

BAB V PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk memahami seberapa besar kemampuan enzim α -glukosidase bekerja pada simplisia kering sambiloto (*Andrographis paniculata*), dengan cara pengukuran menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Penghambatan enzim α -glukosidase perlu dikaji lebih lanjut karena enzim ini bertugas dalam proses mengubah karbohidrat menjadi glukosa di dalam usus kecil. Jika aktivitas enzim ini terhambat, proses penyerapan glukosa ke dalam darah akan lebih lambat, sehingga membantu mengontrol kadar gula darah, terutama dalam mencegah kenaikan gula darah setelah makan pada penderita diabetes melitus tipe 2. Pada pembahasan penelitian ini difokuskan pada hasil validasi metode, pola peningkatan % inhibisi berdasarkan konsentrasi, nilai IC50, faktor yang mempengaruhi hasil penelitian, serta potensi sampel sambiloto sebagai obat bahan alam antidiabetes.

Salah satu pendekatan terapi diabetes melitus tipe 2 adalah dengan cara menghambat enzim α -glukosidase menggunakan inhibitor seperti akarbosa. Namun, penggunaan inhibitor sintetik dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek samping gangguan saluran cerna. Oleh karena itu, penggunaan inhibitor alami dari tanaman obat menjadi alternatif yang terus dikembangkan dan telah banyak digunakan oleh masyarakat. Contohnya seperti tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*), tanaman ini memiliki beberapa zat kimia seperti *andrographolide*, flavonoid, dan senyawa fenolik yang bisa membantu mencegah penyakit diabetes. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak sambiloto bisa membantu mengurangi jumlah gula dalam darah dan memperlambat kerja enzim-enzim yang terlibat dalam proses metabolisme karbohidrat. Mekanisme kerja penghambatan enzim α -glukosidase dengan cara menghidrolisis oligosakarida, disakarida, dan polisakarida menjadi monosakarida berupa glukosa yang kemudian diserap ke dalam darah. Ketika aktivitas enzim ini dihambat, proses pemecahan karbohidrat kompleks menjadi glukosa berlangsung lebih lambat. Akibatnya pembentukan glukosa di usus tertunda sehingga penyerapan glukosa ke dalam darah menjadi lebih perlahan.

Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yang ditunjukkan oleh simplisia kering sambiloto tidak hanya dipengaruhi oleh satu senyawa aktif, tetapi

merupakan hasil kerja berbagai metabolit sekunder yang terkandung di dalam tanaman sambiloto. Senyawa utama yang paling banyak diteliti adalah *Andrographolide*, yaitu diterpene lakton yang menjadi penanda sambiloto. Selain *Andrographolide*, sambiloto juga mengandung *deoksiandrographolide* dan *neoandrographolide*, yang termasuk golongan diterpene lakton. Kedua senyawa tersebut juga memiliki aktivitas antihiperglikemia dan antidiabetes. Sambiloto juga mengandung flavonoid dan polifenol, yang berperan sebagai antioksidan alami. Yang mampu menangkap radikal bebas, menghambat peroksidasi lipid, serta mengurangi kerusakan pada sel β pancreas. Selain itu, beberapa flavonoid juga memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Senyawa metabolit sekunder lainnya, seperti tanin, saponin, dan alkaloid juga berperan dalam efek antidiabetes sambiloto. Tanin dapat membentuk kompleks dengan protein, termasuk enzim pencernaan. Saponin mampu meningkatkan pemanfaatan glukosa oleh jaringan dan membantu memperbaiki metabolisme glukosa, sedangkan alkaloid memiliki aktivitas antioksidan dan berpotensi meningkatkan sensitivitas insulin.

Dalam hasil penelitian sebelumnya oleh Like Efriani dkk. Pada ekstrak daun mangrove juga menunjukkan adanya aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yang ditandai dengan semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin baik aktivitas inhibisinya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa adanya hubungan antara konsentrasi senyawa aktif dengan peningkatan aktivitas penghambatan enzim. Penelitian ini memiliki persamaan dengan penelitian tersebut, yaitu sama-sama menguji aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Dan perbedaannya terletak pada jenis sampel yang digunakan. Perbedaan ini dapat mempengaruhi hasil karena ekstrak umumnya memiliki konsentrasi senyawa aktif yang lebih tinggi dibandingkan simplisia. Namun, penggunaan simplisia kering memiliki keunggulan karena lebih sederhana, ekonomis, dan lebih mudah diaplikasikan sebagai bahan baku herbal. Adanya penelitian ini, dapat diketahui apakah simplisia kering sambiloto tetap memiliki aktivitas penghambatan yang baik meskipun tidak dilakukan ekstraksi.

Pada penelitian ini digunakan metode spektrofotometri UV-Vis untuk menguji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase pada simplisia kering sambiloto. Metode ini dipilih karena memiliki sensitivitas yang baik, pengerjaannya relatif sederhana, serta sering digunakan dalam pengujian aktivitas inhibitor enzim

α-glukosidase. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis yaitu diawali dari sumber cahaya yang akan menghasilkan sinar ultraviolet dan *visible*. Cahaya tersebut kemudian akan melewati monokromator yang berfungsi memilih panjang gelombang 405 nm. Setelah itu, cahaya diteruskan ke kuvet yang berisi larutan sampel. Kemudian sebagian cahaya akan diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan dan sebagian lainnya diteruskan. Besarnya cahaya inilah yang dinamakan absorbansi. Cahaya yang diteruskan kemudian ditangkap oleh detektor dan diubah menjadi sinyal listrik yang selanjutnya akan dibaca oleh sistem read out dan ditampilkan sebagai nilai absorbansi pada layar spektrofotometer.

Pada penelitian ini, alat spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur absorbansi senyawa p-nitrofenol hasil hidrolisis substrat pNPG oleh enzim *α-glukosidase*. Senyawa p-nitrofenol menghasilkan warna kuning sehingga dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 405 nm. Jika simplisia sampiloto mampu menghambat aktivitas enzim *α-glukosidase*, maka pembentukan p-nitrofenol menjadi lebih sedikit sehingga nilai absorbansi menurun. Kemudian pengujian enzim *α-glukosidase* pada metode ini yaitu mengukur hasil reaksi hidrolisis substrat pNPG oleh enzim *α-glukosidase*. Semakin tinggi absorbansi yang terbentuk menunjukkan aktivitas enzim yang semakin besar. Pada penelitian ini juga dilakukan pembuatan beberapa reagen diantaranya, buffer fosfat, larutan substrat pNPG, larutan enzim *α-glukosidase*, larutan akarbosa, dan larutan natrium karbonat (Na_2CO_3).

Buffer fosfat digunakan untuk mempertahankan kestabilan pH selama proses reaksi enzim berlangsung. Penggunaan buffer ini sangat penting karena enzim *α-glukosidase* memiliki aktivitas optimum pada pH 6,8. Karena jika pH larutan berubah terlalu jauh dari kondisi optimum, maka struktur enzim dapat berubah sehingga aktivitas katalisisnya menurun. Pemilihan buffer fosfat pH 6,8 juga didasarkan karena buffer ini memiliki kestabilan yang baik dan sering digunakan pada pengujian aktivitas enzim. Dengan demikian, penggunaan buffer fosfat bertujuan agar aktivitas enzim tetap optimal sehingga hasil pengukuran absorbansi menjadi lebih akurat.

Substrat p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (pNPG) merupakan substrat sintetik yang sering digunakan dalam pengujian aktivitas enzim *α-glukosidase*. Substrat ini dipilih karena memiliki struktur yang menyerupai substrat alami dari enzim *α-glukosidase*. Enzim *α-glukosidase* akan menghidrolisis ikatan glikosidik α

pada molekul pNPG sehingga menghasilkan dua produk yaitu D-glukosa dan p-nitrofenol. Kemudian ditambah natrium karbonat untuk menciptakan suasana basa. Dalam kondisi basa, p-nitrofenol mengalami proses deprotonasi membentuk ion p-nitrofenolat yang berwarna kuning. Warna kuning yang muncul kemudian diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis, sehingga dapat diketahui aktivitas enzim berdasarkan nilai absorbansi yang terbaca. Penggunaan pNPG dipilih karena sensitif dan memudahkan pengamatan hasil reaksi secara kuantitatif. Dengan demikian, penggunaan substrat pNPG bisa membantu mengetahui kemampuan simplisia sambiloto dalam menghambat enzim α -glukosidase.

Larutan enzim α -glukosidase berfungsi menghidrolisis substrat pNPG menjadi p-nitrofenol dan glukosa. Aktivitas enzim inilah yang akan diamati selama proses penelitian. Larutan enzim sangat sensitif terhadap perubahan suhu dan pH sehingga proses preparasi harus dilakukan dengan hati-hati. Jika enzim mengalami kerusakan atau denaturasi, maka aktivitas katalisisnya akan menurun. Oleh karena itu, pembuatan larutan enzim ini dibuat secara segar.

Natrium karbonat (Na_2CO_3) digunakan sebagai larutan penghenti reaksi yang penambahannya dilakukan setelah proses inkubasi selesai agar reaksi enzim tidak terus berlangsung. Karena jika dibiarkan, maka hasil absorbansi dapat berubah. Selain itu natrium karbonat ini juga membantu memperjelas warna kuning dari senyawa p-nitrofenol sehingga pembacaan absorbansi menjadi lebih maksimal. Dengan demikian penggunaan Na_2CO_3 bertujuan untuk menjaga kestabilan hasil pengukuran absorbansi.

Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan obat oral antidiabetes golongan inhibitor α -glukosidase yang telah digunakan dalam terapi diabetes melitus tipe 2. Penggunaan akarbosa bertujuan sebagai pembanding aktivitas inhibisi simplisia sambiloto. Dengan adanya kontrol positif, maka kemampuan penghambatan sampel dapat dibandingkan dengan inhibitor standar yang sudah diketahui efektivitasnya. Semakin mendekati aktivitas akarbosa, maka aktivitas inhibisi sampel dapat dikatakan semakin baik.

Pada penelitian ini tahap pertama dilakukan dengan melakukan determinasi terhadap simplisia sambiloto (*Andrographis paniculata*) kering yang bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar-benar merupakan sambiloto sehingga tidak terjadi kesalahan identifikasi bahan. Proses determinasi ini dilakukan karena setiap tanaman memiliki kandungan metabolit

sekunder yang berbeda. Jika terjadi kesalahan identifikasi tanaman, maka hasil aktivitas inhibisi yang diperoleh dapat berbeda dari yang sudah ditentukan. Dengan demikian determinasi dilakukan untuk menjamin keaslian sampel dan meningkatkan validitas penelitian. Kemudian sampel dilakukan preparasi dengan cara sampel simplisia sambiloto kering ditimbang sebanyak 100 gram dengan perbandingan 1:20, perbandingan ini digunakan untuk memberikan jumlah pelarut yang cukup dalam proses penyarian sehingga senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia dapat terekstraksi lebih optimal. Volume pelarut yang memadai memungkinkan seluruh bagian simplisia terendam dengan baik dan memperbesar kontak antara pelarut dengan matriks bahan sehingga difusi senyawa aktif berlangsung lebih efektif. Penggunaan simplisia kering ini, karena simplisia kering memiliki kadar air yang rendah sehingga stabil selama penyimpanan, mengurangi risiko pertumbuhan mikroorganisme, serta menghambat aktivitas enzim yang dapat menyebabkan degradasi senyawa aktif.

Setelah itu sampel dilakukan perebusan (dekotasi) selama 30 menit dengan suhu 90-98 °C yang dimana proses dekoktasi ini bertujuan untuk menarik senyawa aktif yang larut dalam air. Selama proses pemanasan dinding sel tanaman akan mengalami kerusakan sehingga senyawa aktif lebih mudah keluar dalam pelarut. Suhu dan waktu pemanasan juga perlu diperhatikan karena pemanasan terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan beberapa senyawa aktif yang sensitif terhadap panas. Pada proses dekoktasi, penggunaan pelarut yang terlalu sedikit dapat menyebabkan penyarian tidak berlangsung sempurna karena sebagian bahan tidak terendam secara optimal dan senyawa aktif yang terlarut menjadi terbatas. Oleh karena itu, perbandingan 1:20 dipilih untuk memperoleh keseimbangan antara jumlah pelarut dan jumlah simplisia sehingga proses penyarian berlangsung secara efektif serta menghasilkan dekoktasi yang representatif untuk digunakan pada tahap pengujian aktivitas penghambatan enzim *α -glukosidase*.

Kemudian sampel dilakukan proses *freeze dry* atau pengeringan beku. Metode ini dilakukan dengan membekukan sampel terlebih dahulu kemudian dihilangkan kandungan airnya melalui proses sublimasi. Metode *freeze dry* ini dipilih karena mampu mempertahankan kandungan metabolit sekunder yang sensitif terhadap panas, seperti *andrographolide*. Jika pengeringan dilakukan dengan suhu tinggi, senyawa aktif dapat mengalami degradasi sehingga aktivitas

biologinya menurun. Selain itu, proses *freeze dry* juga berperan penting dalam menjaga kestabilan senyawa aktif pada simplisia sambiloto. Pada penelitian ini tidak digunakan metode ekstraksi dengan pelarut organik, karena tujuan penelitian bukan untuk memperoleh ekstrak dengan kadar senyawa tertentu yang terkonsentrasi, melainkan untuk mengevaluasi potensi antidiabetes dari hasil olahan air yang mendekati bentuk pemanfaatan tradisional.

Sebelum dilakukan pengujian terhadap aktivitas penghambatan enzim menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, perlu dilakukan validasi terlebih dahulu. Tujuan dari validasi metode ini adalah untuk memastikan bahwa pendekatan yang digunakan dapat menghasilkan data yang tepat, akurat, dan konsisten. Pada fase ini, dilakukan pengukuran absorbansi dari beberapa konsentrasi larutan untuk mengevaluasi hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi yang dihasilkan. Hasil dari pengukuran menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi larutan juga berkorelasi dengan peningkatan nilai absorbansi yang diperoleh. Berdasarkan hasil penelitian pada uji linearitas diperoleh rata rata absorbansi dari konsentrasi 2 ppm sebesar 0,273; 4 ppm sebesar 0,390; 6 ppm sebesar 0,570; 8 ppm sebesar 0,739; dan 10 ppm 0,877. Yang dimana rata-rata absorbansi terendah menunjukkan nilai yang lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Dan didapatkan nilai dari uji linearitas/persamaan regresi sebesar $A = 0,1023$; $B = 0,0779$ dan $r = 0,9958$, yang menunjukkan adanya hubungan yang sangat kuat antara konsentrasi dengan absorbansi. Sedangkan pada sampel didapatkan hasil rata-rata absorbansi 2 ppm sebesar 0,159; 4 ppm sebesar 0,264; 6 ppm sebesar 0,390; 8 ppm sebesar 0,460; dan 10 ppm sebesar 0,571. Dan pada uji linearitas /persamaan regresi didapatkan hasil $A = 0,0628$; $B = 0,0510$ dan $r = 0,9941$. Semakin tinggi konsentrasi larutan maka absorbansi yang dihasilkan juga semakin meningkat, nilai tersebut mendekati 1 sehingga menunjukkan linearitas yang baik. Yang dimana hal ini sesuai dengan prinsip hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa absorbansi akan meningkat seiring meningkatnya konsentrasi zat dalam larutan. Semakin banyak molekul dalam larutan maka semakin besar cahaya yang diserap sehingga nilai absorbansi meningkat.

Uji linearitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan metode dalam memberikan respon yang sebanding terhadap perubahan konsentrasi analit. Linearitas diamati melalui hubungan antara konsentrasi larutan standar dengan

nilai absorbansi seiring meningkatnya konsentrasi larutan standar, yang menunjukkan adanya hubungan yang searah antara kedua parameter tersebut. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, nilai uji linearitas/persamaan regresi pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian uji inhibisi enzim α -glukosidase pada ekstrak daun mangrove yang umumnya memiliki linearitas diatas 0,99. Persamaan ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki kualitas analisis yang baik dan mampu menghasilkan data yang konsisten. Pada sampel juga dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm, hal tersebut bertujuan untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi simplisia sambiloto terhadap aktivitas penghambatam enzim α -glukosidase. Karena jika dilakukan dalam satu konsentrasi saja tidak dapat menunjukkan hubungan antara jumlah sampel yang digunakan dengan kemampuan inhibisi yang dihasilkan. Oleh karena itu, dibuat beberapa variasi konsentrasi agar dapat diamati pola aktivitas penghambatan enzim yang terjadi pada masing-masing konsentrasi. Selain itu, penggunaan variasi konsentrasi juga bertujuan untuk memperoleh rentang data yang cukup dalam penentuan nilai IC50 yang dihitung berdasarkan hubungan antara konsentrasi sampel dengan % inhibisi yang dihasilkan. Dan juga membantu menghasilkan kurva hubungan konsentrasi dengan aktivitas inhibisi yang lebih baik.

Kemudian dilakukan juga pengujian batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ). Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan metode dalam mendeteksi dan mengukur analit pada konsentrasi tertentu. Nilai LoD yang diperoleh sebesar 0,6678 dan LoQ sebesar 2,0237. Sedangkan pada sampel didapatkan nilai LoD sebesar 15,0764 dan LoQ sebesar 45,6860. Nilai ini menunjukkan bahwa metode masih mampu mendeteksi dan mengukur analit pada konsentrasi tersebut. Nilai LoD dan LoQ dipengaruhi oleh kemampuan alat dalam mendeteksi dan kestabilan saat mengukur absorbansi. LoD menunjukkan tingkat konsentrasi minimum analit yang dapat terdeteksi oleh alat, meskipun hasil yang diperoleh belum dapat diandalkan. Sementara itu, LoQ menunjukkan tingkat konsentrasi minimum yang dapat diukur dengan akurasi yang memadai. Semakin rendah nilai LoD dan LoQ, semakin tinggi sensitivitas metode yang diaplikasikan, karena metode tersebut dapat mendeteksi analit dalam jumlah yang sangat kecil. Perbedaan nilai LoD dan LoQ standar dan sampel disebabkan oleh kompleksibilitas matriks sampel simplisia yang mengandung berbagai senyawa

metabolit sekunder sehingga respon pengukuran menjadi lebih bervariasi dibandingkan larutan standar.

Kemudian dilakukan pengujian akurasi dengan menggunakan konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm yang bertujuan untuk melihat kedekatan hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya. Penggunaan variasi konsentrasi tersebut bertujuan untuk melihat kemampuan metode dalam memberikan hasil pengukuran yang mendekati nilai sebenarnya pada rentang konsentrasi yang berbeda. Selain itu, konsentrasi 6-10 ppm merupakan rentang yang menghasilkan respon absorbansi yang cukup baik. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh % recovery pada 6 ppm sebesar 103,4615%; 8 ppm sebesar 95,5449%; dan 10 ppm sebesar 102,0769% dengan rata-rata % recovery sebesar 100,3611%, sedangkan pada sampel hasil yang didapatkan pada 6 ppm sebesar 102,5141%; 8 ppm sebesar 96,1093%; dan 10 ppm sebesar 101,4643% dengan rata-rata 100,0292%, yang dimana memenuhi syarat pada rentang 80-110%. Jika nilai *recovery* pada masing-masing konsentrasi berada dalam rentang yang memenuhi syarat, maka metode dapat dikatakan memiliki tingkat ketepatan yang baik. Tingginya nilai % *recovery* menunjukkan bahwa kehilangan analit selama proses preparasi dan pengukuran relatif kecil. Selain itu, hal ini juga menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki tingkat ketepatan yang baik karena nilai yang diperoleh mendekati nilai sebenarnya.

Kemudian dilakukan uji presisi dilakukan pada konsentrasi 6 ppm dengan 6 kali pengulangan pada hari yang berbeda. Konsentrasi 6 ppm dipilih karena berada pada konsentrasi tengah dari rentang pengujian sehingga dianggap dapat mewakili keseluruhan rentang konsentrasi. Selain itu, konsentrasi tengah umumnya menghasilkan nilai absorbansi yang stabil sehingga mempermudah pengamatan keterulangan hasil pengukuran. Pada pengujian presisi, bertujuan untuk melihat konsistensi hasil pengukuran pada konsentrasi yang sama. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil % RSD sebesar 0,42% sedangkan pada sampel didapatkan hasil 0,58%, yang dimana telah memenuhi syarat < 2%. Nilai % RSD yang kecil menunjukkan bahwa data hasil pengukuran relatif rendah sehingga hasil pengukuran memiliki keterulangan yang baik. Presisi yang memenuhi syarat menunjukkan bahwa metode mampu menghasilkan data yang konsisten meskipun dilakukan replikasi 6 kali. Hal ini dipengaruhi juga oleh proses

preparasi larutan yang teliti, penggunaan alat yang konsisten dan pengukuran yang relatif sama selama proses analisis.

Setelah melakukan validasi metode kemudian dilakukan uji sampel yaitu untuk menguji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase menggunakan beberapa variasi konsentrasi sampel simplisia kering sambiloto, yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Variasi kadar sampel dilakukan untuk melihat pengaruh peningkatan konsentrasi terhadap kemampuan penghambatan enzim α -glukosidase. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil kadar sampel sebesar 0,7967 pada 2 ppm; 0,7247 pada 4 ppm; 0,6267 pada 6 ppm; 0,5307 pada 8 ppm; dan 0,4327 pada 10 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar sampel maka nilai absorbansi semakin menurun. Penurunan absorbansi ini menunjukkan bahwa pembentukan senyawa p-nitrofenol hasil hidrolisis substrat pNPG semakin sedikit. Hal ini karena kandungan senyawa aktif pada simplisia sambiloto mulai menghambat aktivitas enzim α -glukosidase sehingga kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat jadi menurun. Senyawa *andrographolide* yang terkandung pada sambiloto diduga berperan dalam aktivitas penghambatan tersebut. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka semakin banyak senyawa aktif yang berinteraksi dengan sisi aktif enzim sehingga aktivitas inhibisi meningkat. Dalam penelitian ini enzim α -glukosidase berperan menjadi target terapi antidiabetes, yang dimana dilakukan penghambatan aktivitas enzim yang akan memperlambat pemecahan karbohidrat menjadi glukosa sehingga penyerapan glukosa berlangsung lebih lambat dan lonjakan kadar glukosa darah dapat dikendalikan. Dengan demikian, enzim α -glukosidase bukan merupakan obat antidiabetes, melainkan target kerja dalam terapi antidiabetes. Sedangkan sampel sambiloto berperan sebagai agen antidiabetes alami karena mengandung berbagai senyawa bioaktif yang mampu menghambat aktivitas enzim α -glukosidase serta memberikan efek antihiperglikemia, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai terapi alternatif pada diabetes melitus tipe 2.

Pada penelitian ini, akarbosa menunjukkan nilai absorbansi yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan sampel sambiloto. Hal tersebut dipengaruhi oleh sifat akarbosa sebagai senyawa murni dengan stabilitas yang tinggi sehingga respon pembacaan spektrofotometer menjadi lebih konsisten dibandingkan dengan sampel simplisia yang masih mengandung berbagai komponen metabolit sekunder. Selain itu, absorbansi yang tinggi pada kontrol positif tidak selalu

menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih rendah ataupun lebih tinggi secara langsung. Dan juga dipengaruhi oleh faktor-faktor kualitas sampel, antara lain umur atau usia panen tanaman, lokasi dan kondisi tempat tumbuh, jenis tanah, iklim, intensitas cahaya matahari, curah hujan, ukuran partikel simplisia, serta kondisi penyimpanan. Faktor-faktor tersebut dapat mempengaruhi kadar metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas antidiabetes. Sebelum dilakukan perhitungan % inhibisi, dilakukan koreksi absorbansi terlebih dahulu dengan cara mengurangi nilai absorbansi kontrol terhadap absorbansi blanko sehingga diperoleh nilai koreksi absorbansi kontrol sebesar 0,812. Absorbansi blanko sebesar 0,066 digunakan untuk menghilangkan pengaruh absorbansi yang berasal dari reagen atau pelarut sehingga nilai absorbansi yang diperoleh benar-benar berasal dari hasil reaksi enzim α -glukosidase. Selain itu, dilakukan juga koreksi absorbansi sampel pada masing-masing konsentrasi.

Kemudian dilakukan perhitungan nilai IC₅₀ dengan menghitung % inhibisi dari masing-masing konsentrasi. Nilai IC₅₀ ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim α -glukosidase. pada penelitian didapatkan hasil persamaan regresi $y = 0,8415x + (-0,0462)$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9969. Nilai r yang mendekati 1 menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi sampel dengan aktivitas inhibisi memiliki hubungan yang linear. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 8,03 ppm yang dimana menunjukkan bahwa simplisia sambiloto membutuhkan konsentrasi sebesar 8,03 ppm untuk menghambat 50% aktivitas enzim α -glukosidase. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin kuat aktivitas inhibisi suatu sampel. Nilai IC₅₀ yang diperoleh menunjukkan bahwa simplisia sambiloto memiliki aktivitas penghambatan yang cukup kuat. Dari data penelitian yang diperoleh % inhibisi pada konsentrasi 8 ppm sebesar 49,75% yang berarti sangat mendekati 50%. Hal ini menunjukkan bahwa hasil regresi yang diperoleh cukup baik dan konsisten. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya pada ekstrak daun mangrove, yang dimana penelitian ini menunjukkan pola yang sama yaitu semakin tinggi konsentrasi sampel maka semakin tinggi % inhibisi yang dihasilkan.

Nilai IC₅₀ yang rendah dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif pada simplisia sambiloto yang masih terjaga selama proses *freeze dry*. Setiap pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (triplo) karena bertujuan untuk meningkatkan ketelitian data yang diperoleh, pengulangan pengujian juga diperlukan karena

hasil yang diperoleh dari satu kali pengujian berpotensi dipengaruhi oleh *random error*, baik berasal dari alat, reagen, maupun faktor peneliti selama proses analisis. Dengan melakukan pengujian 3 kali replikasi memungkinkan untuk menghitung nilai rata-rata absorbansi yang lebih mendekati kondisi sebenarnya dibandingkan jika hanya menggunakan 1 kali pengukuran. Kemudian nilai rata-rata tersebut digunakan sebagai dasar dalam perhitungan koreksi absorbansi, % inhibisi, maupun nilai IC50.

Pada penelitian ini, akarbosa tetap merupakan inhibitor α -glukosidase yang paling poten karena merupakan obat oral yang telah dilakukan pengujian secara klinis. Mekanisme kerja akarbosa terjadi melalui penghambatan secara kompetitif terhadap enzim α -glukosidase yang berada pada pembukaan *brush border* usus halus. Struktur akarbosa yang menyerupai oligosakarida mampu berikatan dengan sisi aktif enzim α -glukosidase dan bersaing dengan substrat karbohidrat. Akhirnya, substrat tidak dapat berikatan dengan enzim secara optimal sehingga proses hidrolisis karbohidrat kompleks menjadi monosakarida, terutama glukosa, menjadi lebih lambat. Perlambatan proses tersebut menyebabkan penyerapan glukosa ke dalam darah berlangsung secara bertahap sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa darah. Namun, apabila simplisia sambiloto menghasilkan nilai IC50 yang relatif mendekati akarbosa, maka hal tersebut menunjukkan bahwa sambiloto memiliki potensi sebagai bahan alam untuk terapi antidiabetes. Walaupun aktivitasnya mungkin belum setara dengan akarbosa, keunggulan sambiloto terletak pada kandungan berbagai senyawa bioaktif.

Meskipun akarbosa telah terbukti efektif sebagai inhibitor enzim α -glukosidase dalam terapi diabetes melitus tipe 2, penggunaannya masih memiliki beberapa keterbatasan. Salah satu keterbatasan utama adalah efek samping pada saluran pencernaan seperti flatulensi, kembung, nyeri abdomen dan diare. Selain itu, penggunaan akarbosa secara terus menerus dapat meningkatkan beban biaya pengobatan serta berpotensi menurunkan kepatuhan pasien yang muncul mengganggu aktivitas sehari-hari. Oleh karena itu, sambiloto dapat dipertimbangkan sebagai terapi alternatif antidiabetes.

Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya pada ekstrak daun mangrove, nilai IC50 penelitian ini tergolong cukup baik. Persamaan tersebut menunjukkan bahwa peningkatan jumlah senyawa aktif berpengaruh terhadap kemampuan penghambatan enzim, adapun perbedaan nilai IC50 dapat

dipengaruhi oleh jenis pelarut, metode ekstraksi, kadar metabolit sekunder, serta kondisi pengujian enzim. Beberapa faktor dapat mempengaruhi hasil penelitian, yang pertama adalah kualitas bahan simplisia. Kandungan senyawa metabolit sekunder pada sambiloto dapat dipengaruhi oleh umur tanaman, kondisi lingkungan, lokasi tumbuh, dan waktu panen. Faktor kedua adalah proses pengeringan sampel, suhu pengeringan yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan senyawa aktif sehingga aktivitas inhibisi menurun. Faktor berikutnya adalah ketelitian selama proses penelitian, seperti saat menimbang, membuat larutan, dan menggunakan mikropipet. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa simplisia kering sambiloto memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase yang cukup kuat. Dan menunjukkan bahwa sambiloto berpotensi dikembangkan sebagai bahan alami dalam antidiabetes. Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan adanya pola peningkatan % inhibisi seiring meningkatnya konsentrasi simplisia serta nilai IC₅₀ yang cukup rendah.