

**UJI AKTIVITAS SENYAWA β -SITOSTEROL DARI SPONS
Haliclona sp. SEBAGAI INHIBITOR ENZIM LIPASE**

***ACTIVITY ASSAY OF β -SITOSTEROL FROM SPONS
Haliclona sp. AS LIPASE ENZYME INHIBITORS***

MULIANI¹, NI KOMANG TRI DHARMAYANI¹, EMMY YUANITA¹

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram
Jl. Majapahit No.62, Gomong, Kec. Selaparang, Kota Mataram, Nusa Tenggara Bar. 83115

*email: tri.dharmayani@unram.ac.id

Abstrak. Pengobatan obesitas dapat dilakukan dengan menghambat enzim lipase menggunakan terapi dan obat-obatan seperti orlistat, namun tidak optimal karena efek samping obat dan mahalnya biaya terapi. Alternatif yang direkomendasikan adalah dengan menggunakan inhibitor lipase seperti senyawa golongan steroid yaitu β -sitosterol yang telah diisolasi dari spons *Haliclona* sp. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas senyawa β -sitosterol dari spons *Haliclona* sp. sebagai inhibitor enzim lipase dengan orlistat sebagai kontrol positif. Nilai penghambatan lipase diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa β -sitosterol menunjukkan persentase inhibisi sebesar 3,48%, 3,61%, 6,78%, 8,54%, 10,08%, dan 15,64% pada variasi konsentrasi 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, dan 250 μ M. Aktivitas penghambatan β -sitosterol lebih tinggi ($IC_{50} = 937,89 \mu$ M) dibandingkan dengan orlistat ($IC_{50} = 1830,85 \mu$ M). Nilai ini menunjukkan β -sitosterol berpotensi sebagai inhibitor lipase.

Kata Kunci: β -sitosterol, *Haliclona* sp., Lipase, Obesitas, Penghambatan.

Abstract. Treatment of obesity has been performed by inhibiting lipase enzymes using therapy and drugs such as orlistat, but this approach is not optimal due to the adverse effects of the medication and the high expense of therapy required for long-term treatment. A recommended alternative is to use lipase inhibitors, such as a steroid group compound namely β -sitosterol which has been isolated from *Haliclona* sponge. The purpose of this study was to determine the lipase enzyme inhibitory activity of β -sitosterol isolated from *Haliclona* sp. sponge using orlistat as a positive control. The lipase inhibition value was measured using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 400 nm. The results showed that β -sitosterol showed an inhibition percentage of 3.48%, 3.61%, 6.78%, 8.54%, 10.08%, and 15.64% at the concentration variations of 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, and 250 μ M, respectively. The inhibitory activity of β -sitosterol was higher ($IC_{50} = 937.89 \mu$ M) compared to orlistat ($IC_{50} = 1830.85 \mu$ M). This value showed that β -sitosterol has potential as a lipase inhibitor.

Keywords: β -sitosterol, *Haliclona* sp., Inhibition, Lipase, Obesity.

PENDAHULUAN

Inhibitor lipase adalah alternatif untuk pengobatan hiperglikemia yang diinduksi diet pada manusia (Liu, *et al.*, 2013). Data klinis dari Tucci *et al* (2010) menyatakan bahwa penghambatan lipase menghasilkan penurunan faktor resiko terhadap obesitas. Penghambatan lipase akan mencegah pemecahan trigliserida dan menunda penyerapan asam lemak ke dalam sirkulasi sistemik dan adiposit. Sehingga inhibitor lipase menjanjikan dalam pengobatan obesitas.

Orlistat adalah salah satu penghambat enzim lipase metabolisme lemak dalam tubuh. Pemanfaatan orlistat terbatas disebabkan karena efek samping obat dan mahalnya biaya akibat pengobatan jangka panjang (Rajan, *et al.*, 2020). Sebagai pengobatan atau pencegahan untuk obesitas, perlu dicari alternatif klinis yang aman dari sumber daya alam sebagai kemajuan yang signifikan.

Alternatif inhibitor lipase yang bersumber dari alam seperti senyawa β -sitosterol telah dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap aktivitas lipase. Senyawa β -sitosterol memiliki gugus OH pada C-3 diperkirakan dapat meningkatkan aktivitas inhibisi senyawa β -sitosterol. Selain itu, Senyawa ini memiliki gugus etil pada posisi C-24 yang dilaporkan mampu mengurangi penyerapan lemak dan mengganggu sirkulasi absorpsi lemak (Babu *et al.*, 2020). Sumber senyawa β -sitosterol lain juga dapat ditemukan pada biota laut seperti spons *Haliclona sp.* yang telah berhasil diisolasi oleh Hasanah, 2022.

Pada studi riset ini memanfaatkan enzim lipase dari tumbuhan yaitu biji ketapang sebagai model yang lebih ekonomis untuk menguji aktivitas senyawa β -sitosterol dari spons *Haliclona sp.* sebagai inhibitor lipase. Biji ketapang diketahui memiliki nilai aktivitas enzim lebih tinggi dibandingkan dengan sumber biji lain. Hal ini sesuai dengan kandungan minyak yang terkandung dalam biji ketapang sekitar 51,80% (Matos *et al.*, 2009). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka telah dilakukan penelitian dengan judul “**Uji Aktivitas Senyawa β -sitosterol dari spons *Haliclona sp.* sebagai Inhibitor Enzim Lipase**”, sehingga dari penelitian ini didapatkan alternatif senyawa obat baru dari alam yaitu tumbuhan laut sebagai inhibitor enzim lipase bagi penderita obesitas.

MATERI DAN METODE

Lokasi Penelitian

Penelitian berlokasi di Laboratorium Bersama, Universitas Mataram. Analisis UV-Vis dilakukan di Laboratorium Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP Universitas Mataram.

Prosedur Kerja

Isolasi Ekstrak Kasar Enzim Lipase. Metode isolasi menggunakan metode yang dikembangkan Abigor *et al.*, (2002) yang dimodifikasi. 25 g biji ketapang yang

telah dicuci dan diblender kasar, ditambahkan 100 mL larutan buffer fosfat 5 mM pH 7, kemudian dihomogenkan dengan blender sampai halus. Homogenat dipisahkan dengan cara disaring menggunakan saringan plastik. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim lipase yang akan digunakan untuk uji lanjutan.

Uji Aktivitas Enzim Lipase. Aktivitas lipase diukur dengan menggunakan metode Enujiugha *et al.*, (2004) yang telah dimodifikasi. Campuran 5 g VCO, 2,5 mL *n*-heksana, 5 mL bufer fosfat 100 mM pH 7 dimasukkan terlebih dahulu ke dalam erlenmeyer. Penambahan 1 mL *crude* enzim lipase ditambahkan dan diinkubasi menggunakan *waterbath* (37 °C, 45 menit). Ketika waktu inkubasi selesai, reaksi enzimatik segera dihentikan dengan penambahan aseton:etanol (1:1) 25 mL. Hasil inkubasi ditambahkan empat tetes indikator fenoltalein dan dititrasi dengan NaOH 0,01 M sampai berubah warna menjadi merah muda. Semua perlakuan dikerjakan triplo. Aktivitas lipase dihitung dengan rumus sebagai berikut (Ul-Haq *et al.*, 2002):

$$\text{Aktivitas Lipase (U/mL)} = \frac{[(V \text{ sampel} - V \text{ blanko}) \times \text{NaOH} \times 1000]}{V \text{ enzim} \times t} \quad (3.1)$$

Keterangan:

V_{sampel} : volume titran sampel (mL)

V_{blanko} : volume titran blanko (mL)

V_{enzim} : volume enzim (mL)

[NaOH] : konsentrasi NaOH (M)

t : waktu inkubasi (menit)

1000 : Nilai konversi dari satuan mmol ke satuan μmol

Panjang Gelombang *p*-Nitrofenol. Penentuan panjang gelombang diukur dengan menggunakan metode Basri (2020). Ditimbang 13,9 mg *p*-Nitrofenol, lalu dilarutkan dengan 10 mL bufer *tris*-HCl hingga menjadi konsentrasi 10 mM. Larutan kembali diencerkan sampai konsentrasi 0,1 mM dengan volume 10 mL. Sebelum pengukuran serapan, campuran ditambahkan 1 mL NaOH 1 M kemudian serapan dibaca pada rentang panjang gelombang 350-550 nm. Panjang gelombang dengan serapan tertinggi dipakai untuk pengukuran selanjutnya.

Waktu Inkubasi (*Time Course*). waktu inkubasi diukur dengan menggunakan metode Gupta *et al.*, (2002) yang telah dimodifikasi. Diambil 6 mg substrat *p*-Nitrofenil Palmitat dilarutkan dengan 2 mL asetonitril dalam vial gelap. Dalam wadah lain, campuran 20 mg *gum arabic* dan 41,4 mg natrium deoksikolat sebagai emulsi dilarutkan dalam 18 mL *tris*-HCl 50 mM pH 8. Kedua larutan dicampur dan dihomogenkan dalam wadah gelap. Substrat masing-masing

sebanyak 2,4 mL dipipet ke dalam 6 buah tabung konikal 15 mL untuk pra inkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Reaksi hidrolisis dimulai dengan menambahkan 0,1 mL enzim lipase ke dalam substrat (kecuali blanko) sambil tetap diinkubasi. Pengukuran aktivitas hidrolitik enzim lipase diukur pada panjang gelombang 400 nm setiap 5 menit.

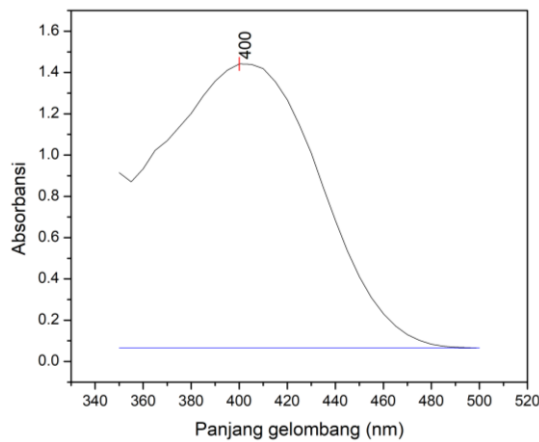
Uji Penghambatan

Pengujian aktivitas penghambatan lipase, metode Slanc *et al.*, (2004) dimodifikasi. *p*-Nitrofenilpalmitat (PNP) (Sigma) dilarutkan dalam asetonitril untuk menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 10 mM. Larutan disimpan pada suhu -20 °C. Larutan sampel β -sitosterol 1 mM 100 μ L, 400 μ L buffer *tris*-HCl 50 mM pH 8, dan 400 μ L larutan substrat *p*NPP, pra inkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 400 μ L enzim lipase diinkubasi kembali selama 10 menit. Setelah inkubasi selesai, 200 μ L etanol ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Absorbansi diukur pada 400 nm. Enzim digantikan dengan aquades dan sampel dengan DMSO untuk blanko dan kontrol. Pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali

HASIL DAN DISKUSI

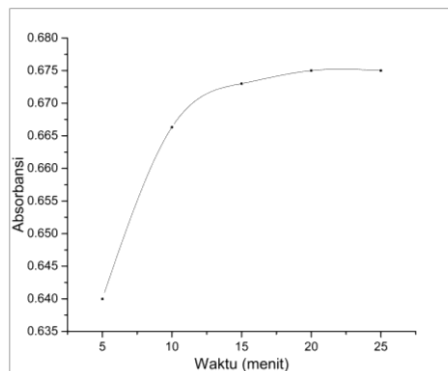
Enzim lipase diisolasi dari biji ketapang tua. Secara kuantitatif, dari 100 mL filtrat biji ketapang didapatkan \pm 65 mL ekstrak kasar enzim lipase. Ekstrak kasar enzim lipase didapatkan pada lapisan tengah (supernatan). Menurut Jubaidah (2016), bahwa lapisan terbentuk karena sel-sel dari tumbuhan yang disentrifugasi akan hancur dan terkumpul dibagian bawah tabung sebagai residu, sedangkan ekstrak kasar enzim lipase (*crude*) akan terlarut dalam supernatannya. Aktivitas hidrolitik enzim lipase ketapang diukur dari jumlah asam lemak yang dihasilkan pada hidrolisis substrat VCO oleh enzim lipase. Jumlah asam lemak ini diketahui dengan metode titrimetri (titrasi asam basa), di mana konsentrasi asam lemak setara dengan NaOH yang dihabiskan. Aktivitas *crude* enzim lipase adalah sebesar 0,9851 U/mL. Nilai ini menunjukkan aktivitas enzim dari biji ketapang tinggi.

Penentuan panjang gelombang maksimum dengan mengukur serapan tertinggi *p*-nitrofenol pada rentang 380-550 nm. Berdasarkan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis, didapatkan panjang gelombang maksimum (λ_{\max}) *p*-nitrofenol adalah 400 nm (Gambar 2). Panjang gelombang inilah yang akan digunakan untuk pengukuran absorbansi selanjutnya. Puncak serapan *p*-nitrofenol pada 400 nm menunjukkan pembentukan ikatan konjugatif antara nitro (-NO₂) dengan fenol (-OH).



Gambar 2. Panjang gelombang maksimum (λ_{\max}) *p*-nitrofenol

Pengukuran waktu optimum dilakukan untuk mengetahui waktu optimum enzim untuk menghasilkan jumlah produk selama proses aktivasi enzim melalui proses inkubasi.

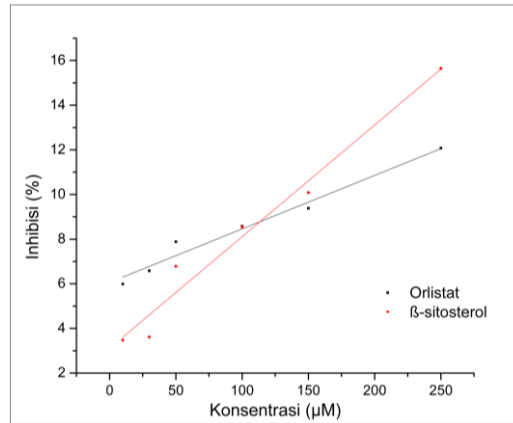


Gambar 3. *Time Course* Substrat Pada Panjang Gelombang 400 nm

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim kecepatan awal reaksi hidrolitik enzim semakin tinggi. Berdasarkan (Gambar 3) absorbansi terjadi pada waktu kontak 5 menit dengan absorbansi 0,64 kemudian mengalami peningkatan sampai waktu kontak 10 menit dengan absorbansi 0,666. Terjadinya kenaikan absorbansi dikarenakan masih ada sisi aktif enzim yang belum berikatan dengan substrat, sisi aktif enzim belum optimal berikatan dengan substrat atau belum terjadi keseimbangan. Setelah waktu kontak 10 menit, waktu kontak cenderung tidak terjadi perubahan yang signifikan (linear). Pada percobaan ini dipilih waktu kontak 10 menit, dengan pertimbangan bahwa kinetika reaksi enzimatik berada dalam daerah linear mengikuti reaksi orde 1.

Uji inhibisi senyawa β -sitosterol terhadap aktivitas enzim lipase dilakukan melalui uji aktivitas enzim lipase dengan penambahan orlistat sebagai kontrol positif dan senyawa β -sitosterol sebagai pembanding dengan variasi konsentrasi 10; 30; 50; 100; 150; dan 250 μM . Pengujian aktivitas penghambatan enzim lipase

terlebih dahulu dilakukan pengukuran nilai penghambatan orlistat sebagai kontrol positif. Perlakuan yang serupa untuk pengujian aktivitas inhibisi lipase dengan senyawa β -sitosterol sebagai sampel uji. Grafik pengaruh senyawa uji dan orlistat terhadap aktivitas enzim lipase tercantum pada Gambar 4.



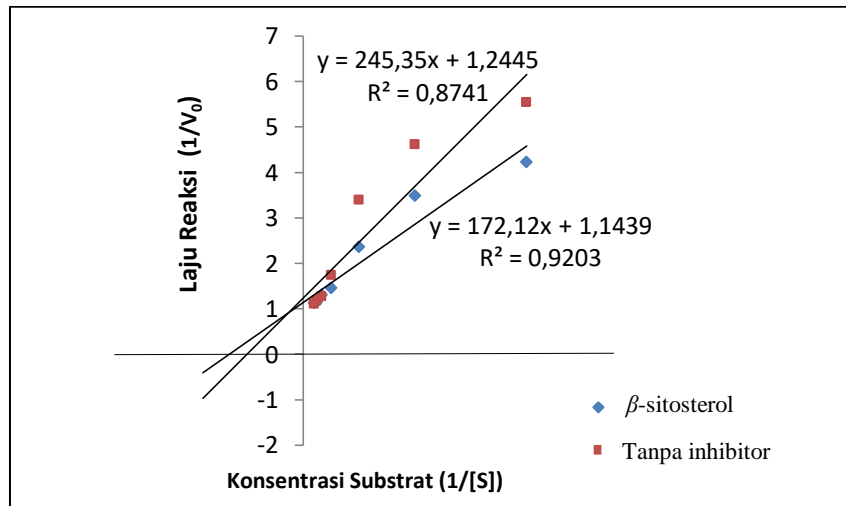
Gambar 4. Kurva aktivitas inhibisi β -sitosterol dan Orlistat terhadap Enzim Lipase

Grafik pada Gambar 4 menunjukkan bahwa orlistat dan senyawa β -sitosterol merupakan inhibitor enzim lipase. Orlistat dengan konsentrasi tertinggi yaitu $250 \mu\text{M}$ menghambat aktivitas enzim lipase sebesar 12,475%. Sedangkan senyawa β -sitosterol menghambat aktivitas enzim lipase sebesar 15,641% pada konsentrasi tertinggi. Efek penghambatan senyawa β -sitosterol lebih besar dibandingkan dengan efek penghambatan orlistat terhadap aktivitas enzim lipase.

Perhitungan nilai inhibisi digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . Berdasarkan grafik persen (%) inhibisi yang ditunjukkan pada (Gambar 4.6) dari kurva tersebut didapatkan persamaan linear orlistat $y = 0,024x + 6,0594$. Dari persamaan ini didapatkan nilai IC_{50} orlistat yaitu $1.830,85 \mu\text{M}$. Angka ini menunjukkan orlistat mampu menghambat 50% aktivitas pembentukan produk pada enzim lipase sebesar $1.830,85 \mu\text{M}$. Penghambatan orlistat terhadap lipase meningkat seiring bertambahnya konsentrasi. Mekanisme orlistat telah dilaporkan sebagai kompetitif, di mana kovalen terbentuk antara residu serin dari situs aktif dan cincin lakton dari inhibitor (Candela, *et al.*, 2021).

Aktivitas inhibisi senyawa β -sitosterol terhadap enzim lipase juga meningkat seiring bertambahnya konsentrasi. Pada (Gambar 4) didapatkan persamaan linear β -sitosterol $y = 0,05x + 3,1055$. Nilai IC_{50} menunjukkan minimum konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% kerja enzim lipase. Sehingga semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin berpotensi sampel sebagai

inhibitor lipase. Nilai IC_{50} senyawa β -sitosterol diperoleh yaitu $937,89 \mu\text{M}$. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa β -sitosterol dari spons *Haliclona sp.* lebih efektif dalam menghambat aktivitas lipase dibandingkan dengan orlistat. Hasil ini menunjukkan bahwa β -sitosterol potensial sebagai alternatif senyawa obat baru dari alam sebagai inhibitor enzim lipase.



Gambar 5. Grafik *Lineweaver-Burk* Reaksi Inhibisi Aktivitas Enzim Lipase oleh Senyawa β -sitosterol

Grafik *Lineweaver-Burk* memberikan identifikasi tentang jenis penghambatan dari senyawa β -sitosterol. Berdasarkan grafik pada Gambar 5, Nilai K_m yang diperoleh dari adanya penambahan inhibitor β -sitosterol sebesar $150,47 \mu\text{M}$ dan nilai V_{max} diperoleh sebesar $0,874 \mu\text{M}/\text{menit}$. Sedangkan nilai K_m enzim lipase tanpa adanya penambahan inhibitor sebesar $197,15 \mu\text{M}$ dan nilai V_{max} yang diperoleh sebesar $0,804 \mu\text{M}/\text{menit}$. Plot *Lineweaver-Burk* nampak bahwa kedua garis saling berpotongan, tetapi tidak memotong sumbu X dan sumbu Y. Berdasarkan nilai K_m dan V_{max} enzim lipase tersebut menunjukkan bahwa K_m dan V_{max} enzim lipase tanpa inhibitor dan dengan adanya inhibitor mempunyai nilai yang berbeda. Jika inhibitor dapat mengubah laju maksimum dan konstanta Michaelis maka merupakan inhibitor campuran (Litwack, 2018). Hal ini menunjukkan bahwa reaksi inhibisi senyawa β -sitosterol terhadap enzim lipase merupakan reaksi inhibisi campuran (*mixed inhibition*). Inhibisi campuran adalah kombinasi dari inhibisi kompetitif dan inhibisi non kompetitif (Hegy *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Enzim lipase dari biji ketapang dapat digunakan sebagai model alternatif yang ekonomis dalam studi riset mengenai uji inhibisi terhadap enzim lipase. Persen inhibisi senyawa β -sitosterol mencapai $15,641\%$ lebih tinggi dibandingkan dengan % inhibisi kontrol positif orlistat sebesar $12,475\%$. Senyawa β -sitosterol

memiliki aktivitas penghambatan enzim lipase dengan nilai IC_{50} 937,89 μ M lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif orlistat dengan nilai IC_{50} 1.830,85 μ M, sehingga β -sitosterol berpotensi sebagai inhibitor enzim lipase. Melalui uji kinetika menggunakan metode plot *Lineweaver-Burk* didapatkan identifikasi jenis inhibisi senyawa β -sitosterol merupakan inhibisi campuran.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Dosen Pembimbing Dr. Ni Komang Tri Dharmayani, S.Si., M.Si., Dr. Emmy Yuanita, S.Si., M.Si., Dr.rer.nat. Lalu Rudyat Telly Savalas, M.Si yang telah memberikan saran, masukan, dan kritikan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abigor, R. D., Uadia, P. O., Foglia, T. A., Haas, M. J., Scott, K., dan Savary, B. J., 2002, Partial Purification and Properties of Lipase from Germinating Seeds of *Jatropha curcas* L, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(11): 1123-1126.
- Babu, S., & Jayaraman, S., 2020, An update on β -sitosterol: A Potential Herbal Nutraceutical For Diabetic Management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131: 110702.
- Basri, N. H., 2020, *Spesifisitas Enzim Lipase dari Endosperma Kelapa terhadap Ester Asam Lemak*, Skripsi, Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram, Mataram.
- Candela, M. F., Arenas, N. E., Caicedo, O., & Malagon, A., 2021, Inhibition of Lipase by Orlistat: Kinetics Combined with In Silico Approaches to Visualize Interactions, *Journal of Chemical Education*, 98(5): 1762-1767.
- Enujiugha, V. N., Thani, F. A., Sanni, T. M., & Abigor, R. D., 2004, Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). *Food Chemistry*, 88(3): 405-410.
- Gupta, R., Gupta, N., and Rathi, P., 2004, Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification and Biochemical Properties, *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 763-781.
- Hasanah, R., 2022, *Isolasi Dan Elusidasi Struktur Metabolit Sekunder Spons Haliclona sp. Asal Perairan Lombok*, Skripsi, Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mataram, Mataram.
- Litwack, G., 2018, *Human Biochemistry*, Academic Press.
- Slanc, B. Doljak, A. Mlinarič, and B. Štrukelj, 2004, *Phytother. Res.*, 18: 758.