

UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN Kersen (*Muntingia Calabura L.*) TERHADAP PENGHAMBATAN ENZIM α -GLUKOSIDASE SECARA IN VITRO

ACTIVITY TEST OF ETHANOL EXTRACT AND ETHYL ACETATE FRACTION OF KERSEN LEAF (*Muntingia Calabura L.*) AGAINST INHIBITION OF α -GLUCOSIDASE ENZYME

¹⁾ Dedi Hanwar, ²⁾ Khisma Arum Firdaus

^{1,2,3,4,5,6)}Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Surakarta

*Email: dedi.hanwar@ums.ac.id

ABSTRAK

Penelitian potensi tumbuhan kersen (*Muntingia calabura L.*) sebagai obat antidiabetes terus dilakukan. Penelitian sebelumnya menyebutkan ekstrak etanol daun kersen dapat menurunkan kadar gula darah pada tikus, namun belum diketahui aktivitasnya dalam menghambat enzim α -glukosidase. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar flavonoid serta menguji aktivitas ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun kersen terhadap enzim α -glukosidase. Ekstrak etanol 96% didapatkan melalui maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Fraksi etil asetat didapatkan dari fraksinasi cair-cair ekstrak etanol 96% menggunakan pelarut etil asetat. Uji aktivitas ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun kersen terhadap penghambatan enzim α -glukosidase menggunakan p-nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside (pNPG) sebagai substrat. Hasil hidrolisis enzim α -glukosidase terhadap pNPG berupa p-nitrofenol yang berwarna kuning dibaca menggunakan ELISA reader pada λ 405 nm. Kadar flavonoid ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer pada λ maks 422 nm. Hasil pengujian aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dengan ekstrak etanol 96% menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 310,880 \pm 21,191 μ g/mL dan kadar flavonoid total sebesar 66,532 \pm 0,731 μ g/mg, sementara nilai IC₅₀ fraksi etil asetat sebesar 270,286 \pm 4,034 μ g/mL dan kadar flavonoid total sebesar 162,503 \pm 1,360 μ g/mg. Nilai IC₅₀ akarbosa sebesar 31,626 \pm 6,361 μ g/mL, digunakan sebagai pembanding dalam uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase. Kadar flavonoid fraksi etil lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol 96%. Nilai ini menunjukkan bahwa inhibisi fraksi etil asetat terhadap enzim α -glukosidase lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol 96%, namun tidak lebih poten daripada akarbosa.

Kata Kunci: *Muntingia calabura L.*, α -glukosidase, IC₅₀, flavonoid

PENDAHULUAN

Pohon kersen (*Muntingia calabura L.*) merupakan pohon sepanjang musim yang mudah ditemukan di Indonesia. Penelitian mengenai potensi kersen dalam pengobatan telah banyak dilakukan. Sindhe *et al.* (2013) mengungkapkan bahwa ekstrak etanol daun kersen berpotensi sebagai antioksidan dan antihiperqlikemia. Potensi anti-hiperqlikemia tersebut diketahui melalui pengujian secara *in vivo*. Sridhar *et al.* (2011) mengungkapkan bahwa secara *in vivo* dengan dosis 500mg/Kg ekstrak metanol daun kersen memiliki aktivitas sebagai antidiabetes. Aktivitas ekstrak dipengaruhi oleh komponen yang terdapat pada ekstrak. Flavonoid, tanin dan saponin merupakan komponen dengan kandungan tertinggi dalam ekstrak etanol daun kersen (Surjowardojo *et al.*, 2014). Penelitian Su *et al.* (2003) menunjukkan fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun kersen mengandung 25 komponen flavonoid (flavon, flavonol dan flavanon).

Flavonoid merupakan senyawa fenolik alami yang dapat digunakan sebagai inhibitor enzim α -glukosidase (Ken *et al.*, 2015). Inhibitor α -glukosidase merupakan salah satu terapi DM tipe 2 dengan mekanisme kerja menghambat kerja enzim α -glukosidase yang terdapat di permukaan membran usus halus. Obat golongan inhibitor α -glukosidase dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah dengan cara memperlambat pemecahan karbohidrat menjadi glukosa, sehingga dapat mencapai

batas normal (Bösenberg and Zyl, 2008). Inhibitor α -glukosidase tidak memberikan efek langsung terhadap produksi dan sekresi insulin atau peningkatan sensitivitas sel terhadap insulin.

Penelitian Pereira *et al.* (2011) memperlihatkan bahwa flavonoid jenis *Chrysin*, *Apigenin*, *Baicalein*, *Baicalin*, *Myricetin* memiliki daya inhibisi terhadap α -amilase dan α -glukosidase. Flavonoid jenis *Epigallocatechin Gallate* tidak menunjukkan daya inhibisi terhadap α -amilase, namun memiliki daya inhibisi terhadap α -glukosidase. Empat dari flavonoid yang telah disebutkan memiliki nilai IC50 terhadap α -glukosidase, yaitu *Baicalein* ($0,713 \pm 0,034$ mM), *Baicalin* ($4,62 \pm 0,38$ mM), *Myricetin* ($1,030 \pm 0,26$ mM), dan *Epigallocatechin Gallate* ($2,208 \pm 0,038$ mM).

Penentuan pelarut mempengaruhi kandungan dan aktivitas yang dihasilkan oleh suatu ekstrak. Pada penelitian ini dipilih pelarut etanol 96% untuk maserasi dan pelarut etil asetat untuk fraksinasi cair-cair. Penentuan tersebut berdasarkan komponen yang dapat tersari dari kedua pelarut tersebut. Flavonoid, tanin dan saponin terdapat dalam ekstrak etanol daun kersen (Surjowardojo *et al.*, 2014) dan penelitian (Su *et al.*, 2003) menunjukkan fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun kersen mengandung 25 komponen flavonoid (flavon, flavonol dan flavanon).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun kersen sebagai inhibitor α -glukosidase dan kadar flavonoid yang terkandung dalam sampel tersebut. Pada penelitian ini ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun kersen diuji aktivitasnya terhadap enzim α -glukosidase menggunakan Elisa reader pada λ 405 nm.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan berupa timbangan analitik, lemari pengering, corong *Buchner*, *rotatory evaporator* (Laborota 4000 Heidolph E-wB eco), penangas air (Memmert), pH meter (Eutech Instruments), *microplate 96 well* (Iwaki), mikropipet (Socorex), vortex (Vortex Maxi Mix II 37600), ELISA reader (Biotex ELX 800) dan Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-UV mini 1240).

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang berasal dari kabupaten Sukoharjo, etanol 96%, dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Jerman), aquadest, buffer fosfat pH 6,8, Na₂CO₃ 0,2 M (Merck, Jerman), HCl 2N (Merck, Jerman), aqua pro injeksi, aqua demineralized, bovine serum albumin (BSA), enzim α -glukosidase (Sigma Aldrich, USA), substrat p-nitrofenil- α -Dglukopiranosida (pNPG) (Sigma Aldrich, USA), standar p-nitrofenol ((Sigma Aldrich, USA), akarbosa (Eclid) 100mg/tablet (kontrol positif), standar kuersetin (Merck, Jerman), NaNO₂ 5% (Merck, Jerman), AlCl₃ 10% (Merck, Jerman), dan NaOH 1 M (Merck, Jerman).

Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 50 g simplisia daun kersen dimaserasi menggunakan etanol 96%. Hasil penyaringan dipekatkan menggunakan *evaporator* dengan suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak etanol 96% daun kersen. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan 2 g ekstrak etanol daun kersen, yang difraksinasi cair-cair dengan pelarut etil asetat. Hasil pemisahan dipekatkan hingga diperoleh fraksi etil asetat.

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Pembuatan kurva baku p-nitrofenol

Kurva baku p-nitrofenol menggunakan 8 seri konsentrasi yaitu 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 160 ; 320 : 640 μ M. Blanko ditetapkan menggunakan larutan buffer fosfat pH 6,8. Absorbansi dibaca menggunakan *ELISA reader* pada λ 405 nm.

Penentuan % Inhibisi enzim α -glukosidase

Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase menggunakan metode Sugiwati *et al.* (2009) dan Ahmed *et al.* (2013) yang telah dimodifikasi. Larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 25; 50; 100; 200; 400 ppm. Sebanyak 1 μ L sampel, dicampurkan dengan 49 μ L buffer fosfat pH 6,8 dan 25 μ L substrat pNPG 20 mM ke dalam *microplate 96 well*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Pada larutan kontrol (C) dan S1 ditambahkan ditambahkan 25 μ L enzim α -glukosidase 0,05

U/ml sedangkan, larutan blanko dan S0 ditambahkan 25 µL buffer fosfat pH 6,8, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 25 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 µL Na₂CO₃ 0,2 M. Pembacaan absorbansi dilakukan menggunakan *ELISA reader* pada λ 405 nm. Tablet akarbosa digunakan sebagai pembanding dan dilakukan pengerjaan seperti sistem reaksi pada sampel. Sistem reaksi uji aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase untuk satu sampel dengan volume 200 µL dapat dilihat pada

Tabel 20.

Tabel 20. Sistem reaksi enzim untuk satu sampel

Bahan	Blanko (µL)	Kontrol (µL)	S0 (µL)	S1 (µL)
Sampel	-	-	1	1
DMSO	1	1	-	-
Buffer fosfat pH 6,8	49	49	49	49
Substrat pNPG 20 mM	-	25	-	25
Diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit				
Buffer fosfat pH 6,8	25	-	25	-
Enzim α-glukosidase 0,05 U/mL	-	25	-	25
Diinkubasi pada suhu 37°C selama 25 menit				
Na ₂ CO ₃ 0,2 M	100	100	100	100

Keterangan: Blanko = Sistem reaksi tanpa adanya sampel dan enzim
 C = Campuran tanpa sampel
 S0 = Campuran sampel namun tanpa penambahan enzim
 S1 = Campuran sampel dengan penambahan enzim

Hasil yang didapatkan berupa absorbansi, diolah menggunakan persamaan regresi linear dari kurva baku p-nitrofenol. Data yang dihasilkan dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(p\text{-NP C}) - \{(p\text{-NP S1}) - (p\text{-NP S0})\}}{(p\text{-NP C})} \times 100\%$$

Keterangan:

p-NP C = p-nitrofenol tanpa inhibitor (enzim-substrat).

p-NP S₁ = p-nitrofenol inhibitor dengan enzim (inhibitor-enzim-substrat).

p-NP S₀ = p-nitrofenol inhibitor tanpa enzim (inhibitor-substrat).

Selanjutnya dari data di atas digunakan untuk menghitung IC₅₀.

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

Keterangan: a dan b diperoleh dari persamaan regresi linier (y = a + bx) antara konsentrasi (sumbu x) dan % daya inhibisi (sumbu y).

Analisis Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid menggunakan metode kolorimetri yang merujuk pada prosedur Lee *et al.* (2005) yang telah dimodifikasi. Sampel dibuat dengan konsentrasi 0,25 % b/v. Sebanyak 1 mL sampel, ditambahkan dengan 4 mL akuades, 0,3 mL NaNO₂ 5% kemudian ditunggu selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan 0,3 mL AlCl₃ 10%, 2 mL NaOH 1 M, dan ditambahkan akuades hingga volume 10 mL. Setelah itu diinkubasi selama 12 menit dan diukur absorbansi pada λ maks 422 nm. Kurva baku kuersetin dilakukan dengan konsentrasi 50; 100; 200; 400 dan 800 ppm. Data yang diperoleh berupa absorbansi dimasukkan dalam persamaan kurva baku kuersetin sebagai nilai y, dan nilai x yang diperoleh merupakan ekuivalensi miligram kuersetin dalam setiap gram sampel (*Quercetin Equivalen/ QE*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol 96 % dan fraksi etil asetat daun kersen yang dilakukan uji aktivitas terhadap enzim α -glukosidase secara *in vitro* dengan akarbosa sebagai pembanding. Simplisia daun kersen 50 g menghasilkan ekstrak kental seberat 4,86 g, didapatkan rendemen 9,72%.

Kurva baku standar p-nitrofenol $y = 0,0041x + 0,0902$ dengan nilai $R^2 = 0,9993$ digunakan untuk menentukan % inhibisi. Nilai linearitas (R^2) tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi produk p-nitrofenol (p-NP) yang terbentuk. Nilai $R^2=1$ memiliki arti bahwa peningkatan absorbansi dari p-nitrofenol berbanding lurus dengan peningkatan kadar/konsentrasi p-nitrofenol.

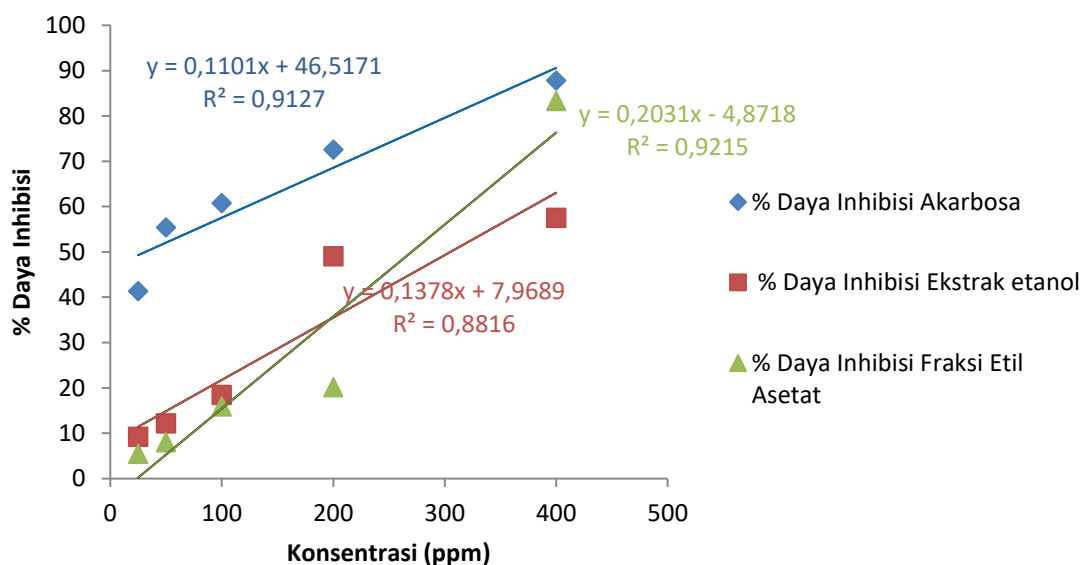
Sampel ekstrak dan fraksi berfungsi sebagai inhibitor enzim, yang akan mempengaruhi ikatan enzim dengan substrat sehingga ikatan antara enzim dan substrat menjadi sedikit. Hal tersebut menjadikan p-nitrofenol yang terbentuk menjadi sedikit sehingga nilai absorbansi menjadi kecil. Akarbosa digunakan sebagai pembanding karena secara klinis terbukti mampu menghambat enzim α -glukosidase.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak dan fraksi memiliki daya inhibisi terhadap enzim, dilihat dari rendahnya kadar produk p-Nitrofenol (p-NP) yang terbentuk jika dibandingkan dengan nilai pada kontrol (campuran enzim substrat tanpa ekstrak). Persentase daya inhibisi ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat daun kersen dan akarbosa terhadap enzim α -glukosidase meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi (Gambar 1.). Kondisi tersebut dapat digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} .

Nilai IC_{50} fraksi etil asetat menunjukkan penghambatan terhadap enzim α -glukosidase yang lebih baik dibandingkan ekstrak etanol 96%. Nilai IC_{50} yang diperoleh dari ekstrak etanol 96% sebesar $310,880 \pm 21,191 \mu\text{g/mL}$ dan fraksi etil asetat sebesar $270,286 \pm 4,034 \mu\text{g/mL}$ serta akarbosa sebesar $31,626 \pm 6,361 \mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} akarbosa digunakan sebagai acuan dalam melihat aktivitas sampel. Jika dibandingkan nilai IC_{50} sampel dan akarbosa, potensi sampel sebagai inhibitor enzim cukup jauh yang dengan nilai potensial akarbosa. Temuan tersebut menjadi alasan untuk tidak melakukan uji kinetika inhibisi enzim α -glukosidase.

Nilai IC_{50} fraksi etil asetat yang lebih baik dibandingkan ekstrak etanol 96% sebanding dengan kadar flavonoid fraksi etil asetat yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol 96% (Tabel 1). Hal tersebut menguatkan bahwa pada penelitian ini penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase disebabkan oleh adanya senyawa flavonoid.

Penelitian Su *et al.* (2003) menunjukkan fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun kersen mengandung 25 komponen flavonoid, dua diantara yaitu chrysin dan pinocembrin (Su *et al.*, 2003). Chrysin memiliki daya inhibisi terhadap α -amilase dan α -glukosidase dan pinocembrin daya inhibisi terhadap α -glukosidase, namun merupakan inhibitor lemah (Ken *et al.*, 2015). Selain flavonoid, kandungan saponin dalam ekstrak etanol juga ikut berperan dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Telah dilaporkan bahwa saponin dapat menghambat aktivitas enzim α -glukosidase secara *in vitro* (Havsteen, 2002).



Gambar 1. Grafik inhibisi enzim α -Glukosidase oleh ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat dan akarbosa

Tabel 2. Nilai IC_{50} dan kadar flavonoid dari ekstrak etanol, etil asetat dan akarbosa

Perlakuan	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g)
Ekstrak etanol 96%	310,880 \pm 21,191	66,532 \pm 0,73
Fraksi Etil asetat	270,286 \pm 4,034	162,503 \pm 1,360
Akarbosa	31,626 \pm 6,361	-

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun kersen memiliki nilai IC_{50} 310,880 \pm 21,191 $\mu\text{g/mL}$ dan kadar flavonoid total sebesar 66,532 \pm 0,73 mg QE/g , sementara untuk fraksi etil asetat nilai IC_{50} 270,286 \pm 4,034 $\mu\text{g/mL}$ dan kadar flavonoid total sebesar 162,503 \pm 1,360 mg QE/g . Hal tersebut menunjukkan bahwa inhibisi fraksi etil asetat terhadap enzim α -glukosidase lebih baik dibandingkan ekstrak etanol 96%.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed D., Sharma M., Mukerjee A., Ramteke P.W. and Kumar V. (2013). Improved Glycemic Control, Pancreas Protective and Hepatoprotective Effect by Traditional Poly-Herbal Formulation "Qurs Tabasheer" In Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 13 (1), 10.
- Bösenberg L. and Zyl D.G. Van. (2008). The Mechanism of Action of Oral Antidiabetic Drugs : A Review Of Recent Literature Insulin Secretagogues. *Jemdsa*, 13 (3), 80–88.
- Havsteen BH. (2002). The biochemistry and Medical Significance of The Flavonoids. *Pharmacol Ther.* 96(2-3):67-202.
- Ken Ng., Gu C., Zhang H. and Putri C.Y. (2015). Evaluation of α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Flavonoids. *International Journal of Food and Nutritional Science*, 2 (6),

- 1–6.
- Lee W., Park J., Jung S., Yang C.W., Kim W.-U., Kim H.-Y., Park J.-H. and Park J. (2005). Preparation and Characterization of Biodegradable Nanoparticles Entrapping Immunodominant Peptide Conjugated with PEG for Oral Tolerance Induction. *Journal of Controlled Release*, 105 (1–2), 77–88.
- Pereira F.D., Cazarolli L.H., Lavado C., Mengatto V., Figueiredo M.S.R.B., Guedes A., Pizzolatti M.G. and Silva F.R.M.B. (2011). Effects of Flavonoids on α -Glucosidase Activity: Potential Targets for Glucose Homeostasis. *Nutrition*, 27 (11–12), 1161–1167.
- Ramadas D., Chandrappa S., Kashyap H.R., Biotechnology A. and Sciences M. (2015). In Vitro Anti-Diabetic Activity of *Muntingia calabura* Root Protein. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 4 (10), 1526–1534.
- Su BN, Park EJ, Vigo JS, et al. (2003). Activity-guided Isolation of The Chemical Constituents of *Muntingia calabura* Using A Quinine Reductase Induction Assay. *J Phytochem* 63:335–41.
- Sugiwati S., Setiasih S. and Afifah D.E. (2009). Antihyperglycemic Activity of The Mahkota Dewa [*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] Leaf Extracts As An Alpha-Glucosidase Inhibitor. *Makara, Kesehatan*, 13 (2), 74–78.
- Surjowardojo P., Thohari I. and Ridhowi A. (2014). Quantitative and Qualitative Phytochemicals Analysis of *Muntingia calabura*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4 (16), 84–89.