

## UJI *IN VITRO* DAN *IN SILICO* SENYAWA 5,7,2',5'-TETRAHYDROXY FLAVAN-3-OL TERHADAP ENZIM ALPHA GLUCOSIDASE

Frengki<sup>1,2\*</sup>, Deddi Prima<sup>3</sup>, Fatma Sri Wahyuni<sup>3</sup>, Daan Khambri<sup>1</sup>, Henny Vanda<sup>2</sup>, Noni Zakiah<sup>4</sup>, Jamilah Abbas<sup>5</sup>, Berna Elya<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas-Padang

<sup>2</sup>FKH Universitas Syiah Kuala-Banda Aceh

<sup>3</sup>Fakultas Farmasi Universitas Andalas

<sup>4</sup>Akademi Farmasi-Aceh Besar

<sup>5</sup>LIPI-Kimia Puspitek-Serpong

<sup>6</sup>Fakultas Farmasi Universitas Indonesia

\*[farhanayash@gmail.com](mailto:farhanayash@gmail.com), [frengki\\_fkh@unsyiah.ac.id](mailto:frengki_fkh@unsyiah.ac.id)

### ABSTRACT

Several of *Calophyllum* genus have been searched and proven as medicinal plants and *Calophyllum macrophyllum* is one of its genus. We have been isolated a compound from ethyl acetate fraction of the stem-bark. The compound was flavan-3-ol (5,7,2',5'-tetrahydroxy flavan-3-ol). This research aimed to determine inhibition antidiabetic activity and affinity of its compound on  $\alpha$ -glucosidase enzyme. *In vitro* antidiabetic effect shown by  $IC_{50}$  9.10  $\mu$ g/ml and docking by Arguslab 4.01 shown by  $\Delta G$  -10,24 kkal/mol as *in silico* test. The inhibition activity of flavan-3-ol against the  $\alpha$ -glucosidase enzyme that is very strong shows its promising potential as a candidate for antidiabetic drugs.

**Keywords:** Flavan-3-ol, alpha glukosidase, *in vitro*, *in silico*

### I. PENDAHULUAN

Kepercayaan masyarakat terhadap manfaat dan kegunaan tumbuhan dalam pengobatan dan pemeliharaan kesehatan semakin meningkat (Christine, 1985). Salah satu genus tumbuhan tingkat tinggi Indonesia yang mempunyai potensi sebagai sumber senyawa kimia bioaktif adalah *Calophyllum* dari suku Guttiferae/Clusiaceae. Beberapa wilayah seperti Sumatera, Jawa Barat, Jawa Tengah, Kalimantan dan Papua merupakan tempat penyebarannya. Selain di Indonesia tumbuhan genus *Calophyllum* ini juga ditemukan di Vietnam, Kamboja, Thailand, Singapura, Australia bagian selatan, pulau Andaman, dan Srilangka dengan 200 jenis telah teridentifikasi (Soerjanegara. 1994; Backer. 1963; Heyne. 1987).

Beberapa jenis *Calophyllum* diantaranya adalah *C. macrophyllum* Scheff, *C. teysmannii*, *C. inophyllum*, *C. apetalum*, *C. moonii*, *C. lankaensis*, *C. caledonicum*, *C. cordata-oblongum*, *C. verticillatum*, *C. calaba*, *C. brasiliense*, *C. blancoi*, *C. australianum* FvM, *C. nervosum*, *C. insularum* dan *C. gracilipes*.

Kumarin, santon, flavonoid, biflavonoid, triterpenoid, asam-asam organik dan senyawa benzofenon merupakan senyawa aktif yang berhasil

diisolasi dari genus *Calophyllum* (Cao S-G, *et al.* 1998; Yimdjoo, *et al.* 2004; Taher, *et al.* 2005; Kirk, *et al.* 1994).

Senyawa santon ((+) klanolida A) dari *C. lanigerum* mempunyai aktivitas sebagai antiplatelet, antibakteri, antikembang dan anti-HIV (Dharmaratne, *et al.* 1999, Linuma, *et al.* 1996). Senyawa kumarin (brasimarin A, B, dan C, 4-fenilkumarin dari kulit batang *C. brasiliense*) bersifat antitumor (Ito, T. 2003). Senyawa poliisoprenil keton (enervosanon) dari kulit batang *C. enervosum* dilaporkan aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* (ATCC 6633), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* dan *S. aureus* (ATCC 6538) (Taher, *et al.* 2005). Senyawa golongan triterpena friedelin dan asam protokatekuat dan asam shikimat dari daun *C. brasiliense* aktif sebagai anti-HIV (Reyes-Chilpa, *et al.* 2004). Golongan flavonoid juga ditemukan dari *C. calaba* berupa senyawa biflavonoid amentoflavon dan merelloflavon, dari *C. inophyllum* ditemukan senyawa katekin (Linuma, *et al.* 1994).

Peneliti juga berhasil mengisolasi senyawa flavanal (5,7,2',5'-tetrahydroxy flavan-3-ol) dari kulit batang tumbuhan *C. macrophyllum* Scheff. Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan katekin. Diduga

gugus -OH posisi para pada cincin B senyawa flavan-3 ol ini berperan meningkatkan aktivitas antioksidan lebih kuat dibanding kuersetin yang memiliki rantai samping gugus -OH posisi meta (Frengki, 2011)

Senyawa ini diduga juga aktif sebagai obat antidiabetes sebagaimana kuersetin sesama golongan flavonoid yang memiliki gugus fenol. Sutedja *et al.*, (2003) melaporkan semua bahan alam yang mengandung senyawa dengan gugus fenol berkhasiat sebagai obat antidiabetes. Oleh karena itulah peneliti tertarik melakukan uji antidiabetes secara *in vitro* melalui mekanisme inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase. Lebih jauh hasil uji *in vitro* ini akan dikonfirmasi secara *in silico* melalui metode *docking molecular*.

## II. METODE PENELITIAN

### A. Bahan dan Alat

Enzim  $\alpha$ -glukosidase (*Saccharoyces sp.*, Oriental Yeast Co., Ltd., Jepang), bovine serum albumin (Wako pure Chemical Industries, Ltd, Jepang.), koji, paranitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranos (PNP) (Wako pure Chemical Industries, Ltd., Jepang), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck cat. 1.09940, Jerman).

Peralatan uji *in vitro* meliputi pipet mikro (Eppendorf), lemari pendingin, wadah inkubator, tube berbagai ukuran (pyrex) dan rak tabung reaksi. Sedangkan perlengkapan uji *in silico* yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa PC dengan *Random Access Memory* sebesar 2 GB. Perangkat lunak yang digunakan berupa *Pymol*, *UCSF Chimera*, *Arguslab*, *VegaZZ*, dan *Chemdraw 2006*.

### B. Prosedur Penelitian

#### 1. Uji Antidiabetes terhadap enzim $\alpha$ -glukosidase (Dewi *et al.*, 2007)

Larutan sampel dalam 5  $\mu$ L DMSO ditambah dengan 495  $\mu$ L dapar fosfat 0,1M dan 250  $\mu$ L 0,02M p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranos (PNP), sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250  $\mu$ L larutan enzim  $\alpha$ -glukosidase, diinkubasi lagi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000  $\mu$ L 0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada standar kuersetin, sedangkan blanko sampel tanpa penambahan larutan enzim diganti dengan penambahan 250  $\mu$ L dapar fosfat pH 7, demikian juga blanko (tanpa sampel) hanya digunakan larutan DMSO.

Nilai LC<sub>50</sub> ditentukan melalui persamaan regresi dengan bantuan program komputer sederhana *Mic. Excel*.

#### 2. Uji *in silico* terhadap enzim $\alpha$ -glukosidase (Ragno *et al.* 2009)

Struktur 3 dimensi ligan dibuat melalui program *Chemdraw 2006*, struktur tersebut disimpan dalam format *pdb*. Kemudian dilakukan minimisasi energi sebanyak 1000x, dan konformasi geometris, kedua proses tersebut menggunakan piranti lunak *Vega ZZ*. Hasil pencarian konformasi terbaik dipilih sebagai struktur yang akan ditambahkan pada makromolekul.

Makromolekul reseptor diunduh dari situs penyedia PDB makromolekul <http://www.rcsb.org/pdb>. Struktur makromolekul dibersihkan dari ligan menggunakan *software UCSF Chimera*. Kemudian molekul air dibuang, sebaliknya ditambahkan atom hidrogen dan muatan parsial *Gasteiger Charges* dan diberi *forcefield* *Autodock*. Minimisasi dan pencarian konformasi dilakukan sebanyak 1000 langkah. Proses tersebut menggunakan piranti lunak *Vega ZZ*. Data makromolekul disimpan dalam format *pdb*.

Penambatan molekul dilakukan menggunakan program *Arguslab 4.01*. Struktur makromolekul dan ligan yang akan ditambahkan telah dioptimasi secara terpisah disimpan dalam satu folder yang sama. Hasil penambatan disimpan dalam format *pdb*.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil Penelitian

#### Uji Antidiabetes dengan Mekanisme Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase secara *in vitro*

Uji aktivitas antidiabetes dengan mekanisme inhibisi  $\alpha$ -glukosidase terhadap standar kuersetin dan senyawa 5, 7, 2', 5' tetrahidroksi flavan-3-ol diperoleh nilai IC<sub>50</sub> masing-masingnya sebesar 17,5  $\mu$ g/mL dan 9,10  $\mu$ g/mL.

**Tabel 1.** Data uji aktifitas antidiabetes standar dan isolat uji

Sampel	Kons	%Inh	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
Blanko			
Kuersetin	25	72.46	17.5
	12.5	58.0	
	6.25	37.29	
	3.125	25.24	
Flavan-3-ol	25	83.37	9.10
	12.5	59.43	
	6.25	30.52	
	3.125	21.26	

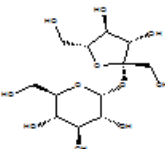
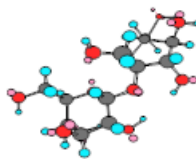
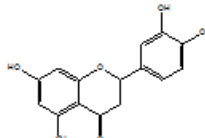
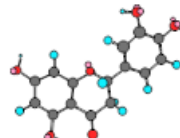
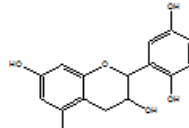
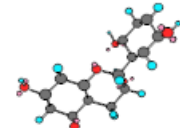
**Uji Antidiabetes dengan Mekanisme Inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase secara *in silico***

Proses uji *in silico* diawali proses validasi metode, optimasi ligan dan reseptor dan terakhir baru dilakukan *docking* ligan-reseptor. Ligan dalam hal ini adalah sukrosa, kuersetin dan flavan-3-ol. Selengkapnya validasi *native* ligan, profil struktur 2D dan 3D, serta hasil *docking* masing-masing ligan tersebut ditunjukkan pada **tabel 2, 3 dan 4** serta **gambar 1, 2 dan 3** dibawah ini.

**Tabel 2.** Validasi *Native Ligand* 1328 ACR (Substrat  $\alpha$ -Glukosidase)

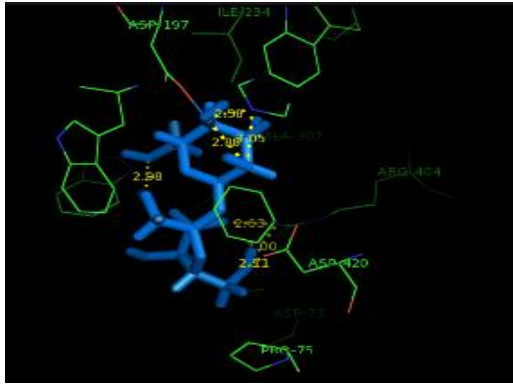
Parameter Validasi		RSMD
Calculate Size		2,374 Å
X	21,243720	
Y	20,981007	
Z	17,354000	0,4

**Tabel 3.** Struktur 2D dan 3D *ligand* (Sukrosa, Kuersetin dan Flavan-3-ol)

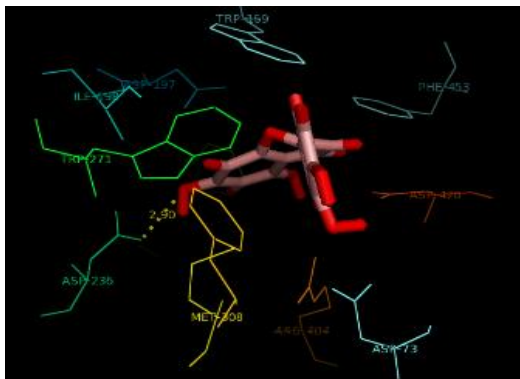
No	Nama Ligan	Struktur 2 Dimensi	Struktur 3 Dimensi (Hasil Optimasi)
1	Sukrosa (Agonis)		
2	Kuersetin (Standar)		
3	Flavan-3-ol		

**Tabel 4.** Hasil *docking* (kkal/mol) dan ikatan hidrogen antara ligan dengan reseptor

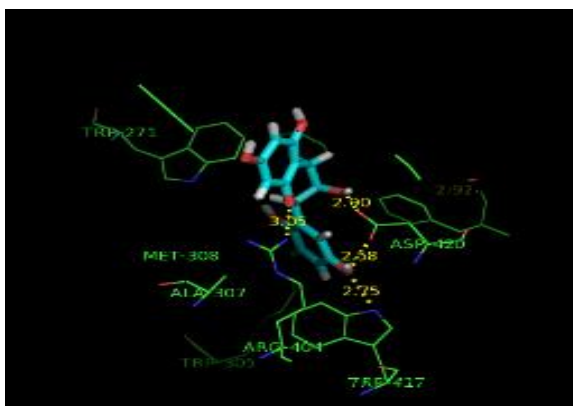
Senyawa Uji	Jumah Ikatan Hidrogen	Jarak Ikatan (Å)	Asam Amino Yang Berikatan	Gugus Senyawa Uji yang Berikatan
Sukrosa	2	2,63	Arg 404	OH
		3,00		OH
	2	2,98	His 478	OH
		3,05		OH
Kuersetin	1	2,51	Asp 420	OH
	1	2,88	Asp 197	OH
	1	2,90	Asp 236	OH
Flavan-3-ol	2	2,00	Asp 420	OH
		2,58		OH
	1	2,75	Trp 417	OH
	1	3,05	Arg 404	-O-



**Gambar 1.** Hasil visualisasi PyMol hasil *docking* enzim alpha glucosidase dengan sucrose (Arg 404 memiliki 2 ikatan hydrogen dengan sukrosa, His 478 2 ikatan, sedangkan ASP 420 1 ikatan dan ASP 197 masing-masing dengan ikatan hydrogen)



**Gambar 2.** Hasil visualisasi PyMol hasil *docking* enzim alpha glucosidase dengan kuersetin (ASP 236 memiliki 1 ikatan hydrogen dengan kuersetin)



**Gambar 3.** Hasil visualisasi PyMol hasil *docking* enzim alpha glucosidase dengan Flavan-3-ol (ASP 420 memiliki 2 ikatan hydrogen, ARG 404 1 ikatan hydrogen dan TRP 417 memiliki 1 ikatan hydrogen)

## B. Pembahasan

### Uji Antidiabetes dengan Mekanisme Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase secara *in vitro*

Uji antidiabetes dilakukan secara *in vitro* menggunakan *p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopironosa* sebagai substrat. Enzim  $\alpha$ -glukosidase akan menghidrolisis substrat *p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopironosa* menjadi *p-nitrofenol* yang berwarna kuning. Aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase diukur berdasarkan absorbansi *p-nitrofenol* (Basuki, *et al.* 2002 & Dewi, *et al.* 2007).

Senyawa flavan-3-ol memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase menghidrolisis substrat *p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopironosa* menjadi *p-nitrofenol*. Daya hambatnya malah lebih baik dibandingkan standar kuersetin. Hal ini diduga perbedaan pola hidroksilasi pada cincin benzena (B) dimana flavan-3-ol memiliki ikatan hidroksi pada posisi *para*, sedangkan kuersetin posisi *ortho*. Hasil ini senada dengan laporan Frengki *et al.* (2011).

### Uji Antidiabetes dengan Mekanisme Inhibisi $\alpha$ -Glukosidase secara *in silico*

Langkah awal dilakukan berupa validasi program ArgusLab untuk mendapat metode yang reliabel. Validasi dilakukan dengan menggunakan pilihan *docking engine* ArgusDock pada rentang kalkulasi sumbu x 21,243720, sumbu y 20,981007 dan sumbu z 17,354000. Metode ini memberikan nilai RMSD 2,374 Å ( $\leq 2,5$  Å), sehingga metode ini dapat digunakan untuk melakukan proses *docking*. Proses validasi ini dilakukan terhadap salah satu substrat reseptor 3POC ( $\alpha$ -glukosidase pada usus manusia yang berasal dari mikroorganisme [Ruminococcus obeum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328)) yang secara eksperimen telah dikenali dan diberi nama 1328 ACR.

Reseptor diketahui memiliki *binding site* pada residu asam amino Arg 404, Asp 197, Asp 420 dan His 478 dengan kode [A5ZY13](http://www.uniprot.org) ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Berat molekul reseptor ini adalah 156840.93 dengan jumlah asam amino penyusunnya 666. Reseptor ini telah mengalami mutasi pada residu asam amino ke 307 dari Asp menjadi Ala.

*Docking* dilakukan menggunakan aplikasi ArgusLab 4.01. Dari empat tempat penambatan tersebut ternyata Arg 404 menunjukkan energi bebas Gibbs ( $-\Delta G$  (kkal/mol)) yang paling rendah, sehingga Arg 404 juga menjadi target penambatan. Semua ligan menunjukkan nilai energi bebas Gibbs negatif. Artinya ketiga senyawa tersebut mampu berikatan dengan reseptor dengan melepaskan sejumlah energi. Masing-masing memberikan nilai energi bebas Gibbs -10,24 (flavan-3-ol), -7,02 (sukrosa) dan -8,95 (kuersetin) kkal/mol.

Semakin negatif nilai energi bebas Gibbs maka akan semakin stabil senyawa tersebut berikatan dengan reseptornya. Dalam hal ini flavan-3-ol memiliki afinitas yang lebih baik dibanding sukrosa. Hal ini menunjukkan bahwa flavan-3-ol mampu menghambat ikatan gula (sukrose) dengan reseptornya. Demikian juga dengan kuersetin yang memiliki afinitas lebih kuat dibandingkan sukrosa.

Yang menarik dari hasil *in silico* ini adalah flavan-3-ol bukan hanya memiliki afinitas lebih kuat dibandingkan sukrosa, juga menunjukkan kestabilan kompleks lebih baik dibandingkan kuersetin sebagai kontrol yang memang telah terbukti aktif sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -Glukosidase.

Daya hambat flavan-3-ol dan kontrol kuersetin terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase melalui uji *in vitro* berbanding lurus dengan hasil *in silico*. Kedua metode ini saling melengkapi dalam rangka penelusuran efek suatu senyawa aktif farmakologis yang telah dibuktikan melalui penelitian ini.

#### IV. KESIMPULAN

Aktivitas inhibisi flavan-3-ol terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase yang sangat kuat menunjukkan potensinya yang menjanjikan sebagai kandidat obat antidiabetes.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Backer and Bakhuizen Van den Brink. (1963). *Flora of Java, Vol I*, N. V. P. Noordhoof of-Goningen-The Netherlands
- Basuki, T., et al. (2002). *Evaluasi aktivitas daya hambat enzim  $\alpha$ -glukosidase dari ekstrak kulit batang, daun, bunga dan buah kemuning [Murraya Paniculata (L.) Jack.]*. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Surabaya
- Cao, S-G., et al. (1998). Minor Coumarins from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide* and Synthesis of Cytotoxic Calanone Derivatives. *Helv. C. Acta.* **81**: Issue 5-8. 1404-1415
- Christine. (1985). *Penggunaan Tanaman Obat*. Jakarta: Penerbit Buletin Farmakon
- Dewi, R.T., et al. (2007). Inhibitory effect of Koji *Aspergillus terreus* on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science*, **18**, 3131-3135.
- Dharmaratne, Wijesinghe, Thevanasem. (1999). Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum spesies*, against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *Journal of Ethnopharmacology*, **66**. 339-342
- Frengki. 2011. Isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat kulit batang tumbuhan *Calophyllum* Scheff. Tesis. Departemen Farmasi-UI. Depok
- Heyne. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia*, Jilid III. Jakarta: Cetakan ke 1, Badan Litbang Kehutanan Jakarta. Departemen Kehutanan. Gatot Subroto. 1374-1380
- Iinuma, et al. (1994). Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*. **35**. 527-532.
- Iinuma, M., et al. (1996). Six xanthenes from *Calophyllum austroindicum*. *Phytochemistry*. **43**. 681-685
- Ito, T., et al. (2003). Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. Structure of Three New Coumarins and Cancer chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. *Journal of Natural Product*, **66**. 368-371.
- Kirk, et al. (1999). Calanone, a novel coumarin from *Calophyllum teysmannii*. *Tetrahedron Letter*. Vol **35**. No 32, 5821-5824
- Ragno, R., et al. (2009) "Molecular Docking Tutorial". <http://www.mmvsl.farm.unipi.it>
- Ratnayake, et al. (1986). Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka. *Phytochemistry*. Vol **25**. 425-42
- Rayes-Chilpa, et al. (2004). Cytotoxic effect of mamea type coumarins from *Calophyllum brasillense*. *Life Science*. Vol **75**. 1635-1647
- Soerjanegara and Lemmens, R.H.M.J. (1994). Plant Resources of Sout-East Asia 5. *Prosea*, Bogor: Pudoc. 114-138
- Sutedja, L, 2003. Bioprospecting Tumbuhan Obat Indonesia Sebagai Sediaan Fitofarmaka Antidiabetes. Laporan Kemajuan Tahap II Riset Unggulan Terpadu, Pusat Penelitian Kimia-LIPI.
- Taher, et al. (2005). A polyisoprenylated ketone from *Calophyllum nervosum*. *Phytochemistry*. **66**, 723-726
- Yimdjoo, M. C., et al. (2004). Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*. **65**. 2789-2795