

Identifikasi Senyawa Penghambat Enzim α -Glukosidase dari Ekstrak Etanol 96% Daun Yacon (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp.& Endl.]H. Robinson)

(Identification of α -glucosidase enzyme inhibitor compound from ethanol 96% extract of yacon leaves [(*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.) H. Robinson]

ZUHELMI AZIZ^{1*}, FARHANA HANIDA AL QISTHI¹, RATNA DJAMIL¹,
SYAMSUDIN¹, NANCY DEWI YULIANA² DAN PARTOMUAN SIMANJUNTAK^{1,3}

¹ Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jl. Srengseng Sawah, Jakarta Selatan 12640;
²Departemen of Food Science. Technology, Faculty of Argicultur Technology, IPB, Bogor 16680;
³Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong 16911.

Diterima 3 Desember 2018, Disetujui 5 Maret 2019

Abstrak: Daun yacon (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp.& Endl.] H. Robinson) atau di Indonesia lebih dikenal sebagai daun insulin, secara ilmiah memiliki berbagai khasiat dan salah satunya sebagai antidiabetes. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa kimia penghambat enzim α -glukosidase dari ekstrak etanol 96% daun yacon. Isolasi, dan pemurnian dilakukan dengan cara fraksinasi ekstrak etanol 96% daun yacon dilakukan dengan kromatografi kolom (SiO_2 ; diklorometan-metanol-air = 5:5:1) menghasilkan 5 fraksi (Fr-1 ~ Fr-5). Hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase secara *in vitro* terhadap kelima fraksi diperoleh fraksi 3 (Fr-3) sebagai fraksi teraktif dengan persentase inhibisi sebesar 87,84%. Pemurnian fraksi Fr-3 dengan KLT preparatif (SiO_2 ; n-BuOH-etanol-air = 4:1:2,2) menghasilkan isolat murni pada Fr 3-1. Identifikasi isolat murni Fr 3-1 dilakukan dengan menginterpretasi data spektra *Ultraviolet*, *Fourier Transform-Infra Red*, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, dan membandingkan data pergeseran kimia Resonansi Magnet Inti (proton dan karbon) dan ditentukan sebagai senyawa kimia nystose (GF3). Hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase untuk Fr-3-1 adalah dengan IC50 sebesar 59,48 bpj.

Kata kunci: Yacon; *Smallanthussonchi folius* (Poepp. &Endl.) H.Robinson), antidiabetes;
 α -glukosidase; nystose.

Abstract: The leaves of yacon (*Smallanthussonchi folius* [Poepp. &Endl.] H. Robinson) or in Indonesia known as “Daun insulin” (Insulin leaf), scientifically has various medicinal properties and one of them as antidiabetic. The aim of this research is to know α -glucosidase enzyme inhibitor compound in the ethanol 96% extract of yacon leaves. Fractionation of ethanol extract subjected to column chromatography (SiO_2 ; dichloromethane-methanol-water = 5:5:1) gave 5 fractions (Fr -1~Fr - 5). The results of the α -glucosidase enzyme inhibition activity test *in vitro* against the five fractions obtained the 3rd fraction as the most active of 87.84%. Purification of the 3rd fraction with preparative thin layer chromatography (SiO_2 ; n-BuOH-ethanol-water = 4:1:2.2) gave pure isolate as Fr 3-1. Identification of pure isolates Fr 3-1 was carried out by interpreted spectra of Ultraviolet, Fourier Transform-Infra Red, Mass Spectra (from LC-MS) and compared data on the chemical shift of the Nuclear Magnetic Resonance (proton and carbon) and determined as Nystose (GF3) compound. The results of the α -glucosidase enzyme inhibition activity showed that Fr 3-1 has IC50 of 21.36 ppm.

Keywords: yacon; *Smallanthussonchi folius* [Poepp. &Endl.] H. Robinson, antidiabetic; α -glucosidase;
nystose

*Penulis korespondensi HP 08129294176
Alamat e-mail emi.ffup@yahoo.com

PENDAHULUAN

DIABETES melitus (DM) adalah suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis dengan multi etiologi yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam darah dan DM merupakan salah satu masalah utama kesehatan dunia, termasuk Indonesia⁽¹⁾. Secara epidemiologi, diperkirakan pada tahun 2030 mendatang prevalensi diabetes melitus di Indonesia mencapai 21,3 juta orang⁽²⁾. Alternatif pengobatan diabetes melitus dengan obat herbal dan salah satunya dengan pemanfaatan potensi antihiperlipidemik yang dimiliki tanaman (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp. & Endl.] H. Robinson). Yakon adalah tanaman yang berasal dari pegunungan Andez, Peru dan telah digunakan sejak lama dalam pengobatan karena nilai gizinya yang baik. Tanaman ini sudah mulai diperkebunkan oleh Anto Widy di Kali Urip, Wonosobo⁽³⁾ dan di kebun percobaan Balitro di Lembang. Akar yakon banyak mengandung air dan rasanya manis. Akar yakon kaya akan pati dengan oligofruktan yang sukar dicerna dan memiliki nilai energi yang relatif rendah. Sehingga dapat diasumsikan bahwa mengkonsumsi akar yakon secara oral tidak menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah. Disamping akar, daun dan batang yakon juga menunjukkan khasiat. Daun dan batang yakon mengandung protein dan senyawa fenolik seperti kafein, asam klorogenat, asam ferulat, dan flavonoid seperti kuersetin⁽⁴⁾. Sedangkan pada umbi terdapat fruktosa, glukosa, sukrosa, GF2 (trisakarida yang terdiri atas 1 molekul glukosa dan 2 molekul fruktosa), GF3, GF4, GF5, GF6, GF7, GF8, GF9, inulin, vitamin, mineral, dan serat⁽⁵⁾.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak etanol 96 % daun yakon memiliki aktivitas penghambat enzim α -glukosidase dengan persentase inhibisi sebesar 75,53 %, lebih tinggi dibandingkan aktivitas ekstrak n-heksan dan ekstrak etil asetat⁽⁶⁾. Besarnya potensi antidiabetes yang dimiliki daun yakon sebagai tanaman budidaya baru di Indonesia, maka pengembangan ilmu pengetahuan tentang tanaman yakon perlu ditingkatkan, terutama untuk eksplorasi kandungan senyawa kimianya. Sehingga tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa kimia sebagai penghambat enzim α -glukosidase dalam ekstrak etanol 96% daun yakon

BAHAN DAN METODE

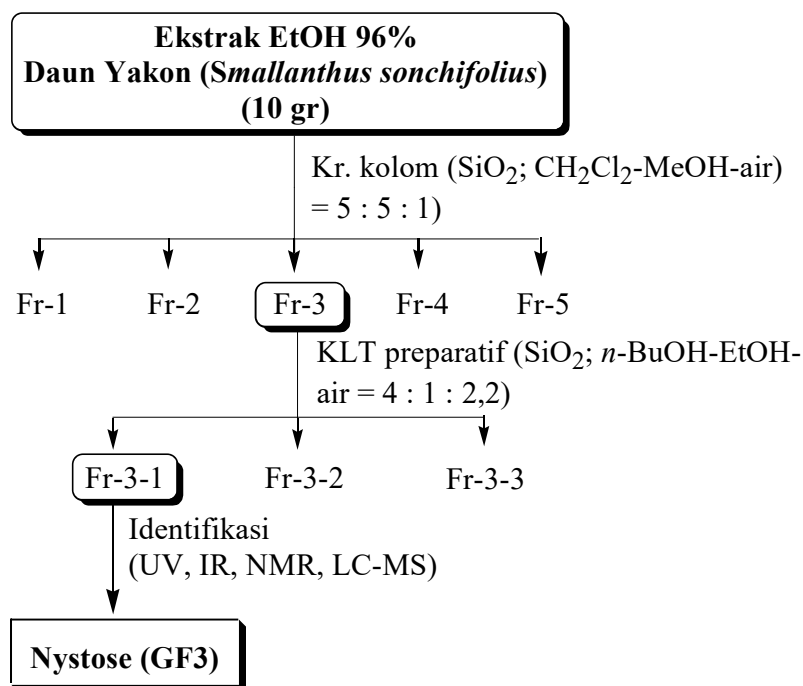
BAHAN. Ekstrak etanol 96% daun yakon (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp.& Endl.] H. Robinson), celite® 545 (Merck), silica gel 60 (Merck), metilen klorida (PT. Brataco), metanol teknis (Merck), etil asetat

(PT. Brataco), etanol (Merck), aquadest, enzim α -glukosidase p-nitrofenil- α -D-gluko piranosid (Sigma Aldrich), akarbose (PT. Pratapa Nirmala), dimetilsulfoksida, KH_2PO_4 , Na_2CO_3 , n-butanol, eter, HCl, anilina, kalium hidrogen ftalat, asetonitril, serum II sulfat, metanol pro analisis (Merck), Alat. Timbangan analitik (Precisa 340A), sonikator (Branson 1510), vortex (Thermolyne), kromatografi kolom, lampu UV 254 dan 366 nm, inkubator (Grant), hot plate, spektrofotometer ultraviolet-cahaya tampak (Hitachi U-3900H), spektrofotometer FT-IR (Bruker, Tensor37), LC/MS (QMicro QQA 842 1.0), spektrometer RMI (Agilent 500 MHz), lempeng silika gel GF₂₅₄, bejana kromatografi, indikator pH, dan seperangkat alat gelas

METODE. Isolasi Dan Pemurnian Senyawa Penghambat Enzim α -Glukosidase Dari Ekstrak Etanol 96% Daun Yakon⁽⁶⁾. Sebanyak 10 g ekstrak etanol 96% daun yakon difraksinasi dengan kromatografi kolom (SiO_2 ; diklorometan-metanol-air = 5:5:1), fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisis dengan KLT. Fraksi yang memiliki pola kromatogram sama digabungkan diperoleh 5 fraksi (Fr-1 ~ Fr-5), selanjutnya kelima fraksi tersebut diuji aktivitas penghambatan α -glukosidasenya. Fraksi dengan % penghambatan paling tinggi ditetapkan nilai IC_{50} , dimurnikan dengan KLT preparatif (SiO_2 ; n-butanol-etanol-air = 4:1:2,2) sampai diperoleh isolat murni. Isolat yang diperoleh diidentifikasi dengan metode spektrofotometri UV-Vis, FTIR, LCMS dan NMR. Skema kerja dapat dilihat pada Gambar 1.

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase⁽⁷⁾. Larutan stok enzim dibuat dengan melarutkan 1,0 mg enzim α -glukosidase dalam 1,0 mL 0,01M buffer fosfat (pH 7,0). Campuran reaktan terdiri dari 25 μL sampel dalam larutan DMSO 1%, 475 μL Buffer fosfat 0,1 M, dan 250 μL Subtrat PNP-G 0,5 mM. Larutan campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, setelah itu ditambahkan 250 μL enzim α -glukosidase 0,04 unit/mL dan diinkubasi selama 25 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan 1000 μL Na_2CO_3 0,2 M, dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Akarbose digunakan sebagai kontrol positif dengan perlakuan yang sama seperti sampel.

Identifikasi. Isolat murni diidentifikasi dengan pengambilan data spektra *spektroskopi Ultraviolet, Fourier Transform-Infra Red, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, dan ^1H - ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance.*



Gambar 1. Skema isolasi dan pemurnian senyawa kimia nystose dari daun yako

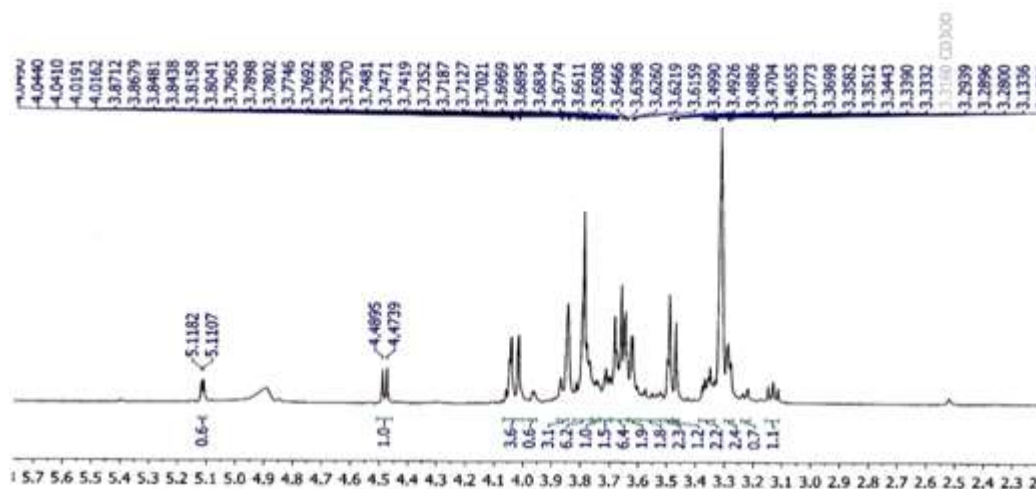
HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi senyawa kimia isolat murni Fr 3-1. Hasil fraksinasi ekstrak etanol 96% dengan kromatografi kolom diperoleh 5 fraksi (Fr-1~Fr 5) kemudian dimurnikan kembali dengan KLT preparatif memberikan Fr 3-1 yang berbentuk serbuk berwarna putih. Pada spektrum ultraviolet (UV) tidak memberikan adanya serapan maksimum pada daerah 200-400 nm, yang menunjukkan bahwa struktur kimia tidak mempunyai gugus kromofor.

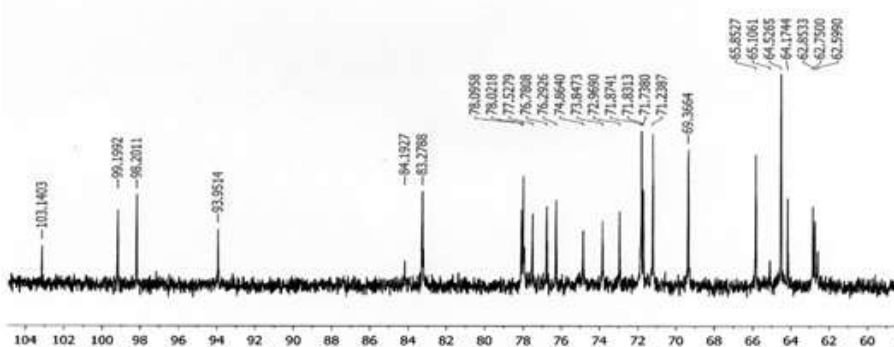
Hasil analisis spektra FT-IR isolat Fr 3-1 memberikan beberapa puncak yang dominan, yaitu pada *functional region* 3396,46 cm^{-1} yang merupakan gugus fungsi hidroksil. Adanya gugus hidroksil diperkuat dengan adanya serapan gugus C-O pada *fingerprint region* 1062,35 cm^{-1} . Puncak berikutnya pada *fingerprint region* 1456,00 cm^{-1} diinterpretasi sebagai gugus C-H (alkana). Pada spektra tidak terlihat adanya puncak spesifik pada *aromatic region*, sehingga isolat Fr 3-1 diperkirakan bukan senyawa aromatis. Hasil analisis isolat Fr 3-1 dengan *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry* (LC/MS) menunjukkan puncak kromatogram tertinggi pada waktu retensi 18,06 menit yang memberikan spektra massa pada m/z 717,38 ($M + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}$), sehingga bobot molekul senyawa dalam isolat Fr 3-1 adalah m/z 666 g/mol. Hasil kajian pustaka mengenai kandungan senyawa kimia dalam yacon diketahui ada satu senyawa kimia yang memiliki m/z sebesar 666, yaitu senyawa nystose/GF3 ($\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$)⁽⁶⁾.

Spektra RMI proton ($^1\text{H-NMR}$) untuk isolat Fr 3-1 menunjukkan adanya pergeseran kimia proton pada daerah medan magnet tinggi yaitu pada δH 3,13 - 5,12 ppm yang menunjukkan adanya proton yang berdekatan dengan atom oksigen (O) yang spesifik untuk gugus gula (Gambar 2). Spektra RMI karbon untuk isolat fr 3-1 (Gambar 3) juga menunjukkan adanya pergeseran kimia karbon untuk glukosa dan fruktosa yang teridentifikasi pada δH 93,95 ppm (glu); 62,85 ppm (fruk-1); 62,75 ppm (fruk-2) dan 64,17 ppm (fruk-3) untuk masing-masing pada atom C-1; C-1'; C-1''; C-1'''". Dengan membandingkan pergeseran kimia proton dan karbon isolate Fr 3-1 dengan pergeseran kimia proton dan karbon senyawa nystose berdasarkan penelitian terdahulu^(7,8) (Tabel 1 dan 2), maka senyawa kimia isolat Fr 3-1 dapat ditentukan sebagai fruktooligosakarida/FOS, yaitu nystose/GF3 dengan rumus kimia $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$ (Gambar 4).

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidasi Hasil Kromatografi Kolom. Hasil uji penghambatan enzim α -glukosidase terhadap kelompok fraksi (Fr-1 ~ Fr 5), Fr 3-1 dan akarbose dapat dilihat pada Tabel 3. Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase paling tinggi diperoleh pada Fr-3 sebesar 87,84 % ($\text{IC}_{50} = 33,62$ bpj), kemudian setelah pemurnian diperoleh aktivitas Fr 3-1 menurun menjadi 61,76 % ($\text{IC}_{50} = 59,48$ bpj). Hasil ini menunjukkan bahwa kemungkinan adanya pengaruh sinergisme dari senyawa kimia dalam daun yacon (*Smallanthus sonchifolius*)



Gambar 2. Spektra RMI proton untuk isolat Fr 3-1



Gambar 3. Spektra RMI karbon untuk isolat Fr 3-1

Tabel 1. Pergeseran kimia proton (δH) isolat fr 3-1 dibandingkan dengan nystose⁽¹¹⁾

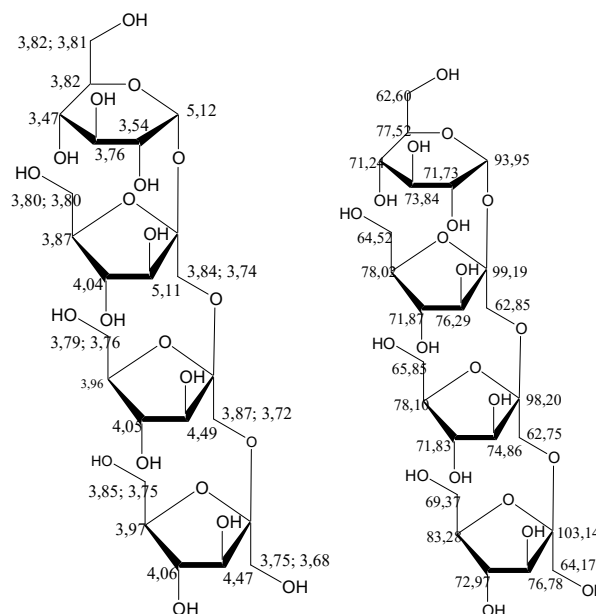
No.	δH Isolat F3-1				δH Nystose*)			
	Glu	Fru 1	Fru 2	Fru 3	Glu	Fru 1	Fru 2	Fru 3
H1	5,12	3,84	3,87	3,75	5,43	3,84	3,86	3,75
H1'	-	3,74	3,72	3,68	-	3,74	3,72	3,69
H2	3,54	-	-	-	3,54	-	-	-
H3	3,76	5,11	4,49	4,47	3,75	4,27	4,22	4,18
H4	3,47	4,04	4,05	4,06	3,47	4,04	4,07	4,10
H5	3,82	3,87	3,96	3,97	3,83	3,87	3,86	3,86
H6	3,82	3,80	3,79	3,85	3,81	3,81	3,82	3,84
H6'	3,81	3,80	3,76	3,75	3,81	3,79	3,75	3,75

Tabel 2. Pergeseran kimia karbon (δC) isolat Fr 3-1 dibandingkan dengan nystose

No.	δC Isolat x	δC Nystose (*)	Jenis Karbon
1	93,95	93,30	CH (d)
2	71,73	71,90	CH (t)
3	73,84	73,40	CH (t)
4	71,24	70,00	CH (t)
5	77,52	73,20	CH (q)
6	62,60	60,90	CH ₂ (d)
1'	62,85	61,70	CH ₂ (s)
2'	99,19	104,10	C (t)
3'	76,29	77,50	CH (d)
4'	71,87	75,20	CH (t)
5'	78,02	81,90	CH (q)
6'	64,52	62,90	CH ₂ (d)
1''	62,75	61,20	CH ₂ (s)
2''	98,20	104,50	C (t)
3''	74,86	77,50	CH (d)
4''	71,83	74,70	CH (t)
5''	78,10	82,00	CH (q)
6''	65,85	63,10	CH ₂ (d)
1'''	64,17	61,53	CH ₂ (s)
2'''	103,14	104,43	C (t)
3'''	76,78	77,89	CH (d)
4'''	72,97	75,83	CH (t)
5'''	83,28	82,30	CH (q)
6'''	69,37	63,46	CH ₂ (d)

Tabel 3. Hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase untuk hasil kromatografi kolom dan KLT preparatif

No	Sampel/ekstrak	Inhibisi (%), pada konsentrasi 100 bpj	IC ₅₀ (bpj)
1	Fr – 1	60,81	-*)
2	Fr – 2	44,60	-
3	Fr – 3	87,84	33,62
4	Fr – 4	70,27	-
5	Fr – 5	82,43	-
6	Fr 3-1	61,76	59,48
7	Akarbose	81,82 (pada 30 bpj)	21,36

**Gambar 4. Struktur kimia isolat Fr 3-1 (nystose)⁽¹¹⁾**

SIMPULAN

Senyawa kimia nystose telah diisolasi dan diidentifikasi dari ekstrak etanol 96% daun yakon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)H.Robinson yang berpotensi sebagai penghambat enzim α -glukosidase.

DAFTAR PUSTAKA

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 7th Edition. Brussels: International Diabetes Federation. <http://www.diabetesatlas.org>. 2015.
2. Depkes Republik Indonesia. Tahun 2030 prevalensi diabetes melitus di Indonesia mencapai 21,3 Juta orang. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2009; 1–2
3. Merlina M. Barabara/ Rani Nossar. Peluang Usaha: Budidaya Tanaman Obat Diabetes Mudah, Tanam Saja di Tempat Lembab. 2015. Diambil dari: <http://www.tribunnews.com/bisnis/2015/09/03/peluang-usaha-budidaya-tanaman-obat-diabetes-mudah-tanam-saja-di-tempat-lembab>. Diakses 21 Maret 2016.
4. Baroni S, Comar J F, Kimmelmeier F S, Mito M S, De Melo J O et al. . 2014. Beneficial effects of an hydroethanolic extract of smallanthus sonchifolius. *Int J Pharm Bio Sci* 2014 July ; 5 (3) : (P) 183 - 96
5. Lachman J, Fernández EC, Orsák M. 2003. Yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use – a review. ;2003(6):283–90.
6. Djamil R., Aziz Z., Virginia J., Penetapan dan identifikasi fraksi aktif penghambat enzim α -glukosidase dari ekstrak etanol 96% daun yakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Robinson). *Prosiding Seminar Nasional POKJANAS TOI ke-52 Tahun 2017 STIFAR Riau*. 92–6.
7. Djamil R, Winarti W, Simanjuntak P, Syamsudin.

- Standardization and α -glycosidase inhibition of extracts of *Vatica pauciflora* Blume stem barks and *Smallanthus sonchifolius* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014;3(4): 42-6.
8. Genta SB, Cabrera WM, Mercado MI, Grau A, Catalán CA, Sánchez SS. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius* : Constituents of the most active fractions. *Chemico-Biological Interactions* 2010;185:143–52.
 9. Grethel T. Choque Delgadoa, Rodolfo Thoméb, Dirce L. Gabrielb, Wirla M.S.C. Tamashirob, Glaucia M. Pastore. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. *Nutrition Research* 22 (2012) 884–92. Available online at www.sciencedirect.com. © 2012 Elsevier Inc.
 10. Juliani. Nancy D. Yuliana, Slamet Budijanto, C. Hanny Wijaya, Alfi Khatib. Senyawa Inhibitor α -Glukosidase Dan Antioksidan Dari Kumis Kucing Dengan Pendekatan Metabolomik Berbasis FTIR. *J. Teknol. dan Industri Pangan*. 2016. Vol. 27(1): 17-30
 11. Timmermans JW, De waard P, Tournuis H, Vliegthaart. NMR spectroscopy of Nystose, *Carbohydrated Res.* 1993, 243, p. 379 – 84.
 12. Bruyn AD and Loo JV. The Identification by ¹H- and ¹³C-n.m.r. Spectroscopy of Sucrose, 1-Kestose, and Neokestose in Mixture Present in Plant Extracts. *Carbohydrate Res.* 211 (1991) p. 131-6.
 13. Shiomi N and Onodera S. The ¹³C-NMRSpectra of Inulo-oligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.* (1990).54 (1), p 215-6.
 14. Joy M. Campbell et al. Selected Fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1F- β -Fructofuranosylnystose) Composition of Foods and Feeds. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3076–82.