

AKTIVITAS ANTIDIABETES BEBERAPA FRAKSI DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*) SECARA IN VITRO BERDASARKAN PENGHAMBATAN ENZIM α -AMILASE

Nailus Amany Melinda¹, Djati Wulan Kusumo¹, Diah Indah Kumala Sari²

¹ Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Lamongan, Lamongan

² Program Studi D3 Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Lamongan, Lamongan

ABSTRAK

Diabetes mellitus merupakan penyakit yang ditandai dengan adanya peningkatan kadar glukosa darah karena tubuh tidak dapat menghasilkan atau menggunakan insulin dengan baik. Salah satu tanaman herbal yang dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah adalah tanaman mimba (*Azadirachta indica*). Daun mimba telah diketahui memiliki senyawa flavonoid yang sangat berpotensi dalam menurunkan kadar glukosa darah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antidiabetes dari fraksi daun mimba (*Azadirachta indica*) dengan variasi pelarut berbeda dalam menghambat enzim α -amilase. Daun mimba diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan metanol kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksan etil asetat dan metanol. Fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol daun mimba yang diperoleh dilakukan skrining fitokimia dan uji in vitro terhadap enzim α -amilase menggunakan substrat pati beras dan reagen dinitrosalisilat (DNS). Penghambatan enzim α -amilase dilakukan dengan variasi konsentrasi sampel yaitu 200; 400; 600; 800 dan 1000 ppm. Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan menghitung nilai % inhibisi dan IC50. Hasil penelitian menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid dan terpenoid pada fraksi n-heksan; flavonoid dan tanin pada fraksi etil asetat; serta flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid pada fraksi metanol. Nilai IC50 fraksi etil asetat didapatkan sebesar 54,85 μ g/ml dengan kategori kuat dan metanol sebesar 132,26 μ g/ml dengan kategori sedang, sedangkan fraksi n-heksan didapatkan nilai penghambatan sebesar 33,82% pada konsentrasi 600 ppm. Fraksi n-heksan tidak dapat diukur nilai IC50nya karena adanya perbedaan polaritas antara fraksi n-heksan dengan enzim α -amilase sehingga tidak dapat bercampur dengan baik. Fraksi etil asetat menunjukkan penghambatan paling tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya.

Kata Kunci :

Daun Mimba, *Azadirachta indica*, Antidiabetes, Enzim α -amilase, DNS

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolit di Indonesia yang terus mengalami peningkatan secara signifikan dan berbahaya apabila tidak diatasi dengan benar dan tepat. Menurut International Diabetes Federation (IDF), Indonesia menduduki peringkat ke-5 dengan jumlah sebanyak 19,5 juta jiwa yang menderita diabetes mellitus dengan rentang umur 20-79 tahun (1). World Health Organization (WHO) memperkirakan Indonesia akan memiliki 21,3 juta kasus diabetes melitus pada tahun 2030 jika kondisi ini tidak dikelola dengan baik (2).

Tubuh tidak dapat secara efektif menghasilkan atau menggunakan insulin yang mengakibatkan peningkatan kadar glukosa darah merupakan salah satu gejala diabetes mellitus (3). Jenis diabetes yang paling banyak diderita masyarakat Indonesia adalah diabetes melitus tipe 2 (4). Mengontrol kadar glukosa postprandial adalah upaya untuk mencegah diabetes mellitus tipe 2. Hal ini dapat dicapai melalui strategi pengobatan dengan menunda penyerapan glukosa, khususnya dengan menghambat enzim hidrolisis karbohidrat (5).

Enzim α -amilase merupakan enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat, yang bekerja dengan memecah karbohidrat menjadi karbohidrat sederhana dan glukosa (6). Obat dengan aktivitas penghambatan α -amilase bekerja dengan menghambat pencernaan karbohidrat kompleks (amilum) menjadi glukosa sehingga

mengurangi peningkatan kadar glukosa postprandial pada penderita diabetes mellitus (5,7). Akarbose merupakan obat inhibitor enzim α -glukosidase dan α -amilase yang saat ini telah digunakan secara klinis. Namun, golongan tersebut memiliki keterbatasan yang menyebabkan timbulnya efek samping pada gastrointestinal seperti perut kembung, mual, muntah hingga diare yang dapat menyebabkan menurunnya kepatuhan minum obat pada pasien (8).

Selain itu, faktor biaya pengobatan juga perlu dipertimbangkan karena diabetes mellitus merupakan penyakit menahun yang tidak dapat sembuh dan hanya dapat diatasi dengan cara merangsang kerja sel β -pankreas untuk menghasilkan insulin yang berfungsi sebagai transport glukosa ke dalam sel-sel hati dan otot atau menghambat percepatan penggunaan glukosa di dalam darah sehingga proses metabolisme dalam tubuh berlangsung dengan normal. Mengatasi permasalahan tersebut dapat dilakukan pendekatan terapi dari bahan alam yang memiliki kemampuan sama dan efek samping yang rendah dengan penggunaan tepat dosis serta biaya pengobatan yang minimum untuk digunakan secara berkala (9).

Salah satu tanaman herbal yang dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah adalah daun mimba (*Azadirachta indica*) (10-12). Diketahui daun mimba memiliki senyawa aktif alkaloid, saponin,

Masuk 14-08-2023

Revisi 02-11-2023

Diterima 06-11-2023

DOI: 10.20956/mff.v27i3.28301

Korespondensi

Nailus Amany Melinda

nailus.amany06@gmail.com

Copyright

© 2023 Majalah Farmasi Farmakologi Fakultas Farmasi - Makassar

Diterbitkan tanggal

30 Desember 2023

Dapat Diakses Daring Pada:

<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



glikosida jantung, tanin, flavonoid, fenol, terpenoid dan steroid (13). Flavonoid dan tanin merupakan golongan besar senyawa yang memiliki potensi dalam menurunkan kadar glukosa darah dengan cara mempertahankan fungsi sel β -pankreas sehingga mengembalikan sensitivitas reseptor insulin pada sel, selain itu senyawa tersebut juga bekerja dengan menghambat enzim pencernaan yaitu α -amilase (14). Selain itu, saponin juga dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan menghambat enzim dalam proses metabolisme karbohidrat (15).

Daun mimba memiliki efektivitas antidiabetes ditinjau dari senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman tersebut. Perlu adanya pengujian lebih lanjut untuk mengetahui nilai penghambatan dari fraksi daun mimba berdasarkan jenis pelarut yang berbeda pada enzim α -amilase, sehingga dengan demikian dapat diketahui fraksi manakah yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase paling besar.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat

Microplate reader (BioTek EPOCH2NSC), microwell 96 wells (Biologix), rotary evaporator (IKA RV 8 V), timbangan analitik (Durascale DAB-E223), mikroskop (Yazumi XSZ-107BN), hot plate (Maspion S-300), mikro pipet (Dragonlab), seperangkat alat maserasi dan alat-alat gelas.

Bahan

Simplisia daun mimba, metanol, n-heksan, etil asetat, aquadest, asam asetat anhidrat ($C_4H_6O_3$), besi (III) klorida ($FeCl_3$), asam klorida (HCl), serbuk magnesium (Mg), dimetil sulfoksida (DMSO), dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), dinitrosalicilyc acid (DNS), natrium hidroksida (NaOH), natrium kalium tartarat, enzim α -amilase, amilum (pati beras) dan akarbose BPHI.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi (1:4 b/v), dimana daun mimba sebanyak 500 gram dilarutkan dengan 2000 mL metanol. Maserasi dilakukan selama kurang lebih 3x24 jam yang selanjutnya dilakukan penyaringan. Padatan yang tersaring diekstraksi kembali sebanyak 3 kali dan hasil filtrat yang diperoleh digabungkan. Filtrat yang terkumpul kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C (16).

Fraksinasi

Ekstrak yang diperoleh dilarutkan dalam 200 mL air destilasi, kemudian difraksinasi menggunakan metode partisi cair-cair (1:1 v/v) dengan urutan pelarut dari non polar ke polar yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol. Pemisahan dilakukan sebanyak 3 kali dalam corong pisah dan fraksi dari satu pelarut digabungkan yang selanjutnya dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C (16).

Skriming Fitokimia

Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 1 mL filtrat sampel ditambahkan serbuk magnesium dan beberapa tetes HCl pekat. Hasil positif apabila terbentuk warna merah (flavonol) atau jingga (flavon) (17).

Identifikasi Tanin

Sebanyak 1 mL filtrat sampel ditambahkan dengan 2 mL $FeCl_3$ 5%. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna biru tua atau hitam kehijauan (18).

Identifikasi Saponin

Sebanyak 2 mL filtrat sampel ditambahkan dengan 2 mL aquadest, kemudian dikocok kuat hingga terbentuk busa stabil. Selanjutnya ditetesi dengan HCl 2N sebanyak 1 tetes. Hasil positif apabila terbentuk busa yang tetap stabil (17).

Identifikasi Alkaloid

Mayer's test: Beberapa mL filtrat ditambahkan dengan 1-2 tetes reagen mayer. Hasil positif apabila terbentuk endapan putih atau kuning (17).

Bouchardat's test: Beberapa mL filtrat ditambahkan dengan beberapa tetes reagen Bouchardat. Hasil positif apabila terjadi perubahan menjadi merah kecoklatan (17).

Wagner's test: Beberapa mL filtrat ditambahkan dengan 1-2 tetes reagen Wagner. Hasil positif apabila terbentuk endapan merah atau coklat (17).

Identifikasi Terpenoid

Sebanyak 2 mL kloroform ditambahkan dengan 5 mL filtrat sampel dan 3 mL H_2SO_4 . Selanjutnya dipanaskan hingga terjadi perubahan warna. Hasil positif apabila terjadi perubahan menjadi abu-abu (17).

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -amilase

Pengujian inhibisi fraksi daun mimba terhadap aktivitas enzim α -amilase menggunakan metode DNS yaitu dengan pereaksi DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat). Pembuatan larutan uji dapat dilihat pada Tabel 1 yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 540 nm.

Tabel 1. Pengujian Aktivitas Penghambatan Enzim α -amilase

Larutan	Volume (μ L)					
	B1	B0	S1	S0	A1	A0
Sampel	-	-	150	150	-	-
Akarbose	-	-	-	-	150	150
Dapar fosfat pH 6,9	400	800	250	650	250	650
Enzim α -amilase	400	-	400	-	400	-
Inkubasi 30 menit, suhu 37°C						
Amilum	50	50	50	50	50	50
Inkubasi 30 menit, suhu 37°C						
DNS	25	25	25	25	25	25
Dipanaskan selama 10 menit, suhu 100°C						

Analisis Data

Data hasil nilai absorbansi dari setiap pengujian yang telah diukur menggunakan microplate reader dianalisis dengan menentukan persen inhibisi enzim α -amilase menggunakan rumus sebagai berikut (19):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(B1-B0)-(S1-S0)}{(B1-B0)} \times 100\%$$

Keterangan: S1= absorbansi sampel; S0= absorbansi kontrol sampel; B1= absorbansi blanko; B0= absorbansi kontrol blanko

Kemudian menghitung IC50 dengan menggunakan persamaan regresi linier $y = bx+a$. Sumbu (y) merupakan % inhibisi dan sumbu (x) merupakan konsentrasi sampel. Persamaan regresi yang telah diperoleh digunakan untuk menentukan nilai IC50 menggunakan rumus sebagai berikut (20):

$$IC50 = (50-a)/b$$

Analisis statistik dilakukan dengan IBM SPSS Statistics version 22 menggunakan one-way analysis of variance (ANOVA) diikuti dengan uji Tukey-HSD pada signifikansi 0,05 ($p < 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Mimba

Ekstraksi simplisia diperoleh hasil persentase rendemen ekstrak kental metanol daun mimba sebesar 11,81%. Apabila nilai rendemen semakin besar maka menunjukkan ekstrak yang dihasilkan banyak dan semakin banyak pula senyawa yang tertarik. Sari et al., (2022) menunjukkan bahwa persentase rendemen ekstrak metanol daun mimba sebesar 11,39% (21). Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil persentase rendemen yang didapatkan pada penelitian yang dilakukan. Syarat rendemen ekstrak kental yaitu nilainya tidak kurang dari 10% (22). Sehingga dapat dikatakan bahwa hasil rendemen dari ekstrak metanol daun mimba termasuk baik karena memenuhi persyaratan rendemen ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapatkan selanjutnya dilakukan fraksinasi yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Mimba

Sampel	Berat Hasil Ekstrak (gram)	% Rendemen
Ekstrak Daun Mimba	55,88	11,18
Fraksi N-heksan	1,74	3,11
Fraksi Etil asetat	1,91	3,42
Fraksi Metanol	0,37	0,66

Berdasarkan hasil pada Tabel 2, presentase rendemen pada masing-masing fraksi menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Hal tersebut dikarenakan adanya perbedaan dari masing-masing kemampuan pelarut dalam menarik senyawa pada proses fraksinasi (23). Presentase rendemen fraksi n-heksan dan metanol lebih kecil dibandingkan fraksi etil asetat, sedangkan fraksi n-heksan lebih besar daripada fraksi metanol. Hal tersebut menunjukkan kandungan senyawa dalam daun mimba lebih banyak yang memiliki sifat dengan kepolaran rendah.

Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia disajikan pada Tabel 3 dimana dalam fraksi n-heksan teridentifikasi senyawa alkaloid dan terpenoid. Fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Sedangkan fraksi metanol terdapat senyawa flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid. Senyawa fitokimia pada daun mimba cenderung memiliki sifat kepolaran yang rendah (24). Oleh karena itu banyak senyawa yang tertarik pada fraksi n-heksan dan etil asetat.

Tabel 3. Hasil Uji Skrining Fitokimia Fraksi Daun Mimba

Metabolit Sekunder	Hasil Uji		
	Fraksi N-heksan	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Metanol
Flavonoid	-	+	+
Tanin	-	+	+
Saponin	-	-	+
Alkaloid			
- Mayer's	+	-	-
- Bouchardat's	+	-	+
- Wagner's	+	-	-
Terpenoid	+	-	-

Keterangan: (+) = positif mengandung senyawa; (-) = negatif mengandung senyawa

Mimba memiliki komponen senyawa utama berupa azadirachtin yang termasuk dalam limonoid, turunan dari triterpenoid (25). Adapun senyawa spesifik lain dari mimba yang termasuk dalam limonoid seperti azadiradione, epoxyazadiradione, nimbolide, nimbolinin, nimbin, nimbidin, salannin, aladucin, valassin, meliacin dan gedunin (25,26). Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa yang diduga banyak tertarik dalam fraksi n-heksan, karena berdasarkan

hasil uji skrining fitokimia fraksi n-heksan mengandung terpenoid yang salah satu turunannya merupakan triterpenoid. Selain itu, senyawa-senyawa tersebut termasuk kedalam senyawa non polar karena tersusun dari beberapa rantai hidrokarbon (27).

Senyawa flavonoid teridentifikasi dalam fraksi etil asetat dan fraksi metanol. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Falana dan Nurudeen (2020), myricetin dan quercetin diketahui banyak tertarik dalam ekstrak etil asetat daun mimba yang merupakan senyawa dari golongan flavonoid kelompok flavonol (aglikon flavonoid) dimana keduanya diidentifikasi dengan metode HPLC dan menunjukkan puncak paling tinggi dibandingkan dengan senyawa lainnya (28). Selain itu, Vergallo et al. (2019) juga menemukan senyawa lain yaitu rutin yang terdapat pada pelarut polar air-alkohol daun mimba yang diidentifikasi dengan HPLC menunjukkan puncak paling tinggi, dimana rutin termasuk dalam golongan flavonoid kelompok O-glikosida (glikosida flavonoid) (29). Berdasarkan penelitian tersebut, diduga bahwa flavonoid yang teridentifikasi pada fraksi etil asetat daun mimba lebih banyak berupa myricetin dan quercetin, sedangkan pada fraksi metanol berupa rutin. Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang umumnya lebih mudah diekstrak menggunakan pelarut organik dengan sifat polar dan semi polar (30). Hal ini selaras dengan hasil uji skrining fitokimia dimana senyawa flavonoid hanya teridentifikasi pada fraksi yang bersifat semi polar yaitu etil asetat dan fraksi bersifat polar metanol. Rutin cenderung larut dalam pelarut polar seperti metanol karena termasuk dalam flavonoid O-glikosida dimana pada gugus hidroksilnya berikatan dengan gula sehingga mudah larut dalam air atau pelarut polar (31).

Senyawa alkaloid teridentifikasi dalam fraksi n-heksan dan metanol, namun berdasarkan hasil skrining fitokimia menunjukkan lebih banyak terkandung dalam fraksi n-heksan. Alkaloid dalam bentuk basa mudah larut dalam pelarut organik non polar seperti n-heksan, sementara alkaloid dalam bentuk garamnya larut dalam pelarut polar (32). Hal tersebut menunjukkan bahwa berdasarkan hasil skrining fitokimia yang diperoleh, banyak kandungan alkaloid pada daun mimba bersifat basa yang tertarik oleh pelarut n-heksan dan sedikit senyawa alkaloid dalam bentuk garamnya yang tertarik oleh pelarut metanol. Pernyataan tersebut sesuai dengan literatur dimana daun mimba banyak mengandung senyawa alkaloid yang bersifat basa seperti pirolidine, piridine dan quinoline (33).

Senyawa tanin juga teridentifikasi dalam fraksi etil asetat dan fraksi metanol. Hal tersebut dikarenakan tanin termasuk dalam senyawa fenolik seperti flavonoid yang umumnya lebih mudah diekstrak oleh pelarut organik bersifat semi polar dan polar (30). Sedangkan senyawa saponin hanya teridentifikasi dalam fraksi metanol karena termasuk dalam glikosida triterpen yang memiliki ikatan glikosida sehingga sifatnya cenderung polar. Ikatan glikosida itulah yang akan lebih cenderung tertarik oleh pelarut bersifat polar seperti metanol (34).

Aktivitas Penghambatan Enzim α -amilase

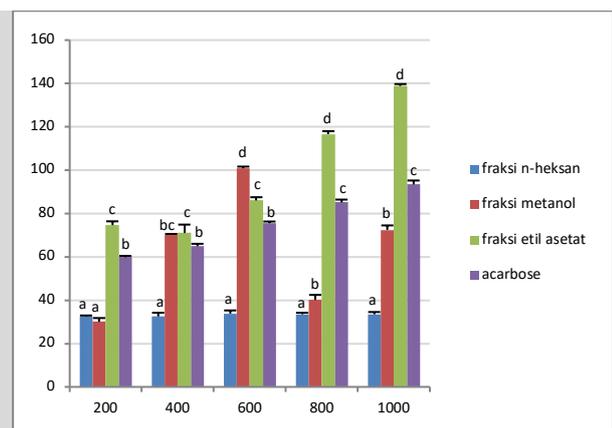
Reagen DNS (3,5-dinitrosalisilat) digunakan untuk pengujian aktivitas inhibisi enzim α -amilase. Nilai % inhibisi adalah nilai yang menunjukkan kemampuan suatu senyawa atau sampel uji dalam konsentrasi tertentu dapat menghambat aktivitas fungsi biologis atau komponen biokimia (35). Berdasarkan hasil analisis tiap sampel, nilai % inhibisi pada konsentrasi rendah hingga tinggi (200-1000 ppm) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Nilai % inhibisi paling besar adalah fraksi etil asetat yang ditunjukkan pada Tabel 4 dan Gambar 1. Sedangkan fraksi dengan nilai % inhibisi paling kecil adalah fraksi n-heksan. Acarbose sebagai pembanding menunjukkan nilai % inhibisi

lebih rendah dibandingkan dengan etil asetat, namun hasil yang didapatkan terus mengalami kenaikan dari konsentrasi rendah ke tinggi. Sedangkan pada fraksi etil asetat terjadi penurunan nilai dari konsentrasi 200 ppm ke 400 ppm dan selanjutnya terjadi kenaikan nilai kembali. Begitupun fraksi n-heksan dan fraksi metanol yang hasil nilai % inhibisinya naik turun dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi. Hal tersebut dikarenakan adanya batas dalam konsentrasi tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim α -amilase, sehingga dalam konsentrasi tertentu pula terdapat nilai % inhibisi yang kecil dimana enzim α -amilase tidak dihambat sempurna oleh sampel.

Tabel 4. Hasil Nilai % Inhibisi Enzim α -amilase Fraksi Daun Mimba dan Acarbose

Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi (%)			
	Fraksi N-Heksan	Fraksi Metanol	Fraksi Etil Asetat	Acarbose
200	32,65 ± 0,30 ^a	30,09 ± 1,68 ^a	74,64 ± 1,76 ^c	59,81 ± 0,62 ^b
400	32,51 ± 1,71 ^a	70,30 ± 0,28 ^b	71,01 ± 3,87 ^c	64,9 ± 1,13 ^b
600	33,82 ± 1,47 ^a	100,88 ± 0,76 ^d	86,04 ± 1,47 ^c	75,56 ± 0,75 ^b
800	33,53 ± 0,69 ^a	40,12 ± 2,33 ^b	116,59 ± 1,38 ^d	85,12 ± 1,30 ^c
1000	33,53 ± 1,02 ^a	72,44 ± 2,06 ^b	138,85 ± 0,87 ^d	93,41 ± 1,81 ^c

Data direpresentasikan sebagai rata-rata ± SD (n=3) dan dianalisis menggunakan uji ANOVA diikuti dengan uji Tukey-HSD. *d Huruf yang berbeda dalam kolom parameter tertentu memiliki perbedaan nilai yang signifikan (p <0,05).



*d Huruf yang berbeda di atas batang memiliki perbedaan yang signifikan (uji ANOVA diikuti dengan uji Tukey-HSD, p <0,05).

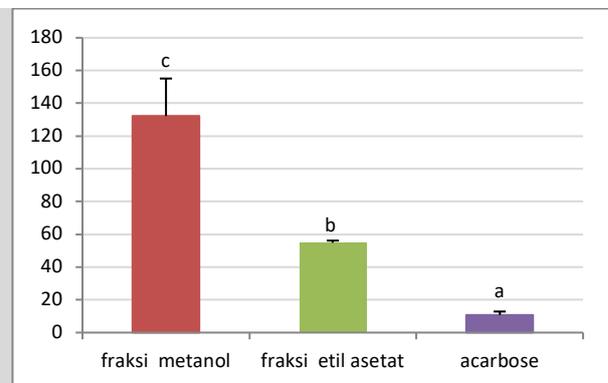
Gambar 1. Diagram % Inhibisi Enzim α -amilase Fraksi Daun Mimba dan Acarbose

Senyawa fitokimia dalam suatu tanaman sangat banyak dan beraneka macam jenis, dimana senyawa-senyawa tersebut akan saling berinteraksi sehingga menghasilkan suatu aktivitas. Meningkatnya konsentrasi juga akan menyebabkan jumlah komponen senyawa fitokimia meningkat sehingga dapat mengurangi manfaat yang diharapkan karena tidak semua komponen fitokimia dapat menempel pada reseptor. Oleh karena itu, dengan peningkatan konsentrasi tidak selalu menghasilkan efektivitas yang tinggi juga (36). Adanya beberapa senyawa yang berikatan secara bersamaan dengan enzim tidak selalu menghasilkan efek yang menguntungkan karena terdapat senyawa yang justru menurunkan suatu aktivitas (37). Oleh karena itu aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase dapat mengalami kenaikan dan penurunan nilai. Nilai % inhibisi yang didapat dilakukan perhitungan sehingga didapatkan nilai IC50 dari masing-masing fraksi yang diuji.

Tabel 5. Hasil Nilai IC50 Fraksi Daun Mimba dan Acarbose

Sampel	IC ₅₀ (μ g/ml)
Fraksi Metanol	132,26 ± 22,86 ^c
Fraksi Etil Asetat	54,85 ± 1,31 ^b
Acarbose	10,72 ± 2,14 ^a

Data direpresentasikan sebagai rata-rata ± SD (n=3) dan dianalisis menggunakan uji ANOVA diikuti dengan uji Tukey-HSD. a-c Huruf yang berbeda dalam kolom parameter tertentu memiliki perbedaan nilai yang signifikan (p <0,05).



** Huruf yang berbeda di atas batang memiliki perbedaan yang signifikan (uji ANOVA diikuti dengan uji Tukey-HSD, p <0,05).

Gambar 2. Diagram Nilai IC50 Fraksi Daun Mimba dan Acarbose

Berdasarkan hasil analisis statistik, nilai IC50 dari tiap sampel menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (p <0,05). Fraksi yang menunjukkan nilai IC50 paling baik adalah fraksi etil asetat dengan nilai sebesar 54,85 μ g/ml yang termasuk dalam kategori penghambatan kuat. Fraksi metanol juga menunjukkan adanya penghambatan kerja enzim α -amilase dengan nilai IC50 sebesar 132,26 μ g/ml yang termasuk dalam kategori sedang. Fraksi n-heksan menunjukkan aktivitas penghambatan yang lemah terhadap enzim α -amilase yang dilihat dari nilai %inhibisi dengan penghambatan pada konsentrasi 600 ppm sebesar 33,82%. Fraksi n-heksan tidak bercampur secara baik dengan enzim α -amilase. Hal tersebut dikarenakan fraksi n-heksan memiliki sifat non polar sedangkan enzim α -amilase memiliki sifat polar sehingga aktivitas penghambatannya tidak dapat diukur dengan baik untuk mendapatkan nilai IC50. Sedangkan, nilai IC50 acarbose sebesar 10,72 μ g/ml yang nilainya sangat kecil dan termasuk dalam kategori penghambatan sangat kuat. Acarbose pada penelitian ini digunakan sebagai pembandingan dalam melihat aktivitas penghambatan kerja enzim α -amilase. Acarbose dipilih karena merupakan obat yang bekerja sebagai penghambat kompetitif enzim α -amilase yang secara luas telah digunakan pada penderita diabetes mellitus. Acarbose memiliki mekanisme menghambat kerja enzim penghidrolisis karbohidrat dalam pankreas yaitu enzim α -amilase sehingga dapat menunda waktu cerna dan mencegah peningkatan kadar glukosa dalam darah (20,38).

Fraksi etil asetat termasuk dalam kategori penghambatan yang kuat terhadap enzim α -amilase. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, terdapat senyawa flavonoid dan tanin pada fraksi etil asetat. Penelitian yang dilakukan oleh Proença et al. (2019), membuktikan bahwa myricetin dan quercetin merupakan flavonoid dari kelompok flavonol yang memiliki penghambatan sangat tinggi terhadap enzim α -amilase dengan nilai IC50 masing-masing sebesar 34,05 μ g/ml dan 41,71 μ g/ml (39). Flavonol termasuk flavonoid yang bersifat kurang polar, sehingga dapat ditarik menggunakan pelarut dengan polaritas yang rendah seperti etil asetat (40). Mekanisme dalam penghambatan enzim α -amilase tersebut

terjadi karena senyawa flavonoid dalam fraksi etil asetat berperan sebagai inhibitor non kompetitif pada enzim α -amilase, dan substrat dapat mengikat enzim secara bersamaan pada sisi ikatan yang berbeda sehingga enzim α -amilase tidak dapat bekerja dengan semestinya (41). Oleh karena itu, fraksi etil asetat daun mimba memiliki aktivitas penghambatan yang kuat dibandingkan dengan fraksi lainnya.

Fraksi metanol daun mimba termasuk dalam kategori penghambatan yang sedang terhadap enzim α -amilase. Hal tersebut dikarenakan adanya senyawa fitokimia yang berpotensi dalam menghambat enzim α -amilase. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Proença et al. (2019), senyawa rutin yang termasuk dalam golongan flavonoid diisolasi menggunakan pelarut polar diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase dengan nilai IC50 sebesar 122,1 $\mu\text{g/ml}$ (39). Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa flavonoid rutin diduga terdapat pada fraksi metanol daun mimba yang berperan dalam menghambat enzim α -amilase. Rutin merupakan flavonoid kelompok O-glikosida dimana terdapat komponen gula yang berikatan dengan atom O pada sisi struktur flavonoid. Penambahan struktur gula pada flavonoid akan menurunkan efek penghambatan terhadap enzim α -amilase dikarenakan peningkatan ukuran molekul dan polaritas (42). Oleh karena itu, efektivitas penghambatan fraksi metanol terhadap enzim α -amilase lebih rendah jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat.

Fraksi n-heksan memiliki aktivitas penghambatan enzim α -amilase yang lemah dibandingkan dengan fraksi lainnya jika dilihat dari data %inhibisi. Hal tersebut dikarenakan kandungan senyawa fitokimia yang ada didalam daun mimba mempengaruhi aktivitas dalam menghambat enzim α -amilase. Fraksi n-heksan mengandung senyawa alkaloid dan terpenoid. Penelitian yang dilakukan oleh Ponnusamy et al. (2015) menunjukkan bahwa daun mimba mengandung senyawa azadirachtin, salannin, nimbin dan azadirone yang termasuk dalam terpenoid namun tidak memiliki penghambatan terhadap enzim α -amilase (43). Mekanismenya terjadi karena senyawa tersebut tidak menempel atau berikatan dengan sisi aktif dari enzim α -amilase sehingga substratnya yaitu pati menempel pada enzim dan menyebabkan terjadinya proses hidrolisis karbohidrat. Oleh karena itu, fraksi n-heksan daun mimba tidak memiliki aktivitas penghambatan enzim α -amilase yang tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya.

Berdasarkan uraian tersebut, maka komponen fitokimia yang terkandung dalam daun mimba berperan penting dalam menghambat enzim α -amilase. Komponen fitokimia dalam daun mimba yang berperan dalam menghambat enzim α -amilase banyak tertarik pada fraksi etil asetat dan golongan senyawa yang memiliki peran paling utama yaitu flavonoid. Fraksi etil asetat lebih tinggi penghambatannya dari pada fraksi metanol dikarenakan senyawa fitokimia dalam daun mimba yang berpotensi dalam menghambat enzim α -amilase lebih cenderung bersifat semi polar. Hal inilah yang menyebabkan nilai IC50 fraksi etil asetat lebih kecil dari pada fraksi metanol. Fraksi n-heksan menunjukkan penghambatan yang lemah dibandingkan dengan fraksi lain. Hal tersebut dikarenakan adanya senyawa lain yang tidak memiliki potensi dalam menghambat enzim α -amilase yang saling berikatan sehingga dapat menurunkan efek penghambatan terhadap enzim α -amilase. Banyaknya komponen senyawa kompleks yang saling berikatan tidak semuanya akan menempel pada reseptor atau enzim yang ingin dihambat, sehingga dengan adanya penambahan senyawa tidak selalu menghasilkan efek yang tinggi juga (44).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah diuraikan, dapat disimpulkan bahwa fraksi metanol asetat dan fraksi etilasetat daun mimba (*Azadirachta indica*) memiliki potensi menurunkan kadar gula dalam darah dengan cara menghambat enzim α -amilase. Nilai IC50 dari fraksi n-heksan, fraksi metanol dan fraksi etil asetat daun mimba (*Azadirachta indica*) masing-masing dalam menghambat enzim α -amilase adalah 189,85 $\mu\text{g/ml}$, 132,26 $\mu\text{g/ml}$, dan 54,85 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi n-heksan menunjukkan nilai penghambatan terhadap enzim α -amilase sebesar 33,82% pada konsentrasi 600 ppm. Fraksi n-heksan tidak dapat diukur nilai IC50nya dikarenakan adanya perbedaan polaritas antara fraksi n-heksan dengan enzim α -amilase sehingga tidak dapat bercampur dengan baik. Fraksi yang menunjukkan aktivitas inhibisi enzim α -amilase paling besar adalah fraksi etil asetat karena adanya komponen senyawa flavonoid yang berperan penting terhadap penghambatan enzim α -amilase.

DAFTAR PUSTAKA

1. International Diabetes Federation. International Diabetes Federation (IDF) Atlas 10th edition. 10th ed. Diabetes Research and Clinical Practice. 2021.
2. Kementerian Kesehatan RI. Lindungi Keluarga Dari Diabetes. Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2018. 2018.
3. Padang A, Tarigan M, Amelia R. Hambatan Pengelolaan Kadar Gula Darah Pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2. *J Telenursing*. 2015;4(2):495-504.
4. Rofikoh, Handayani S, Suraya I. Determinan Kejadian Diabetes Melitus Tipe 2 di Posbindu Mawar Kuning Gambir. *ARKESMAS (Arsip Kesehat Masyarakat)*. 2020;5(1):42-8.
5. Santoso I, Simanjuntak P, Rahmianar. Identifikasi Senyawa β -Sitosterol dari Ekstrak n-heksan Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dan Uji Penghambatan Enzim α -Glukosidase. *J Ilmu Kefarmasian Indones*. 2017;15(2):223-7.
6. Fitrianiingsih P, Maulana IT, Choesrina R, Aprilliani R. Uji Aktivitas Penghambatan Alfa Amilase Ekstrak Daun Tithonia Diversifolia Secara In Vitro. *Pros SNaPP Kesehat*. 2016;6(1):108-15.
7. Pratama Y, Sarjono PR, Mulyani NS. Skrining Metabolit Sekunder Bakteri Endofit yang Berfungsi sebagai Antidiabetes dari Daun Mimba (*Azadirachta Indica*). *J Kim Sains dan Apl*. 2015;18(2):73-8.
8. Hasimun P, Adnyana I, Valentina R, Lisnasari E. Potential Alpha-glucosidase Inhibitor from Selected Zingiberaceae Family. *Asian J Pharm Clin Res*. 2016;9(1):164-70.
9. Kasole R, Martin HD, Kimiywe J. Traditional medicine and its role in the management of diabetes mellitus: "patients" and herbalists' perspectives." *Hindawi Evidence-based Complement Altern Med*. 2019;1-12.
10. Madhukar DS, Vasant HM, Shivaji GP, Kailas IS, Dnyaneshwar JM, Laxman GK. Review on Herbal Medicines Used in Treatment of Antidiabetic. *World J Pharm Pharm Sci*. 2022;11(8):165-77.
11. Singh P, Dongre PN. A Review on Medicinal Applications of *Azadirachta Indica* or *Neem*. *Int J Sci Res Eng Trends*. 2022;8(1):230-3.
12. Suarantika F. Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi dari Tanaman Mimba (*Azadirachta indica* A.). *Bunga Rampai (b Chapter) Progr Stud Farm*. 2022;2(1):45-53.
13. Itelima JU, Nwokedi VC, Ogbonna AI, Nyam MA. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity Evaluation of Aqueous and Ethanolic Extracts of The Leaf of *Azadirachta indica* Juss (neem) on Some Microorganisms. *World J Microbiol*. 2016;3(1):56-60.
14. Kazeem MI, Dansu T V., Adeola SA. Inhibitory Effect of *Azadirachta indica* A. Juss Leaf Extract on The Activities of α -Amylase and α -Glucosidase. *Pakistan J Biol Sci*. 2013;16(21):1358-62.
15. Christian EO, Felicia EC, Helen IN, Nneka S V, Vivian CU, Ogochukwu AP. Antidiabetic Property and Antioxidant Potentials of Ethanol Extract of *Azadirachta Indica* Leaf in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Med Plants Stud*. 2019;7(6):18-23.
16. Sakti AS, Widyastanto H, Maulidina A, Mitasari D, Eriyani DS, Mun'im A. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Methanol Extract Fractions of Various Indonesian Ethnopharmacological Plants. *Int J Appl Pharm*. 2020;12(1):43-6.
17. Shaikh JR, Patil M. Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *Int J Chem Stud*. 2020;8(2):603-8.
18. Roghini R, Vijayalakshmi K. Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Flavonoids and Minerals in Ethanolic Extract of Citrus Paradisi. *IJPSR Int J Pharm Sci Res*. 2018;9(11):4859-64.
19. Devi S, Rahmah M, Novianty R. Analisis Uji Infusa Buah Petai Cina, Daun Keji Beling dan Daun Tempuyung Sebagai Inhibitor Enzim α -amilase dan α -glukosidase. *J Ris Kim*. 2019;10(1):44-50.

20. Pambudi DB, Fajriyah NN, Maharisti RA. Test of α -Amylase Inhibition Activity in Ethanol Extract of Fennel Leaves (*Foeniculum vulgare* Mill.) Using Elisa Reader. *Urecol Journal Part C Heal Sci*. 2021;1(1):1-7.
21. Sari YS, Hidayati E, Sudarma IM. Uji Efektivitas Antifungi Ekstrak Biji Mimba (*Azadirachta indica*) Terhadap *Trichophyton mentagrophytes* Secara *In Vitro*. *BIOMA*. 2022;18(1):1-7.
22. Badriyah L, Farihah DA. Analisis ekstraksi kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) menggunakan metode maserasi. *J Sint Penelit Sains, Terap dan Anal*. 2022;3(1):30-7.
23. Anjaswati D, Pratimasari D, Nirwana AP. Perbandingan Rendemen Ekstrak Etanol, Fraksi n- Heksana, Etil Asetat, dan Air Daun Bit (*Beta vulgaris* L.) Menggunakan Fraksinasi Bertingkat. *J Stikes Nas*. 2021;1(1):1-6.
24. Hossain MA, Al-Toubi WAS, Weli AM, Al-Riyami QA, Al-Sabahi JN. Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. *J Taibah Univ Sci [Internet]*. 2013;7(4):181-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2013.05.003>
25. Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A, Cahill DM, Barrow CJ, Sehgal R, et al. Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Front Plant Sci*. 2017;8:1-13.
26. Spradlin JN, Hu X, Ward CC, Brittain SM, Jones MD, Ou L, et al. Harnessing the anti-cancer natural product nimbolide for targeted protein degradation. *Nat Chem Biol [Internet]*. 2019;15:747-755. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41589-019-0304-8>
27. Putri FE, Diharmi A, Karnila R. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Pada Rumput Laut Cokelat (*Sargassum plagyophyllum*) Dengan Metode Fraksinasi. *J Teknol dan Ind Pertan Indones*. 2023;15(1):41-6.
28. Falana MB, Nurudeen QO. Analysis of secondary metabolites and in vitro evaluation of extracts of *Carica papaya* and *Azadirachta indica* leaves on selected human pathogens. *Not Sci Biol*. 2020;12(1):57-73.
29. Vergallo C, Panzarini E, Dini L. High performance liquid chromatographic profiling of antioxidant and antidiabetic flavonoids purified from *Azadirachta indica* (neem) leaf ethanolic extract. *DE GRUYTER*. 2019;91(10):1631-40.
30. Yanuarti R, Nurjanah, Anwar E, Hidayat T. Profil Fenolik Dan Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Rumput *Turbinaria conoides* dan *Eucheuma cottonii*. *JPHPL*. 2017;20(2):230-7.
31. Parwata IMO. Bahan Ajar Kimia Organik Bahan Alam: Flavonoid. Denpasar: Universitas Udayana; 2014.
32. Prayoga DGE, Nociantri KA, Puspawati NN. Antioksidan Ekstrak Kasar Daun Pepe (*Gymnema reticulatum* Br.) Pada Berbagai Jenis Pelarut. *J Ilmu dan Teknol Pangan*. 2019;8(2):111-21.
33. Madhavan A. Phytochemicals analysis and GC - MS analysis of identification and characterization of bioactive compounds present in methanolic leaf extract *Azadirachta indica*. *Int J Pharm Sci Drug Anal*. 2021;1(1):39-50.
34. Santi IW, Radjasa OK, Widowati I. Potensi Rumput Laut *Sargassum duplicatum* Sebagai Sumber Senyawa Antifouling. *J Mar Res*. 2014;3(3):274-84.
35. Wirasti W, Lestari T, Isyti'aroh I. Penghambatan Ekstrak Daun Kremah (*Alternanthera sessilis*) Terhadap Enzim α -amilase secara *In-Vitro*. *Pharmacol J Farm Indones*. 2021;18(1):68-74.
36. Kusumo DW, Efendi YN, Kintoko, Yuliana TP, Waznah U, Muldiyana T, et al. The Effects of Kaliputih Traditional Herbs on Fasting Blood Glucose Levels, SOD, HbA1c, Histopathology Pancreatic in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Ilmu Kefarmasian Indones*. 2023;21(1):9-16.
37. Kato CG, Gonçalves G de A, Peralta RA, Seixas FAV, Sá-Nakanishi AB de, Bracht L, et al. Inhibition of α -Amylases by Condensed and Hydrolysable Tannins: Focus on Kinetics and Hypoglycemic Actions. *Hindawi Enzym Res*. 2017;1-12.
38. Budianto NE, Hairullah. (*Solanum melongena* L) terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Sukrosa. *J Ilm Kedokt Wijaya Kusuma*. 2017;6(2):14-20.
39. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Tomé SM, Eduardo F, Oliveira T, et al. Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic α -amylase towards a structure - activity relationship structure - activity relationship. *J Enzyme Inhib Med Chem [Internet]*. 2019;34(1):577-88. Available from: <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1558221>
40. Hanani E, Handinata T, Dwinita V, Hanif A. Analisis Fitokimia. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2016.
41. Alfiani LA. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -amilase oleh Ekstrak Herba Ciplukan (*Physalis Angulate* L) Secara *In Vitro*. *J Ilm Wahana Pendidik*. 2022;8(15):335-46.
42. Xu W, Shao R, Xiao J. Critical Reviews: Is There Consistency between the Binding Affinity and Inhibitory Potential of Natural Polyphenols as α -amylase Inhibitors? *Food Sci Nutr*. 2015;56(10):1630-9.
43. Ponnusamy S, Haldar S, Mulani F, Zinjarde S, Thulasiram H, RaviKumar A. Gedunin and Azadiradione: Human Pancreatic Alpha-Amylase Inhibiting Limonoids from Neem (*Azadirachta indica*) as Anti-Diabetic Agents. *PLoS One*. 2015;10(10):1-19.
44. Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules*. 2017;22(7):2-46.