

FRAKSINASI SENYAWA PENGHAMBAT ENZIM α -GLUKOSIDASE DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SAMBUNG NYAWA (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.)

Marwati, Subehan Lallo, Yusnita Rifai

Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar

Kata Kunci :

G. procumbens,
Fraksinasi,
 α -Glukosidase,
Diabetes Melitus

ABSTRAK

Daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*(Lour) Merr) merupakan salah satu tanaman yang memiliki senyawa yang berpotensi sebagai penghambat enzim α -glukosidase atau sebagai obat antidiabetes melitus. Penelitian ini bertujuan untuk memisahkan senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dan mengetahui jenis kinetika penghambatan berdasarkan grafik Lineweaver-Burk. Pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran pelarut. Uji aktivitas dilakukan pada ekstrak etanol, Fraksi n-heksan fraksi etil asetat dan fraksi air, dan kontrol positif acarbose yang diukur dengan micro plate reader pada panjang gelombang 405 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC50 berturut-turut pada ekstrak etanol 6,56 ppm, fraksi n-heksan sebesar 14,97 ppm, fraksi etil asetat 9,33 ppm, fraksi air 13,03 ppm dan acarbose 6,38 ppm serta mekanisme kinetika penghambatan enzim secara uncompetitive.

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara tropis memiliki beraneka ragam tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebanyak-banyaknya untuk kepentingan manusia. Masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu telah mengenal tanaman yang mempunyai khasiat obat atau menyembuhkan berbagai macam penyakit. Tanaman yang berkhasiat obat tersebut dikenal dengan sebutan tanaman obat tradisional (1).

Penggunaan obat tradisional secara luas oleh masyarakat disebabkan selain karena alami, mudah didapat, serta harganya yang murah, penggunaan obat ramuan tumbuhan secara tradisional ini tidak menghasilkan efek samping yang ditimbulkan seperti yang sering terjadi pada pengobatan secara kimiawi, selain itu masih banyak orang yang beranggapan bahwa penggunaan obat tradisional lebih aman dibandingkan dengan obat sintesis (2).

Banyak penelitian yang membuktikan bahwa berbagai senyawa dalam tumbuhan berpotensi sebagai penghambatan enzim α -glukosidase. Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim α -glukosidase, salah satunya adalah tanaman daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) dan daun sambung nyawa juga merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang diketahui secara empiris memiliki khasiat untuk menyembuhkan diabetes melitus (3).

Diabetes melitus merupakan penyakit gangguan metabolik menahun akibat rusaknya pankreas yang tidak mampu memproduksi insulin dalam jumlah yang mencukupi atau tubuh tidak mampu menggunakan insulin yang telah diproduksi dengan sebagaimana mestinya (4).

Indonesia merupakan negara ke-4 dengan prevalensi penderita diabetes tertinggi setelah Cina, Amerika dan India. Data WHO memperkirakan jumlah penderita diabetes melitus tipe 2 di Indonesia akan meningkat signifikan hingga 21,3 juta jiwa pada 2030 mendatang (5).

Pengobatan diabetes melitus merupakan pengobatan yang terus-menerus dan menahun. Pengobatan diabetes melitus yang sering digunakan adalah dengan menggunakan obat oral. Salah satu mekanisme kerja obat antidiabetes adalah sebagai inhibitor katabolisme karbohidrat, yaitu enzim α -glukosidase. Inhibitor α -glukosidase bekerja menghambat enzim α -glukosidase yang terdapat pada dinding usus halus. Inhibisi kerja enzim ini secara efektif dapat mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks, sehingga memperlambat absorpsi glukosa ke dalam darah dan mengurangi peningkatan kadar glukosa setelah makan pada penderita diabetes melitus. Kerja enzim ini tidak menyebabkan efek samping hipoglikemik (6).

Aktivitas yang dimiliki oleh daun sambung nyawa ini dipengaruhi oleh senyawa yang terkandung didalamnya seperti penelitian yang telah dilakukan oleh (3), disebutkan bahwa daun sambung nyawa memiliki kandungan senyawa kimia yaitu asam kafeat, asam vanilat, asam para kumarat, asam para hidroksi benzoat, polifenol, dan kaemferol dan penelitian yang dilakukan oleh (7) disebutkan bahwa ekstrak etanol daun *G. procumbens* dengan dosis 50, 150 dan 300 mg/kg dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus DM yang diinduksi streptozotisin (STZ). Ekstrak etanol daun *G. procumbens* menunjukkan efektivitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak

Masuk 18-07-2018
Revisi 24-07-2018
Diterima 30-07-2018

Korespondensi

Subehan Lallo

subehan@unhas.ac.id

Fakultas Farmasi,
Universitas Hasanuddin,
Jalan Perintis
Kemerdekaan Km.10,
Makassar 90245,
Indonesia
Telp. +62-411-588-556
Fax. +62-411-585-188

Copyright

© 2018 Majalah Farmasi
Farmakologi Fakultas
Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal
31-07-2018

Dapat Diakses Daring
Pada:

<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



air dalam menurunkan kadar glukosa darah tikus yang diinduksi STZ.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dan mengetahui jenis kinetika penghambatan berdasarkan grafik Lineweaver-Burk.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah bejana maserasi, cawan porselin, eksikator, oven, labu ukur, mikropipet, pipet tetes, Lemari Pengeriing, Chamber, rotary evaporator (IKA), kolom chromatography vakum (Buchi), seperangkat FT-IR (Bruker®), seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis, lampu UV (254 nm dan 365 nm), Elisa Reader (Biotex ELX), mikro pipet (socorex, Eppendorf), plate well 96 lubang, pH meter, dan timbangan analitik (Sartorius).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *Gynura procumbens*, aquadest, pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendorf, metanol, etanol 70%, etil asetat, H₂SO₄ 10%, kloroform, lempeng silika gel 60 GF 254, Lempeng KLTP, pereaksi Lieberman-Burchard, n-heksan, spiritus, serbuk Mg, fecl₃, HCL pekat, buffer fosfat, dimetil sulfoksida (DMSO), p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (pNPG) (*sigma Aldrich, USA*), Akarbose (glucobay), Natrium karbonat (Na₂CO₃) (*Merck*), dan enzim α -glukosidase (*sigma Aldrich, USA*).

Prosedur Kerja

Penyiapan Sampel Penelitian

Sampel daun sambung nyawa (*G. procumbens*) yang diperoleh dari daerah Banta-Bantaeng, Kota Makassar, Sulawesi Selatan. Sampel daun sambung nyawa dicuci dengan air mengalir, kemudian disortasi basah, dipotong kecil-kecil, kemudian dicuci bersih dengan air mengalir lalu dikeringkan dalam Lemari pengeriing simplisia hingga kering, selanjutnya dilakukan ekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan cairan penyari yaitu etanol 70%. serbuk simplisia daun sambung nyawa sebanyak 1000gram dimasukkan dalam bejana maserasi, Kemudian cairan penyari ditambahkan sebanyak 5 liter ke dalam bejana maserasi. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam pada suhu kamar, terlindung dari cahaya matahari, dan diaduk sesekali. Setelah 3 hari kemudian disaring, filtrat diuapkan dengan cara dirotari evaporator hingga diperoleh ekstrak Kental.

Penyiapan Sampel Uji

Pembuatan Dapar Fosfat pH 6,8

Sebanyak 1,778 gram Na₂HPO₄ dan 1,56 gram NaH₂PO₄ masing-masing dilarutkan kedalam labu ukur 100 mL dengan aquadest bebas CO₂ kemudian cukupkan hingga batas labu ukur, campur larutan Na₂HPO₄ dan NaH₂PO₄ kemudian ukur pH nya hingga pH 6,8.

Pembuatan Dapar Fosfat pH 6,8

Larutan substrat dibuat dengan menimbang 37,5 mg pNPG dan dilarutkan dalam dapar fosfat hingga 25 mL. Sehingga diperoleh konsentrasi 5 mM.

Pembuatan Larutan Enzim α -Glukosidase

Larutan enzim dibuat dengan menimbang 1,3 mg enzim α -glukosidase dan dilarutkan dalam 50 mL dapar fosfat pH 6,8 dalam kondisi dingin, hingga diperoleh konsentrasi larutan enzim 0,5 U/mL.

Pembuatan Larutan Natrium Karbonat 200 mM

Larutan natrium karbonat 200 mM dibuat dengan menimbang 2,12 g serbuk natrium karbonat dan dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL.

Pembuatan Larutan Acarbose

Larutan acarbose konsentrasi 100 ppm dibuat dengan menimbang 1 mg serbuk standar acarbose, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dalam dapar fosfat pH 6,8 hingga 10 mL. Dipipet sebanyak 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 125 μ l dicukupkan hingga 1 mL dapar fosfat dan didapatkan konsentrasi 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ppm.

Pembuatan Larutan Sampel

Sampel ditimbang 1 mg dilarutkan dengan DMSO 10 μ l, kemudian disonikasi hingga larut, kemudian ditambahkan dapar fosfat pH 6,8 hingga 10 mL (konsentrasi 100 ppm). Dipipet sebanyak 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 125 μ l dicukupkan hingga 1 mL dapar fosfat dan didapatkan konsentrasi 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ppm.

Prosedur Perlakuan

Skrining Komponen Senyawa Kimia

Uji Alkaloid

Ekstrak ditambahkan 5 ml HCl 2 N kemudian dipanaskan selama 5 menit kemudian ditambahkan NaCl 5 ml dikocok dan disaring, kemudian ditambahkan HCl 2 N pada masing-masing filtrat, kemudian kocok dan didiamkan. Bagian atas dari masing-masing filtrat diambil dan diuji dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorf. Terbentuknya endapan jingga, cokelat, dan putih menunjukkan adanya alkaloid (1).

Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan serbuk Mg 0,1 g dan 3 tetes HCl pekat. Terbentuknya warna merah bata, orange pada lapisan menunjukkan adanya flavonoid (1).

Uji Terpenoid

Ekstrak sebanyak 1 ml dicampur dengan 2 ml kloroform dan ditambah 2 ml asam sulfat pekat dan 2 ml asam asetat anhidrat. Perubahan warna kecoklatan antar permukaan menunjukkan adanya senyawa terpenoid (1).

Uji Steroid

Ekstrak sebanyak 1 ml dicampur dengan 2 ml kloroform dan ditambah 2 ml asam sulfat pekat dan 2 ml asam asetat anhidrat. Perubahan warna dari ungu ke biru atau hijau menunjukkan adanya senyawa steroid (1).

Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dididihkan dengan 10 mL air di atas penangas air, lalu disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1% dan terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin.

Uji Saponin

Ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dilarutkan 10 ml aquadest, kemudian dipanaskan, kocok dengan kuat selama 2 menit. Tambahkan 3 tetes Hcl 2 N kemudian kocok dengan kuat. Amati pembentukan busa selama 10 menit. Sampai positif mengandung saponin jika busa konsisten selama 10 menit.

Uji Fenolik

Ekstrak sebanyak 1 ml ditambahkan beberapa tetes larutan Fecl₃ 1 %, kemudian di amati warna hijau sampai ungu yang dihasilkan positif mengandung fenolik.

Proses Pemisahan

Fraksinasi

Ekstrak kental masing-masing ditimbang g sebanyak 20 gram dilarutkan menggunakan aquadest 200 mL (1:10), Selanjutnya filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan n-heksana dengan volume yang sama, dikocok selama 15 menit dan dibiarkan sampai membentuk dua lapisan terpisah yaitu fraksi air dan fraksi n-heksana. Fraksi n-heksana diuapkan, kemudian dilakukan penambahan n-heksana dan pengocokan dilakukan sebanyak lima kali hingga lapisan n-heksana warna bening. Fraksi air dimasukan kembali dalam corong pisah dan ditambah etil asetat dengan volume yang sama, dikocok selama 15 menit dan dibiarkan sampai membentuk dua lapisan terpisah yaitu fraksi air dan fraksi etil asetat. Penambahan etil asetat dan pengocokan dilakukan sebanyak lima kali hingga lapisan etil asetat berwarna bening. Fraksi etil asetat diuapkan pelarutnya. Didapatkan tiga fraksi yaitu fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi yang diperoleh kemudian dilakukan uji aktivitas penghambatan α -glukosidase. Fraksi yang aktif dari hasil partisi Kemudian dilakukan orientasi eleun dengan KLT untuk dilakukan proses pemisahan dengan kromatografi kolom vakum.

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Pengujian Blanko

Larutan dapar fosfat pH 6,8 sebanyak 70 μ L dicampur. Lalu ditambahkan 15 μ L substrat p-nitrofenil- α -D lukopiranosida (pNPG) dalam well 96, kemudian diinkubasi selama 5 menit ada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 15 μ L enzim α -glukosidase 0,5 U/mL. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 100 μ L Natrium karbonat. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm. Pengujian dilakukan tiga kali replikasi.

Pengujian Kontrol Negatif

Larutan 10 μ L DMSO dan dapar fosfat pH 6,8 sebanyak 60 μ L dicampur. Lalu ditambahkan 15 μ L substrat p-nitrofenil- α -D glukopiranosida (pNPG) dalam well 96, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 15 μ L enzim α -glukosidase 0,5 U/mL. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 100 μ L Natrium karbonat. Sampel diukur absorbansinya pada jang gelombang 405 nm. Pengujian dilakukan tiga kali replikasi.

Pengujian Kontrol Positif

Dari konstansi dipipet 30 μ l larutan acarbose ditambah 60 μ l dapar fosfat pH 6,8 dan ditambahkan 15 μ l substrat pNPG 5 mM dalam well 96. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian, ditambahkan 15 μ l larutan enzim 0,5 U/mL diinkubasi lagi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah selesai diinkubasi ditambahkan 100 μ l natrium karbonat. Diukur absorbansinya dengan pada panjang gelombang 405 nm. pengujian dilakukan tiga kali replikasi.

Pengujian Sampel Ekstrak dan Fraksi

Fraksi aktif diambil 30 μ L. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan larutan Na_2CO_3 200 mM. pNPG diambil sebanyak 15 μ L dari masing-masing konsentrasi 5, 10, 15, 20 mM, kemudian ditambahkan dapar fosfat 40 μ L dalam well 96. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 15 μ l larutan enzim 0,5 U/mL diinkubasi lagi selama 15 menit suhu 37°C. Setelah selesai diinkubasi ditambahkan 100 μ l natrium karbonat. Diukur absorbansinya dengan pada panjang gelombang 405 nm. pengujian dilakukan tiga kali replikasi.

Persentase penghambatan aktivitas α -glukosidase dapat dihitung melalui rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100\%$$

A_0 = Absorbansi Blanko

A_1 = Absorbansi Sampel

Melalui persamaan regresi linier, $y = a + bx$, dimana sumbu x adalah konsentrasi sampel dan sumbu y adalah % inhibisi, maka nilai IC50 dapat dihitung menggunakan rumus:

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

Pengolahan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan data primer yang berasal dari hasil pemisahan, dan uji aktivitas.

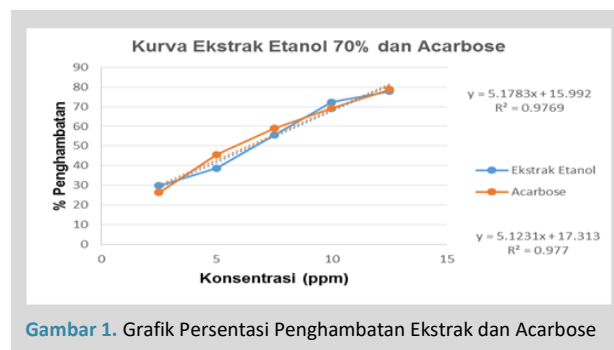
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, simplisia yang digunakan adalah daun sambung nyawa (*G. procumbens*) yang diperoleh dari daerah padang-padang Kecamatan Belopa kabupaten luwuk dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI) Bogor, dengan tujuan untuk memastikan bahwa daun tersebut adalah bagian dari tanaman daun sambung nyawa. Daun yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau dan masih segar.

Daun *G. procumbens* yang diperoleh kemudian disortasi, dipisahkan dari pengotor-pengotor, setelah itu dilakukan penimbangan berat daun sambung nyawa, selanjutnya dikeringkan menggunakan lemari pengering simplisia suhu $\pm 40^\circ\text{C}$. Simplisia sebanyak 1000 gram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, selama 3x24 jam. Pelarut etanol 70% digunakan karena etanol cenderung aman, tidak beracun dan tidak berbahaya. Selanjutnya residu dilakukan remaserasi dengan pelarut yang sama selama 1x24 jam. Filtrat yang didapatkan kemudian di evaporasi pelarutnya pada suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental, selanjutnya berat ekstrak kental ditimbang adapun persen rendamen yang didapat 4,8%

Hasil diidentifikasi golongan senyawa kimia. Berdasarkan uji identifikasi golongan senyawa kimia yang telah dilakukan hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% positif mengandung, flavanoid, saponin, steroid, terponoid, tanin dan fenolik.

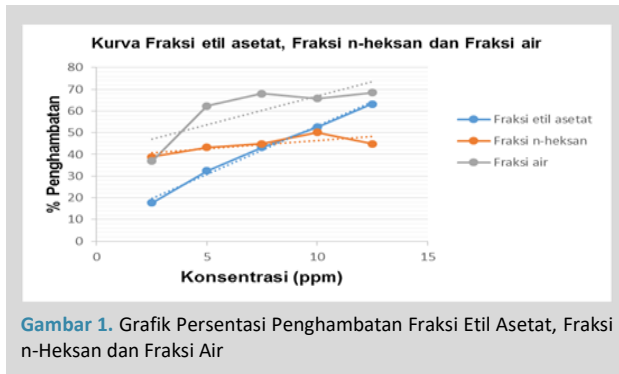
Pada pengujian selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas inhibitor dari ekstrak etanol terhadap α -glukosidase Hasil penghambatan ekstrak etanol dan acarbose memiliki kemampuan aktivitas menghambat α -glukosidase dengan nilai IC50 sebesar 6,56 ppm dan 6,39 ppm (**Gambar 1**).



Gambar 1. Grafik Persentase Penghambatan Ekstrak dan Acarbose

Hasil fraksinasi diperoleh fraksi n-heksana berwarna hijau kecoklatan dengan berat 3,276 g, fraksi etil asetat berupa fraksi pekat berwarna hijau tua kehitaman dengan berat 11,023 g dan fraksi air berwarna kuning kecoklatan dengan berat 4,402 g. Selanjutnya dari hasil 3 fraksi yang didapatkan dilakukan pengujian aktivitas penghambatan α -glukosidase dengan variasi konsentrasi yang digunakan sama dengan konsentrasi yang digunakan pada ekstrak dan acarbose. Hal

ini digunakan untuk memperoleh nilai persen inhibisi yang digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ (konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % aktivitas enzim) dari setiap fraksi dan nilai IC₅₀ tersebut digunakan untuk mengetahui kekuatan penghambatan fraksi terhadap enzim. Fraksi yang memiliki nilai IC₅₀ paling rendah merupakan fraksi yang memiliki kemampuan menghambat aktivitas α -glukosidase paling tinggi, dari ke 3 fraksi yang memiliki daya hambat yaitu fraksi etil asetat dengan aktivitas penghambatan sebesar 9,33 ppm. (gambar 2)



Gambar 1. Grafik Persentasi Penghambatan Fraksi Etil Asetat, Fraksi n-Heksan dan Fraksi Air

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian fraksi penghambatan enzim α -glukosidase menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ berturut-turut

pada ekstrak etanol 6,56 ppm, fraksi n-heksan sebesar 14,97 ppm, fraksi etil asetat 9,33 ppm, fraksi air 13,03 ppm dan acarbose 6,38 ppm serta mekanisme kinetika penghambatan enzim secara *uncompetitive*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua. Penulis juga berterima kasih kepada pembimbing dan Penulis juga berterima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan STIFA-AKFAR Makassar atas dukungan moril dan sarana selama penulis melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Thomas, Tanaman Obat Tradisional I, Penerbit Kanisius, Yogyakarta. 1993
2. Thomas, A.N.S. Tanaman Obat Tradisional I. Yogyakarta. Kanisius. 1989
3. Rosidah, Mun F, Amirin A., Gabriel A., Zaini A. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal Of Ethnopharmacology*; 2009, p. 244–9
4. Dipiro, Joseph T., Robert L., Talbert, Gary C., Yees., Gary R. Matzke. Barbara G. Wells, & L., Michael Posey. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. New York: McGraw-Hill; 2008, P.2
5. World Health Organization. *The world health report 2007: a safer future*. Global Public Health; 2007. p.96.
6. Muchid, A., F. Umar, M. N. Ginting, C. Basri, R. Wahyuni, R. Helmi, dan S. N. Istiqomah. *Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes mellitus*. Departemen Kesehatan RI; 2005, p.1–89.
7. Zhang, X.F., & Tan, B.K.H., Effects of an Ethanolic Extract of *Gynura procumbens* on Serum Glucose, Cholesterol, and Triglyceride Levels in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Singapore Medical Journal*, 2000, 41 (1); p.9