

INHIBISI ENZIM α -GLUKOSIDASE MENGGUNAKAN EKSTRAK DAUN BENALU CENGKEH (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Mic)

INHIBITION OF α -GLUCOSIDASE ENZYME USING CLOVE MISTLETOE LEAF EXTRACT (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Mic)

Tiana Fitrilia^a, M Bintang^b, M Safithri^b

^aUniversitas Djuanda Bogor; Jalan Tol Ciawi Nomor 1, Ciawi, Bogor-16720

^bInstitut Pertanian Bogor; Jalan Raya Darmaga, Bogor-16680

Korespondensi: Tiana Fitrilis, E-mail: tiana.fitrilia15@gmail.com

ABSTRACT

Clove mistletoe is a plant that life attached to the host tree. Mistletoe Leaf that has been extracted have various biological functions such as antioxidants and anti diabetes. This study aims to determine the most active extract that inhibits the enzyme of α -glucosidase. Selected extracts was tested on the enzyme kinetics and compound identification using LC-MS/MS. Solvents that used for the extraction of mistletoe leaf was water and ethanol. Furthermore, the ethanol extract was fractionated by a solvent with different polarity. The tested samples consist of water extract, ethanol extract and fractions of ethanol extract. The results showed that the ethanol extract had the highest activity of enzyme inhibition with IC_{50} value about 129.7 mg/mL. Meanwhile, the acarbose as positive control had IC_{50} value about 0.1 mg/mL. Statistically, all tested samples had IC_{50} values significantly different. The results of enzyme kinetics showed that ethanol extract had mixed-noncompetitive, and based on LC-MS/MS identification, it had molecular weight about 700.73 (m/z) with a retention time about 1:45.

Keywords: clove mistletoe, LC-MS/MS, α -glucosidase enzyme inhibition

ABSTRAK

Benalu cengkeh merupakan tumbuhan yang hidup menempel pada pohon inangnya. Daun benalu yang telah diekstraksi memiliki berbagai fungsi biologis seperti antioksidan dan antidiabetes. Penelitian ini bertujuan menentukan ekstrak paling aktif dalam menghambat enzim α -glukosidase. Ekstrak terpilih dilakukan pengujian terhadap kinetika enzim dan identifikasi senyawa menggunakan LC-MS/MS. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi daun benalu adalah air dan etanol. Selanjutnya, ekstrak etanol difraksinasi dengan pelarut yang memiliki kepolaran berbeda. Sampel yang diuji terdiri atas ekstrak air, ekstrak etanol dan fraksi dari ekstrak etanol. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol memiliki aktivitas dalam menginhibisi enzim paling besar dengan nilai IC_{50} sebesar 129.7 μ g/mL. Sementara, akarbose sebagai kontrol positif memiliki nilai IC_{50} sebesar 0.1 μ g/mL. Secara statistik, semua sampel uji memiliki nilai IC_{50} yang berbeda secara signifikan. Hasil kinetika enzim dari ekstrak etanol menunjukkan jenis inhibisi nonkompetitif campuran dan berdasarkan identifikasi LC-MS/MS, ekstrak etanol memiliki bobot molekul 700.73 (m/z) dengan waktu retensi 1.45.

Kata kunci: benalu cengkeh, inhibisi enzim α -glukosidase, LC-MS/MS

PENDAHULUAN

Penyakit diabetes ditandai oleh kadar glukosa yang tinggi di dalam darah (hiperglikemia). Hormon insulin yang mengalami gangguan dapat menjadi penyebab terjadinya hiperglikemia. Prevalensi diabetes di Indonesia cukup mengkhawatirkan dan menempati urutan ketujuh pada tahun 2013 (IDF 2013).

Tingginya kadar glukosa di dalam darah dapat memicu pembentukan senyawa oksigen reaktif yang berimplikasi pada peningkatan modifikasi molekuler (Patel *et al.* 2011). Modifikasi molekuler tersebut menyebabkan terjadinya kondisi stres oksidatif yang dapat menurunkan fungsi sel β -pankreas dan meningkatkan komplikasi berbagai penyakit (Ueno *et al.* 2002; Setiawan dan Suhartono 2005; Patel *et al.* 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan penanganan diabetes secara tepat untuk mencegah komplikasi yang lebih lanjut.

Salah satu cara terapi diabetes adalah menggunakan inhibitor untuk menghambat enzim α -glukosidase (Wu *et al.* 2014). Enzim ini berada di dinding usus halus dan berperan dalam menghidrolisis karbohidrat menjadi glukosa. Inhibisi enzim α -glukosidase dapat menunda glukosa untuk mengalami proses penyerapan (Ping *et al.* 2010). Senyawa kimia yang ada di dalam tanaman dapat dimanfaatkan untuk menghambat enzim penghidrolisis karbohidrat. Penggunaan tanaman herbal dapat dijadikan alternatif dalam terapi diabetes karena sedikit atau hampir tidak ada efek sampingnya. Sementara, menurut Lee *et al.* (2007), obat sintetis yang biasa digunakan dapat menyebabkan diare, kejang perut dan kembung.

Secara empiris, masyarakat telah memanfaatkan banyak tanaman herbal untuk menjaga kesehatan dan mengobati berbagai penyakit. Tanaman yang diketahui memiliki aktivitas antidiabetes adalah tanaman benalu. Benalu disebut

sebagai tanaman semi parasit yang tumbuh pada pohon inangnya dan mempunyai dua suku yaitu Loranthaceae dan viscaceae. Menurut Uji dan Samiran (2005), perbedaan keduanya berdasarkan morfologi buah dan bunga. Benalu cengkeh adalah salah satu benalu yang termasuk ke dalam suku Loranthaceae.

Benalu biasanya digunakan sebagai obat tradisional untuk manajemen, kontrol atau pengobatan sejumlah besar gangguan pada manusia (Ojewole dan Adewole 2007), seperti untuk diabetes dan antihiperlipidemia (Adaramoye *et al.* 2012), agen antioksidan (Suryanto dan Wehantouw 2008), antiproliferasi (Lazuardi 2007) dan agen antikanker (Sundaryono 2011).

Fitrilia *et al.* (2015) melakukan pengujian fitokimia terhadap ekstrak daun benalu cengkeh dan hasilnya diketahui bahwa ekstrak tersebut memiliki kandungan metabolit sekunder seperti komponen fenol dan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Selain pada daun, bagian lain seperti akar, batang dan bunga juga mempunyai manfaat biologis (Suryanto dan Wehantouw 2008). Adanya manfaat biologis dalam benalu cengkeh dapat digunakan dalam pengobatan penyakit diabetes. Sejauh ini, pemanfaatan tanaman benalu cengkeh belum terlalu luas digunakan untuk menghambat enzim α -glukosidase. Oleh karena itu, diperlukan pengujian aktivitas antidiabetes dan analisis senyawa dari daun benalu cengkeh yang diekstrak menggunakan berbagai pelarut dengan kepolaran berbeda.

MATERI DAN METODE

Persiapan Sampel Uji

Determinasi tanaman benalu cengkeh dilakukan di Bogoriense-LIPI, Bogor. Daun benalu dipilih pada lembar keempat dari pucuk daun. Selanjutnya, dilakukan pencucian menggunakan air

mengalir dan dilakukan pengeringan. Simplisia kering dihaluskan sampai berukuran 40 mesh menggunakan alat berupa grinder.

Serbuk daun benalu cengkeh selanjutnya diekstraksi dengan cara perebusan menggunakan air dan maserasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak etanol hasil evaporasi difraksinasi lebih lanjut menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat. Semua larutan yang diperoleh dilakukan evaporasi menggunakan evaporator.

Uji Aktivitas Enzim α -Glukosidase

Sampel uji berupa ekstrak air, ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol. Analisis sampel menggunakan *microplate reader* dengan memasukkan larutan sampel, standar (akarbose) dan blanko ke dalam sumur *microplate*. Semua larutan dicampur dengan larutan bufer fosfat pH 7, dan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*NPG) sebagai substrat. Inisiasi reaksi terjadi dengan penambahan enzim α -glukosidase 0.04 U/mL yang diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C kemudian ditambahkan Na_2CO_3 200 mM untuk menghentikan reaksi enzimatis.

Uji Kinetika Enzim

Sampel terpilih dengan aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase paling tinggi digunakan untuk menentukan kinetika enzim. Sistem reaksi yang terlibat dalam pengujian kinetika enzim sama dengan pengujian pada aktivitas enzim tetapi konsentrasi substrat yang digunakan meningkat berdasarkan penentuan kurva Michaelis-Menten. Pengujian terdiri atas dua sistem reaksi yaitu dengan inhibitor dan tanpa inhibitor. Selanjutnya absorbansi dianalisis menggunakan *microplate reader* ($\lambda=410$ nm)

Identifikasi Senyawa Aktif

Sampel yang memiliki aktivitas inhibisi enzim paling tinggi dilakukan identifikasi senyawa aktif menggunakan instrumen *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), tipe QMicro QAA 842. Kolom LC berisi cairan sampel yang merupakan fase gerak dengan kecepatan alir 0.2 mL/menit pada temperatur 40 °C. Analisis pada kolom LC berlangsung selama 35 menit dengan bantuan pompa. Identifikasi senyawa aktif dilanjutkan ke MS tipe quadrupole dan Modus scan selama 5 detik. Spektrum yang diperoleh menyatakan perbandingan antara massa dan muatan (*m/z*).

Analisis Data

Program yang digunakan adalah SPSS *Statistics* 16.0 dan *Microsoft Excel* 2007. Analisis data menggunakan *Analyses of Variance* (ANOVA), kemudian diuji lebih lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi daun benalu cengkeh yang menggunakan pelarut air dan etanol memiliki rendemen yang berbeda, yaitu ekstrak air 26.3% dan ekstrak etanol sebesar 23.4%. Perbedaan rendemen disebabkan oleh jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Pelarut air memiliki kepolaran lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut etanol. Hal ini dapat dilihat dari momen dipol pelarut air (1.87 Debye) lebih besar dibandingkan dengan momen dipol pelarut etanol (1.69 Debye) (Markom *et al.* 2007). Ekstrak air yang memiliki rendemen lebih besar menunjukkan bahwa senyawa aktif daun benalu cengkeh lebih banyak bersifat polar.

Ekstrak etanol kemudian difraksinasi dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda. Rendemen hasil fraksinasi menunjukkan bahwa fraksi n-

heksana memiliki rendemen paling kecil dibandingkan dengan fraksi etanol dan etil asetat yaitu secara berurutan 0.9%, 6.8% dan 7.1%. Besarnya rendemen fraksi etil asetat disebabkan oleh pembentukan ikatan hidrogen dari gugus etoksi pada struktur pelarut etil asetat dengan sampel. Ekstrak air, Ekstrak etanol dan fraksi ekstrak etanol kemudian dilakukan pengujian inhibisi terhadap enzim α -glukosidase.

Inhibisi Enzim α -Glukosidase

Enzim yang digunakan merupakan rekombinan dari *Bacillus stearothermophilus* dengan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*NPG) sebagai substrat. Hasil reaksi enzimatik berupa *p*-nitrofenol yang berwarna kuning. Inhibisi enzim oleh sampel dapat diketahui dari nilai IC_{50} (*Inhibition concentration 50 %*) (Tabel 1).

Tabel 1 Inhibisi Enzim

Sampel	IC_{50} (μ g/mL)
Akarbose	0.1 ^a
Ekstrak air	437.8 ^d
Ekstrak Etanol	129.7 ^b
Fraksi n-heksana	595.9 ^f
Fraksi Etil Asetat	272.4 ^c
Fraksi Etanol	568.9 ^e

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda menunjukkan hasil berbeda nyata pada $p < 0.05$

Aktivitas antidiabetes ekstrak etanol lebih tinggi dibandingkan dengan sampel uji yang lain. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh pelarut yang mampu menarik kandungan senyawa kimia pada sampel. Ekstrak etanol daun benalu cengkeh mengandung senyawa kimia berupa tannin, flavonoid, saponin dan triterpenoid (Fitrilia 2015). Menurut Nagmoti dan Juvekar (2013), senyawa kimia tersebut dapat menghambat enzim α -glukosidase. Nilai IC_{50} akarbose sebagai kontrol positif secara statistik berbeda nyata. Aktivitas akarbose dengan

konsentrasi 0.1 μ g/mL mampu menghambat 50 % enzim α -glukosidase. Kemampuan sampel dalam menghambat enzim α -glukosidase disebabkan oleh adanya senyawa fenolik yang dapat membentuk ikatan dengan protein enzim.

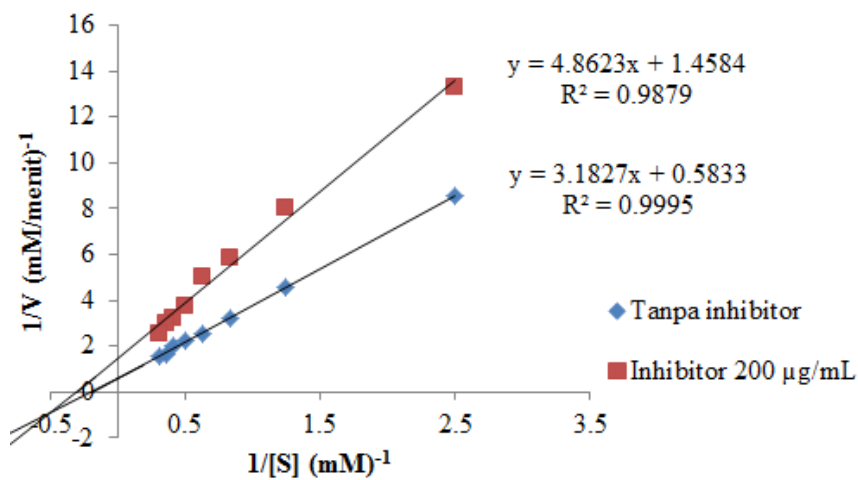
Kinetika Inhibisi Enzim

Penentuan kinetika inhibisi terhadap enzim α -glukosidase dilakukan dengan dua sistem reaksi yang melibatkan inhibitor dan tanpa inhibitor. Inhibitor berupa sampel yang memiliki nilai IC_{50} paling kecil pada pengujian aktivitas antidiabetes yaitu ekstrak etanol. Mekanisme inhibisi ditentukan berdasarkan persamaan pada kurva Lineweaver-Burk (Gambar 1).

Sistem dengan inhibitor memiliki nilai K_m 3.3mM/mL dan V_{maks} 0.7 mM/mL menit. Sementara, sistem tanpa inhibitor memiliki nilai K_m 5.4mM/mL dan V_{maks} 1.7 mM/mL. Nilai K_m menunjukkan afinitas enzim dalam mengikat substrat. Terjadinya penurunan nilai K_m memberikan gambaran bahwa kecepatan reaksi maksimum dapat dicapai dengan substrat pada konsentrasi kecil. Selain itu, nilai V_m juga mengalami penurunan yang disebabkan oleh terganggunya konformasi enzim oleh inhibitor sehingga produk yang dihasilkan dalam pemecahan senyawa karbohidrat menjadi tidak optimal.

Penurunan nilai K_m , V_m dan kurva Lineweaver-Burk menunjukkan bahwa jenis kinetika inhibisi enzim oleh inhibitor merupakan inhibisi campuran (kompetitif dan nonkompetitif). Mekanisme yang terjadi belum dapat ditentukan secara mutlak karena sampel yang digunakan masih *crude extract*. Selain itu, menurut Babu *et al* (2004), konsentrasi substrat yang bervariasi dapat mempengaruhi sifat substrat maupun kecepatan reaksi yang terjadi. Pengujian yang dilakukan oleh Ghadyale *et al*. (2012) terhadap ekstrak

Cymbopogon martini (Roxb.) juga memiliki tipe inhibisi campuran.

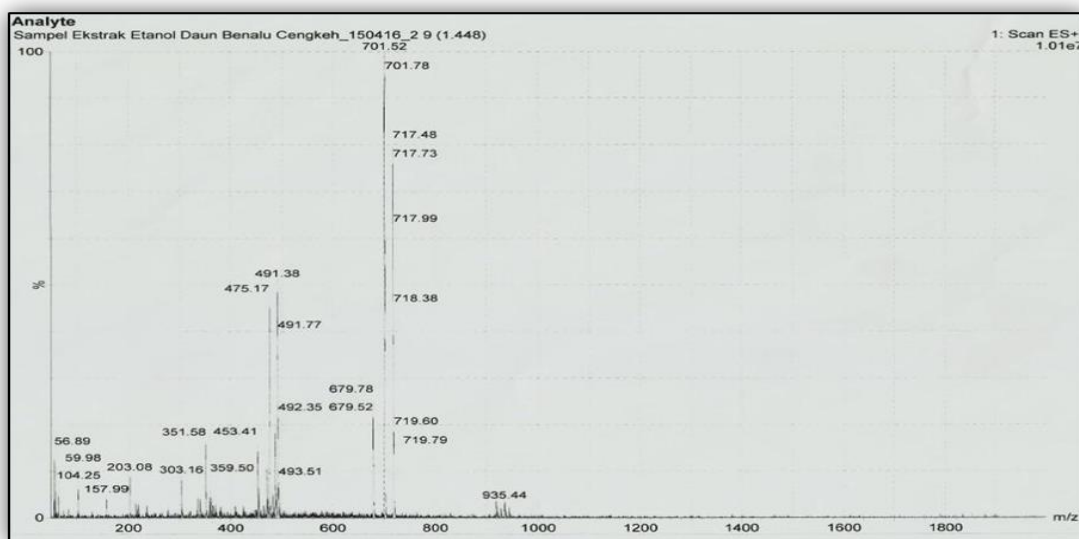


Gambar 1 Plot Lineweaver-Burk

Identifikasi Senyawa Aktif

Senyawa aktif pada sampel uji dianalisis menggunakan LC-MS/MS. Menurut Zou dan Schreiber (2012), LC-MS/MS memiliki tingkat selektivitas dan sensitivitas yang tinggi. Selain itu, preparasi sampel uji juga dapat dilakukan dengan sederhana tanpa melibatkan derivatisasi dan mampu menganalisis senyawa dengan kepolaran yang tinggi (Vogeser dan Seger 2008).

Hasil kromatogram menunjukkan terdapat tiga puncak dengan kelimpahan tinggi, yaitu waktu retensi 1.45, 16.61 dan 17.63. Puncak paling tinggi dengan waktu retensi 1.45 memiliki bobot molekul sebesar 700.73 (m/z) dan diduga rumus molekulnya adalah $C_{29}H_{55}F_3O_{15}$ (Gambar2). Keberadaan puncak hasil kromatogram lebih dari satu menunjukkan bahwa sampel uji belum mengalami pemurnian sehingga masih banyak senyawa lain yang dapat teridentifikasi.



Gambar 2 Hasil Kromatogram Ekstrak Etanol

KESIMPULAN

Inhibisi enzim α -glukosidase paling tinggi ditunjukkan oleh ekstrak etanol dengan nilai IC₅₀ 129.7 μ g/mL dan memiliki tipe inhibisi secara nonkompetitif campuran. Analisis LC-MS/MS menunjukkan bahwa kandungan senyawa kimia ekstrak etanol dengan kelimpahan paling tinggi memiliki bobot molekul 700.73 (*m/z*) dan rumus molekul C₂₉H₅₅F₃O₁₅.

DAFTAR PUSTAKA

- Adaramoye O, Amanlou M, Habibi-Rezaei M, Pasalar P, Moosavi-Movahedi A. 2012. Methanolic extract of African mistletoe (*Viscum album*) improves carbohydrate metabolism and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*. 2012:427-433.
- Babu KS, Tiwari AK, Srinivas PV, Ali AZ, Raju C, Rao M. 2004. Yeast and mammalian α -glucosidase inhibitory constituent from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall.ex Meisson.*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 14:3841-3845.
- Fitrilia, T. 2015. Phytochemical screening and antioxidant activity of clove mistletoe leaf extract (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq).*IOSR Journal Of Pharmacy*. 5(8):13-18.
- Ghadyale V, Takalikal S, Haldavnekar V, Arvindekar A. 2012. Effective control of postprandial glucose level through inhibition of intestinal alpha glucosidase by *Cymbopogon martini* (Roxb.).*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.doi:10.1155/2012/372909.
- [IDF] International Diabetes Federation. 2013. IDF Diabetes Atlas Sixth Edition. ISBN: 2-930229-85-3.
- Lazuardi M. 2007. Aktivitas Antiproliferatif Ekstrak Etanol Kasar *Dendrophthoe pentandra* L. Miq. Terhadap Kultur sel Mieloma. *J Bahan Alam Indonesia*. 6(3):1412-2855.
- Lee SK, Hwang YJ, Song JH, Jo JR, Kim MJ, Kim ME, Kim JI. 2007. Inhibitory activity of *Euonymus alatus* agains α -glucosidase *in vitro* and *in vivo*. *J nutr Re Pract*. 1(3):184-188.
- Markom M, Hasan M, Daud WRW, Singh H, Jaim JM. 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn:effects of solvent and extraction methods. *Separation and Purification Technology*. 52:487-496.
- Nagmoti DM, Juvekar AR. 2013. In vitro inhibitory effects of *Pithecellobium dulce* (Roxb) Benth. Seeds on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *J Biochem Tech*. 4(3)616-621.
- Ojewole JA, Adewole SO. 2007. Hypoglycaemic and Hypotensive Effects of *Globimetula cupulata* (DC) Van Tieghem (Loranthaceae) Aqueous Leaf Extract in Rats. *Cardiovasc J South Afr*. 18(1).
- Patel DK, Kumar R, Prasad SK, Sairam K, Hemalatha S. 2011. Antidiabetic and *in vitro* antioxidant potential of *Hybanthus enneaspermus* (Linn) F. Muell in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pasific Journal of Tropical*
- Ping YX, Qing SC, Ping Y, Gang MR. 2010. A-Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity of Common Constituents from Traditional Chinese Medicine Used for Diabetes Melitus. *Chinese Journal of Natural Medicines*.8(5):0349-0352.
- Setiawan B, Suhartono E. 2005. Stres oksidatif dan peran antioksidan pada diabetes melitus.*Maj Kedokt Indon*. 55(2).
- Sundaryono A. 2011. Teratogenitas Senyawa Flavonoid dalam Ekstrak Metanol Daun Benalu (*Dendrophthoe pentandra*

- L. Miq) pada *Mus musculus*. *J Exacta*. 9(1):1412-3617.
- Suryanto E, Wehantouw F. 2008. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Ekstrak Fenol dari Benalu Cengkeh. *J Bahan Alam Indonesia*. 6(5):1412-2855.
- Uji T, Samiran. 2005. Keanekaragaman jenis benalu dan tumbuhan inangnya di Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur. Laporan Teknik Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr*. 132:897-900.
- Vogeser M, Seger C. 2008. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-Goals for further developments. *Clinical Biochemistry*. 41: 649-662.
- Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. 2014. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int. J. Med. Sci*. 11(11).doi: 10.7150/ijms.10001.
- Zou YY, Schreiber A. 2012. Quantitation and identification of organotin compounds in food, water, and textiles using LC-MS/MS. *AB Sciex*.6690212-01.