

II. TINJAUAN PUSTAKA

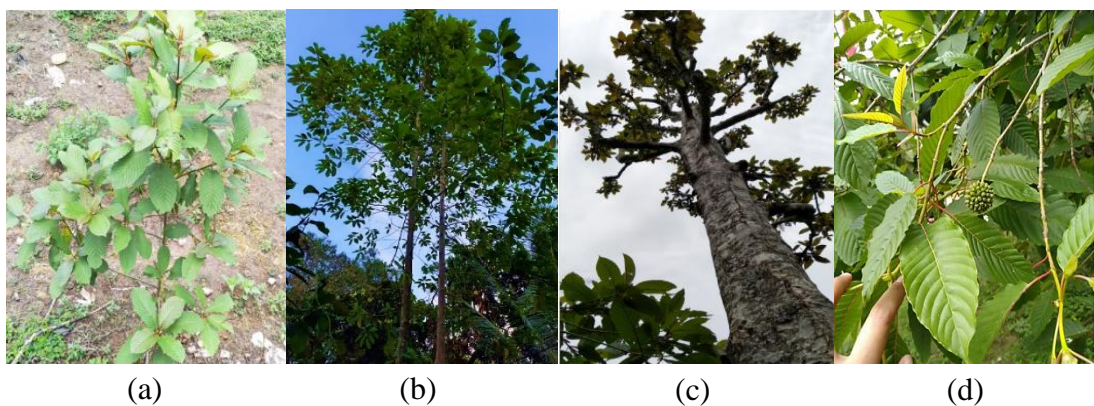
A. Landasan Teori

1. Potensi Kratom

Kratom yang juga dikenal dengan sebutan ketum (*Mitragyna speciosa* Korth) merupakan tanaman tropis berkayu dari famili Rubiaceae atau termasuk famili kopi yang berasal dari Asia Tenggara dan Indochina. Kratom tumbuh secara alami di daerah termasuk Thailand, Indonesia, Malaysia, Sumatera, Jawa, Bali dan Kalimantan (Singh dkk., 2016). Wilayah Kalimantan Barat khususnya Putussibau Utara merupakan salah satu Kecamatan di Kabupaten Kapuas Hulu yang berperan penting sebagai pemasok kratom untuk diperdagangkan secara internasional (Simamora, 2020). Kenampakan pohon kratom dengan umur tumbuh yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 1 dan morfologi kratom tulang daun merah terlihat pada Gambar 2.

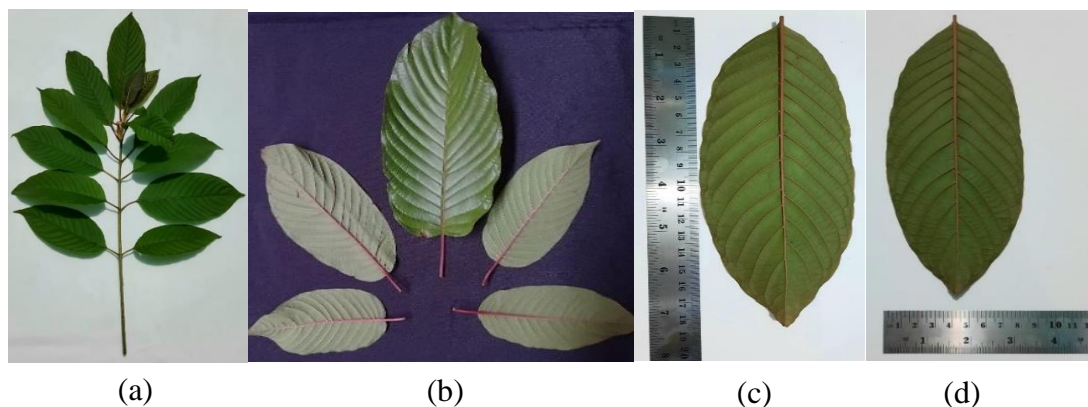
Klasifikasi taksonomi untuk kratom menurut *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
Filum : Tracheophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Gentianales
Suku : Rubiaceae
Marga : *Mitragyna* Korth.
Jenis : *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil



Gambar 1. Pohon Kratom: (a) Kenampakan Pohon Muda, (b) Tanaman Berusia 1 Tahun, (c) Tanaman Berusia 40 Tahun, (d) Daun dan Bunga

Sumber: Tim Kratom Balitbangkes dalam Wahyono dkk. (2019)



Gambar 2. Morfologi Kratom Tulang Daun Merah: (a) Tampak Depan Daun, (b) Tampak Depan dan Belakang Daun, (c) Ukuran Daun Vertikal, (d) Ukuran Daun Horizontal

Kratom diketahui mengandung lebih dari 40 jenis alkaloid, diantaranya adalah mitraginin, 7-hidroksimitraginin, painantein, spesioginin, spesiosiliatin yang merupakan golongan alkaloid indol dan beberapa jenis flavonoid, terpenoid, saponin, dan glikosida (Compton dkk., 2014; Cinosi dkk., 2017). Senyawa mitraginin dan 7-hidroksimitraginin merupakan dua senyawa alkaloid indol utama yang terdapat pada bagian daun kratom (Casey dkk., 2015). Kadar mitraginin pada tanaman muda dan tua sangat bervariasi, umumnya tanaman tua persentase mitragininnya lebih tinggi (Wahyono dkk., 2019). Hasil isolasi kratom dari Muang Thai menunjukkan bahwa Mitraginin menyusun sekitar 66% dari alkaloid total (Raini, 2017), sedangkan 7-hidroksimitraginin menyusun sebesar 2% dari alkaloid total (Casey dkk., 2015). Efek kratom pada manusia tergantung pada dosis pemakaian. Dosis tinggi memberi efek narkotik menyerupai morfin dan efek dosis rendah berupa stimulan (Raini, 2017).

Kratom telah digunakan secara luas selama ratusan tahun untuk efek analgesik stimulan seperti opioid (Singh dkk., 2016). Kratom berpotensi untuk mengatasi nyeri, gejala putus obat opioid, dan masalah klinis lainnya (Prozialeck dkk., 2012). Kratom secara farmakologis terbukti memiliki aktivitas sebagai analgesik, antipiretik, antidiare, antidepresan, antibakteri, antidiabetes, antinosiseptif, anti-inflamasi, dan antioksidan (Takayama, 2004; Hassan dkk., 2013). Potensi senyawa bioaktif dapat menambah harga jual dan permintaan yang tinggi terhadap kratom. Hal ini jelas memberi dampak langsung terhadap kehidupan masyarakat Kapuas Hulu sebagai daerah pemasok serbuk kratom terbesar (Simamora, 2020). Kratom terutama bagian daunnya oleh masyarakat biasanya dikunyah langsung saat masih segar dan dibuat

dalam bentuk sediaan seperti remahan, serbuk atau bubuk. Bubuk kratom merupakan produk setengah jadi hasil proses pengecilan ukuran daun kratom, dimana pemakaiannya biasanya dengan cara direbus atau diseduh (Wahyono dkk., 2019; Puspasari dkk., 2020). Salah satu kunci manfaat seduhan bagi kesehatan terletak pada komponen bioaktifnya (Sudaryat dkk., 2015). Seduhan bubuk daun kratom berpotensi dikembangkan ditinjau dari kandungan senyawa bioaktif terutama alkaloidnya (Compton dkk., 2014; Cinosi dkk., 2017).

2. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa bioaktif yang biasanya terdapat pada tanaman, mungkin ada dalam keadaan bebas, kompleks dengan N-oksida atau sebagai garam. Alkaloid bebas dalam bentuk basa biasanya tidak larut dalam air tetapi mudah larut dalam pelarut organik (seperti benzena, eter, kloroform) sementara dalam bentuk garamnya, alkaloid mudah larut dalam pelarut polar seperti air dan larutan encer alkohol, tetapi tidak larut dalam pelarut organik. (Endarini, 2016). Alkaloid sebagian besarnya adalah zat kristal yang membentuk garam karena bersatu dengan asam mineral (hidroklorida, sulfat, nitrat) atau asam organik (tartrat, sulfamat, maleat, dan galat). Kebiasaan alkaloid dapat menyebabkan senyawa tersebut mudah mengalami dekomposisi terutama oleh panas dan sinar dengan adanya oksigen, hasil reaksi ini sering berupa N-oksida. Pembentukan garam dengan senyawa organik (tartrat, sitrat) atau anorganik (asam hidroklorida atau sulfat) dapat mencegah terjadinya dekomposisi pada alkaloid (Kusrahman, 2012). Alkaloid adalah senyawa heterosiklik, dimana pada strukturnya selain unsur karbon, hidrogen dan nitrogen, kebanyakan alkaloid mengandung oksigen. Karakter tunggal yang membedakan semua alkaloid adalah adanya nitrogen yang umumnya berasal dari asam amino, tergabung dalam cincin heterosiklik, dan bersifat basa (Bribi, 2018).

Klasifikasi senyawa alkaloid menurut *Hegnauer* (1963) terbagi menjadi tiga, yaitu alkaloid sesungguhnya, alkaloid sederhana, dan alkaloid semu. Alkaloid sesungguhnya (*true alkaloid*) seperti atropin dan morfin, merupakan alkaloid yang bersifat basa (kecuali kolkhisin dan asam aristolokhat); toksik; lazim mengandung nitrogen dalam cincin heterosiklik (kecuali kolkhisin dan asam aristolokhat); diturunkan dari asam amino; terdapat dalam bentuk garam dengan asam organik. Alkaloid sederhana (*protoalkaloid*) seperti meskalin (kaktus), ephedrin, dan N,N-

dimetiltriptamin, merupakan amin yang relatif sederhana dimana nitrogen dan asam amino tidak terdapat dalam cincin heterosiklik; bersifat basa; beberapa larut dalam air; diperoleh berdasarkan biosintesis dari asam amino. Alkaloid semu (*pseudoalkaloid*) seperti steroidal (konessiin) dan purin (kaffein), merupakan alkaloid yang tidak diturunkan dari prekursor asam amino, misalnya alkaloid terpen (*aconitin* : alkaloid diterpen), alkaloid dari jalur metabolisme asetat (*coniin*); memiliki sifat kebasaaan rendah; beberapa larut dalam air (Wijayanti, 2018).

Berdasarkan atom nitrogen, alkaloid dibagi menjadi dua, yaitu alkaloid dengan atom nitrogen heterosiklik dan alkaloid tanpa atom nitrogen heterosiklik. Alkaloid dengan atom nitrogen heterosiklik, terdiri dari sembilan jenis alkaloid yaitu alkaloid piridin-piperidin yang mempunyai 1 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen; alkaloid tropan yang mengandung 1 atom nitrogen dengan gugus metil (N-CH₃), dapat mempengaruhi sistem saraf pusat termasuk yang ada pada otak maupun sumsum tulang belakang; alkaloid quinnolin yang mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen; alkaloid isoquinolin yang mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen; alkaloid indol yang mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 cincin indol; alkaloid imidazol yang berupa cincin karbon mengandung 2 atom nitrogen; alkaloid lupinan yang mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen; alkaloid steroid yang mengandung 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen dan 1 rangka steroid yang mengandung 4 cincin karbon; alkaloid purin yang mempunyai 2 cincin karbon dengan 4 atom nitrogen.

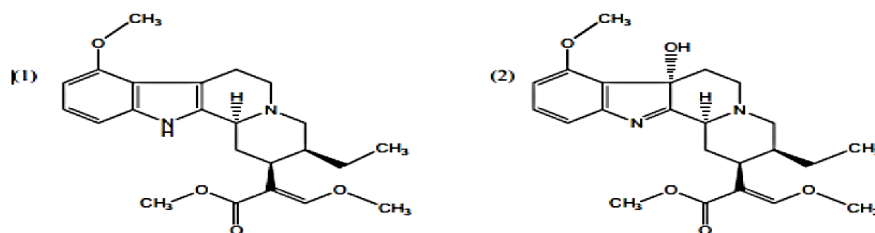
Alkaloid tanpa atom nitrogen yang heterosiklik terdiri dari dua yaitu alkaloid Efedrin dan alkaloid *Capsaicin*. Alkaloid Efedrin (alkaloid *amine*), mengandung 1 atau lebih cincin karbon dengan atom nitrogen di salah satu atom karbon pada rantai samping. Alkaloid jenis ini contohnya berupa alkaloid amina, merupakan turunan sederhana dari feniletilamin dan asam amino fenilalanin atau tirosin, sementara alkaloid *Capsaicin* merupakan jenis alkaloid yang berasal dari *chile peppers*, genus *Capsicum*, salah satunya yaitu *Capsicum pubescens*.

Alkaloid memiliki sifat fisika dan kimia. Sifat fisika dari alkaloid yaitu umumnya berbentuk kristal atau padatan, kadang *amorf* atau cairan kental (nikotin, *coniine*), umumnya tidak berwarna, kecuali *berberine* (poli aromatik); alkaloid basa larut dalam pelarut organik; sedangkan alkaloid garam larut dalam air. Sifat kimianya

yaitu alkaloid dengan adanya sepasang elektron bebas pada atom -N (nitrogen) bersifat basa; kebasaaan alkaloid tergantung pada jenis substitusi pada atom -N-. Alkaloid disebut *electron donating*, apabila bertindak sebagai pendonor atau pemberi elektron dan disebut *electron withdrawing*, apabila bertindak sebagai penarik elektron.

Senyawa alkaloid dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dan inhibisi terhadap enzim alfa-amilase dengan adanya gugus hidroksil (-OH) pada strukturnya. Alkaloid dapat mendonorkan atom hidrogen (H) nya untuk menstabilkan radikal bebas (Shirwaikar dkk., 2006) dan gugus -OH alkaloid dapat berikatan dengan atom H dari residu asam amino pada enzim alfa-amilase (Okechukwu dkk., 2020). Daun kratom yang mengandung senyawa alkaloid diduga berpotensi memiliki aktivitas antioksidan dan inhibisi alfa-amilase. Alkaloid utama golongan indol berupa mitraginin dan 7-hidroksimitraginin pada daun kratom strukturnya disajikan pada Gambar 3.

(1) Mitragynine

(2) 7 α -hydroxy-7H-mitragynine

Gambar 3. Struktur Kimia Senyawa Mitraginin dan 7-Hidroksimitraginin
Sumber: Casey dkk. (2015)

Penetapan kadar alkaloid total secara tepat dapat dilakukan dengan metode gravimetri. Penggunaan metode ini dikarenakan jenis senyawa alkaloid sangat beragam sehingga sulit untuk menentukan standar senyawa untuk pengujiannya bila menggunakan spektrofotometer. Metode gravimetri merupakan metode analisis yang didasarkan pada pengukuran atau penimbangan berat dari endapan alkaloid yang telah diekstraksi. Metode ini sangat sederhana dan mudah dilakukan, hasil yang didapatkan juga spesifik dan akurat (Alasa dkk., 2017). Senyawa alkaloid yang umumnya bersifat basa karena adanya atom H dalam strukturnya ketika ditambahkan dengan asam asetat (CH_3COOH) yang merupakan asam lemah (pH sekitar 2,4) maka gugus amina pada senyawa alkaloid akan terpisah dengan zat netral sehingga membentuk garam alkaloid. Ikatan antara asam dengan alkaloid akan semakin kuat dengan adanya pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*, sehingga senyawa alkaloid akan semakin banyak yang

terekstraksi. Amonium hidroksida pekat (NH_4OH) merupakan basa yang lebih kuat dari basa alkaloid, ketika ditambahkan pada larutan uji maka akan bereaksi dengan asam asetat membentuk garam yang larut air (alkaloid terbebas dari ikatan garamnya) sedangkan alkaloid kembali dalam bentuk basa dan tidak terlarut dalam air sehingga dihasilkan endapan alkaloid atau alkaloid total (Nugrahani dkk., 2020).

3. Antioksidan

Antioksidan dalam bidang kesehatan mempunyai peranan yang sangat penting bagi tubuh manusia. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menangkap atau meredam efek negatif dari oksidan atau radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektron kepada senyawa radikal bebas sehingga aktivitas dari radikal bebas menjadi terhambat dengan membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil (Azizah, 2018).

Antioksidan didefinisikan sebagai molekul yang mampu menghambat oksidasi molekul lain. Oksidasi merupakan reaksi kimia yang melibatkan hilangnya elektron dari suatu molekul. Reaksi oksidasi menghasilkan pembentukan radikal bebas yang merupakan atom tidak stabil dan molekul kekurangan elektron (tidak berpasangan), sangat reaktif, mampu memulai reaksi berantai yang dapat mengubah struktur molekul dan menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas juga disebut sebagai spesies oksigen reaktif yang dapat menghasilkan stres oksidatif dan menyebabkan kematian sel serta cedera jaringan (Mehta dan Gowder, 2015). Parwata (2016) mengemukakan bahwa radikal bebas yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau *reactive oxygen species* (ROS) dan turunan nitrogen atau *reactive nitrogen species* (RNS). *Reactive Oxygen* terdiri dari superoksida ($\text{O}_2\cdot$), hidroksil ($\text{OH}\cdot$), peroksil ($\text{RO}_2\cdot$), hidroperoksil (HO_2), *alkoxyl* ($\text{RO}\cdot$), peroksil ($\text{ROO}\cdot$), oksida nitrat ($\text{NO}\cdot$), nitrogen dioksida ($\text{NO}_2\cdot$), lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorit (HOCl), ozon (O_3), oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), dan lipid peroksida (LOOH). Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida yang akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2).

Radikal bebas bisa ada di tubuh kita karena paparan polutan lingkungan, radiasi, infeksi bakteri, jamur dan virus (ROS eksogen), atau dari berbagai proses metabolisme yang terjadi dalam tubuh (ROS endogen) seperti metabolisme

karbohidrat dan protein (Parwata, 2016). Tubuh manusia pada dasarnya mempunyai sistem antioksidan endogen yang diproduksi secara kontinyu untuk menangkal atau meredam radikal bebas, seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathione peroksidase. Senyawa radikal bebas ketika jumlahnya melebihi antioksidan endogen maka senyawa tersebut akan menyerang komponen lipid, protein dan DNA. Asupan antioksidan eksogen dari luar tubuh (dapat berasal dari makanan dan minuman yang dikonsumsi setiap hari) diperlukan untuk mendukung kerja antioksidan endogen dalam melindungi tubuh dari serangan radikal bebas (Putranti, 2013).

Senyawa fitokimia yang menunjukkan sifat antioksidan dapat menghentikan reaksi-reaksi lanjutan dari radikal bebas sehingga tidak terjadi stres oksidatif dan meminimalisir kerusakan sel atau menghentikan induksi suatu penyakit (Parwata, 2016). Senyawa antioksidan diduga dapat mencegah terjadinya kerusakan pada sel β -pankreas sehingga insulin dapat diproduksi secara normal. Insulin akan memberikan sinyal kepada sel-sel tubuh untuk mengangkut glukosa dalam darah yang merupakan hasil pemecahan pati oleh enzim alfa-amilase, dengan demikian akan terjadi penurunan kadar glukosa dalam darah (Otari, 2013). Antioksidan dapat dibedakan menjadi dua yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Pemakaian antioksidan sintetik dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya sehingga diperlukan antioksidan alami untuk meminimalisir efek samping yang ditimbulkan. Antioksidan alami sebagian besar berasal dari tanaman yang memiliki senyawa bioaktif salah satunya alkaloid (Tiong dkk., 2015; Goboza dkk., 2020).

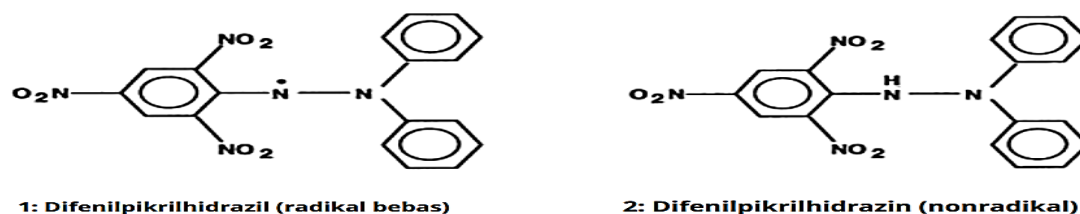
Antioksidan diklasifikasikan menjadi tiga kategori yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier. Antioksidan primer merupakan senyawa-senyawa yang terlibat dalam pencegahan pembentukan oksidan. Senyawa ini bertindak dengan menekan atau memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas dan mendonorkan atom hidrogen atau elektronnya untuk menstabilkan senyawa radikal bebas. Antioksidan ini contoh adalah glutathione peroksidase, katalase, selenoprotein, transferin, feritin, laktoferin, karotenoid, dll. Antioksidan sekunder atau preventif merupakan senyawa-senyawa pemulung atau penangkap ROS (*free radical scavenger*). Senyawa ini dapat bertindak dengan menekan inisiasi rantai dan memutus reaksi propagasi rantai (antioksidan pemulung radikal), mengkelat atau menonaktifkan logam, mengais oksigen singlet (sangat beracun), atau menghapus ROS untuk mencegah terjadinya reaksi antara

senyawa radikal bebas dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder dikatakan multifungsi karena dapat menggabungkan fungsi antioksidan primer dan sekunder dalam satu senyawa. Antioksidan sekunder terdiri dari antioksidan alami (β -karoten, retinol, flavonoid, antosianin, vitamin C dan vitamin E) dan antioksidan sintetik (*butylated hydroxyanisole* atau BHA, *butylated hydroxytoluene* atau BHT, *propyl gallat* atau PG, *tertiary butylhydroquinone* atau TBHQ). Antioksidan tersier bekerja dengan memperbaiki molekul teroksidasi (beberapa enzim proteolitik; enzim DNA misalnya *metionin sulfoksidan reduktase* yang memperbaiki DNA) melalui sumber seperti makanan atau antioksidan secara berturut-turut (Mehta dan Gowder, 2015).

Oxygen scavengers, yaitu senyawa-senyawa yang berperan sebagai pengikat oksigen yang berada dalam sistem sehingga jumlah oksigen akan berkurang. Antioksidan ini contohnya adalah vitamin C (asam askorbat), askorbilpalminat, asam eritorbat, dan sulfit. *Secondary antioxidants*, yaitu senyawa-senyawa yang mempunyai kemampuan untuk berdekomposisi hidroperoksida menjadi produk akhir yang stabil. Antioksidan ini contohnya adalah asam tiodipropionat dan dilauriltiopropionat. *Antioxidative enzyme*, yaitu enzim yang berperan mencegah terbentuknya radikal bebas. Antioksidan ini contohnya adalah *glukose oksidase*, *superoksidase dismutase (SOD)*, *glutation peroksidase*, dan *katalase*. *Chelators sequestrant*, yaitu senyawa-senyawa yang mampu mengikat logam seperti besi dan tembaga yang mampu mengkatalis reaksi oksidasi lemak. Antioksidan ini contohnya adalah asam sitrat, asam amino, *ethylenediaminetetra acetid acid (EDTA)*, dan fosfolipid (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Pengukuran aktivitas antioksidan umumnya menggunakan metode kuantitatif berupa 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Kelebihan metode ini yaitu sederhana, cepat dan tidak memerlukan reagen kimia terlalu banyak (Sayuti dan Yenrina, 2015). Parameter nilai untuk mengetahui seberapa besar aktivitas antioksidan suatu ekstrak yaitu menggunakan IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*). Nilai IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH (radikal bebas) sebanyak 50% (Jami'ah dkk., 2018). Prinsip dari metode DPPH adalah interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Yulian dan Safrijal, 2018). Antioksidan diklasifikasikan menjadi 5, yaitu sangat kuat (<50 ppm), kuat (50-

100 ppm), sedang (100-150 ppm), lemah (150-200 ppm) dan sangat lemah (>200 ppm). Gambar 4 menunjukkan proses peredaman senyawa radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yang berwarna ungu ketika berikatan dengan atom hidrogen (H) dari senyawa antioksidan maka akan berubah menjadi senyawa 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH + H) berwarna kuning yang lebih stabil (non-radikal). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm (Yulian dan Safrijal. 2018).



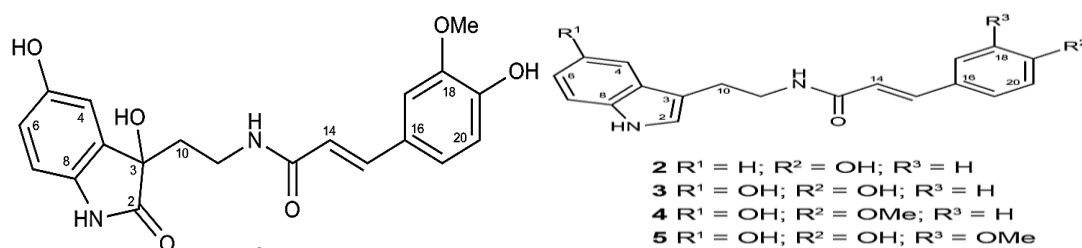
Gambar 4. Peredaman Radikal Bebas DPPH oleh Senyawa Antioksidan
Sumber: Molyneux (2004)

4. Mekanisme Alkaloid sebagai Antioksidan

Alkaloid merupakan salah satu metabolit sekunder yang tersebar luas pada tanaman dan banyak terdapat pada daun kratom. Senyawa alkaloid yang larut air terutama alkaloid dalam bentuk garamnya dan alkaloid golongan indol diduga berperan sebagai antioksidan primer, hal ini dikarenakan senyawa alkaloid ini mampu mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil dalam strukturnya untuk menstabilkan senyawa radikal bebas (Goboza dkk., 2020). Maulida dan Zulkarnaen (2010) menyatakan bahwa suatu senyawa dapat digolongkan sebagai antioksidan primer apabila senyawa tersebut mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak, memberikan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksi senyawa tersebut sehingga terbentuk senyawa yang stabil.

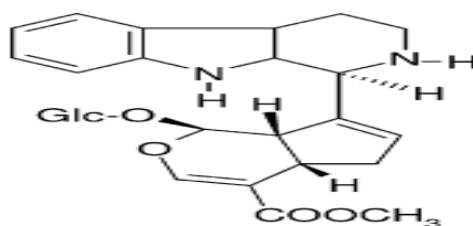
Novello dkk., (2016) yang mengisolasi alkaloid indol dengan fraksi etil asetat dari *Croton echinoides* melaporkan bahwa diperoleh lima senyawa alkaloid indol berupa triptamin yang tersubstitusi N, kelima senyawa tersebut menunjukkan sifat antioksidan melalui uji in vitro pemulung radikal DPPH. Kelima senyawa ini adalah *N-trans-feruloyl-3,5-dihydroxyindolin-2-one* (senyawa 1) sebagai campuran stereoisomer pada posisi C-3 dan merupakan alkaloid indol baru dari *Croton* yang memiliki nilai IC_{50} sebesar $30.0 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$ dan alkaloid yang dikenal sebagai *N-trans-p-coumaroyl-triptamin* (senyawa 2) dengan nilai IC_{50} sebesar $203,7 \pm 25,3 \mu\text{mol/L}$, *N-trans-p-coumaroyl-5-hydroxytryptamine* (senyawa 3) sebesar $10,7 \pm 0,4$

$\mu\text{mol/L}$, *N-trans-4-metoksi-cinnamoyl-5-hydroxytryptamine* (senyawa 4) sebesar $17,5\pm 0,4 \mu\text{mol/L}$, dan *N-trans-feruloyl-5-hydroxytryptamine* berupa moschamin (senyawa 5) sebesar $14,5\pm 0,4 \mu\text{mol/L}$. Alkaloid indol senyawa 3-5 menunjukkan sifat antioksidan paling kuat dengan nilai IC_{50} lebih rendah dari kontrol positif *Trolox* ($\text{IC}_{50}=17,9\pm 1,1 \mu\text{mol/L}$). Perbandingan nilai IC_{50} senyawa 2 ($203,7\pm 25,3 \mu\text{mol/L}$) dan senyawa 3 ($10,7 \mu\text{mol/L}$) menunjukkan bahwa gugus hidroksil (-OH) pada atom C5 dari bagian triptamin merupakan dasar untuk aktivitas antioksidan dari alkaloid indol. Struktur kelima senyawa alkaloid indol tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Senyawa Alkaloid Indol dari *Croton echinoides*
 Sumber: Novello dkk., (2016)

Psikolatin adalah alkaloid indol monoterpen yang diproduksi dan diakumulasi oleh daun *Psikotria umbellata* Vell. (famili Rubiaceae) dalam jumlah yang relatif tinggi (sekitar 3% dari berat kering). Psikolatin dan ekstrak daun kasar dari *P. umbellata* menunjukkan efek perlindungan terhadap stres oksidatif yang artinya bertindak baik sebagai antioksidan. Psikolatin mungkin bertindak sebagai pertahanan kimiawi terhadap radikal superoksida dalam galur tanpa enzim spesifik yang mengubah radikal ini menjadi molekul hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif, ada kemungkinan bahwa psikolatin bertindak lebih sebagai penangkap O_2^- daripada sebagai penangkap H_2O_2 . Kemungkinan peran protektif psikolatin terhadap ROS dapat dijelaskan dengan adanya dua amina sekunder, ikatan rangkap dan residu glukosa dalam strukturnya yang dapat dilihat pada Gambar 6 (Fragoso dkk., 2007).



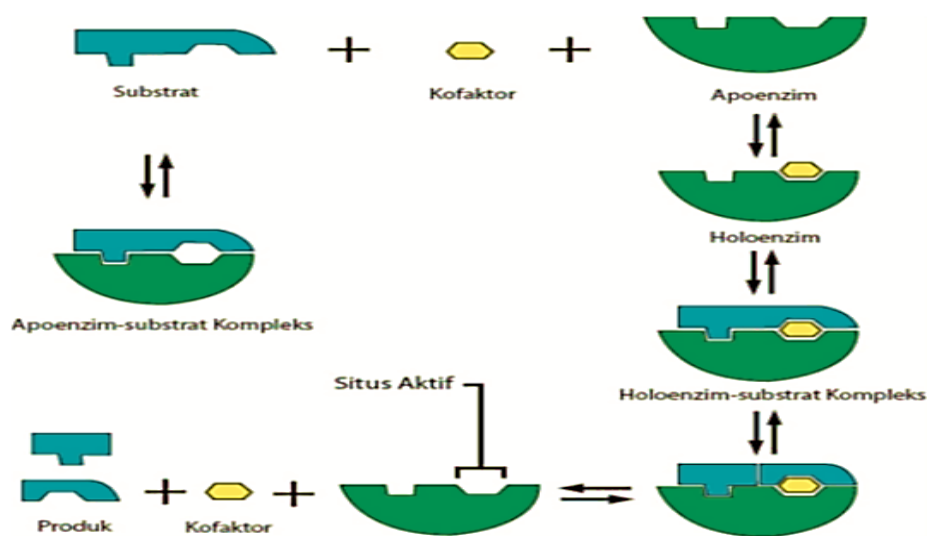
Gambar 6. Struktur Kimia Psikolatin
 Sumber: (Fragoso dkk., 2007)

Senyawa alkaloid termasuk juga golongan indol memiliki mekanisme kerja yang multifungsi yaitu dapat bekerja sebagai antioksidan sekunder karena selain dapat memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas dan mendonorkan atom hidrogennya, senyawa ini juga dapat mengkelat logam (Mehta dan Gowder, 2015). Rai dkk. (2014) melaporkan bahwa tanaman *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don mengandung senyawa alkaloid indol (*vinblastine* dan *vincristine*) yang menunjukkan adanya efek antioksidan. Tanaman ini mampu bertahan melawan stres oksidatif yang dipicu oleh logam kromium (Cr) dengan cara mengkelat logam tersebut. Penelitian Quesille-Villalobos dkk. (2013) yang mengkaji aktivitas pada seduhan menunjukkan bahwa hampir semua seduhan (infusa) dari jenis teh komersial di negara Chili, Amerika Selatan memiliki aktivitas antioksidan sekaligus inhibisi alfa-amilase. Penelitian serupa dilakukan oleh Atikawati dkk. (2019) yang memperoleh hasil bahwa seduhan minuman fungsional daun papasan dan daun sembung kombinasi 1:3 memiliki aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas DPPH dengan IC_{50} sebesar $1,58 \pm 0,06$ mg/mL ($1.580 \pm 0,06$ ppm) dan aktivitas inhibisi alfa-amilase dengan IC_{50} sebesar $1,29 \pm 0,02$ mg/mL ($1.290 \pm 0,02$ ppm).

5. Enzim

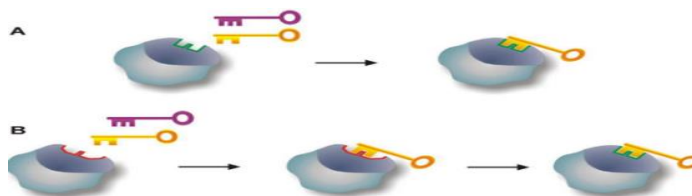
Enzim merupakan biomolekul berupa protein berbentuk bulat atau globular yang terdiri dari satu atau lebih gugus polipeptida. Enzim berfungsi sebagai katalis yang dapat membantu mempercepat proses reaksi biologis tanpa ikut bereaksi. Enzim dihasilkan oleh organ-organ pada hewan dan tanaman yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer radikal, pemutusan rantai karbon (Sumardjo, 2009). Enzim bersifat lebih spesifik, satu enzim hanya untuk satu macam senyawa atau satu reaksi kimia saja. Sifat spesifik ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim yang bersifat tetap, sebagai contoh, enzim alfa-amilase hanya dapat digunakan pada proses perombakan pati menjadi glukosa. Enzim secara utuh (Gambar 7) disebut holoenzim, terdiri dari apoenzim (protein yang tidak tahan panas) dan kofaktor (non-protein). Apoenzim yang kehilangan kofaktor merupakan protein inaktif. Kofaktor merupakan molekul kecil yang menempel di sisi alosterik protein enzim dan berperan sebagai katalis pada sisi aktif enzim. Kofaktor enzim terbagi menjadi dua kategori yaitu kofaktor berupa ion-ion logam (anorganik) seperti Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , dan Cu^{2+} yang berperan sebagai

katalisator dan stabilisator, dan kofaktor molekul organik atau dikenal sebagai koenzim (vitamin B, NAD atau nikotinamid adenin dinukleotida, dan FAD atau flavin adenin dinukleotida) yang berperan untuk memindahkan zat kimia (karboksil atau CO_2 , dan hidrogen) dari satu enzim ke enzim yang lain. Kofaktor yang memiliki ikatan kuat pada protein disebut gugus prostetik dan yang ikatannya lemah disebut koenzim. Enzim dapat aktif sebagai katalis apabila dalam bentuk enzim utuh atau holoenzim (Ulhaq, 2019).



Gambar 7. Struktur Enzim
Sumber: Sutrisno (2017)

Mekanisme kerja enzim dan substrat terdiri dari dua teori (Gambar 8). Teori pertama adalah teori *lock and key* yang menyatakan bahwa sisi aktif enzim dan substrat memiliki bentuk yang komplemen atau saling melengkapi. Teori kedua adalah teori *induced fit* yang menyatakan bahwa sisi aktif enzim menyesuaikan terhadap bentuk substrat.



Gambar 8. Interaksi Enzim-Substrat Model *Lock and Key* (A) dan *Induced Fit* (B)
Sumber: Prokop dkk. (2012)

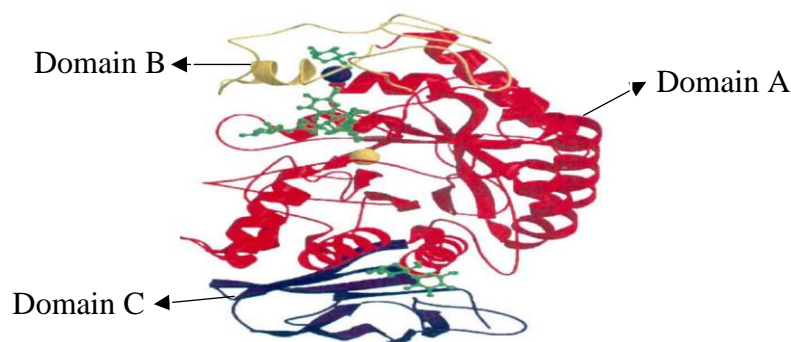
Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama adalah suhu, derajat keasaman (pH), konsentrasi enzim maupun substrat, kofaktor dan inhibitor. Enzim yang berbeda membutuhkan suhu dan pH optimal yang berbeda pula untuk bekerja.

Nilai pH dan suhu yang tidak sesuai akan menyebabkan kerja enzim menjadi tidak optimal, bahkan strukturnya akan mengalami kerusakan. Enzim sebagian besarnya memiliki aktivitas optimal pada suhu 30-40°C dan pH 5-9 (Murray dkk., 2009). Inhibitor terdiri dari dua jenis, yaitu inhibitor kompetitif dan inhibitor non kompetitif. Inhibitor kompetitif akan berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga menghalangi penempelan substrat. Inhibitor non kompetitif akan berikatan dengan enzim pada sisi alosterik yang merupakan sisi selain sisi aktif enzim. Inhibitor yang mengikat pada sisi alosterik akan mengubah konformasi molekul enzim sehingga mengakibatkan inaktivasi sisi aktif enzim tersebut (Ulhaq, 2019).

6. Enzim Alfa-Amilase

Penamaan enzim berdasarkan klasifikasi menurut *Enzyme Commission* (EC) dari *International Union of Biochemistry* (IUB), enzim terbagi menjadi enam kelas yaitu oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase. Amilase termasuk kedalam kelas enzim hidrolase (3.2) yang termasuk kedalam golongan enzim glikosida hidrolase, yaitu enzim yang menghidrolisis ikatan *1,4-alpha-D-glucon glucanohydrolase* dengan nomor E.C.3.2.1. (Isnaeni, 2020).

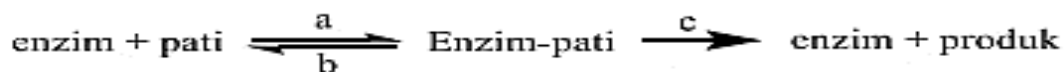
Amilase merupakan enzim yang diproduksi oleh pankreas dan kelenjar ludah. Alfa-amilase merupakan enzim kunci dalam sistem pencernaan dari famili *endoamylase*, diklasifikasikan sebagai *saccharidase* atau enzim golongan hidrolitik yang mengkatalisis proses hidrolisis ikatan alfa-1,4-glikosidik pada polisakarida atau pati (amilum) untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa atau gula sederhana yang siap diserap tubuh. Ikatan glikosidik merupakan ikatan yang menghubungkan gugus hidroksil (-OH) pada atom C1 dan pada atom C4 antara dua molekul D-glukosa. Pemecahan pati dapat terjadi secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul pati dan berlangsung dengan cepat (Ariandi, 2016).



Gambar 9. Struktur Alfa-Amilase
Sumber: Souza dkk. (2010)

Struktur alfa-amilase sebagian besar disusun oleh protein yang terdiri dari 3 domain, yaitu domain A, B, dan C (Gambar 9). Domain A yang ditandai dengan warna merah merupakan domain terbesar, terdiri dari lipatan simetris delapan untai β -paralel dalam barrel yang dikelilingi oleh delapan *heliks*. Domain B yang ditandai dengan warna kuning posisinya menempel dengan domain A karena ikatan disulfida serta berada diantara domain A dan C. Domain C yang ditandai dengan warna ungu memiliki struktur lembaran β yang terhubung dengan domain A melalui rantai polipeptida sederhana. Sisi aktif enzim yang ditandai dengan warna hijau merupakan rantai panjang dan terletak di bagian akhir gugus karboksil domain A dan B. Enzim juga dilengkapi dengan ion kalsium yang ditandai dengan bola biru dan ion klorida yang ditandai dengan bola kuning. Ion kalsium berperan sebagai stabilisator dan *activator allosteric* (Souza dkk., 2010).

Mekanisme kerja enzim alfa-amilase terdiri dari dua tahap, yaitu tahap pertama degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak dan sangat cepat, diikuti dengan penurunan viskositas secara cepat. Tahap kedua terjadi pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim alfa-amilase pada molekul amilosa. Kerja alfa-amilase pada molekul amilopektin akan menghasilkan glukosa, maltosa dan satu seri α -limit dekstrin, serta oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih glukosa yang mengandung ikatan α -1,6-glikosidik. Molekul amilosa sebagian besar terdiri dari rantai tunggal dengan 500 sampai 20.000 ikatan α -1,4-D-glukosa. Amilosa dapat membentuk “*extended shape*” yang cenderung berakhir menjadi kumpuran *heliks* (melingkar). *Heliks* tunggal amilosa memiliki ikatan hidrogen antara atom oksigen nomor 2 dan atom oksigen nomor 6 pada permukaan luar *heliks* dengan mengarah ke dalam cincin oksigen (Ariandi, 2016). Kinetika reaksi penguraian pati oleh enzim alfa-amilase digambarkan sebagai persamaan kesetimbangan berikut.



Gambar 10. Kinetika Reaksi Pati oleh Enzim Alfa-Amilase
Sumber: Wahyuningsih (2019)

Persamaan yang disajikan pada Gambar 10 menunjukkan bahwa alfa-amilase-pati membentuk suatu kompleks dalam reaksi kesetimbangan yang mengalami reaksi berkelanjutan menghasilkan produk yang kemudian terpisah dari enzim. Reaksi enzim tersebut bersifat *reversible* (bekerja bolak-balik), artinya enzim dapat melakukan reaksi dua arah yaitu dari substrat menjadi produk atau produk menjadi substrat. Enzim dapat mengkatalis penguraian suatu senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dan sebaliknya dapat mengkatalis penyusunan senyawa-senyawa sederhana menjadi senyawa kompleks seperti semula (Wahyuningsih, 2019).

Enzim memerlukan kondisi tertentu untuk dapat bekerja secara optimal. Alfa-amilase bekerja optimal pada suhu 20°C dan pada pH 5,6-7,2. Bufer digunakan untuk menjaga agar pH sampel optimum bagi enzim amilase untuk bekerja. Asam klorida atau HCl (pH 1) yang merupakan asam kuat dapat digunakan untuk menghentikan reaksi enzim alfa-amilase dalam memecah pati (Chang, 2020). Aktivitas alfa-amilase dapat diukur berdasarkan kadar glukosa yang terbentuk dari reaksi enzimatik dan dapat berdasarkan kadar pati yang tersisa (pati yang tidak dipecah). Pengukuran kadar pati sisa dilakukan dengan menggunakan reagen berupa larutan iodin. Larutan sampel yang mulanya berwarna kuning akan berubah menjadi warna biru tua apabila terdapat amilosa pati dalam larutan sampel. Hal ini disebabkan oleh adanya molekul iodium (ion-ion triiodida (I_3^-): terbentuk dari iodin (I_2) yang terlarut dalam kalium iodida atau I^-) terikat kedalam kumparan *helix* amilosa pati (polisakarida) sehingga terbentuk rantai panjang poliiiodida yang menghasilkan warna biru hingga kehitaman pada larutan (Ariandi, 2016). Warna tersebut dapat dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yaitu 568,5 nm (Chang, 2020). Reaksi pembentukan I_2KI dengan pati menghasilkan warna biru tua yang dapat dijelaskan dengan persamaan reaksi berikut (Ulhaq, 2019):



7. Inhibisi Alfa-Amilase

Penghambatan terhadap enzim pencernaan (alfa-amilase) yang terlibat, akan mampu mengurangi laju pelepasan dan penyerapan glukosa (Samudra dkk., 2015). Inhibisi aktivitas enzim merupakan penurunan kecepatan ataupun kemampuan suatu reaksi enzimatik karena adanya zat yang menghambat kerja enzim (Samudra dkk.,

2015). Inhibitor alfa-amilase merupakan senyawa yang berperan dalam pencernaan pati dan dianggap sebagai salah satu strategi pengobatan gangguan penyerapan karbohidrat, seperti diabetes dan obesitas (De Sales dkk., 2012). Inhibitor amilase berinteraksi dengan residu asam amino dari domain A dan B yang melapisi tempat pengikatan substrat enzim dan membuatnya kehilangan aktivitas. Ikatan antara inhibitor dan sisi enzim dapat berupa ikatan hidrogen (Tintu dkk., 2012). Inhibitor alfa-amilase dapat bersumber dari bahan alami, tanaman alam (Nurjanah dkk., 2020).

Tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder (senyawa bioaktif) berupa alkaloid, flavonoid, fenolik dan saponin diduga memiliki khasiat sebagai obat antidiabetes. Senyawa bioaktif tersebut menunjukkan hubungan dalam menghambat aktivitas enzim alfa-amilase (Sangi dkk., 2008). Alkaloid merupakan agen antidiabetes yang dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan cara pencegahan penyerapan glukosa dan penghambatan aktivitas alfa-amilase yang secara spesifik menunda pemecahan disakarida dan polisakarida menjadi glukosa pada usus kecil (Sangi dkk., 2008; Brahmachari, 2011).

8. Alkaloid sebagai Agen Inhibitor Alfa-Amilase

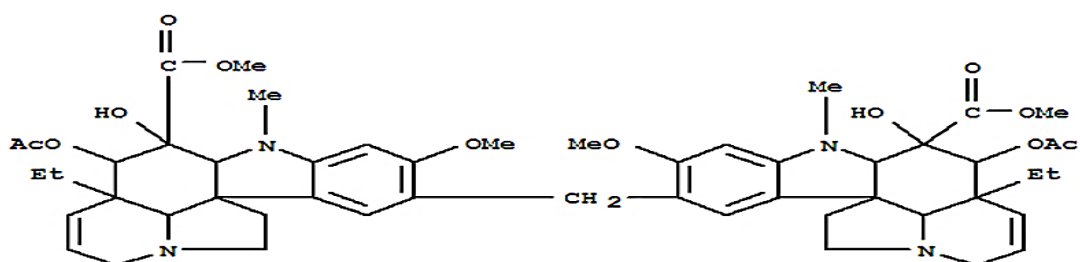
Alkaloid sebagai agen inhibitor alfa-amilase dapat dijelaskan melalui pendekatan mekanisme inhibisi dari beberapa senyawa alkaloid berupa *vindolicine* dan *vindoline*, alkaloid golongan isoquinolin berupa palmatin dan berberin.

a. *Vindolicine*

Aktivitas hipoglikemik dan antioksidan senyawa *vindoline*, *vindolidine*, *vindolicine* dan *vindolinine* yang diperoleh dari daun *Catharanthus roseus* (L.) G. Don dilaporkan dalam penelitian Tiong dkk. (2015). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa keempat senyawa ini memicu peningkatan pengambilan glukosa dalam sel pankreas atau otot, dimana peningkatan terbesar terdapat pada senyawa *vindolicine*. Pengambilan glukosa ini dapat memperbaiki kondisi hiperglikemia. *Vindolicine* juga menunjukkan efek antioksidan tertinggi pada absorbansi PPHP (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), dan senyawa ini juga dapat menurunkan radikal bebas berupa hidrogen peroksida (H₂O₂) sehingga meminimalisir kerusakan oksidatif pada sel pankreas.

Alkaloid *vindolicine* secara struktural dikategorikan sebagai alkaloid *bisindole*. Alkaloid *bisindole* adalah *heterocycles tetracyclic* yang terdiri dari dimer alkaloid

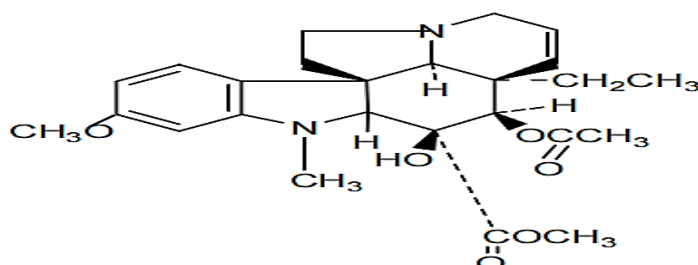
indol yang dihubungkan oleh ikatan tunggal. *Vindolicine* adalah alkaloid potensial yang diisolasi dari *Catharanthus roseus* dan *Catharanthus longifolius*, strukturnya terdiri dari refleksi dua unit *vindoline* yang terkondensasi dengan satu fragmen karbon (Gambar 11). *Vindolicine* adalah satu-satunya turunan alkaloid *bisindole* yang disusun oleh *vindoline* (Tiong dkk., 2013).



Gambar 11. Struktur Kimia Alkaloid *Vindolicine*
Sumber: Satyarsa (2019)

b. *Vindoline*

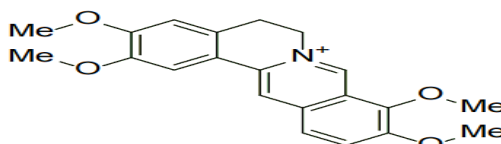
Vindoline merupakan golongan alkaloid indol dengan struktur kimia seperti yang disajikan pada Gambar 12. Penelitian Goboza dkk. (2020) melaporkan bahwa *vindolie* dan ekstrak kasar daun *Catharanthus roseus* dapat berperan sebagai antioksidan sekaligus sebagai antidiabetik. *Vindoline* sebagai antioksidan mampu menghambat kerusakan sel akibat kompleks radikal bebas dengan cara menyumbangkan atom hidrogennya pada senyawa radikal tersebut. *Vindoline* juga dapat meningkatkan sekresi insulin dengan merangsang sel beta pankreas namun hanya dalam keadaan hiperglikemik. Ekstrak kasar daun *Catharanthus roseus* dan senyawa murni *vindoline* menunjukkan adanya aktivitas inhibisi terhadap alfa amilase. Inhibisi dari kedua sampel tersebut tergolong lebih kecil dari inhibisi yang dihasilkan *acarbose*, yang digunakan sebagai obat pembanding atau kontrol positif.



Gambar 12. Struktur Kimia Alkaloid *Vindoline*
Sumber: Haque dan Saba (2011)

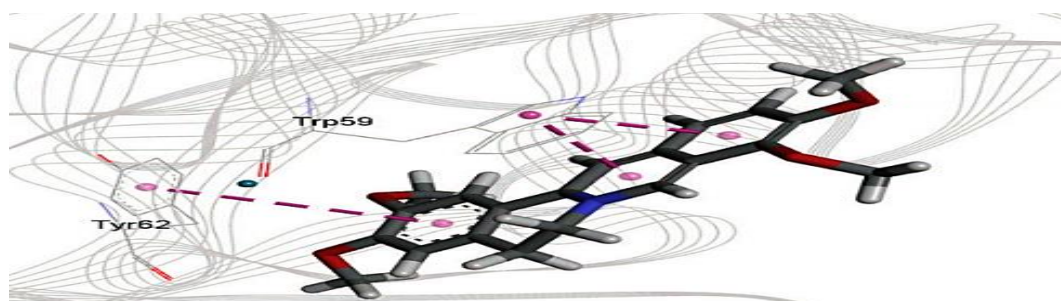
c. *Palmatin*

Palmatin adalah salah satu alkaloid kelompok isoquinolin yang memiliki struktur kimia $C_{21}H_{22}O_4N$ seperti yang disajikan pada Gambar 13. Palmatin dilaporkan dapat berinteraksi dengan posisi spesifik enzim sehingga bertindak sebagai penghambat yang dapat mengurangi aktivitas alfa-amilase dan alfa-glukosidase. Palmatin merupakan penghambat kuat enzim alfa-amilase dan penghambat lemah enzim alfa-glukosidase (Okechukwu dkk., 2020).



Gambar 13. Struktur Kimia Palmatin
Sumber: Okechukwu dkk. (2020)

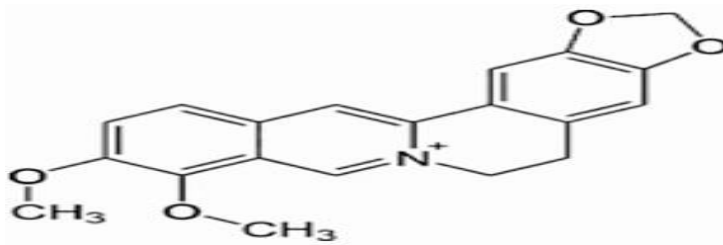
Uji penghambatan yang dilakukan dengan menggunakan metode *molecular docking* yang merupakan metode untuk mencari kombinasi interaksi protein (enzim) dan ligan (senyawa bioaktif) dan menjadi dasar penemuan obat secara simulasi. Hasil penghambatan pada metode ini menunjukkan adanya interaksi ikatan hidrogen antara palmatin dan alfa-amilase menghasilkan afinitas pengikatan walaupun masih terbilang lebih rendah (energi ikatan -7,8 kkal/mol) dibandingkan dengan afinitas pengikatan *acarbose* ke alfa-amilase (energi ikat -8,8 kkal/mol). Pengikatan oleh *acarbose* ditunjukkan oleh interaksinya dengan residu situs aktif alfa-amilase melalui lima ikatan hidrogen. Kelompok isoquinolin berupa palmatin menampilkan interaksi $-\pi$ dengan cincin aromatik TRP59 (triptofan pada posisi 59 di struktur enzim). Kelompok tetrahydronaphthalene juga menampilkan adanya interaksi $-\pi$ dengan residu aromatik TYR62 (tirosin pada posisi 62 di struktur enzim). Interaksi tersebut disajikan dalam garis putus-putus magenta yang disajikan pada Gambar 14 (Okechukwu dkk., 2020).



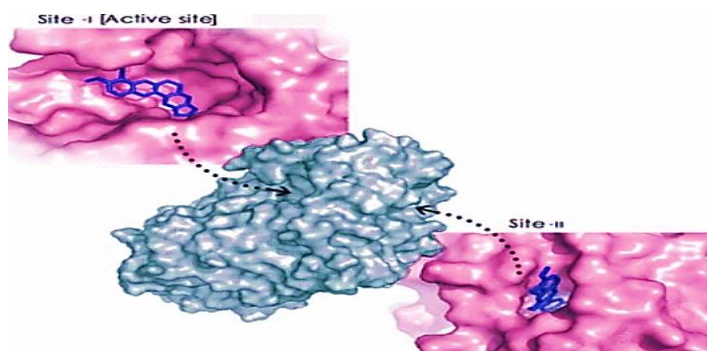
Gambar 14. Interaksi *Docking*; Mode Pengikatan Palmatin dan Alfa-Amilase
Sumber: Okechukwu dkk. (2020)

d. Berberin

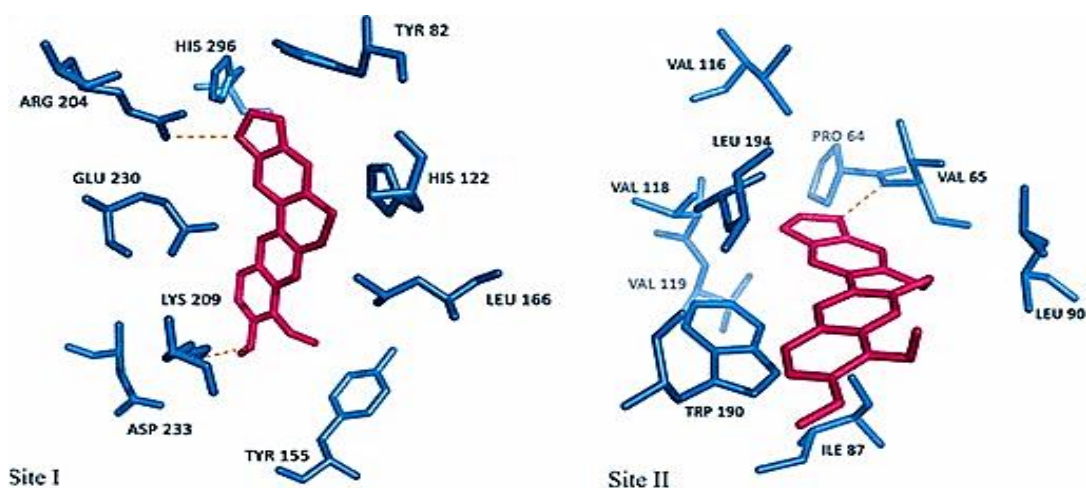
Berberin adalah alkaloid benzil tetra isoquinolin (Shirwaikar dkk., 2006) dengan struktur kimia $C_{18}H_{22}NO_4$ seperti yang disajikan pada Gambar 15. Tintu dkk. (2012) melaporkan bahwa berberin mampu menghambat aktivitas alfa-amilase dengan cara mengikat di dua lokasi (2 situs) pada alfa-amilase yaitu di situs I (sisi aktif) dan situs II (Gambar 16).



Gambar 15. Struktur Kimia Berberin
Sumber: Tintu dkk. (2012)



Gambar 16. Situs Pengikatan Berberin pada Enzim Alfa-Amilase
Sumber: Tintu dkk. (2012)



Gambar 17. Ikatan Berberin dengan Residu Protein di Situs I dan Situs II
Sumber: Tintu dkk. (2012)

Situs I sebagian besar bersifat hidrofilik, yang juga mencakup residu katalitik. Hal ini membuat afinitas berberin yang bersifat hidrofobik mungkin tidak cukup untuk

bersaing dengan substrat hidrofilik untuk berikatan di situs I (sisi aktif enzim). Ikatan berberin di situs I membuat dua ikatan hidrogen dengan residu dari enzim yaitu residu Arg204 (arginin pada posisi 204 di struktur enzim) dan Lys209 (lisin pada posisi 209 di struktur enzim). Berberin pada saat yang sama juga dapat mengikat di situs II (sisi alosterik enzim) tanpa persaingan dari substrat (penghambatannya bersifat non kompetitif) dan hanya membuat satu ikatan hidrogen dengan Val65 (valin pada posisi 65 di struktur enzim), disajikan pada Gambar 15. Situs II sebagian besar terdiri dari residu hidrofobik. Studi simulasi menunjukkan bahwa pengikatan di situs II membuat perubahan konformasi di situs aktif sehingga mempengaruhi aktivitas enzimatis alfa-amilase, dimana pengikatan oleh substrat terhambat karena substrat sukar mengenali sisi aktif enzim yang telah berubah bentuk (Tintu dkk., 2012). Ikatan Hidrogen ditunjukkan oleh garis putus-putus pada Gambar 17. Semua residu asam amino yang terdapat pada enzim alfa-amilase bertindak sebagai donor ikatan hidrogen, dan sebaliknya ligan bertindak sebagai akseptor ikatan hidrogen yang menerima atom hidrogen dari asam amino (Okechukwu dkk., 2020).

9. Perbedaan Ukuran Bahan terhadap Potensi Fitokimia dan Aktivitas

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani berdasarkan cara yang cocok di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Depkes RI, 1979). Ekstraksi didefinisikan sebagai proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut yang berbeda. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non-polar dalam pelarut non-polar (Hammado dan Illing, 2013). Metode ekstraksi yang umum digunakan adalah ekstraksi secara dingin dan ekstraksi panas. Penelitian ini menggunakan ekstraksi panas metode infusi. Infusa merupakan sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit (Ditjen POM, 2000). Mutu bioaktif seduhan yang akan melewati proses ekstraksi erat hubungannya dengan potensi aktivitasnya pada variasi ukuran bahan. Ekstraksi akan berlangsung dengan baik bila ukuran bahan yang digunakan tepat. Pengecilan ukuran dapat memperluas bidang kontak antara sampel dengan pelarut, sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh pun akan semakin besar (Hammado dan Illing, 2013).

Pengecilan ukuran (*grinding*) dengan menggunakan mesin *grinder* dalam waktu relatif singkat sampai ukuran daun kering diketahui cukup untuk proses pengestrakan. Ukuran partikel simplisia dengan luas yang sesuai kisaran + 40 – 60 mesh akan lebih mudah kontak dengan pelarut (Amaliah dkk., 2019) sehingga senyawa bioaktif yang diperoleh dari simplisia lebih optimal (Widiyastutik dkk., 2018). Pengecilan ukuran bahan bubuk menggunakan alat akan memudahkan pelepasan komponen aktif pada seduhan saat proses penyeduhan (Lestari dkk., 2018a). Proses penggilingan (pengecilan ukuran) yang baik tidak mempengaruhi sifat kimia dari konstituen ekstrak, dengan adanya penggilingan kelarutan senyawa kimia menjadi meningkat tanpa adanya perubahan kimia. Pengecilan ukuran menunjukkan pengaruh positif terhadap penghambatan enzim alfa-amilase (Hussain dkk., 2019). Pengecilan ukuran pada kondisi tertentu menunjukkan bahwa ukuran padatan yang terlalu halus juga dapat menimbulkan kerusakan pada senyawa yang mengakibatkan resiko kehilangan bahan aktif (Hidayat dkk., 2018).

Aktivitas antioksidan pada perlakuan ukuran bahan telah dilaporkan oleh Zaiter dkk. (2016) yang mengkaji aktivitas antioksidan menggunakan uji penangkal radikal DPPH. Penelitiannya menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak metanol/air bubuk daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) pada ukuran partikel 100-180 m (0,28 $\mu\text{g/mL}$ atau 0,28 ppm) memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan pada ukuran partikel 315-500 m (0,31 $\mu\text{g/mL}$ atau 0,31 ppm). Ukuran partikel memiliki pengaruh yang signifikan terhadap sifat antioksidan ekstrak tanaman. Aktivitas antioksidan berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif seperti fenol, flavonoid, tanin, glikosida, steroid, alkaloid yang memiliki dampak baik untuk kesehatan (Nur, 2011).

Aktivitas antioksidan dan inhibisi alfa-amilase seduhan bubuk daun kratom diduga ditimbulkan karena adanya proses pengecilan ukuran bubuk yang menyebabkan terjadinya peningkatan senyawa bioaktif selama proses ekstraksi. Yadav dkk. (2018) menyatakan bahwa pengecilan ukuran dapat mempercepat kelarutan komponen bioaktif pada seduhan. Pernyataan ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Margaretta dkk. (2011) dan Indriyani dkk. (2021) bahwa semakin kecil ukuran partikel maka laju perpindahan massa semakin meningkat dan jarak difusi semakin kecil sehingga jumlah senyawa bioaktif yang mudah larut semakin meningkat.

10. Analisa Data Regresi

Subandriyo (2020) memaparkan terkait korelasi dan regresi. Korelasi merupakan teknik analisis yang termasuk kedalam salah satu teknik pengukuran asosiasi atau hubungan (*measures of association*). Pengukuran asosiasi mengacu pada sekelompok teknik dalam statistik bivariat yang digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan antara dua variabel, yaitu variabel independen (bebas, dengan simbol x) dan variabel dependen (terikat, dengan simbol y). Dua variabel dikatakan berasosiasi jika perilaku variabel yang satu mempengaruhi variabel yang lain. Jika tidak terjadi pengaruh, maka kedua variabel tersebut disebut independen.

Teknik korelasi yang sering digunakan yaitu korelasi Pearson (data harus berskala interval atau rasio) dan korelasi rank Spearman (data berskala ordinal). Nilai korelasi (r) berkisar antara 1 sampai -1, nilai semakin mendekati 1 atau -1 berarti hubungan antara dua variabel semakin kuat, sebaliknya nilai mendekati 0 berarti hubungan antara dua variabel semakin lemah. Korelasi mempunyai kemungkinan pengujian hipotesis dua arah (*two tailed*). Nilai positif menunjukkan hubungan searah (x naik maka y naik) dan nilai negatif menunjukkan hubungan terbalik (x naik maka y turun). Menurut Sugiyono (2007) pedoman untuk memberikan interpretasi koefisien korelasi adalah 0,00-0,199 untuk sangat rendah, 0,20-0,399 untuk rendah, 0,40-0,599 untuk sedang, 0,60-0,799 untuk kuat dan 0,80 -1,000 untuk sangat kuat.

Analisis regresi pada dasarnya adalah studi mengenai ketergantungan satu variabel dependen (terikat) dengan satu atau lebih variabel independen (variabel penjelas/bebas), dengan tujuan untuk mengestimasi dan/ atau memprediksi rata-rata populasi atau nilai rata-rata variabel dependen berdasarkan nilai variabel independen yang diketahui. Pusat perhatian adalah pada upaya menjelaskan dan mengevaluasi hubungan antara suatu variabel dengan satu atau lebih variabel independen. Hasil analisis regresi adalah berupa koefisien regresi untuk masing-masing variabel independen. Koefisien ini diperoleh dengan cara memprediksi nilai variabel dependen dengan suatu persamaan.

Nilai regresi dalam bentuk Tabel *summary output* menunjukkan kekuatan hubungan antara model (variabel bebas) dengan variabel terikat. *Multiple R* (R majemuk) pada *regression statistics* adalah suatu ukuran untuk mengukur tingkat (keeratan) hubungan linear antara variabel terikat dengan seluruh variabel bebas secara

bersama-sama. Pada kasus dua variabel (variabel terikat dan variabel bebas), besaran r (biasa dituliskan dengan huruf kecil untuk dua variabel) dapat bernilai positif maupun negatif (antara -1 sampai 1). Nilai R yang lebih besar (+ atau -) menunjukkan hubungan yang lebih kuat. *R Square* (R^2) sering disebut dengan koefisien determinasi atau koefisien penentu, merupakan hasil pengkuadratan dari koefisien korelasi yang digunakan untuk mengukur kebaikan suai (*goodness of fit*) dari persamaan regresi atau sebagai ukuran kemampuan variabel bebas atau variabel x (variabel prediktor) dalam menjelaskan varian-varian variabel terikat atau variabel y (variabel respon). Nilai R^2 terletak antara 0% sampai 100%, dan kecocokan model dikatakan lebih baik kalau R^2 semakin mendekati 100%. *Adjusted R Square* adalah besarnya pengaruh atau kemampuan variabel bebas secara simultan dalam menjelaskan variabel terikat dengan memperhatikan standar error. *Standard Error* merupakan standar error dari estimasi variabel terikat. Angka ini dibandingkan dengan standar deviasi dari variabel terikat. Semakin kecil angka standar error dibandingkan angka standar deviasi dari variabel terikat maka model regresi semakin tepat dalam memprediksi variabel terikat. *Observations* adalah jumlah observasi yang dilibatkan dalam analisis.

B. Kerangka Konsep

Pengecilan ukuran merupakan salah satu faktor penting dapat mempengaruhi karakteristik bubuk yang dihasilkan. Pengecilan ukuran menyebabkan luas permukaan bahan semakin besar sehingga dapat mempercepat kelarutan suatu zat aktif kedalam seduhan (Yadav dkk., 2018). Pengecilan ukuran perlu diperhatikan dalam pengolahan seduhan bubuk daun kratom supaya dapat dihasilkan mutu seduhan yang diinginkan.

Ismail dkk. (2016) meneliti tentang ekstrak bubuk kering rumput laut (*Sargassum* sp) yang menggunakan pelarut campuran etanol dan air (perbandingan etanol:air sebesar 50:50) dan pelarut air panas (infusa) dengan variasi ukuran bubuk 2,0 mm (10 mesh) dan 0,25 mm (60 mesh). Ekstrak air pada bubuk 60 mesh menunjukkan total fenol dan aktivitas antioksidan sebesar $2,40 \pm 0,05$ mg GAE/g ekstrak ($0,24 \pm 0,05\%$) dengan %inhibisi sebesar $81,37 \pm 1,36\%$. Hasil ini secara signifikan lebih efisien dibandingkan dengan ekstrak dari campuran etanol dan air yang menunjukkan total fenol dan aktivitas antioksidan sebesar $1,76 \pm 0,02$ mg GAE/g ekstrak ($0,176 \pm 0,02\%$) dengan %inhibisi sebesar $53,75 \pm 0,92\%$.

Penelitian Miranda dkk. (2020) yang membuat ekstrak kakao sebagai sumber antioksidan menggunakan variasi etanol 70, 80 dan 90% dan ukuran bubuk 40, 60 dan 80 mesh, menunjukkan bahwa ekstrak dengan konsentrasi etanol 90% dan ukuran bubuk 80 mesh merupakan perlakuan terbaik dengan karakteristik rendemen sebesar $10,78 \pm 0,61\%$, total fenolik $110,65 \pm 0,80$ mg GAE/g ($11,065 \pm 0,80\%$), dan kapasitas antioksidan $55,08 \pm 0,78$ mg GAEAC/g ($5,508 \pm 0,78\%$). Penelitian lainnya membuat teh herbal daun kenikir menggunakan variasi ukuran bubuk 40, 60 dan 80 mesh, memperoleh hasil bahwa teh dengan ukuran bubuk 80 mesh memiliki karakteristik total fenol sebesar $83,85 \pm 0,12$ mg GAE/g ($8,385 \pm 0,12\%$), total flavonoid $7,25 \pm 0,12$ mg QE/g ($0,725 \pm 0,12\%$), vitamin C $2,05 \pm 0,27$ mg/g ($0,205 \pm 0,27\%$), dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) kategori sedang sebesar $157,87 \pm 0,08$ ppm (Indriyani dkk., 2021).

Penelitian Goboza dkk. (2020) mengkaji aktivitas antioksidan dan antidiabetes dari senyawa alkaloid indol murni berupa *vindoline* dan *vindoline* dalam ekstrak kasar daun *Catharanthus roseus* menggunakan pelarut yang berbeda, yaitu air, metanol, etil asetat dan diklorom metana. Senyawa *vindoline* dalam ekstrak kasar *Catharanthus roseus* pada pelarut dikloro-metana, etil asetat, metanol, dan air menunjukkan konsentrasi masing-masing sebesar $57,89 \mu\text{g/g}$ ($0,005789\%$), $57,32 \mu\text{g/g}$ ($0,005732\%$), $15,40 \mu\text{g/g}$ ($0,00154\%$), dan $7,056 \mu\text{g/g}$ ($0,0007056\%$). *Vindoline* menunjukkan sifat sebagai antioksidan dan antidiabetes. *Vindoline* sebagai antioksidan mampu menghambat kerusakan sel akibat kompleks radikal bebas dengan cara menyumbangkan atom hidrogennya pada senyawa radikal tersebut. *Vindoline* juga dapat meningkatkan sekresi insulin dengan merangsang sel β -pankreas namun hanya dalam keadaan hiperglikemik. Ekstrak air dari *C. roseus* pada konsentrasi 10% menunjukkan aktivitas penghambatan alfa-amilase sebesar 20%.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa terdapat hubungan perlakuan ukuran bubuk terhadap kadar senyawa bioaktif, aktivitas antioksidan dan inhibisi alfa-amilase. Oleh karena itu, penulis mengambil perlakuan ukuran bubuk 40, 60 dan 80 mesh dalam pembuatan seduhan bubuk daun kratom.

C. Hipotesis

1. Diduga ada hubungan yang sangat kuat antara perlakuan ukuran bubuk daun kratom terhadap kadar alkaloid total, aktivitas antioksidan dan inhibisi alfa-amilase seduhan.

-
2. Diduga ada hubungan yang sangat kuat antara alkaloid terhadap aktivitas antioksidan dan inhibisi alfa-amilase seduhan bubuk daun kratom.