



## Test of $\alpha$ -Amylase Inhibition Activity in Ethanol Extract of Fennel Leaves (*Foeniculum vulgare Mill.*) Using Elisa Reader

Dwi Bagus Pambudi<sup>1</sup>✉, Nuniek Nizmah Fajriyah<sup>2</sup>, Retno Aulia Maharisti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan, Indonesia

<sup>2</sup> Department of Nursing, Universitas Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan, Indonesia

✉ dwibagus589@umpp.ac.id

doi <https://doi.org/10.53017/ujhs.1>

Received: 12/02/2021

Revised: 26/02/2021

Accepted: 28/02/2021

### Abstract

Fennel has been cultivated in Indonesia as a spice and medicinal plant. Fennel can produce fennel oil, which is the result of distillation from dry and ripe fennel fruit powder, while fennel leaves are mainly cooked to make vegetables. The  $\alpha$ -amylase enzyme plays an important role in the breakdown of oligosaccharides and disaccharides into monosaccharides so that they are ready for absorption. Inhibition of the  $\alpha$ -amylase enzyme can delay and prolong the digestion time of carbohydrates, causing a decrease in the rate of glucose absorption and preventing an increase in postprandial plasma glucose levels. Therefore, this study aims to investigate the ethanol extract of fennel leaves (*Foeniculum vulgare Mill.*) Against the inhibitory activity of the  $\alpha$ -amylase enzyme using Elisa Reader. The experimental research method was applied to test the ethanol extract of secondary metabolite compounds from fennel leaves against the inhibition of  $\alpha$ -amylase enzyme activity. The results showed that the  $IC_{50}$  value in the fennel leaf extract was 1.432  $\mu\text{g/mL}$  while the  $IC_{50}$  acarbose as a comparison was 3.340  $\mu\text{g/mL}$ . In conclusion, the ethanol extract of fennel leaves can be used to reduce blood sugar levels.

Keywords:  $\alpha$ -amylase enzyme; Fennel leaves; Glucose reduction

## Uji Aktivitas Penghambatan $\alpha$ -Amilase dalam Ekstrak Etanol Daun Adas (*Foeniculum vulgare Mill.*) Menggunakan Elisa Reader

### Abstrak

Adas telah dibudidayakan di Indonesia sebagai tanaman bumbu dan tanaman obat. Adas dapat menghasilkan minyak adas, yang merupakan hasil penyulingan dari serbuk buah adas yang kering dan masak, sedangkan daun adas lebih banyak dimasak untuk dijadikan sayur. Salah satu enzim yang berperan penting dalam pemecahan oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida sehingga siap untuk diabsorpsi adalah enzim  $\alpha$ -amilase. Penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dapat menunda dan memperlama waktu cerna karbohidrat, menyebabkan penurunan laju absorbs glukosa dan mencegah peningkatan kadar plasma glukosa postprandial. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare Mill.*) memiliki aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase menggunakan Elisa Reader. Metode penelitian eksperimental diterapkan untuk menguji ekstrak etanol senyawa metabolit sekunder dari daun adas terhadap penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai  $IC_{50}$  pada ekstrak daun adas sebesar 1.432  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan  $IC_{50}$  akarbose sebagai pembanding sebesar 3.340  $\mu\text{g/mL}$ . Sebagai kesimpulan, bahwa ekstrak etanol daun adas dapat digunakan dalam menurunkan kadar gula dalam darah.

Kata-kata kunci: Enzim  $\alpha$ -amilase; Daun Adas; Penurunan glukosa

## 1. Pendahuluan

Salah satu enzim yang berperan penting dalam pemecahan oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida sehingga siap untuk diabsorpsi adalah enzim  $\alpha$ -amilase. Penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dapat menunda dan memperlama waktu cerna karbohidrat, menyebabkan penurunan laju absorpsi glukosa dan mencegah peningkatan kadar plasma glukosa postprandial. Inhibitor  $\alpha$ -amilase dapat dikatakan sebagai senyawa yang dapat menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase yang berperan dalam memecah pati menjadi maltosa atau glukosa konfigurasi alfa [1]. Enzim  $\alpha$ -glukosidase dan enzim  $\alpha$ -amilase merupakan enzim penghambat diabetes mellitus.

Komplikasi utama jangka panjang penyakit diabetes mellitus ditandai dengan rusaknya pembuluh darah. Penderita diabetes dua kali lebih beresiko terkena penyakit kardiovaskular [2] dan sekitar 75% kematian akibat diabetes disebabkan oleh penyakit jantung coroner [3].

Indonesia sebagai negara agraris memiliki potensi tumbuhan herbal untuk digunakan sebagai pengobatan penyakit diabetes mellitus. Potensi alam perlu dimanfaatkan oleh masyarakat guna dalam rangka menemukan jalur pengobatan mandiri sehingga dibutuhkan bekal pemahaman terkait tumbuhan obat [4].

Tanaman adas telah dibudidayakan di Indonesia sebagai tanaman bumbu dan tanaman obat. Adas dapat menghasilkan minyak adas, yang merupakan hasil penyulingan dari serbuk buah adas yang kering dan masak, sedangkan daun adas lebih banyak dimasak untuk dijadikan sayur. Minyak atsiri yang terkandung dalam biji adas adalah salah satu senyawa aktif bahan dasar pembuatan obat, selain itu minyak atsiri adas dapat dijadikan sebagai bahan baku industri minyak telom. Aroma wangi yang dihasilkan digunakan sebagai bahan yang memperbaiki rasa, mengharumkan ramuan obat serta makanan [5].

Beberapa jenis bahan alam diketahui memiliki aktivitas sebagai enzim  $\alpha$ -amilase inhibitor yaitu pada ekstrak air kulit buah dan biji okra (*Abelmoscus esculentus* (L.) Moench), ekstrak etanol oat, beras, dan gandum, ekstrak methanol *Cinnamomum zeylanicum*, *Artocarpus altilis*, *Piper betel*, dan *Artocarpus heterophyllus*, ekstrak air daun Tamarindus indica, ekstrak air batang dan akar Catharanthus roseus dan Caesalpinia bonducella [6]. Berdasarkan penelitian di atas, maka perlu dilakukan penelitian terkait tanaman adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) terhadap aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase.

## 2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang mengujikan ekstrak etanol senyawa metabolit sekunder dari daun adas terhadap penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase.

### 2.1. Variabel penelitian

Dalam penelitian ini terdapat 3 macam variabel, yaitu: (1) variabel dependen berupa persentase penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase, variabel independent berupa seri konsentrasi daun adas, dan variabel kendali berupa suhu, pH, dan waktu inkubasi.

### 2.2. Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah grinder, ayakan mesh, wadah kaca, pompa vakum, erlenmeyer, beaker glass, batang pengaduk, gelas ukur, rotary evaporator, cawan porselin, waterbath, timbangan analitik, chamber, pipet tetes,

mikropipet, *hot plate-stirrer*, pH meter, inkubator, *microplate*, *microplate reader*, autoklaf, pipet mikro, dan ELISA reader.

### 2.3. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun adas, etanol 96%, aqua DM, enzim  $\alpha$ -amilase, substratamilum (*starch soluble*), dimetil sulfoksida (DMSO), bovine serum albumin (BSA), serbuk akarbosa, natrium karbonat, kalium dihidrogenfosfat, aqua demineralisata (aqua DM), sodium fosfat, asam dinitrosalisilat (DNS).

### 2.4. Penyiapan simplisia

Daun adas dicuci hingga bersih dari semua komponen lain dengan air yang mengalir, kemudian dikeringkan dan dibuat serbuk menggunakan grinder. Simplisia diayak menggunakan ayakan mesh untuk memastikan bahwa serbuk simplisia sudah berukuran homogen.

Proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi selama 1 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Maserat disaring menggunakan vakum buchner, dan kemudian proses maserasi diulang hingga maserat berwarna bening. Selanjutnya maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga mendapatkan ekstrak kental.

### 2.5. Penyiapan larutan

Dalam studi ini, penyiapan larutan dilakukan dalam tujuh langkah, sebagaimana disajikan pada [Tabel 1](#).

**Tabel 1.** Penyiapan larutan

No	Langkah penyiapan larutan	Deskripsi
1.	Pembuatan larutan dapar fosfat pH 6,9	Larutan dapar fosfat pH 6,9 dibuat dengan mencampurkan 245 mL larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ dan 255 mL larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , kemudian diukur pH menggunakan pH meter. Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ dibuat dengan menimbang 15,84 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ dan dilarutkan dalam 600 mL aqua DM. Sedangkan larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ dibuat dengan menimbang 6,90 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ dan dilarutkan dalam 500 mL aqua DM.
2.	Pembuatan larutan NaOH 2 M	Larutan NaOH 2 M dibuat dengan menimbang 2 gr NaOH dan dilarutkan dalam 25 mL aqua DM.
3.	Pembuatan larutan reagen DNS	Larutan reagen DNS dibuat dengan mencampurkan larutan K.Na tartrat dan larutan DNS. Larutan K.Na tartrat dibuat dengan menimbang 30 gr K.Na tartrat yang dilarutkan dalam 20 mL NaOH dengan pemanasan hingga larut.
4.	Pembuatan larutan enzim $\alpha$ -amilase	Larutan enzim $\alpha$ -amilase dibuat dengan menimbang 20 mg enzim $\alpha$ -amilase dan dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,9 sehingga mendapatkan konsentrasi 20 U/mL.
5.	Pembuatan larutan substrat pati 1%	Larutan substrat dibuat dengan menimbang 0,1 gr pati dan dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,9 dengan dipanaskan selama 5 hingga 10 menit hingga larut.
6.	Larutan ekstrak daun adas	Larutan ekstrak daun adas dibuat dengan menimbang 100 mg ekstrak, kemudian dilarutkan dalam 10 mL DMSO hingga homogen dan menjadi larutan stok dengan konsentrasi 10000 ppm. Selanjutnya diencerkan menjadi seri konsentrasi 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 100 ppm dengan menggunakan DMSO.
7.	Larutan akarbosa	Larutan akarbosa dibuat dengan menimbang 100 mg serbuk tablet oral akarbosa, kemudian dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 6,9 hingga homogen dan menjadi larutan stok dengan konsentrasi 10000 ppm. Selanjutnya diencerkan menjadi seri konsentrasi 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 100 ppm dengan menggunakan dapar fosfat pH 6,9.

## 2.6. Inhibisi aktivitas enzim $\alpha$ -amylase

Pengujian penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase menggunakan metode DNS dengan menentukan tingkat hidrolisis pati. Pengujian dilakukan dengan menyiapkan 1  $\mu$ L masing-masing sampel yang dimasukkan ke dalam *tube*, kemudian ditambahkan 49  $\mu$ L dapar fosfat dengan pH 6,9 dan larutan pati 1% 25  $\mu$ L. Kemudian diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 25°C. Selanjutnya sebanyak 25  $\mu$ L larutan enzim 0,15 U/mL dan diinkubasi kembali pada suhu 25°C selama 10 menit. Reaksi kemudian dihentikan dengan penambahan 100  $\mu$ L pereaksi DNS. Kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 5 menit dan didinginkan hingga mencapai suhu ruangan. Selanjutnya campuran reaksi dilakukan pengenceran dengan 1 mL air suling (*aquades*) dan diabsorbansi pada  $\lambda$  540 nm. Kontrol disiapkan menggunakan prosedur yang sama, dengan menggantikan ekstrak dengan *aquades* [7].

## 2.7. Pengolahan dan analisis data

Analisis data dilakukandengan memperoleh data pada uji antidiabetes adalah nilai % penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$  glukosidase dan enzim  $\alpha$  amylase. Regresi linier antara konsentrasi vs % penghambatan dibuat dengan persamaan regresi linier  $y = bx + a$ . Nilai probit 50% penghambatan enzim di masukkan ke dalam persamaan hingga diperoleh nilai  $IC_{50}$  (konsentrasi penghambatan 50%).

# 3. Hasil dan Pembahasan

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun adas (*Foeniculum vulgare Mill.*). Tanaman ini didapatkan dari Desa Tolokan, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang. Tanaman disortasi untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji. Setelah itu, bagian tanaman dicuci menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran-kotoran dan mengurangi mikroba-mikroba yang melekat pada bahan. Pencucian harus segera dilakukan setelah panen karena dapat mempengaruhi mutu bahan.

Simplisia yang telah kering disortasi kembali untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lain yang tertinggal. Simplisia tersebut dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 90%. Hasil ekstraksi diuapkan agar mendapatkan ekstrak kental.

Pengujian aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase dilakukan untuk mengetahui kemampuan enzim  $\alpha$ -amylase untuk menghidrolisis pati menjadi gula sederhana. Produk akhir dari aksi  $\alpha$ -amylase adalah oligosakarida dengan panjang bervariasi serta  $\alpha$ -konfigurasi dan  $\alpha$ -limit deksrin yang terdiri dari campuran maltose, maltotriosa, dan cabang oligosakarida (6-8 unit glukosa) yang berisi ikatan  $\alpha$ -1-4 dan  $\alpha$ -1-6. Enzim  $\alpha$ -amylase inhibitor berperan untuk mengikat dan menginaktifkan enzim  $\alpha$ -amylase. Penghambatan terhadap enzim  $\alpha$ -amylase dapat menunda dan memperlama waktu cerna karbohidrat, menyebabkan penurunan laju absorpsi glukosa dan mencegah peningkatan kadar plasma glukosa postprandial.

Pengujian penghambatan  $\alpha$ -amylase dilakukan untuk mengetahui penurunan aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase dalam memecah pati. Semakin banyak maltosa yang dihasilkan dari sebuah pati artinya semakin banyak pati yang terhidrolisis menjadi maltosa dan glukosa. Prinsip pengujian adalah melihat reaksi antara maltosa dan glukosa dengan DNS (3,5-dinitrosalisilat) sehingga menghasilkan warna. Dan pemanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit untuk menghentikan reaksi karena enzim terdenaturasi. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C karena merupakan suhu untuk enzim alfa amylase bekerja. Untuk mendapatkan persamaan regresi linier maka dibuat kurva baku antara % inhibisi

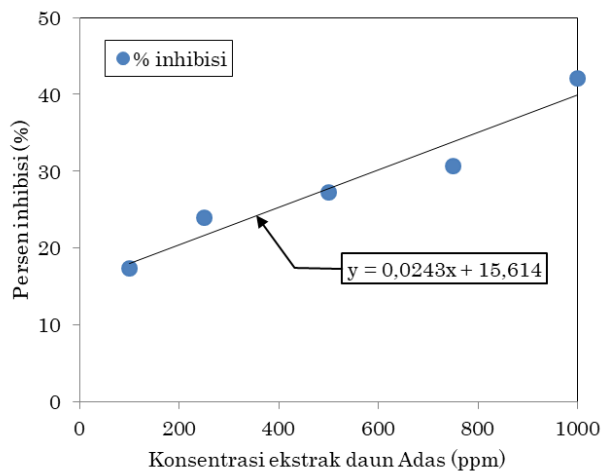
ekstrak dan juga akkarbose terhadap konsentrasi masing-masing. Berikut data terkait hasil % inhibisi ekstrak daun adas.

Dalam studi ini, hasil % inhibisi (y) ekstrak daun adas didapatkan sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** % Inhibisi ekstrak daun adas

Konsentrasi sampel (x)	S <sub>1</sub> -S <sub>0</sub>	% inhibisi (y)
100 ppm	3,642-1,987 = 1,655	17,37
250 ppm	2,753-1,230 = 1,523	23,96
500 ppm	2,642-1,184 = 1,458	27,21
750 ppm	2,363-0,974 = 1,389	30,65
1000 ppm	2,013-0,854 = 1,159	42,14

Dalam studi ini, persamaan garis linier % inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak daun adas didapatkan sebagaimana disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** % Inhibisi ekstrak daun adas  
 Persamaan regresi linier  $\rightarrow y = a + bx$ ,  
 sehingga  $a = 15,614$  dan  $b = 0,0243$ .

$$IC_{50} = \frac{50 - 15,614}{0,0243} = 1.432 \mu\text{g/mL}$$

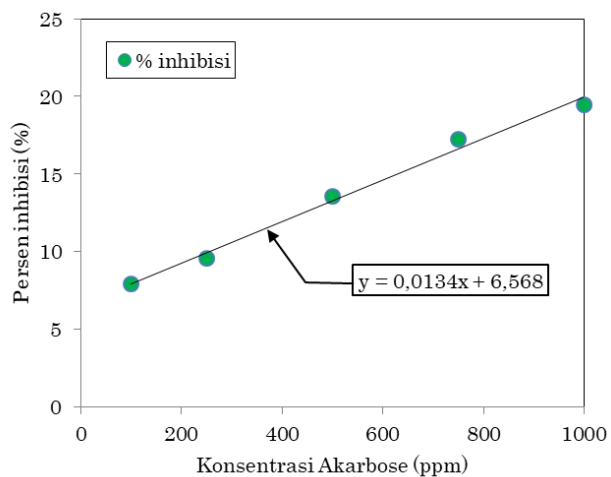
Dari persamaan regresi linier terdapat koefisien y sebagai IC<sub>50</sub>, sedangkan koefisien x pada persamaan ini adalah konsentrasi ekstrak yang akan dicari nilainya. Dimana konsentrasi ekstrak tersebut merupakan konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat 50% aktivitas enzim alfa amilase. Pada penelitian ini didapatkan bahwa nilai IC<sub>50</sub> pada ekstrak daun adas sebesar 1.432 µg/mL. Hasil ini termasuk kategori penghambatan yang relatif rendah karena dimungkinkan pada waktu perlakuan sampel pada *plate sample preparation* kurang ketelitian sehingga reaksi sampel dengan substrat tidak maksimal yang mengakibatkan nilai absorbansi sampel tidak maksimal.

Dalam studi ini, hasil % inhibisi (y) kontrol positif atau akkarbose didapatkan sebagaimana disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** % Inhibisi akkarbose

Konsentrasi KP (x)	Absorbansi	% inhibisi (y)
100 ppm	1,845	7,89
250 ppm	1,812	9,54
500 ppm	1,731	13,58
750 ppm	1,657	17,27
1000 ppm	1,613	19,47

Dalam studi ini, persamaan garis linier % inhibisi terhadap konsentrasi akarbose didapatkan sebagaimana disajikan pada **Gambar 2**. Pada penelitian ini digunakan akarbose sebagai pembanding. Akarbose merupakan obat antidiabetes yang dapat memperlambat absorpsi gula setelah makan yaitu dengan menunda hidrolisis karbohidrat, disakarida dan absorpsi glukosa; serta menghambat metabolisme sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Hasil perhitungan nilai  $IC_{50}$  pada kontrol positif sebesar  $3.340 \mu\text{g/mL}$ . Hasil ini dipengaruhi oleh karena pada waktu proses ekstraksi tablet akarbose tidak maksimal sehingga dimungkinkan larutan akarbose yang digunakan untuk pengukuran sedikit konsentrasinya karena terjadi endapan sehingga di dalam perlakuan ekstraksi tablet akarbose tidak terdispersi merata yang mengakibatkan nilai absorbansi kontrol positif ini rendah.



**Gambar 2.** Inhibisi Akarbose  
Persamaan regresi linier  $\rightarrow y = a + bx$ .  
Sehingga  $a = 6.568$  dan  $b = 0.0134$ .  
 $IC_{50} = \frac{50 - 6.568}{0.0134} = 3.340 \mu\text{g/mL}$

## 4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa nilai  $IC_{50}$  pada ekstrak daun adas sebesar  $1.432 \mu\text{g/mL}$  sedangkan  $IC_{50}$  akarbose sebagai pembanding sebesar  $3.340 \mu\text{g/mL}$ . Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak adas memiliki potensi sebagai penurun kadar gula dalam darah walaupun bukan termasuk kategori yang tinggi. Rekomendasi pada penelitian ini adalah menggunakan pembanding akarbose murni bukan menggunakan tablet akarbose agar dicapai hasil yang maksimal serta disarankan juga untuk menggunakan enzim yang lebih spesifik yakni enzim  $\alpha$ -glukosidase. Hal ini dikarenakan akarbose memiliki potensi tinggi pada mekanisme penghambatan pada enzim  $\alpha$ -glukosidase.

## Referensi

- [1] D. A. Prahesti, S. Pujiyanto, and M. G. I. Rukmi, "Isolasi, Uji Aktivitas, dan Optimasi Inhibitor  $\alpha$ -Amilase Isolat Kapang Endofit Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia*)(Ten.) Steenis," *Jurnal Akademika Biologi*, vol. 7, no. 1, pp. 43–51, 2018.
- [2] N. Sarwar *et al.*, "Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies.," *Lancet (London, England)*, vol. 375, no. 9733, pp. 2215–2222, Jun. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.
- [3] C. W. Yancy *et al.*, "2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines," *Circulation*, vol. 128, no. 16, pp. 1810–1852, 2013.

- [4] S. Sumarmiyati and S. W. P. Rahayu, "Development potential of local traditional medicinal plants at a scale of home-based industry to support medicine and food self-sufficiency in Samarinda, East Kalimantan," in *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 2015, vol. 1, no. 2, pp. 330–336.
- [5] E. M. Kridati, E. Prihastanti, and S. Haryanti, "Rendemen Minyak Atsiri dan Diameter Organ serta Ukuran Sel Minyak Tanaman Adas (*Foeniculum vulgare* Mill) yang Dibudidayakan di Kabupaten Semarang dan Kota Salatiga," *ANATOMI dan FISILOGI*, vol. 20, no. 1, pp. 1–17, 2012.
- [6] N. A. K. Wardani, "Enzim  $\alpha$ -Amilase Inhibitor Pada Ekstrak Air Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) untuk Penanggulangan Diabetes Melitus," *Jurnal Ilmu Pangan dan Hasil Pertanian*, vol. 1, no. 2, pp. 50–59, 2017.
- [7] M. I. Kazeem, T. V. Dansu, and S. Adeola, "Inhibitory Effect of *Azadirachta Indica* A. Juss Leaf Extract on the Activities of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase," *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 16, no. 21, pp. 1358–1362, 2013, doi: 10.3923/pjbs.2013.1358.1362.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

---