

Efek Hidrolisis Ekstrak Daun Iler (*Coleus scutellarioides*) Terhadap Aktivitas Inhibisi Enzim α -glukosidase

Riky Auliawan, Bambang Cahyono

Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia FSM, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Sudharto SH, Kampus Tembalang, Semarang 50275 (Telp/Fax 024-76480824)
Corresponding author: bambang_cahyono@undip.ac.id

ABSTRAK

Penemuan antidiabet dari suatu senyawa bioaktif atau ekstrak tanaman banyak diarahkan pada mekanisme penghambatan hidrolisis ikatan glikosidic, dan umumnya tertuju pada senyawa fenolik. Tanaman iler (*Coleus scutellarioides*), yang secara tradisional telah digunakan untuk antidiabetes, dilaporkan mengandung senyawa dari golongan tersebut. Penelitian yang bertujuan membandingkan aktivitas dari ekstrak daun iler dan ekstrak yang terhidrolisis telah dilakukan dalam riset ini. Penyediaan ekstrak dilakukan melalui maserasi dalam pelarut etanol, dan hidrolisis ekstrak dilakukan dalam suasana asam (HCl 2N). Ekstrak dan hasil hidrolisis dianalisis fenolat total dan aktivitas penghambatan enzim alfa-glukosidase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolat daun iler dapat diperoleh dengan rendemen 4,50%. Adanya peningkatan kadar fenolat total rata-rata dari ekstrak setelah dihidrolisis sebesar 23,99 mg GAE/g bobot sampel kering (dari 156,38 \pm 0,25 menjadi 180,37 \pm 0,260 dapat mengindikasikan bahwa ikatan glikosida pada ekstrak asal telah terhidrolisis oleh HCl. Uji aktivitas penghambatan α -glukosidase terhadap sampel sebelum dan sesudah hidrolisis menunjukkan harga IC₅₀ sebesar 735,67 \pm 11,51 μ g/mL dan 724,33 \pm 8,60 μ g/mL. Secara statistik, nilai aktivitas kedua bahan ini tidak berbeda secara signifikan. Hasil penelitian ini dapat membuktikan bahwa ikatan glikosida dalam senyawa organik ekstrak daun iler tidak memberikan efek terhadap peningkatan aktivitas penghambatan enzim glukosidase.

Kata kunci: Coleus scutellarioides, daun iler, fenolat total, enzim α -glukosidase, hidrolisis ekstrak

ABSTRACT

The studies of antidiabetic activity of a bioactive compound or plant extract have been directed into the inhibition mechanism of glycoside bond hydrolyses, and generally focused on phenolic compounds. Iler plants (*Coleus Scuterllarioussdes*) that traditionally used as antidiabetic, has been reported containing those compounds. Aim of this study is comparing the activity of Iler leaves extract and their hydrolyzed extracts. The extracts were prepared by ethanol maceration and acid hydrolysis (HCl 2N). Both ethanol and hydrolyzed extracts were analyzed for total phenolic and alpha-glucosidase inhibitory activity. The result showed that the extract yield was 4.50%. The increasing number of total phenolic content after hydrolysis (23.99 mg GAE/g weight of dry samples) indicated that the glycoside bonds in extracts have been hydrolyzed by HCl. The alpha-glucosidase inhibitory (IC₅₀) of ethanol and hydrolyzed extracts were 735.67 \pm 11.51 μ g/mL dan 724.33 \pm 8.60 μ g/mL respectively. Statistically, the differences of inhibitory activity of both extracts was not significant. This result proved that the glycoside bond in Iler leaves extract does not enhance the inhibition activity of glucosidase enzyme.

Key-words : Coleus scutellarioides, total phenolics, α -glucosidase enzyme, extract hydrolysis

PENDAHULUAN

Penelitian terhadap obat antidiabetes herbal terus dilakukan seiring dengan penggunaan obat sintetik yang mulai dihindari oleh banyak orang karena efek akut dalam jangka panjang (Kavishankar et al., 2011). Beberapa jenis

tumbuhan yang dapat ditemukan di Indonesia, seperti dari genus Terminalia, sangat menjanjikan untuk dikembangkan sebagai bahan antidiabet karena memiliki IC₅₀ yang hampir sama dengan obat yang beredar dipasaran. *Terminalia arjuna* Warb memiliki IC₅₀ 5,41 μ g/mL, *Terminalia catappa* Warb, IC₅₀ 3,43 μ g/mL, dan *Terminalia*

kaernbachii Warb, IC_{50} 0,27 $\mu\text{g/mL}$ (Anam et al., 2009). Hal yang sama, *Bridellia ferruginea* Benth, IC_{50} 1,4 $\mu\text{g/mL}$, *Ceiba pentandra* L Gaerth, IC_{50} 51 $\mu\text{g/mL}$ (Bothon et al., 2012), *Cecropia obtusifolia* Bertol, IC_{50} 14 $\mu\text{g/mL}$, *Malmea depressa*, IC_{50} 21 $\mu\text{g/mL}$ (Andrade-Cetto et al., 2008). Untuk mengembangkan obat antidiabetes herbal lebih lanjut, akhir-akhir ini dilakukan penelitian terhadap senyawa fenolik, khususnya dari golongan flavonoid, yang dapat berperan sebagai inhibitor α -glukosidase (Li et al., 2009).

Tanaman iler (*Coleus scutellarioides* L. Benth) yang secara tradisional telah digunakan sebagai antidiabetes (Dalimartha, 2006). Tanaman ini telah dilaporkan mengandung senyawa-senyawa flavonoid (Poeloengan, 2009). Beberapa senyawa flavonoid dalam dapat ditemukan dalam bentuk bebas maupun dalam bentuk glikosida (berikatan dengan gula). Proses hidrolisis asam atau basa akan mengubah bentuk glikosida menjadi bentuk aglikon (senyawa fenolat bebas) (Sani et al., 2012). Proses hidrolisis ini diduga dapat mengurangi aktivitas inhibisi mengingat tidak ada lagi bagian yang dapat dihidrolisis oleh enzim alfa glukosidase. Pembuktian laboratoris terhadap teori ini telah dilakukan, dengan cara membandingkan hasil analisis aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase dari ekstrak daun iler dan ekstrak yang telah diperlakukan dengan reaksi hidrolisis ikatan glikosidanya.

METODOLOGI

Sampel. Sampel tumbuhan. daun iler diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO) Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Sebanyak 2 kg sampel segar dibersihkan dan dipisahkan dari tulang daunnya, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam suhu ruang selama 6 hari. Simplisia kering selanjutnya dihaluskan menggunakan blender untuk mendapatkan serbuk (kadar air serbuk = $10,07 \pm 0,26$ %).

Bahan. Semua bahan kimia berkualitas pa, kecuali bila disebutkan lain. Standart asam galat, dan Pereaksi Folin-Ciocalteu dari Merck, enzim alfa glukosidase.

Alat. Neraca analitik (Ohaus), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu model UV-1601).

Penapisan fitokimia. Sampel daun kering dilakukan penapisan fitokimia berupa pengujian

golongan alkaloid, flavonoid, steroid/titerpenoid, saponin dan tanin, untuk memeriksa kandungan senyawa metabolit sekunder secara kualitatif (Harbourne, 1987).

Proses ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam 500 gram serbuk daun iler dalam pelarut 3L etanol 96% selama 24 jam. Filtrat disaring dan sisanya direndam kembali dengan pelarut yang baru. Pekerjaan filtrasi dan perendaman ini diulang enam kali. Semua filtrat disatukan dan kemudian dipekatkan dengan cara evaporasi vakum hingga diperoleh ekstrak pekat

Proses hidrolisis. Proses hidrolisis asam dilakukan sesuai dengan metode yang dituliskan oleh Harbourne (1987). Sebanyak satu gram ekstrak dimasukkan ke dalam labu bulat kemudian ditambahkan 10ml HCl 2 M. Larutan direfluks selama 40 menit, kemudian hasil didinginkan pada suhu kamar. Campuran kemudian diekstraksi dengan etil asetat sebanyak 5x20 ml dan akan membentuk 2 fasa. Fasa atas merupakan etil asetat dan fasa bawah merupakan polar (HCl). Fasa etil asetat dikumpulkan kemudian dikeringkan dengan vakum evaporator.

Analisis fenolat total.

Analisis kuantitatif fenolat total dilakukan dengan menggunakan metode yang pernah dilakukan oleh Suzery dkk. (2013), termasuk pembuatan kurva kalibrasinya.

Pengujian sampel terhadap aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase. Pengujian aktivitas ini dilakukan menurut prosedur yang pernah dilakukan oleh Narkhede et al (2005). Sampel hasil hidrolisis dan sampel tanpa hidrolisis dibuat larutan induk 1000 ppm. Setiap sampel diencerkan menjadi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm. Setiap konsentrasi sampel dipipet sebanyak 10 μL kedalam *microplate* ditambahkan 25 μL substrat (*p*-nitrophenil- α -D-glicopyranoside), 50 μL buffer posfat pH 7.0, dan 25 μL enzim α -glukosidase. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 100 μL natrium karbonat dan dibaca absorbannya pada panjang gelombang 410 nm. Larutan standar dibuat dengan konsentersasi 1 ppm, 0,5 ppm, 0,1 ppm, 0,01 ppm dan 0,001. Persen inhibisi dapat dihitung dari persamaan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(C-S)}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

S = Absorbansi sampel

C = absorbansi blanko (glukobay)

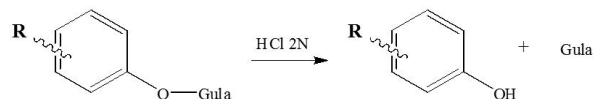
Selanjutnya dilakukan perhitungan IC_{50} yang menunjukkan kemampuan sampel dalam menghambat 50% aktivitas enzim α -glukosidase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak daun iler dan hasil screening phytochemistry

Ekstrak daun iler disediakan melalui teknik maserasi menggunakan pelarut etanol teknis selama 7x24 jam. Teknik ini dipilih mengingat sifatnya yang sangat sederhana, murah dan mudah diterapkan untuk keperluan produksi. Rendemen ekstrak, yakni sebesar 4,50 % (dengan kadar air $10,07 \pm 0,26$ %,) lebih kecil dibandingkan dengan teknik ekstraksi dari peneliti-peneliti sebelumnya. Yuningsih (2007) melaporkan rendemen ekstrak sebesar 11.19% dan 6.37% dengan pelarut aseton dan heksana.

Penapisan fitokimia terhadap ekstrak daun iler menunjukkan test positif terhadap keberadaan alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin, serta negatif untuk uji steroid/triterpenoid. Hasil penelitian ini identik dengan penelitian yang pernah dilaporkan oleh peneliti-peneliti sebelumnya (Poeloengan, 2009; Ariyanti dkk. 2007). Bila dilihat dari struktur yang lazim ditemukan dalam bahan alam, senyawa-senyawa tersebut dapat berikatan dengan gula atau dalam keadaan bebas. Hidrolisis dengan asam terhadap senyawa-senyawa ini diharapkan akan menghasilkan senyawa aglikon. Pada senyawa flavonoid dan tanin, atau dimungkinkan untuk senyawa-senyawa saponin dan alkaloid, hidrolisis ini akan menghasilkan gula dan senyawa fenolik. Keberhasilan hidrolisis ini dapat dibuktikan dengan indikator peningkatan kadar fenolik tersebut.



Hasil analisis fenolat total terhadap ekstrak daun iler dan hasil hidrolisisnya.

Kurva kalibrasi total fenolat dari asam galat telah dibuat khusus untuk penelitian ini. Harga koefisien korelasi yang mendekati angka satu

($r=0,9998$) menunjukkan metode analisis spektroskopi dalam penentuan fenolat total ini dapat diterima secara statistik. Hasil regresi dengan persamaan $y=0,0274x-0,0033$ dapat digunakan untuk analisis total fenolat sampel ekstrak daun iler dan hasil hidrolisisnya. Asam galat digunakan sebagai standar fenolat karena banyaknya publikasi yang menggunakan senyawa ini sebagai standart sehingga mempermudah memberikan gambaran mengenai kualitas bahan yang dianalisis.

Hasil penentuan kadar fenolat total ekstrak hasil hidrolisis dengan sampel tanpa hidrolisis dapat dilihat pada tabel 1. Walaupun terdapat kekurangan dalam penelitian ini, seperti tidak ditentukannya perubahan struktur fenolat hasil hidrolisis, tetapi perbedaan kadar fenolat total sebesar 23,99 24 mg GAE/sampel, dari ekstrak yang telah dihidrolisis dengan ekstrak aslinya diusulkan dapat menunjukkan adanya perubahan ikatan glikosida menjadi bentuk fenolatnya.

Tabel 1. Hasil penentuan kadar fenolat total ekstrak daun iler dan hasil hidrolisis

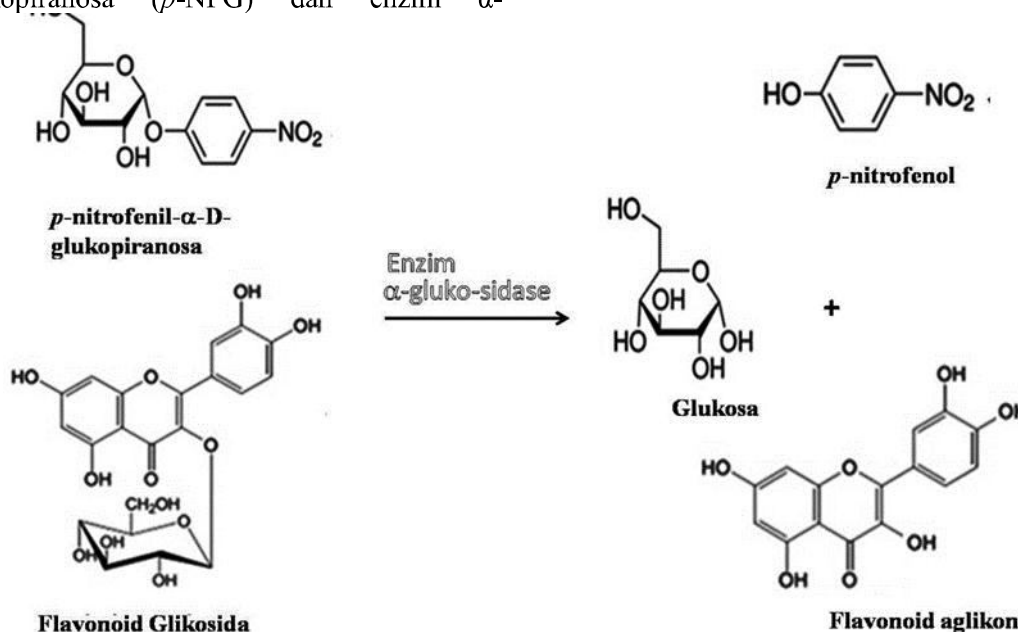
Nama Sampel	Kadar Fenolat Total (mg GAE / g bobot sampel kering)		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Rata - rata
Hidrolisis	180,18	180,55	180,37 ± 0,26
Tanpa hidrolisis	156,56	156,20	156,38 ± 0,25

Penggunaan uji t dengan *pairedt test* telah dapat membantu untuk mengetahui perbedaan nyata atau tidak terhadap kedua sampel. Pada analisis ini, digunakan hipotesis, $H_0=0$, $H_1 \neq 0$, H_0 diterima jika nilai t hitung lebih kecil dibandingkan dengan t tabel dan sebaliknya, H_0 ditolak jika nilai t hitung lebih besar dibandingkan dengan t tabel. Telah dapat ditentukan bahwa nilai t hitung (65,2490) lebih besar dibandingkan dengan t tabel (12,706), menunjukkan bahwa H_0 ditolak dan nilai dari dua perlakuan pada sampel berbeda secara signifikan. Total fenolat hasil hidrolisis lebih besar dibandingkan dengan sebelum hidrolisis.

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase

Pengujian aktivitas daya hambat terhadap enzim α -glukosidase secara *in vitro* dengan metode yang paling umum digunakan ialah metode spektrofotometri dengan substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranososa (*p*-NPG) dan enzim α -

glukosidase. Kompetisi reaksi *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranososa dan fenolik glikosida (ditunjukkan oleh flavonoid) dengan α -glukosidase ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Reaksi kompetisi *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranososa dan flavonoid glikosida dengan enzim α -glukosidase

Hasil pengujian aktivitas inhibisi α -glukosidase sampel aksrak daun iler, ekstrak yang telah dihidrolisis dan senyawa standart glukobay, ditunjukkan pada Tabel 2. Pertama-tama penting dicatat bahwa senyawa standart glukobay menunjukkan aktivitas yang jauh lebih tinggi

dibanding dengan ekstrak daun iler maupun ekstrak yang telah dihidrolisis. Kebiasaan masyarakat yang menggunakan daun iler sebagai antidiabet kelihatannya tidak bisa diterangkan melalui percobaan *in vitro* dengan enzim α -glukosidase ini.

Tabel 2. Hasil pengukuran aktivitas antidiabetes daun iler

Nama Sampel	IC ₅₀ (μ g/mL)			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
Hidrolisis	733,90	721,8089	717,2511	724,32 \pm 8,60
Tanpa hidrolisis	743,23	741,3701	722,4152	735,67 \pm 11,51
Glukobay	0,335	0,3383	0,3807	0,35 \pm 0,02

Telah dilaporkan sebelumnya, bahwa senyawa yang memiliki ikatan glikosida memiliki aktivitas inhibisi α -glukosidase yang lebih baik dibandingkan senyawa dalam bentuk aglikon (Tan et al., 2013). Proses hidrolisis menyebabkan

putusnya ikatan glikosida dan berubah menjadi gugus hidroksil sehingga diharapkan akan mengurangi aktivitas inhibisi α -glukosidase. Namun demikian, proses hidrolisis yang dilakukan dalam penelitian ini tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Nilai IC₅₀ masing-

masing sampel dilakukan uji t, hasil yang diperoleh setelah dilakukan perhitungan ialah nilai t hitung (2,7167) lebih kecil dibandingkan dengan t tabel (4,303), H_0 diterima. Secara statistik, nilai aktivitas ekstrak dan ekstrak yang telah terhidrolisis tidak berbeda secara signifikan: keberadaan glikosida dalam struktur fenolat daun iler tidak berpengaruh terhadap aktivitas anzim alfa glukosidase.

KESIMPULAN

Telah dapat ditunjukkan bahwa hidrolisis asam terhadap ekstrak daun iler dapat meningkatkan kadar fenolat total. Walaupun demikian, proses hidrolisis ini tidak memberikan efek yang signifikan terhadap aktivitas kerja inhibisi α -glukosidase. Selain itu, kecilnya aktivitas ekstrak yang ditunjukkan dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa aplikasi mekanisme penghambatan enzim α -glukosidase tidak tepat diterapkan untuk sampel ekstrak daun iler ini. Besarnya kadar fenolat total kelihatannya dapat membuka pemikiran jalur lain mengenai peran daun iler dalam mengatasi diabet, khususnya yang mengarah pada sifat antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Anam, K., Widharna, R.M., Kusri, D., 2009, α -glucosidase Inhibitor Activity of Terminalia Species, *International Journal of Pharmacology*, 4: 277-280
- [2] Andrade-Cetto, A., Becerra-Jimenez, J., Cardenas-Vazquez, R., 2008, Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes, *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 27-32.
- [3] Ariyanti, T., Fazrina, I.R., Darmono, D., 2007, Pengaruh ekstrak Daun Iler (*Coleus atropurpureus* L. Benth) terhadap Infeksi *Salmonella enteridis* pada Mencit (*Mus musculus*), Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner
- [4] Bothon, F.T.D., Debiton, E., Yedomonhan, H., Avlessi, F., Teulade, J.C., Sohounhlo, D.C.K., 2012, α -Glucosidase inhibition, antioxidant and cytotoxicity activities of semiethanolic extracts of *Bridellia ferrugineabenth.* and *Ceiba pentandra* L. Gaerth from Benin, *Research Journal of Chemical Sciences*, 2: 31-36
- [5] Dalimartha, S., 2006, Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Trubus Agriwidya.
- [6] Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia*, Cetakan 2, a.b. Padmowinata, K dan Sudiro, I., Institut Teknologi Bandung, Bandung, hal. 4-5.
- [7] Kavishankar, G.B., Lakshmidivi, N., Murthy, S.M., Prakash, H.S., Niranjana, S.R., 2011, Diabetes and medicinal plants-A review, *Int J Pharm Biomed Sci*, 2: 65-80
- [8] Li, Y.Q., Zhou, F.C., Gao, F., Bian, J.S., Shan, F., 2009, Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 11463-11468
- [9] Narkhede M.B, Ajimire P.V, Wagh A.E, Mohan M, Shivashanmugam A.T, 2011, In vitro antidiabetic activity of *Caesalpinia digyna* (R.) methanol root extract, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1: 101-106
- [10] Poeloengan, M., 2009, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Miana (*Coleus scutellaroides* [L] Benth) Terhadap Bakteri *Salmonella enteridis* dan *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Biotika*, 7: 61-68.
- [11] Sani, I.M., Iqbal, S., Chan, K.W., Ismail, M., 2012, Effect of Acid and Base Catalyzed Hydrolysis on the Yield of Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from Germinated Brown Rice (GBR), *Molecules* 17: 7584-7594
- [12] Suzery, M., Agustina, C., Cahyono, B., 2013, Potensi Ekstrak dan Fraksi Buah Kemloko (*Phyllanthus emblica* L.) Sebagai Sumber Antioksidan, *Jurnal Molekul*, 8: 167-177
- [13] Tan, C., Wang, Q., Luo, C., Chen, S., Li, Q., Li, P., 2013, Yeast α -Glucosidase Inhibitory Phenolic Compounds Isolated from *Gynura medica* Leaf, *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 2551-2558.
- [14] Yuningsih, R., 2007, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jawer Kotok (*Coleus scutellaroides* (L.) Benth.), Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor