

**AKTIVITAS INHIBITOR -GLUKOSIDASE ISOLAT KAPANG ENDOFIT DUWET  
(*Syzygium cumini* (L.) Skeels)**

**Roseliana Fitri, Agung Suprihadi, Sri Pujiyanto**

Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi FSM Universitas Diponegoro. Jl. Prof.  
Soedharto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275. Email:  
roseliana25@gmail.com

**Abstrak**

Duwet diketahui mempunyai kemampuan sebagai obat diabetes. Inti dari pengobatan diabetes adalah menjaga kadar gula darah dalam keadaan normal salah satunya dengan menggunakan inhibitor -glukosidase. Kemampuan tersebut dapat diperoleh dari kapang endofit yang terdapat dalam tanaman duwet. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan isolat terbaik yang memiliki kemampuan inhibitor -glukosidase dengan sumber karbon yang berbeda. Penelitian ini menggunakan isolat kapang endofit duwet yang diuji kemampuan inhibitor -glukosidasenya menggunakan teknik spektrofotometri berdasarkan pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna serta variasi sumber karbon berupa sukrosa, laktosa, maltosa dan pati. Hasil uji aktivitas inhibitor -glukosidase menunjukkan bahwa supernatan isolat JB 2.3 memiliki kemampuan terbaik dalam menghasilkan inhibitor -glukosidase dengan persentase sebesar 13,76% lebih tinggi dibandingkan kontrol positif *acarbose* 1%. Laktosa menjadi sumber karbon terbaik dengan rerata inhibisi sebesar (19,27%), Sukrosa (13,58%), Pati (12,70%), Maltosa (10,76%).

**Kata kunci :** *inhibitor -glukosidase, kapang endofit, duwet, diabetes melitus.*

**Abstract**

Java plum known to have the ability as a diabetes drug. The essence of diabetes treatment is to maintain blood sugar levels in normal state using -glucosidase inhibitor. Such capabilities can be obtained from endophytic mould found in java plum plant. The aim of this study is to get the best isolates that have the ability of -glucosidase inhibitors with different carbon sources. This study uses java plum endophytic mould isolates which tested the ability of -glucosidase inhibitor by using spectrophotometric techniques with breaking substrates to produce colored products and a variety of carbon sources such as sucrose, lactose, maltose and starch. The results of -glucosidase inhibitor activity indicate that crude extract of isolates JB 2.3 has the best ability to produce -glucosidase inhibitor with a percentage of 13.76% is higher than the positive control *acarbose* 1%. Lactose be the best carbon source with a mean inhibition of (19.27%), sucrose (13.58%), starch (12.70%), Maltose (10.76%).

**Keywords:** *-glucosidase inhibitor, endophytic mould, java plum, diabetes melitus.*

## PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis yang ditandai dengan kadar glukosa darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein sebagai akibat gangguan sekresi insulin oleh sel-sel  $\beta$ -langerhans kelenjar pankreas, aksi insulin terhadap jaringan target yang mengakibatkan *insensitivitas* sel terhadap insulin, ataupun keduanya (Si *et al.*, 2010). Diabetes merupakan masalah kesehatan yang cukup serius di dunia. Menurut data IDF pada tahun 2013 terdapat 382 juta jiwa penderita diabetes di seluruh dunia. Indonesia sendiri menempati posisi ke tujuh dunia dengan 8,5 juta jiwa penderita diabetes dan diperkirakan akan meningkat menjadi 14,1 juta jiwa pada 2035. Diabetes dapat menimbulkan resiko komplikasi hingga kematian, sehingga mendorong para peneliti untuk menemukan obat anti diabetes. Salah satunya adalah dengan menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berfungsi memecah disakarida atau polisakarida menjadi glukosa yang diserap usus halus. Pengendalian ini dapat dilakukan dengan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase karena pada prinsipnya pengobatan diabetes adalah menjaga kadar glukosa darah dalam tingkat normal. Selain obat inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang telah ada dipasaran alternatif lain adalah dengan menggunakan tanaman yang diketahui memiliki kemampuan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase seperti pare, duwet, brotowali, sambiloto, cemara sumatera, dan randu. Namun penggunaan tanaman dirasa kurang efisien karena memerlukan lahan yang luas, waktu panen yang lama dan kaitan dengan masalah konservasi.

Mikrob endofit hadir sebagai solusi kekurangan tersebut karena penggunaan mikrob tidak membutuhkan lahan yang luas dan waktu panen yang lama. Mikrob endofit merupakan mikrob yang hidup dan berkembang biak dalam jaringan tumbuhan namun tidak mengakibatkan kerugian bagi tumbuhan tersebut (Kharwar *et al.*, 2008; Prabavathy & Nachiyar, 2013). Menurut Tan & Zou (2001) mikrob endofit yang hidup dalam tanaman dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sama dengan yang dihasilkan inangnya akibat adanya pertukaran genetik dan hubungan evolusi yang panjang. Penelitian-penelitian terdahulu menunjukkan bahwa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dapat dihasilkan dari kapang endofit yang diisolasi dari berbagai tanaman. Penelitian yang dilakukan oleh Dompeipen *et al.*, (2011) melaporkan bahwa terdapat tujuh isolat kapang endofit yang berpotensi sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase. Kapang endofit tersebut diperoleh dari tanaman sambiloto, sirih merah dan kumis kucing. Demikian pula yang dilakukan oleh Mun'im *et al.*, (2013), bahwa ekstrak etil asetat dari isolat kapang endofit daun johar potensial sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase. Oleh karena itu, penggunaan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dari kapang endofit merupakan suatu hal yang potensial untuk dikembangkan sebagai alternatif obat anti diabetes.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi dan Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro selama 10 bulan yaitu dari bulan Mei 2015 hingga Februari 2016.

### Kultur Kapang Endofit

Empat belas isolat kapang endofit ditumbuhkan pada medium YS cair menurut Chen *et al.*, (2004) ; Pujiyanto & Ferniah (2010) dengan komposisi : 0,1% *soluble starch*, 0,5% pepton

dan 0,15% *yeast* ekstrak dengan pH 7. Kultur diinkubasi selama lima 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 -glukosidase.

#### Uji Inhibitor -glukosidase

Uji penghambatan enzim -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 -glukosidase (Sigma-aldrich) dilarutkan dalam 0,1 M buffer fosfat pH 7 dengan konsentrasi 0,30 unit/mL. Sebagai substrat digunakan *p-Nitrophenyl-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. Sebagai pembanding digunakan larutan *Acarbose* 1% (Bayer). Persentase inhibisi diukur dengan rumus :

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

Dimana c adalah absorbansi kontrol  $c_1-c_0$  sedangkan s adalah absorbansi sampel  $s_1-s_0$

#### Optimasi Produksi Inhibitor -glukosidase

Optimasi produksi inhibitor -glukosidase dilakukan dengan menumbuhkan isolat kapang JB 2.3 dalam media dasarnya (YS) menurut Chen *et al.*, (2004); Pujiyanto & Ferniah (2010) yang terdiri dari 0,1% *soluble starch*, 0,5% pepton dan 0,15% *yeast* ekstrak (pH 7) dalam erlenmeyer 50 mL. Kultur kemudian diinkubasi dengan agitasi 120 rpm untuk mengetahui aktivitas puncak inhibitorynya.

#### Pengaruh Sumber Karbon terhadap Produksi Inhibitor -glukosidase

Isolat kapang terpilih penghasil inhibitor -glukosidase ditumbuhkan dalam 50 mL medium produksi menurut Chen *et al.*, (2004); Pujiyanto & Ferniah (2010) yang berisi 0,1% *soluble starch*, 0,5% pepton dan 0,15% *yeast* ekstrak (pH 7) dalam erlenmeyer 100 mL. Sebagai bentuk perlakuan sumber karbon diganti dengan bahan lain berupa sukrosa, maltosa, laktosa. Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam media produksi dan diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 9 hari. Pada akhir fermentasi, kultur disentrifuse dan supernatan yang diperoleh diuji aktivitas inhibitor -glukosidasenya.

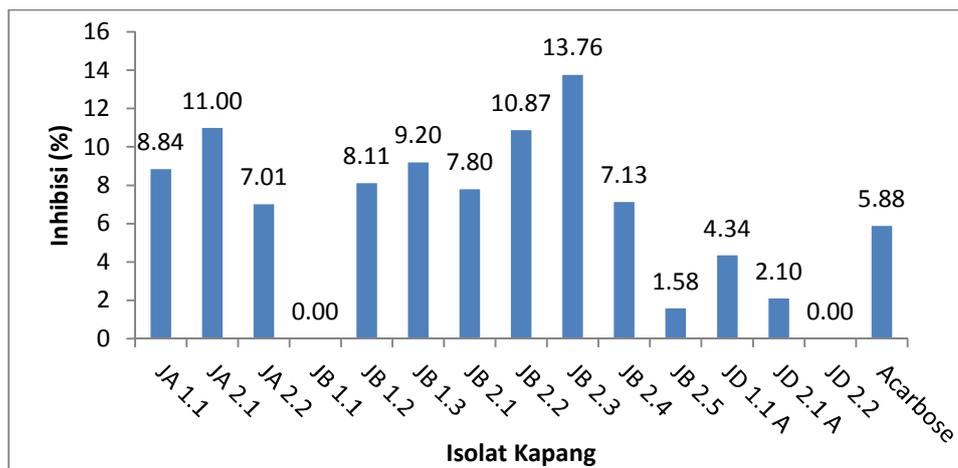
#### Analisis Data

Penelitian ini menggunakan cara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0. Isolat kapang yang digunakan hanya isolat terpilih dengan persentase inhibisi tertinggi yang berasal dari batang yaitu isolat JB 2.3. Adapun sumber karbon yang digunakan yaitu sukrosa (S),

maltosa (M), pati (P) dan laktosa (L) dengan lima kali ulangan. Data yang didapatkan kemudian dianalisis dengan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% . Apabila berbeda nyata dilakukan uji lanjut menggunakan uji Tukey (BNJ).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan pengembangan dari program kreativitas mahasiswa bidang penelitian, dari hasil penelitian tersebut didapatkan 14 isolat kapang endofit yang berasal dari akar, batang dan daun tanaman duwet. Semua isolat tersebut kemudian diuji kemampuan inhibitor  $\alpha$ -glukosidasenya dengan metode spektrofotometri menggunakan substrat *p* Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside yang dipecah menghasilkan zat berwarna kuning yang diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 410 nm. Zat berwarna kuning tersebut merupakan hasil hidrolisis  $\alpha$ -glukosidase terhadap substrat *p* Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside yaitu p-nitrofenol (zat berwarna kuning) dan alfa-D-glukopiranosida. Sebagai pembanding digunakan acarbose 1%. Berdasarkan reaksi inhibisi  $\alpha$ -glukosidase menggunakan metode spektrofotometri didapatkan hasil bahwa ekstrak kasar (supernatan) kapang endofit dari batang yaitu isolat JB 2.3 menghasilkan aktivitas inhibisi tertinggi yakni sebesar 13,76 %. Hasil reaksi inhibisi  $\alpha$ -glukosidase kapang endofit duwet dapat dilihat pada Gambar 1.

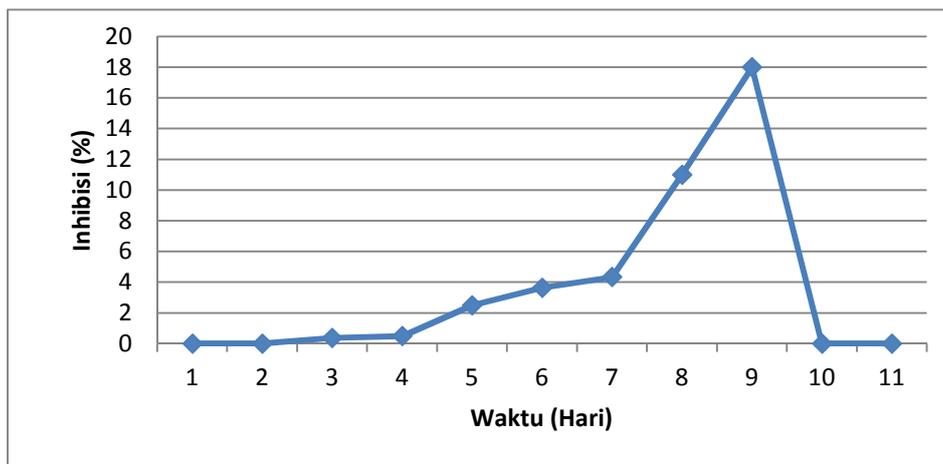


Gambar 1. Aktivitas inhibisi  $\alpha$ -glukosidase kapang endofit tanaman duwet

Berdasarkan penelitian ini didapatkan hasil persentase inhibisi acarbose yang lebih rendah dibanding nilai inhibisi isolat JB 2.3 yaitu sebesar 5,88% hal tersebut seperti terjadi pada penelitian yang telah lebih dahulu dilakukan dimana membuktikan bahwa acarbose lebih efektif menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari mamalia dibandingkan dengan enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari mikrob (Kim *et al.*, 2008) seperti yang terdapat pada penelitian ini. Hal tersebut menunjukkan bahwa supernatan kapang endofit JB 2.3 cukup potensial dimanfaatkan sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase karena persentase inhibisinya yang lebih tinggi dari acarbose.

### Optimasi Inhibitor Aktivitas Inhibisi $\alpha$ -glukosidase

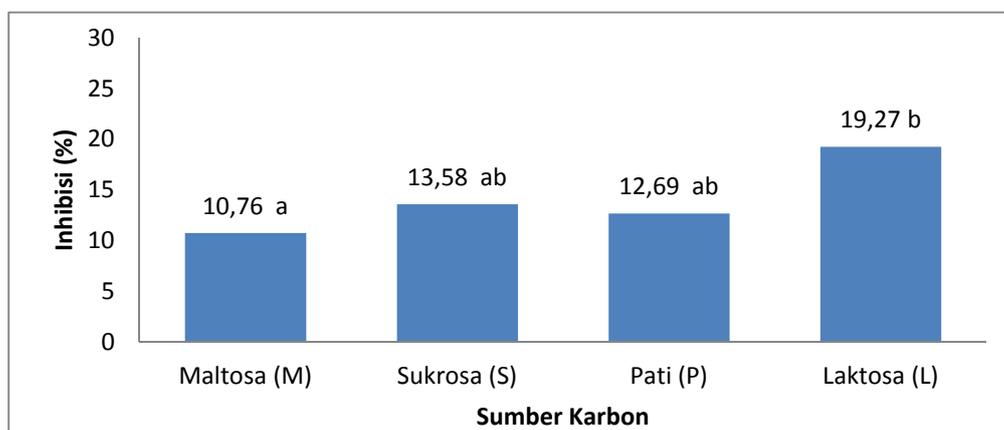
Optimasi dilakukan untuk mengetahui waktu optimal produksi inhibitor  $\alpha$ -glukosidase menggunakan isolat terpilih yaitu isolat JB 2.3. Hasil optimasi menunjukkan bahwa produksi inhibitor paling optimal pada hari ke 9, dengan persentase inhibisi sebesar 18%, hasil lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 2. Hal ini dapat disimpulkan bahwa pada hari ke 9 isolat kapang JB 2.3 kemungkinan telah menghasilkan metabolit sekunder dan memasuki fase stasioner. Robinson *et al.*, (2001) menyatakan bahwa metabolit sekunder merupakan senyawa yang memiliki struktur kimia yang bervariasi dan biasanya hanya diproduksi pada fase stasioner pertumbuhan.



Gambar 2. Optimasi inhibisi isolat JB 2.3

### Perbedaan Sumber Karbon terhadap Produksi Inhibitor $\alpha$ -glukosidase.

Penelitian ini menggunakan sumber karbon yang berbeda jenisnya untuk melihat kemampuannya dalam menghasilkan inhibitor dengan persentase tertinggi. Adapun sumber karbon yang digunakan adalah maltosa, sukrosa, pati dan laktosa. Isolat yang digunakan hanya isolat terpilih yaitu JB 2.3. Berdasarkan hasil uji inhibitor menunjukkan bahwa laktosa memiliki kemampuan terbaik dalam menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan rerata persentase inhibisi sebesar 19,27%, diikuti sukrosa dengan rerata persentase sebesar 13,58%. Lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3.



### Gambar 3. Persentase inhibisi dengan perbedaan sumber karbon

Hal ini kemungkinan berkaitan dengan sintesis inhibitor  $\alpha$ -glukosidase karena perbedaan sumber karbon berpengaruh terhadap produksi enzim-enzim yang berkaitan dengan sintesis inhibitor  $\alpha$ -glukosidase. Hal ini seperti yang terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh (Zhu *et al.*, 2008) bahwa perbedaan sumber karbon berpengaruh terhadap produksi inhibitor  $\alpha$ -glukosidase oleh *B. subtilis* B2 karena perbedaan sumber karbon berpengaruh terhadap produksi enzim-enzim yang berkaitan dengan sintesis inhibitor  $\alpha$ -glukosidase. Hipotesis lain yang mungkin terjadi berkaitan dengan metabolisme kapang endofit yang menghasilkan senyawa antara sebagai pemicu sintesis inhibitor  $\alpha$ -glukosidase, seperti yang terdapat pada penelitian (Zhang, 2002) yang melaporkan bahwa *acarbose* memerlukan maltosa sebagai sumber karbon yang nantinya diperlukan untuk sintesis *acarbose* sebagai bagian struktur dari *acarbose* karena ditemukan kemiripan struktur kimia antara *acarbose* dengan maltosa, kemungkinan mekanisme yang sama juga terjadi pada laktosa, laktosa dibutuhkan sebagai sumber karbon utama yang kemudian berada di dalam struktur kimia inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang dihasilkan oleh kapang JB 2.3.

Hasil inhibisi dari setiap sumber karbon tersebut kemudian dianalisis secara statistika dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan nyata diantara perlakuan yang diberikan karena nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  dengan taraf kepercayaan 95%. Sehingga dilakukan uji lanjut untuk mengetahui apakah terdapat pasangan perlakuan yang berbeda nyata, hasilnya terdapat perbedaan nyata saat dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Tukey (BNJ) pada perlakuan maltosa dan laktosa ditandai dengan pemberian notasi huruf yang berbeda pada Gambar 3, sehingga dapat dikatakan bahwa sumber-sumber karbon tersebut berpengaruh nyata terhadap produksi inhibitor  $\alpha$ -glukosidase supernatan JB 2.3.

### SIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini didapatkan 14 isolat kapang endofit duwet yang mempunyai kemampuan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang bervariasi. Isolat JB 2.3 menunjukkan kemampuan inhibitor terbaik dengan persentase inhibisi sebesar 13,76%. Isolat JB 2.3 sebagai isolat terpilih digunakan untuk uji lanjut dengan perbedaan sumber karbon. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa aktivitas inhibitor  $\alpha$ -glukosidase tertinggi terdapat pada medium yang menggunakan laktosa sebagai sumber karbon dengan rerata persentase sebesar 19,27%.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kementerian riset dan pendidikan tinggi atas bantuan pendanaan penelitian melalui program kreativitas mahasiswa.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anam, K., R.M. Widharna, D. Kusri. 2009. Alpha glucosidase inhibitor activity of Terminalia species. *Internat. J. Of Pharmacology*. 5: 277-280.
- 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.
- Dompeipen, E.J., Srikanth, Y., Suharso, W.P., Cahyana, H., Simanjuntak, P. 2011. Potential Endophytic Microbes for Antidiabetic Bioactive Compounds Products. *Asian J. Biochem*. 6(6): 465-471.
- Kharwar, R.N., Verma, V.C., Strobel, G., and Ezra, D. 2008. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G Don. *Current Science*. 95(2): 228-232.
- Kim, K.Y., K.A. Nam., H.Kurihara., S.M. Kim. 2008. Potent  $\alpha$ -glucosidase Inhibitors Purified from Red Alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*. 69: 2820-2825.
- Mun'im, A., Ramadhan, M.G., Soemiati, A. 2013. Screening of Endophytic Fungi from *Cassia siamea* Lamk Leaves as  $\alpha$ -glucosidase Inhibitor. *Int Res.J. Pharm* 2013. 4(5): 128-131.
- Prabavathy, D., Nachiyar, V.C. 2013. Antimicrobial and Antidiabetic Activity of An Endophytic Fungi Isolated from *Adathoda beddomei*. *Int J Pharm Pharm Sci*. (3): 780-783.
- Pujiyanto, S., & R.S. Ferniah. 2010. Aktivitas inhibitor alpha-glukosidase bakteri endofit PR-3 yang diisolasi dari tanaman pare (*Mimordica charantia*). *Bioma*. 12 (1) : 1-5.
- Robinson, T., Singh, D., Nigan, P. 2001. Solid-State Fermentation: A Promising Microbial Technology for Secondary Metabolites Production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55(3) : 284-289.
- Si, M.M., Lou, J.S., Zhou, C.X., Shen, J.N., Wu, H.H., Yang, B., He, Q.J., Wu, H.S. 2010. Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*. 128: 154-159.
- 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 alpha-glucosidase inhibitors. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 23: 354-356.

Zhang, C.S. 2002. Genomic analysis of secondary metabolite producing Actinomycetes: AcbM is a 2-epi-5-epi-valiolone 7-kitinase. *Disertation*. Bergische Universitat, Wuppertal.

Zhu, Y. P., Yin, L. J., Cheng, Y. Q., Yamaki, K., Mori, Y., Su, Y. C., Li, L. T., 2008. Effects of sources of carbon and nitrogen on production of  $\alpha$ -glucosidaseinhibitor by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2. *Food Chem.*109 (4) : 737-742.