

AKTIVITAS INHIBISI SENYAWA PINOSTROBIN DARI TEMU KUNCI (*Boesenbergia pandurata*) SEBAGAI INHIBITOR ENZIM α -GLUKOSIDASE

Esalina Dewi¹, Emmy Yuanita¹, Lalu Rudyat Telly Savalas², Ni Komang Tri Dharmayani¹

¹Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram, Jl. Majapahit No 62

²Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram, Jl. Majapahit No 62

Abstrak: Enzim α -glukosidase adalah enzim yang menghidrolisis karbohidrat menjadi glukosa pada saluran pencernaan. Penghambatan enzim α -glukosidase pada saluran pencernaan merupakan salah satu upaya untuk mengobati penyakit diabetes mellitus tipe 2. Beberapa senyawa bahan alam telah diteliti memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase, salah satunya adalah senyawa turunan flavonoid. Penelitian ini menggunakan senyawa turunan flavonoid, yaitu pinostrobin yang diisolasi dari tumbuhan temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) dengan akardiose sebagai kontrol positif. Uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan dengan melakukan pengukuran absorbansi *p*-nitrofenol menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 400 nm. Kondisi reaksi dibuat tetap pada suhu 37°C, pH 6,8, waktu inkubasi 10 menit dan konsentrasi substrat 1 mM. Aktivitas enzim α -glukosidase pada kondisi tersebut didapatkan 0,028 U/mL. Variasi konsentrasi pinostrobin yang digunakan 10; 25; 50; 100; dan 200 μ M dengan nilai aktivitas inhibisi berturut-turut 0,026; 0,027; 0,025; 0,0257; dan 0,0248 U/mL. Hasil ini menunjukkan aktivitas inhibisi pinostrobin terhadap enzim α -glukosidase sangat lemah.

Kata kunci: α -glukosidase, inhibisi, pinostrobin, flavonoid, temu kunci

Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia sebagai gejala awal. Hiperglikemia merupakan salah satu kondisi dengan kadar glukosa darah di atas 200 mg/dL (Yuniastuti, dkk., 2018). Secara umum, diabetes diklasifikasikan menjadi diabetes melitus tipe 1 (DMT1), diabetes melitus tipe 2 (DMT2), gestasional, dan diabetes spesifik lain (Hardianto, 2020). *International Diabetes Federation (IDF)* (2021) dalam *IDF Diabetes Atlas 10th Edition* melaporkan jumlah penderita diabetes sebanyak 537 juta di seluruh dunia. Berdasarkan data tersebut, diperkirakan penderita diabetes terus meningkat hingga 643 juta pada tahun 2030 dan mencapai angka 783 juta pada tahun 2045. 90% dari kasus diabetes tersebut merupakan DMT2.

Dua faktor utama penyebab DMT2 yaitu rusaknya sekresi insulin pada sel pankreas dan ketidakmampuan jaringan sensitif insulin untuk merespon glukosa secara tepat (Gracia, dkk., 2020). Salah satu upaya untuk mengatasi penyakit DMT2 dengan menggunakan senyawa inhibitor yang mampu menghambat kerja enzim pencernaan karbohidrat seperti α -glukosidase di saluran pencernaan. Penggunaan inhibitor

α -glukosidase (AGI) menunda pemecahan karbohidrat di usus kecil dan mengurangi perjalanan glukosa darah postprandial. Dengan demikian, penghambatan enzim α -glukosidase memiliki efek signifikan pada metabolisme polisakarida (Kajimoto dan Node, 2009).

Berbagai senyawa yang potensial telah dipelajari secara ekstensif sebagai inhibitor α -glukosidase (AGI). Beberapa senyawa inhibitor α -glukosidase seperti akarbose, miglitol, voglibose, dan 1-deoxinojirimicin (DNJ) telah dikomersialkan sebagai obat penyakit DMT2 (Meneilly, dkk., 2000). Meskipun aktivitas α -glukosidase dapat dihambat oleh AGI komersial, penggunaan AGI komersial sering disertai dengan efek samping bagi kesehatan dan harganya mahal (Adefegha dan Oboh, 2012). Efek samping penggunaan AGI komersial yaitu sekresi insulin yang dirangsang glukosa berkurang dan gangguan fungsi hati (Bischoff, 1994; Isfa dan Walid, 2019).

Pencarian alternatif inhibitor enzim dari sumber alam sebagai bioinhibitor enzim untuk pengendalian hiperglikemia dapat dilakukan sebagai solusi masalah tersebut (Assefa, dkk., 2019). Beberapa senyawa bahan alam yang termasuk alkaloid, terpenoid, steroid, quinin, dan flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase (Yin, dkk., 2014). Beberapa senyawa turunan flavonoid dengan kerangka dasar flavon dan flavanon dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase lemah hingga kuat ($IC_{50} = <20\% * 200; 200; 96; 54; \text{ dan } 15 \mu\text{M}$) (Proenca, dkk., 2017).

Tanaman temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) merupakan salah satu sumber senyawa turunan flavonoid. Beberapa senyawa turunan flavonoid dengan kerangka dasar flavon, flavanon, dan kalkon telah berhasil diisolasi, salah satunya adalah senyawa pinostrobin (5-hidroksi-7-metoksi flavanon) (Atun, dkk., 2018; Risma, 2022). Pinostrobin dilaporkan memiliki aktivitas biologi seperti aktivitas anti-virus, anti-oksidan, anti-kanker, anti-inflamasi dan anti-bakteri (Patel, dkk., 2015). Berdasarkan hal tersebut pinostrobin diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai aktivitas penghambatan senyawa pinostrobin sebagai inhibitor enzim α -glukosidase (AGI) karena belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini diharapkan memberikan alternatif senyawa obat baru sebagai AGI bagi penderita DMT2. Uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan dengan modifikasi metode Proenca, dkk., (2017). Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase ditentukan dengan melakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Aktivitas enzim α -glukosidase ditandai dengan serapan *p*-nitrofenol (produk warna kuning) yang dilepaskan dari substrat *p*NPG.

Metode

Bahan

Senyawa pinostrobin hasil isolasi dari temu kunci (*Boesenbergia pandurata*), aquades, dimetil sulfoksida (DMSO) (Bio Basic Canada), enzim α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* rekombinan (Sigma Aldrich, USA), substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (*p*NPG) (Sigma Aldrich, USA), akarbose (Sigma Aldrich, USA), natrium karbonat (Na_2CO_3) (Merck), natrium dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) (Merck), dinatrium hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Merck), dan natrium hidroksida (NaOH) (Merck).

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Kern), *microtube* 1500-2000 μL (Eppendorf), tabung konikal 15 mL, pipet dan tip mikro (0,5-10; 10-100; 100-1000 μL Eppendorf), spektrofotometer UV-Vis (Reign, UV-1900), kuvet, *waterbath* (B-One), pH meter (*Hanna Instrument*), *freezer-20*, gelas kimia (Pyrex® IWAKI Glass), labu ukur (Pyrex® IWAKI Glass), gelas ukur (Pyrex® IWAKI Glass), corong kaca (Pyrex® IWAKI Glass), batang pengaduk, dan spatula.

Uji aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase

Aktivitas α -glukosidase diukur menggunakan modifikasi metode Proenca, dkk., (2017). Pengujian dilakukan oleh mengukur banyaknya substrat *p*NPG yang dihidrolisi oleh enzim α -glukosidase menjadi α -D-glukosa dan *p*-nitrofenol, pada panjang gelombang 400 nm. 50 μL DMSO/pinostrobin (0-200 μM)/akarbose (0-2000 μM), 250 μL buffer fosfat 0,1 M pH 6,8 dan 125 μL substrat *p*NPG konsentrasi 1 mM diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Campuran ditambahkan 125 μL larutan enzim α -glukosidase 0,25 U/mL dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah masa inkubasi selesai, ditambahkan 1000 μL Na_2CO_3 200 mM untuk menghentikan reaksi. Diukur absorbansi sampel pada panjang 400 nm. Akarbose (0–2000 μM) digunakan sebagai kontrol positif. Uji dilakukan dengan 3 kali pengulangan.

Hasil

Optimasi panjang gelombang maksimum p-nitrofenol

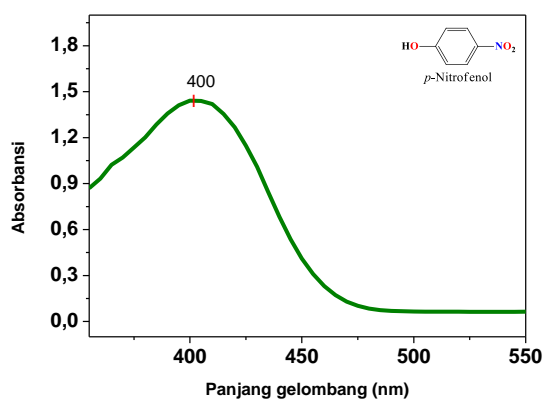
Enzim α -glukosidase memotong ikatan glikosidik pada substrat *p*NPG menghasilkan produk berupa D-glukosa dan *p*-nitrofenol. Terbentuknya produk *p*-nitrofenol menunjukkan adanya aktivitas enzim α -glukosidase. *p*-nitrofenol memiliki ciri khas berwarna kuning cerah dengan serapan maksimum pada 400-420 nm (Hallem, dkk., 2020 dan Leon, dkk., 2020). Berdasarkan pengujian yang dilakukan, *p*-nitrofenol teridentifikasi dengan adanya perubahan warna sampel uji menjadi kuning cerah dan serapan maksimum pada panjang gelombang 400 nm yang ditunjukkan pada Gambar 1 Hasil ini serupa dengan uji aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase yang dilakukan Elya, dkk (2012).

Aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi substrat pNPG dan variasi waktu inkubasi

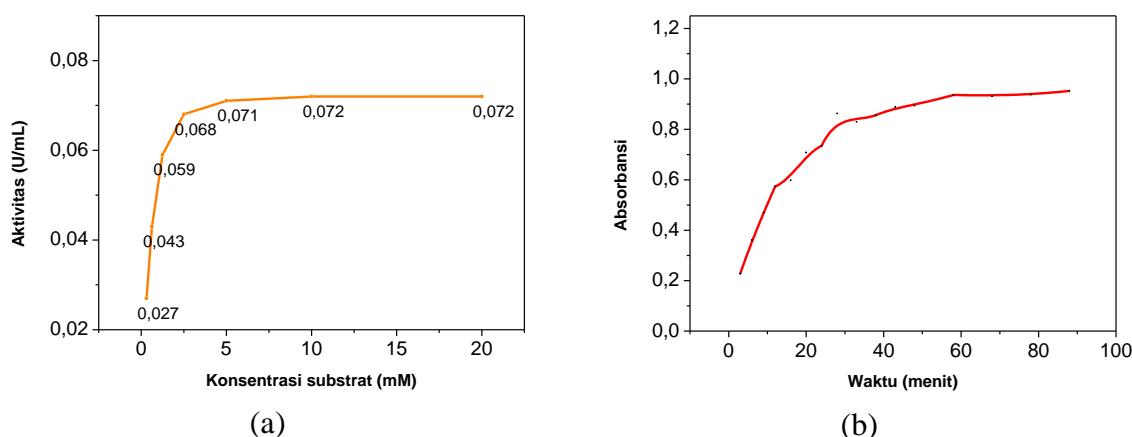
Uji aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang tepat berdasarkan kurva laju reaksi enzim terhadap substrat. Pengukuran pada Gambar 2 menunjukkan aktivitas enzim meningkat signifikan ketika konsentrasi substrat rendah. Ketika konsentrasi substrat tinggi kenaikan aktivitas enzim meningkat semakin kecil, ditunjukkan dengan kurva aktivitas enzim semakin landai. Aktivitas maksimum enzim teramati ketika konsentrasi substrat 10 mM, ditandai dengan tidak adanya peningkatan aktivitas enzim pada konsentrasi 20 mM. Hal ini dikarenakan ketika konsentrasi substrat rendah, sebagian besar enzim berada dalam bentuk enzim bebas yang tidak terkombinasi. Ketika konsentrasi substrat tinggi sisi aktif

enzim terisi penuh oleh substrat. Pada kondisi ini penambahan konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Berdasarkan hal tersebut, ditentukan konsentrasi substrat 1 mM untuk uji selanjutnya.

Perhitungan aktivitas enzim pada penelitian ini berdasarkan jumlah produk yang terbentuk dengan memvariasikan waktu inkubasi berdasarkan absorbansi. Kenaikan absorbansi menunjukkan peningkatan jumlah produk yang terbentuk persatuan waktu. Gambar 2 memperlihatkan kenaikan jumlah produk secara signifikan pada awal reaksi (20 menit pertama). Hasil ini, menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut sebagian besar enzim masih dalam bentuk enzim bebas. Semakin lama waktu inkubasi peningkatan jumlah produk semakin kecil, menunjukkan sisi aktif enzim semakin banyak terisi substrat. Sehingga, enzim dalam sistem lebih banyak dalam bentuk kompleks ES. Kurva aktivitas enzim stasioner pada waktu inkubasi 58 menit, menunjukkan semua enzim dalam bentuk kompleks ES. Penambahan waktu inkubasi pada kondisi ini tidak lagi mempengaruhi jumlah produk yang terbentuk. Pada percobaan ini ditentukan waktu inkubasi 10 menit untuk uji selanjutnya.



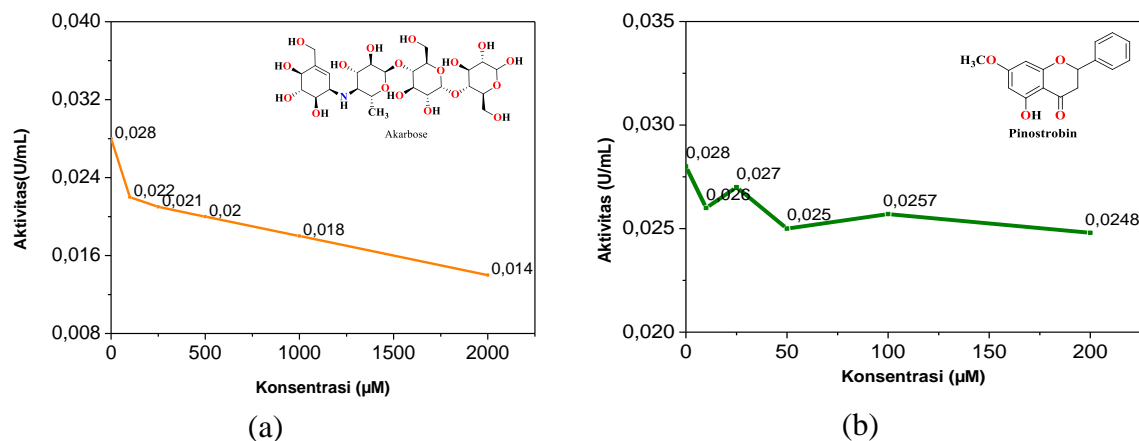
Gambar 1 Kurva absorbansi *p*-nitrofenol



Gambar 2 Kurva aktivitas enzim α -glukosidase dengan variasi (a) konsentrasi substrat *p*NPG dan (b) waktu inkubasi

Aktivitas inhibisi senyawa pinostrobin

Enzim α -glukosidase adalah enzim yang menghidrolisis karbohidrat menjadi glukosa pada saluran pencernaan. Aktivitas enzim α -glukosidase tanpa senyawa inhibitor (kontrol negatif) didapatkan sebesar 0,028 U/mL. Unit didefinisikan sebagai banyak μ mol substrat (dalam penelitian ini digunakan substrat *p*NPG) yang diubah menjadi produk (D-glukosa dan *p*-nitrofenol) per menit. Sehingga, 0,028 U/mL artinya enzim dapat mengubah 0,028 μ mol substrat *p*NPG menjadi D-glukosa dan *p*-nitrofenol per menit dalam 1 mL larutan. Berdasarkan grafik aktivitas enzim α -glukosidase yang ditunjukkan pada Gambar 3 Aktivitas inhibisi akarbose ditunjukkan dengan adanya penurunan aktivitas enzim ketika ditambahkan akarbose sebagai inhibitor. Gambar 3 menunjukkan aktivitas enzim menurun signifikan ketika ditambahkan akarbose sebagai inhibitor. Aktivitas enzim semakin rendah ketika konsentrasi akarbose dinaikkan. Hasil ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi akarbose aktivitas inhibisinya semakin tinggi. Struktur gula pada akarbose memiliki kemiripan dengan substrat *p*NPG, kemiripan struktur ini memungkinkan akarbose mengikat tepat pada sisi aktif enzim. Sehingga, akarbose memiliki aktivitas penghambatan kuat dan bersifat kompetitif.

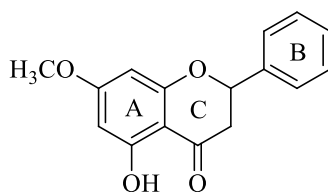


Gambar 3 Kurva aktivitas inhibisi (a) akarbose dan (b) pinostrobin terhadap enzim α -glukosidase

Gambar 3 menunjukkan aktivitas penghambatan senyawa pinostrobin tidak berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa pinostrobin sebagai inhibitor. Aktivitas enzim menurun tidak teratur dan tidak selaras dengan konsentrasi senyawa pinostrobin. Aktivitas inhibisi senyawa pinostrobin maksimum pada konsentrasi senyawa 200 μ M dengan aktivitas enzim sebesar 0,0248 U/mL. Nilai tersebut memperlihatkan bahwa penurunan aktivitas enzim sangat kecil pada konsentrasi maksimum senyawa yang diuji. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi untuk menghambat 50 % aktivitas enzim α -glukosidase (IC_{50}) senyawa pinostrobin di atas 200 μ M. Ada tiga kategori nilai IC_{50} sebagai anti-diabetes, yaitu sangat aktif (< 41 μ M), aktif (41-370 μ M), dan tidak aktif (> 370 μ M) (Lee, dkk., 2001). Berdasarkan hasil yang didapatkan, pinostrobin belum dapat digolongkan aktif atau tidak aktif sebagai anti-diabetes. Apabila IC_{50} senyawa

pinostrobin lebih besar dari 370 μM , maka senyawa pinostrobin tidak aktif sebagai anti-diabetes.

Hubungan struktur-aktivitas inhibisi senyawa flavonoid dipengaruhi oleh (i) ikatan hidrogen antara gugus hidroksi (-OH) dari ligan polifenol dan residu katalitik dari situs pengikatan dan (ii) pembentukan sistem π terkonjugasi yang menstabilkan interaksi dengan situs aktif (Piparo, dkk., 2008). Pinostrobin hanya memiliki substitusi OH pada C-5 cincin A, sehingga diprediksi hanya gugus OH C-5 yang membentuk ikatan hidrogen dengan struktur enzim α -glukosidase. Pinostrobin juga tidak memiliki ikatan rangkap pada cincin C. Hal ini mengurangi planaritas senyawa antara cincin A dan C dengan cincin B. Kedua hal ini diduga menyebabkan lemahnya aktivitas inhibisi senyawa pinostrobin terhadap enzim α -glukosidase.



Gambar 4 Struktur senyawa pinostrobin

Kesimpulan

Senyawa pinostrobin memiliki aktivitas inhibisi lemah terhadap enzim α -glukosidase. Aktivitas inhibisi pinostrobin lebih lemah dibandingkan dengan kontrol positif akardose. Sehingga, senyawa pinostrobin tidak berpotensi sebagai anti-diabetes.

Referensi

- Adefegha, S. A., & Oboh, G. (2012). Inhibition of Key Enzymes Linked to Type 2 Diabetes and Sodium Nitroprusside-Induced Lipid Peroxidation in Rat Pancreas by Water Extractable Phytochemicals from Some Tropical Spices. *Pharmaceutical Biology*, 50(7), 857-865.
- Assefa, S. T., Yang, E. Y., Chae, S. Y., Song, M., Lee, J., Cho, M. C., & Jang, S. (2019). Alpha Glucosidase Inhibitory Activities of Plants with Focus on Common Vegetables. *Plants*, 9(2), 1-16.
- Atun, S., Handayani, S., & Rakhmawati, A. (2018). Potential Bioactive Compounds Isolated from *Boesenbergia rotunda* as Antioxidant and Antimicrobial agents. *Pharmacognosy Journal*, 10(3), 513-518.
- Bischoff, H. (1994). Pharmacology of α -glucosidase Inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, 24(3), 3-10.
- Elya, B., Basah, K., Mun'im, A., Yulastuti, W., Bangun, A., & Septiana, E. K. (2012). Screening of α -Glucosidase Inhibitory Activity from Some Plants of *Apocynaceae*, *Clusiaceae*, *Euphorbiaceae*, and *Rubiaceae*. *Journal of*

Biomedicine and Biotechnology, 1-6.

Haleem, A., Syaal, S. B., Ajmal, M., Ambreen, J., Rauf, S., Ali, N., Muhammad, S., Shah, A., Zia, M. A., & Siddiq, M. (2020). Silver and Palladium Nanoparticle Embedded Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-2-Acrylamido-2-Methylpropane Sulfonic Acid) Hybrid Microgel Catalyst with pH and Temperature Dependent Catalytic Activity. *Korean J. Chem. Eng.*, 37(4), 614-622.

International Diabetes Federation (IDF), (2021), IDF Diabetes Atlas 10th Edition.

Isfa, M., & Walid, M. (2019). Uji kombinasi Antidiabetik antara Ekstrak Kulit Durian dan Akarbose dengan Perhitungan Kombinasi Indek dalam Penghambatan Kerja Enzim α -Glukosidase. *Jurnal farmasi Indonesia*, 16(1), 85-95.

Kajimoto, T., & Node, M. (2009). Inhibitors Against Glycosidases as Medicines. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(1), 13-33.

Lee, D.S., & Lee, S.H. (2001). Genistein, A Soy Isoflavone, is A Potent α -Glucosidase Inhibitor. *FEBS Letters*, 501(1), 84-86.

Leon, R. S., Barrates, M. S., Vasquez, H. T., Penaranda, L. V., & Rodriguez, G. (2020). Revisiting The Fundamentals of *p*-Nitrophenol Analysis For Its Application in The Quantification of Lipases Activity. *Revista UNICIENCIA*, 34(2), 2215-3470.

Meneilly, G. S., Ryan, E. A., Radziuk, J., Lau, D. C., Yale, J. F., Morais, J., Chiasson, J. L., Lhoret, R. R., Tessier, D., Maheux, P., Wolever, T., Josse, R. G., & Elahi, D. (2000). Effect of Acarbose on Insulin Sensitivity in Elderly Patients With Diabetes. *Diabetes Care*, 23(8), 1162-1167.

Patel, N. K., Jaiswal, G., & Bhutani, K. K. (2015). A Review o Biological Sources, Chemistry and Pharmacological Activities of Pinostrobin. *Natural Product Research*, 1-11.

Piparo, E. L., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Gigorov, M., & Chou, C. J. (2008). Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(12), 3555-3561.

Proenca, C., Freitas, M., Riberio, D., Oliveira, E. F., Sousa, J. L., Tome, S. M., Ramos, M. J., Silva, A. M., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017). α -Glucosidase Inhibition by Flavonoids: An In Vitro and In Silico Structure-Activity Relationship Study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216-1228.

Risma, M. (2022). *Isolasi Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Antibakteri pada Ekstrak n-Heksan Rimpang Temu Kunci (Boesenbergia pandurata) Asal Dompu. (Skripsi)*. Universitas Mataram.

Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014). α -Glucosidase Inhibitors

Isolated from Medicinal Plants. *Food Science and Human Wellness*, 3, 136-174.

Yuniastuti, A., Susanti, R., & Iswari, R. S. (2018). Efek Infusa Umbi Garut (*Maranta arundinacea* L) Terhadap Kadar Glukosa dan Insulin Plasma Tikus yang Diinduksi Streptozotocin. *Jurnal MIPA*, 41(1), 34-39.