

UJI PENGHAMBATAN AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI DARI DAUN *Antidesma montanum* Blume

Nofiantini, Berna Elya, dan Azizahwati
Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia
Kampus Baru UI, Depok 16424

ABSTRACT

α -Glucosidase inhibitor has known to be a therapeutic agent for diabetes mellitus (DM) treatment, especially type 2 DM. Based on previous studies. There are various plants that have the effect of inhibiting the activity of α -glucosidase, one of which is garu leaves (*Antidesma montanum* Blume). This research aimed to get the fraction which had the highest α -glucosidase inhibiting activity from ethanol extract of garu leaves and identify the chemical compounds from the most active fraction. Simplisia powder was extracted by maseration using 80% ethanol then fractionated using n-hexane, ethyl acetate, and methanol. Inhibitory activity test was performed by measuring absorbance of p-nitrophenol, which produced by reaction between α -glucosidase and p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, using microplate reader at 405 nm. The result showed that ethyl acetate fraction have the best α -glucosidase inhibitory activity with IC₅₀ values 138.38 ppm. The test of enzyme kinetics showed that ethyl acetate fraction inhibited competitively. The phytochemical screening showed that ethyl acetate fraction of garu leaves contained glycosides, tannins, and terpenes.

Keywords: α -glucosidase; diabetes mellitus; garu leaves

ABSTRAK

Penghambat α -glukosidase diketahui berperan sebagai agen terapeutik untuk pengobatan diabetes melitus (DM), khususnya DM tipe 2. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa terdapat berbagai tanaman yang memiliki efek penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase, salah satunya adalah daun garu (*Antidesma montanum* Blume). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh fraksi yang memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase tertinggi dari ekstrak etanol daun garu dan mengidentifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif. Serbuk simplisia diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 80% kemudian difraksinasi dengan n-heksana, etil asetat, dan metanol. Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan dengan mengukur serapan produk p-nitrofenol yang dihasilkan dari reaksi antara α -glukosidase dan substrat

Corresponding author: elya64@yahoo.com

p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menggunakan microplate reader pada λ 405 nm. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase terbaik dengan IC₅₀ 138,38 ppm. Hasil uji kinetika enzim menunjukkan fraksi etil asetat menghambat α -glukosidase secara kompetitif. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia menunjukkan bahwa fraksi etil asetat tersebut mengandung glikosida, tanin, dan terpen.

Kata Kunci : α -glukosidase; daun garu; diabetes melitus

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan sekumpulan gejala penyakit yang ditandai dengan kadar glukosa darah melebihi batas normal dan gangguan metabolisme insulin (Bosenberg, 2008). Penyakit ini sudah merupakan penyakit epidemi global, dimana prevalensi DM meningkat secara signifikan di seluruh belahan dunia. Data dari International Diabetic Federation (IDF) menunjukkan bahwa sekitar 366 juta orang di seluruh dunia (8,3% dari orang dewasa), diperkirakan mengidap DM pada tahun 2011 (Champe, Harvey, Ferrier, 2005). Pada tahun 2030 diprediksikan jumlah penderita DM dapat mencapai 552 juta orang, atau 1 dari 10 orang dewasa akan terkena DM (Dewi, 2013).

Penyakit DM dapat diobati dengan pemberian insulin, obat hipoglikemik oral, dan obat herbal (Elya et al, 2012). Mekanisme kerja obat hipoglikemik oral diantaranya merangsang sekresi insulin, meningkatkan sensitivitas reseptor, dan menghambat aktivitas α -glukosidase (Gautam et al, 2010). Obat-obatan golongan penghambat α -glukosidase dapat menunda penguraian karbohidrat dan sukrosa di usus halus. Adapun obat herbal dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah dan membantu

dalam mengontrol kondisi hiperglikemia yang lebih ringan pada diabetes tidak tergantung insulin. Salah satu mekanisme kerja obat herbal ialah menghambat penyerapan glukosa di usus sehingga mencegah peningkatan kadar glukosa dalam darah yang terjadi setelah makan (Murray et al, 200).

α -glukosidase dapat mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 karbohidrat sehingga melepaskan α -glukosa dan meningkatkan kadar glukosa darah setelah makan (Hongxiang et al, 2009). Mekanisme kerja senyawa penghambat α -glukosidase adalah menghambat hidrolase α -amilase pankreatik dan enzim-enzim pencernaan di usus halus seperti maltase, isomaltase, dan sukrase secara reversibel kompetitif, dimana enzim-enzim tersebut berperan dalam hidrolisis karbohidrat menjadi glukosa dan monosakarida lainnya. Akarbose adalah obat yang termasuk golongan penghambat α -glukosidase. Akarbose merupakan suatu oligosakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis*.

Enzim merupakan biomolekul berupa protein yang dapat mengkatalisis proses metabolisme di dalam tubuh. Enzim mengkatalisis konversi satu atau lebih substrat menjadi satu atau lebih senyawa

lain (produk) dengan meningkatkan laju reaksinya 106 kali lebih cepat jika dibandingkan tanpa katalis (Hongxiang et al, 2009). Enzim memiliki celah khusus yang disebut dengan active site (sisi aktif). Jika sisi aktif enzim berikatan dengan substrat, maka akan terbentuk kompleks enzim-substrat (ES). ES diubah menjadi enzim-produk (EP), kemudian terpecah menjadi enzim bebas dan produk. Laju reaksi yang dikatalisis enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya konsentrasi substrat, suhu, pH, dan waktu inkubasi (IDF, 2011). Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi hingga mencapai nilai maksimum (V_{max}). Namun jika penambahan substrat tidak lagi mempengaruhi laju reaksi enzim, maka enzim telah jenuh oleh substrat.

Kinetika enzim berhubungan dengan pengukuran laju reaksi terkatalisis enzim secara kuantitatif. Tipe penghambatan enzim ditentukan melalui analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten (K_m). Adapun K_m menyatakan hubungan antara variasi konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzimatik yang bervariasi, dimana didefinisikan sebagai konsentrasi substrat ketika enzim mencapai setengah dari laju maksimumnya. Tetapan K_m menggambarkan hubungan afinitas enzim terhadap substrat.

Metode *Lineweaver-Burk* membedakan antara penghambatan kompetitif dan nonkompetitif berdasarkan masih ada atau tidaknya efek penghambatan aktivitas enzim ketika konsentrasi substrat dinaikkan. Dengan adanya penghambat kompetitif, menyebabkan peningkatan

konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai $\frac{1}{2} V_{max}$ sehingga nilai K_m akan naik. Dengan penambahan substrat hingga konsentrasi tertentu, nilai V_{max} akan sama dengan kondisi saat sebelum dimasukkan penghambat, sehingga nilai V_{max} akan konstan. Adanya penghambat nonkompetitif tidak dapat diatasi dengan penambahan jumlah substrat karena penghambat nonkompetitif tidak mempengaruhi ikatan enzim dengan substrat, maka nilai K_m yang sebanding dengan konsentrasi substrat akan konstan dan V_{max} akan turun (Murray, 2009).

Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan dengan reaksi enzimatik. Metode spektrofotometri banyak digunakan dalam uji penghambatan aktivitas α -glukosidase secara *in vitro* dengan menggunakan substrat seperti p-Nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG). α -glukosidase akan menghidrolisis substrat PNPG menjadi p-nitrofenol dan glukosa (Sinaga & Wirawanni, 2012).

Indonesia kaya akan berbagai spesies tanaman yang berkhasiat sebagai bahan obat, termasuk obat untuk DM dan telah digunakan secara turun temurun karena efek sampingnya relatif kecil. Obat-obatan dari bahan tanaman pun memiliki harga yang cukup ekonomis. *Antidesma montanum* Blume berasal dari suku Euphorbiaceae dengan nama umum yakni tanaman garu. Berdasarkan penelitian terdahulu terbukti bahwa ekstrak etanol daun garu mengandung saponin, alkaloid, terpenoid/sterol, tanin, dan glikosida. Diketahui bahwa ekstrak etanol 80% dari daun garu memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase dengan IC_{50} 2,83

ppm (Wadkar et al, 2007). Namun belum dilakukan fraksinasi untuk mengetahui penghambatan aktivitas α -glukosidase dari beberapa fraksi dan identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi teraktifnya.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh fraksi yang memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase tertinggi dari ekstrak etanol daun garu dan mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif tersebut. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat bahwa daun garu dapat dikonsumsi sebagai pengobatan alternatif untuk penyakit DM.

METODE

Alat

Alat penggiling (Phillips), penangas air, pipet mikro 10-100 μ L dan 100-1000 μ L (Eppendorf dan Socorex), penguap vakum putar (Janke & Kunkel IKA, Jerman), pH meter (Eutech pH-510), timbangan analitik (Acculab), lemari pendingin (Panasonic), oven (Hotpack vacuum oven), vortex mixer (VM-2000), microplate reader, microtube (Eppendorf), penyaring Buchner, dan alkohol meter.

Bahan

Bahan uji berupa daun garu (*Antidesma montanum* Blume) yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi oleh Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. α -glukosidase yang berasal dari rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA), substrat

p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (Sigma-Aldrich, USA), bovine serum albumin (Merck, Jerman), akarbose (Dexa Medica, Indonesia), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), dimetil sulfoksida (Merck, Jerman), etil asetat teknis, heksana teknis, metanol teknis, etanol teknis, akua demineralisata (PT BRATACO).

Cara Kerja

1. Penyiapan Simplisia

Daun garu segar sebanyak 2,5 kg dikumpulkan lalu disortasi. Setelah itu dibersihkan dari pengotor dan dicuci dengan air mengalir, lalu disimpan di dalam ruangan ber-AC suhu 20oC hingga layu. Untuk proses pengeringan, simplisia dimasukkan ke dalam oven suhu 60oC selama 3 jam. Simplisia kering disortasi kembali untuk memisahkan pengotor yang tertinggal, kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan alat penggiling.

2. Ekstraksi

Serbuk daun sebanyak 716,2 g dimaserasi dengan 3 L etanol 80% selama 1 hari pada suhu kamar di dalam botol coklat. Rendamannya disaring, filtratnya disimpan, dan residunya diremaserasi lima kali. Filtrat dikumpulkan, diuapkan pelarutnya dengan rotary vaccum evaporator (suhu 500C), dan diuapkan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental diuapkan kembali pelarutnya dengan dimasukkan ke dalam oven vakum hingga diperoleh bobot yang konstan.

3. Fraksinasi

Ekstrak kental sejumlah 98,62 g difraksinasi berturut-turut secara

fraksinasi cair-cair dengan pelarut yang kepolarannya meningkat, yakni dimulai dari n-heksana, etil asetat, dan metanol. Ekstrak kental diencerkan dengan 300 mL air panas, diaduk hingga homogen dan dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi dengan n-heksana yang jumlahnya sama banyak dengan air sehingga akan diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi air. Fraksi n-heksana dipisahkan, lalu fraksi air difraksinasi dengan etil asetat, sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi etil asetat dipisahkan, fraksi air ditambahkan dengan metanol dan diuapkan, sehingga diperoleh fraksi metanol. Dari hasil penyarian diperoleh tiga fraksi, kemudian masing-masing fraksi dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak pekat.

4. Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Pengujian dilakukan pada ekstrak etanol 80% dan ketiga fraksi, yaitu fraksi n-heksan, etil asetat, dan metanol dengan konsentrasi masing-masing 1000 ppm. Sebanyak 30 μ L larutan sampel ditambahkan 36 μ L dapar fosfat pH 6,8 dan 17 μ L substrat. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian pada larutan sampel ditambahkan 17 μ L enzim, diinkubasi kembali 15 menit, dan ditambahkan 100 μ L natrium karbonat. Selanjutnya serapan diukur dengan microplate reader pada λ 405 nm. Untuk larutan kontrol sampel, natrium karbonat ditambahkan terlebih dahulu daripada enzim. Dilakukan pula pengujian blanko dan kontrol blanko dimana larutan sampel diganti dengan dimetilsulfoksida. Selanjutnya dihitung

persentase inhibisi dari tiap sampel uji. Pada sampel uji dengan persentase inhibisi tertinggi dilakukan uji penghambatan aktivitas α -glukosidase kembali, yakni dibuat lima konsentrasi dan diukur persentase penghambatannya pada tiap konsentrasi. Kemudian dihitung nilai IC50 dengan menggunakan persamaan regresi linier. Pengujian juga dilakukan pada akarbose sebagai kontrol positif.

5. Identifikasi Golongan Senyawa Kimia pada Fraksi Teraktif

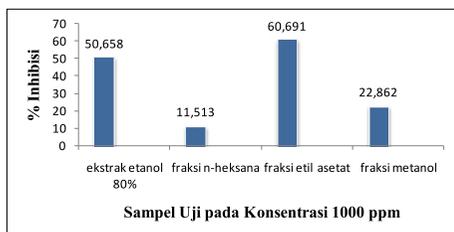
Pengujian dilakukan pada fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat. Golongan senyawa kimia yang terkandung di dalam fraksi yang aktif diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik. Identifikasi alkaloid diamati dengan pembentukan endapan setelah ditambahkan pereaksi Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff. Flavonoid dideteksi dengan pembentukan warna merah pada penambahan zink dan asam klorida pekat. Identifikasi glikosida diamati dengan terbentuknya cincin ungu setelah penambahan pereaksi Molisch. Tanin dapat dideteksi dengan terbentuknya endapan putih setelah penambahan gelatin 1% dan terbentuknya warna biru kehitaman setelah penambahan FeCl₃ 1%. Deteksi saponin dapat diamati dengan pembentukan busa setelah penambahan air panas dan asam klorida encer. Untuk identifikasi antrakuinon dilakukan dengan pengamatan warna jingga kemerahan setelah penambahan wash benzene dan natrium hidroksida encer. Deteksi sterol-terpen dilakukan dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard dan akan terbentuk warna biru kehijauan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

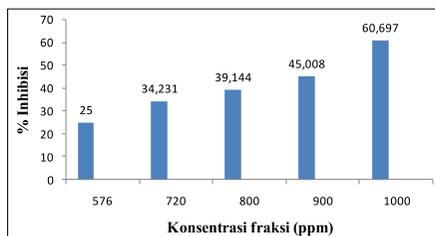
Uji Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Hasil uji menunjukkan bahwa persentase inhibisi untuk ekstrak etanol 80% sebesar 50,658%. Adapun nilai persentase inhibisi untuk fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol secara berturut-turut adalah 11,513%, 60,691%, dan 22,862%. Diagram batang perbandingan persentase inhibisi untuk ekstrak etanol dan ketiga fraksi dapat dilihat pada Gambar 1. Dengan demikian penentuan nilai IC₅₀ hanya dilakukan pada sampel uji dengan persentase inhibisi tertinggi yaitu fraksi etil asetat.

Hasil uji penghambatan aktivitas α -glukosidase pada fraksi etil asetat dengan menggunakan lima konsentrasi, yaitu 576; 720; 800; 900; dan 1000 ppm dapat dilihat pada Gambar 2. Dengan menggunakan persamaan regresi linier diketahui nilai IC₅₀ untuk fraksi etil asetat sebesar 138,38 ppm.



Gambar 1. Diagram batang perbandingan persentase inhibisi ekstrak etanol dan tiap fraksi pada konsentrasi 1000 ppm



Gambar 2. Persentase inhibisi tiap konsentrasi fraksi etil asetat

Untuk hasil uji IC₅₀ akarbose sebagai standar pembanding diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 38,37 ppm. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa akarbose mampu menghambat aktivitas dari α -glukosidase dengan baik, dimana nilai IC₅₀ dari fraksi etil asetat dan ekstrak etanol 80% lebih tinggi dari nilai IC₅₀ akarbose yang digunakan sebagai pembanding. Akarbose digunakan sebagai standar pembanding karena termasuk obat golongan penghambat aktivitas α -glukosidase yang mudah diperoleh dan telah umum digunakan sebagai standar uji untuk penghambatan aktivitas α -glukosidase. Selain itu akarbose memiliki kemiripan struktur dengan substrat p-Nitrofenil- α -D-glukopiranosida karena sama-sama merupakan bentuk karbohidrat.

Identifikasi Golongan Senyawa Kimia pada Fraksi Teraktif

Identifikasi golongan senyawa kimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi aktif yakni fraksi etil asetat yang diduga memiliki efek penghambatan aktivitas α -glukosidase. Berdasarkan hasil uji diketahui bahwa fraksi etil asetat daun garu mengandung golongan senyawa glikosida, tanin, dan terpen. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia pada fraksi etil asetat tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia pada fraksi etil asetat daun garu

| Golongan Senyawa Kimia | Standar/ Pemanding | Fraksi Etil Asetat Daun Garu |
|------------------------|---------------------|------------------------------|
| Sterol-Terpen | Caryophylli Flos | + |
| Alkaloid | Chinae Cortex | - |
| Flavonoid | Ortosiphonis Folium | - |
| Glikosida | Nerii Folium | + |
| Tanin | Theae Folium | + |
| Saponin | Ortosiphonis Folium | - |
| Antrakuinon | Rhei Radix | - |

KESIMPULAN

Ekstrak etanol dan ketiga fraksi dari daun garu (*Antidesma montanum* Blume) menunjukkan efek penghambatan terhadap aktivitas α -glukosidase dan fraksi etil asetat memiliki penghambatan terbaik dengan nilai IC₅₀ sebesar 138,38 ppm. Fraksi etil asetat tersebut mengandung golongan senyawa glikosida, terpen, dan tanin.

DAFTAR ACUAN

- Bosenberg LH. 2008. The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: review of recent literature. *The Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 13(3): 80-88.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. 2005. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Dewi RP. 2013. Faktor Risiko Perilaku yang Berhubungan dengan Kadar Gula Darah pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 di RSUD Kabupaten Karanganyar. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* 2(1).
- Elya B, Katrin, Mun'im A., Yuliastuti W, Bangun A., Kurnia SE. 2012. Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of apocynaceae, clusiaceae, euphorbiaceae, and rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-6.
- Gautam SP, Bundela PS, Pandey AK, Jamaluddin K, Awasthi MK, Sarsaiya S. 2010. Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International*. 11: 1-8.
- Harvey RA., Ferrier DR. 2011. *Lippincott's Illustrated Reviews : Biochemistry (5th ed.)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 57-61.
- Hongxiang H, Tang G, Liang WGV. 2009. Chinese Medicine: Hypoglycemic Herbs and Their Action Mechanisms. *Biomed Central* 4 (11) : 1-11.
- IDF. *One adult in ten will have diabetes by 2030*. 5th edition Diabetes Atlas, 2011.
- Murray R., Bender D, Botham K. Kennelly P, Rodwell V, Weil A. 2009. *Harper's Illustrated Biochemistry (28th ed.)*. New York: McGraw-Hill, 51-71.
- Sinaga E, Wirawanni Y. 2012. Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap

Kadar Glukosa Darah Puasa pada Wanita Prediabetes. *Journal of Nutrition College* 1(1) : 563-579.
Wadkar KA., Magdum CS, PatilSS,

Naikwade NS. 2007. Anti-diabetic Potential and Indian Medical Plants. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2(1) : 45-50.