

Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Teh Hitam dan Teh Hijau secara *In Vitro* Menggunakan Metode Inhibisi Enzim α -Glukosidase (*In Vitro Antidiabetic Activity of Black Tea and Green Tea Extracts by Inhibition of α -Glucosidase Method*)

Diana Holidah, Yasmin, Fransiska Maria Christianty
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Jln. Kalimantan No. 37 Jember 68121
e-mail korespondensi: diana.farmasi@unej.ac.id

Abstract

*Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia. Carbohydrates are metabolized into glucose, in gastrointestinal tract than absorbed into the bloodstream and increase blood glucose level. This absorption process is catalyzed by α -glucosidase enzyme. Previous studies showed that tea (*Camellia sinensis*) extract have antidiabetic activity in mice induced by streptozotocin. The aim of this study was to compared the in vitro activity of tea extract in inhibiting α -glucosidase. Black tea and green tea extracts were tested for α -glucosidase inhibitory activity. Acarbose was used as positive control. IC_{50} extract was 54.86 μ g/mL for black tea and 44.79 μ g/mL for green tea. This study showed that inhibitory effect of green tea was higher than black tea.*

Keywords: black tea, green tea, diabetes mellitus, α -glucosidase

Abstrak

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan adanya gangguan metabolisme tubuh yang menyebabkan peningkatan kadar gula dalam darah melampaui batas normal. Karbohidrat akan dimetabolisme menjadi glukosa oleh enzim α -glukosidase dan diabsorpsi ke dalam pembuluh darah yang menyebabkan peningkatan kadar gula dalam darah. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak teh (*Camellia sinensis*) memiliki aktivitas antidiabetes pada mencit yang diinduksi oleh streptozotocin. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase secara *in vitro*. Ekstrak teh hitam dan teh hijau digunakan sebagai sampel uji penghambatan enzim α -glukosidase. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah akarbose. Ekstrak teh hitam dan teh hijau masing memiliki nilai IC_{50} 54,86 μ g/mL dan 44,79 μ g/mL. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yang lebih tinggi dibandingkan dengan teh hitam.

Kata kunci: teh hitam, teh hijau, diabetes melitus, α -glukosidase

Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu penyakit yang ditandai adanya gangguan atau kelainan fungsional tubuh yang menyebabkan peningkatan kadar gula dalam darah melampaui batas normal [1]. DM dikelompokkan menjadi dua kategori besar, yakni DM tipe 1 dan DM tipe

2 [2]. Kasus penderita diabetes di Indonesia pada tahun 2015 telah mencapai 10 juta penduduk dan jumlah ini diperkirakan akan terus meningkat tiap tahunnya [3].

Salah satu terapi farmakologi yang dapat diberikan pada penderita DM adalah dengan terapi insulin [4]. Obat hipoglikemik oral dapat

diberikan sebagai terapi diabetes tipe 2 sebelum pemberian insulin. Salah satu strategi penting untuk mengobati DM tipe 2 adalah dengan mengontrol kadar glukosa *postprandial* (*postprandial hyperglycaemia*). Penghambatan enzim -glukosidase merupakan salah satu strategi untuk dapat mengontrol *postprandial hyperglycaemia* dengan menunda absorpsi glukosa dalam usus [5].

Penghambatan enzim -glukosidase dapat membatasi kadar glukosa darah dengan memperlambat atau menunda proses hidrolisis dan absorpsi karbohidrat. Penghambatan enzim ini sangat berguna untuk manajemen terapi diabetes tipe 2 [6]. Akarbose merupakan suatu oligosakarida yang secara reversibel dapat menghambat enzim -glukosidase sehingga pemecahan karbohidrat kompleks dan disakarida menjadi monosakarida terhambat [7]. Penggunaan akarbose dalam jangka panjang dapat memberikan efek samping pada saluran pencernaan seperti perut kembung (*flatulence*), diare, distensi abdomen, dan keroncongan (*borborygmus*) [8]. Adanya efek samping yang tidak diinginkan inilah yang mendasari munculnya berbagai penelitian dalam upaya mencari alternatif terapi DM tipe 2, khususnya melalui mekanisme penghambatan enzim -glukosidase.

Tanaman teh (*Camellia sinensis*) merupakan tumbuhan tahunan yang banyak tersebar di Asia Tenggara, India, Cina Selatan, Laos Barat Laut, Muangthai, dan Burma [9]. Pemanfaatan ekstrak teh sebagai terapi pengobatan telah banyak berkembang dan semakin luas, salah satunya adalah sebagai terapi pengobatan diabetes melitus. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian ekstrak teh hitam dan teh hijau dapat menurunkan kadar glukosa pada mencit yang diinduksi streptozotisin (STZ) [10]. Uji aktivitas yang dilakukan oleh Yang dan Koh [11] menunjukkan bahwa ekstrak teh hitam memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan teh hijau. Penelitian ini dikembangkan lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas ekstrak teh hitam dan teh hijau yang diperoleh dari PTPN XII Jember dalam menghambat enzim -glukosidase.

Metode Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah simplisia kering teh hitam dan teh hijau yang diperoleh dari PT Perkebunan Nusantara XII Jember, akuades, sodium dihidrogen fosfat

(NaH_2PO_4), sodium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) akarbose (Sigma-Aldrich), enzim -glukosidase (dari *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil- -D-glukopiranosida (PNPG) (Sigma-Aldrich), natrium karbonat (Na_2CO_3) (Merck).

Alat-alat yang digunakan antara lain *freeze dryer*, mikropipet, tip mikropipet (*yellow tip* dan *blue tip*), *microwell 96*, *microplate reader* (ELISA *reader*), inkubator, dan pH meter. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Pembuatan ekstrak teh

Sebanyak 100 gram teh direndam dalam 1000 mL air suhu 90 °C selama 15 menit, filtrat disaring menggunakan corong Buchner dan dibuat ekstrak kering dengan menggunakan *freeze dryer* [12]. Ekstrak teh diencerkan dengan dapar fosfat pH 6,8 untuk mendapatkan konsentrasi larutan sampel 16, 32, 48, 64, dan 72 µg/mL.

Uji pendahuluan reaksi enzimatis

Optimasi yang dilakukan adalah optimasi konsentrasi enzim. Panjang gelombang maksimal, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi merujuk pada penelitian yang telah dilakukan oleh Zuhro [13]. Panjang gelombang maksimal, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi terpilih adalah 415 nm, 10 mM, dan 60 menit.

Uji aktivitas inhibisi -glukosidase

Uji aktivitas inhibisi -glukosidase yang dilakukan ini merujuk pada penelitian Moradi-Afrapoli [14] dengan beberapa modifikasi. Uji aktivitas inhibisi -glukosidase dilakukan terhadap larutan kontrol negatif (larutan tanpa sampel/standar), larutan kontrol positif (larutan akarbose), dan larutan sampel (ekstrak). Setiap larutan uji dibuat larutan blanko masing-masing sebagai faktor koreksi.

Sebanyak 10 µL larutan sampel (ekstrak teh) ditambah 120 µL 0,1 M dapar fosfat pH 6,8 dan 20 µL larutan enzim dimasukkan dalam *microwell 96*. Selanjutnya diinkubasi selama 15 menit suhu 37 °C dan ditambahkan 20 µL substrat PNPG konsentrasi 10 mM, lalu diinkubasi selama 60 menit suhu 37 °C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 80 µL natrium karbonat 0,2 M. *p*-Nitrofenol yang dihasilkan dibaca absorbansinya pada 415 nm. Sebagai pembanding (kontrol positif) digunakan Akarbose dengan konsentrasi 1.000, 2.000,

5.000, 10.000, dan 20.000 µg/mL. Pada uji larutan blanko, dilakukan tanpa penambahan enzim. Semua pengujian dilakukan tiga kali replikasi. Persen inhibisi enzim -glukosidase dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Inhibisi -glukosidase (\%)} = \frac{K - S}{K} \times 100\%$$

(K= absorbansi kontrol negatif, S= absorbansi sampel).

IC₅₀ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan inhibisi enzim -glukosidase sebagai sumbu y. Persamaan regresi $y = bx + a$ yang diperoleh, digunakan untuk menentukan IC₅₀ dengan rumus:

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

Analisis data

Data yang diperoleh kemudian diolah dan dilakukan uji normalitas (Shapiro-Wilk) sebagai syarat uji analisis T-test untuk melihat perbedaan IC₅₀ [15].

Hasil Penelitian

Hasil rendemen ekstrak teh hitam dan teh hijau masing-masing didapatkan 22,1% dan 18,25%. Konsentrasi enzim -glukosidase yang digunakan berdasarkan hasil optimasi adalah 0,5 Unit/mL. Nilai IC₅₀ masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai IC₅₀

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)
Teh hitam	54,86 ^a
Teh hijau	44,79 ^b
Akarbose	7.111,11

Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan berdasarkan uji analisis T-test ($p < 0,05$) dalam penghambatan enzim -glukosidase. Data dalam bentuk rata-rata ±SD (n=3).

Pembahasan

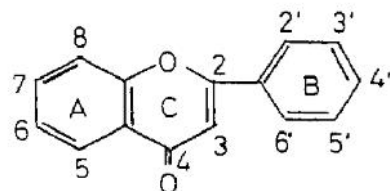
Pengujian aktivitas inhibisi enzim -glukosidase dilakukan berdasarkan prinsip dasar reaksi enzimatik, yakni terjadinya hidrolisis substrat *p*-nitrofenil-*D*-glukopiranosida (PNPG) oleh enzim -glukosidase menjadi *p*-nitrofenol (warna kuning) dan glukosa [16]. Berdasarkan uji inhibisi enzim -glukosidase, ekstrak teh hijau memiliki aktivitas penghambatan yang lebih tinggi

dibandingkan dengan teh hitam dengan nilai IC₅₀ teh hijau 44,79 µg/mL dan teh hitam 54,86 µg/mL (Tabel 1).

Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Bait [17], yakni pemberian seduhan teh hijau secara *in vivo* lebih efektif dibandingkan dengan teh hitam dalam aktivitas hipoglikemik. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa secara *in vivo* ekstrak teh hijau mampu menurunkan kadar glukosa darah lebih besar dibandingkan teh hitam. Kandungan polifenol total yang terdapat dalam ekstrak teh hijau lebih besar dibandingkan dengan teh hitam [12] sehingga aktivitas penghambatan enzim -glukosidase dari ekstrak teh hijau lebih besar dibandingkan dengan ekstrak teh hitam.

Hasil ini berbeda dengan peneliti lain yang melaporkan bahwa aktivitas penghambatan enzim -glukosidase teh hitam lebih tinggi dibandingkan dengan teh hijau [11,18]. Menurut Setyamidjaja [19] faktor lingkungan area pertumbuhan tanaman teh, seperti faktor iklim dan tanah, dapat mempengaruhi mutu tanaman tersebut. Adanya perbedaan tersebut juga dapat mempengaruhi jumlah kandungan dari tanaman teh. Perbedaan kandungan akan berdampak pada perbedaan aktivitas suatu tanaman [20].

Proses pembuatan teh hijau yang terbilang sederhana menyebabkan kandungan katekin tetap terjaga. Pada teh hitam, adanya proses fermentasi menyebabkan sebagian besar katekin teroksidasi menjadi *theaflavins* [21]. Proses inilah yang menyebabkan perbedaan kandungan katekin dari teh hitam dan teh hijau. Meskipun terdapat perbedaan kandungan tersebut, diketahui bahwa keduanya memiliki aktivitas inhibisi enzim -glukosidase [22]. Senyawa yang memiliki peranan penting dalam penghambatan enzim -glukosidase menurut beberapa peneliti adalah *epigallocatechin gallate* (EGCG) dan *theaflavins digallate* (TF2G) [23].



Gambar 1. Kerangka dasar flavonoid

Gugus hidroksil (-OH) yang terdapat dalam flavonoid memiliki peranan penting dalam inhibisi enzim -glukosidase [24], khususnya pada cincin C flavonoid [25]. Penelitian yang

dilakukan oleh Yilmazer-Musa *et al.* [26] melaporkan bahwa adanya gugus galat ($C_7O_4H_5$) pada posisi 3 di cincin C flavonoid akan berinteraksi dengan enzim α -glukosidase sehingga aktivitas enzim tersebut menjadi terhambat. Tadera *et al.* [27] menambahkan adanya substitusi gugus hidroksil pada cincin B flavonoid diketahui dapat meningkatkan aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase (Gambar 1).

Standar akarbose yang digunakan sebagai kontrol positif memiliki nilai IC_{50} yang sangat besar, yakni 7.111,11 μ g/mL. Nilai tersebut jauh berbeda dengan nilai IC_{50} sampel yang digunakan. Shinde *et al.* [28] melaporkan bahwa akarbose yang digunakan sebagai kontrol positif memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yang berasal dari mamalia (tipe II) lebih tinggi dibandingkan dengan enzim α -glukosidase yang berasal dari jamur (tipe I). Penelitian terkait juga dilakukan oleh Kim *et al.* [29] dan Oki *et al.* [30] dimana akarbose merupakan inhibitor yang poten dalam menghambat enzim α -glukosidase yang berasal dari mamalia dan kurang memiliki kemampuan penghambatan pada enzim α -glukosidase yang berasal dari jamur atau bakteri.

Simpulan dan Saran

Ekstrak teh hitam dan teh hijau memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase. Ekstrak teh hijau memiliki kemampuan penghambatan yang lebih baik dibandingkan dengan teh hitam karena memiliki nilai IC_{50} yang lebih kecil. Penelitian ini dapat dikembangkan lagi untuk menyempurnakan penggunaan obat herbal sebagai alternatif pengobatan diabetes. Hal yang dapat dikembangkan yaitu dengan pembuatan sediaan herbal ekstrak teh hitam dan teh hijau sehingga dapat memudahkan penggunaannya.

Daftar Pustaka

- [1] American Diabetes Association [Internet]. America: American diabetes association; 2015 [cited 2015 December 28]. Available from: <http://www.diabetes.org/>
- [2] Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J. Harrison's: principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill; 2015.
- [3] International Diabetes Federation [Internet]. Belgia: International diabetes federation:

- 2015 [cited 2015 December 28]. Available from: <http://www.idf.org/>
- [4] Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Diabetes mellitus. Informasi Produk Terapeutik. 2009; 19(1): 1-12.
- [5] Baron AD. Postprandial hyperglycaemia and α -glukosidase inhibitors. *Diabetes Res Clin Pr*. 1998; 40: 51-55.
- [6] Lebovitz HE. Alpha-glukosidase inhibitors. *Endocrin Metab Clin*. 1997; 26(3): 539-551.
- [7] Balfour JA, McTavish D. Acarbose. *Drugs*. 1993; 46(6): 1025-1054.
- [8] Walker R, Whittlesea C. *Clinical pharmacy and therapeutics*. Edinburgh: Elsevier; 2012.
- [9] Effendi IDS, Syakir M, Yusron M, Wiratno. *Budidaya dan pasca panen teh*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan; 2010.
- [10] Tang W, Li S, Liu Y, Huang MT, Ho CT. Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in a type 2 diabetes mice model via different mechanisms. *J Funct Foods*. 2013; 5(4): 1784-1793.
- [11] Yang X, Kong F. Evaluation of the in vitro α glukosidase inhibitory activity of green tea polyphenols and different tea types. *J Sci Food Agr*. 2016; 96(3): 777-782.
- [12] Holidah D, Christianty FM. Uji aktivitas antidiabetes ekstrak teh hitam, teh olong dan teh hijau secara in vivo. *Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development: Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*; 2015.
- [13] Zuhro F, Puspitasari E, Muslichah S, Hidayat MA. Aktivitas inhibitor α -glukosidase ekstrak etanol 70% daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.). *Pustaka Kesehatan*. 2015; 4(1): 1-7
- [14] Moradi-Afrapoli F, Asghari B, Seidnia S, Ajani Y, Mirjani M, Malmir M, et al. In vitro α -glukosidase inhibitory activity of phenolic constituent from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. *DARU J Pharm Sci*. 2012; 20 (37): 1-6.
- [15] Dahlan MS. *Statistika untuk kedokteran dan kesehatan: uji hipotesis dengan menggunakan SPSS Seri 1: evidence based medicine*. Jakarta: Arkans Entertainment and Education in Harmony; 2004.
- [16] Li KB, Chan KY. Production and properties of alpha-glukosidase from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microb*. 1983; 46(6): 1380-1387

- [17] Bait Y. Efektivitas pemberian seduhan teh hitam, teh hijau (*Camelia sinensis* var. *assamica*), teh daun murbei (*Morus kanva*) dan campurannya dalam aktivitas hipoglikemik pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes. Institut Pertanian Bogor; 2010.
- [18] Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. Inhibitory potential of wine and tea against amylase and glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J Food Biochem.* 2008; 32(1): 15-31.
- [19] Setyamidjaja D. Teh: Budidaya dan pengolahan pascapanen. Yogyakarta: Kanisius; 2000.
- [20] Woodward, FI. Climate and plant distribution. Melbourne: Cambridge University Press; 1987.
- [21] Haslam E. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry.* 2003; 64(1): 61-73.
- [22] Matsui, Tanaka, Tamura, Toshima, Tamaya, Miyata et al. -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J Agr Food Chem.* 2007; 55(1): 99-105.
- [23] Kamiyama, Sanae, Ikeda, Higashi, Minami, Asano et al. In vitro inhibition of -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea. *Food Chem.* 2010; 122(4): 1061-1066.
- [24] de Melo EB, da Silveira Gomes A, Carvalho I. -and -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron.* 2006; 62(44): 10277-10302.
- [25] Xu H. Inhibition kinetics of flavonoids on yeast -glucosidase merged with docking simulations. *Protein Peptide Lett.* 2010; 17(10): 1270-1279.
- [26] Yilmazer-Musa, Griffith, Michels, Schneider, Frei. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of -amylase and -glucosidase activity. *J Agr Food Chem.* 2012; 60(36): 8924-8929.
- [27] Tadera, Minami, Takamatsu, Matsuoka. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2006; 52(2): 149-153.
- [28] Shinde J, Taldone T, Barletta M, Kunaparaju N, Hu B, et al. -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels seed kernel in vitro and in goto-kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res.* 2008; 343(7): 1278-1281.
- [29] Kim YM, Wang MH, Rhee HI. A novel a-glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Res.* 2004; 339(3): 715-717.
- [30] Oki T, Matsui T, Osajima Y. Inhibitory effect of a-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J Agr Food Chem.* 1999; 47(2): 550-553.