

Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) dan Penghambatannya Terhadap Enzim α -Amilase

Nurharis Munandar^{1*}, Ririn Handayani²

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar

*Email korespondensi: harismunandar@unsrat.ac.id

ABSTRAK

Diabetes melitus masih menjadi salah satu masalah kesehatan global yang terus meningkat, sehingga pencarian senyawa bioaktif alami dengan potensi antidiabetes menjadi sangat penting. Biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diketahui kaya akan senyawa polifenol yang berpotensi menghambat enzim pencernaan karbohidrat. Penelitian ini bertujuan untuk memfraksinasi, mengidentifikasi, dan menguji aktivitas senyawa polifenol dari biji kakao asal Kabupaten Bulukumba, Sulawesi Selatan, sebagai antidiabetes secara in vitro melalui penghambatan enzim α -amilase. Sampel biji kakao tanpa fermentasi diekstraksi menggunakan metanol p.a, kemudian difraksinasi dengan metode Kupchan sehingga diperoleh fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana. Keempat fraksi tersebut selanjutnya diuji aktivitas penghambatannya terhadap enzim α -amilase dan menghasilkan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 74,45 $\mu\text{g/mL}$; 96,51 $\mu\text{g/mL}$; 137,48 $\mu\text{g/mL}$; dan 194,10 $\mu\text{g/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi air memiliki aktivitas penghambatan paling kuat dan berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat antidiabetes berbasis bahan alam.

Kata Kunci: Biji kakao, Antidiabetes, Enzim α -amilase, Polifenol

ABSTRACT

Diabetes mellitus remains a major global health problem, and the search for natural bioactive compounds with antidiabetic potential is of great importance. Cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) are known to be rich in polyphenolic compounds that may inhibit carbohydrate-digesting enzymes. This study aims to fractionate, identify, and evaluate the activity of polyphenols extracted from cocoa beans originating from Bulukumba Regency, South Sulawesi, as an antidiabetic agent in vitro through α -amylase inhibition. Non-fermented cocoa bean samples were extracted using methanol p.a and subsequently fractionated with the Kupchan method to obtain water, 50% methanol, dichloromethane, and n-hexane fractions. All fractions were then evaluated for their α -amylase inhibitory activity, resulting in IC_{50} values of 74.45 $\mu\text{g/mL}$, 96.51 $\mu\text{g/mL}$, 137.48 $\mu\text{g/mL}$, and 194.10 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These results indicate that the water fraction exhibited the strongest inhibition and therefore has promising potential to be further developed as a natural antidiabetic candidate.

Keywords: Cocoa beans, Antidiabetic, α -amylase Enzyme, Polyphenols

PENDAHULUAN

Diabetes melitus tipe 2 (T2DM) adalah gangguan metabolik kronis yang angka kejadiannya terus meningkat di seluruh dunia. Data International Diabetes Federation (IDF) mencatat bahwa pada tahun 2021 terdapat sekitar 537 juta individu dewasa yang hidup dengan diabetes, dan jumlah tersebut diproyeksikan melonjak menjadi 783 juta pada tahun 2045. Indonesia termasuk dalam lima negara dengan jumlah kasus diabetes tertinggi, sehingga kondisi ini menjadi persoalan kesehatan masyarakat yang membutuhkan perhatian serius secara nasional maupun global.

Upaya pengendalian kadar glukosa darah pada pasien T2DM umumnya dilakukan melalui pemberian obat sintetik, seperti metformin dan sulfonilurea. Namun, penggunaan jangka panjang obat-obatan ini sering menimbulkan efek samping, terutama yang berkaitan dengan saluran pencernaan. Kondisi ini mendorong pengembangan alternatif terapi berbasis bahan alam yang lebih aman dan dapat ditoleransi dengan baik oleh tubuh (Lam dkk., 2024). Salah satu sumber bahan alam yang berpotensi

adalah biji kakao (*Theobroma cacao* L.), yang selama ini dikenal luas sebagai bahan baku industri makanan, khususnya cokelat.

Biji kakao diketahui mengandung berbagai senyawa polifenol, seperti flavonoid, katekin, dan epikatekin, yang memiliki aktivitas biologis penting, termasuk sebagai antioksidan dan antidiabetes (Wardana dkk., 2024; Iflahah dkk., 2016). Senyawa-senyawa tersebut telah terbukti mampu menghambat kerja enzim pemecah karbohidrat seperti α -amilase dan α -glukosidase, merangsang sekresi insulin, serta meningkatkan sensitivitas insulin (Ramos dkk., 2017; Shahidi dan Danielski, 2024). Studi *in vivo* oleh Haq dkk. (2023) menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji kakao asal Kabupaten Bulukumba, Sulawesi Selatan, mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus putih yang diinduksi glukosa. Beberapa penelitian melaporkan bahwa proses fermentasi biji kakao dapat menyebabkan degradasi polifenol, terutama antosianin dan katekin, akibat aktivitas enzim oksidase dan reaksi polimerisasi selama fermentasi (Kyi dkk., 2005; Alean dkk., 2016). Oleh karena itu, penggunaan biji kakao tanpa fermentasi dipilih dalam penelitian ini untuk memaksimalkan perolehan senyawa bioaktif yang berperan dalam aktivitas antidiabetes.

Kakao dari Sulawesi Selatan memiliki karakteristik unik yang dipengaruhi oleh kondisi geografis dan agroklimat, seperti pH tanah 6,5–7, ketinggian 0–600 meter di atas permukaan laut, serta curah hujan dan suhu yang relatif stabil. Faktor-faktor ini diyakini memengaruhi komposisi metabolit sekunder, termasuk kandungan senyawa bioaktif dalam biji kakao (Haq dkk., 2023). Selain itu, kakao dari wilayah ini tumbuh pada lingkungan agroekologi yang berbeda dengan daerah penghasil kakao lainnya, sehingga memungkinkan terjadinya variasi kandungan polifenol yang signifikan (Yusuf dkk., 2021).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa fraksi *n*-butanol dari ekstrak biji kakao memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dan efektif dalam menurunkan kadar biomarker stres oksidatif seperti 8-OHdG dalam urin hewan uji (Iflahah dkk., 2016). Selain itu, fraksi tersebut mengandung senyawa flavonoid spesifik seperti flavanon dan dihidroflavonol, yang diketahui memiliki aktivitas biologis tinggi (Wardana dkk., 2024).

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan fraksinasi dan identifikasi senyawa polifenol dari biji kakao asal Sulawesi Selatan, serta mengevaluasi potensi antidiabetesnya melalui uji aktivitas penghambatan enzim α -amilase. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat mendukung pemanfaatan sumber daya alam lokal sebagai kandidat agen antidiabetes yang aman dan efektif.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji kakao tanpa fermentasi, Enzim α -amilase (EC3.2.1.1) (Sigma-Aldrich, A8220), maltosa monohidrat, akuabides, akuades, pati sagu, dietil eter p.a, buffer natrium posfat pH 7, H₂SO₄ p.a, metanol p.a, reagen 3,5-dinitro salicylic acid (DNS), diklorometana p.a, *n*-heksana p.a, FeCl₃ 1% dan 5%, reagen Dragendorff, reagen Mayer, HCl 1%, dimetil sulfoksida (DMSO), akarbosa (*glukobay*), kertas saring Whatman No. 42, aluminium foil, kain saring, es batu, *plastic wrap*, sabun, dan *tissue roll*.

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, *vortex*, *rotary evaporator*, penangas air, inkubator, statif, klem, oven, pH meter (*Hanna Instrumen*), dan spektrofotometer UV-Vis.

Prosedur Penelitian

a. Pengolahan Biji Kakao

Biji kakao tanpa fermentasi dari Desa Balibo, Dusun Borong, Kabupaten Bulukumba yang telah dipisahkan dan dibersihkan dari kulitnya, dikeringkan tanpa sinar matahari langsung selama 7 x 24 jam. Pengeringan dilakukan di dalam ruangan berventilasi baik menggunakan rak pengering bersaringan untuk menjaga sirkulasi udara, serta disertai penggunaan dehumidifier dan kipas untuk menekan kelembaban sehingga mencegah pertumbuhan jamur. Kemudian biji kakao kering direndam

menggunakan dietil eter selama 2 x 96 jam, lalu disaring menggunakan kain saring menghasilkan biji kakao dan filtrat. Filtrat hasil penyaringan disimpan dalam botol 500 mL. Selanjutnya biji kakao dikeringkan kembali, kemudian diserbukkan.

b. Ekstraksi Biji Kakao

Serbuk biji kakao sebanyak 50 g dimaserasi menggunakan metanol p.a selama 3 x 72 jam. Kemudian ekstrak disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 42. Selanjutnya filtrat hasil penyaringan dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C, maka diperoleh ekstrak kasar metanol.

c. Fraksinasi Ekstrak Metanol (Kupchan dkk., 1978)

Ekstrak kasar metanol disuspensikan dengan akuabides sebanyak 50 mL, lalu difraksinasi menggunakan diklorometana (DCM) 50 mL sebanyak 3 kali dalam corong pisah menghasilkan fraksi air dan fraksi DCM. Fraksi DCM dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dan dilarutkan kembali dengan menggunakan metanol 90%. Kemudian metanol 90% difraksinasi menggunakan n-heksana 50 mL sebanyak 3 kali, lalu dipisahkan fraksi n-heksana dan fraksi metanol 90%. Selanjutnya fraksi metanol 90% diencerkan menjadi metanol 50%. Selanjutnya fraksi metanol 50% difraksinasi kembali menggunakan DCM 50 mL sebanyak 3 kali, menghasilkan dua fraksi yaitu fraksi metanol 50% dan fraksi DCM. Kemudian fraksi metanol 50% dikeringkan menggunakan *rotary evaporatory* pada suhu 50°C. Selanjutnya fraksi air, n-heksana, metanol 50%, dan DCM dilakukan uji fitokimia.

d. Uji Fitokimia

1). Uji Flavonoid

Setiap fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana diambil sebanyak tiga tetes dan ditetaskan pada plat tetes. Selanjutnya, masing-masing fraksi diberikan satu tetes larutan H_2SO_4 p.a. Sampel dinyatakan positif mengandung flavonoid apabila terjadi perubahan warna yang terlihat jelas, seperti menjadi kuning, merah, atau cokelat.

2). Uji Tanin

Sebanyak tiga tetes dari masing-masing fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana ditetaskan ke permukaan plat tetes. Setelah itu, setiap fraksi ditambahkan dua tetes larutan FeCl_3 1%. Sampel dikategorikan positif mengandung tanin apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

3). Uji Fenolik

Tiga tetes dari masing-masing fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana ditetaskan ke plat tetes. Selanjutnya, ke setiap fraksi ditambahkan dua tetes larutan FeCl_3 5%. Adanya kandungan fenolik ditunjukkan apabila larutan berubah warna menjadi hijau, hitam kebiruan, atau hitam pekat.

4). Uji Saponin

Fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana masing-masing dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 tetes akuades. Selanjutnya masing-masing fraksi dikocok dan didiamkan selama 5 menit. Terbentuknya busa menandakan adanya kandungan saponin.

5). Uji Alkaloid

Fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana masing-masing dipipet sebanyak 1,5 mL ke dalam masing-masing tabung reaksi yang berbeda-beda. Kemudian masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1,5 mL HCl 1%, lalu dikocok dan dipanaskan selama 1 menit. Masing-masing fraksi diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi terpisah. Pada tabung reaksi pertama, setiap fraksi ditambahkan tiga tetes reagen Dragendorff; terbentuknya endapan berwarna jingga menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung reaksi kedua, setiap fraksi ditambahkan tiga tetes reagen Mayer, dan keberadaan alkaloid ditunjukkan oleh munculnya endapan berwarna krem kekuningan.

e. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase**1). Penentuan Standar Maltosa****a) Pembuatan Larutan Induk Maltosa 1000 ppm**

Sebanyak 0,0105 g maltosa monohidrat ditimbang menggunakan neraca digital ke dalam gelas kimia berukuran 25 mL. Larutan kemudian dibuat dengan melarutkan maltosa monohidrat menggunakan sejumlah akuades. Selanjutnya, larutan tersebut dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan akuades hingga mencapai tanda batas, lalu dikocok hingga tercampur homogen.

b) Pembuatan Larutan Standar Maltosa

Pembuatan larutan standar maltosa dilakukan melalui proses pengenceran dari larutan induk maltosa 1000 ppm. Larutan standar dibuat dengan berbagai konsentrasi yaitu 80 ppm; 150 ppm; 200 ppm; 300 ppm; 400 ppm; dan 600 ppm. Larutan standar maltosa dengan konsentrasi konsentrasi yaitu 80 ppm; 150 ppm; 200 ppm; 300 ppm; 400 ppm; dan 600 ppm diencerkan dengan akuades hingga masing-masing larutan mencapai volume 1,5 mL. Proses pembuatan larutan standar maltosa terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pembuatan larutan standar maltosa

Larutan Standar (ppm)	Volume Larutan Induk (mL)	Volume Akuades (mL)	Volume Total (mL)
80	0,12	1,38	1,5
150	0,225	1,275	1,5
200	0,3	1,2	1,5
300	0,45	1,05	1,5
400	0,6	0,9	1,5
600	0,9	0,6	1,5

c) Pengukuran Standar Maltosa

Tabung reaksi yang berisi larutan blanko, dan larutan standar dengan konsentrasi 80 ppm; 150 ppm; 200 ppm; 300 ppm; 400 ppm; dan 600 ppm dengan volume 1,5 mL disiapkan dan diberi label. Kemudian 1,5 mL reagen DNS dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 10 detik. Kemudian masing-masing tabung reaksi, dimasukkan ke dalam penangas air dan dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, masing-masing tabung reaksi dimasukkan ke dalam air es. Kemudian absorbansi tiap larutan diukur pada panjang gelombang 565 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

2). Penentuan Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase**a). Blanko**

Sebanyak 0,5 mL akuades, 0,5 mL buffer natrium fosfat pH 7,0, dan 0,5 mL substrat pati 2% dicampurkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah inkubasi, campuran ditambahkan 1,5 mL reagen DNS dan digoyangkan menggunakan *vortex* selama sekitar 10 detik. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan segera didinginkan dalam air es. Selanjutnya, absorbansi larutan blanko diukur pada panjang gelombang 565 nm.

b). Kontrol Positif (Akarbosa)

Sebanyak 0,5 mL larutan akarbosa dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, dan 100 ppm dicampurkan masing-masing dengan 0,5 mL larutan enzim α -amilase dan 0,5 mL substrat pati 2% ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah inkubasi, ditambahkan 1,5 mL reagen DNS dan campuran digoyangkan menggunakan *vortex* selama kurang lebih 10 detik. Selanjutnya tabung dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan segera didinginkan dalam air es. Setelah itu, absorbansi larutan akarbosa diukur pada panjang gelombang 565 nm.

c). Kontrol Negatif (Tanpa Zat Penghambat)

Sebanyak 0,5 mL buffer natrium fosfat pH 7,0, 0,5 mL larutan enzim α -amilase, dan 0,5 mL substrat pati 2% dicampurkan ke dalam tabung reaksi, kemudian campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan 1,5 mL reagen DNS dan campuran

digoyangkan menggunakan vortex selama sekitar 10 detik. Selanjutnya tabung dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan langsung didinginkan di dalam air es. Absorbansi kontrol negatif kemudian diukur pada panjang gelombang 565 nm. Konsentrasi maltosa yang terbentuk akibat hidrolisis pati oleh enzim α -amilase dihitung menggunakan kurva kalibrasi larutan standar maltosa dengan rentang konsentrasi 80–600 ppm. Nilai kadar maltosa diperoleh dengan mensubstitusikan absorbansi sampel ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi standar maltosa. Hasil kadar maltosa tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas enzim α -amilase dengan menggunakan rumus perhitungan aktivitas enzim sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{[\text{maltosa}] \times \text{FP}}{\text{BM} \times V \times t}$$

Keterangan: [maltosa] = kadar maltosa (ppm), FP = faktor pengenceran, BM = bobot molekul maltosa, V = volume enzim yang digunakan (mL), dan t = waktu inkubasi (menit)

Aktivitas enzim yang diperoleh dinyatakan dalam unit/mL, dimana satu unit aktivitas alfa amilase adalah sejumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol gula reduksi (maltosa) permenit pada kondisi tertentu.

d). Sampel (Fraksi Air; n-Heksana; Metanol 50%; dan DCM)

Sebanyak 0,5 mL dari masing-masing fraksi dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, dan 100 ppm dicampurkan dengan 0,5 mL larutan enzim α -amilase dan 0,5 mL substrat pati 2% ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah inkubasi, setiap campuran ditambahkan 1,5 mL reagen DNS dan digoyangkan menggunakan vortex selama sekitar 10 detik. Kemudian tabung-tabung tersebut dipanaskan di dalam air mendidih selama 10 menit dan langsung didinginkan menggunakan air es. Absorbansi masing-masing sampel kemudian diukur pada panjang gelombang 565 nm. Selanjutnya, persentase aktivitas relatif dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Aktivitas Relatif} = \frac{\text{Aktivitas Penghambatan}}{\text{Aktivitas Tanpa Zat Penghambat}} \times 100 \%$$

Selanjutnya menghitung nilai % inhibisi menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = 100 - \% \text{ Aktivitas Relatif}$$

Nilai IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi inhibitor dapat menghambat 50% aktivitas enzim alfa amilase. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan persamaan regresi liner, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. dari persamaan $y = ax + b$ dapat dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{IC}_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Keterangan: a = slope, dan b = intercept

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengolahan Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Biji kakao tanpa fermentasi dikeringkan tanpa paparan sinar matahari langsung untuk mencegah kerusakan komponen kimia akibat suhu tinggi. Setelah kering, biji kakao dimaserasi menggunakan dietil eter untuk menghilangkan kandungan lemak. Pelarut dietil eter bersifat nonpolar sehingga mampu melarutkan lemak yang juga bersifat nonpolar. Pelarutan lemak ditunjukkan oleh perubahan warna maserat dari bening menjadi kekuningan. Selanjutnya, biji kakao yang telah bebas lemak digiling hingga diperoleh serbuk.

Ekstraksi Dan Fraksinasi Biji Kakao

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi (ekstraksi dingin) menggunakan pelarut metanol p.a menghasilkan ekstrak kering yang berwarna merah. Maserasi digunakan dalam penelitian ini, karena proses penarikan senyawa tidak membutuhkan pemanasan yang tinggi. Metode ini memiliki beberapa keunggulan, antara lain prosedurnya sederhana, biaya relatif rendah, dan mampu mencegah degradasi senyawa yang sensitif terhadap panas, termasuk polifenol yang mudah rusak pada suhu tinggi (Wollgast dan Anklam, 2000; Emelda dan Wahyudin, 2014).

Ekstrak kasar metanol kemudian dipisahkan lebih lanjut melalui proses fraksinasi. Fraksinasi merupakan teknik pemisahan komponen bahan berdasarkan kesamaan sifat kimianya untuk mengelompokkan senyawa dengan karakteristik tertentu. Pada penelitian ini, pemisahan dilakukan menggunakan metode Kupchan dkk. (1978), sehingga diperoleh empat fraksi, yaitu fraksi air, n-heksana, metanol 50%, dan diklorometana. Urutan tingkat kepolaran pelarut adalah air (1,000) > metanol 50% (0,762) > diklorometana (0,309) > n-heksana (0,009).

Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan analisis kualitatif yang bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam biji kakao *Theobroma cacao* L. Prosedur ini dilakukan berdasarkan reaksi perubahan warna yang terjadi ketika sampel bereaksi dengan pereaksi tertentu. Keempat fraksi air, n-heksana, metanol 50%, dan DCM dianalisis untuk mengetahui kandungan flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan alkaloid. Senyawa metabolit sekunder yang terdeteksi berperan penting dalam kemampuan fraksi untuk menghambat aktivitas enzim α -amilase. Hasil lengkap uji fitokimia disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji fitokimia kandungan metabolit sekunder

No.	Fraksi	Hasil Pengamatan				
		Fenolik	Flavonoid	Tanin	Alkaloid	Saponin
1	Air	+	+	+	+	-
2	Metanol 50%	+	+	+	-	+
3	Diklorometana	-	-	-	+	+
4	n-Heksana	-	-	-	+	-

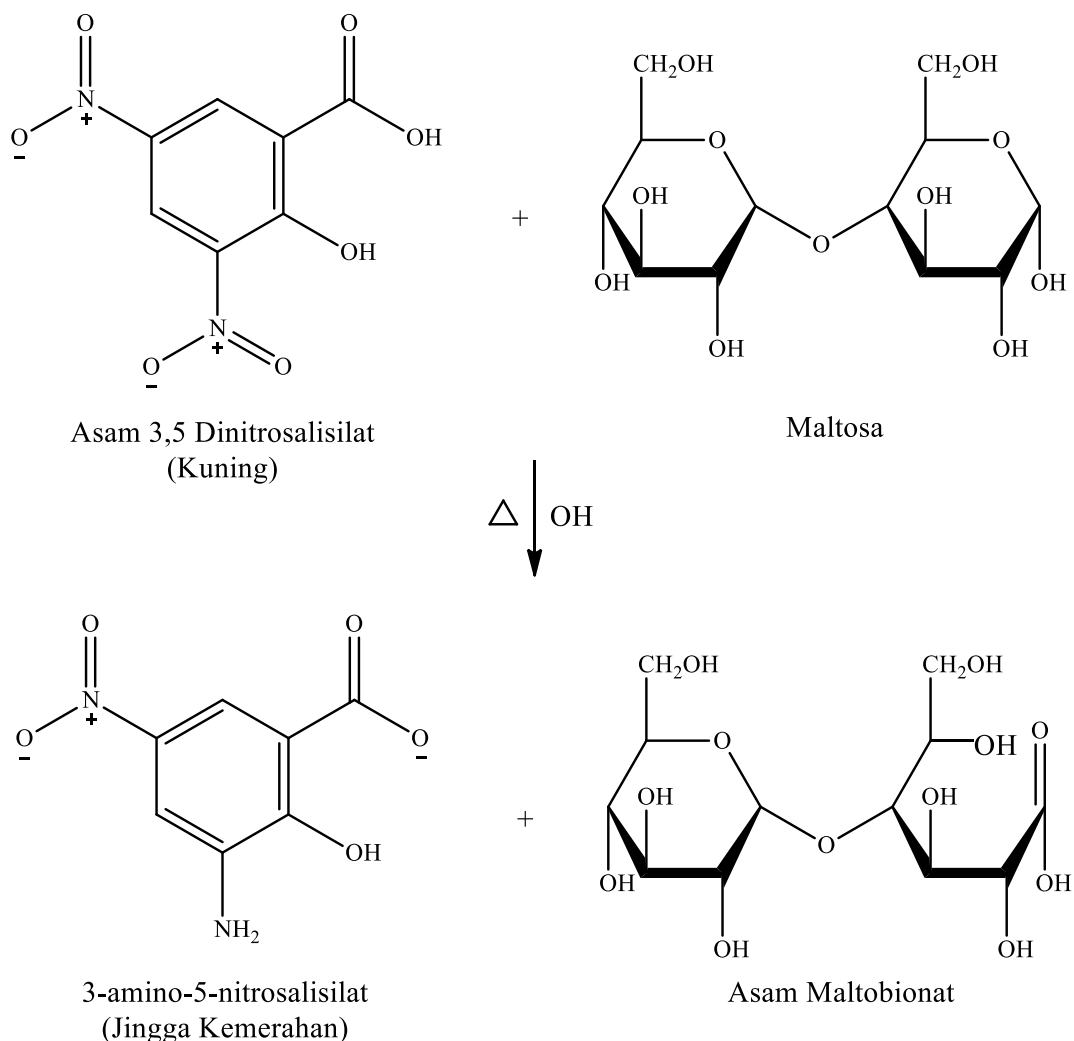
Berdasarkan hasil uji fitokimia, biji kakao teridentifikasi mengandung senyawa metabolit sekunder berupa fenolik, flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid. Pada pengujian fenolik, fraksi air dan fraksi metanol 50% memberikan hasil positif yang ditunjukkan oleh munculnya warna hitam pekat. Sebaliknya, fraksi n-heksana dan fraksi DCM tidak menunjukkan reaksi positif pada uji fenolik.

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase

Aktivitas penghambatan fraksi air, metanol 50%, DCM, dan n-heksana diuji secara *in vitro* menggunakan spektrofotometri untuk mengevaluasi kemampuan masing-masing fraksi dalam menghambat kerja enzim α -amilase. Penentuan aktivitas inhibisi dilakukan menggunakan metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat). Metode DNS dipilih karena memiliki spesifisitas tinggi dalam mendeteksi gula pereduksi yang terdapat di dalam sampel. DNS merupakan senyawa aromatik yang dapat bereaksi dengan gula pereduksi, yaitu senyawa yang memiliki kemampuan menyerap radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 565 nm. Prinsip pengujian ini didasarkan pada kesetimbangan maltosa dalam larutan berair yang dapat berubah menjadi bentuk aldehida rantai terbuka sehingga mampu mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat. Reaksi yang terjadi terlihat pada Gambar 1.

Pengujian penghambatan aktivitas enzim α -amilase dilakukan pada fraksi air, n-heksana, metanol 50%, diklorometana, serta akarbosa sebagai kontrol positif/pembanding. Akarbosa merupakan obat antidiabetes tipe 2 yang bekerja dengan memperlambat penyerapan glukosa setelah konsumsi makanan melalui penghambatan enzim α -amilase, sehingga pemecahan karbohidrat menjadi glukosa tertunda dan lonjakan kadar glukosa darah dapat diminimalkan (Sales dkk., 2012). Hasil pengujian menunjukkan bahwa akarbosa maupun seluruh fraksi air, n-heksana, metanol 50%, dan diklorometana (DCM) mampu menghambat aktivitas enzim α -amilase, namun dengan tingkat penghambatan yang

berbeda-beda sebagaimana ditampilkan pada Tabel 3. Efektivitas suatu fraksi dalam menghambat kerja enzim ditandai dengan semakin sedikitnya gula pereduksi yang terbentuk.



Gambar 1. Reaksi Asam 3,5-Dinitrosalisilat dan Maltosa

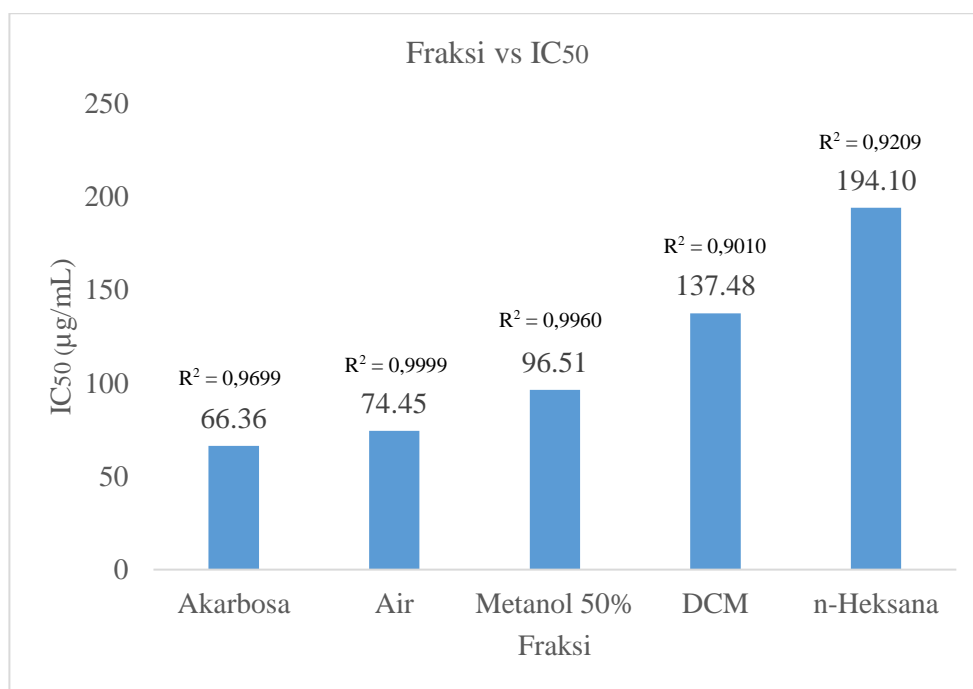
Tabel 3. Evaluasi aktivitas inhibisi enzim α -amilase

Sampel	% Inhibisi		
	1 ppm	10 ppm	100 ppm
Akarbosa	12,92	26,96	66,29
Air	33,71	35,95	55,61
Metanol 50%	32,58	35,39	50,56
Diklorometana	21,35	29,77	42,69
n-Heksana	15,73	22,47	34,27

Tabel 3. menunjukkan bahwa nilai persen inhibisi meningkat dengan penambahan konsentrasi. Nilai persen inhibisi berbanding lurus dengan konsentrasi yaitu semakin tinggi konsentrasi, maka persen inhibisi akan semakin meningkat. Semakin besar persen inhibisi, maka semakin besar pula aktivitas antidiabetes. Nilai persen inhibisi terbesar terdapat pada fraksi air dengan konsentrasi 100 ppm yaitu 55,61 %, sedangkan nilai persen inhibisi terkecil terdapat pada fraksi n-heksana pada konsentrasi 1 ppm

yaitu 15,73 %. Data tersebut, sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Bhutkar dan Bhise (2012), bahwa hasil persentase daya inhibisi yang diperoleh semakin meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi fraksi. Selain itu, hasil penelitian Fatmawati (2011), menunjukkan bahwa fraksi air yang bersifat polar memiliki nilai persen inhibisi tertinggi, dibandingkan dengan pelarut yang bersifat semipolar dan non-polar.

Berdasarkan hasil analisis aktivitas penghambatan yang diperoleh, dilakukan penyusunan persamaan regresi linear untuk menggambarkan hubungan antara konsentrasi masing-masing fraksi (x) dan persentase inhibisi (y) guna menentukan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} digunakan sebagai parameter standar untuk menilai potensi suatu ekstrak, fraksi, atau senyawa dalam pengembangan sebagai kandidat obat (Mugiyanto dkk., 2017).



Gambar 2. Nilai IC_{50} akarbosa, fraksi air, metanol 50%, DCM, dan n-heksana

Menurut International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tahun (2006) dalam Febrinda dkk. (2013), IC_{50} adalah konsentrasi suatu senyawa yang menyebabkan penghambatan sebesar 50% terhadap sebuah sistem yang diberikan. Dengan demikian, nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi inhibitor yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim α -amilase. Kategori interpretasi nilai IC_{50} adalah sebagai berikut: $< 50 \mu\text{g/mL}$ diklasifikasikan sebagai aktivitas penghambatan sangat kuat, $50\text{--}100 \mu\text{g/mL}$ termasuk kategori kuat, $101\text{--}250 \mu\text{g/mL}$ tergolong sedang, $251\text{--}500 \mu\text{g/mL}$ tergolong lemah, sedangkan nilai $> 500 \mu\text{g/mL}$ dianggap tidak menunjukkan aktivitas antidiabetes.

Gambar 2. menunjukkan bahwa nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan persen inhibisi, yaitu semakin tinggi persen inhibisi enzim α -amilase, maka akan semakin rendah nilai IC_{50} yang diperoleh. Nilai IC_{50} yang semakin rendah memiliki kemampuan aktivitas antidiabetes yang tinggi. Kemampuan inhibisi akarbosa, fraksi air, fraksi metanol 50%, fraksi DCM, dan fraksi n-heksana terhadap enzim α -amilase secara berturut-turut sebesar $66,36 \mu\text{g/mL}$, $74,45 \mu\text{g/mL}$, $96,51 \mu\text{g/mL}$, $137,48 \mu\text{g/mL}$, dan $194,10 \mu\text{g/mL}$.

Urutan kemampuan inhibisi adalah fraksi air $>$ fraksi metanol 50% $>$ fraksi DCM $>$ fraksi n-heksana. Fraksi air dan fraksi metanol 50% memiliki kemampuan penghambatan tergolong kuat, sedangkan fraksi DCM dan fraksi n-heksana memiliki kemampuan penghambatan tergolong sedang. Kemampuan inhibisi dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder. Fraksi air memiliki kemampuan inhibisi yang paling kuat dibandingkan fraksi lainnya karena mengandung jumlah metabolit polar yang paling banyak, yaitu flavonoid, fenolik, tanin, dan alkaloid. Senyawa-senyawa polar ini diketahui mampu berinteraksi kuat dengan enzim α -amilase melalui pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik pada sisi aktif enzim, sehingga dapat mengganggu proses hidrolisis pati. Fraksi metanol 50% menunjukkan aktivitas inhibisi tertinggi kedua karena masih kaya akan senyawa polar seperti

flavonoid, fenolik, tanin, dan saponin, sehingga mekanisme penghambatan melalui interaksi polar dengan residu amino pada sisi aktif enzim masih terjadi secara efektif, meskipun intensitas interaksinya lebih rendah dibandingkan fraksi air.

Aktivitas fraksi DCM dan fraksi n-heksana relatif lebih rendah karena kandungan metabolit sekunder yang dimiliki lebih sedikit dan cenderung kurang polar. Pada fraksi DCM, senyawa utama adalah saponin dan alkaloid yang hanya memberikan interaksi penghambatan sedang akibat keterbatasan afinitas terhadap sisi aktif enzim. Sementara pada fraksi n-heksana, senyawa dominan adalah alkaloid yang bersifat lebih non-polar sehingga afinitas terhadap lingkungan sisi aktif enzim yang umumnya hidrofilik menjadi rendah, menyebabkan mekanisme penghambatan berlangsung kurang optimal. Oleh karena itu, perbedaan aktivitas inhibisi antarfraksi berkaitan erat dengan tingkat polaritas metabolit sekunder yang dikandung masing-masing fraksi dan kesesuaiannya terhadap karakteristik sisi aktif enzim α -amilase. Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh, keempat fraksi tetap menunjukkan potensi sebagai kandidat antidiabetes, dengan fraksi air sebagai kandidat paling prospektif.

KESIMPULAN

Hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa fraksinasi ekstrak metanol dalam biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode Kupchan menghasilkan fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana. Identifikasi senyawa polifenol dalam biji kakao menggunakan uji fitokimia menunjukkan hasil positif dalam fraksi air dan metanol 50%. Aktivitas penghambatan enzim α -amilase dalam fraksi air, metanol 50%, diklorometana, dan n-heksana dengan nilai IC_{50} secara berurutan yaitu sebesar 74,45 $\mu\text{g/mL}$; 96,51 $\mu\text{g/mL}$; 137,48 $\mu\text{g/mL}$; dan 194,10 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi air dan metanol 50% memiliki potensi sebagai antidiabetes.

DAFTAR PUSTAKA

- Alean, J., Chejne, F., & Rojano, B. 2016. Degradation of polyphenols during the cocoa drying process, *Journal of Food Engineering*, 189, 99-105.
- Bhutkar, M.A., & Bhise, S.B. 2012. In Vitro Assay of Alpha Amylase Inhibitory Activity of Some Indigenous Plants, *Int. J. Chem. Sci.*, 10(1), 457-462.
- Emelda, A., & Wahyudin, E. 2014. High Levels of Flavonoids and HPLC Profile from Purified Extract of Cocoa Bean from West Sulawesi Indonesia, *International Journal of ChemTech Research*, 6(4), 2363-2367.
- Fatmawati, E., Suradikusumah, E., & Suparto, I. H. 2011. Ekstrak etanol daun salam dan fraksinya sebagai inhibitor α amilase (Skripsi Sarjana, Institut Pertanian Bogor). IPB Repository.
- Febrinda, A.E, Astawan, M., Wresdiyati, T., & Yuliana, N.D. 2013. Kapasitas Antioksidan dan Inhibitor Alfa Glukosidase Ekstrak Umbi Bawang Dayak, *J. Teknol dan Industri Pangan*, 24(2), 161-167.
- Haq, S., Noer, S. F., & Baso Amri, A. W. A. 2023. Uji aktivitas ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) asal Kabupaten Bulukumba terhadap penurunan kadar gula darah tikus putih
- IDF. 2021. IDF Diabetes Atlas (10th ed.). International Diabetes Federation.
- Iflahah, M. A., Puspawati, N. M., & Suaniti, N. M. 2016. Aktivitas antioksidan biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menurunkan kadar 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin dalam urin tikus setelah terpapar etanol. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 4(2), 113-117.
- Kupchan, S. M., Tsou, G., & Sigel, C. W. 1973. A new 3-phase solvent system for separation of natural products. *Journal of Organic Chemistry*, 38(1), 142-143.
- Kupchan, S.M., Stevens, K.L., Rohlfing, E.A., Sickless, B.R., & Sneden, A.T. 1978. New Cytotoxic from Aniba Megaphyllia Mez, *Journal Organic Chemistry*, 43(4), 586-590.
- Kyi, T. M., Wan Ramli, W. R., Mohammad, A. B., Samsudin, M. W., & Kadhun, A. A. H. 2005. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(3), 323-331.
- Lam, Thua-Phong; Tran, Ngoc-Vi Nguyen; Pham, Long-Hung Dinh; Lai, Nghia Vo-Trong; Dang, Bao-Tran Ngoc; Truong, Ngoc-Lam Nguyen; Nguyen-Vo, Song-Ky; Hoang, Thuy-Linh; Mai, Tan

- Thanh; Tran, Thanh-Dao. 2024. Flavonoids as dual-target inhibitors against α -glucosidase and α -amylase: A systematic review of in vitro studies. *Natural Products and Bioprospecting*, 14(4)
- Mugiyanto, E., Simanjuntak, P., & Setyahadi, S. 2017. Identifikasi Senyawa Aktif Fraksi Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) sebagai Inhibitor α -Amilase, Prosiding, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Ramos, S., Martín, M. Á., & Goya, L. 2017. Effects of cocoa antioxidants in type 2 diabetes mellitus. *Antioxidants*, 6(4), 84
- Sales, P.M.D, Souza, P.M.D, Simeoni, L.A., Magalhaes, P.D.O., & Silveira, D. 2012. α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source, *Journal Pharmacy Pharmaceuthy Science*, 15(1), 141-183.
- Shahidi, F., & Danielski, R. 2024. Review on the role of polyphenols in preventing and treating type 2 diabetes: Evidence from in vitro and in vivo studies. *Nutrients*, 16, 3159.
- Wardana, I.M.W., Pramitha, D.A.I., Wibawa, A.A.C., & Sanjiwani, N.M.S. 2024. Penentuan jenis senyawa flavonoid pada isolat biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam fraksi n-butanol dengan aktivitas antioksidan tertinggi. *Chimica et Natura Acta*, 12(2), 98–105.
- Wollgast, J., dan Anklam, E. 2000. Review of Polyhenols In *Theobroma Cacao*: Changes In Composition During The Manufacture of Chocolate And Methodology For Identification and Quantification, *Food Research International*, 33: 423-447.
- Yusuf, M., Pirman, N.F.U.A., Amri, I., & Juwita, A.I. 2021. Identifications of polyphenols and α -amylase inhibitory activity of multi herbal formulation: Cocoa beans (*Theobroma cacao*), buni (*Antidesma bunius*), and cinnamons (*Cinnamomum cassia*). *Journal of Physics: Conference Series*, 1783, 012004.