

## Uji Aktivitas Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase Isolat Bakteri Endofit Tanaman Duwet (*Syzygium cumini* L. Skeels) Sebagai Sumber Alternatif Antidiabetes

Nuhaul Fatin, Sri Pujiyanto dan Budi Raharjo

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Jalan Prof. H. Soedarto, S.H., Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275  
Email: nuha.fatin93@gmail.com.

### Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease contributes to the health problem in Indonesia. The inhibition of  $\alpha$ -glucosidase is one of the mechanisms of antidiabetic treatment.  $\alpha$ -glucosidase inhibitor can be found in the duwet plants (*Syzygium cumini* L. Skeels) that have been used traditionally in Indonesia as antidiabetic drug. However, due to the insufficient quantity and the long harvesting time, the forthcoming application of duwet is considerably not promising. The natural tendencies of endophytic microorganisms are identical to the host plant. In this case the endophytic bacteria of the duwet plant is studied to determine its potential as an alternative to producing  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. A total of 14 isolates of endophytic duwet bacteria isolated tested the ability of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors using p-nitrophenyl-D-  $\alpha$ -glucopyranoside. The result of the absorbance based on breakdown of substrate that produce colored product and analyzed by spectrophotometric technique. All isolates had  $\alpha$ -glucosidase inhibitor activity, the highest activity produced by isolates A21 and A22 with value of 69,18% and 69,22%.

Keywords : inhibitor  $\alpha$ -glucosidase, endophytic bacteria, *Syzygium cumini*

### Abstrak

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang menjadi permasalahan kesehatan cukup pelik di Indonesia. Inhibisi  $\alpha$ -glukosidase merupakan salah satu mekanisme pengobatan antidiabetes. Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dapat diperoleh dari tanaman duwet yang telah digunakan sejak lama secara tradisional di Indonesia sebagai obat antidiabetes, namun penggunaannya memiliki berbagai kendala dikarenakan jumlahnya yang terbatas dan siklus hidupnya yang relatif lama. Pemanfaatan mikroorganisme endofit yang memiliki senyawa aktif yang sama dengan tanaman inangnya, dalam hal ini bakteri endofit dari tanaman duwet, dikaji untuk mengetahui potensinya sebagai alternatif penghasil inhibitor  $\alpha$ -glukosidase. Sebanyak 14 isolat bakteri endofit duwet diuji kemampuan inhibitor  $\alpha$ -glukosidasenya menggunakan pseudo-substrat p-nitrofenil-D-  $\alpha$ -glukopiranosida. Hasil absorbansi berdasarkan pemecahan substrat yang menghasilkan produk berwarna dianalisis dengan teknik spektrofotometri. Seluruh isolat memiliki aktivitas inhibitor  $\alpha$ -glukosidase, aktivitas tertinggi dihasilkan isolat A21 dan A22 sebesar 69,18% dan 69,22%.

Kata kunci : inhibitor  $\alpha$ -glukosidase, bakteri endofit, *Syzygium cumini*

### PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang menjadi permasalahan kesehatan yang cukup pelik di Indonesia. Berbagai laporan, jumlah penderita diabetes melitus semakin meningkat. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menyatakan, penderita diabetes di Indonesia akan mengalami kenaikan dari 8,4 juta jiwa pada 2000, menjadi 21,3 juta jiwa pada 2030.

Diabetes melitus merupakan sindroma khas yang ditandai hiperglikemia kronik serta gangguan

metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang dihubungkan dengan kekurangan insulin baik relatif maupun absolut serta gangguan kerja insulin (Dalimartha, 2005). Diabetes mellitus tidak dapat disembuhkan, tapi dapat dikontrol dengan cara menjaga kadar gula tetap dalam kondisi normal (80-120 mg/dl) (Pujiyanto *et al.*, 2012).

Pengobatan diabetes mellitus dapat dilakukan dengan menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berfungsi mempercepat perombakan karbohidrat yang belum terserap (oligosakarida dan

disakarida) menjadi monosakarida di dalam usus halus, sehingga menyebabkan hiperglikemia. Maka dibutuhkan obat antidiabetes yang menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase, sehingga asupan glukosa dari usus ke dalam darah dapat dikurangi. Senyawa aktif yang memiliki aktivitas seperti ini misalnya inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase, diantaranya bersumber dari tanaman obat.

Menurut Arifin *et al.*, (2006) Salah satu pemanfaatan tanaman obat antidiabetes di Indonesia adalah duwet (*Syzygium cumini* L. Skeels). Kulit, batang, buah, daun dan biji duwet dapat menurunkan kadar gula darah. Ekstrak etanol daun duwet mengandung beberapa senyawa seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, fenolik, dan saponin. Namun, pemanfaatan tanaman sebagai obat herbal memiliki berbagai kendala dikarenakan jumlahnya yang terbatas dan siklus hidupnya yang relatif lama (Prihatiningtias, 2007).

Menurut Srikandance *et al.*, (2007) menambahkan peraturan pemerintah maupun internasional yang melindungi kelestarian alam menyebabkan pengambilan tumbuhan maupun usaha pengembangan kultivar tanaman keluar dari daerah asalnya mengalami hambatan. Oleh karena itu, diperlukan alternatif lain sebagai sumber senyawa antidiabetes.

Alternatif lain sumber penghasil antidiabetes yaitu dengan memanfaatkan metabolit sekunder pada bakteri endofit, yaitu bakteri yang hidup dalam tanaman dan dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sama dengan yang dihasilkan inangnya akibat adanya pertukaran genetik dan hubungan evolusi yang panjang (Tan & Zou, 2001).

Pemanfaatan bakteri endofit diharapkan dapat menghasilkan metabolit sekunder penting yang memiliki khasiat sama dengan metabolit yang dihasilkan tanaman inangnya. Tanaman obat diabetes merupakan sumber mikroba potensial penghasil inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase. Dengan memperoleh isolat potensial dari tanaman tersebut, maka produksi senyawa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase sebagai obat diabetes dapat dilakukan secara mikrobiologis, dengan jumlah yang lebih banyak, dan kualitas yang lebih baik, serta sebagai upaya konservasi.

Penelitian yang dilakukan oleh Fatin dkk., (2014) dilaporkan telah berhasil mendapatkan isolat bakteri endofit yang berasal dari Tanaman Duwet

(*Syzygium cumini* L. Skeels). Namun, potensi inhibisinya terhadap  $\alpha$ -glukosidase dari isolat bakteri endofit tersebut belum diketahui. Oleh karena, dilakukan uji inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase untuk mengetahui potensinya sebagai penghasil senyawa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang dikemudian hari dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai alternatif sumber penghasil antidiabetes.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah cawan petri, ose, tabung reaksi, autoklaf, pembakar spiritus, erlenmeyer, hot plate, mikroskop, gelas beker, inkubator, neraca analitik, freezer, spektrofotometer, mikropipet, tip, pipet tetes, gunting, mortar, rotary shaker, sentrifuge, tabung sentrifuge 15 ml, gelas benda. Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri endofit duwet yang terdiri dari 8 isolat dari akar dan 6 isolat dari batang duwet (*Syzygium cumini* L. Skeels) (Fatin dkk., 2014), Agar, soluble starch, pepton, yeast extract, enzim  $\alpha$ -glukosidase (Sigma-Aldrich), Bovine Serum Albumin (BSA), buffer fosfat, *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG), larutan natrium karbonat Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, larutan akarbose (Bayer), maltosa, fruktosa, sukrosa, laktosa, alkohol, spiritus, aquades, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, Iodin, minyak emersi.

### **Peremajaan Isolat Bakteri Endofit**

Peremajaan isolat bakteri endofit dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri sebanyak 1 ose dan menggoreskannya pada media (Priyanto, 2014). Media yang digunakan untuk isolat bakteri endofit adalah medium agar *Yeast Extract Starch* (YS) miring dengan komposisi menurut Pujiyanto & Ferniah (2010) yaitu 0,15% yeast extract, 0,1% soluble starch, 0,5% pepton dan 2% agar, kemudian diinkubasi selama 24 jam.

### **Kultur Bakteri Endofit**

Isolat bakteri dikultur pada medium cair dengan komposisi 0,1% soluble starch, 0,5% pepton dan 0,15 % yeast ekstrak dengan pH 7. Kultur diinkubasi selama 5 hari dengan agitasi 120 rpm pada suhu ruang. Sel mikroba pada kultur selanjutnya dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit dan supernatan yang diperoleh diuji daya hambatnya terhadap aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase (Chen *et al.*, 2004; Pujiyanto & Ferniah, 2010).

### Uji Inhibitor $\alpha$ -glukosidase

Uji Inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase (Xiancui *et al.*, 2005; Anam *et al.*, 2009; Pujiyanto & Ferniah, 2010) dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna, yang diukur absorbansinya selama periode waktu tertentu. Enzim  $\alpha$ -glukosidase (Sigma-Aldrich) dilarutkan dalam 0,1 M buffer fosfat pH 7 dengan konsentrasi 0,30 U/mL. Sebagai substrat digunakan *pseudo*-substrat *p*-Nitrophenil- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG) 20 mM yang dilarutkan dalam 0,1 M buffer fosfat pH 7. Campuran reaksi terdiri dari 250  $\mu$ L substrat, 490  $\mu$ L 0,1 M buffer fosfat pH 7 dan 10  $\mu$ L sampel. Setelah campuran reaksi diinkubasi pada 37°C selama 5 menit, sebanyak 250  $\mu$ L larutan enzim ditambahkan dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 500  $\mu$ L larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM. Natrium karbonat dan pNPG yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm. Komposisi pengujian inhibitor dapat dilihat pada Tabel 4.2. Sebagai pembandingan digunakan larutan Acarbose 1% (Bayer).

Persentase inhibisi diukur dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(c-s)}{c} \times 100\%$$

Ketentuan: C= absorbansi kontrol C<sub>1</sub>-C<sub>0</sub>

S= absorbansi sampel S<sub>1</sub>-S<sub>0</sub>

### HASIL DAN PEMBAHASAN

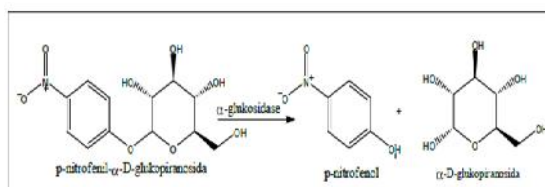
Uji aktivitas inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dari 14 isolat bakteri endofit dikaji dengan menggunakan *pseudo*-substrat *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida menghasilkan produk berwarna kuning dengan tingkat kecerahan warna berbeda-beda.

Menurut Sugiwati, (2005) hal tersebut disebabkan terhidrolisisnya *pseudo*-substrat yaitu *p*-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida oleh  $\alpha$ -glukosidase menjadi *p*-nitrofenol (zat berwarna kuning) dan  $\alpha$ -D-glukopiranosida (glukosa).



Gambar 1. Uji inhibitor  $\alpha$ -glukosidase pada empat belas isolat tanaman duwet.

Warna kuning yang dihasilkan merupakan indikator kemampuan inhibitor dari isolat bakteri endofit. Mikkelsen & Corton, (2004 dalam Irawan (2009) menyatakan kemampuan inhibitor yang semakin besar menghasilkan produk yang semakin sedikit atau warna larutan setelah inkubasi menjadi lebih cerah. Inhibisi dari hidrolisis enzimatis substrat dianalisis dengan spektrofotometer untuk mengetahui jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan pada reaksi. Gambar 2. Berikut reaksi enzimatis yang terjadi.

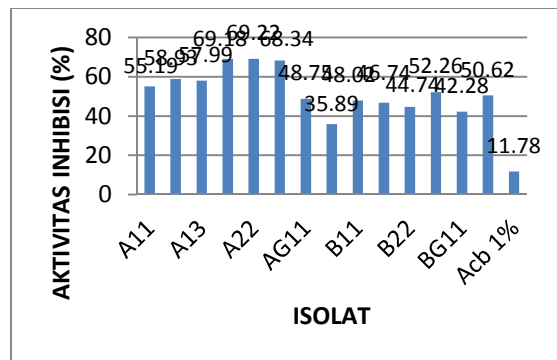


Gambar 2. Skema reaksi enzimatis  $\alpha$ -glukosidase dengan *pseudo*-substrat *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (Sugiwati *et al.*, 2009).

Akarbose dilaporkan Gown (2006 dalam Pujiyanto, 2012) adalah senyawa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang telah sukses dikomersilkan dan merupakan suatu *pseudo*-oligosakarida yang memiliki struktur mirip glukosa. Senyawa ini dihasilkan oleh *Actinoplanes* sp., yaitu aktinomiset yang diisolasi dari suatu daerah di Kenya dan dikomersilkan perusahaan Bayer Jerman.

Hasil analisis inhibisi pada 14 isolat bakteri endofit tanaman duwet dengan spektrofotometer menunjukkan adanya aktivitas inhibitor terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase. Keseluruhan isolat bakteri endofit tanaman duwet memiliki nilai aktivitas inhibitor yang lebih tinggi dibandingkan dengan

akarbosa 1% (Acb 1%), sebagai pembanding, seperti pada Gambar 2.



Gambar 3. Aktivitas Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase

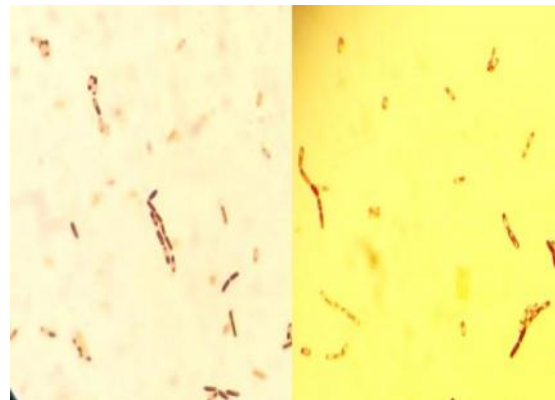
Membandingkan nilai aktivitas inhibitor  $\alpha$ -glukosidase pada 14 Isolat bakteri yang diujikan (Gambar.2.), isolat bakteri A21 dan A22 menghasilkan nilai aktivitas inhibitor tertinggi yaitu sebesar 69,18% dan 69,22%, sedangkan nilai aktivitas terendah adalah isolat bakteri AG22 yakni sebesar 35,89%. Isolat bakteri A21 an A22 disimpulkan memiliki potensi terbaik sebagai alternatif penghasil antidiabetes.

Inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang dihasilkan oleh isolat bakteri endofit tanaman duwet merupakan metabolit sekunder yang menurut Nofiani, (2008) adalah metabolit yang beraksi sebagai mekanisme pertahanan alternatif. Bakteri yang hidup dalam jaringan bersimbiosis dengan tanaman duwet (*Syzygium cumini* L. Skeels.) untuk memperoleh nutrisi dalam kondisi stress. Interaksi yang terjadi antara bakteri endofit dan tanaman duwet menyebabkan kemungkinan bakteri terinduksi untuk menghasilkan suatu metabolit sekunder yang mirip dengan inangnya, dalam hal ini adalah senyawa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase.

Mekanisme kerja inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase pada isolat tanaman duwet (*Syzygium cumini* L. Skeels) diduga sama dengan mekanisme penghambatan oleh akarbosa yang menghambat secara kompetitif enzim  $\alpha$ -glukosidase di dalam lumen usus halus. Mardiah, (2011) berpendapat bahwa penghambatan secara kompetitif terjadi karena inhibitor mampu berikatan dengan pusat aktif enzim kemudian berkompetisi dengan substrat sehingga tidak terbentuk produk.

Tabel 1. Karakteristik isolat potensial

Uji Karakterisasi	Hasil		Literatur (Cowan, 1975)
	Isolat A21	Isolat A22	
Pewarnaan Gram	+	+	+
Bentuk Morfologi	rod	rod	Rod
Produksi Katalase	+	+	+
Hidrolisis Pati	+	+	+
Endospora	+	+	+



Gambar 4. Foto pengamatan mikroskopik isolat potensial (perbesaran 1000x)

Uji karakteristik isolat bakteri endofit potensial yang ditunjukkan Tabel 1. berdasarkan Cowan (1975) menunjukkan isolat bakteri endofit A21 dan A22 memiliki sifat yang mirip dengan kelompok *Bacillus*.

## KESIMPULAN

Empat belas isolat bakteri endofit dari tanaman duwet (*syzygium cumini* L. Skeels) menunjukkan adanya aktivitas inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan aktivitas tertinggi ditunjukkan pada isolat A21 dan A22 yaitu 69,18% dan 69,22% dan dapat dikatakan paling berpotensi sebagai sumber alternatif penghasil inhibitor  $\alpha$ -glukosidase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anam, K., R.M. Widharna, D. Kusri. 2009.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Activity of Terminalia Species. *Internat. J. of Pharm.* 5: 277-280.

- Arifin, H., Nelvi A., Dian H., Roslinda R. 2006. Standarisasi ekstrak etanol daun *Eugenia cumini* Merr. *J. Sains Tek. Far.* 11: 88-93.
- Chen, H., X. Yan, W. Lin, L. Zheng and W. Zhang. 2004. A New Method for Screening - Glucosidase Inhibitors and Application to Marine Microorganisms. *Pharm. Biol.* 42: 416-421.
- Cowan, S.T. 1975. *Cowan and Steel's Manual of The Identification of Medical Bacteria*. Second Edition. Cambridge University Press, London.
- Dalimartha, S. 2005. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Mellitus*. Penebar Swadaya, Bogor.
- Fatin, N., R. Fitri, J.A. Priyanto & L.N. Afifi. 2014. Isolasi Dan Uji Aktivitas Inhibisi Enzim Alfa-Glukosidase Bakteri Endofit Dari Duwet (*Eugenia cuminia* Merr.) sebagai Alternatif Baru Penghasil Antidiabetes Melitus. *Laporan Akhir Program Kreativitas Mahasiswa*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Irawan, D. 2009. Isolasi Aktinomiset Endofit Tanaman Obat yang Berpotensi sebagai Antidiabetes melalui Kajian Aktivitas - Glukosidase. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mardiah, E. 2011. Mekanisme Inhibisi Enzim Polifenol Oksidase pada Sari Buah Markisa dengan Sisein dan Asam Askorbat. *J. Ris. Kim.* 4: 32-37.
- Mikkelsen, S.R. and E. Corton. 2004. *Bioanalytical Chemistry*. J. Wiley, New Jersey.
- Nofiani, R. 2008. Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut. *J. Natur. Idn.* 2: 120-125.
- Prihatiningtias, W. 2005. Senyawa Bioaktif Fungi Endofit Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) sebagai Senyawa Antimikroba. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana UGM, Yogyakarta.
- Priyanto, J.A. 2014. Uji Kemampuan Produksi Flavonoid dari Isolat Bakteri Endofit Benalu Teh (*Scurrula atropurpurea* BL. Dans). *Skripsi*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Pujiyanto, S. & R.S. Ferniah 2010. Aktivitas inhibitor alpha-glukosidase bakteri endofit PR-3 yang diisolasi dari tanaman pare (*Mimordica charantia*). *Bioma*. 12: 1-5.
- Pujiyanto, S. 2012. Kajian Inhibitor -Glukosidase Aktinomiset Endofit Asal Brotowali (*Tinospora crisa*). *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Srikandance, Y., Y. Hastari, P. Simatupang. 2007. Seleksi mikroba endofit *Curcuma zedoaria* dalam memproduksi senyawa kimia antimikroba. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5: 77-84.
- Sugiwati, S. 2005. Aktivitas Antihyperglikemik dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) sebagai Inhibitor Alfa-Glukosidase. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- \_\_\_\_\_, S., S. Setiasih & E. Afifah. 2009. Anthihyperglycemic Activity of The Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (scheff.) boerl.] Leaf Extracts as An - Glucosidase Inhibitor. *Makara Kesehatan*. 13:74-78.
- Tan, R.X., and W. X. Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459.
- Xiancui, L., N. Rongli, F. Xiao, H. Lijun, Z. Lixin, 2005. Macroalgae as A Source of - Glukosidase Inhibitors. *Chin. J. of Ocean. Limn.* 23: 354-356.

