

DETERMINATION OF ANDROGRAPHOLIDE ISOLATE ACTIVITY TO α -AMYLASE AND α -GLUCOSIDASE USING APOSTOLIDIS AND MAYUR METHOD

PENENTUAN AKTIVITAS ISOLAT ANDROGRAFOLID TERHADAP α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE MENGGUNAKAN METODE APOSTOLIDIS DAN MAYUR

Ichwan Ridwan Rais*^{1,2}, Agung Giri Samudra¹, Sitarina Widayarini³, Agung Endro Nugroho¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta Indonesia

²Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta Indonesia

³Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta Indonesia

ABSTRACT

Disorders of carbohydrate metabolism can lead to diabetes mellitus. Carbohydrates are metabolized in the gastrointestinal tract into simple glucose and absorbed into the bloodstream and affected blood glucose levels. The absorption process is catalyzed by α -1,4-glycoside breaking bond enzyme, namely α -amylase and α -1,6-glycoside breaking bond enzyme, namely α -glucosidase. They are found in the intestinal cells. Research had been conducted in an effort to develop an alternative treatment of diabetes mellitus by testing the ability of isolates of andrographolide in inhibiting α -amylase activity and α -glucosidase in vitro. Andrographolide isolates showed fairly good activity in inhibiting α -amylase ($IC_{50} = 1,49$ mg/mL) and weak in inhibiting α -glucosidase ($IC_{50} = 38,86$ mg/mL). Inhibition of α -amylase activity is evidence of one mechanism of andrographolide in reducing carbohydrate metabolism that can affect blood glucose levels and indicates that andrographolide is a potential alternative medicine in addressing diabetes mellitus.

Keywords: andrographolide, α -amylase, α -glucosidase.

ABSTRAK

Gangguan metabolisme karbohidrat dapat menyebabkan Diabetes mellitus. Karbohidrat dalam saluran cerna mengalami metabolisme menjadi glukosa yang sederhana kemudian diabsorpsi masuk ke dalam peredaran darah serta mempengaruhi kadar glukosa dalam darah. Proses penyerapan ini dikatalisis enzim pemecah ikatan α -1,4-glikosida yaitu α -amilase dan enzim pemecah ikatan α -1,6-glikosida yaitu α -glukosidase yang terdapat pada sel usus. Telah dilakukan penelitian sebagai upaya mengembangkan pengobatan alternatif diabetes mellitus dengan menguji kemampuan isolat andrografolid dalam menghambat aktivitas α -amilase dan α -glukosidase secara in vitro. Isolat andrografolid memperlihatkan aktivitas yang cukup baik dalam menghambat α -amilase ($IC_{50} = 12,49$ mg/mL) dan lemah dalam menghambat α -glukosidase ($IC_{50} = 38,86$ mg/mL). Penghambatan aktivitas α -amilase ini menjadi bukti salah satu mekanisme andrografolid dalam mengurangi metabolisme karbohidrat yang dapat mempengaruhi kadar glukosa dalam darah dan mengindikasikan andrografolid sebagai obat alternatif yang cukup potensial dalam mengatasi penyakit diabetes mellitus.

Kata kunci: andrografolid, α -amilase, α -glukosidase.

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus didefinisikan sebagai suatu kekacauan metabolik yang diakibatkan oleh berbagai macam penyebab penyakit yang ditandai oleh hiperglikemia kronis dengan gangguan

Metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein, terkait defisiensi sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. Menurut WHO 1980, penyakit diabetes mellitus dibagi menjadi dua, yaitu: diabetes mellitus tipe 1 *insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM) dan tipe 2 *non insulin-dependent diabetes mellitus* (NIDDM) (DepKes RI, 2005). Diabetes mellitus tipe 2 lebih banyak terjadi dibandingkan tipe 1 dengan jumlah penderita mencapai 80-90%

Corresponding author : Ichwan Ridwan Rais
E-mail : ichwanridwanrais@yahoo.co.id

dari total seluruh populasi penderita diabetes mellitus (Mycek *et al.*, 2001). Departemen Kesehatan (2005) menyatakan bahwa penyakit ini masuk dalam sepuluh penyakit terbesar di Indonesia. Diabetes mellitus tipe 2 umumnya terjadi pada usia setelah 45 tahun. Namun, terjadi peningkatan penderita diabetes mellitus tipe 2 di kalangan remaja dan anak-anak selama beberapa tahun terakhir.

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) adalah salah satu tanaman Indonesia yang banyak digunakan secara tradisional dimasyarakat sebagai obat penyakit diabetes mellitus (Sudarsono *et al.*, 2006). Tanaman ini mengandung diterpen lakton yang terdiri dari andrografolid (zat pahit), neoandrografolid, 14-deoksiandrografolid, 14-deoksi-11-oksoandrografolid (Niranjan *et al.*, 2010; Sudarsono *et al.*, 2006; Chao dan Lin, 2010). Andrografolid paling aktif dibandingkan yang lainnya (Soediro, 1973).

Karbohidrat yang telah dicerna dalam lambung masuk ke dalam usus dan mengalami penyerapan. Penyerapan ini dipermudah dengan adanya enzim pemecah ikatan glikosida yaitu enzim α -glukosidase dan α -amilase yang terdapat pada batas pertemuan (*brush border*) sel usus (Katzung, 2002).

Aktivitas enzim α -glukosidase seperti maltase dan sukrase dalam menghidrolisis oligosakarida menjadi glukosa, fruktosa dan monosakarida lain pada dinding usus halus dapat dihambat oleh senyawa obat inhibitor α -glukosidase. Penghambatan aktivitas enzim ini efektif dalam mengurangi pencernaan karbohidrat dan proses absorpsinya dalam usus halus sehingga dapat menurunkan kadar gula darah *post prandial* penderita diabetes mellitus. Senyawa obat ini hanya berpengaruh terhadap penurunan kadar gula darah pada waktu makan dan tidak mempengaruhi kadar gula darah setelahnya. Inhibitor α -glukosidase juga dapat menghambat aktivitas enzim α -amilase dalam menghidrolisis polisakarida dalam lumen usus (DepKes RI, 2005).

Tadera *et al.* (2006) telah membuktikan secara *in vitro*, flavonoid suatu senyawa yang berpotensi menghambat α -amilase dan α -glukosidase. Apostolidis *et al.* (2007) juga melaporkan aktivitas penghambatan α -amilase oleh keju. Andrografolid menunjukkan efek hipoglikemik dan hipolipidemik pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi (Nugroho, *et al.*, 2011) dan ekstrak air *A. paniculata* dilaporkan menunjukkan aktivitas pelepasan insulin yang tergantung dosis secara *in vitro* kultur sel *Brin-BD11* (Wibudi *et al.*, 2008). Pada penelitian ini

diuji aktivitas andrografolid dalam menghambat α -amilase dan α -glukosidase.

METODOLOGI

Bahan penelitian

Andrografolid yang digunakan adalah isolat penelitian sebelumnya (Warditiani, 2012) yang herbanya diperoleh dari Desa Girimulyo, Kecamatan Nanggulan, Kabupaten Kulon progo. Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

Uji kualitatif andrografolid

Pada uji kualitatif isolat andrografolid menggunakan KLT, sesuai dengan uji kualitatif yang telah dilakukan oleh DepKes RI (2009) dan Aulia (2008). Pengujian secara kualitatif dengan KLT dilakukan dengan menyiapkan larutan uji isolat 0,1 mg/mL dalam etanol dan perbandingan andrografolid standar 0,1 mg/mL dalam etanol. Sebagai fase gerak adalah kloroform:methanol (9:1). Fase diam menggunakan plat KLT silika gel 60 F₂₅₄. Volume penotolan larutan uji dan perbandingan sebanyak 5 μ L. Pengamatan noda pada UV 254 nm.

Uji penghambatan α -amilase secara *in vitro*

Dua puluh lima mikroliter larutan ekstrak etanol sambiloto ditambahkan ke dalam *microplate* kemudian 25 μ L larutan α -amilase 0,5 mg/mL dalam buffer fosfat dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan pati 0,5% dan diinkubasi kembali pada suhu 25°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 μ L larutan DNS yang diinkubasi di atas penangas air selama 5 menit. Larutan didinginkan dalam suhu ruangan dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

Uji penghambatan α -glukosidase secara *in vitro*

Sepuluh mikroliter larutan isolat andrografolid dicampur dengan 25 μ L larutan α -glukosidase 0,2 UI/mL dalam 0,1 M buffer fosfat pH 7, dan 25 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida sebagai substrat. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ L larutan natrium karbonat 0,2 M. Larutan diukur absorbansinya sebelum dan sesudah penambahan substrat. Selisih nilai absorbansi digunakan sebagai parameter penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase.

Persen penghambatan kedua enzim dihitung dengan:

$$\frac{A_{540} \text{ kontrol} - A_{540} \text{ sampel}}{A_{540} \text{ kontrol}} \times 100 \%$$

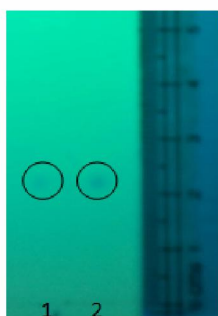
Kontrol menggambarkan 100% aktivitas enzim tanpa perlakuan dengan menggunakan buffer fosfat. DNS dan natrium karbonat digunakan sebagai *stop solution*. Persen penghambatan dianalisis dengan *independent sample-t test* dan *paired sample-t test*. Nilai aktivitas penghambatan enzim 50% (IC_{50}) dihitung melalui analisis regresi linier.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji kualitatif andrografolid

Identifikasi isolat andrografolid menggunakan analisis kualitatif kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilakukan terhadap isolat andrografolid dengan pembanding andrografolid standar. Isolat andrografolid dan andrografolid standar yang akan dianalisis diencerkan terlebih dahulu, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dengan fase diam silika gel 60 F_{254} dan fase gerak kloroform:metanol (9:1) v/v, jarak pengembangan 8 cm (Dep Kes RI, 2008).

Hasil elusi yang diamati pada λ 254 nm mendapatkan nilai R_f isolat andrografolid yang diperoleh sebesar 0,28 sebanding dengan nilai R_f andrografolid standar (Gambar 1).

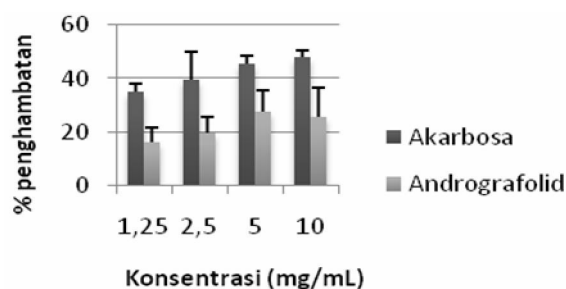


Gambar 1. Profil KLT isolat andrografolid (1) dan andrografolid standar (2) dilihat dibawah sinar UV 254 nm. Fase diam silika gel 60 F_{254} dan fase gerak kloroform : metanol (9:1)

Uji penghambatan α -amilase secara *in vitro*

Pada Gambar 2, hasil analisis statistik dengan *independent sample-t test* pengaruh peningkatan kadar isolat andrografolid terhadap kenaikan persen penghambatan enzim α -amilase menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p > 0,05$), dan hasil analisis statistik dengan *paired sample-t test* untuk pengaruh penghambatan

enzim α -amilase antara akarbosa dengan andrografolid menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).



Gambar 2. Grafik penghambatan (%) aktivitas enzim α -amilase akarbosa dan isolat andrografolid ($n=3$, rata-rata \pm SEM)

Hasil statistika ini mengindikasikan bahwa kenaikan kadar isolat andrografolid yang diberikan berpengaruh kecil dan tidak bermakna terhadap daya penghambatan enzim α -amilase. Pengaruh penghambatan aktivitas enzim α -amilase isolat andrografolid juga tidak sebanding dengan akarbosa.

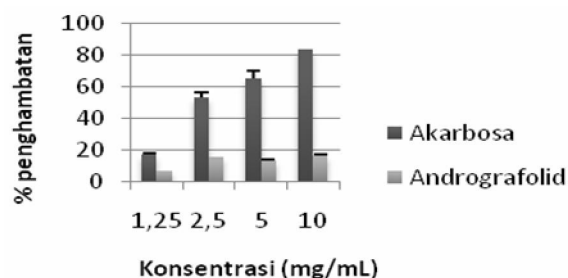
Berdasarkan Gambar 2, isolat andrografolid dapat menghambat kerja enzim α -amilase dan peningkatan daya hambat kerja enzim α -amilase terhadap dosis sesuai dengan peningkatan daya hambat dari kontrol positif akarbosa yang sudah diketahui secara umum memiliki aktivitas menghambat kerja enzim α -amilase. Namun, berdasarkan hasil analisis statistik *independent sample-t test* dan *paired sample-t test* peningkatan ini tidak bermakna dan persen aktivitas penghambatan mendekati 30% pada hari ke-5, lebih kecil dibandingkan dengan kontrol akarbosa yang hampir mencapai 50%.

Uji penghambatan α -glukosidase secara *in vitro*

Hasil analisis statistik dengan *independent sample-t test* pengaruh peningkatan kadar isolat andrografolid terhadap kenaikan persen penghambatan enzim α -glukosidase menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), dan hasil analisis statistik dengan *paired sample-t test* untuk pengaruh penghambatan enzim α -glukosidase antara akarbosa dengan andrografolid juga menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Hasil statistika ini mengindikasikan bahwa kenaikan kadar isolat andrografolid yang diberikan berpengaruh secara bermakna terhadap daya penghambatan enzim α -glukosidase, namun pengaruh penghambatan aktivitas enzim α -

glukosidase isolat andrografolid tidak sebanding dengan akarbosa.



Gambar 3. Grafik penghambatan (%) aktivitas enzim α-glukosidase akarbosa dan isolat andrografolid (n=3, rata-rata ± SEM)

Berdasarkan Gambar 3, aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase menggambarkan peningkatan yang sama dengan α-amilase tetapi dengan persen penghambatan yang lebih rendah sekitar 25%.

Kedua uji α-amilase dan α-glukosidase menunjukkan aktivitas penghambatan yang meningkat seiring kenaikan dosis. Dosis paling rendah daya hambat enzim α-amilase menunjukkan aktivitas 16% dan daya hambat enzim α-glukosidase 6,5%; sedangkan aktivitas tertinggi daya hambat enzim α-amilase ditunjukkan pada dosis 5 mg/mL dengan 28% dan daya hambat enzim α-glukosidase ditunjukkan pada dosis 10 mg/mL dengan 17%.

Tabel I. Nilai IC₅₀ *in vitro* α-amilase dan α-glukosidase akarbosa dan andrografolid, analisis dilakukan dengan 3 kali pengukuran.

Perlakuan	(IC ₅₀) (mg/mL)	
	α-amilase	α-glukosidase
Akarbosa	6,53	1,47
Andrografolid	12,49	38,86

Nilai 50% penghambatan (IC₅₀) *in vitro* α-amilase dan α-glukosidase isolat andrografolid menunjukkan aktivitas penghambatan yang cukup berbeda (Tabel 1). Aktivitas penghambatan α-amilase terlihat lebih poten dengan nilai IC₅₀ sebesar 12,49 mg/mL dibandingkan aktivitas penghambatan α-glukosidase dengan nilai IC₅₀ sebesar 38,86 mg/mL.

Ali *et al.* (2006) menyatakan bahwa penghambatan aktivitas α-amilase dan α-glukosidase dapat menurunkan kadar glukosa darah postprandial hewan coba toleransi glukosa. Hal ini dapat digunakan sebagai suatu strategi menurunkan kadar glukosa darah postprandial pasien penderita diabetes mellitus.

Terkadang uji *in vitro* tidak sejalan dengan uji *in vivo*, oleh karena itu adalah penting peran pengujian *in vitro* dalam penelitian skrining aktivitas farmakologi tanaman obat. Pengujian *in vitro* juga bermanfaat dalam menentukan aktivitas farmakologi tanaman yang mengandung banyak komponen kimia mana yang berkhasiat dan mana yang tidak dalam skala yang lebih sederhana dibanding pengujian *in vivo*. Pengujian ini merupakan rangkaian pengujian dari aktivitas isolat aktif andrografolid dalam mengobati diabetes mellitus.

KESIMPULAN

Isolat andrografolid memiliki aktivitas penghambatan α-amilase dan α-glukosidase secara *in vitro*, dimana potensi penghambatan aktivitas α-amilase (IC₅₀ 12,49 mg/dL) lebih kuat dibanding α-glukosidase (IC₅₀ 38,86 mg/dL) yang mengindikasikan bahwa andrografolid dapat digunakan sebagai obat alternatif yang cukup potensial dalam mengatasi penyakit diabetes mellitus.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh IM-HERE Universitas Gadjah Mada tahun anggaran 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, H., Houghton, P.J., and Soumyanath, A. 2006, α-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol* **107**: 449-455 *cit.* Subramanian, R., Asmawi, M.Z., and Sadikun, A. 2008, *In vitro* alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of Andrographis paniculata extract and andrographolide, *Act. J. Biochim. Pol.*, **55(2)**: 391-398.
- Apostolidis, E., Kwon, Y.I.I., and Shetty, K. 2007, Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension, *Inn. Food Sci. Emer. Technol.*, **8**: 46-54.
- Aulia, N., 2008, Penetapan Kadar Andrografolid dan Kurkumin dalam Ekstrak Campuran Herba Sambiloto dan Rimpang Kunyit dengan Metode KLT-densitometri, Universitas Airlangga, *Skripsi*, Surabaya.
- Chao, W.W. and Lin, B.F., 2010, Isolation and Identification of Bioactive Compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian), *Chinese Medicine Journal*, **5**: 1-15.

- Dep Kes RI, 2005, *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Mellitus*, Dep Kes RI, Jakarta. pp:16, 24, 36-46.
- Depkes RI, 2009, *Farmakope Herbal Indonesia*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Katzung, B.G., 2002, *Farmakologi Dasar dan Klinik*, diterjemahan dari Bahasa Inggris oleh Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, pp: 349, 694-709.
- Mayur, B., Sandesh, S., Shruti, S., and Sung-Yum, S., 2010, Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L., *Journal of Medicinal Plants Research*, **4** (15): 1547-1553.
- Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., and Fisher, B.D., 2001, *Farmakologi Ulasan Bergambar Edisi 2*, 1995, Cetakan I. Alih bahasa : Prof.dr.H. Azwar Agoes, Widya Medika, 259-263.
- Niranjana, A., Tewari, S.K., and Lehry, A., 2010, Biological Activities of Kalmegh (*A. Paniculata* Ness) and Its Active Principles, *Indian J. of Nat. Prod. and Res.*, **1**(2): 125-135.
- Nugroho, A.E., Syamsul, E.S., Andrie, M., Warditiani, K., Lukitaningsih, E., and Pramono, S., 2011, The Antidiabetics of Purified Extract of *Andrographis paniculata* (Burn.f.) Ness and its Active Compound Andrographolide in High Fructose-Fat Fed Rats. *Laporan penelitian hibah IMHERE*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Soediro, S., 1973, Pemeriksaan zat pahit dalam daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees dari Bandung, Jawa). *Acta Pharmaceutica*.
- Sudarsono, Puidjoarinto, A., Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, I.A., Drajad, M., Wibowo, S., and Ngatidjan, 2006, *Tumbuhan Obat 1*. Pusat Penelitian Obat Tradisional, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. pp: 25-28.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., and Matsuoka, T., 2006, Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase of Flavonoids, *J Nutr. Sci. Vitaminol.*, **52**: 149-153.
- Warditiani, N.K., 2012, 'Uji Aktivitas Antihiperlipidemia dan Antiaterosklerosis Isolat Andrografolid dan Ekstrak Terpurifikasi Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Ness) Pada Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 Resistensi Insulin, *Tesis*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wibudi, A., Kiranadi, B., Manalu, W., Winarto, A. and Suyono, S. 2008, The Traditional Plant, *Andrographis paniculata* (Sambiloto) Exhibits Insulin-Releasing Actions *In vitro*, *Acta Med. Indonesian*, **40**(2).
- Zang, X.F. and Tan, B.K., 2000, Antihyperglycemic and antioxidant Properties of *Andrographis paniculata* in Normal and Diabetic Rats. *J. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **27** (3): 58-63.