AKTIVITAS PENGHAMBATAN ENZIM α-GLUKOSIDASE EKSTRAK DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN SALAM (Syzygium polyanthum (Wight) Walp.)

Aufa Ali Fajar Nanda Nasukha^{1,*)}, Lilik Sulastri¹, Partomuan Simanjuntak^{2,3}

¹Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor; ²Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional (BBOOT), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong; ³Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jakarta ^{*)}E-mail: aufaali22@gmail.com

Diterbitkan: 01 Maret 2023

ABSTRAK

Diabetes Mellitus (DM) adalah penyakit kronis yang disebabkan oleh ketidakmampuan pankreas untuk memproduksi insulin yang ditandai dengan hiperglikemia. Salah satu terapi yang digunakan untuk menurunkan kadar glukosa darah adalah dengan menggunakan obat yang memiliki mekanisme kerja dengan menghambat enzim α-glukosidase, sehingga dapat menunda penyerapan glukosa di saluran pencernaan. Salah satu tanaman yang berpotensi menghambat enzim α-glukosidase adalah daun salam. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak etil asetat dan fraksi kromatografi kolom daun salam dalam menghambat enzim α-glukosidase. Ekstrak etil asetat diperoleh melalui proses partisi cair-cair dari ekstrak etanol 96%. Ekstrak etil asetat dipisahkan dengan fraksinasi menggunakan kromatografi kolom (SiO₂; *n*-heksan - etilasetat = 10 : 1 ~ 1 : 1). Pengujian aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase dengan IC₅₀ sebesar 87,93 ppm. Fraksi F-5.5 merupakan fraksi terbaik dengan nilai IC₅₀ sebesar 18,99 ppm. Aktivitas akarbosa dalam menghambat enzim α-glukosidase memiliki nilai IC₅₀ sebesar 18,05 ppm.

Kata kunci : enzim α-glukosidase; antidiabetes; daun salam, Syzygium polyanthum

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic disease caused by the inability of the pancreas to produce insulin which is characterized by hyperglycemia. One of the therapies used to lower blood glucose levels is drugs that have a mechanism to inhibit the α -glucosidase enzyme, so that it can delay the glucose absorption in the digestive tract. One of the plants that has the potential to inhibit the α -glucosidase enzyme is bay leaf. The intention of this study was determine the activity of ethyl acetate extract and chromatographic fraction of bay leaf in inhibiting the α -glucosidase enzyme. A liquid-partition process from 96% ethanol extract was carried out to obtain ethyl acetate extract. The ethyl acetat extract was separated by fractionation using chromatography and TLC with pNPG substrate and acarbose positive control. The inhibitory activity testing of the α -glucosidase enzyme was executed using an ELISA reader with a wavelength of 405 nm. The result revealed that the ethyl acetate extract had inhibitory activity of the α -glucosidase enzym with an IC50 of 79,65 ppm. The F-5.5 fraction was the best fraction with an IC50 value of 18,99 ppm. The acarbose activity in inhibiting the α -glucosidase enzyme had an IC50 value of 18,05 ppm.

Keywords: α-glucosidase, antidiabetic, Salam leaves, Syzygium polyanthum

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus merupakan penyakit yang disebabkan oleh gangguan pankreas dalam memproduksi insulin oleh sel β Langerhans kelenjar pankreas atau dapat juga disebabkan karena kurangnya responsif tubuh terhadap insulin. Menurut *International Diabetes*

Federation (IDF) memperkirakan adanya kenaikan jumlah penderita DM di Indonesia dari 9,1 juta jiwa pada tahun 2014 menjadi 14,1 juta jiwa pada tahun 2030. Menurut (WHO) juga memperkirakan jumlah penderita DM di Indonesia akan terus meningkat dari 8,4 juta jiwa di tahun 2000 menjadi 21,3 juta jiwa di tahun

2030. Saat ini Indonesia menempati posisi ke tujuh di dunia dengan jumlah angka kejadian 8,5 juta penduduk.salah satu mekanisme obat antidiabetik yang umum adalah dengan mencegah atau menunda pencernaan karbohidrat kompleks menjadi sakarida sederhana (glukosa). Bisa dilakukan dengan mengganggu aktivitas enzim yang penting untuk pencernaan karbohidrat, seperti α-glukosidase[1]. Untuk menurunkan resiko komplikasi diabetes melitus dan untuk mengurangi keparahan penyakit perlu dilakukannya terapi obat maupun tanpa obat [2].

Salah satu terapi dalam mengontrol kadar glukosa darah yaitu dengan cara menghambat enzim hidrolisis karbohidrat, seperti enzim αglukosidase untuk menunda absorpsi glukosa pada pencernaan [3] Penghambatan enzim glukosidase menyebabkan oligosakarida atau polisakarida tidak dapat terpecah semua menjadi monosakarida. Mengkonsumsi obat antidiabetes merupakan salah satu terapi yang sering digunakan. Namun, efek samping yang dapat ditimbulkan oleh beberapa obat DM juga perlu diperhatikan. Maka dari itu, pemanfaatan bahan alam merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk memperoleh obat yang lebih aman dengan efek samping yang lebih kecil . Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai penghambat enzim α-glukosidase adalah daun salam (Syzygium polyanthum (Wight.) Walp). Ekstrak etanol 96% daun salam dapat menghambat enzim α-glukosidase dengan nilai IC₅₀ sebesar 8,71 ppm.

Dalam mengeksplorasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak daun salam diperlukan tahapan fraksinasi menggunakan pelarut semi polar seperti etil asetat [4]. Ekstrak etil asetat daun salam (*Syzygium polyanthum*) juga memiliki efektivitas antidiabetes yang baik dengan dosis 95 mg/Kg BB terhadap penurunan kadar glukosa darah mencit putih jantan (*Mus musculus*) [5]. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak etilasetat daun salam dan hasil fraksinasi kromatografi Kolom sebagai penghambat enzim α-glukosidase.

METODOLOGI PENELITIAN Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etil asetat daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) dari Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional (BBO OT), BRIN Cibinong, etanol 96%, metanol,

akuades, etil asetat, serium sulfat, silica gel 60, cellite 545, dimetilsulfoksida (DMSO), dapar fosfat 0,1 M dan akarbosa (tablet 100 mg generik Dexa Medica),*p*-nitrofenil-α-D-glukopiranosida (*p*NPG), (Sigma-Aldrich N 1337-1G),enzim α-glukosidase (Sigma),NaH₂PO₄.H₂O, dapar fosfat pH 6,8, Natrium karbonat, kertas saring, kapas dan aluminium foil.

Alat yang digunakan adalah *chamber*, set KLT lempeng silika gel GF₂₅₄, lampu UV 254 dan 366 nm, *hotplate* (Maspion), timbangan analitik (precisa 240 A), kolom kromatografi, inkubator (Firlabo), vial, mikropipet (ThermoScientifie), oven (Memmert),pH meter, *rotary vacuum evaporator* (Stuart RE300DB), penangas air, *mikroplate* (Thermo Scientifie NUNC), *thermometer*), set kolom kromatografi, inkubator (Firlabo), ELISA *Reader* (Thermo Electron Corporation).

PROSEDUR PENELITIAN

Penelitian ini diawali dengan pengujian enzim α-glukosidase ekstrak etil asetat daun salam kemudian menentukan nilai IC50, Dilanjutkan menggunakan isolasi metode dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom pertama kemudian dilakukan pengujian dari hasil isolasi untuk mendapatkan nilai persen inhibisi terbaik untuk dilanjutkan ke tahap Kromatografi Kolom kedua. Isolat yang diperoleh dari hasil kromatografi kolom kedua, dilakukan pengujian aktivitas kembali untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dan dibandingkan dengan kontrol positif akarbosa.

Uji Penghambatan Enzim α-Glukosidase

Pengujian aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase dilakukan menggunakan metode yang telah dimodifikasi [6].

Analisis Data Aktivitas Antidiabetes

Hasil pengukuran absorbansi yang telah diperoleh kemudian dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linear dari kurva *p*-nitrofenol, sebagai berikut [7]:

$$\% \ Inhibisi = \frac{(Abs\ kontrol\ negatif\ -\ Abs\ blanko) -\ Abs\ sampel}{Abs\ kontrol\ negatif\ -\ Abs\ blanko} \times 100\%$$

Data persen penghambatan yang telah didapatkan digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . Dengan rumus persamaan regresi linear y = a+bx, sebagai berikut

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

Keterangan : persamaan regresi linear antara

konsentrasi pada sumbu X dengan persen inhibisi pada sumbu Y.

Tabel 1. Skema Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α-Glukosidase

No.	Bahan	Blanko	Κ(-) (μl)	K(+) (μl)	Sampel (µl)
1.	Fraksi etil asetat	-	-	-	50
2.	Akarbosa	-	-	50	-
3.	DMSO	5	5	-	-
4.	Dapar fosfat pH 6,8	95	60	15	15
5.	Substart pNPG 5 mM	-	10	10	10
	Inkubasi	pada suhu 37°C	selama 5 men	nit	
6.	Enzim α-glukosidase 0,15 U/ml	-	25	25	25
	Inkubasi	pada suhu 37°C	selama 5 men	nit	
7.	Na ₂ CO ₃ 200 mM	100	100	100	100
_					

Keterangan:

Blanko = Campuran tanpa sampel dan enzim

Kontrol (-) = Campuran tanpa sampel dengan tambahan enzim.

Kontrol(+) = Pembanding sampel (akarbosa)

Sampel = Campuran fraksi etil asetat dengan penambahan enzim.

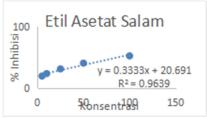
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Penghambatan Enzim α-Glukosidase dari Ekstrak Etil Asetat Daun Salam

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Etil Asetat Daun Salam

	Duan Salam		
No	Konsentrasi (ppm)	Inhibisi (%)	IC ₅₀
1	100	67,70 ± 0,001	87,93 ± 0,75

Hasil pengujian aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase ekstrak etil asetat daun salam dengan konsentrasi 100 ppm memiliki nilai absorbansi sebesar 0,281 dengan inhibisi sebesar 67,701%. Hasil pengujian IC₅₀ dapat dilihat pada kurva regresi linear pada Gambar



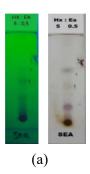
Gambar 1. Kurva regresi linear Ekstrak Etil Asetat Daun Salam

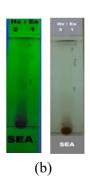
Berdasarkan hasil data diatas, dengan nilai persamaan regresi linear y=0,3333x+20,691 diperoleh konsentrasi yang dapat menghambat 50% proses hidrolisis *p*-nitrofenil dari sampel uji yaitu sebesar 87,935 ppm.

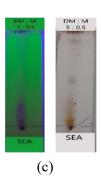
Isolasi dan Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat Daun Salam

Metode Kromatografi Lapis Tipis

Analisis Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mengetahui pola kromatogram dari fase gerak yang cocok sehingga dapat digunakan pada kromatografi kolom. Ekstrak etil asetat dianalisis dengan menggunakan KLT dengan fase diam berupa silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak berupa nheksan~etil asetat (10:1),*n*-heksan~etil asetat(5:1), *n*-heksan~etil asetat (2:1)nheksan~etil asetat (1:1)dichlorometan~metanol (5:1). Serta digunakan serium sulfat 1% sebagai penampak bercak noda. Hasil kromatogram lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 2.







Gambar 2. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etil Asetat Daun Salam, *n*-heksan~etil asetat10:1 (a), *n*-heksan~etil asetat2:1 (b), diklorometan~metanol 10:1 (c).

Berdasarkan pola kromatogram yang muncul, diperoleh pola yang baik terjadi pada fase gerak *n*-heksan~etil asetat (10:1) karena bercak noda berada di tengah tengah plat. Atas dasar itu, kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan fase gerak *n*-heksan~etil asetat (10:1~2:1) bertujuan untuk memisahkan senyawa secara bertahap dan menghasilkan pemisahan senyawa yang baik.

Metode Kromatografi Kolom Kromatografi Kolom I

Hasil fraksinasi didapatkan 166 fraksi dengan volume botol ± 80 ml menggunakan komposisi pelarut *n*-heksan~etil asetat (10:1~2:1) kemudian dibersihkan menggunakan metanol sebanyak 400ml dan etil asetat sebanyak 200 ml. Proses isolasi dilanjutkan dengan KLT kemudian dianalisis untuk penggabungan fraksi sesuai dengan pola kromatogram yang sama. Hasil analisis KLT didapatkan 8 fraksi dengan pola kromatogram yang sama dan akan dilanjutkan pada pengujian aktivitas hasil dari kromatografi kolom I.

Pengujian Aktivitas Hasil Kromatografi Kolom I

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α-Glukosidase dari hasil kromatografi kolom pertama bertujuan untuk mendapatkan % inhibisi terbaik dari kromatografi kolom pertama yang akan digunakan pada kromatografi kolom selanjutnya. Hasil pengujian aktivitas kolom I dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Kromatografi Kolom I

No.	Sampel	% inhibisi	IC ₅₀ F-5
1.	F-1	$43,94 \pm 7,86$	
2.	F-2	$42,64 \pm 0,20$	
3.	F-3	$61,34 \pm 0,67$	
4.	F-4	$39,27 \pm 2,63$	
5.	F-5	$52,64 \pm 1,26$	79,65±1,08
6.	F-6	$34,21 \pm 4,06$	
7.	F-7	$34,90 \pm 5,34$	
8.	F-8	$35,51 \pm 1,72$	

Berdasarkan hasil kromatografi kolom pertama, dalam F-3 memiliki persentase terbesar dibandingkan dengan fraksi lainnya dalam menghambat enzim α-glukosidase. Hasil kolom pertama juga menunjukkan bahwa fraksi F-3 memiliki persentase vang lebih dibandingkan ekstrak etil asetat daun salam. Fraksi yang memiliki aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase yang paling baik, akan dilanjutkan untuk dilakukan kromatografi kolom kedua. Sebelum dilakukannya kolom kedua, terlebih dahulu dilakukan KLT menggunakan larutan standar β-sitosterol untuk menghindari terisolasinya senyawa tersebut pada penelitian ini karena aktivitas β-sitosterol dari etil asetat daun salam yang dapat menghambat enzim αglukosidase telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Atas dasar itu, Fraksi F-5 akan digunakan pada kromatografi kolom selanjutnya.

Kromatografi Kolom II

Hasil dari kromatografi kolom kedua yaitu sebanyak 83 fraksi menggunakan botol dengan volume ± 50 ml menggunakan eluen *n*-heksan:etil asetat dengan perbandingan (5:1 \sim 2:1). Kemudian

dari 83 fraksi tersebut dilakukan KLT untuk menggabungkan beberapa fraksi berdasarkan pola kromatogram yang sama sehingga diperoleh 8 fraksi.

Pengujian Aktivitas Hasil Kromatografi Kolom II

Tabel 4. Hasil Pengujian Aktivitas Kromatografi

Kolom II		
No.	Sampel	% inhibisi
1.	F-5.1	$31,76 \pm 15,54$
2.	F-5.2	$28,30 \pm 7,95$
3.	F-5.3	$18,12 \pm 11,71$
4.	F-5.4	$19,79 \pm 10,70$
5.	F-5.5	$52,90 \pm 0,11$
6.	F-5.6	$38,59 \pm 9,29$
7.	F-5.7	$26,84 \pm 0,19$
8.	F-5.8	$18,90 \pm 0,22$

Subfraksi yang menunjukkan aktivitas tertinggi dalam penghambatan enzim α-glukosidase yaitu F-5.5 yang memiliki persentase inhibisi sebesar 52,908%. Hal ini ditunjukkan dari hasil pengukuran bahwa subfraksi F-5.5 memiliki serapan yang paling rendah. Serapan tersebut menunjukkan bahwa jumlah *p*-nitrofenil yang terhidrolisis hanya sedikit, sehingga monosakarida yang terbentuk juga sedikit

Hasil IC₅₀ Kromatografi Kolom Kedua Pada Fraksi F-5.5

Tabel 5. Nilai IC₅₀ Kromatografi Kolom II

No	Konsentrasi (Ppm)	Rata- Rata Inhibisi (%)	IC ₅₀ (Ppm)	
1	2	34,22		
2	5	40,00		
3	10	42,31	$18,99\pm1,00$	
4	20	52,56		
5	40	66,25		

Konsentrasi yang diperoleh dari F-5.5 yang dapat menghambat 50% dari proses terhidrolisisnya p-nitrofenil yaitu pada konsentrasi 20 ppm dengan nilai inhibisi sebesar 52,562% dan nilai IC₅₀ sebesar 18,99 ppm.

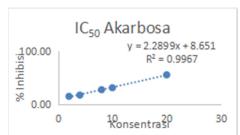
Nilai IC₅₀ Akarbosa Sebagai Kontrol Positif

Nilai persen inhibisi yang diperoleh dari kontrol positif Akarbosa terhadap enzim α -glukosidase dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Nilai Persen Inhibisi Akarbosa

No	Konsentrasi	Inhibisi (%)	IC50 (ppm)
1	2	14,52	
2	4	16,92	$18,05 \pm$
3	8	26,95	0,43
4	10	30,69	
5	20	54,94	

Nilai persamaan regresi linear yang diperoleh adalah y = 2,2899 x + 8,651 dengan nilai $R^2 = 0,9967$ dan kurva regresi linear dapat dilihat pada Gambar 3.



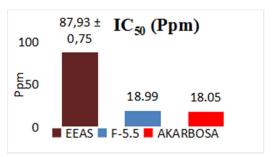
Gambar 3. Kurva regresi linear akarbosa

Berdasarkan hasil tersebut, nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan regresi linear y=2,2899x+8,651 menunjukkan bahwa akarbosa sangat aktif dalam menghambat setengah aktivitas hidrolisis oleh enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} sebesar 18,057 ppm. Subekstrak etil asetat daun salam (F-5.5) memiliki aktivitas yang tidak jauh berbeda dengan kontrol positif akarbosa yaitu sebesar 18,99 ppm. Namun, nilai IC_{50} akarbosa menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan F-5.5

Grafik Perbandingan Nilai IC50 Ekstrak Etil Asetat Daun salam, Fraksi 5.5 dan Kontrol Positif Akarbosa

Berdasarkan hasil yang diperoleh, ekstrak etil asetat daun salam memiliki nilai IC₅₀ sebesar 87,93 ppm sedangkan isolat ekstrak etil asetat daun salam memiliki nilai IC₅₀ sebesar 18,99 ppm. Semakin kecil nilai IC₅₀ yang diperoleh maka aktivitasnya semakin baik. Dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun salam bersifat antagonis yang artinya apabila senyawa tersebut masih dalam satu kesatuan, maka kekuatan dalam penghambatan enzim α-glukosidase tidak maksimal sedangkan pada saat senyawa tersebut telah dipisahkan, maka kekuatan masing-masing senyawa tersebut dapat lebih maksimal dalam penghambatan enzim α-glukosidase tidak maksimal sedangkan pada saat senyawa tersebut telah dipisahkan, maka kekuatan masing-masing senyawa tersebut dapat lebih maksimal dalam penghambatan enzim α-

glukosidase. Berbeda dengan sifat sinergis yang artinya bahwa senyawa dapat bekerja lebih maksimal saat dalam kondisi bersatu dengan senyawa yang lain. Namun, memberikan kinerja yang buruk setelah dipisahkan dengan senyawa yang lain.



Gambar 4. Grafik Perbandingan Nilai IC₅₀

KESIMPULAN

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh, fraksi F-5.5 (IC_{50} sebesar 18,99 ppm) memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase lebih baik dibandingkan dengan ekstrak etil asetat (IC_{50} sebesar 87,93 ppm) dengan kontrol positif akarbosa dengan nilai IC_{50} sebesar 18,05 ppm.

SARAN

Perlu dilakukan pemisahan senyawa kembali untuk mendapatkan senyawa tunggal dengan melihat profil metabolit yang dapat dilanjutkan ke tahap penentuan struktur kimia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada dan staf peneliti BBO OT Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memberikan fasilitas penelitian dan membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

[1] WHO. 1999. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and its complication. Geneva: World Health Organization Departement of Noncommunicable Disease Surveillance.

- [2] Depkes RI. 2006. *Pharmaceutical Care*Untuk Penyakit Diabetes Mellitus.
 Direktoran Jendral Bina Kefarmasian dan
 Alat Kesehatan Indonesia
- [3] Loranza, B. 2012. Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa-Glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif Daun Buni (*Antidesma bunius L.*) Depok: Universitas Indonesia
- [4] Jannah, U.A (2021) Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Ekstrak Daun Salam (Syzygium Polyanthum) Pelarut Etanol, Etil Asetat dan n- Heksana Hasil Ekstraksi Sonikasi. Malang. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- [5] Agustin, N. (2021). Uji Efektivitas Antidiabetes Ekstrak etil asetat Dan Aquades Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium Polyanthum Wight*) Pada Mencit Putih Jantan (*Mus Musculus*) Yang diinduksi Aloksan. Kediri: Universitas Kadiri.
- [6] Aziz, z., al qisthi, f.h., yuliana, n.d. and simanjuntak, p. (2019) identification of α-glucosidase enzyme inhibitor compound from ethanol 96% extract of yakon leaves (smallanthus sonchifolius [poepp.& endl.] h. robinson). *jurnal ilmukefarmasianindonesia*,17,21.https://doi.org/10.35814/jifi.v17i1.652
- [7] Alvionitasari, D. N., Sulastri, L., Desmiaty, Y., & Simanjuntak, P. (2021). Prosiding Seminar Nasional Kimia Dan Terapan 2021 Isbn 978-602-50942-6-2 Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Kimia Penghambat Enzim α Glukosidase Dari Fraksi Air Daun Salam (Syzygium Polyanthum) Prosiding Seminar Nasional Kimia Dan Terapan 2021. Dm, 16–22.