

Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi Etil Asetat Daun Pandan Wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) Dengan Metode α -Glukosidase

Dede Sukandar, La Ode Sumarlin, Hilyatuz Zahroh dan Eka Rizki Amelia

Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, Jalan Ir. H. Juanda No 95 Ciputat 15412 Indonesia Telp. (62-21) 7493606

Corresponding author: d_sukandar@hotmail.com

Abstrak

Telah dilaporkan hasil penelitian untuk mengetahui aktivitas antidiabetes setiap fraksi dalam ekstrak etil asetat daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) secara *in vitro* menggunakan metode α -glukosidase. Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat dan pemisahan komponen kimia dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil KLT dengan fase gerak n-heksan:etil asetat (3:1) dan penambahan 3 tetes asam asetat glasial menghasilkan lima fraksi dengan Rf masing-masing sebesar 0,20; 0,30; 0,55; 0,60; dan 0,70. Fraksi 2 memiliki aktivitas antidiabetes tertinggi dengan nilai IC_{50} relatif 77,57 ppm.

Kata kunci : antidiabetes, fraksi etil asetat, daun pandan wangi, α -glukosidase

Abstract

A research to know antidiabetes activity every fraction in ethyl acetate extract of fragrant screw pine leaf (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) *in vitro* applies α -glukosidase method has been reported. Extract made by the way of macerate to apply ethyl acetate solvent. Result of thin layer chromatography (TLC) with mobile phase n-heksan:ethyl acetate (3:1) and addition of 3 acetic acid drip glasial yields five fractions with Rf each of 0,20; 0,30; 0,55; 0,60; and 0,70. Fraction 2 has highest antidiabetic activity with relative IC_{50} value 77,57 ppm.

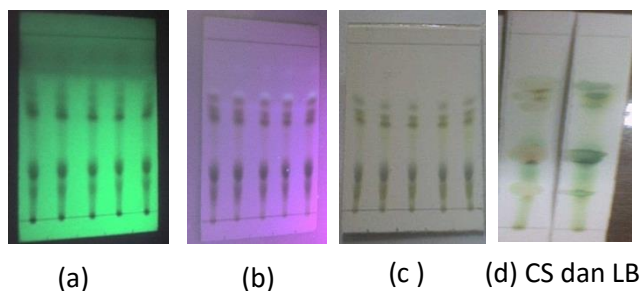
Keywords : antidiabetes, fraction of ethyl acetate, fragrant screw pine leaf, α -glukosidase

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang terletak di daerah khatulistiwa dan beriklim tropis. Indonesia memiliki sumber daya alam hayati yang sangat beranekaragam. Sumber daya alam hayati ini merupakan sumber senyawa kimia yang tak terbatas jenis dan jumlahnya. Oleh karena itu, keanekaragaman hayati dapat diartikan sebagai keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia untuk kebutuhan manusia, seperti obat-obatan, insektisida, kosmetika, dan sebagai bahan dasar sintesa senyawa organik yang lebih bermanfaat [1].

Pengobatan tradisional sebagian besar menggunakan ramuan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan baik berupa akar, batang, biji, bunga, daun, ataupun kulit kayu. Bagian-

bagian dari tumbuhan tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder yang terdiri dari empat golongan utama, yaitu steroid, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Senyawa metabolit sekunder tersebut memiliki aktivitas biologis. Salah satu di antaranya dapat mengobati penyakit diabetes melitus. Diabetes melitus adalah suatu penyakit dimana kadar glukosa (gula sederhana) di dalam darah relatif tinggi [2]. Menurut Dallimunthe [3], berdasarkan laporan *International Diabetes Federation* (IDF) jumlah penderita diabetes melitus telah meningkat secara mengkhawatirkan. Berdasarkan hasil survey yang dilakukan oleh organisasi kesehatan dunia (WHO), Indonesia merupakan negara keempat terbesar untuk prevalensi diabetes melitus setelah India, Cina, dan Amerika Serikat. Pengobatan diabetes



Gambar 1. Hasil Kromatografi Lapis Tipis
Keterangan: (a) UV₂₅₄ (b) UV₃₆₆ (c) Tanpa UV dan (d) Cerium Sulfat (CS) dan
Pereaksi Liberman-Burchard (LB)

melitus yang digunakan dalam dunia kedokteran adalah dengan injeksi insulin dan obat hipoglikemik oral (OHO) sintetik. Obat hipoglikemik oral (OHO) tersebut disintesis dari golongan sulfonilurea, biguanid, tiazolidindion, dan meglitinida. Namun penggunaan obat-obat tersebut relatif mengeluarkan biaya yang cukup mahal dan menghasilkan efek samping. Oleh karena itu, maka diperlukan obat alternatif dari berbagai jenis tumbuhan untuk mengobati penyakit dengan efek samping yang sangat kecil. Beberapa tumbuhan yang memiliki aktivitas antidiabetes, yaitu benih fenugreek (sapogenin, 50 mg/kg BB pada kelinci), daun sirih merah (flavonoid, 39,62% pada 10000 ppm), biji buah alpukat (0,980 g/kg BB pada kelinci), dan akar tumbuhan cendana (steroid glikosida, 50 mg/kg BB pada kelinci) [4].

Penelitian lainnya melaporkan bahwa ekstrak etil asetat daun pandan wangi memiliki aktivitas antidiabetes dengan aktivitas penghambatan (IC₅₀) sebesar 94,23 ppm. Adapun senyawa yang diduga memiliki aktivitas antidiabetes ini adalah steroid [5].

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan fraksinasi ekstrak etil asetat daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) serta pengujian aktivitas antidiabetes fraksi tersebut menggunakan metode α -glukosidase [6].

2. Metodologi Penelitian

Umum. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama 3x24 jam menggunakan pelarut etil asetat dan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* Buchi. Fraksinasi menggunakan lempeng silica gel Merck Kieselgel F₂₅₄ (ukuran 20x20 cm, tebal 0,2 mm) dengan eluen n-heksan:etil asetat (3:1) dan 3 tetes asam asetat glacial. Uji aktivitas antidiabetes dilakukan dengan metode α -glukosidase menggunakan pelarut p-nitrofenil α -glukopiranosida (PNP-G) dan spektrotometer UV-Vis merk Perkin Elmer Lambda 25.

Bahan Tumbuhan. Sampel daun pandan wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) diperoleh dari Balai Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Cimanggu, Bogor dan diperiksa di Herbarium Bogoriense Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong dan spesimennya disimpan di herbarium tersebut

Ekstraksi dan Fraksinasi. Sebanyak 25 g serbuk kering daun pandan wangi dimaserasi dengan etil asetat kualitas teknis (3 x 24 jam). Setelah dilakukan penyaringan, ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 70 °C. Ekstrak kemudian difraksinasi pada plat KLT silica gel Merck Kieselgel F₂₅₄ (ukuran 20x20 cm, tebal 0,2 mm) dengan eluen n-heksan:etil asetat (3:1) dan 3 tetes asam asetat glacial. Setiap bercak warna fraksi diamati menggunakan sinar UV₂₅₄ dan UV₃₆₆ dan

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antidiabetes

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	IC ₅₀ Relatif (ppm)
Kuersetin	3,125	43,702	3,50
	1,563	29,820	
	0,781	12,682	
	0,391	10,368	
Fraksi 1	25,000	38,817	218,79
	12,500	37,961	
	6,250	37,704	
	3,125	37,532	
Fraksi 2	25,000	40,531	77,57
	6,250	36,932	
	3,125	36,675	
Fraksi 3	25,000	36,675	192,87
	12,500	35,390	
	6,250	35,047	
	3,125	34,961	
Fraksi 4	25,000	38,046	103,55
	12,500	35,390	
	6,250	34,961	
	3,125	34,704	

identifikasi senyawa steroid menggunakan pereaksi cerium sulfat dan Lieberman Burchard.

Uji Antidiabetes. Sebanyak 30 lembar KLT preparatif fraksi 1-4 (3 mg) dilarutkan dalam DMSO dan dibuat larutan baku dengan variasi konsentrasi 10000; 5000; 2500; dan 1250 ppm. Sampel sebanyak 5 µL dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan 495 µL buffer fosfat pH 7 dan 250 µL PNP-α-D-glukopiranosida 20 mM. Setelah homogen, larutan dipreinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan 250 µL enzim α-glukopiranosidase

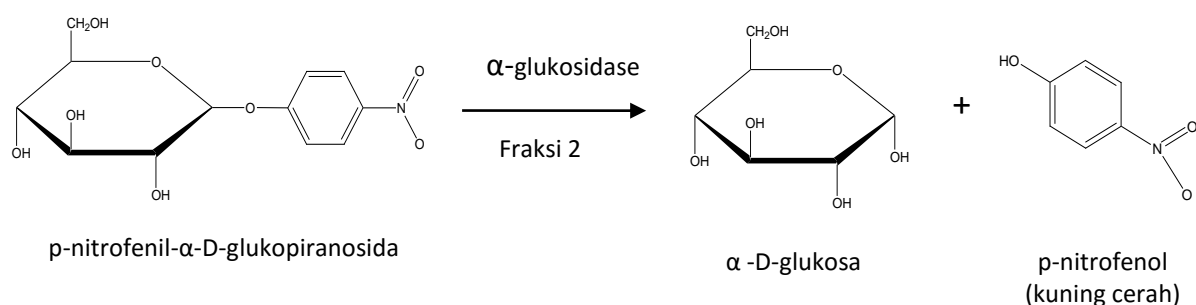
dan inkubasi dilanjutkan selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL Na₂CO₃ 0,2 M. Jumlah p-nitrofenol yang dihasilkan diukur pada panjang gelombang 400 nm. Selanjutnya dibuat preparasi sampel tanpa enzim α-glukopiranosidase dan larutan pembanding kuersetin (4 mg dalam 400 µL DMSO) dengan dengan cara yang sama. Setiap konsentrasi dibuat tiga kali pengulangan.

3. Hasil Dan Pembahasan

Hasil maserasi diperoleh ekstrak kental berwarna hijau (0,73 g) dengan rendemen 2,92%. Pemilihan pelarut etil asetat ini didasarkan hasil penelitian sebelumnya bahwa ekstrak etil asetat daun pandan wangi memiliki aktivitas antidiabetes (IC₅₀) sebesar 94,23 ppm [5]. Hasil fraksinasi diperoleh lima fraksi dengan R_f masing-masing sebesar 0,20; 0,30; 0,55; 0,60; dan 0,70 berdasarkan pengamatan menggunakan sinar UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Setiap fraksi positif terhadap uji steroid menggunakan pereaksi serum sulfat (merah) dan Lieberman Burchard (hijau kebiruan).

Aktivitas antidiabetes diuji dengan metode α-glukosidase terhadap fraksi 1-4. Sedangkan fraksi 5 tidak diuji karena jumlah sampel yang sangat sedikit. Fraksi 1-4 memiliki aktivitas antidiabetes dengan nilai IC₅₀ relatif masing-masing sebesar 218,79; 77,57; 192,87; dan 103,55 ppm. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi 2 memiliki aktivitas antidiabetes terbesar dengan nilai IC₅₀ relatif sebesar 77,57 ppm. Artinya, fraksi 2 mampu menghambat aktivitas enzim α-glukosidase sebesar 50% pada konsentrasi 77,57 ppm. Hasil uji antidiabetes fraksi 1-4 dapat dilihat pada tabel 1.

Kuersetin sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antidiabetes lebih besar dibandingkan fraksi 2 dengan nilai IC₅₀ relatif sebesar 3,50 ppm., fraksi 2 memiliki aktivitas antidiabetes yang lebih kecil [7]. Hal ini dimungkinkan karena fraksi 2 yang belum murni sehingga daya inhibisi fraksi 2 terhadap α-glukosidase bersifat lemah



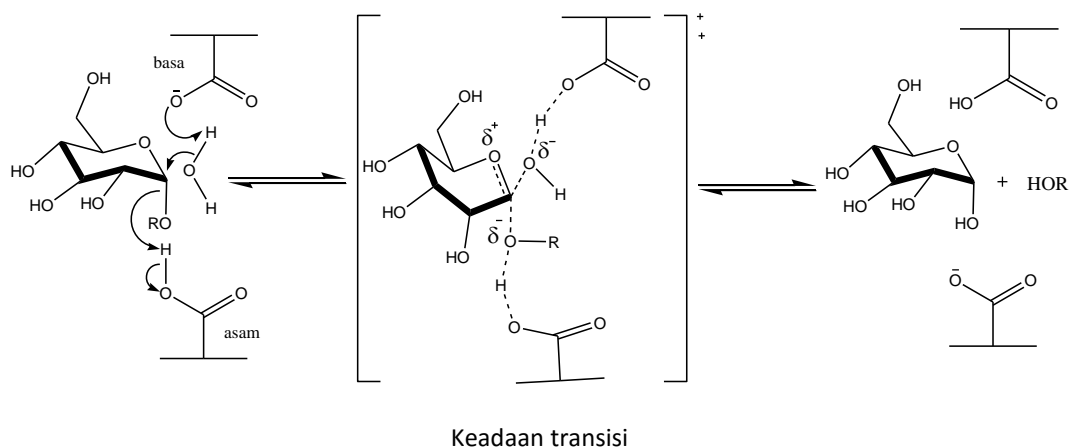
Gambar 2. Reaksi Uji Antidiabetes

daripada kuersetin. Akan tetapi aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase fraksi 2 (nilai % inhibisi sebesar 40,531% pada konsentrasi 25 ppm) lebih besar jika dibandingkan dengan ekstrak etanol daun sirih merah yang memiliki nilai % inhibisi sebesar 39,62% pada konsentrasi 10000 ppm [8].

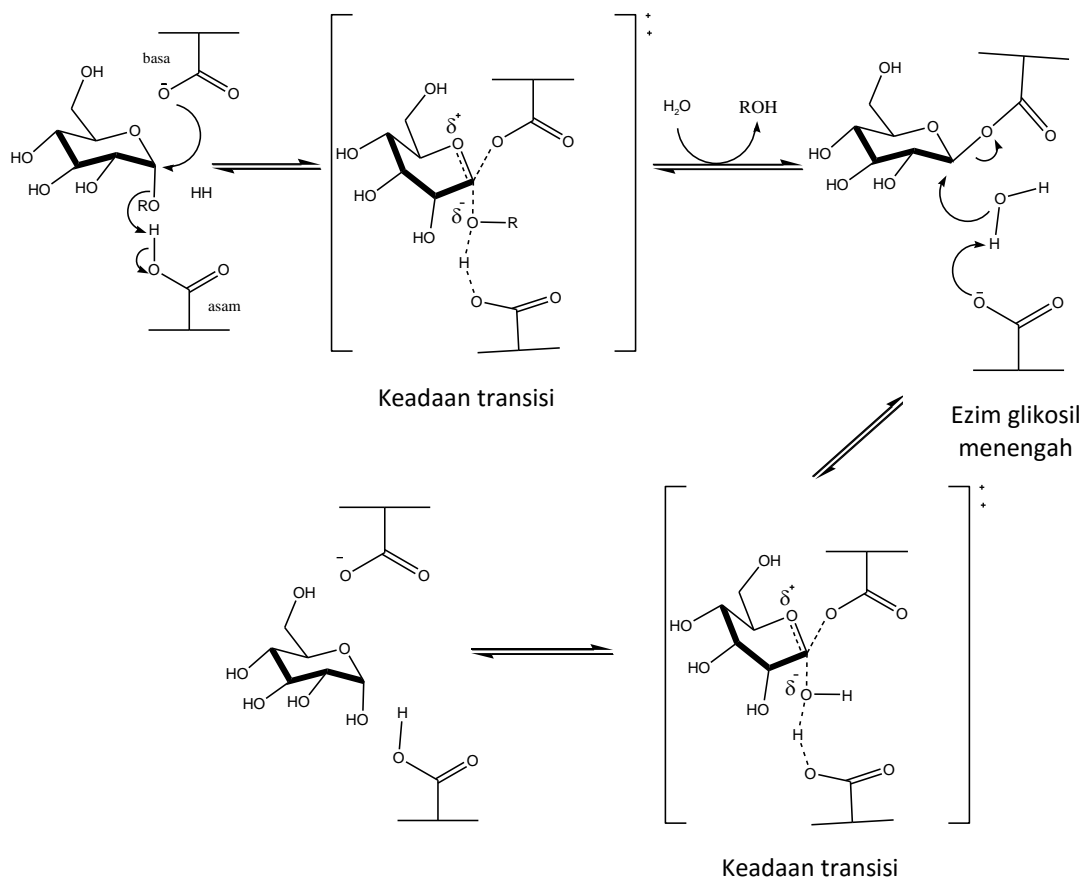
Pada uji antidiabetes, terjadi penguraian p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNP-G) oleh enzim α -glukosidase. Pada reaksi ini, PNP-G terhidrolisis menjadi α -D-glukosa dan p-nitrofenol. Indikator dalam reaksi ini adalah warna kuning dari p-nitrofenol. Semakin besar kemampuan inhibitor untuk menghambat, maka warna kuning yang dihasilkan akan semakin cerah jika dibandingkan dengan larutan tanpa inhibitor. Adapun reaksi uji antidiabetes menggunakan metode α -glukosidase dapat dilihat pada gambar 2.

Pada reaksi uji antidiabetes, fraksi 2 merupakan inhibitor reversibel terhadap enzim α -glukosidase yang digunakan untuk terapi DM. Inhibitor enzim ini bisa bersifat sebagai inhibitor kompetitif ataupun non-kompetitif. Fraksi 2 dapat menurunkan aktivitas enzim melalui pembentukan ikatan kovalen antara enzim dengan inhibitor.

Dua mekanisme yang umum digunakan untuk glikosidasi adalah efek pemutusan ikatan glikosidik dengan intervensi keseluruhan atau retensi stereokimia anomerik. Enzim pembalik mengalami pemutusan ikatan melalui dua residu asam karboksilat. Akan tetapi hanya satu karboksilat yang mengalami deprotonasi pada enzim dan berperan sebagai basa yang kehilangan proton (H_2O) selama menyerang karbon anomerik. Sedangkan asam karboksilat lainnya berperan sebagai residu asam yang mengalami protonasi [9]. Adapun mekanisme reaksinya dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme Reaksi Inversi α -Glukosidase



Gambar 4. Mekanisme Reaksi Pertahanan α -Glukosidase

Diperlukan dua mekanisme untuk mempertahankan glikosida yang melibatkan enzim glikosil. Tahap pertama (glikosilasi), salah satu residu berperan sebagai nukleofil yang menyerang pusat anomerik untuk menggantikan aglikon dan membentuk suatu enzim glikosil menengah (*intermediet*). Pada saat yang sama, residu lain berfungsi sebagai katalis asam dan protonasi oksigen glikosidik. Pada tahap kedua (deglikosilasi), enzim glikosil dihidrolisis oleh air dengan residu lainnya yang berperan sebagai katalis basa yang mengalami deprotonasi molekul air saat penyerangan [9]. Adapun mekanisme reaksi tersebut dapat dilihat pada gambar 4.

4. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu :

a. Hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun pandan wangi menghasilkan empat fraksi

dengan Rf masing-masing sebesar 0,20; 0,30; 0,55; 0,60; dan 0,70.

b. Hasil pengujian aktivitas antidiabetes menggunakan metode α -glukosidase menunjukkan fraksi 1-4 memiliki aktivitas antidiabetes dengan IC₅₀ relatif masing-masing sebesar 218,79; 77,57, 192,87, dan 103,55 ppm.

c. Fraksi 2 memiliki aktivitas antidiabetes terbesar dengan IC₅₀ relatif 77,57 ppm

Penghargaan

Terima kasih kami ucapkan kepada pimpinan dan staf Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong Jawa Barat, yang telah membantu mengidentifikasi spesimen tumbuhan. Terima kasih pula kami sampaikan kepada Kepala Laboratorium Kimia-LIPI Serpong, yang telah membantu pengujian aktivitas antidiabetes.

Daftar Pustaka

- [1] Lenny, S. 2006. *Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp*. USU Repository, Medan.
- [2] Soegondo, S. 2005. *Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus Terkini dalam Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*. Universitas Indonesia, Jakarta.
- [3] Dallimunthe. 2004. *Diabetes Melitus: Peranan Insulin, Reseptor Insulin, dan Penanganannya*. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- [4] Saleh, C. 2007. *Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (Santalum album Linn)*. Disertasi. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- [5] Sukandar, D., S. Hermanto, dan Almabrur, I., 2010. Aktivitas Senyawa Antidiabetes dari Ekstrak Etil Asetat Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.). *Jurnal Valensi Prodi Kimia FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta* (Vol. 1 No. 6): hal. 269-273.
- [6] Kim, Y. M. dan M. H. Wang. 2004. Inhibitory Effect of Pine Extract on α -Glucosidase Activity and Postprandial Hyperglycemia. *Elseiver* (Vol. 21): hal. 756-761.
- [7] Artanti, N. M. H dan L. B. S. Kardono. 2002. *Aktivitas Penghambatan Ekstrak Gambir (Uncaria Gambir Roxb.) dan Ekstrak Taxus sumatrana (Miquel) De Laubenfels terhadap Enzim α -Glukosidase*. Prosiding seminar Nasional V. "Kimia dalam Pembangunan". ISSN: 0854-4778:483-448.
- [8] Alfarabi, M. 2010. *Kajian Antidiabetogenik Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum) in vitro*. Tesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [9] Rempel, B. P. dan S. G. Withers. 2008. Covalent Inhibitors of Glucosidases and Their Applications in Biochemistry and Biology. *Review Glycobiology* (Vol. 18, No. 8): hal. 570-586.