

Produksi Dan Ekstraksi Inhibitor Alfa Glukosidase Dari Isolat Aktinomiset Jp-3

Sri Pujiyanto, Rejeki Siti Ferniah dan Sunarno

¹Jurusan Biologi FMIPA, Kampus MIPA Undip Tembalang Semarang Telp. (024) 70799494
Email:spujiyanto@hotmail.com

Abstract

Alpha-glucosidase inhibitors are compounds that can prevent the digestion of complex carbohydrates into glucose, so potentially used as a diabetes drug. This study aims to examine the production and extraction of alpha-glucosidase inhibitor compound from Isolate Aktinomiset JP-3 from the sea. The supernatant obtained from the culture of the JP-3 isolate was extracted using various solvents to obtain the active compound. The solvents used were chloroform, methanol, and ethyl acetate. An assay of inhibitor activity of the α -glucosidase using *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside substrate. The activity of the enzyme is measured based on the absorbance of *p*-nitrophenol produced from the breaking reaction of the substrate. The results showed that extraction of alpha-glucosidase inhibitor compound with ethyl acetate yielded extract with highest inhibitor activity.

Keywords: alpha-glucosidase inhibitors, actinomycetes, diabetes, extraction, fractionation

Abstrak

Inhibitor alfa glukosidase merupakan senyawa yang dapat mencegah digesti karbohidrat kompleks menjadi glukosa, sehingga berpotensi digunakan sebagai obat diabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji produksi dan ekstraksi senyawa inhibitor alfa glukosidase dari Isolat Aktinomiset JP-3 asal laut. Supernatan yang diperoleh dari kultur isolat JP-3 diekstraksi dengan menggunakan berbagai pelarut untuk mendapatkan senyawa aktif. Pelarut yang dicoba digunakan adalah: kloroform, metanol, dan etil asetat. Pengujian aktivitas inhibitor enzim α -glukosidase menggunakan substrat *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside. Aktivitas enzim diukur berdasarkan absorbansi *p*-nitrophenol yang dihasilkan dari reaksi pemecahan substrat tersebut. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstraksi senyawa inhibitor alfa glukosidase dengan etil asetat menghasilkan ekstrak dengan aktivitas inhibitor tertinggi.

Kata kunci: inhibitor alfa glukosidase, aktinomiset, diabetes, ekstraksi, fraksinasi

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) adalah penyebab kematian tertinggi di antara penyakit menahun lainnya. Menurut perkiraan, penderita diabetes di seluruh dunia pada tahun 2025 akan mencapai 300 juta orang. Jumlah penderita DM di Indonesia menempati peringkat ke 4 di dunia. Lebih dari 95% penderita diabetes merupakan penderita diabetes tipe 2 atau sering disebut *non-insulin dependent diabetes* (Bailey and Day, 2003). Pengobatan DM pada prinsipnya adalah menjaga agar kadar glukosa darah dapat dipertahankan pada kondisi normal (80-120 mg/dl).

Berbagai pilihan obat antidiabetes baik modern maupun tradisional telah dikenal di masyarakat. Salah satu cara kerja obat antidiabetes adalah menghambat pencernaan karbohidrat komplek (amilum) menjadi glukosa. sehingga asupan glukosa dari usus ke dalam darah dapat dikurangi. Senyawa aktif yang memiliki aktivitas seperti ini misalnya inhibitor alfa glukosidase. Senyawa inhibitor

alfa glukosidase dapat dihasilkan oleh mikroba. Sebagai contoh adalah acarbose, suatu inhibitor alfa glukosidase yang dihasilkan oleh *Actinoplanes* sp., suatu mikroba yang diisolasi dari daerah di Kenya. (McGown, 2006). Pengobatan DM secara tradisional biasanya dengan memanfaatkan berbagai jenis tanaman obat yang memiliki kandungan bahan aktif yang dapat menurunkan kadar gula darah. Berbagai tanaman obat tersebut misalnya: Brotowali, Sambiloto, Mengkudu, Delima, Mahkota Dewa, dan Pare (Subroto, 2006, Klein., *et. al.*, 2007, Bnouham, *et al.*, 2007)

Indonesia memiliki sumber daya alam lautan yang sangat luas. Di dalam lautan terdapat sumberdaya alam hayati termasuk mikroorganisme yang melimpah. Pencarian bahan obat yang berasal dari laut banyak dilakukan oleh para peneliti. Lautan merupakan sumber mikroba potensial penghasil berbagai senyawa bioaktif termasuk senyawa inhibitor alfa glukosidase. Salah satu kelompok mikroba penting adalah aktinomiset. Kajian aktinomiset

laut sebagai sumber obat diabetes masih sangat langka. Aktinomisetes telah lama diketahui sebagai sumber berbagai senyawa bioaktif yang telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti kesehatan. Dengan memperoleh isolat potensial dari lautan khususnya aktinomiset, kita akan dapat memproduksi senyawa inhibitor alfa glukosidase untuk obat diabetes secara mikrobiologis, dengan jumlah yang lebih banyak, dan kualitas yang lebih baik.

Bahan Dan Metode

Persiapan Kultur dan Media Fermentasi.

Isolat JP-3 ditumbuhkan pada media YSA selama 7 hari selanjutnya diinokulasikan ke dalam medium cair berisi 0.1% *soluble starch*, 0.5% pepton, dan 0.1% *yeast extract* (pH 7). Kultur diinkubasi selama 2 hari dengan kecepatan agitasi 120 putaran per menit pada temperatur ruang. Kultur ini selanjutnya digunakan sebagai starter.

Kurva Produksi senyawa inhibitor

Kurva produksi digunakan untuk mengetahui waktu optimum produksi enzim yang digunakan untuk memproduksi inhibitor alfa glukosidase dalam jumlah besar. Isolat terpilih ditumbuhkan dalam medium produksi yang berisi 0.1% *soluble starch*, 0.5% pepton, dan 0.1% *yeast extract* (pH 7). Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam media produksi dan diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 150 rpm dengan *rotary shaker*. Setiap 24 jam dilakukan pengambilan kultur sebanyak 2 ml dan disentrifus 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh diuji aktivitas penghambatannya terhadap enzim alfa glukosidase. Percobaan diakhiri jika produksi inhibitor alfa glukosidase telah mengalami penurunan.

Produksi Senyawa Inhibitor

Produksi inhibitor -glukosidase dilakukan dengan menginokulasikan sebanyak 1% kultur aktinomiset umur 2 hari ke dalam 100 mili liter media produksi, dan dilakukan inkubasi selama 6 hari dengan agitasi. Pemanenan kultur dilakukan dengan menyaring kultur untuk memisahkan supernatan dan biomassa.

Ekstraksi Senyawa Inhibitor.

Supernatan yang diperoleh dari kultur isolat JP-3 diekstraksi dengan menggunakan berbagai pelarut untuk mendapatkan senyawa aktif. Pelarut yang dicoba digunakan adalah: kloroform, metanol, dan etil asetat. Ekstraksi dilakukan dengan cara menambahkan pelarut ke dalam supernatan dengan perbandingan 1:1, selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirer* selama 2 jam dan dibiarkan selama 2 jam hingga membentuk fraksi air dan fraksi pelarut. Fraksi pelarut kemudian dipisahkan dan dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi pekat. Fraksi pekat yang diperoleh kemudian dikeringkan, dihitung bobotnya dan siap digunakan untuk tahap selanjutnya.

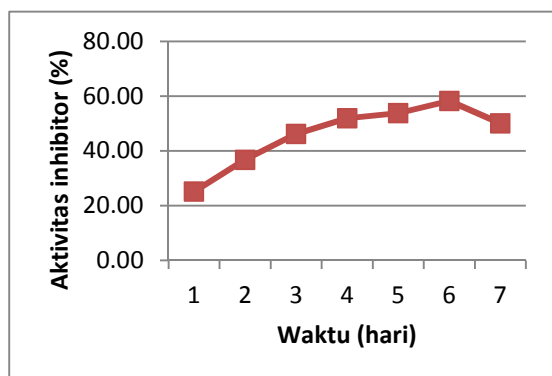
Pengujian Inhibitor -Glukosidase Ekstrak.

Aktivitas inhibitor -glukosidase diuji menurut Moon *et al.* (2011) dengan modifikasi. Uji penghambatan enzim dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna, yang diukur absorbansinya selama periode waktu tertentu. Enzim -glukosidase (Sigma) dilarutkan dalam 0.1 M buffer fosfat pH 7 dengan konsentrasi 0.2 unit/ml. Sebagai substrat digunakan *p-Nitrophenyl -D-glucopyranoside* (Sigma) 2.5 mM yang dilarutkan dalam 0.1 M buffer fosfat pH 7. Campuran reaksi terdiri dari 50 µl substrat, 50 µl 0.1 M buffer fosfat pH 7 dan 50 µl sampel. Setelah campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit, sebanyak 50 µl larutan enzim ditambahkan dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 800 µl larutan Na₂CO₃ 200 mM. Senyawa p-nitrofenol yang dihasilkan dari reaksi ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm. Sebagai pembanding digunakan larutan acarbose.

Hasil Dan Pembahasan

Produksi senyawa inhibitor alfa glukosidase dilakukan selama 7 hari inkubasi. Pengamatan produksi senyawa inhibitor dilakukan setiap hari, sehingga dapat diketahui kurva produksi senyawa inhibitor alfa glukosidase. Kurva produksi digunakan untuk mengetahui waktu optimum produksi enzim yang digunakan untuk memproduksi inhibitor alfa glukosidase dalam jumlah besar. Isolat JP-

3 ditumbuhkan dalam medium produksi menurut Chen *et. al.* (2004) yang mengandung 1% *soluble starch*, 0,5% pepton dan 0,1% *yeast ekstrak* (pH 7). Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam media produksi dan diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 120 rpm dengan *rotary shaker*. Setiap 24 jam dilakukan pengambilan kultur sebanyak 2 ml dan disentrifus 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh diuji aktivitas penghambatannya terhadap enzim alfa glukosidase.



Gambar 1. Produksi senyawa inhibitor pada beberapa hari inkubasi.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa senyawa inhibitor alfa glukosidase diproduksi mulai hari pertama inkubasi dan mencapai puncaknya pada hari ke 6. Pada hari ke-7 percobaan diakhiri karena produksi inhibitor alfa glukosidase telah menunjukkan gejala penurunan. (Gambar 1).

Ekstraksi senyawa inhibitor

Untuk dapat mengisolasi senyawa inhibitor alfa glukosidase diperlukan pelarut yang dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa inhibitor dari medium produksi.

Beberapa pelarut yang dapat digunakan untuk ekstraksi senyawa inhibitor alfa glukosidase diantaranya: etil asetat, etanol, (Sunil, et al. 2009; Kim et al. 2004). Pada penelitian ini dicoba 3 jenis pelarut untuk mengekstrak senyawa inhibitor alfa glukosidase dari medium cair, yaitu: kloroform, etil asetat, dan metanol.

Ekstraksi Senyawa Inhibitor -Glukosidase

Pelarut terbaik yang digunakan untuk ekstraksi senyawa inhibitor dari kultur JP-3 diperoleh dengan cara melakukan percobaan pendahuluan dengan menggunakan berbagai macam pelarut yaitu; kloroform, etil asetat, dan methanol. Hasil percobaan menunjukkan penggunaan etil asetat memberikan hasil terbaik diantara pelarut lainnya dengan rendemen ekstrak 0.03%, diikuti dengan pelarut dan kloroform. Etil asetat selanjutnya digunakan untuk keperluan ekstraksi senyawa inhibitor -glukosidase dari kultur aktinomiset JP-3.

Uji Aktivitas Inhibitor Hasil Ekstraksi dengan Berbagai Pelarut.

Ekstrak kultur JP-3 selanjutnya diuji aktivitas penghambatannya terhadap enzim -glukosidase. Pada pengujian ini enzim -glukosidase menghidrolisis substrat *p-nitrophenyl -D-glucoopyranoside* menjadi *p-nitrophenol* yang berwarna kuning dan glukosa. Aktivitas enzim diukur berdasarkan absorbansi *p-nitrophenol* yang berwarna kuning. Dengan adanya ekstrak kultur JP-3 yang berperan sebagai inhibitor -glukosidase maka *p-nitrophenol* yang dihasilkan akan berkurang yang ditandai oleh berkurangnya intensitas warna kuning.

Hasil pengujian menggunakan beberapa jenis pelarut untuk mengekstraksi senyawa inhibitor alfa glukosidase dari kultur cair disajikan pada Tabel 1, 2, dan 3.

Tabel 1. Aktivitas inhibitor alfa glukosidase menggunakan pelarut kloroform

Konsentrasi (ppm)	ulangan		S1	S0	S1-S0	Inhibisi(%)
	1	2				
1000	0,74	0,79	0,77	0,03	0,73	51,36
500	0,79	0,79	0,79	0,02	0,77	48,97
250	0,88	0,85	0,87	0,01	0,86	43,26
125	0,95	0,91	0,93	0,01	0,92	38,82
62,5	1,02	1,17	1,10	0,00	1,09	27,47

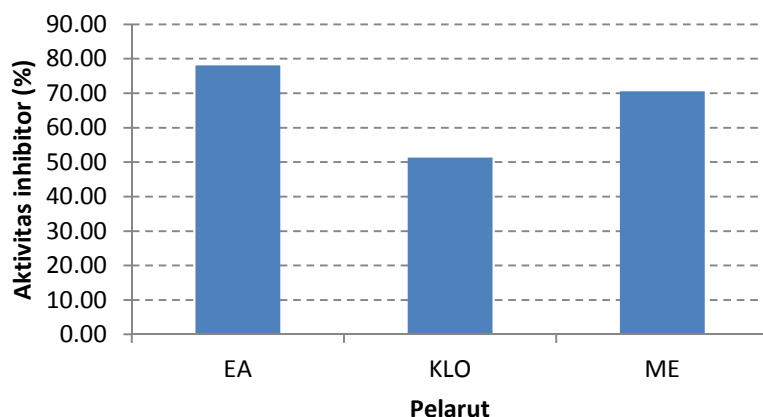
Tabel 2. Aktivitas inhibitor alfa glukosidase menggunakan pelarut etil asetat

Konsentrasi (ppm)	ulangan		S1	S0	S1-S0	Inhibisi(%)
	1	2				
1000	0,38	0,36	0,37	0,04	0,33	78,07
500	0,42	0,45	0,43	0,02	0,41	72,66
250	0,51	0,53	0,52	0,01	0,51	66,19
125	0,67	0,60	0,63	0,01	0,63	58,33
62,5	0,77	0,74	0,76	0,00	0,75	50,17

Tabel 3. Aktivitas inhibitor alfa glukosidase menggunakan pelarut methanol

Konsentrasi (ppm)	ulangan		S1	S0	S1-S0	Inhibisi(%)
	1	2				
1000	0,49	0,50	0,50	0,05	0,44	70,60
500	0,51	0,55	0,53	0,03	0,50	67,02
250	0,63	0,63	0,63	0,01	0,62	58,99
125	0,76	0,73	0,74	0,01	0,73	51,29
62,5	0,95	0,92	0,94	0,00	0,93	37,99

Perbandingan keefektifan keempat jenis pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa inhibitor alfa glukosidase dapat dilihat pada Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Perbandingan aktivitas inhibitor alfa glukosidase yang diisolasi menggunakan berbagai pelarut (Kloroform, EA-etil asetat, M-metanol).

Hasil pengujian tersebut dapat dilihat aktivitas inhibitor kultur JP-3 yang diekstrak dengan berbagai macam pelarut. Ekstrak etil asetat memberikan aktivitas penghambatan paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak lainnya. Pada konsentrasi 1000 µg/ml ekstrak etil asetat memberikan penghambatan sebesar 78,07%, diikuti ekstrak metanol, dan kloroform dengan nilai penghambatan sebesar 70,60%, 51,36%. Semakin rendah konsentrasi ekstrak menghasilkan penghambatan yang semakin rendah pula terhadap aktivitas enzim -glukosidase. Berdasarkan hasil uji pendahuluan bahwa penggunaan etil asetat menghasilkan rendemen ekstrak dengan aktivitas inhibitor -glukosidase tertinggi dibanding pelarut lainnya, serta senyawa etil asetat diketahui tidak bersifat toksik, maka untuk keperluan ekstraksi selanjutnya dipilih senyawa etil asetat.

Penggunaan etil asetat untuk mengekstrak senyawa bioaktif khususnya senyawa inhibitor -glukosidase telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Xu *et al.* (2005) melakukan ekstraksi tanaman *Glycyrrhiza uralensis* dengan beberapa jenis pelarut. Hasil pengujian ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dari tanaman tersebut menghasilkan hambatan terhadap -glukosidase tertinggi sebesar 83,2% dibanding dengan ekstrak dari pelarut yang lain. Wu *et al.* (2009) juga melaporkan telah mengekstrak tanaman *Crossostephium chinense* dengan etil asetat untuk mendapatkan senyawa inhibitor -glukosidase. Hasil fraksinasi dari ekstrak etil asetat tersebut akhirnya diperoleh senyawa *scopoletin, tanacetin, hispidulin, quercetagenin,*

celagin yang menunjukkan aktivitas penghambatan yang kuat terhadap enzim -glukosidase secara *in vitro*.

Kesimpulan

Isolat aktinomiset JP-3 merupakan isolat potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil inhibitor -glukosidase karena memiliki kemampuan inhibisi yang tinggi terhadap enzim -glukosidase. Senyawa inhibitor -glukosidase yang dihasilkan isolat ini dapat diproduksi menggunakan medium cair dan memiliki kemampuan penghambatan terhadap enzim alfa glukosidase tertinggi pada hari ke 6 setelah inkubasi. Senyawa inhibitor alfa glukosidase isolat ini dapat diekstrak menggunakan pelarut etil asetat. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstraksi senyawa inhibitor alfa glukosidase dengan etil asetat menghasilkan ekstrak dengan aktivitas inhibitor tertinggi. Ekstrak etil asetat memberikan aktivitas penghambatan paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak lainnya. Pada konsentrasi 1000 µg/ml ekstrak etil asetat memberikan penghambatan sebesar 78,07%,

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Ditlitabmas Dikti yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

Aguiar, F.J., T. B. Dorantes, A. G. Leon, L.V.Carrillo, J. L. Saenz and R. R. Ramos. 2003. Study of the anti-hyperglycemic effect of anti-diabetic

- plants in rabbits with impaired glucose tolerance. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 46: 148-152.
- Akhtar, M.A., I. I. Wahed, M. R. Islam. S. M. Shaheen, M. A. Islam, M. S. Amran and M. Ahmed. 2007. Comparison of long-term antihyperglycemic and hypolipidemic effects between *Coccinia cordifolia* (Linn.) and *Catharanthus roseus* (Linn.) in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Medicine and Medical Sciences.* 2: 29-34.
- Attele, A. S., Y. P. Zhou, J. T. Xie, J. A. Wu, L. Zhang, L. Dey, W. Pugh, P.A. Rue, K. S. Polonsky, and C. Yuan. 2002. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes.* 51: 1851-1859.
- Bailey, C.J. and C. Day. 2003. Antidiabetic drugs. *Br J Cardiol.* 10: 128-36.
- Beltrame1, F.M., G. L. Pessini, D. L. Doro, B. P. Dias, R. B. Bazotte and D. A. Garcia Cortez. 2002. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 45: 21 - 25.
- Bnouham, M., A.Ziyyat, H. Mekhfi, A.Tahri, 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity – a review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int J Diabetes and Metabolism.* 14: 1-25.
- Caruso, M. A.L. Colombo, L. Fedeli, A. Pavesi, S. Quaroni, M. Saracchi, G. Ventrella. 2000. Isolation of endophytic fungi and aktinomisetes taxane producers. *Annals of Microbiology.* 50: 3-13.
- Castillo, U. F., G. A. Strobel, E. J.Ford, W. M. Hess, H. Porter, J. B. Jensen, H. Albert, R. Robison, M. A. Condrón, D. B. Teplow, D. Stevens and D. Yaver. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *kennedia nigricans*. *microbiology.* 148: 2675-2685.
- Chen, H., X. Yan, W. Lin, L. Zheng and W. Zhang. 2004. A new method for screening alfa glucosidase inhibitors and application to marine microorganisms. *Pharmaceutical Biology.* 42: 416-421.
- Chin, Y.W., M.J. Balunas ,H. B. Chai, and A. D. Kinghorn. 2006. Drug discovery from natural sources. *The Aaps Journal.* 8 (2): 239-252.
- Clark, C.M., 1998. Oral therapy in type 2 diabetes: pharmacological properties and clinical use of currently available agents. *Diabetes Spectrum.* 11: 211-221.
- Djomoni, P.D., L. Tedong, E. A. Asongalem, T. Dimo, S. C. Sokeng, P. Kamtchouing. 2006. Hypoglycaemic and antidiabetic effect of root extracts of *Ceiba pentandra* in normal and diabetic rats . *Afr. J. Trad. CAM.* 3: 129 – 136.
- Ebong, P. E., I. J. Atangwho, E. U. Eyong and G. E. Egbung. 2008. The antidiabetic efficacy of combined extracts from two continental plants: *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) and *Vernonia amygdalina* (Del.) (African Bitter Leaf). *American Journal of Biochem. and Biotech.* 4 (3): 239-244.
- Ezra, D., U.F. Castillo,G. A. Strobel, W. M. Hess, H. Porter, J. B. Jensen, M. A. M. Condrón, D. B. Teplow, J. Sears, M.Maranta, M. Hunter, B. Weber and D. Yaver. 2004. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a Verticillate *Streptomyces* Sp. (Msu-2110) endophytic on *Monstera* Sp. *Microbiology.*150: 785-793.
- Garg, M., V. J. Dhar and A. N. Kalia. 2008. Antidiabetic and antioxidant potential of *Phyllanthus fraternus* in alloxan induced diabetic animals. *Phcog Mag.* 4: 138-143.
- Gholamhoseinian, A., H. Fallah, F. Sharifi, M. Mirtajaddini. 2008. The inhibitory effect of some Iranian plants extract on the alfa glucosidase. *Iranian Journal of Basic science.* 11: 1-9.
- Gray, A. M. and P. R. Flatt. 1999. Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). *Journal of Endocrinology.* 160: 409-414.
- Gupta, R. K., A. N. Kesari, G. Watal. 2005. Antidiabetic effect of *Annona squamosa* (L.). *V. Curr. Sci.* 1244.
- Hemker, M. A.Stratmann, K.Goeke, W. Schro'Der, J. Lenz, W. Piepersberg, and H. Pape. 2001. Identification, cloning, expression, and

- characterization of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* Sp. strain Se50. *Journal of Bacteriology*. 183: 4484–4492.
- Higgs, R. E. J. A. Zahn, J.D. Gygi, and M. D. Hilton. 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Appl. And Environ. Microbiol.* 67: 371-376.
- Huerta, V., K. Mihalik, V. Maitin, S. H. Crixell, and D.A. Vatter. 2007. Effect of Central/South American medicinal plants on energy harvesting ability of the mammalian GI tract. *Journal of Medicinal Plants Research*. 1(2): 038-049.
- Igarashi, Y., S. Miura, T. Fujita, T. Furumai. 2006. Cpteroctidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygrosopicus*. *J. Antibiot.* 59: 193–195.
- Jeyacandran, R. and A. Mahesh. 2007. Enumeration of antidiabetic herbal flora of Tamil Nadu. *Research J. of Medicinal Plant*. 1(4): 144-148.
- Kim, J. S. J. B. Ju, C.W. Choi and S.C. Kim. 2006. Hypoglycemic and antihyperlipidemic effect of four Korean medicinal plants in alloxan induced diabetic rats. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2 (4): 154-160.
- Kim, S.D. and H.J. Nho. 2004. Isolation and Characterization of alfa glukosidase inhibitor from fungus *Ganoderma lucidum*. *J. of Microbiology*. 42: 223-227.
- Klein, G., Jaekyung Kim, Klaus Himmeldirk, Yanyan Cao and Xiaozhuo Chen. 2007. Antidiabetes and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*. *eCAM*. 4: 401–407.
- Kumar, A., R. Ilavarasan, T. Jayachandran, M. Decaraman, P. Aravindan, N. Padmanabhan and M. R. V. Krishan. 2008. Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 29: 246-249.
- Lin, W. L. Li, H. Fu, I. Sattler, X. Huang, S. Grabley. 2005. New cyclopentenone derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the mangrove plant. *Aegiceras Comiculatum*. *J. Antibiot.* 58: 594–598.
- Mahop, M. P. and M. Mayet. 2007. En route to biopiracy? Ethnobotanical research on anti medicinal plants in the Eastern Cape Province, South Africa. *African Journal of Biotechnology*. 6: 2945-2952.
- McGown, J. 2006. *Diabetes Drug Produced by a Microbe in Out of Africa: Mysteries of Access and Benefit Sharing*. Beth Burrows (ed). The Edmonds Institute. Washington. USA.
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2:113 – 126.
- Ramkumar, K. M., P. Rajaguru and R. Ananthan. 2007. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of an antidiabetic plant *Gymnema montanum*. *Advances in Biological Research*. 1: 67-71.
- Strobel, G.A. and B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. And Molecular Biology Rev.*, 67: 491–502.
- _____. 2002. Microbial gifts from rain forests. *Can. J. Plant Pathol.* 24: 14–20.
- Subramanian, R. M. Z. Asmawi dan A. Sadikun. 2008. Effect of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* nees on a combination of fat-fed diet and low dose streptozotocin induced chronic insulin resistance in rats. *Diabetologia Croatica*. 37: 13-22.
- Subroto, A. 2006. *Ramuan Herbal Untuk Diabetes Melitus*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Susheela, T., P. Balaravi, J. Theophilus, T. N. Reddy and P. U. M. Redd. 2008. Evaluation of hypoglycaemic an antidiabetic effect of *Melia dubia* CAV fruits in mice. *Current Science*. 94: 1191-1195.
- Taechowisan, T., C. Lu, y. Shen. And S. Lumyong. 2007. Antitumor activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMU Ac130. *J. Cancer Res Ther*. 3: 86-91.

- Tan, R.X., and W. X. Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448–459.
- Topliss, J.G. A. M. Clark, E. Ernst, C. D. Hufford, G. A. R. Johnston, J. M. Rimoldi, And B. J. Weimann. 2002. Natural and synthetic substances related to human health. *Pure Appl. Chem.* 74:1957-1985.
- WHO, 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complication. Dept. of noncommunicable and disease surveillance. Geneva.
- Xiancui, L., N. Rongli, F. Xiao, H. Lijun, Z. Lixin, 2005. Macroalage as a source of alfa-glukosidase inhibitors. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology.* 23: 354-356.
- Yulinah, E., Sukrasno dan M. A. Fitri. 2001. Aktivitas antidiabetika ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees (Acanthaceae). *JMS.* 6: 13-20.