnya *orthogonal projections to latent structures* (OPLS). OPLS dipilih pada penelitian ini karena teknik ini secara efektif mampu memisahkan variasi yang berkorelasi dengan aktivitas dengan variasi yang tidak berkorelasi dengan aktifitas sehingga memudahkan interpretasi data (Worley dan Powers, 2013).

Data profil kimia sampel dapat diperoleh dengan menggunakan berbagai teknik kromatografi maupun spektroskopi, misalkan *fourier transform infrared* (FTIR). Persiapan sampel yang cepat dan mudah, *robust*, dan non-destruktif menyebabkan teknik FTIR berpotensi untuk memperoleh data profil kimia pada penelitian ini (Pop *et al.*, 2014). Metabolomik berbasis FTIR cukup sensitif digunakan untuk mengevaluasi perubahan metabolit buah pada berbagai musim (Hussain *et al.*, 2009; Yusof *et al.*, 2015) dan waktu panen (Yusof *et al.*, 2015). Selain itu, metabolomik berbasis FTIR juga digunakan untuk mengevaluasi komposisi kimia secara kuantitatif untuk membedakan enam kultivar beri (Pop *et al.*, 2014). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi senyawa aktif inhibitor α -glukosidase dan

senyawa antioksidan melalui identifikasi gugus fungsi yang merupakan penanda dari senyawa aktif dengan menggunakan pendekatan metabolomik berbasis FTIR.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman (daun, ranting, bunga) kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* Benth) (Nagrak, Sukabumi).

Persiapan sampel, ekstraksi dan fraksinasi kumis kucing

Sebanyak 3 kg tanaman kumis kucing segar disortir dan dikeringkan dengan pengering kabinet pada suhu 45°C selama 8 jam. Tanaman kumis kucing kering dihaluskan menggunakan blender. Sebanyak 531 g serbuk tanaman kumis kucing dikemas dalam 3 plastik tertutup untuk 3 kali ekstraksi. Sampel disimpan di dalam freezer pada suhu -20°C sampai dilakukan proses ekstraksi.

Tanaman kumis kucing (177 g) diekstraksi dengan menambahkan metanol 80% (Merck, USA) sebanyak dua kali volume serbuk kumis kucing, kemudian disonikasi dengan *ultrasonic bath* (Branson Ultrasonic Cleaner model 8510E MTH, Branson Ultrasonic Corporation, USA) selama 30 menit pada suhu ruang, disaring dan diambil filtratnya. Proses ekstraksi ini diulang dua kali. Hasil ekstraksi disatukan dan dikeringkan dengan evaporator putar (Butchi Rotavapor R-210, BÜCHI Labortechnik, Switzerland), dengan pompa vakum (Buchi B-169 *vacuum system*, BÜCHI Labortechnik, Switzerland) pada suhu 40°C sampai 1/3 volume awal (500 mL), sebanyak 100 mL dipisahkan (ekstrak ini selanjutnya disebut ekstrak metanolik). Sisa larutan ekstrak sebanyak 400 mL dikeringkan untuk kemudian difraksinasi sebagai berikut; ekstrak kering dilarutkan dalam 250 mL air, dimasukkan ke dalam labu pemisah dan ditambahkan 250 mL pelarut organik (1:1 v/v). Pelarut organik yang ditambahkan berturut-turut adalah heksana (Merck, USA), kloroform (Merck, USA), dan n-butanol (Merck, USA). Tahapan proses ekstraksi dan fraksinasi ini diulang sebanyak 3 kali. Ekstrak dan fraksi dipekatkan dengan evaporator putar dan dikeringkan dengan pengering beku (Gamma 2-16 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany).

Uji penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase

Uji ini mengacu pada Sancheti *et al.* (2009). Sebanyak 50 μ L bufer fosfat 0,1 M pH 6,9 (Sigma Aldrich P0662 dan P3786), 25 μ L larutan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (Sigma Aldrich N1377) (dilarutkan dalam 0,1 M larutan bufer fosfat pH

6,9), ekstrak kumis kucing sebanyak 10 μL dilarutkan dalam DMSO (Merck, USA) dan akarbosa (Glucobay®, PT. Bayer Indonesia) sebagai kontrol positif dilarutkan dalam akuabides, 25 μL α -glukosidase 0,04 U/mL (Sigma Aldrich G3651) dalam larutan bufer 0,1 M pH 6,9 dicampurkan. Campuran ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μL larutan natrium karbonat 0,2 M (Sigma Aldrich 223530). Reaksi hidrolisis enzimatis diukur pada panjang gelombang 410 nm menggunakan *microplate reader* (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments Inc., USA). Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali. Aktivitas inhibisi α -glukosidase dinyatakan sebagai % inhibisi dan dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{[(AB-AKB)-(AS-AKS)]}{(AB-AKB)} \times 100\%$$

AB = absorbans blanko, AKB = absorbans kontrol blanko, AS = absorbans sampel, AKS = absorbans kontrol sampel.

Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH

Uji ini mengacu pada Salazar-Aranda *et al.* (2011). Sebanyak 500 μL larutan ekstrak ditambahkan ke dalam 500 μL larutan DPPH 125 μM (Sigma Aldrich D9132) dalam EtOH (Merck, USA), diaduk dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Penurunan absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments Inc., USA) pada gelombang 517 nm. Kuersetin (Sigma Aldrich 337951) digunakan sebagai kontrol positif.

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{[(AB-AKB)-(AS-AKS)]}{(AB-AKB)} \times 100\%$$

AB = absorbansi blanko, AKB = absorbansi kontrol blanko, AS = absorbansi sampel, AKS = absorbansi kontrol sampel.

Uji profil kimia tanaman kumis kucing dengan FTIR

Uji profil kimia sampel diukur dengan FTIR (Tensor 37, Bruker Optik GmbH, Germany) dilengkapi detektor DTGS (*deuterated triglycine sulphate*) menggunakan teknik pelet KBr pada mode absorbans. Spektrum diperoleh kemudian diproses dengan peranti lunak OPUS versi 4.2. Perlakuan pendahuluan berupa pemrosesan sinyal dilakukan pada area puncak spektra FTIR ekstrak dan fraksi yang diperoleh dari hasil pengukuran yang diskalakan terhadap puncak total dan dikurangi menjadi daerah terintegrasi dengan lebar sama (bilangan gelombang 2 cm^{-1}) menggunakan peranti lunak XLSTAT versi 2012.

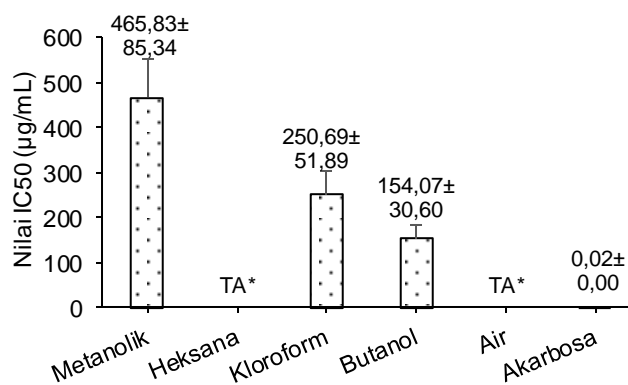
Analisis data

Pada penelitian ini spektrum FTIR merepresentasikan profil kimia ekstrak dan fraksi kumis kucing yang kemudian digunakan sebagai matriks data X, sedangkan aktivitas (penghambatan enzim α -glukosidase atau antioksidan merupakan matriks data Y). Spektrum dibuat turunannya menggunakan metode *multi-plicative signal correction* (MSC). Data dianalisis dengan *orthogonal projection to latent structures* (OPLS) menggunakan perangkat lunak SIMCA-P versi 13.0 dengan penskalaan pareto. Model di-deskripsikan dengan kriteria ketepatan model (R^2Y) dan ketepatan prediksi (Q^2Y). Model kemudian divalidasi dengan CV ANOVA dan uji permutasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas penghambatan α -glukosidase ekstrak dan fraksi kumis kucing

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase oleh ekstrak dan fraksi kumis kucing dapat dilihat pada Gambar 1. Ekstrak metanol, fraksi kloroform dan butanol menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase akan tetapi aktivitas penghambatan terkuat diperoleh dari fraksi butanol. Namun demikian aktivitas penghambatan oleh fraksi butanol masih lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif akarbosa.



Keterangan: *Tidak aktif pada konsentrasi tertinggi diujikan yaitu 476 $\mu\text{g/mL}$

Gambar 1. Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase oleh ekstrak dan fraksi kumis kucing

Ekstrak etanol daun kumis kucing dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase dengan IC_{50} sebesar 4,63 mg/mL (Mohamed *et al.*, 2012) lebih besar dibandingkan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu sebesar sebesar 465,83 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan asal geografis tempat tumbuh, jenis pelarut dan bagian tanaman yang digunakan mem-

pengaruhi kandungan bioaktif sehingga dapat menyebabkan perbedaan aktifitas biologis dari tanaman kumis kucing (Rafi *et al.*, 2015; Akowuah *et al.*, 2005). Penggunaan metanol dan air (*aquaeos methanol*) sebagai pelarut untuk ekstraksi tanaman kumis kucing diketahui mampu mengekstrak lebih banyak senyawa aktif dan memiliki kandungan total fenolik lebih tinggi dibandingkan pelarut lainnya (Abdelwahab *et al.*, 2011). Tanaman kumis kucing kaya akan kandungan senyawa fenolik termasuk flavonoid (Sriplang *et al.*, 2007). Beberapa literatur menyatakan senyawa penghambat aktivitas α -glukosidase termasuk dalam kelompok ini (Kwon *et al.*, 2008; Shobana *et al.*, 2009).

Fraksi kloroform kumis kucing diketahui mengandung terpenoid dan flavonoid termasuk sinensitin (Mohamed *et al.*, 2011). Sinensitin merupakan senyawa metoksi flavonoid larut kloroform dengan aktivitas anti α -glukosidase kuat (IC_{50} 0,66 mg/mL) (Mohamed *et al.*, 2012). Aktivitas penghambatan α -glukosidase oleh fraksi butanol kumis kucing belum pernah dilaporkan akan tetapi senyawa glikosida dan flavonoid dengan aktivitas anti α -glukosidase kuat diisolasi dari fraksi butanol herbal *Gynostemma pentaphyllum* (Yang *et al.*, 2013). Kumis kucing dilaporkan mengandung senyawa glikosida termasuk saponin (Siddiqui *et al.*, 2009).

Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi kumis kucing

Pada Tabel 1 dapat diamati aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi kumis kucing. Aktivitas antioksidan pada penelitian ini lebih tinggi pada fraksi dan ekstrak yang semipolar dan polar (air, butanol, dan metanolik) dibandingkan fraksi non-polar (kloroform dan heksana) akan tetapi aktivitas yang diperoleh lebih rendah dibandingkan kuersetin sebagai kontrol positif. Perbedaan polaritas pelarut ekstraksi digunakan yaitu MeOH 80% dengan MeOH 60% dapat menjadi salah satu penyebab perbedaan nilai IC_{50} yang diperoleh dari penelitian ini dengan Abdelwahab *et al.* (2011). Kemampuan solven yang digunakan dalam melarutkan senyawa fenolik menentukan aktivitas antioksidan. Senyawa marker terpolar yaitu asam rosmarinat dilaporkan tertinggi kandungannya pada solven MeOH 50% secara signifikan dibandingkan MeOH 100%. Asam rosmarinat merupakan antioksidan terkuat dibandingkan marker lainnya (Akowuah *et al.*, 2005). Khamsiah *et al.* (2006) melaporkan perbedaan tempat tumbuh tanaman kumis kucing yang juga dapat menjadi penyebab perbedaan kandungan senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan. Fenolik merupakan salah satu kelompok penting senyawa aktif kumis kucing yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan (Akowuah *et al.*, 2004).

Tabel 1. Perbandingan aktivitas antioksidan oleh ekstrak dan fraksi kumis kucing yang diperoleh pada penelitian ini dengan literatur

Ekstrak atau Fraksi	IC_{50} (μ g/mL)	
	Hasil Penelitian	Abdelwahab <i>et al.</i> , 2011
Metanolik	7,41 \pm 0,02	16,66
Heksana	TA*	126,2
Kloroform	TA*	31,25
Butanol	10,84 \pm 0,54	13,56
Air	19,35 \pm 0,09	23,0
Kuersetin**	5,46 \pm 0,00	-

Keterangan: *Tidak aktif pada konsentrasi yang tertinggi diujikan yaitu 25 μ g/mL, ** kontrol positif

Dari empat marker yaitu sinensetin (SEN), eupatorin (EUP) and 3'-hidroksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavin (TMF) dan asam rosmarinik (RA) fraksi kloroform tinggi akan kandungan SEN dan EUP (Akowuah *et al.*, 2005). Oleh karena gugus O-metil pada SEN, EUP dan TMF senyawa-senyawa ini bersifat lipofilik sehingga memungkinkan terkandung dalam jumlah besar dalam ekstrak non polar. Fraksi kloroform dan heksan tinggi akan kandungan total flavonoid (Abdelwahab *et al.*, 2011). Diantara solven-solven yang digunakan kloroform dan heksan merupakan solven paling tidak polar sehingga memungkinkan melarutkan sebagian besar senyawa flavonoid lipofilik. Aktivitas antioksidan tinggi pada fraksi dan ekstrak semipolar dan polar dapat disebabkan salah satunya oleh senyawa RA yang diketahui merupakan senyawa polar. Tidak hanya itu senyawa gula diduga juga dapat berperan sebagai antioksidan mengingat penstabilan aktivitas radikal bebas oleh antioksidan disebabkan oleh kemampuannya mendonorkan hidrogen (Akowuah *et al.*, 2005).

Korelasi profil komposisi kimia dan bioaktivitas ekstrak dan fraksi kumis kucing dengan OPLS

Pada prinsipnya OPLS mencoba mengorelasikan dua jenis data matriks, yaitu data berupa komposisi kimia sampel (X) dan data aktivitas sampel (Y). Terdapat beberapa keluaran OPLS yang dapat digunakan untuk menafsir data di antaranya *score plot*, *plot Y-related coefficient* dan *plot variable influence on projection (VIP)*. Untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa aktif, plot VIP digunakan sebagai parameter sinyal x penting terhadap data Y sedangkan *plot Y-related coefficient* digunakan guna mempelajari sinyal yang berkorelasi positif dengan matriks data Y (bioaktivitas). VIP hanya memberikan nilai korelasi positif untuk semua sinyal sedangkan *plot Y-related coefficient* dapat memberikan nilai korelasi baik positif dan negatif (Eriksson *et al.*, 2006). Sinyal yang dipilih adalah sinyal yang berkorelasi positif dan bernilai $VIP > 0,5$.

Profil kimia senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase

Score plot pada OPLS digunakan untuk mengelompokkan sampel berdasarkan karakteristik data matriks Y (aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase). Pemisahan yang baik antara sampel dengan aktivitas rendah dan sampel dengan aktivitas tinggi menunjukkan bahwa OPLS dapat digunakan lebih lanjut untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa aktif. Pada Gambar 2 terlihat fraksi aktif dan fraksi tidak aktif terpisah dengan baik sehingga proses identifikasi gugus fungsi senyawa aktif dengan OPLS dapat dilakukan lebih lanjut. Ketepatan model OPLS dapat dilihat dari nilai R^2Y dan Q^2Y . Nilai R^2Y merupakan jumlah variabel Y yang dapat dijelaskan oleh model dan peninjauan kecocokan model. Q^2Y adalah hasil validasi silang dan pengukuran kuantitatif antara hasil prediksi dengan data yang sebenarnya. Nilai R^2Y diperoleh pada model ini sebesar 0,76 sedangkan nilai Q^2Y sebesar 0,59. Pada model OPLS ini kedua nilai tersebut $>0,5$ sehingga tergolong model yang baik (Eriksson *et al.*, 2006).

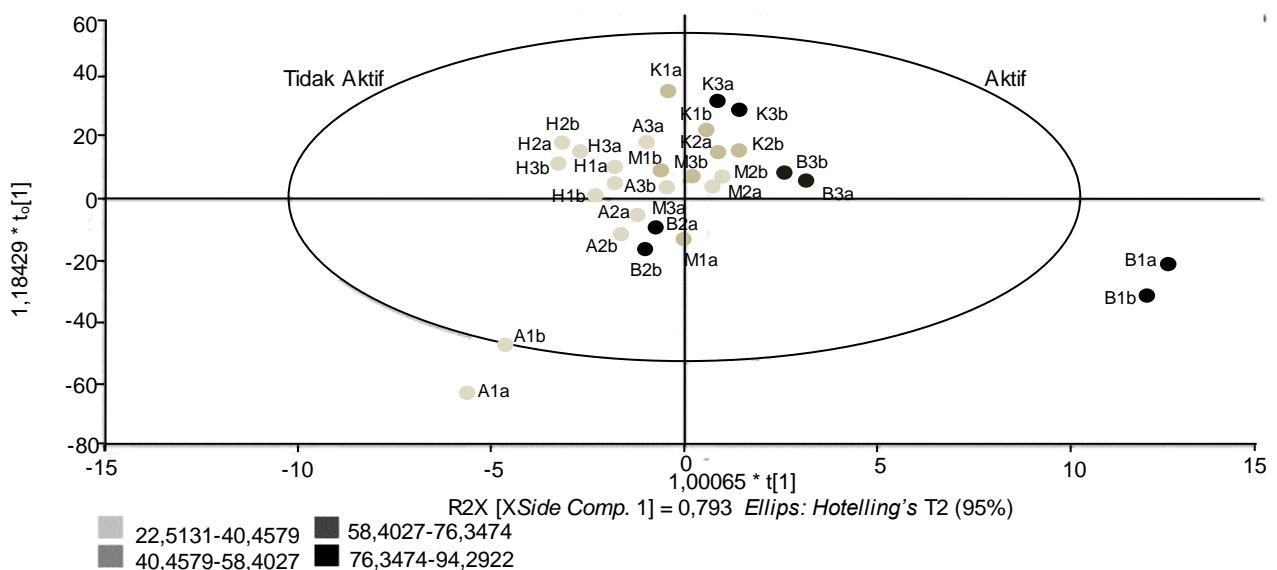
OPLS cenderung memaksakan kecocokan model dengan data (*over-fit*) sehingga dibutuhkan tahapan validasi untuk memastikan keandalan (*reliability*) dari model (Worley dan Powers, 2013). Nilai p yang menjadi patokan pada metode validasi CV ANOVA yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 0,03, lebih kecil dari nilai maksimum yang diterima, yaitu $P < 0,05$ sehingga model dianggap memiliki reabilitas yang baik (Eriksson *et al.*, 2008). Selain itu, test permutasi juga dilakukan untuk mengetahui seberapa besar terjadinya korelasi yang tidak disengaja akibat jumlah sampel yang kecil

dengan variabel yang berjumlah besar (Lindgren *et al.*, 1996). Model yang valid seharusnya memiliki nilai intersep R^2 dan Q^2 pada sumbu Y berturut-turut tidak lebih dari 0,3-0,4 (Eriksson *et al.*, 2006). Nilai intersep R^2 dan Q^2 yang diperoleh pada model ini berturut-turut adalah 0,26 dan -0,94.

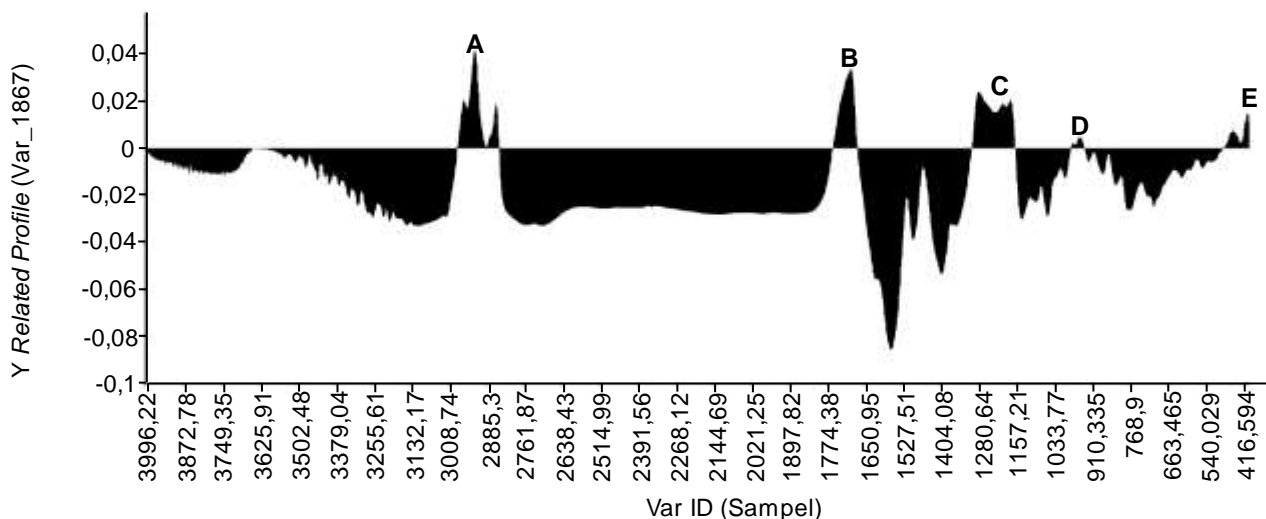
Pada Gambar 3 diketahui ada lima area puncak bilangan gelombang yang berkorelasi positif terhadap aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yaitu Area A (2844-2978 cm^{-1}), Area B (1675-1758 cm^{-1}), Area C (1161-1302 cm^{-1}), Area D (934-980 cm^{-1}), dan Area E (480-399 cm^{-1}). Area Puncak A, B, C dan D dipilih untuk diidentifikasi lebih lanjut karena pada puncak tersebut terdapat sinyal penanda senyawa aktif penting terhadap aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase. Pita serapan Area A (2845-2977 cm^{-1}) mengindikasikan vibrasi ulur asimetri dan simetri gugus fungsi dari grup metilena (CH_2 dan CH_3), turunan metoksi dan C-H (aldehid) termasuk cis ikatan rangkap dan hidroksil (Saidan *et al.*, 2015). Area B (1676-1755 cm^{-1}) mengindikasikan gugus karbonil sedangkan Area C (1162-1301 cm^{-1}) mengindikasikan gugus ulur C-O dan OH. Area D (935-979 cm^{-1}) mengindikasikan keberadaan vinil atau pita tekuk C-H dari senyawa aromatik (Silva *et al.*, 2014; Pop *et al.*, 2014).

Penanda senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase

Pita serapan serapan sempit dan tajam pada bilangan gelombang 2924 cm^{-1} dan 2854 cm^{-1} yang mencirikan senyawa metoksi flavonoid (Rafi *et al.*, 2015).



Gambar 2. OPLS score plot aktivitas penghambatan α -glukosidase oleh ekstrak dan fraksi kumis kucing. Tiap sampel diwakili oleh lingkaran dengan variasi warna abu-abu ke hitam mewakili sampel dengan aktivitas rendah ke aktivitas tinggi. Sumbu dan ordinat plot menunjukkan skor OPLS untuk setiap sampel



Gambar 3. Plot *Y-related coefficient* ekstrak dan fraksi kumis kucing. Area A ($2845\text{--}2977\text{ cm}^{-1}$), Area B ($1676\text{--}1755\text{ cm}^{-1}$), Area C ($1162\text{--}1301\text{ cm}^{-1}$), Area D ($935\text{--}979\text{ cm}^{-1}$), dan Area E ($480\text{--}399\text{ cm}^{-1}$) adalah puncak-puncak yang menunjukkan korelasi positif dengan aktivitas penghambatan α -glukosidase

Hasil analisis OPLS mengindikasikan senyawa sinensitin dan 5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenilflavon (Hossain dan Rahman, 2015) memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase. Flavonoid kumis kucing umumnya terdapat dalam bentuk termetoksilasi dan larut kloroform, bilangan gelombang penanda gugus fungsi aktif flavonoid seperti OCH_3 (2928 cm^{-1} dan 2857 cm^{-1}), C-O ($1234\text{--}1284\text{ cm}^{-1}$), C-O dan C-OH ($1173\text{--}1176\text{ cm}^{-1}$) dan pita tekuk C-H dari senyawa aromatik ($913\text{--}997\text{ cm}^{-1}$) pada penelitian ini dapat diamati pada spektrum fraksi aktif kloroform. Perbedaan antara bilangan gelombang yang diperoleh pada literatur dengan pada spektra kemungkinan disebabkan oleh senyawa yang diukur pada literatur merupakan senyawa murni. Pengukuran contoh dalam bentuk campuran memungkinkan terjadi tumpang tindih puncak gugus fungsi penanda senyawa aktif dalam spektra ekstrak maupun fraksi (Stehfest *et al.*, 2004). Rangkuman hasil analisis karakteristik IR seluruh senyawa yang diidentifikasi memiliki aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase berupa nilai VIP berkisar 0,00-1,63 dan memiliki nilai *Y-related coefficient* positif dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai $\text{VIP} \geq 0,5$ dianggap relevan sedangkan nilai $\text{VIP} > 1$ sangat relevan (Galindo-Prieto *et al.*, 2014). Sinensitin dengan gugus fungsi dari grup metoksi, asam karboksilat, cincin aromatik dan heteroaromatik, metil, hidroksi fenolik, C-O, dan ujung metilena merupakan salah satu senyawa yang diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase (Hossain dan Rahman, 2015; Mohamed *et al.*, 2012). Hasil berbeda dikemukakan oleh Damsud *et al.* (2014) yang mengisolasi 4 flavonoid yaitu sinensetin, salvigenin, tetrametilskutellarein dan 3,7,4'-tri-O-metilkaempferol. Dari

empat flavonoid tersebut tetrametilskutellarein dan 3,7,4'-tri-O-metilkaempferol menghambat α -glukosidase khamir dengan IC_{50} berturut-turut sebesar 6,34 mM dan 0,75 mM. Diketahui bahwa substitusi gugus metoksi pada flavonoid menurunkan aktivitas penghambatan α -glukosidase (Gao *et al.*, 2004; Asghari *et al.*, 2015). Sinensetin dengan struktur kimia terdapat lima gugus metoksi merupakan senyawa flavonoid dengan substitusi gugus metoksi terbanyak dari tanaman kumis kucing. Selain itu keberadaan gugus OH dan C=O diduga memiliki kecenderungan meningkatkan aktivitas penghambatan α -glukosidase oleh flavonoid. Kemampuan gugus fungsi C=O diduga lebih baik dibandingkan gugus fungsi OH dalam membentuk ikatan hidrogen pada sisi aktif enzim yang merupakan salah satu mekanisme penghambatan enzim α -glukosidase oleh senyawa bioaktif (Asghari *et al.*, 2015; Uddin *et al.*, 2012).

Senyawa diterpen ditandai dengan adanya pita serapan gugus hidroksil pada bilangan gelombang $3500\text{--}3480\text{ cm}^{-1}$, ester karbonil pada bilangan gelombang $1270\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$, dan fenil pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} dan 1420 cm^{-1} (Sim *et al.*, 2004). Senyawa diterpen dapat diisolasi dari fraksi kloroform (Awale *et al.*, 2002; Awale *et al.*, 2003). Pada spektrum aktif fraksi kloroform dapat diamati gugus fungsi aktif penanda diterpen yaitu hidroksil pada bilangan gelombang $3396\text{--}3420\text{ cm}^{-1}$ dan ester karbonil pada bilangan gelombang $1113\text{--}1284\text{ cm}^{-1}$. Berdasarkan hasil identifikasi gugus fungsi penanda senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase mengindikasikan senyawa dari kelompok diterpen tipe isopimaran yaitu ortoarisin F-J (Tezuka *et al.*, 2000), ortoarisin A, ortoarisin B, ortoarisin C, ortoarisin D, ortoarisin E, ortoarisin F, ortoarisin G (Di *et al.*, 2013) sebagai senyawa penghambat

aktivitas enzim α -glukosidase. Walaupun belum ada laporan aktivitas senyawa isopimarane diterpen dari kumis kucing tetapi isopimarane diterpen baru 5R, 6S, 10S, 11R, 13R and 14S dan isopimarane diterpen teridentifikasi 11-deoksidiaportin A dari kapang laut *Epicoccum* sp. HS-1 dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} berturut-turut 4,6 μ M dan 11,9 μ M (Xia *et al.*, 2015).

Senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase juga diidentifikasi dari kelompok diterpen tipe isopimarane teroksigenasi yaitu ortosifol O, ortosifol P, ortosifol Q, dan noortosifonolida A (Awale *et al.*, 2002), kelompok diterpen tipe isopimarane teroksigenasi tinggi ortosifol A, ortosifol B, ortosifol U, ortosifol V, ortosifol W, ortosifol X, ortosifol Y dan ortosifol Z (Masuda *et al.*, 1992; Awale *et al.*, 2003), kelompok diterpen tipe isopimarane termigrasi yaitu neoortosifol A dan neoortosifol B (Ohashi *et al.*, 2000), dan senyawa ortoarisin H dari kelompok diterpen tipe sekoisopimarane (Di *et al.*, 2013). Diterpen tipe isopimarane teroksigenasi tinggi ortosifol A yang dikarakterisasi berdasarkan data spektroskopi secara selektif menghambat enzim maltase dengan nilai IC_{50} sebesar 6,54 mM. Studi lebih lanjut ortosifol A menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan fungsi maltase terjadi secara tidak kompetitif (Damsud *et al.*, 2014). Diterpen tipe sekoisopimarane dari *Salvia cinnabarina* diketahui memiliki aktivitas antipasmodik (Capasso *et al.*, 2004) dan mutagenik (Di Sotto *et al.*, 2009) akan tetapi aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase belum pernah dilaporkan. Senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase diidentifikasi dari kelompok diterpen tipe staminan adalah staminol A, staminol B, staminolakton A, staminolakton B, norstaminol A (Tezuka *et al.*, 2000) dan ortoarisin I (Di *et al.*, 2013).

Asam ursolat, asam oleanolat, asam betulinat, asam hidroksibetulinat, α -amirin, β -amirin, asam maslinat (Hossain dan Ismail, 2013) merupakan senyawa triterpen yang diidentifikasi dari gugus fungsi penanda senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase yang diduga berkontribusi terhadap aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase. Asam maslinat dan asam oleanolat dari ekstrak etil asetat daun *Lagerstroemia speciosa* dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase dengan IC_{50} berturut-turut 5,52 g/mL dan 6,29 g/mL (Hou *et al.*, 2009). Lebih lanjut senyawa triterpen penghambat aktivitas enzim α -glukosidase asam ursolat (IC_{50} 47,6 μ M) dan asam betulinat (IC_{50} 14,0 μ M) diisolasi dari apel emas merah (*Malus domestica*) (He *et al.*, 2014). Asam ursolat dan asam oleanolat sebagai senyawa yang menghambat aktivitas enzim α -glukosidase secara tidak kompetitif dengan nilai IC_{50} berturut-turut 39,0 dan 35,0 mM juga dilaporkan dari bunga *Punica*

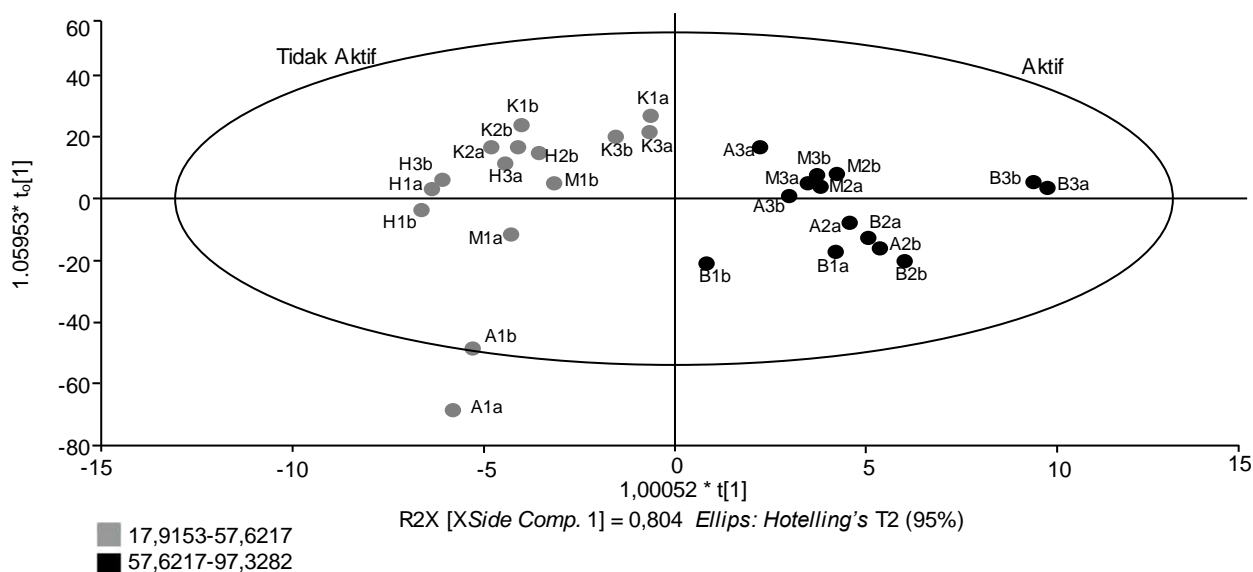
granatum L. (Salah *et al.*, 2014). Asam hidroksibetulinat belum pernah dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase akan tetapi pentasiklik triterpen asetat 3β -asetoksi-16 β -asam hidroksibetulinat dari tanaman *Fagara tessmannii* Engl. menunjukkan aktivitas penghambatan yang signifikan terhadap enzim α -glukosidase (IC_{50} 7,6 μ M) (Mbaze *et al.*, 2007). Secara *in vivo* α -amirin dan β -amirin menunjukkan aktivitas antihiperlipidemik pada konsentrasi 10, 30 dan 100 mg/kg terhadap mencit (Santos *et al.*, 2012). Aktivitas antihiperlipidemik ini dapat diakibatkan salah satunya oleh aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase. β -amirin dari *Memecylon umbellatum* Burm. F. dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase secara signifikan pada konsentrasi 10,0 mM (Sridevi *et al.*, 2015).

Profil kimia senyawa antioksidan

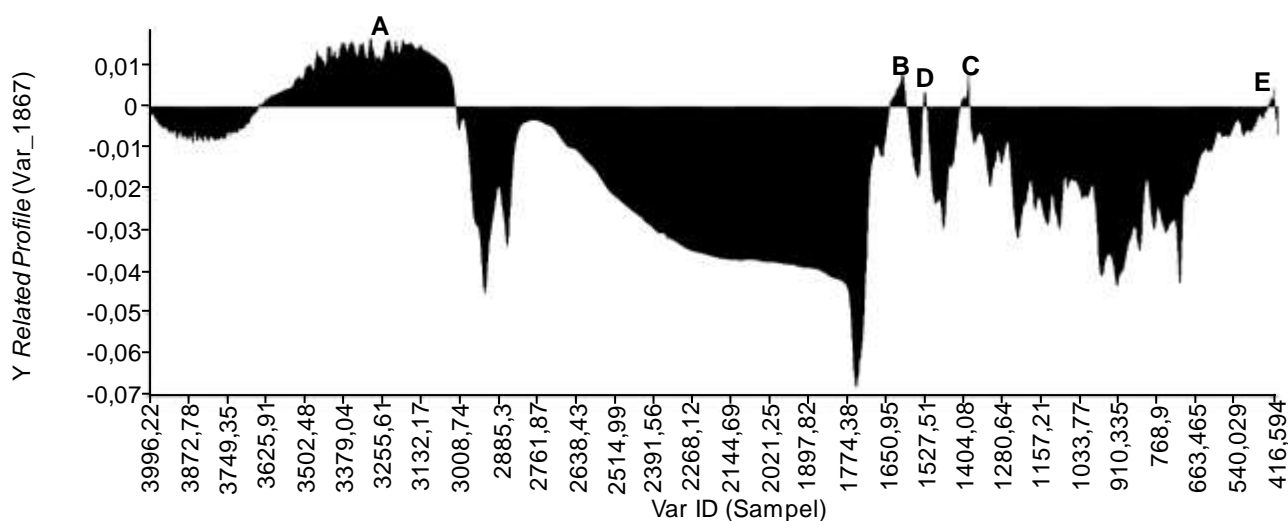
Score plot pada OPLS digunakan untuk mengelompokkan sampel berdasarkan karakteristik data matriks Y (aktivitas antioksidan). Pada Gambar 4 terlihat fraksi aktif dan fraksi tidak aktif terpisah dengan baik sehingga memungkinkan penggunaan OPLS dalam mengidentifikasi gugus fungsi senyawa aktif lebih lanjut. Nilai R^2Y dan Q^2Y diperoleh berturut-turut sebesar 0,82 dan 0,59. Hasil validasi silang CV ANOVA diperoleh 0,03 sehingga secara statistik metode ini tergolong valid (Eriksson *et al.*, 2008). Dari hasil permutasi diperoleh nilai intersep R^2 dan Q^2 berturut-turut adalah 0,29 dan -0,95 sehingga dapat disimpulkan bahwa model OPLS ini cukup valid. Pada Gambar 5 terdapat lima area puncak dengan bilangan gelombang yang berkorelasi positif terhadap aktivitas antioksidan yaitu Area A (3020-3649 cm^{-1}), Area B (1600-1635 cm^{-1}), Area C (1519-1598 cm^{-1}), Area D (1380-1409 cm^{-1}), dan Area E (408-430 cm^{-1}). Selain Area E (408-430 cm^{-1}), puncak-puncak yang korelasi positif dengan aktivitas antioksidan digunakan untuk identifikasi senyawa aktif lebih lanjut karena terdapat sinyal penanda senyawa aktif penting ($VIP > 0,5$). Gugus fungsi OH direpresentasikan oleh bilangan gelombang pada Area A (3020-3649 cm^{-1}) sedangkan Area B (1600-1635 cm^{-1}), Area C (1519-1598 cm^{-1}) mengindikasikan keberadaan cincin aromatik. Area D (1380-1409 cm^{-1}) mengindikasikan pita tekuk CH_3 (Pop *et al.*, 2014; Saidan *et al.*, 2015).

Penanda senyawa antioksidan

Pita ulur dari grup fenil (C=C) pada bilangan gelombang 1609-1608 cm^{-1} dan bilangan gelombang 1516-1516 cm^{-1} merupakan karakteristik IR tipikal senyawa aromatik yang dapat mengindikasikan keberadaan senyawa fenolik (Silva *et al.*, 2014). Pada spektra karakteristik IR senyawa fenolik berupa pita ulur dari grup fenil (C=C) berada pada bilangan gelombang 1602-1608 dan 1522-2527 cm^{-1} .



Gambar 4. OPLS score plot antioksidan ekstrak dan fraksi kumis kucing. Tiap sampel diwakili oleh lingkaran dengan variasi warna abu-abu ke hitam mewakili sampel dengan aktivitas rendah ke aktivitas tinggi. Sumbu dan ordinat plot menunjukkan skor OPLS untuk setiap sampel



Gambar 5. Plot Y-related coefficient ekstrak dan fraksi kumis kucing. Area A (3020–3649 cm^{-1}), Area B (1600–1635 cm^{-1}), Area C (1519–1598 cm^{-1}), Area D (1380–1409 cm^{-1}), dan Area E (408–430 cm^{-1}) adalah puncak-puncak yang menunjukkan korelasi positif dengan aktivitas antioksidan

Asam rosmarinat yang merupakan senyawa fenolik polar turunan asam kafeat dengan gugus fungsi cincin aromatik, C-H aromatik, grup fenol dan karboksilat diketahui memiliki kontribusi kuat terhadap aktivitas antioksidan (Stehfest *et al.*, 2004; Hunaefi *et al.*, 2012). Rangkuman hasil analisis karakteristik IR seluruh senyawa yang diidentifikasi memiliki aktivitas antioksidan berupa nilai VIP berkisar 0,01-0,67 dan memiliki nilai Y-related coefficient positif dapat dilihat pada Tabel 3. VIP merupakan parameter yang digunakan untuk mengukur secara kumulatif pengaruh variabel X pada model yang mana nilai $\text{VIP} \geq 0,5$ dianggap relevan (Galindo-Prieto *et al.*, 2014). Gugus fungsi

OH ($>3000 \text{ cm}^{-1}$) dan cincin aromatik ($>1500\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$) bernilai VIP berturut-turut 0,15-0,67 dan 0,09-0,33 memiliki peranan penting terhadap aktivitas antioksidan. Kedua gugus fungsi ini sangat umum ditemukan terutama jika contoh yang diukur dalam bentuk campuran sehingga tumpang tindih gugus fungsi OH dan cincin aromatik senyawa aktif dengan senyawa tidak aktif sangat mungkin terjadi. Kumis kucing diketahui tinggi akan kandungan senyawa fenolik salah satunya flavonoid. Berdasarkan hasil identifikasi gugus fungsi penanda senyawa antioksidan mengindikasikan senyawa-senyawa metoksi flavonoid dan flavonoid terprenilasi berikut memiliki aktivitas antioksidan antara lain eupatorin, sinensitin,

5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon, salvegenin, 6-hidroksi-5,7,3'-trimetoksiflavon, dan 5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenilflavon (Hossain dan Rahman 2015). Eupatorin dan 3'-hidroksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavon (TMF) diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang relatif sama dengan *butylated hydroxyanisole* (BHA) sedangkan aktivitas antioksidan sinensitin lebih rendah dari BHA pada konsentrasi yang sama (0,05 mg/mL) (Akowuah *et al.*, 2005).

Tabel 2. Karakteristik IR senyawa aktif terhadap aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase berdasarkan nilai *Y-related coefficient* dan VIP

Senyawa	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	<i>Y-related Coefficients</i>	VIP	Ref.
Sinensitin	2850	+	0,72	Hossain dan Rahman, 2015
	1215	+	0,67	
	1189	+	0,72	
5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenil flavon Neoortosifol A	2964	+	0,69	Ohashi <i>et al.</i> , 2000
	2936	+	1,13	
	1271	+	0,93	
	1200	+	0,77	
Neoortosifol B	1720	+	1,01	Awale <i>et al.</i> , 2002
	1267	+	0,88	
	1250	+	0,75	
Ortosifol O	1725	+	0,94	Masuda <i>et al.</i> , 1992
	1280	+	0,98	
Ortosifol P	1720	+	1,01	Awale <i>et al.</i> , 2003
	1275	+	0,96	
	1275	+	0,94	
Ortosifol Q	1265	+	0,86	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1720	+	1,01	
Noortosifonolida A	1285	+	0,94	Masuda <i>et al.</i> , 1992
Ortosifol A	2967	+	0,60	
	1723	+	0,98	
	1287	+	0,89	
	1240	+	0,69	
Ortosifol B	2970	+	0,40	Awale <i>et al.</i> , 2003
	1717	+	1,12	
	1289	+	0,82	
Ortosifol U	1240	+	0,69	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1720	+	1,01	
	1210	+	0,72	
Ortosifol V	1180	+	0,80	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1720	+	1,01	
	1210	+	0,72	
Ortosifol W	1180	+	0,80	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1725	+	0,94	
	1210	+	0,72	
Ortosifol X	1180	+	0,80	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1720	+	1,01	
	1210	+	0,72	
Ortosifol Y	1175	+	0,81	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1735	+	0,66	
	1210	+	0,72	
Ortosifol Z	1725	+	0,94	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1265	+	0,86	
Ortosifol F	1725	+	0,94	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1280	+	0,98	
Ortosifol G	1720	+	1,01	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1280	+	0,98	
	1240	+	0,69	
Ortosifol H	1725	+	0,94	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1280	+	0,98	
	1240	+	0,69	
Ortosifol I	1725	+	0,94	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1270	+	0,91	
	1725	+	0,94	
Ortosifol J	1270	+	0,91	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	1230	+	0,63	
	1725	+	0,94	
Staminol A	1725	+	0,94	

Senyawa	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	<i>Y-related Coefficients</i>	VIP	Ref.
Staminol B	1200	+	0,77	Di <i>et al.</i> , 2013
	1270	+	0,91	
	1725	+	0,94	
Staminolakton A	1200	+	0,77	Di <i>et al.</i> , 2013
	1270	+	0,91	
	1730	+	0,83	
Staminolakton B	1200	+	0,77	Di <i>et al.</i> , 2013
	1240	+	0,67	
	1730	+	0,83	
Norstaminol A	1270	+	0,91	Di <i>et al.</i> , 2013
	1200	+	0,77	
	1240	+	0,67	
Ortoarisin A	1716	+	1,12	Di <i>et al.</i> , 2013
	1275	+	0,96	
	1716	+	1,12	
Ortoarisin B	1279	+	0,98	Di <i>et al.</i> , 2013
	1720	+	1,01	
	1276	+	0,93	
Ortoarisin C	1712	+	1,19	Di <i>et al.</i> , 2013
	1238	+	0,67	
	2972	+	0,32	
Ortoarisin D	2944	+	0,77	Di <i>et al.</i> , 2013
	2883	+	0,04	
	1729	+	0,86	
Ortoarisin E	1276	+	0,93	Di <i>et al.</i> , 2013
	2970	+	0,42	
	2938	+	1,02	
Ortoarisin F	2881	+	0,06	Di <i>et al.</i> , 2013
	1725	+	0,94	
	1283	+	0,78	
Ortoarisin G	1235	+	0,65	Di <i>et al.</i> , 2013
	1174	+	0,81	
	2970	+	0,42	
Ortoarisin H	2938	+	1,02	Di <i>et al.</i> , 2013
	2881	+	0,06	
	1725	+	0,94	
Ortoarisin I	1283	+	0,78	Di <i>et al.</i> , 2013
	1235	+	0,65	
	1174	+	0,81	
Asam ursolat	1731	+	0,79	Di <i>et al.</i> , 2013
	1277	+	0,97	
	1244	+	0,71	
Asam oleanolat	1718	+	1,06	Di <i>et al.</i> , 2013
	1271	+	0,93	
	1293	+	0,62	
Asam betulinat	1216	+	0,65	Di <i>et al.</i> , 2013
	963	+	0,07	
	2876	+	0,18	
Asam hidroksi-betulinat	1265	+	0,86	Di <i>et al.</i> , 2013
	1227	+	0,62	
	964	+	0,06	
Asam α -amirin	2953	+	0,78	Di <i>et al.</i> , 2013
	2887	+	0,04	
	1682	+	0,57	
Asam β -amirin	1221	+	0,63	Di <i>et al.</i> , 2013
	1194	+	0,73	
	980	+	0,00	
Asam maslinat	2926	+	1,63	Di <i>et al.</i> , 2013
	1742	+	0,46	
	1254	+	0,77	

Aktivitas antioksidan oleh flavonoid dan senyawa fenol lainnya sebagian besar disebabkan oleh gugus hidroksil aromatik sehingga radikal fenolik menjadi lebih stabil langsung setelah radikal terbentuk ketika satu hidrogen radikal didonorkan ke DPPH (de Souza *et al.*, 2013). Semakin banyak gugus hidroksi pada struktur kimia semakin tinggi aktivitas antioksidan oleh senyawa tersebut (Liu *et al.*, 2010). Sebaliknya, flavonoid yang disubstitusi dengan sejumlah metoksi menunjukkan penurunan aktivitas antioksidan (Jeong *et al.*, 2007). Senyawa diterpen ditandai dengan adanya pita serapan gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3500-3480 cm^{-1} , ester karbonil pada bilangan gelombang 1270-1150 cm^{-1} , dan fenil pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} dan 1420 cm^{-1} (Sim *et al.*, 2004).

Tabel 3. Karakteristik IR senyawa aktif terhadap aktivitas antioksidan berdasarkan nilai *Y-related coefficient* dan VIP

Senyawa	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	<i>Y-related Coefficients</i>	VIP	Ref.
Asam rosmarinat	3382	+	0,66	Abedini <i>et al.</i> , 2013
	1606	+	0,21	
	1522	+	0,11	
Eupatorin	3470	+	0,44	Hossain dan Rahman, 2015
	3250	+	0,55	
	1605	+	0,22	
Sinensitin	1599	+	0,31	
	1600	+	0,27	
	1590	+	0,23	
5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksilavon	3415	+	0,52	
	1600	+	0,27	
	1590	+	0,23	
Salvegenin	3450	+	0,52	
	1600	+	0,27	
	1590	+	0,23	
6-hidroksi-5,7,3'-trimetoksiflavon	3470	+	0,44	
	1595	+	0,33	
	1590	+	0,23	
5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenil flavon	3435	+	0,43	
	1610	+	0,19	
	1595	+	0,33	
Neoortosifol A	3420	+	0,61	Ohashi <i>et al.</i> , 2000
	3080	+	0,51	
	3410	+	0,55	
Neoortosifol B	3080	+	0,51	Awale <i>et al.</i> , 2002
	3550	+	0,19	
	3400	+	0,50	
Ortosifol O	3550	+	0,19	
	3450	+	0,52	
	3400	+	0,19	
Ortosifol P	3550	+	0,19	
	3450	+	0,52	
	3400	+	0,19	
Ortosifol Q	3550	+	0,19	
	3450	+	0,52	
	3400	+	0,19	
Noortosifonolida A	3550	+	0,19	
	3450	+	0,52	
	3400	+	0,19	
Ortosifol A	3425	+	0,62	Masuda <i>et al.</i> , 1992
	3420	+	0,61	
	3450	+	0,52	
Ortosifol B	3420	+	0,61	Awale <i>et al.</i> , 2003
	1605	+	0,22	
	1590	+	0,23	
Ortosifol U	3450	+	0,52	
	1605	+	0,22	
	1590	+	0,23	
Ortosifol V	3450	+	0,52	
	1605	+	0,22	
	1590	+	0,23	
Ortosifol W	3400	+	0,50	
	1605	+	0,22	
	1590	+	0,23	
Ortosifol X	3450	+	0,52	
	1605	+	0,22	
	1585	+	0,09	

Senyawa	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	<i>Y-related Coefficients</i>	VIP	Ref.
Ortosifol Y	3450	+	0,52	Tezuka <i>et al.</i> , 2000
	3450	+	0,52	
	3550	+	0,19	
Ortosifol Z	3450	+	0,52	
	3450	+	0,52	
	3550	+	0,19	
Ortosifol F	3550	+	0,19	
	3400	+	0,50	
	3550	+	0,19	
Ortosifol G	3550	+	0,19	
	3400	+	0,50	
	3550	+	0,19	
Ortosifol H	3550	+	0,19	
	3400	+	0,50	
	3550	+	0,19	
Ortosifol I	3550	+	0,19	
	3400	+	0,50	
	3550	+	0,19	
Ortosifol J	3550	+	0,19	
	3400	+	0,50	
	3550	+	0,19	
Staminol A	3430	+	0,61	
	3300	+	0,53	
	1600	+	0,27	
Staminol B	3550	+	0,19	
	3430	+	0,61	
	3300	+	0,53	
Staminolaktone A	1600	+	0,27	
	3570	+	0,44	
	1600	+	0,27	
Staminolaktone B	1600	+	0,27	
	3570	+	0,44	
	1600	+	0,27	
Norstaminol A	3550	+	0,19	
	1600	+	0,27	
	3580	+	0,15	
Ortoarisin A	1602	+	0,24	Di <i>et al.</i> , 2013
	3439	+	0,45	
	1602	+	0,24	
Ortoarisin B	3430	+	0,61	
	1601	+	0,27	
	3460	+	0,56	
Ortoarisin C	1601	+	0,27	
	3460	+	0,56	
	1601	+	0,27	
Ortoarisin D	3519	+	0,32	
	1601	+	0,27	
	3425	+	0,62	
Ortoarisin E	1601	+	0,27	
	3425	+	0,62	
	1601	+	0,27	
Ortoarisin F	3425	+	0,62	
	1601	+	0,27	
	3425	+	0,62	
Ortoarisin G	1601	+	0,27	
	3425	+	0,62	
	1601	+	0,27	
Ortoarisin H	3363	+	0,58	
	1601	+	0,27	
	3438	+	0,45	
Ortoarisin I	1601	+	0,27	
	3438	+	0,45	
	1601	+	0,27	
Asam ursolat	3435	+	0,43	Hossain dan Ismail, 2013
	3243	+	0,67	
	1621	+	0,12	
Asam oleanolat	1600	+	0,27	
	1528	+	0,12	
	1380	+	0,01	
Asam betulinat	3331	+	0,54	
	3161	+	0,65	
	3095	+	0,54	
Asam maslinat	1616	+	0,16	
	3473	+	0,38	
	3063	+	0,46	
Asam hidrosibetulinat	3435	+	0,43	
	1380	+	0,01	
	3446	+	0,48	
α -amirin	3035	+	0,34	
	3452	+	0,52	
	3035	+	0,34	
β -amirin	3435	+	0,43	
	1380	+	0,01	
	3435	+	0,43	

Berdasarkan hasil identifikasi gugus fungsi penanda senyawa antioksidan mengindikasikan senyawa dari kelompok diterpen tipe isopimarane yaitu ortosifol F, ortosifol G, ortosifol H, ortosifol I, ortosifol J (Tezuka *et al.*, 2000), ortoarisin A, ortoarisin B, ortoarisin C, ortoarisin D, ortoarisin E, ortoarisin F dan ortoarisin G (Di *et al.*, 2013). Diterpen tipe isopimarane teroksidasi antara lain ortosifol O, ortosifol P, ortosifol Q, dan noortosifonolida A (Awale *et al.*, 2002), diterpen tipe isopimarane

teroksigenasi tinggi antara lain ortosifol A, ortosifol B, ortosifol U, ortosifol V, ortosifol W, ortosifol X, ortosifol Y, dan ortosifol Z (Masuda *et al.*, 1992; Awale *et al.*, 2003), diterpen tipe isopimaran termigrasi neoortosifol A dan neoortosifol B (Ohashi *et al.*, 2000) dan diterpen tipe sekoisopimaran ortoarisin H (Di *et al.*, 2013). 18 senyawa diterpen (ortosifol U-Z, ortosifol A, B, D, F, G, I, J, O, R, T, ortosifonon A dan sekoortosifol B) diisolasi dari ekstrak metanol kumis kucing menunjukkan aktivitas penghambatan yang signifikan terhadap produksi nitrit oksida (NO) pada sel serupa makrofag J774,1 teraktivasi lipopolisakarida (LPS). Namun demikian ortosifol A, B, D, dan X menunjukkan aktivitas penghambatan kuat melebihi kontrol positif NG-monometil-L-arginin (L-NMMA). Ortosifol U menunjukkan aktivitas terkuat dengan nilai IC_{50} sebesar $6,4 \mu\text{M}$ (Awale *et al.*, 2003).

Selain itu senyawa antioksidan juga diduga dari kelompok diterpen tipe staminan. Beberapa senyawa diterpen tipe staminan diidentifikasi yaitu staminol A, staminol B, staminolakton A, staminolakton B, norstaminol A (Tezuka *et al.*, 2000) dan ortoarisin I (Di *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan diterpen tipe staminan terhadap produksi nitrit oksida (NO) pada sel serupa makrofag J774,1 teraktivasi lipopolisakarida (LPS) dilaporkan dari senyawa staminol C dan D yang diisolasi dari ekstrak metanol kumis kucing dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $61,1 \mu\text{M}$ dan $92,0 \mu\text{M}$ (Nguyen *et al.*, 2004).

Berdasarkan hasil identifikasi gugus fungsi penanda senyawa antioksidan mengindikasikan senyawa dari kelompok triterpen yaitu asam ursolat, asam oleanolat, asam betulinat, asam hidroksibetulinat, α -amirin, β -amirin, dan asam maslinat (Hossain dan Ismail, 2013) sebagai senyawa antioksidan. Asam ursolat yang diisolasi dari ekstrak *Sambucus australis* menunjukkan aktivitas antioksidan terhadap senyawa DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar $5,97 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$, asam maslinat yang diisolasi dari kulit buah *Ziziphus jujuba* Mill. menunjukkan aktivitas antioksidan terhadap DPPH setara standar BHT dengan nilai dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 39,6; 28,12 $\mu\text{g/mL}$ (do Nascimento *et al.*, 2014; Rajopadhye dan Upadhye, 2016). Aktivitas antioksidan juga dilaporkan dari triterpen β -amirin dari daun *Symplocos cochinchinensis* Moore. yang menunjukkan aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH (IC_{50} 89,63 g/mL), hidroksil (IC_{50} 76,41 g/mL), nitrit oksida (IC_{50} 87,03 g/mL) dan superoksida (IC_{50} 81,28 g/mL) sekaligus aktivitas mereduksi radikal yang tinggi dan kuat dalam menekan pengaruh peroksidasi lipid (Sunil *et al.*, 2014). Selain itu, senyawa triterpen α -amirin, asam ursolat, dan asam oleanolat yang diisolasi dari *F. pseudopalma* merupakan pendonor proton dengan nilai IC_{50} >333,33 μM dan kemampuan mereduksi sebesar

RC_{50} >909,09 μM . Asam ursolat merupakan penghambat NO^{\bullet} tertinggi (IC_{50} >166,67 μM) yang disusul asam oleanolat dan kemudian α -amirin. Asam ursolat juga merupakan penghambat radikal O_2^{\bullet} tertinggi. Tidak hanya itu, α -amirin, asam oleanolat dan asam ursolat menunjukkan kemampuan menghambat peroksidasi lipid dengan nilai IC_{50} <15 μM (Santiago *et al.*, 2014).

KESIMPULAN

Metode metabolomik berbasis FTIR memungkinkan identifikasi secara cepat gugus fungsional penanda senyawa yang berkorelasi positif dengan aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dan antioksidan dari ekstrak kasar dan fraksi kumis kucing. Hasil analisis menunjukkan bahwa gugus fungsi karbonil, metoksi, hidroksil dan C-O yang mengindikasikan keberadaan senyawa dari kelompok metoksi flavonoid (sinensitin dan 5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenilflavon), diterpena (ortosifol, ortoarisin, neoortosifol, staminol, dan staminolakton), triterpena (asam ursolat, asam oleanolat, asam betulinat, asam hidroksibetulinat, asam maslinat, α -amirin dan β -amirin) diidentifikasi sebagai senyawa penghambat aktivitas enzim α -glukosidase sedangkan fenolik (asam rosmarinat), flavonoid (eupatorin, sinensetin, 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon, salvigenin, 6-hidroksi-5,7,3'-trimetoksiflavon dan 5,6,7,3'-tetrametoksi-4'-hidroksi-8-C-prenilflavon), diterpena (ortosifol, ortoarisin, neoortosifol, staminol, dan staminolakton), triterpena (asam ursolat, asam oleanolat, asam betulinat, asam hidroksibetulinat, asam maslinat, α -amirin dan β -amirin) diidentifikasi sebagai senyawa antioksidan. Untuk konfirmasi, senyawa-senyawa tersebut dapat diisolasi dan diuji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dan antioksidannya. Dengan adanya informasi dari analisis OPLS ini, maka proses isolasi dan identifikasi akan jauh lebih mudah dan terarah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana atas bantuan dari Riset Inovatif Produktif (RISPRO) Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) bekerja sama dengan PT Soho Industri Farmasi.

DAFTAR PUSTAKA

Abdelwahab SI, Mohan S, Elhassan MM, Al-Mekhlafi N, Mariod AA, Abdul AB, Abdulla MA, Alkharfy KH. 2011. Antiapoptotic and antioxidant properties of *Orthosiphon stamineus* benth (cat's whiskers): intervention in the Bcl-2-mediated apoptotic pathway. Evid-Based

- Compl Alt Med 2011: 1-11. DOI: 10.1155/2011/156765.
- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Rivière C, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C, Hennebelle T. 2013. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* poit. (*Lamiaceae*). Evid-Based Compl Alt Med 2013: 1-11. DOI: 10.1155/2013/604536.
- Adnyana IK, Setiawan F, Insanu M. 2013. From ethnopharmacology to clinical study of *Orthosiphon stamineus* Benth. Int J Pharm Sci 5: 63-66.
- Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A. 2005. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. Food Chem 93: 311-317. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.09.028.
- Asghari B, Salehi P, Sonboli A, Nejad ES. 2015. Flavonoids from *Salvia chloroleuca* with α -amylase and α -glucosidase inhibitory effect. Iran J Pharm Res 14: 609-615.
- Awale S, Tezuka Y, Banskota AH, Kouda K, Tun KM, Kadota S. 2002. Four highly oxygenated isopimarane-type diterpenes of *Orthosiphon stamineus*. Planta Med 68: 286-288. DOI: 10.1055/s-2002-23137.
- Awale S, Tezuka Y, Banskota AH, I Ketut Adnyana, Kadota S. 2003. Nitric oxide inhibitory isopimarane-type diterpenes from *Orthosiphon stamineus* of Indonesia. J Nat Prod 66: 255-8. DOI: 10.1021/np020455x.
- Baynes JW, Thorpe SR. 1999. Perspectives in diabetes: Role of oxidative stress in diabetic complications a new perspective on an old paradigm. Diabetes 48: 1-09.
- Capasso R, Izzo AA, Romussi G, Capasso F, De Tommasi N, Bisio A, Mascolo N. 2004. A secoisopimarane diterpenoid from *Salvia cinnabarina* inhibits rat urinary bladder contractility in vitro. Planta Med 70: 185-8. DOI: 10.1055/s-2004-815501.
- Damsud T, Grace MH, Adisakwattana S, Phuwapraisirisan P. 2014. Orthosiphon A from the aerial parts of *Orthosiphon aristatus* is putatively responsible for hypoglycemic effect via alpha-glucosidase inhibition. Nat Prod Commun 9: 639-41.
- de Souza RF, Marinho VHS, da Silva GA, Costa-Jr. LM, da Silva JKR, Bastos GNT, Arruda AC, da Silva MN, Arruda MSP. 2013. New isoflavones from the leaves of *Vatairea guianensis* aublé. J Brazil Chem Soc 24: 1857-1863. DOI: 10.5935/0103-5053.20130231.
- Di XX, Wang SQ, Zhang XL, Wang B, Lou XL, Wang XN. 2013. Diterpenoids from the aerial parts of *Orthosiphon aristatus* var. *aristatus*. Phytochem Lett 6: 412-417. DOI: 10.1016/j.phytol.2013.05.015.
- Di Sotto A, Mastrangelo S, Romussi G, Bisio A, Mazzanti G. 2009. Antimutagenic activity of a secoisopimarane diterpenoid from *Salvia cinnabarina* M. Martens et Galeotti in the bacterial reverse mutation assay. Food Chem Toxicol 47: 2092-2096. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.030.2.
- do Nascimento PG, Lemos TL, Bizerra AM, Arriaga AM, Ferreira DA, Santiago GM, Braz-Filho R, Costa JG. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. Molecules 19: 1317-1327. DOI: 10.3390/molecules19011317.
- Eriksson L, Johansson E, Wold N, Trygg J, Wikstrom C, Wold S. 2006. Multi- and Megavariate Data Analysis: Advanced Applications and Method Extensions. 1st ed. 103-119. Umetrics AB, Umea Sweden.
- Eriksson L, Trygg J, Wold S. 2008. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS models. J Chemometr 22: 594-600. DOI: 10.1002/cem.1187.
- Galindo-Prieto B, Eriksson L, Trygg J. 2014. Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS). J Chemometr 28: 623-632. DOI: 10.1002/cem.2627.
- He QQ, Yang L, Zhang JY, Ma JN, Ma CM. 2014. Chemical constituents of gold-red apple and their α -glucosidase inhibitory activities. J Food Sci 79: C1970-83. DOI: 10.1111/1750-3841.12599.
- Hossain MA, Rahman SMM. 2015. Isolation and characterisation of flavonoids from the leaves of medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. Arab J Chem 8: 218-221. DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.06.016.
- Hossain MA, Ismail Z. 2013. Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. Arab J Chem 6: 295-298. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.10.009.
- Hou W, Li Y, Zhang Q, Wei X, Peng A, Chen L, Wei Y. 2009. Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as alpha-glucosidase inhibitors. Phytother Res 23: 614-618. DOI: 10.1002/ptr.2661.
- Hunaefi D, Akumo DN, Riedel H, Smetanska I. 2012. The effect of *Lactobacillus plantarum* ATCC

- 8014 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM fermentation on antioxidant properties of selected *in vitro* sprout culture of *Orthosiphon aristatus* (Java Tea) as a Model Study. *Antioxidants (Basel)* 1: 4–32. DOI: 10.3390/antiox1010004.
- Hussain K, Ismail Z, Sadikun A, Ibrahim P. 2009. Evaluation of metabolic changes in fruit of *Piper sarmentosum* in various seasons by metabolomics using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Int J Clin Pharm Res* 1: 68-71.
- Jeong JM, Choi CH, Kang SK, Lee IH, Lee JY, Jung H. 2007. Antioxidant and chemosensitizing effects of flavonoids with hydroxy and/or methoxy groups and structure-activity relationship. *J Pharm Pharm Sci* 10: 537-46.
- Khamsiah SM, Akowah G, Zhari I. 2006. Antioxidant activity and phenolic content of *Orthosiphon stamineus* benth from different geographical origin. *J Sustain Sci Manage* 1: 14-20.
- Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. 2008. In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresour Technol* 99: 2981-8. 10.1016/j.biortech.2007.06.035.
- [IDF] International Diabetes Federation. 2013. Diabetes atlas. Sixth edition. <http://www.idf.org/diabetesatlas>. [28 Februari 2014].
- Lindgren F, Hansen B, Karcher W. 1996. Model validation by permutation tests: applications to variable selection. *J Chemometr* 10: 521-532. DOI: 10.1002/(SICI)1099-128X(199609)10:5/6<521::AID-CEM448>3.0.CO;2-J.
- Liu W, Yu Y, Yang R, Wan C, Xu B, Cao S. 2010. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis. *Int J Mol Sci* 11: 4750–4763. DOI: 10.3390/ijms11114750.
- Masuda T, Masuda K, Shiragami S, Jitoe A, Nakatani N. 1992. Orthosiphon A and B, novel diterpenoid inhibitors of TPA (12-O- Tetradecanoylphorbol-13-acetate)-induced inflammation, from *Orthosiphon stamineus*. *Tetrahedron* 48: 6787–6792. DOI: 10.1016/S00404020(01)89868-9.
- Mbaze LM, Poumale HM, Wansi JD, Lado JA, Khan SN, Iqbal MC, Ngadjui BT, Laatsch H. 2007. alpha-Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (*Rutaceae*). *Phytochemistry* 68: 591-5. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.12.015.
- Mohamed EAH, Mohamed AJ, Asmawi MZ, Sadikun A, Ebrika OS, Yam MF. 2011. Antihyperglycemic effect of *Orthosiphon stamineus* benth leaves extract and its bioassay-guided fractions. *Molecules* 16: 3787-3801. DOI: 10.3390/molecules16053787.
- Mohamed EAH, Siddiqui MJA, Ang LF, Sadikun A, Chan SH, Tan SC, Asmawi MZ, Yam MF. 2012. Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC Complem Altern M* 12: 01-07. DOI: 10.1186/1472-6882-12-176.
- Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Chien-Hsiung C, Kadota S. 2004. Staminane- and isopimarane-type diterpenes from *Orthosiphon stamineus* of Taiwan and their nitric oxide inhibitory activity. *J Nat Prod* 67: 654-8. DOI: 10.1021/np030471+.
- Ohashi K, Bohgaki T, Matsubara T, Shibuya H. 2000. Indonesian medicinal plants. XXIII. Chemical structures of two new migrated pimarane-type diterpenes, neoorthosiphols A and B, and suppressive effects on rat thoracic aorta of chemical constituents isolated from the leaves of *Orthosiphon aristatus* (*Lamiaceae*). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 48: 433-435.
- Pop RM, Buzoianu AD, Rați IV, Socaciu C. 2014. Untargeted metabolomics for sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *carpatica*) berries and leaves: fourier transform infrared spectroscopy as a rapid approach for evaluation and discrimination. *Not Bot Horti Agrobo* 42: 545-550. DOI: 10.1583/nbha4229654.
- Rafi M, Purwakusumah ED, Ridwan T, Barus B, Sutandi A, Darusman LK. 2015. Geographical classification of Java tea (*Orthosiphon stamineus*) from Java Island by FTIR spectroscopy combined with canonical variate analysis. *J Sains Matematika* 23: 25-31.
- Rajopadhye A, Upadhye AS. 2016. Estimation of bioactive compound, maslinic acid by HPTLC, and E valuation of hepatoprotective activity on fruit pulp of *Ziziphus jujuba* mill. Cultivars in India. *Evid-Based Compl Alt* 2016: 1-8. DOI: 10.1155/2016/4758734.
- Saidan NH, Hamil MSR, Memon AH, Abdelbari MM, Hamdan MR, Mohd KS, Majid AMSA, Ismail Z. 2015. Selected metabolites profiling of *Orthosiphon stamineus* Benth. leaves extracts combined with chemometrics analysis and correlation with biological activities. *BMC Complem Altern M* 15: 12-30. DOI: 10.1186/s12906-015-0884-0.
- Salah EDR, Ma Q, Kandil ZA, El-Halawany AM. 2014. Triterpenes as uncompetitive inhibitors of α -glucosidase from flowers of *Punica granatum*

- L. Nat Prod Res 28: 2191-2194. DOI: 10.1080/14786419.2014.928292.
- Salazar-Aranda R, P´erez-L´opez LA, L´opez-Arroyo J, Alan´ıs-Garza BA, de Torres NW. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast of Mexico. Evid-Based Compl Alt 2011: 01-06. DOI: 10.1093/ecam/nep127.
- Sancheti S, Sancheti S, Seo SY. 2009. Chaenomeles Sinensis: A potent α - and β -glucosidase inhibitor. Am J Pharm Toxicol 4: 8-11. DOI: 10.3844/ajptsp.2009.8.11.
- Santiago LA, Dayrit KC, Correa PCB, Mayor ABR. 2014. Comparison of antioxidant and free radical scavenging activity of triterpenes α -amyirin, oleanolic acid and ursolic acid. J Nat Prod 7: 29-36.
- Santos FA, Frota JT, Arruda BR, de Melo TS, de Carvalho Almeida da Silva AA, de Castro Brito GA, Chaves MH, Rao VS. 2012. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β - amyirin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. Lipids Health Dis 11: 98. DOI: 10.1186/1476-511X-11-98.
- Siddiqui M, Hafizoh S, Zhari I, Sahib H, Helal M, Majid AA. 2009. Analysis of total proteins, polysaccharides and glycosaponins contents of *Orthosiphon stamineus* Benth. in spray and freeze dried methanol: water (1:1) extract and its contribution to cytotoxic and antiangiogenic activities. Pharmacognosy Res 1: 320-326.
- Silva SD, Feliciano RP, Boas LV, Bronze MR. 2014. Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. Food Chem 150: 489–493. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.028.
- Sim CO, Hamdan MR, Ismail Z, Ahmad MN. 2004. Assessment of herbal medicines by chemometrics-assisted interpretation of FTIR spectra. J Anal Chimica Acta 570: 116-123.
- Shobana S, Sreerama YN, Malleshi NG. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. Food Chem 115: 1268–1273. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.042.
- Sridevi H, Jayaraman P, Pachaiyappan P. 2015. Evaluation of α -glucosidase inhibitory action of isolated compound beta amyirin from *Memecylon umbellatum* burm. Int J Pharmacogn Phytochem Res 7: 1033-1038.
- Stehfest K, Boese M, Kerns G, Piry A, Wilhelm C. 2004. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. J Plant Physiol 161: 151–156. DOI: 10.1078/0176-1617-01099.
- Sunil C, Irudayaraj SS, Duraipandiyan V, Al-Dhabi NF, Agastian P, Ignacimuthu S. 2014. Antioxidant and free radical scavenging effects of β -amyirin isolated from *S. cochinchinensis* Moore. Leaves. Ind Crop Prod 61: 510–516. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.07.005.
- Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ, Saiki I, Kadota S. 2000. Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 48: 1711-9. DOI: 10.1248/cpb.48.1711.
- Uddin G, Rauf A, Al-Othman AM, Collina S, Arfan M, Ali G, Khan I. 2012. Pistagremic acid, a glucosidase inhibitor from *Pistacia integerrima*. Fitoterapia 83: 1648-52. DOI: 10.1016/j.fitote.2012.09.017.
- Worley B, Powers R. 2013. Multivariate analysis in metabolomics. Current Metabolomics 1: 92-107. DOI: 10.2174/2213235X11301010092.
- Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. 2007. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. Phytochem Rev 6: 3–14. DOI: 10.1007/s11101-006-9031-3.
- Xia X, Qi J, Liu Y, Jia A, Zhang Y, Liu C, Gao C, She Z. 2015. Bioactive isopimarane diterpenes from the fungus, *Epicoccum* sp. HS-1, associated with *Apostichopus japonicus*. Mar Drugs 13: 1124-32. DOI: 10.3390/md13031124.
- Yang F, Shi H, Zhang X, Yang H, Zhou Q, Yu L. 2013. Two new saponins from tetraploid jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*), and their anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory activities. Food Chem 141: 3606–3613. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.015.
- Yuliana ND, Khatib A, Verpoorte R, Choi YH. 2011. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* benth. Anal Chem 83: 6902–6906. DOI: 10.1021/ac201458n.
- Yusof NA, Isha A, Ismail IS, Khatib A, Shaari K, Abas F, Rukayadi Y. 2015. Infrared-metabolomics approach in detecting changes in *Andrographis paniculata* metabolites due to different harvesting ages and times. J Sci Food Agr 95: 2533-43. DOI: 10.1002/jsfa.6987.