

Original Research

UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM α -GLUKOSIDASE DARI ISOLAT FRAKSI ETIL ASETAT DAUN AREUY KIKUNTI (*Pothos junghuhnii* de Vriese) SECARA IN VITRO

TEST OF α -GLUCOSIDASE ENZYME INHIBITION ACTIVITY FROM ISOLATE ETHYL ACETATE FRACTION OF AREUY KIKUNTI LEAVES (*Pothos junghuhnii* de Vriese) IN VITRO

Purwati^{1*}, Delva Syaputri²

Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta utara, Indonesia, 14350

*E-mail: purwati@uta45jakarta.ac.id

Diterima : 06/05/2022

Direvisi : 27/05/2022

Disetujui : 26/08/2022

Abstrak

Diabetes melitus merupakan penyakit gangguan metabolisme yang kasus dan prevalensi terus melonjak selama beberapa dekade terakhir. Salah satu terapi diabetes melitus adalah dengan menghambat aktivitas α -glukosidase yang menghalangi penguraian disakarida sehingga menunda absorpsi glukosa dan menurunkan kadar glukosa postprandial. Beberapa genus *Pothos* banyak dimanfaatkan sebagai antidiabetes. Pada penelitian ini digunakan isolat fraksi etil asetat dari daun areuy (*Pothos junghuhnii* de Vriese) untuk mengidentifikasi senyawa aktif dengan spektrofotometri LC-MS dan uji aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase serta akarbose sebagai kontrol pembanding. Hasil identifikasi dari isolat nomor 47 diperoleh senyawa aktif berupa digiprolactone dengan formula $C_{11}H_{16}O_3$. Persen hambatan atau inhibisi tertinggi pada isolat fraksi etil asetat nomor 06 adalah 12.897 % dan nomor 47 sebesar 51.1 % pada konsentrasi 200 ppm, dibandingkan dengan akarbose 99.7 % pada konsentrasi 10 ppm. Nilai IC_{50} pada isolat fraksi etil asetat nomor 06 adalah 844.5 ppm tergolong sangat lemah dan nomor 47 adalah 202.6 ppm tergolong intensitas sedang.

Kata Kunci : Diabetes Melitus; Penghambatan α -glukosidase; *Pothos junghuhnii* de Vriese

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder disease whose cases and prevalence have continued to soar over the last few decades. One of the pharmacological therapies for diabetes mellitus is an agent that inhibits the activity of α -glucosidase which blocks the breakdown of disaccharides which has an impact on delaying glucose absorption, thereby reducing postprandial glucose levels. Several genera of *Pothos* are widely used as antidiabetic. In this study, the ethyl acetate fraction isolate from the leaves of areuy (*Pothos junghuhnii* de Vriese) was used to identify the active compound by LC-MS spectrophotometry and test its inhibitory activity against α -glucosidase and acarbose enzymes as a comparison control. The results of the identification of isolate number 47 obtained the active compound in the form of digiprolactone with the formula $C_{11}H_{16}O_3$. The highest percentage inhibition or inhibition in the ethyl acetate fraction isolate number 06 was 12.897% and number 47 was 51.1% at a concentration of 200 ppm, compared to acarbose 99.7% at a concentration of 10 ppm. The IC_{50} value for the ethyl acetate fraction isolate number 06 was 844.5 ppm which was classified as very weak and number 47 was 202.6 ppm which was classified as moderate intensity.

Keywords: Diabetes Mellitus; α -glucosidase inhibition; *Pothos junghuhnii* de Vriese

PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan penyakit kronis yang terjadi akibat resistensi insulin sehingga kadar gula darah meningkat. Diabetes melitus dikenal sebagai *silent killer* karena sering tidak disadari oleh penderita dan setelah diketahui, kondisinya sudah terjadi komplikasi [1]. Peningkatan Prevalensi diabetes melitus, berdasarkan data International Diabetes Federation (IDF) prevalensi diabetes melitus secara global pada tahun 2019 adalah 9,3% (463 juta orang) dan akan naik menjadi 10,2% (578 juta) pada tahun 2030 dan 10,9% (700 juta) pada tahun 2045 [2]. Pada tahun 2015 Indonesia menempati peringkat ketujuh penyandang diabetes melitus terbanyak di dunia dengan jumlah sebanyak 10 juta jiwa dan diperkirakan akan meningkat pada tahun 2040, yaitu sebanyak 16,2 juta jiwa [3].

Di Bangladesh, ekstrak batang dan akar tanaman *Pothos scandens* L. (*Araceae*) diisolasi dan diidentifikasi tiga ester aromatic hemiterpene glukosida, pothobanoside, fenilisobutanoid dan pothobanol. Pothobanoside dan pothobanol menghambat pelepasan histamin ke tingkat yang serupa dengan kontrol positif epigallocatechin. Potensi penghambatan pelepasan histamin dari isolat dapat mendukung penggunaan tanaman secara tradisional dalam pengembangan pengobatan tradisional di masa depan [4]. Penelitian pada ekstrak *Pothos scandens* menunjukkan bahwa tanaman memiliki beberapa aktivitas biologis yang beragam seperti antioksidan, antipiretik, antidiabetes, penangkal radikal bebas, penyembuhan luka bakar, antikarsinogenik, antiestrogenik, penghambatan hyaluronidase, histamin pelepasan inhibitor, antiseptik, antiinflamasi, antimikroba, antikanker, bronkodilator seperti aktivitas biologis tanaman [5].

Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat tradisional telah lama digunakan oleh masyarakat dunia termasuk pula Indonesia [6,7]. Di Indonesia Areuy Kikunti (*Pothos junghuhnii* de Vriese) dipercaya secara turun-temurun memiliki khasiat untuk meredakan panas dalam oleh masyarakat Kampung Adat Desa Urug, Kecamatan Sukajaya, Kabupaten Bogor. Penelitian yang dilakukan oleh Astuti pada tahun 2019 telah mengumpulkan 29 tumbuhan obat yang dimanfaatkan oleh masyarakat Kampung Adat Urug. Areuy Kikunti (*Pothos junghuhnii* de Vriese) mendapat nilai *Relatif Important* (RI) yang tinggi dari tanaman lainnya dan mengandung metabolit sekunder, seperti alkaloid, fenolik, steroid/triterpenoid, flavonoid dan kuinon. Penelitian tersebut hanya sampai pada skrining fitokimia sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat mengetahui aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dari daun areuy kikunti sehingga bermanfaat untuk kemajuan terapi diabetes melitus [8].

METODE

Sampel (Bahan) Penelitian

Cawan porselin, plastik pembungkus, aluminium foil, kaca arloji, chamber, pipa kapiler (Marienfeld), buret (Pyrex), botol vial 50 mL, spektrofotometri LC-MS (xevo G2-XS Qtof), lampu UV (Camag), *rotary vacuum evaporator* (Eyela), pinset, neraca analitik (Ohaus), *waterbath* (Mettler) erlenmeyer 100 mL (Duran), chamber, gelas ukur (Pyrex), labu ukur (Iwaki, Pyrex), *beaker glass* (Pyrex, Duran), pipet tetes, corong pisah 1000 mL (Iwaki, Pyrex), corong kaca, batang pengaduk, botol coklat. Daun Areuy Kikunti, aquadest, etil asetat (Merck), n-heksan (Merck), kloroform (Merck), metanol (PA : Merck), Silika gel 60 (F₂₅₄ : Merck), akarbosa, enzim α -glukosidase.

Prosedur kerja

Pemisahan dengan Metode Kromatografi Kolom

Fraksi etil asetat daun areuy kikunti dimurnikan dengan metode kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan adalah silika gel dan fase geraknya adalah n-heksan dan etil asetat, dengan metode gradien.

Identifikasi Isolat Fraksi Etil Asetat dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Isolat yang didapatkan dari kromatografi kolom diidentifikasi dengan metode kromatografi lapis tipis. Spot penotolan KLT diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm untuk dapat menghitung nilai faktor reterdasi dan HRF pada noda-noda yang terbentuk.

Identifikasi Senyawa Aktif dengan Spektrofotometri Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

Isolat fraksi etil asetat diidentifikasi menggunakan spektrofotometri LC-MS yang dilakukan di Badan Riset dan Inovasi Nasional, Pusat Riset Kimia, LIPI-Serpong.

Uji Penghambatan Aktivitas Enzim α -Glukosidase

Uji penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan di Biofarma, IPB-Bogor. Tahapan uji ini bertujuan untuk melihat daya inhibisi atau hambatan dari sampel dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Sampel yang digunakan adalah isolat fraksi etil asetat daun areuy kikunti dengan acarbose sebagai pembanding. Isolat yang digunakan sebanyak 0,03 gram dan di buat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 12,5 ppm; 25 ppm; 50 ppm; 100 ppm dan 200 ppm.

Analisa Data

Data yang diperoleh akan dianalisa dengan menggunakan persamaan regresi linear untuk mengetahui persen hambatan sampel pada enzim α -glukosidase.

Perhitungan persen Inhibisi dan IC₅₀

Aktivitas % inhibisi α -glukosidase dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blanko} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Blanko}} \times 100\%$$

IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai x dan % inhibisi sebagai sumbu y, yaitu dengan persamaan : $y = a + bx$

Nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan rumus :

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada kromatografi kolom fase gerak yang digunakan adalah N-heksan dan etil asetat serta untuk fase diamnya adalah silica gel 60 F₂₅₄. Perbandingan eluen menggunakan metode elusi gradien atau Solvent Gradien Polaritas (SGP), yaitu dengan berdasarkan kenaikan kepolaran pelarut. Perbandingan eluen N-heksan dan etil asetat, yaitu 100:0 ; 95:5 ; 9,25:7,5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30 ; 60:40 ; 50:50 ; 40:60 ; 30:70 dan 20:80. Semua filtrat ditampung di vial dan diuapkan diatas *waterbath* hingga kering, kemudian diamati warna dan bobotnya. Filtrat nomor 06 dan 47 dari perbandingan eluen 80:20, dipilih karena kejernihan warna dan ketersediaan bobotnya.

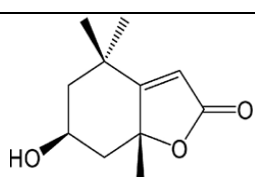
Isolat yang terpilih dilarutkan dengan etil asetat, kemudian ditotolkan pada plat KLT yang telah diberi garis batas atas dan bawah. Penotolan dilakukan sebanyak 2-3 kali, tunggu hingga kering lalu dimasukkan ke dalam chamber yang telah berisi etil asetat yang dijenuhkan. Kemudian tunggu beberapa saat hingga plat KLT terbasahi hingga garis batas atas. Plat KLT diangkat dan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Pengamatan dibawah sinar UV menampilkan bercak noda yang berfluoresensi pada plat KLT. Idealnya nilai Rf yang dapat dikatakan baik adalah 0,2 – 0,8 cm [9]. Diketahui nilai Rf isolat nomor 6 adalah 0,33 cm dan pada nomor 47 terdapat dua noda, yaitu dengan nilai Rf 0,46 cm dan 0,62 cm ketiga noda tersebut menghasilkan nilai Rf yang dapat dikategorikan baik.

Tabel. 1 Nilai Rf dan HRf

Isolat	Nilai Rf (cm)	HRf (%)
Nomor 06	0,33	33
Nomor 47	0,62	62

Pemeriksaan diidentifikasi senyawa aktif dengan spektrum *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) dilakukan di LIPI-Serpong. Hasil pemisahan dengan LC mendapatkan spektrum puncak setiap senyawa di dalam ekstrak dan kemudian dilanjutkan ke MS untuk penentuan data masa molekul senyawa kimia. Berdasarkan hasil analisa dari LC-MS terdapat senyawa aktif, yaitu C₁₁H₁₆O₃. Waktu retensi dinyatakan sebagai durasi waktu analisis suatu senyawa kimia dari di injeksi hingga terdeteksi, dimana pada fase terbalik zat yang lebih polar akan terelusi lebih dulu dan memiliki waktu retensi yang lebih cepat dibanding dengan zat non polar. Waktu retensi digiprolactone adalah 5,52 menit. *Retention time* atau waktu retensi dipengaruhi oleh beberapa hal, yaitu tekanan yang digunakan, temperature pada kolom, kondisi dari fase diam dan pelarut.

Tabel. 2 Identifikasi Senyawa Aktif Hasil LC-MS

Waktu Retensi (menit)	Bobot Molekul (m/z)	Kemungkinan Senyawa Menurut Chemspider	Formula	Struktur Molekul
5,52	197,116	<i>Digiprolactone</i>	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	

Digiprolactone adalah senyawa turunan fenolik yang termasuk lakton monoterpen. Senyawa ini mempunyai senyawa identik, yaitu loliolida. Pada tanaman *Sesbania grandiflora*

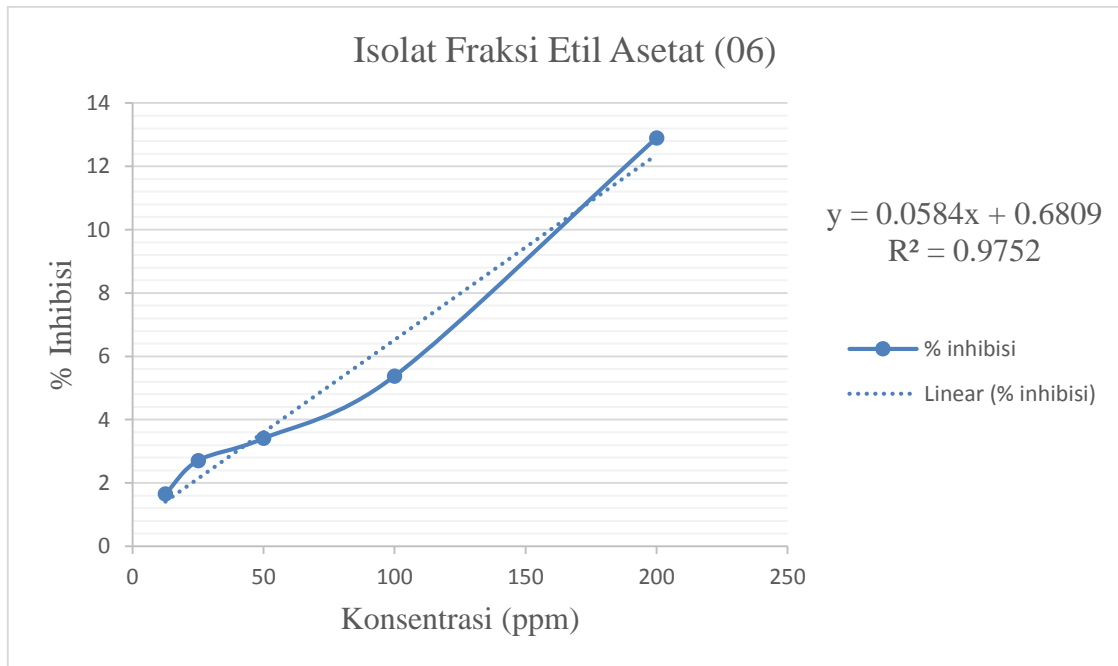
L. Poir. atau dalam bahasa Indonesia di kenal dengan tanaman turi. Pada ekstrak metanol *Sesbania grandiflora* L. Poir. teridentifikasi adanya senyawa aktif, yaitu loliolida dengan menggunakan *Liquid Chromatography-High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (LC-HRESIMS). Loliolida yang terdapat pada *Sesbania grandiflora* L. Poir. berpotensi sebagai inhibitor α -glukosidase karena terbukti memiliki intensitas sedang ($IC_{50} = 272,88$ ppm), namun belum adanya bukti klaim secara kimia atau alasan dalam literatur. Penelitian tersebut merupakan laporan pertama yang menyebutkan loliolida mampu menghambat aktivitas enzim α -glukosidase [10]. Dipenelitian lainnya loliolida juga memiliki bioaktivitas lainnya, seperti antidiare, antibakteri, antiinflamasi dan anthelmintik [11].

Uji aktivitas Penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka, Institut Pertanian Bogor. Uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase bertujuan untuk mengetahui aktivitas inhibitor pada beberapa variabel konsentrasi ekstrak yang diperhatikan dari nilai persen inhibisi atau yang disebut juga persen hambatan dan nilai IC_{50} dari isolat fraksi etil asetat daun areuy kikunti. Bobot isolat daun areuy kikunti sebanyak 0,03 gram dan dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 12,5 ppm; 25 ppm; 50 ppm; 100 ppm dan 200 ppm. Akarbosa digunakan sebagai kontrol pembanding.

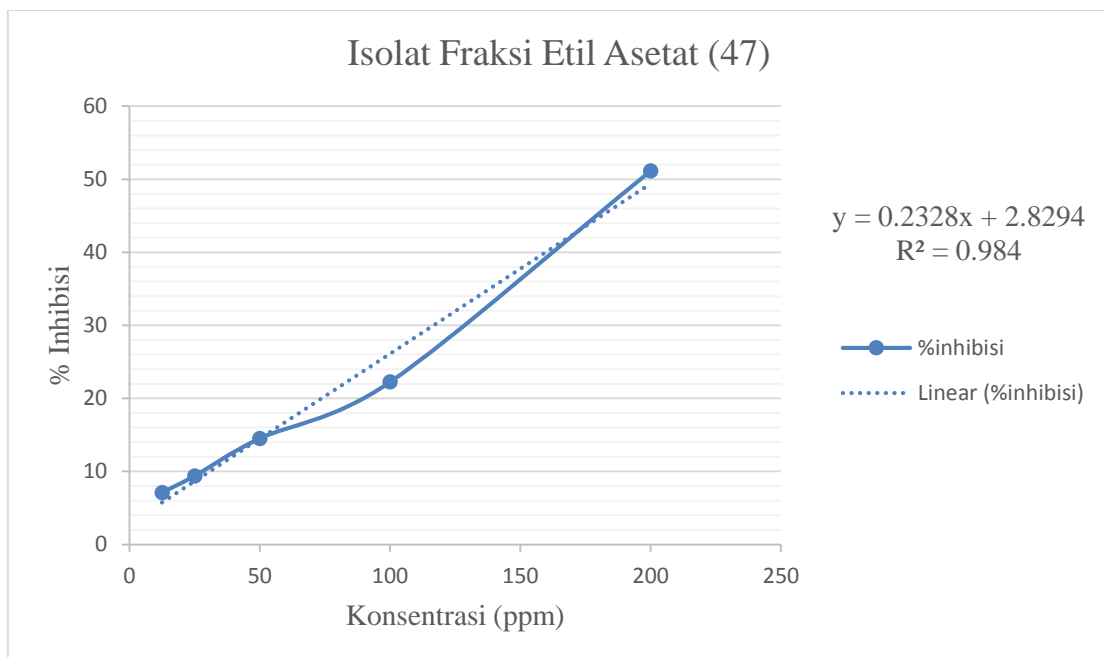
Tabel. 3 Hasil Uji Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Persamaan Regresi Linear	IC_{50} (ppm)
Isolat (06)	12.5	1.651	$y = 0.0584x + 0.6809$ $R^2 = 0.9752$	844.5
	25	2.705		
	50	3.407		
	100	5.374		
	200	12.897		
Isolat (47)	12.5	7.095	$y = 0.2328x + 2.8294$ $R^2 = 0.984$	202.6
	25	9.378		
	50	14.506		
	100	22.234		
	200	51.138		
Akarbosa	10.0	99.765	$y = 15.519\ln(x) + 64.544$ $R^2 = 0.9995$	0.3916
	5	90.118		
	1	64.000		
	0.5	54.588		
	0.1	28.471		

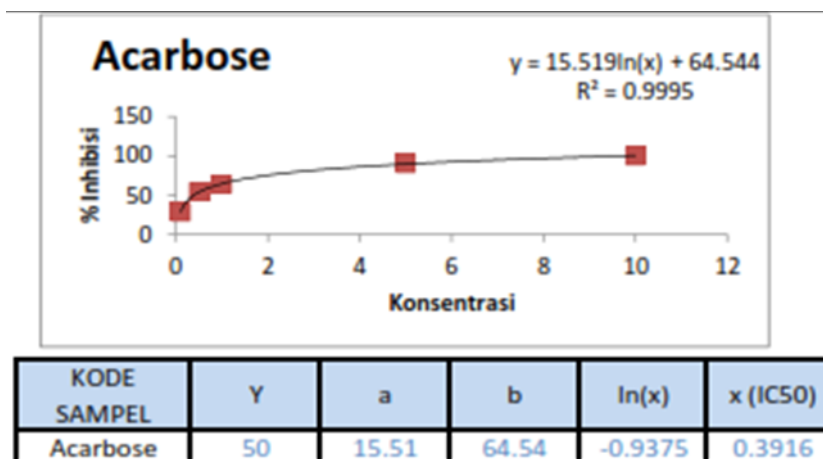
Hasil uji penghambatan enzim α -glukosidase dalam regresi linear dipaparkan dalam bentuk grafik sebagai berikut:



Gambar 1. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase Dengan Isolat Fraksi Etil Asetat (06)



Gambar 2. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase Dengan Isolat Fraksi Etil Asetat (47)



Gambar 3. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase Dengan Akarbosa

Tingkat intensitas IC_{50} di bagi dalam beberapa kategori, yaitu sangat kuat < 50 ppm, kuat $50 - 100$ ppm, sedang $100 - 250$ ppm, lemah $250 - 500$ ppm dan sangat lemah > 500 ppm [12]. Pada isolat daun areuy kikunti fraksi etil asetat nomor 06 diketahui mempunyai nilai IC_{50} 844.5 ppm, yang artinya termasuk ke dalam kategori intensitas yang sangat lemah, sedangkan pada isolat nomor 47 mempunyai nilai IC_{50} 202.6 ppm masuk ke kategori sedang. Pada akarbose mendapatkan nilai IC_{50} sebesar 0,3916 ppm yang termasuk dalam kategori sangat kuat. Jika membandingkan nilai IC_{50} isolat daun areuy kikunti fraksi etil asetat dan akarbose terdapat perbedaan yang signifikan yang mana diketahui bahwa sifat dari akarbose itu sendiri merupakan inhibitor α -glukosidase.

KESIMPULAN

Isolat fraksi etil asetat nomor 47 dari daun areuy kikunti (*Pothos junghuhnii* de Vriese) mengandung senyawa aktif digiprolactone yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim α -glukosidase sebesar 51.1% pada konsentrasi 200 ppm dan nilai IC_{50} 202.6 ppm yang tergolong sedang.

DAFTAR RUJUKAN

1. Al Goblas, A. A. M; Khan, M. Mechanism Linking Diabetes Mellitus and Obesity, Dove Press Journal Diabetes Methabolic Syndrome and Obesity: targets and Therapy, 2014;7(7): 587 – 591.
2. IDF. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. In Atlas de la DIABETES et la FID. 2019.
3. Balitbang Kemenkes, Hasil Riskesdas. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Jakarta. 2018.
4. Muhit, Md. A. Izumikawa. M, Umehara. K, and Noguchi. H. Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. Phytochemistry. 2016;121, 30–37.

5. Gupta, S., Singh, S., Gupta, R., Singh, T.G. Pharmacological and Phytochemical Updates on *Pothos scandens* L. *Pharmacogn. Commn.* 2018;8(4), 138-145.
6. Tanjung, R.H.R., Suharno, dan H.K Muary. *Potensi tumbuhan obat Papua. Edisi 2. Dialetika, Yogyakarta.* 2018.
7. Henuk, Y.L. Medical plants used in tradisional medicine and their roles—in Indonesia. *J Plant Pathol Microbiol.* 2017;8(5), 34-36.
8. Syahputra, G. S., Astuti, A. M., Piter., & Arbain, Dayar. *Kajian Etnofarmasi Tumbuhan Obat Kampung Adat Urug, Kecamatan Sukajaya, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia.* 2019;14(1), 14-28.
9. Rohman A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat.* Yogyakarta: Graha Ilmu.
10. Thissera, Bathini; Visvanathan, Rizliya; Khanfar, Mohammad A.; Qader, M. Mallique; Hassan, Marwa H.A., Hassan, Hossam M.; Bawazeer, Majed, Behery, Fathy A; Yaseen, Mohammed, Liyanage, Ruvini; Abdelmohsen, Usama R., Rateb, Mostafa E. *Sesbania grandiflora* L. Poir leaves: A dietary supplement to alleviate type 2 diabetes through metabolic enzymes inhibition. *South African Journal of Botany,* 2020;130(0, 282-299).
11. Adnan, M., Chy, N.U., Mostafa Kamal, A.T.M., Azad, M.O.K., Paul, A., Uddin, S.B., Barlow, J.W., Faruque, M.O., Park, C.H., Cho, D.H., Investigation of the Biological Activities and Characterization of Bioactive Constituents of *Ophiorrhiza rugosa* var. *prostrata* (D. Don) & *Mondal* Leaves through In Vivo, In Vitro, and In Silico Approaches. *Molecules.* 2019;24 (7), 1367.
12. Molyneux, P. The use of stable free radical diphenylpicril-hydrazyl (DPPH) for estimating antioksidan activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004;26(2) : 211-219.