

IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF FRAKSI ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.) SEBAGAI INHIBITOR α -AMYLASE

Eko mugiyanto^{1,2}, Partomuan simanjuntak³, Siswa setyahadi⁴.

Email: giyan77@yahoo.co.id

¹Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila

²Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Pekajangan Pekalongan

³Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong Bogor

⁴BPPT Puspitek Serpong

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic interference characterized by both postprandial and fasting glycemic increase with disturbances in carbohydrate, fat and protein metabolism. There has been much interest in the development of alternative medicine for type 2 diabetes. Annona muricata or sirsak has been use to cure cancer and according to American Association of Clinical Endocrinologist there was a significant increasing for patient cancer with obesity and diabetes. The goal of the present study was to provide in vitro evindence and chemical structure for potential inhibition of α -amylase. This was performed using α -amylase from Aspergillus oryzae and the result was Ethanol fraction from Annona muricata leafes gave the highest inibitory activity against α -amylase (IC_{50} 73,54 ppm) furthermore inhibition of isolates compounds Fr.EtOH.4.2.3 gave IC_{50} 0,12 ppm of α -amylase. Analysis data and identification of active compounds is done by LC-MS and FT-IR, identification active compound of α -amylase inhibitors is mixture of Muricatin C, cis-Reticulatacin-10-one and 3-Methylquercetin 7-[galactosyl-(1->4)-glucoside].

Keywords: Diabetes, α amylase, annona muricata, sirsak

1. Pendahuluan

Diabetes diartikan sebagai gangguan metabolisme kronis yang ditandai dengan kadar glukosa darah yang tinggi, akibat dari tidak memadai produksi insulin endogen oleh sel beta pankreas (diabetes tipe-I); atau gangguan sekresi dan atau aktivitas insulin (diabetes tipe-II). diabetes tipe-I merupakan penyakit autoimun yang ditandai dengan kerusakan T-sel pada sel beta pankreas sedang pada diabetes tipe-II, ada peningkatan secara bertahap dari resistensi insulin dan disfungsi sel beta yang sangat terkait dengan obesitas dan gaya hidup [1]. Karena insiden yang lebih tinggi dari faktor risiko, prevalensi diabetes meningkat di seluruh dunia, tetapi lebih jelas di negara-negara berkembang [2].

Gangguan metabolisme glukosa berkaitan erat dengan tidak memadainya sekresi insulin dimana tingkat glukosa dalam plasma adalah abnormal, akibat dari gangguan metabolisme glukosa⁷. Peningkatan abnormal glukosa darah memainkan peran patogenik dalam gangguan metabolisme [3].

Gangguan Toleransi Glukosa (GTG) atau postprandial, adalah tahap regulasi glukosa yang terdapat dalam individu dimana toleransi glukosa berada di atas kisaran normal umumnya tetapi lebih rendah dari tingkat yang dianggap sebagai jenis diabetes mellitus tipe-2. GTG merupakan tahap sementara antara toleransi glukosa normal dan tipe-II DM. Postprandial hiperglikemia memainkan peran sentral dalam pengembangan dan perkembangan komplikasi diabetes penyakit terutama jantung. Tahap postprandial ditandai dengan glikemia cepat dan meningkat [4].

Faktor penting yang muncul dalam hiperglikemia postprandial adalah penyerapan cepat glukosa dalam usus. Penyerapan glukosa dapat ditunda dengan mengurangi laju pencernaan pati. Pankreas α -amilase adalah enzim kunci dalam sistem pencernaan yang mengkatalisis langkah awal dalam hidrolisis pati oligosakarida yang lebih kecil yang terdiri dari maltosa, maltotriosa dan sejumlah α - {1-6} dan α - (I - 4) oligoglucans, kemudian dilanjutkan dengan kerja α -glucosidase yang akan

mendegradasi menjadi glukosa yang di serap memasuki aliran darah. Degradasi pati secara cepat ini mengarah ke peningkatan PPHG (hiperglikemia post-prandial). Telah terbukti bahwa aktivitas HPA (Human Pancreatic α -Amylase) di usus kecil berkorelasi dengan peningkatan kadar glukosa post-prandial [5].

Obat-obatan dalam pengelolaan diabetes dapat dikategorikan ke dalam tiga kelompok. Obat dalam kelompok pertama bekerja meningkatkan ketersediaan insulin endogen, yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonilurea seperti glibenclamide, glinides, analog insulin, agonis glucagon-like peptide 1 (GLP-1) dan inhibitor dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). Dua anggota yang pertama dari kelompok ini bekerja pada reseptor sulfonilurea di pankreas untuk meningkatkan sekresi insulin. Agonis GLP-1 dan inhibitor DPP-IV pada sisi lain bekerja pada sel-sel ileum dari usus kecil. Kelompok kedua bekerja dengan meningkatkan sensitivitas insulin, seperti thiazolidinediones, yang merupakan agonis dari Peroxisom proliferatoractivated gamma receptor (PPAR) dan metformin biguanida. Kelompok ketiga terdiri dari inhibitor α -glukosidase seperti acarbose, yang bekerja dengan mengurangi pencernaan dan bioavailabilitas polisakarida [6]. Semua terapi yang ada memiliki keterbatasan efikasi, tolerabilitas terbatas dan/atau mekanisme tertentu berdasarkan efek samping [7].

Telah banyak tersedia farmakoterapi yang ada, tetapi masih sulit untuk mencapai kontrol glikemik yang memadai antara banyak pasien diabetes karena penurunan progresif fungsi sel- β [8]. Disamping itu obat-obatan yang telah ada memiliki aktivitas penghambatan yang kuat terhadap α -amylase namun memiliki kelemahan efek samping yang tidak diinginkan seperti perut kembung, meteorism, dan diare. Beberapa inhibitor yang tersedia di pasaran dan banyak digunakan adalah acarbose, aglitol dan oglitose yang diketahui menghambat secara luas glukosidase seperti α -amylase.

Oleh karena sifat non spesifik target tersebut sehingga diketahui memiliki efek samping seperti gangguan pencernaan, kembung, diare dan flatulen.

Soursop dikenal sebagai Sirsak, guanabana, graviola, zuurzak, coraçãoda-India, guyabano atau corossol merupakan salah satu buah eksotis. Sirsak, yang dikenal sebagai buah asli dari Hindia Barat, Amerika Tengah, dan Brasil sangat banyak dijumpai dan merupakan buah yang umum di Asia tropis saat ini. Sirsak atau nama ilmiah, *Annona muricata* L termasuk dalam famili Annonaceae terdiri dari 2300 sampai 2500 spesies termasuk didalamnya lebih dari 130 genus, sehingga dapat dikatakan ini adalah keluarga terbesar dari Magnoliales. Hanya empat genera (*Annona*, *Rollinia*, *Uvaria*, dan *Asimina*) yang menghasilkan buah yang dapat dimakan seperti *Annona* [9].

A. muricata L merupakan pohon buah populer yang dibudidayakan di seluruh daerah tropis dunia, dimana biji dan daun dari spesies ini ditemukan mengandung lebih dari 50 mono-THF acetogenins. Beberapa intermediet kunci yang terlibat dalam biosintesis acetogenins ini telah diisolasi dari spesies ini dan diberi nama sebagai epomuricenins-A dan B, montecristin, cohibins-A dan B, muridienins-1 dan 2, muridienins-3 dan 4, muricadienin dan chatenaytrienins-1, 2 dan 3 dan juga senyawa baru yang disebut sebagai sabadelin yang mungkin menjadi prekursor biogenetis cis-panatellin [10].

Sirsak adalah tanaman obat yang telah digunakan sebagai obat alami untuk berbagai penyakit. Beberapa studi oleh para peneliti yang berbeda menunjukkan bahwa kulit kayu serta daunnya memiliki aktivitas anti-hipertensi, vasodilator, anti-spasmodik (relaksan otot polos) dan aktivitas depresi cardio (memperlambat denyut jantung) pada hewan. Sifat dan aktivitas *A. muricata* lainnya didokumentasikan oleh penggunaan tradisional termasuk penggunaan sebagai anti-kanker, anti-bakteri, anti-jamur, anti-malaria, anti-mutagenik (pelindung seluler), muntah (menginduksi muntah), anti-

convulsant, obat penenang, insektisida dan stimulan rahim. Padma et al [11] menegaskan aktivitas anti-virus dari ekstrak etanol *A. muricata* terhadap virus Herpes simpleks. Ekstrak *A. muricata* telah terbukti memiliki anti-parasit, anti-rematik, astringent, anti-leishmanial dan efek sitotoksik [12]. *A. muricata* juga telah terbukti efektif melawan resisten (MDR) sel kanker multi-obat [13]. *Annona muricata* telah digunakan secara tradisional di banyak bagian dunia di mana akses ke pelayanan kesehatan formal terbatas [14]. Ada beberapa alasan mengapa penggunaan tanaman obat harus dipelajari diantaranya adalah obat herbal mungkin memiliki efek terapi tertentu, mereka juga mungkin memiliki efek samping beracun [15].

Studi *Annona muricata* L. Sebagai inhibitor α -amylase telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya, namun terbatas pada aktivitas ekstraknya sehingga masih terbuka untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang bertanggung jawab. Oleh karena itu pada penelitian ini akan mengidentifikasi senyawa yang menghambat α -amylase.

2. Metode Penelitian

• Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan dan reagen kimia sebagai berikut, etanol 95%, n-heksana, etil asetat, diklorometan, dimetilsulfoksida (DMSO), kalium fosfat monobasa, asam klorida (HCl), FeCl₃, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendorf, pereaksi Bouchardat, serbuk Mg, lempeng KLT silika gel GF254, silika 60 mesh, acarbose, α -amylase, iodin. Semua bahan yang digunakan berasal dari GR Merck dengan kualitas p.a. Fasa gerak yang digunakan dalam kromatografi kolom (etanol, etil asetat, heksana, dan diklorometan) menggunakan pelarut teknis yang telah didestilasi.

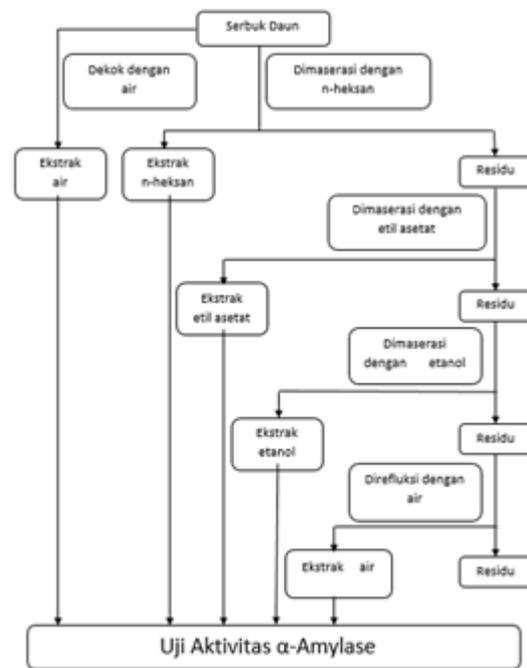
• Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas laboratorium, waterbath, timbangan analitik

(Metler Toledo), rotary evaporator (Hedolph), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), spektrofotometer Fourier-transform Infrared (FTIR, Shimadzu IR Prestige 21), dan Liquid chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS, Mariner Biospectrometry).

• Penyiapan Ekstrak

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan beberapa pelarut dan infudasi dengan air. Serbuk daun sirsak diekstraksi berturut-turut dengan n-heksana, etil asetat, etanol 96% dan air. Filtrat yang diperoleh diuapkan dan dipekatkan serta dihitung rendemennya seperti pada gambar Gambar 1 berikut:



Gambar 1. Skema ekstraksi dan uji

• Isolasi dan Penentuan Senyawa Kimia

Ekstrak Etanol difraksinasi dengan kromatografi kolom silika gel dengan perbandingan eluen CH₂Cl₂-MeOH (20 : 1) sampai (1 : 1), dihasilkan 6 fraksi. Fraksi dengan aktivitas inhibisi α -Amylase tertinggi (Fr.EtOH.4) dilakukan fraksinasi pada kromatografi kolom silika gel dengan eluen CH₂Cl₂-MeOH (10:1) menghasilkan 4 fraksi. Selanjutnya Fr.EtOH.4.2 dimurnikan

dengan KLT preparative dengan eluen CH₂Cl₂-MeOH (20:1) dihasilkan isolat yang selanjutnya diidentifikasi dengan analisis data spektrum IR dan LCMS.

• **Uji Aktivitas α-Amylase secara In Vitro**

Uji inhibisi α-Amylase secara In Vitro mengikuti prosedur seperti yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya [16]. Aktivitas inhibisi alfa-amilase dapat diukur secara in-vitro dengan cara hidrolisis pati oleh enzim α -amilase. Proses ini dihitung dengan menggunakan yodium, yang memberi warna biru dengan pati. intensitas warna biru yang berkurang menunjukkan hidrolisis pati menjadi monosakarida oleh. Jika ekstrak memiliki aktivitas penghambatan α -amilase, intensitas warna biru akan lebih. Dengan kata lain, intensitas warna biru dalam sampel uji berbanding lurus dengan aktivitas penghambatan α amylase [17].

aktivitas alfa-amilase dilakukan dengan metode pati-yodium. 500 µL sampel dengan berbagai konsentrasi dan 500 µL enzim α-amylase kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya Kedalam sampel ditambahkan 500 µL Amylum 1%, diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 10 µL iodine 1% . Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 614 nm.

• **Analisis Data Uji Aktivitas inhibisi α-Amylase**

Serapan blangko, kontrol positif dan serapan larutan uji yang telah diukur pada spektrofotometer UV-Vis dicatat kemudian dicari persen inhibisinya dengan cara memasukkan hasil serapan masing-masing konsentrasi sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = 1 - \frac{C - S}{C} \times 100 \%$$

Untuk % inhibisi α-glukosidase dengan rumus⁸⁸ :

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

Dimana :

C = Serapan (Blanko (B1) - kontrol blanko (B0))

S = Serapan (S₁ - S₀)

3. Hasil Dan Pembahasan

α-amilase merupakan salah satu enzim utama yang bertanggung jawab terhadap katabolisme pati menjadi gula yang lebih sederhana. α-Amilase menghidrolisis polisakarida kompleks guna menghasilkan oligosakarida dan disakarida. Inhibitor amilase juga dikenal sebagai pati blockers karena mencegah pati diserap oleh tubuh sehingga kadar glukosa postprandial menjadi rendah. Dengan memperlambat pencernaan dan pemecahan pati dimungkinkan memiliki efek menguntungkan pada resistensi insulin dan kontrol indeks glikemik pada penderita diabetes.

α-Amilase digolongkan dalam kelompok enzim hydrolase, hidrolase glikosida (GHs), GHs mengkatalisis pemutusan ikatan glikosidik baik dengan mekanisme retensi atau inversi pada konfigurasi anomerik.

• **Uji Aktivitas Ekstrak terhadap Inhibisi α-Amylase**

Untuk mengetahui potensi antidiabetes dari daun *Annona muricata* L maka dilakukan uji inhibisi terhadap aktivitas enzim α-amylase terhadap ekstrak heksan, etil asetat, etanol, air dan infusa daun sirsak yang hasilnya seperti pada tabel 1 berikut:

Tabel 1. Uji aktivitas inhibisi α-amylase terhadap ekstrak dan infusa

No.	Ekstrak	Nilai IC ₅₀ (ppm)
1.	Ekstrak heksana	1871.85
2.	Ekstrak Etil Asetat	552.56
3.	Ekstrak Etanol	73.54
4.	Ekstrak Air	909.79
5.	Infusa Air	5695.89

Nilai IC₅₀ merupakan satuan standar yang digunakan untuk menentukan apakah suatu ekstrak, fraksi maupun senyawa dapat dijadikan sebagai obat antidiabetes atau tidak berdasarkan aktivitasnya. Ekstrak etanol (Fr.EtOH) sebagai ekstrak yang akan dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi kolom.

• Uji Aktivitas Inhibisi α -Amylase Fr.EtOH Hasil Kromatografi Kolom I

Hasil uji inhibisi α -amylase terhadap fraksi hasil kromatografi kolom I menunjukkan Fr.EtOH.4 merupakan fraksi yang paling aktif yaitu ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ yang paling kecil sebesar 10.50 ppm. Adapun hasilnya seperti pada tabel 2 berikut:

Tabel 2. Hasil uji inhibisi α -amylase fraksi hasil kromatografi kolom I

No	Fraksi	IC ₅₀ (ppm)
1.	Fr.EtOH.1	67.39
2.	Fr.EtOH.2	39.65
3.	Fr.EtOH.3	13.762
4.	Fr.EtOH.4	10.50
5.	Fr.EtOH.5	13.55
6.	Fr.EtOH.6	19.42

• Uji Aktivitas Inhibisi α -Amylase Fr.EtOH.4 Hasil Kromatografi Kolom II

Hasil uji terhadap inhibisi α -amylase menunjukkan bahwa sub fraksi yang paling aktif adalah Fr.EtOH.4.2 dengan nilai IC₅₀ sebesar 1.81 ppm. Hasilnya seperti pada tabel 3 berikut:

Tabel 3. Hasil uji inhibisi α -amylase terhadap Fr.EtOH.4 hasil kromatografi kolom II

No.	Fraksi	IC ₅₀ (ppm)
1.	Fr.EtOH.4.1	3.72
2.	Fr.EtOH.4.2	1.81
3.	Fr.EtOH.4.3	3.49
4.	Fr.EtOH.4.4	2.41

• Isolasi Fr.EtOH.4.2 Dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Isolasi sub fraksi Fr.EtOH.4.2 dilanjutkan dengan kromatografi lapis preparatif, digunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak yang digunakan adalah diklorometan-methanol dengan perbandingan 20 : 1. Hasil KLTP diperoleh 3 spot, berdasarkan pemisahan pada KLTP. Tiga spot yang diperoleh kemudian diuji aktivitas inhibisi α -amylase.

• Uji Aktivitas Inhibisi α -Amylase Isolat

Hasil uji terhadap inhibisi α -amylase menunjukkan bahwa sub fraksi yang paling aktif adalah isolat 3 dengan nilai IC₅₀ sebesar 0.12 ppm, sedangkan akarbosa 0.048 ppm. Adapun hasilnya tersaji pada tabel 4 berikut:

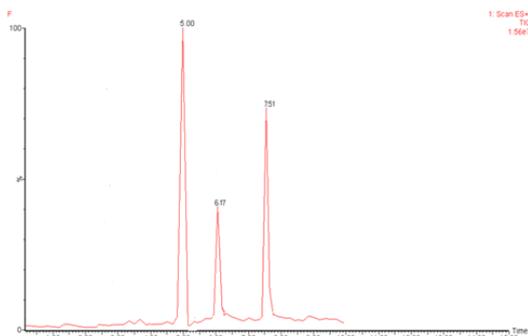
Tabel 4. Hasil uji α -amylase terhadap Isolat

No.	Fraksi	IC ₅₀ (ppm)
1.	Isolat 1	0.15
2.	Isolat 2	1.50
3.	Isolat 3	0.12
4.	Akarbosa	0.048

• Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

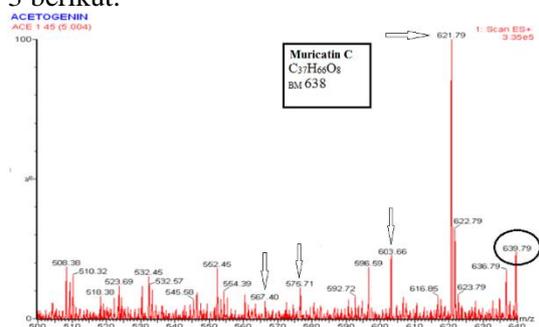
Isolat 3 berbentuk padatan serbuk berwarna kuning. Penentuan senyawa dari masing-masing komponen diidentifikasi dengan menggunakan LC-MS dengan eluen diklormethan-methanol (20:1) dengan kecepatan 1 ml/menit sedangkan untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung dalam isolat 3 digunakan FT-IR.

Kromatogram LC menunjukkan hubungan waktu retensi (Rt) dengan intensitas puncak kromatogram. Rt yang muncul pada Rt 5.00, 6.17 dan 7.51, setiap puncak yang muncul pada Rt tertentu diduga merupakan 1 senyawa. Kromatogram LC isolat 3 (Gambar 2) masih menunjukkan campuran senyawa, terlihat dari munculnya 3 puncak, selanjutnya masing-masing puncak diamati pola fragmentasi MS-nya seperti pada gambar 2 berikut:



Gambar 2. Spektrum LC-I-MS Isolat 3 Fase gerak : diklormetan : methanol (20:1) kecepatan 1 ml/menit

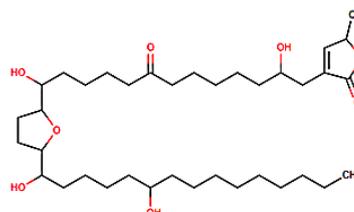
Sedangkan hasil Fragmentasi LC-MS isolat 3 pada Rt 5.00 menit menunjukkan nilai m/z 639 (M+H) sebagai puncak dasar (gambar 3), sehingga didapatkan bobot molekul (BM) 638 Da, kemudian dibandingkan kemiripan pola fragmentasi berdasar senyawa yang telah diketahui dari *A. muricata* L. Hasilnya seperti pada gambar 3 berikut:



Gambar 3. Fragmentasi MS isolat 3 pada Rt 5.00, Jenis fragmentasi : positive (M+H)

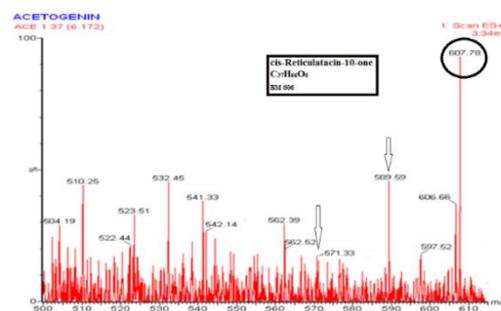
Pada Rt 5.00 senyawa mempunyai berat molekul 638 Da, dari literatur (Gloster TM, 2008 Oct 20) diketahui terdapat 2 senyawa dengan BM 638 Da yang telah diidentifikasi terdapat didalam *A. muricata* L yaitu purpurenin dan Muricatin C, selanjutnya dibandingkan pola fragmentasi MS dengan yang terdapat pada literatur. Hasil perbandingan fragmentasi senyawa yang diduga dengan fragmentasi senyawa pada literature menunjukkan kemiripan pola fragmentasi sama dengan senyawa Muricatin C (golongan acetogenin) yang mempunyai rumus molekul C₃₇H₆₆O₈

dengan struktur kimia seperti pada gambar 4.



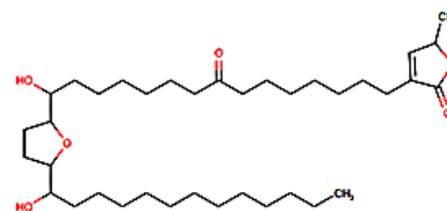
Gambar 4. Struktur kimia Muricatin C

Spektrum MS pada Rt 6.17 menit menunjukkan nilai m/z 607 (M+H) sebagai puncak dasar, sehingga didapatkan bobot molekul (BM) 606 Da, kemudian dicari kemiripan pola fragmentasi m/z berdasar literature [18] pembandingan seperti pada gambar 5 berikut:



Gambar 5. Fragmentasi MS isolat 3 pada Rt 6.17. Jenis fragmentasi : positive (M+H)

Pada Rt 6.17 diduga merupakan senyawa cis-Reticulatacin-10-one dengan rumus molekul C₃₇H₆₆O₆ dengan pola fragmentasi yang mirip dengan fragmentasi pembandingan. Struktur kimia dari senyawa cis-Reticulatacin-10-one seperti pada gambar 6 berikut:



Gambar 6. Struktur kimia cis-Reticulatacin-10-one

Spektrum MS isolat 3 pada Rt 7.51 menit menunjukkan nilai m/z 641 (M+H)

- [11]. Padma, P. P. N. T. S. a. K. R., 1998. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus.. *J. Ethnopharmacol*, 61(: 81-83.).
- [12]. Jaramillo, M. C. A. G. J. G. M. R. S. a. V. I., 2000. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp.. *Fitoterapia.*, 71(183-186.).
- [13]. Oberlies, N. C. C. a. M. J., 1997. Structure–activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF – 7/Adr) cells.. *J. Med. Chem.*, 40 (13)(2102-2106.).
- [14]. Adewole, S. a. E. C.-M., 2006. Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats.. *African Journal of Biomedical Research*, Volume 9.
- [15]. Bailey, C. A. D. C. (., 1989. Traditional treatments for diabetes.. *Diabet Care*, 12(553-554).
- [16]. BS Ashok kumar, S. K. e. a., 2013. In vitro antidiabetic activity of Nisamalaki Churna. *Sains Malaysiana*, 5(625-628), p. 42.
- [17]. Gloster TM, T. J. P. J. H. B. D. G., 2008 Oct 20. Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora.. *Chem. Biol.*, 15(10-3), p. 1058–1067.
- [18]. anonim, 2016. [Online] Available at: http://foodb.ca/spectra/ms_ms/6842#documentation [Accessed 7 december 2016].