

# Aktivitas Penghambatan Enzim Alfa Glukosidase dan Sitotoksisitas terhadap Sel $\beta$ -Pankreas BRIN BD11 dari Ekstrak Daun Gaharu

Yanico Hadi Prayogo<sup>1</sup>, Rita Kartika Sari<sup>1,2</sup>, Wasrin Syafii<sup>1</sup>, Eva Harlina<sup>3</sup>, Bayu Febram Prasetyo<sup>3</sup>

1 Departemen Hasil Hutan, Fakultas Kehutanan dan Lingkungan, IPB, Bogor

2 Pusat Studi Biofarmaka Tropika, IPB, Bogor

3 Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University

\*Corresponding author: rita\_kartikasari@apps.ipb.ac.id

## Abstrak

Diabetes mellitus, terutama tipe 2, merupakan penyakit metabolik yang ditandai oleh resistensi insulin dan gangguan regulasi glukosa dalam tubuh. Ekstrak bahan alam untuk aplikasi farmasi, khususnya sebagai agen antidiabetes, semakin mendapat perhatian besar dalam penelitian biomedis. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas antidiabetes dari daun gaharu (*Aquilaria malaccensis*) serta sitotoksisitasnya terhadap sel  $\beta$ -pankreas. Daun gaharu diekstraksi menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat. Ekstrak kemudian diuji invitro aktivitas antidiabetesnya melalui mekanisme aktivitas penghambatan enzim alfa-glukosidase. Selain itu, toksisitas ekstrak terhadap sel  $\beta$ -pankreas BRIN BD11 juga dianalisis. Ekstraksi dengan bantuan sonikasi menghasilkan tren rendemen ekstrak dari tinggi ke rendah adalah ekstrak etanol 50%, etanol, dan air. Aktivitas antidiabetes menunjukkan nilai  $IC_{50}$  yang lebih besar dari 100 ppm. Sementara itu, sitotoksisitas terhadap sel  $\beta$ -pankreas BRIN BD11 menunjukkan ekstrak air dan etanol tidak sitotoksik dengan inhibisi pada konsentrasi 1000  $\mu\text{g/mL}$  yang kurang dari 50%.

## 1. Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit degeneratif menahun yang menjadi masalah kesehatan utama dan prioritas penanggulangan penyakit tidak menular di Indonesia. Indonesia menempati posisi ke-5 negara dengan jumlah penduduk penyandang DM tertinggi di dunia, yaitu sebanyak 19,5 juta orang di tahun 2021 dan diperkirakan akan terus meningkat hingga 28,6 juta orang pada tahun 2045 untuk usia 20 tahun ke atas (IDF 2021). Diabetes melitus ditandai dengan hiperglikemia (kadar glukosa darah melebihi normal) karena kekurangan insulin akibat kerusakan sel  $\beta$ -pankreas (DM tipe 1) atau resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin akibat kelainan fungsi sel  $\beta$ -pankreas (DM tipe 2). Diabetes melitus dapat menimbulkan kerusakan jaringan, organ, disfungsi mata, ginjal, sistem saraf, dan pembuluh darah sebagai akibat gangguan metabolisme yang terjadi pada sel. Komplikasi jangka panjang DM adalah makrovaskular (penyakit jantung koroner, pembuluh darah perifer, dan stroke), mikrovaskular (nefropati, retinopati, dan neuropati), serta gabungan makrovaskular dan mikrovaskular (diabetes kaki) (Hardianto *et al.* 2020). Hal ini menyebabkan penanganan lebih sulit dan berbiaya mahal sehingga angka beban pemerintah Indonesia dalam penanggulangan penyakit ini tertinggi dengan peningkatan angka beban mencapai 4,9% [3].

Selama ini, pengobatan DM tipe 1 melalui injeksi insulin dan pengobatan DM tipe 2 melalui terapi obat oral berbahan aktif sintetis dari golongan obat sulfonilurea (glibenklamid),

meglitinid (repaglinid), biguanid (metformin), dan tiazolidinedion (rosiglitazon) melalui mekanisme kerja peningkatan sekresi dan sensitivitas insulin. Selain itu, obat oral DM tipe 2 lainnya adalah dari golongan inhibitor  $\alpha$ -glikosidase (akarbose dan miglitol) dengan mekanisme kerja memperlambat pencernaan pati di dalam usus halus sehingga glukosa dari pati lambat memasuki aliran darah, menunda adsorpsi karbohidrat, dan mengurangi peningkatan glukosa darah. Namun, obat-obat tersebut memiliki efek samping seperti hipoglikemia, gagal ginjal dan hati (Hardianto *et al.* 2020). Selain itu, sekitar 95% bahan aktif obat di Indonesia termasuk obat DM diimpor (Adiarso *et al.* 2020). Obat bahan alam dipercaya memiliki efek samping lebih rendah dan toleransi yang lebih baik pada pasien (Prajapati *et al.* 2022). Oleh karena itu, pemanfaatan bahan aktif antidiabetes alami dari tumbuhan yang melimpah di Indonesia potensial untuk dikembangkan untuk mengurangi ketergantungan bahan impor.

Pohon gaharu menghasilkan kayu yang sangat mahal, yaitu mutu terbaik Rp5-10juta/kg dan mutu terendah Rp500.000/kg (Hidayah *et al.* 2020). Permintaan gaharu meningkat sehingga budidaya gaharu berkembang dan daun gaharu (DG) dibuat teh. Uji in-vitro ekstrak etanol-DG menunjukkan IC50 enzim alfa glukosidase sebesar 90,87 $\mu$ g/ml, sedangkan fraksi metanol-air adalah 35,89 $\mu$ g/ml (antidiabetes sangat kuat) (Suhardiman *et al.* 2022). Ekstrak metanol-DG pada dosis 500mg/kgBB tikus menurunkan kadar gula darah sebesar 57,1% dan tidak toksik (Zulkiflie 2018). Kombucha DG dosis 1ml/20gBB mencit menurunkan kadar gula darah setara dengan pemberian obat antidiabetes komersil (glibenklamid) (Khoerunnisa *et al.* 2023) Fraksi air ekstrak etanol DG pada dosis 10 mg/kgBB tikus meningkatkan penyerapan glukosa dengan peningkatan kadar GLUT4 pada tulang otot 24,5% (Said *et al.* 2016). Namun senyawa aktif ekstrak metanol DG belum banyak diteliti. Demikian pula dengan mekanisme kerja lainnya. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi pengaruh metode ekstraksi dan perbedaan pelarut terhadap penghambatan enzim alfa glukosidase dan sitotoksitas sel beta pankreas BRIN BD11.

## **2. Metode**

### **2.1 Ekstraksi**

Serbuk daun gaharu berukuran 40-60 mesh diekstraksi dengan etanol, etanol 50% (etanol:air), dan air. Ekstraksi menggunakan metode *ultrasound assisted extraction* (UAE) dengan lama waktu ekstraksi 45 menit. Ekstraksi diawali dengan pelarut n-heksana untuk menghilangkan zat ekstraktif yang bersifat non polar seperti lemak dan lilin. Nisbah serbuk dan pelarut yang digunakan sebesar 1:10. Filtrat yang diperoleh dari ekstraksi kemudian diuapkan hingga pekat dan ditimbang untuk menentukan rendemen ekstraksi.

### **2.2 Uji Penghambatan Enzim $\alpha$ -glukosidase**

Evaluasi aktivitas inhibisi  $\alpha$ -glukosidase dilakukan melalui reaksi enzimatik secara in vitro, merujuk pada penelitian. Kontrol positif yang digunakan yaitu akarbose. Konsentrasi sampel dan akarbose yang digunakan, yaitu 500 ppm. Sebanyak 50  $\mu$ L buffer fosfat 0,1 M pH 6,8, 25  $\mu$ L substrat p-NPG konsentrasi 10 mM, dan 10  $\mu$ L larutan sampel dimasukkan ke dalam microplate 96 well. Larutan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37  $^{\circ}$ C. Sebanyak 25  $\mu$ L larutan  $\alpha$ -glukosidase (0,4 unit/mL dalam buffer fosfat 0,1 M pH 7) dimasukkan ke dalam microplate 96 well. Kemudian, diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37  $^{\circ}$ C. Setelah itu, ditambahkan 100  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M untuk menghentikan reaksi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm. Pengujian dilakukan pada sampel hasil fraksi dan ekstrak kasar dengan tiga kali ulangan.

### 2.3 Sitotoksitas Sel Pankreas BRIN-BD 11 (Prayogo *et al.* 2023)

Penentuan aktivitas antiproliferasi akan dilakukan pada ekstrak daun, kulit, dan kayu teras dan ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida). Satu jenis sel kanker yang digunakan adalah sel  $\beta$ -pankreas BRIN BD11. Sel kultur dimasukkan ke dalam pelat mikro 96 sumur dengan volume akhir 100  $\mu$ L dan diinkubasi selama 24 jam. Sampel ekstrak yang telah dilarutkan dengan medium dengan konsentrasi 25  $\mu$ g/mL selanjutnya ditambahkan ke dalam sumur yang telah berisi sel biakan dan diinkubasi selama 48 jam. Sebanyak 10  $\mu$ L MTT (2000 mg/L). Campuran tersebut diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37 °C. Sebanyak 100  $\mu$ L etanol 70% ditambahkan dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 565 nm menggunakan microplate reader.

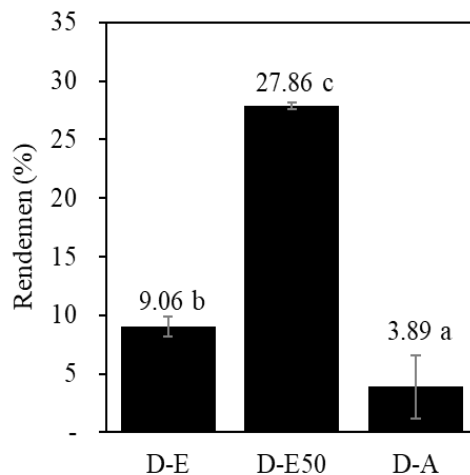
### 2.4 Analisis Data

Data rendemen, sitotoksitas, dan enzim  $\alpha$ -glukosidase dianalisis dengan *analysis of variance* (ANOVA). Selain itu, variabel terikat dengan hasil analisis yang signifikan dilanjutkan dengan menggunakan uji jenjang berganda Duncan's. Analisis menggunakan SPSS 25 (IBM, Amerika Serikat).

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Rendemen Ekstrak

Ekstraksi terhadap daun gaharu menghasilkan rendemen yang bervariasi. Ekstrak D-E50 menghasilkan rendemen tertinggi dan berbeda nyata terhadap D-E dan D-A (Gambar 1). Sementara itu, ekstrak D-A memiliki rendemen terendah, sehingga tren rendemen ekstraksi daun gaharu adalah D-E50 > D-E > D-A. Perbedaan rendemen ini dikarenakan adanya perbedaan pelarut ekstraksi yang berkaitan dengan perbedaan dalam mengekstrak jenis/golongan senyawa yang ada di daun gaharu. Campuran antara etanol dan air dengan perbandingan 1:1 tersebut menghasilkan pelarut ekstrak yang memiliki kemampuan untuk mengekstrak senyawa dengan kepolaran yang lebih luas. Air bersifat sangat polar dan etanol memiliki kepolaran yang lebih rendah dibandingkan air. Jika memperhatikan tren dari rendemen ekstraksi tsb, rendemen ekstraksi D-E yang lebih besar dari D-A menunjukkan kemungkinan bahwa komponen senyawa yang terkandung di daun gaharu didominasi oleh senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang relatif rendah. Ekstrak metanol daun gaharu (*Aquilaria malaccensis*) mengandung senyawa golongan flavonoid, fenolik, triterpenoid, dan steroid, sedangkan fraksi metanol-airnya mengandung flavonoid, triterpenoid, dan fenolik (Hidayah *et al.* 2023).



Gambar 1. Sitotoksitas atau inhibisi sel BRIN BD11 dari ekstrak daun gaharu pada konsentrasi 1000 µg/mL. Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji jenjang berganda Duncan ( $p < 0.05$ ).

### 3.2 Aktivitas Penghambatan Enzim $\alpha$ -glukosidase

Ekstrak Nilai  $IC_{50}$  ketiga jenis ekstrak (D-E, D-E50, dan D-A) lebih besar dari 100 µg/mL menunjukkan potensi ekstrak daun gaharu (*Aquilaria malaccensis*) sebagai penghambat enzim alfa-glukosidase (Tabel 1). Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase diketahui dihambat oleh zat bioaktif seperti flavonoid, tanin, dan polifenol, yang sering terdapat dalam ekstrak etanol (D-E) dan ekstrak etanol-air (D-E50) (Tundis et al., 2010). Namun, hasil  $IC_{50}$  dalam penelitian ini lebih besar dari 100 µg/mL, hal ini dapat diduga karena adanya pengaruh dari proses ekstraksi dan pelarut yang digunakan. Senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung di dalam ekstrak diduga memiliki aktivitas atau mekanisme yang berbeda, sehingga hasil inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diperoleh kurang baik.

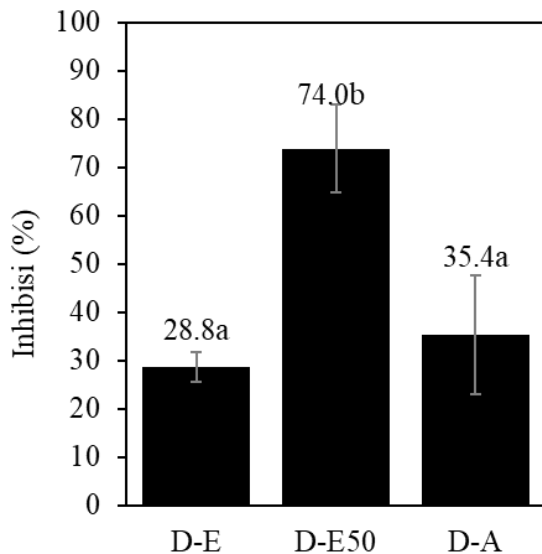
Selain itu, ekstrak air (D-A) yang biasanya mengandung senyawa hidrofilik seperti saponin dan polisakarida juga tidak menunjukkan efektivitas yang baik, yang mungkin disebabkan oleh rendahnya keberadaan senyawa spesifik penghambat alfa-glukosidase. Meskipun hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun gaharu memiliki aktivitas penghambatan yang rendah terhadap enzim alfa-glukosidase, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengevaluasi potensi senyawa aktif spesifik yang terkandung dalam ekstrak ini. Isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif, seperti flavonoid atau alkaloid, dapat memberikan informasi yang lebih mendalam mengenai aktivitas biologisnya. Selain itu, optimasi metode ekstraksi atau modifikasi struktur senyawa bioaktif juga dapat dilakukan untuk meningkatkan efektivitas penghambatan enzim alfa-glukosidase (Kim et al., 2011).

Tabel 1 Nilai  $IC_{50}$  penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase oleh ekstrak daun gaharu dengan berbeda jenis pelarut ekstrak.

Jenis Ekstrak	$IC_{50}$ (µg/mL)
D-E	> 100
D-E50	> 100
D-A	> 100

### 3.3 Sitotoksitas

Ekstrak daun gaharu menunjukkan sitotoksitas yang berbeda akibat perbedaan pelarut ekstraksi yang digunakan. Ekstrak D-E50 menunjukkan inhibisi sel BRIN BD11 tertinggi dengan inhibisi lebih besar dari 50% dan berbeda nyata dibandingkan ekstrak lain. Berdasarkan inhibisi sel BRIN BD11 tersebut, tren sitotoksitas ketiga ekstrak tersebut adalah D-E50 > D-A > D-E. Ekstrak D-A memiliki sitotoksitas yang lebih tinggi dibandingkan D-E, tetapi nilai tersebut tidak berbeda nyata. Penelusuran terhadap publikasi ilmiah tidak ditemukan laporan untuk efek sitotoksitas ekstrak daun gaharu terhadap sel BRIN BD11.



Gambar 2. Sitotoksitas ekstrak daun gaharu dengan perbedaan pelarut. Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji jenjang berganda Duncan ( $p < 0.05$ ).

### 4. Simpulan

Ekstraksi dengan sonikasi dan perbedaan pelarut menghasilkan inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase yang kurang baik, tetapi toksisitas terhadap sel  $\beta$ -pankreas yang cukup baik. Nilai  $IC_{50}$  yang lebih besar dari 100  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan adanya kemungkinan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antidiabetes melalui mekanisme selain penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Sitotoksitas ekstrak terhadap sel  $\beta$ -pankreas BRIN BD11 menunjukkan bahwa ekstrak daun gaharu memiliki sitotoksitas yang rendah terhadap sel  $\beta$ -pankreas. Hal ini mengindikasikan adanya potensi ekstrak daun gaharu sebagai antidiabetes yang dapat mempengaruhi kinerja sel  $\beta$ -pankreas dalam memproduksi insulin.

## 5. Daftar Pustaka

- Adiarso, Marwanto B, Ismariny, Zubair M, Widyastuti N, Prihawantoro S. Outlook Teknologi Kesehatan 2020 Inisiatif Penguatan Rantai Pasok Bahan Baku Obat. Jakarta (ID): BPPT; 2020.
- Badan Perencanaan Pembangunan Nasional. Transisi Demografi dan Epidemiologi: Permintaan Pelayanan Kesehatan di Indonesia. 2019.
- Prajapati, A.K., Sagar, S. dan Kumar, R. Past and current perspectives of herbal product. J Research in Applied Sciences and Biotechnology. 2022;1(5): 145–160.
- Hardianto D. Telaah komprehensif diabetes melitus: Klasifikasi, gejala, diagnosis, pencegahan, dan pengobatan. Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia. 2020; 7(2): 305-317.
- Hidayat H, Siburian R, Yuliana CI. Gaharu alam, jaringan perdagangan, dan gaharu budidaya: studi kasus Kalimantan Timur. Jurnal Biologi Indonesia. 2020;16(1):99-110.
- [International Diabetes Federation]. IDF Diabetes Atlas. 10th Edition. 2021.
- Khoerunnisa DA, Choesrina R, Suwendar. Uji aktivitas antidiabetes kombucha daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) terhadap mencit jantan (*Mus musculus*) Swiss Webster yang diinduksi aloksan. Pharmacy. 2023;3(2):591-599.
- Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y., & Rhee, H. I. (2011). Inhibitory effect of pine bark extract on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. Nutrition, 27(6), 645-652.
- Said F, Kamaluddin MT, Theodorus. Efficacy of the *Aquilaria Malaccensis* leaves active fraction in glucose uptake in skeletal muscle on diabetic wistar rats. Intl J Health Sci Res. 2016;6(7):162-167.
- Suhardiman A, Adnyana IK, Sukamawati IK, Rostinawati T. Activity of gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam) leaves extract and fraction as herbal drug against  $\alpha$ -glucosidase inhibition. Int. J. Res. Pharm. Sci. 2022;13(1):35-41.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and their hypoglycemic potential in the treatment of diabetes: an update. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 10(4), 315-331.
- Zulkifle NL. Antidiabetic activity of aquilaria malaccensis (agarwood) leaves extracts [tesis]. Pahang (MY): University Malaysia Pahang. 2018.