

## Aktifitas Inhibitor Alpha-Glukosidase Bakteri Endofit PR-3 yang Diisolasi dari Tanaman Pare (*Momordica charantia*)

Sri Pujiyanto dan Rejeki Siti Ferniah

Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Undip

### Abstract

Some traditional medicinal plants are known to have efficacy as a medicine for diabetes. Active compounds produced by a plant can be derived from endophytic microbes that live in these plants. One way diabetes drugs work is to prevent digestion of complex carbohydrates into glucose so that glucose intake is reduced. Alpha-glucosidase inhibitor is a compound that can prevent the digestion of carbohydrates, especially starch into glucose. This study aimed to test the inhibitory activity of alpha gluosidase PR-3 isolate, an endophytic bacteria from *Momordica charantia*. The results showed that the crude extract (supernatant) from PR-3 has the capability of the enzyme alpha glucosidase inhibition that is equal to 61.2% compared with positive control compound acarbose 1 mg / ml. The results also showed that the use of maltose as carbon source produce the highest an alpha glucosidase inhibitor (54,97%), followed by the starch (47.77%), glucose (31.97%), fructose (44.14%) and sucrose (27.7%).

**Kata kunci:** alpha glucosidase inhibitor, endophytes, diabetes, *Momordica charantia*

### PENDAHULUAN

Mikroba endofit yang hidup dalam tanaman dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sama dengan yang dihasilkan inangnya akibat adanya pertukaran genetik dan hubungan evolusi yang panjang (Tan and Zou, 2001; Radji, 2005). Eksplorasi mikroba endofit diharapkan dapat menghasilkan metabolit sekunder penting yang memiliki khasiat sama dengan metabolit yang dihasilkan tanaman inangnya. Beberapa tanaman obat khas Indonesia seperti brotowali, sambiloto, mahkota dewa, pare, dll telah diketahui secara empiris memiliki khasiat sebagai obat diabetes. Tanaman obat diabetes merupakan sumber mikroba potensial penghasil inhibitor alpha glukosidase. Dengan memperoleh isolat potensial dari tanaman obat tersebut, akan dapat memproduksi senyawa inhibitor alpha glukosidase untuk obat diabetes secara mikrobiologis, dengan jumlah yang lebih banyak, dan kualitas yang lebih baik. *Diabetes melitus* (DM) merupakan masalah utama kesehatan dunia, termasuk Indonesia. Menurut perkiraan, penderita diabetes di seluruh dunia pada tahun 2025 akan mencapai 300 juta orang. Jumlah penderita DM di Indonesia menempati peringkat ke 4 di dunia. Lebih dari 95% penderita diabetes merupakan penderita

diabetes tipe 2 atau sering disebut *non-insulin dependent diabetes* (Bailey and Day, 2003). DM adalah penyebab kematian tertinggi di antara penyakit menahun lainnya. Penyakit diabetes mellitus dapat menyebabkan komplikasi, seperti: penyakit kardiovaskular, gagal ginjal, kebutaan, impotensi dan gangren. DM tidak dapat disembuhkan, tetapi dapat dikontrol.

Pengobatan DM pada prinsipnya adalah menjaga agar kadar glukosa darah dapat dipertahankan pada kondisi normal (80-120 mg/dl). Berbagai pilihan obat antidiabetes baik modern maupun tradisional telah dikenal di masyarakat. Di Indonesia, pengobatan DM secara tradisional adalah dengan memanfaatkan berbagai jenis tanaman obat yang memiliki kandungan bahan aktif yang dapat menurunkan kadar gula darah. Berbagai tanaman obat tersebut misalnya: Brotowali, Sambiloto, Mengkudu, Delima, Mahkota Dewa, dan Pare (Subroto, 2006, Klein., *et al.*, 2007, Bnouham, *et al.*, 2007, Subramanian *et al.*, 2005, Yulinah *et al.*, 2001). Salah satu cara kerja obat antidiabetes adalah menghambat pencernaan karbohidrat kompleks (amilum) menjadi glukosa. sehingga asupan glukosa dari usus ke dalam darah dapat dikurangi. Senyawa aktif yang memiliki aktivitas seperti ini misalnya

inhibitor alpha glukosidase. Senyawa inhibitor alpha glukosidase dapat dihasilkan oleh mikroba. Sebagai contoh adalah acarbose, suatu inhibitor alpha glukosidase yang dihasilkan oleh *Actinoplanes* sp., suatu mikroba yang diisolasi dari daerah di Kenya. (McGown, 2006). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas inhibitor alpha glukosidase dari bakteri PR-3 yang diisolasi dari tanaman pare.

## BAHAN DAN METODE

### Sampel tanaman dan isolasi bakteri endofit

Sampel tanaman obat sebagai sumber isolat berupa akar, batang dan daun Pare (*Momordica charantia*), diperoleh dari kebun koleksi tanaman obat PT Jamu Nyonya Meneer Ungaran. Bagian tanaman yang akan diisolasi dicuci bersih kemudian disterilisasi permukaan dengan cara merendam dalam larutan hipoklorit alkohol 70% selama 1 menit, natrium hipoklorit 1% 5 menit, alkohol 70% 1 menit dan terakhir dibilas dengan akuades steril. (Coombs and Franco, 2003). Potongan tanaman selanjutnya digerus secara aseptis dengan ditambahkan garam fisiologis 4 ml. Seratus mikroliter sampel diambil dengan mikropipet dan disebar pada media YMA (yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l, dextrosa 4 g/l, agar 20 g/l, akuades 1000 ml). Potongan akar, batang dan daun secara langsung juga diinokulasikan pada ketiga media tersebut. Inkubasi dilakukan selama satu minggu pada suhu ruang. Koloni bakteri yang tumbuh dari jaringan tanaman diisolasi dan dimurnikan lebih lanjut. Koleksi isolat disimpan di dalam lemari pendingin sebelum diuji lebih lanjut.

### Kultur pertumbuhan isolat

Untuk memproduksi inhibitor alpha glukosidase, isolat bakteri PR-3 ditumbuhkan pada medium cair menurut Chen *et. al.* (2004) 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 selanjutnya dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit dan supernatan yang diperoleh diuji daya hambatnya terhadap aktivitas enzim alpha glukosidase.

### Uji inhibitor alpha glukosidase

Penghambatan aktivitas alpha glukosidase diuji menurut Xiancui *et al* (2005) yang dimodifikasi Anam *et .al.* (2009). Uji penghambatan enzim dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna, yang diukur absorbansinya selama periode waktu tertentu. Enzim alpha-glukosidase (Waco) dilarutkan dalam 0,1 M buffer fosfat pH 7 dengan konsentrasi 0,75 unit/ml. Sebagai substrat digunakan *p-Nitrophenyl-alpha-D-gluco pyranoside* 20 mM yang dilarutkan dalam 0,1 M buffer fosfat pH 7. Campuran reaksi terdiri dari 250 µl substrat, 490 µl 0,1 M buffer fosfat pH 7 dan 10 µl sampel. Setelah campuran reaksi dinkubasi pada 37°C selama 5 menit, sebanyak 250 µl larutan enzim ditambahkan dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 500 µl larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM. Natrium karbonat dan p-nitrofenol yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm. Sebagai pembanding digunakan larutan Acarbose 1% (Bayer). Penghambatan aktivitas enzim alpha glukosidase ditentukan dengan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = (\text{Ac} - (\text{As} - \text{Ab}) / \text{Ac} \times 100\%$$

dimana, Ac: absorbansi kontrol, Ab: absorbansi background, As: absorbansi sampel

### Pengaruh sumber karbon terhadap produksi inhibitor alpha glukosidase

Isolat PR-3 ditumbuhkan dalam 100 ml medium produksi menurut Chen *et. al.* (2004) yang berisi 0,1% *soluble starch*, 0,5% pepton dan 0,15 *yeast* ekstrak (pH 7) dalam erlenmeyer 250 ml. Sebagai perlakuan, komponen amilum diganti dengan sumber karbon lain berupa glukosa, fruktosa, maltosa dan sukrosa. Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam media produksi dan diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 4 hari. Pada akhir fermentasi, kultur disentrifus dan supernatan yang diperoleh diuji aktivitas anti alpha glukosidasenya.

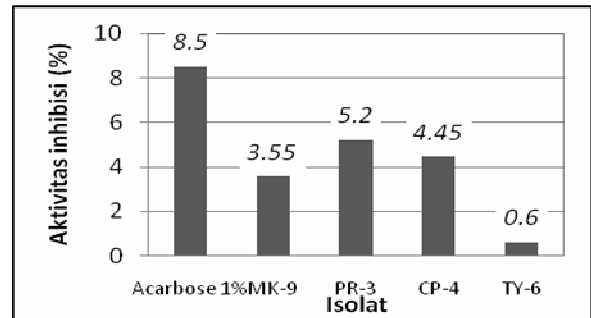
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan sampel tanaman obat sebagai sumber isolat berupa akar,

batang dan daun tanaman obat, Pare (*Momordica charantia*) yang diperoleh dari kebun koleksi tanaman obat PT Jamu Nyonya Meneer Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang akan diisolasi disterilisasi permukaan dengan cara merendam dalam larutan alkohol 70% selama 1 menit, natrium hipoklorit 1% 5 menit, alkohol 70% 1 menit dan terakhir dibilas dengan akuades steril (Coombs and Franco, 2003). Hal ini bertujuan untuk mengeliminasi mikroba kontaminan yang terdapat pada sampel tanaman. Setelah diinkubasi 3-5 hari akan dijumpai adanya koloni mikroba yang tumbuh dari sampel yang di tanam pada media agar . Isolat yang diperoleh dimurnikan lebih lanjut pada medium yang sama hingga diperoleh kultur murni.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampel supernatan isolat PR-3 mampu membentuk bercak biru ungu setelah penggenangan dengan larutan Iodin. Warna biru ini menunjukkan bahwa pada daerah tersebut terdapat amilum. Hal ini menandakan bahwa pada daerah tersebut tidak terdapat degradasi amilum oleh enzim yang ditambahkan.

Penghambatan aktivitas alpha glukosidase diuji menurut Xiancui *et al* (2005) yang dimodifikasi Anam *et al.* (2009). Uji penghambatan enzim dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna, yang diukur absorbansinya selama periode waktu tertentu. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak kasar (supernatan) dari isolat PR-3 dari tanaman pare memiliki kemampuan penghambatan terhadap enzim alpha glukosidase tertinggi dibanding dengan isolat lainnya yaitu sebesar 5,2%. disusul isolate CP-4, MK-9 dan TY-6. Sebagai pembanding digunakan senyawa inhibitor komersial Acarbose 1 mg/ml. Acarbose merupakan inhibitor alpha glukosidase yang telah dikomersialkan dengan nama dagang Glucobay.

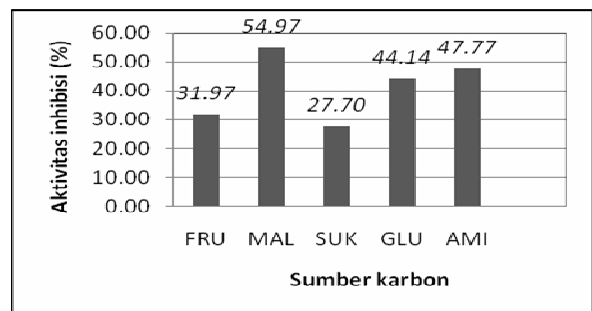


Gambar 1. Aktivitas penghambatan enzim alpha glukosidase oleh beberapa isolat endofit.

Dibandingkan Acarbose yang memiliki hambatan 8,5%, (Gambar 1) daya hambat supernatan PR-3 adalah tergolong tinggi mengingat yang diujikan adalah hanya supernatan saja, bukan senyawa murni. Apabila yang diuji adalah senyawa murni, maka peluang daya hambat kemungkinan besar bisa melebihi Acarbose. Dengan demikian isolate PR-3 sangat berpotensi untuk dikaji lebih lanjut.

#### Pengaruh sumber karbon terhadap produksi inhibitor alpha glukosidase

Untuk mengetahui sumber karbon apakah yang paling baik digunakan untuk memproduksi senyawa inhibitor alpha glukosidase, komponen amilum diganti dengan sumber karbon lain berupa glukosa, fruktosa, maltosa dan sukrosa. Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam media produksi dan diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 4 hari.



Gambar 2. Aktivitas inhibitor alpha glucosidase pada berbagai sumber karbon (FRU: fruktosa, MAL: maltosa, SUK: sukrosa, GLU: glukosa, AMI:amilum).

Pada akhir fermentasi, kultur disentrifus dan supernatan yang diperoleh diuji aktivitas anti alpha glukosidasenya. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sumber karbon maltosa menghasilkan produksi senyawa inhibitor alpha glukosidase tertinggi yaitu 54,97% diikuti oleh amilum 47,77%, glukosa 44,14% fruktosa 31,97% dan sukrosa 27,7% (Gambar 2).

Sumber karbon maltosa mampu memberikan produksi inhibitor alpha glukosidase tertinggi pada isolat PR-3, hal ini kemungkinan sistem sintesis senyawa inhibitor alpha glukosidase pada isolat ini mirip dengan isolat *Actinoplanes* sp SE50/110. Pada *Actinoplanes* sp SE50/110, maltosa merupakan senyawa antara dalam biosintesis Acarbose, suatu inhibitor alpha glukosidase (Zhang, 2002).

#### KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi bakteri endofit dari tanaman *Momordica charantia* (isolat PR-3) yang memiliki kemampuan tinggi untuk menghambat enzim alpha glukosidase. Ekstrak kasar isolat ini mampu memberikan penghambatan sebesar 61,2 % dibanding senyawa komersial Acarbose 1%. Sumber karbon terbaik untuk memproduksi inhibitor alpha glukosidase adalah maltosa yang memberikan penghambatan 54,97%.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi melalui Hibah Penelitian Kompetitif sesuai Prioritas Nasional yang telah mendanai penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

Anam, K., R.M. Widharna and D. Kusri. 2009. Alpha glucosidase inhibitor activity of Terminalia species. *Internat. J. of Pharmacology*. 5: 277-280.

Bailey, C.J. and C. Day. 2003. Antidiabetic drugs. *Br J Cardiol*. 10: 128-36.

Bnouham, M., A.Ziyyat, H. Mekhfi, A.Tahri, 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity – a review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int J Diabetes and Metabolism*. 14: 1-25.

Chen, H., X. Yan, W. Lin, L. Zheng and W. Zhang. 2004. A new method for screening alpha glucosidase inhibitors and application to marine microorganisms. *Pharmaceutical Biology*. 42: 416-421.

Hemker, M. A.Stratmann, K.Goeke, W. Schro“Der, J. Lenz, W. Piepersberg, and H. Pape. 2001. Identification, cloning, expression, and characterization of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* Sp. strain Se50. *Journal of Bacteriology*. 183: 4484-4492.

Kim, S.D. and H.J Nho. 2004. Isolation and Characterization of alpha glukosidase inhibitor from fungus Ganoderma lucidum. *J. of Microbiology*. 42: 223-227.

Klein., G.,Jaekyung Kim, Klaus Himmeldirk, Yanyan Cao and Xiaozhuo Chen. 2007. Antidiabetes and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*. *eCAM*. 4: 401-407.

McGown, J. 2006. *Diabetes Drug Produced by a Microbe in Out of Africa: Mysteries of Access and Benefit Sharing*. Beth Burrows (ed). The Edmonds Institute. Washington. USA.

Radji., M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2:113 – 126.

Subramanian, R. M. Z. Asmawi dan A. Sadikun. 2008. Effect of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* nees on a combination of fat-fed diet and low dose streptozotocin induced chronic insulin resistance in rats. *Diabetologia Croatica*. 37: 13-22.

Subroto, A. 2006. *Ramuan Herbal Untuk Diabetes Melitus*. Penebar Swadaya. Jakarta.

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. Macroalage as a source of alpha-glukosidase inhibitors. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 23: 354-356.

Yulinah, E., Sukrasno dan M. A. Fitri. 2001. Aktivitas antidiabetika ekstrak etanol herba

sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees  
(Acanthaceae). *JMS*. 6: 13-20.

Zhang C.S. 2002. Genomic analysis of secondary  
metabolite producing Actinomycetes: AcbM  
is a 2-epi-5-epi-valiolone 7-kininase.

Disertation. Bergische Universitat.  
Wuppertal. Germany.