

AKTIVITAS ANTIDIABET SECARA INVITRO AGAR-AGAR, AGAROSA, DAN AGAROEKTIN DARI RUMPUT LAUT *Gracilaria gigas*

Invitro Antidiabetic Activities of Agar, Agarosa, and Agaropectin from Gracilaria gigas Seaweed

Hardoko*, Agnes Febriani, Titri Siratantri

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya-Malang dan Jurusan Teknologi Pangan
Universitas Pelita Harapan. Jl. MH. Thamrin Boulevard no. 1 Lippo Karawaci, Tangerang.

Telp. 021-546901, Fax. 021-546910.

*Korespondensi: hardoko@ub.ac.id dan oko8163@yahoo.com

Diterima 10 Juli 2015 / Disetujui 14 Agustus 2015

Abstrak

Rumput laut dalam beberapa jenis dilaporkan mempunyai aktivitas antidiabet secara *in vivo* maupun secara *in vitro*, namun aktivitas antidiabet fraksi-fraksi polisakarida dari rumput laut belum banyak dilaporkan. *Gracilaria gigas* merupakan jenis rumput laut merah yang dapat menghasilkan ekstrak agar dan memiliki dua fraksi yaitu agarosa dan agaropektin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan ekstrak agar, fraksi agarosa, fraksi agaropektin dari *Gracilaria gigas* dan untuk menentukan aktivitas penghambatan α -glukosidase dari ekstrak agar dan fraksinya. Ekstraksi agar digunakan larutan etanol, dan untuk fraksinasi agarosa dan agaropektin digunakan larutan dimetil sulfoxide. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi agarosa memiliki kandungan sulfat lebih rendah (0,28%) dibandingkan dengan agar (5,91%) dan agaropektin (6,07%). Jenis sampel (agar, agarosa, dan agaropektin) dan dosis sampel berinteraksi dan berpengaruh nyata dalam menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Fraksi agarosa memiliki nilai IC_{50} terhadap α -glukosidase terendah ($96,86 \pm 4,61$ ppm), diikuti oleh ekstrak agar ($116,63 \pm 5,61$ ppm), kemudian fraksi agaropektin ($158,34 \pm 1,77$ ppm).

Kata kunci: α -glukosidase, ekstrak, fraksi, *Gracilaria gigas*, IC_{50}

Abstract

Some types of seaweed are reported to have antidiabet activity *in vivo* or *in vitro*, but the activity antidiabet fractions of polysaccharides from seaweed has not been widely reported. *Gracilaria gigas* is one type of red seaweed that can produce agar and it has two factions, namely agarose and agaropectin. The aim of this study was to obtain an agar extract, agarose fraction, agaropectin fraction of *Gracilaria gigas* and to determine the α -glucosidase inhibitory activity of extracts and the fractions. Extraction of agar that used an ethanol solution, and to fractionate agarose and agaropectin used dimetilsulfoxide solution. The results showed that the fraction of the agarose having lower sulfate content (0.28%) compared with agar (5.91%) and agaropectin (6.07%). Types of samples (agar, agarose, and agaropectin) and sample doses significantly in inhibiting α -glucosidase enzyme activity. Agarose fraction has IC_{50} value against α -glucosidase lowest (96.86 ± 4.61 ppm), followed by the extract agar (116.63 ± 5.61 ppm), then the fraction agaropectin (158.34 ± 1.77 ppm).

Keywords: α -glucosidase, extract, fraction, *Gracilaria gigas*, IC_{50}

Pendahuluan

Aktivitas antidiabet suatu bahan dapat diukur dengan *in vivo* dan atau *in vitro*. Pengukuran secara *in vivo* dapat menggunakan manusia (Bajorek and Morello, 2010; Setiawan *et al.* 2011) atau hewan coba (Lee *et al.* 2010; Lee and Jeon, 2013; Roy *et al.*, 2011; Ortiz-Andrade *et al.* 2008), sedangkan secara *in vitro* dapat menggunakan enzim pencerna karbohidrat seperti α -amilase dan atau α -glukosidase (Andrade-Cetto *et al.* 2008; Nagarani dan Kumaraguru, 2013; Kim *et al.* 2014; Lakshmanasenthil *et al.* 2014).

Jumlah penderita penyakit diabetes melitus meningkat drastis di Indonesia. Berdasarkan data *World Diabetes Foundation*, Indonesia menduduki peringkat ketujuh dunia sebagai negara penderita diabetes melitus (DM). Proporsi penduduk Indonesia tahun 2013 yang berusia diatas 15 tahun penderita DM adalah 6,9 persen. Prevalensi diabetes yang terdiagnosis dokter tertinggi terdapat di DI Yogyakarta (2,6%), DKI Jakarta (2,5%), Sulawesi Utara (2,4%), dan Kalimantan Timur (2,3%). Prevalensi diabetes yang terdiagnosis dokter atau berdasarkan gejala, tertinggi terdapat di Sulawesi Tengah (3,7%), Sulawesi Utara (3,6%), Sulawesi Selatan (3,4%) dan Nusa Tenggara Timur (3,3%) (Kemenkes, 2013).

Berbagai upaya dilakukan untuk mengatasi penyakit diabetes di Indonesia, yaitu dengan obat-obatan kimia sintesis dan atau dengan bahan-bahan alami yang ada di Indonesia. Penggunaan obat-obatan kimia dianggap kurang aman dan memiliki efek samping, sehingga banyak upaya untuk mengeksplorasi bahan-bahan alami yang berpotensi sebagai antidiabetes, diantaranya bahan alami dari organisme laut. Organisme laut yang berpotensi sebagai antidiabetes diantaranya alga merah, alga coklat, fungi laut, rumput laut, diatom, hewan laut kelompok ascidians, dan terumbu karang (Bhattacharjee *et al.* 2014).

Antidiabet dari organisme laut dapat utuh (*whole*), ekstrak kasar bahan maupun ekstrak polisakarida. Ekstrak organisme laut yang dilaporkan berpotensi sebagai antidiabet secara invitro antara lain adalah ekstrak air dari rumput laut coklat, merah, dan hijau (Senthil *et al.*, 2013), ekstrak air dari *Hizikia fusiforme*, *Capsosiphon fulvescens*, *Undaria pinnatifida*, dan *Undaria pinnatifida* (Tong *et al.* 2014), ekstrak metanolik *Sargassum hystrix* dan *Euचेuma denticulatum* (Pratiwi, 2013), ekstrak polifenol dan florotanin dari *Padina pavonica* (Husni *et al.*, 2014). Secara *in vivo*, Dewi *et al.* (2013) menyatakan bahwa ekstrak metanol rumput laut coklat *Sargassum prismaticum* dapat memperbaiki jaringan pankreas tikus diabetes hasil induksi *streptosotocin*. Ekstrak rumput laut merah (Rhodophyta) jenis *Gracilarria*, *Euचेuma*, *Gelidium*, *Hypnea* ternyata mempunyai kandungan senyawa bromophenol yang diketahui dapat berperan sebagai senyawa antidiabetes.

Ekstrak polisakarida yang dilaporkan memiliki aktivitas antidiabet antara lain adalah fucoidan dari *Turbinaria ornata* (Lakshmanasenthil *et al.*, 2014), galaktomanan (Kumar and Sinha, 2012), glikoprotein rumput laut coklat *Undaria pinnatifida* (Rafiquzzaman *et al.* 2015), polisakarida larut air dari *Dioscorea hispida* Dents (Estiasih *et al.* 2012), serat pangan dari alga merah *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatus* dan *Euचेuma denticulatum* (Balasubramaniam *et al.* 2013). Secara *in vivo* dengan menggunakan tikus wistar Hardoko (2007) melaporkan bahwa tepung rumput laut merah *Euचेuma cottonii* mampu menurunkan kadar gula darah tikus diabet (hiperglikemia) akibat injeksi aloksan, hal ini diduga berkaitan dengan tingginya kadar serat pangan pada rumput laut tersebut yang mencapai 65,07%.

Gracilaria gigas merupakan salah satu jenis rumput laut merah yang lebih dikenal dengan nama agar-agar atau lubu kasang. Rumput laut ini merupakan penghasil utama agar-agar di Indonesia. Agar-agar mempunyai dua komponen polisakarida yakni agarosa dan agaropektin. Fraksi dari agar-agar tersebut dapat diekstrak menggunakan berbagai metode ekstraksi. Rachmat dan Rasyid (2002) telah melakukan ekstraksi agarosa dari rumput laut *Gracilaria gigas* dan Salamah *et al.* (2005) telah mengisolasi agarosa dari *Rhodomyenia Ciliata* menggunakan DEAE-selulosa. Adapun Jeon *et al.* (2005) berhasil memisahkan fraksi agarosa dan agaropektin dengan menggunakan DMSO (Dimetilsulfoksida), sedangkan Kang *et al.* (2011) berhasil memisahkan agarosa dengan mengekstraksi dengan DMSO dan mencucinya dengan EDTA. Dari berbagai metode ekstraksi dan fraksinasi tersebut menghasilkan karakteristik fisik dan kimia yang berbeda, namun Jeon *et al.* (2005) dapat menghasilkan agarosa dengan kekuatan gel lebih tinggi dan kadar sulfat lebih rendah dari metode yang lain.

Aktivitas antidiabet rumput laut merah telah ditunjukkan secara *in vivo* dan *in vitro*, namun fraksi-fraksi polisakarida agarosa dan agaropektin yang mempunyai karakteristik fisiko kimia yang berbeda belum diketahui aktivitasnya secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas antidiabet fraksi agarosa dan agaropektin secara *in vitro* menggunakan penghambatan enzim α -glukosidase.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang diteliti adalah rumput laut merah jenis *Gracilaria gigas* segar yang diperoleh dari Serang, Banten. *Gracilaria gigas* segar diekstraksi untuk mendapatkan ekstrak agar-agar dan difraksinasi untuk mendapatkan agarosa

dan agaropektin. Bahan yang digunakan untuk proses ekstraksi agar-agar meliputi akuades, larutan NaOH 0,1N, dan larutan etanol 95% (pro analysis, Merck Jerman) sedangkan untuk proses fraksinasi agarosa dan agaropektin meliputi akuades, larutan dimetil sulfoksida 99,9% (DMSO) (Merck, Jerman). Bahan yang digunakan untuk analisis adalah enzim α -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* (type I lyophilized powder ≥ 10 unit/ mg protein) (Sigma Aldrich, Singapura), buffer fosfat (pH 7), serum albumin, p-nitrophenyl-D-glucopyranose $\geq 99\%$ (p-NPG) (Sigma Aldrich, Singapura), pelarut dimetil sulfoksida 99,9% (Merck, Jerman), Na_2CO_3 (Merck, Jerman) air demineralisasi, serta akarbosa sebagai obat antidiabet (Merk Glucobay diproduksi PT. Bayer Indonesia).

Alat-alat yang digunakan adalah blender (Merk PHILIPS HR2108), kertas saring, kertas Whatman no 41, desikator diameter 300mm (Merk Duran), vakum filter, heater (Merk Thermoline), neraca analitik (Nettler Toledo AB204-S), alat sentrifuse (Hermle Z206A), batang pengaduk, erlenmeyer, gelas ukur, pipet volumetrik, gelas beaker (Iwaki Pyrex), UV-Vis *double beam spectrophotometer* (Thermo Scientific Genesys 20), *waterbath* (Merk Memmert), mikropipet (Merk Thermo Scientific), FTIR (Fourier Transform Infra Red) (Shimadzu 8400).

METODE

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap dua faktor, yaitu faktor jenis sampel (A) dan faktor dosis (B). Faktor A terdiri dari ekstrak agar (A1), fraksi agarosa (A2), fraksi agaropektin (A3), sedangkan faktor B terdiri dari 6,25 ppm (B1), 12,50 ppm (B2), 25,00 ppm (B3), 50,00 ppm (B4). Tahap pertama dilakukan ekstraksi agar-agar dari *G. gigas* dan dilanjutkan dengan fraksinasi untuk mendapatkan agarosa dan agaropektin

dengan metode yang digunakan oleh Jeon *et al.* (2005). Ekstrak agar, fraksi agarosa, dan fraksi agaropektin berdasarkan dosisnya diuji aktivitas penghambatannya terhadap enzim α -glukosidase (Sugiwati *et al.* 2009), rendemen, kadar air, kadar abu, (AOAC, 2005), kadar sulfat (Hidayat, 1978), dan gugus fungsi dengan FTIR.

Pembuatan Ekstrak Agar, Fraksi Agarosa dan Fraksi Agaropektin (Jeon *et al.* 2005)

Gracilaria gigas segar dicuci dengan menggunakan air kran dan ditiriskan. *Gracilaria gigas* yang telah tiris dikeringkan dengan sinar matahari selama 3 hari siang, dipotong-potong hingga berukuran panjang sekitar 0,5 cm dan dikecilkan lagi ukurannya dengan blender kering hingga diperoleh hancuran rumput laut.

Hancuran rumput laut kering ditimbang sebanyak 50 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, serta ditambahkan larutan akuades hingga semua rumput laut terendam. Rendaman rumput laut ditambah larutan natrium hidroksida 0,1 N hingga mencapai pH 8,5 dan dilanjutkan dengan pemanasan dengan pemanas listrik (heater) hingga suhu mencapai 80°C, sambil dilakukan pengadukan hingga terbentuk sol. Larutan sol panas disaring dengan kertas whatman nomor 41 pada penyaring vakum hingga mendapatkan filtrat.

Selanjutnya, filtrat ditambahkan larutan etanol 95% sebanyak 300 mL dan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Endapan yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring biasa. Endapan dipisahkan dan ditambahkan lagi larutan etanol 95% sebanyak 200 ml dan didiamkan lagi selama 24 jam. Kemudian larutan disaring lagi dengan kertas saring yang telah digunakan sebelumnya. Endapan bersama kertas saring diletakkan dalam desikator selama beberapa jam hingga mencapai berat konstan. Endapan

yang diperoleh merupakan ekstrak agar-agar.

Ekstrak agar-agar ditambahkan larutan DMSO hingga mencapai konsentrasi larutan 1% (w/v), dipanaskan pada suhu 70°C selama 2 jam dan diaduk. Setelah larutan dingin dilakukan proses sentrifugasi (356G, 20 menit pada suhu 4°C) untuk memisahkan agarosa dan agaropektin. Endapan yang didapat merupakan agaropektin, sedangkan supernatannya merupakan agarosa. Agarosa yang didapat dilakukan proses pencucian dengan air destilasi untuk menghilangkan larutan DMSO dan disaring dengan penyaring vakum untuk mengurangi air destilasi yang masih tersisa.

Aktivitas Penghambatan dengan Enzim Glukosidase

Prosedur aktivitas penghambatan dengan enzim glukosidase dilakukan berdasarkan metode yang digunakan oleh Sugiwati *et al.* (2009) untuk mengukur aktivitas antidiabet ekstrak daun Mahkota Dewa. Larutan enzim α -glukosidase dibuat dengan melarutkan 1 mg enzim α -glukosidase ke dalam 100 mL fosfat buffer (pH 7,0) yang mengandung 200 mg albumin serum. Sebelum digunakan, 1 mL larutan enzim diencerkan sebanyak 25 kali dengan buffer fosfat (pH 7,0) yang mengandung 200 mg albumin serum. Campuran yang mengandung 250 μ L substrat 20 mM *p*-nitrofenil α -D-glukopiranosida dan 490 μ L 100 mM buffer fosfat (pH 7,0), ditambahkan ke dalam sampel yang telah dilarutkan dalam larutan DMSO. Campuran diinkubasi di waterbath pada suhu 37°C selama 5 menit, lalu 250 μ L larutan enzim ditambahkan ke dalam campuran dan kembali diinkubasikan di waterbath selama 15 menit. Kemudian untuk mengakhiri reaksi enzimatik, ditambahkan 100 μ L 200 mM larutan natrium karbonat. Hasil diuji

Tabel 1 Sistem reaksi enzim untuk satu sampel dengan volume total 2 mL

	Blank (μL)	Kontrol (μL)	S0 (μL)	S1 (μL)
Sampel	-	-	10	10
DMSO	10	10	-	-
Buffer	490	490	490	490
Substrat	250	250	250	250
Inkubasi dalam <i>waterbath</i> pada suhu 37°C selama 5 menit				
Buffer	250	-	250	-
Enzim	-	250	-	250
Inkubasi dalam <i>waterbath</i> pada suhu 37°C selama 15 menit				
Na_2CO_3	1000	1000	1000	1000

Keterangan: S0 = sampel tanpa penambahan enzim, S1 = sampel dengan penambahan enzim

menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Sistem reaksi enzim untuk satu sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

$$\text{Inhibisi (\%)} = (C-S)/C \times 100\%$$

Keterangan:

S = absorbansi sampel (S1-S0)

S1= absorbansi sampel dengan penambahan enzim

S0 = absorbansi sampel tanpa penambahan enzim

C = absorbansi kontrol dikurangi absorbansi kontrol-blanko

Selanjutnya, dilakukan perhitungan nilai IC_{50} dengan menggunakan persamaan regresi linier, di mana dosis sampel yang digunakan sebagai sumbu x, sedangkan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ dapat dilakukan perhitungan nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus:

$$\text{IC}_{50} = (50-a)/a \times 100\%$$

Sampel standar (pembanding) digunakan tablet obat akar bosa (glukobay). Akar bosa dilarutkan dalam buffer fosfat

dan HCl 2N (1:1) dengan konsentrasi 1% (b/v) kemudian disentrifugasi. Supernatan akan diambil dan dimasukkan ke dalam campuran reaksi seperti dalam sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Fraksi Rumput Laut Merah *Gracilaria gigas*

Hasil uji identifikasi yang dilakukan di LIPI Oseanografi diketahui bahwa rumput laut merah yang didapat dari Serang, Banten merupakan rumput laut merah *Gracilaria gigas*. Karakteristik fisik dan kimia ekstrak agar, fraksi agarosa, serta fraksi agaropektin dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Fraksi agarosa dan agaropektin berkadar air lebih tinggi daripada ekstrak agar karena proses yang berbeda, yaitu ekstrak agar-agar kering dan fraksi agarosa dan agaropektin tidak dikeringkan (Tabel 2). Menurut Armisen and Galatas

Tabel 2 Karakteristik ekstrak dan fraksi dari rumput laut merah *Gracilaria gigas*

	Ekstrak Agar-agar	Fraksi Agarosa	Fraksi Ag-aropektin
Kadar Air	19,57%	88,81%	87,96%
Kadar Abu	4,25%	3,86%	3,63%
Kadar Sulfat	5,91%	0,28%	6,07%
Rendemen	23,89%	64,93%	33,71%

Tabel 3 Spektrum FTIR agar-agar dan agarosa dan agaropektin dari *G. gigas*

	Gugus senyawa kimia	Agar-agar	Agarosa	Agaropektin
FTIR (cm ⁻¹)	-CH ₂	2972,31	-	-
	3,6 anhidrogalaktosa	1029,99	927,76	1045,42
			1045,42	490
	Sulfat	1209,37; 1247,94; 1367,53	-	833,4
	1,3 β-D galaktosa piranosil	883,4	894,97	-

Keterangan: FTIR = *Fourier Transform Infra Red*

(1987) menyatakan bahwa ekstrak agar umumnya mempunyai kadar air sekitar 12-35%, sehingga ekstrak agar masih masuk dalam kriteria FAO, sedangkan fraksi agarose dan agaropektin belum memenuhi kriteria FAO.

Karakteristik yang lain adalah kadar abu dan kadar sulfat. Armisen and Galatas (1987) menyatakan bahwa kadar abu ekstrak agar, agarosa, dan agaropektin haruslah dibawah 5% dan menurut Salamah *et al.* (2005) kadar abu agarosa terendah adalah 4,02 – 4,64%. Balkan *et al.* (2005) bahwa kadar sulfat pada ekstrak agar adalah maksimal 9% dan kadar sulfat pada agarosa umumnya adalah 0,3% atau kurang dari 0,3%. Menurut Fu dan Kim (2010), agarosa umumnya mempunyai kadar sulfat yang rendah yaitu sekitar 0,15% dan agaropektin umumnya mempunyai kadar sulfat yang tinggi yaitu sekitar 5-8%. Perbedaan kecil dari karakteristik fisiko kimia dari ekstrak agar, agarosa dan agaropektin dapat disebabkan oleh perbedaan jenis rumput laut dan metode ekstraksinya. Penelitian ini diperoleh kadar abu dan kadar sulfat dari ekstrak agar, agaropektin, dan agarose memenuhi kriteria tersebut.

Menurut Navard (2012), rendemen ekstrak agar umumnya adalah 16-45%, rendemen agarosa sekitar 50-90% dan rendemen agaropektin lebih kecil dari rendemen agarosa yaitu sekitar 10-50%

sehingga rendemen ekstrak agar, fraksi agarosa dan agaropektin juga memenuhi kriteria tersebut.

Menurut Sur dan Guven (2002) dan Balkan *et al.* (2005), ekstrak agar-agar umumnya mempunyai gugus fungsi CH₂ pada serapan 2960 cm⁻¹, gugus 3,6 anhidrogalaktosa pada serapan 1070 cm⁻¹, gugus gugus 1,3 β-D galaktosa piranosil serapan 897 cm⁻¹, dan gugus ester sulfat pada serapan 1180 cm⁻¹; 1250 cm⁻¹; 1370 cm⁻¹. Fraksi agarosa umumnya mempunyai serapan sebesar 897 cm⁻¹ pada gugus 1,3 β-D galaktosa piranosil, serta adanya serapan 930 cm⁻¹ dan 1070 cm⁻¹ yang menunjukkan gugus 3,6 anhidrogalaktosa, dimana jumlah ikatan 3,6 anhidrogalaktosa pada agarosa lebih tinggi dibandingkan fraksi agaropektin. Fraksi agaropektin akan mempunyai gugus 3,6 anhidrogalaktosa pada serapan peak 1070 cm⁻¹, serta serapan peak 1250 cm⁻¹ dan 850 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya kelompok sulfat. Spektrum FTIR ekstrak dan fraksi dari rumput laut merah *Gracilaria gigas* (Tabel 3) identik dengan agar-agar, agarosa, dan agaropektin.

Inhibisi Enzim α-Glukosidase oleh Rumput Laut Merah *Gracilaria gigas*

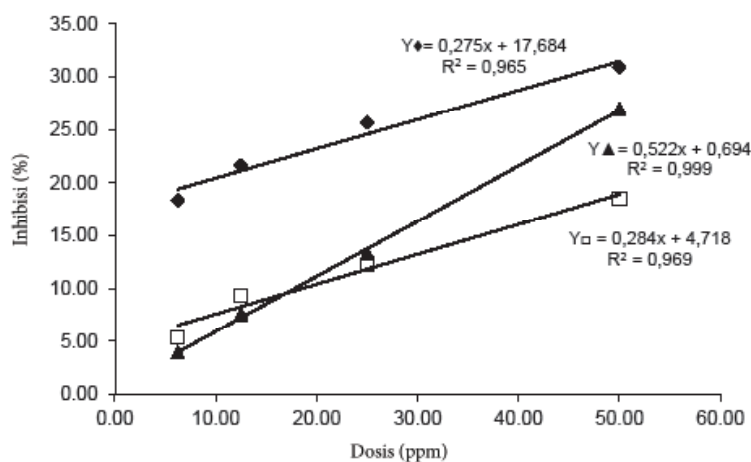
Inhibisi enzim α-glukosidase oleh ekstrak rumput laut *Gracilaria gigas* dapat

dinyatakan dalam persen inhibisi dan atau dalam IC₅₀. Persen inhibisi menunjukkan jumlah persentase enzim yang terhambat oleh sejumlah dosis atau konsentrasi sampel, sehingga makin besar nilai persen menunjukkan makin besar inhibisinya terhadap enzim, dan sebaliknya. IC₅₀ menunjukkan kemampuan dari sampel dalam menghambat aktivitas enzim sebesar 50 persen, sehingga makin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan aktivitas inhibisi makin tinggi, dan sebaliknya.

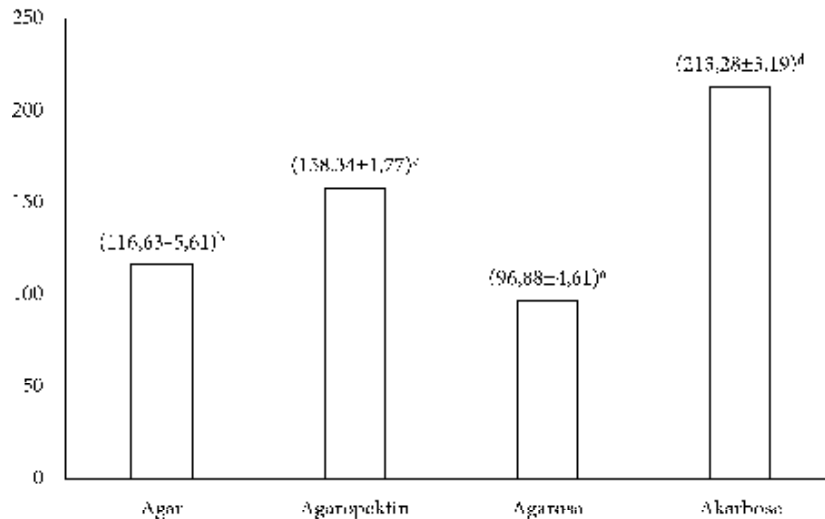
Hasil analisis sidik ragam (Anova) data persen inhibisi diperoleh bahwa baik jenis sampel, dosis sampel maupun interaksi keduanya berpengaruh nyata terhadap persen inhibisi enzim α-glukosidase (*p*<0,05). Karena perbedaan yang nyata tersebut, maka dapat dilihat hubungan antara persen penghambatan dengan dosis sampel menggunakan korelasi regresi seperti pada Gambar 1. Hasil analisis sidik ragam data nilai IC₅₀ diperoleh bahwa jenis ekstrak rumput laut *G. gigas* berpengaruh nyata terhadap nilai IC₅₀ (*p*<0,05), seperti ditunjukkan pada Gambar 2.

Gambar 1 menunjukkan adanya peningkatan aktivitas penghambatan enzim α-glukosidase dengan semakin besarnya dosis ekstrak agar-agar, dosis fraksi agarosa, dan dosis fraksi agaropektin

dari *Gracilaria gigas*. Inhibisi ekstrak agar-agar terlihat lebih tinggi daripada fraksi agarosa dan fraksi agaropektin. Hal ini mengindikasikan adanya fenomena sinergisme antara fraksi agarosa dan fraksi agaropektin yang terdapat dalam agar-agar sampai titik tertentu yaitu pada dosis 77,54 ppm (hasil perpotongan antara persamaan linier agar-agar dengan persamaan linier agarosa) dalam menghambat enzim α-glukosidase. Pada dosis diatas 77,54 ppm aktivitas penghambatan agarosa lebih tinggi dari agar-agar dan agaropektin. Fenomena ini belum dapat dijelaskan dengan baik, namun dapat disebabkan oleh perbedaan sifat fisiko kimia dari agarosa, khususnya kekuatan gelnya, dimana kekuatan gel agarosa lebih tinggi daripada ekstrak agar-agar maupun fraksi agaropektin (Rachmat dan Rasyid, 2002; Salamah *et al.* 2005; Jeon *et al.* 2005; Kang *et al.* 2011). Peran kekuatan gel dalam inhibisi enzim α-glukosidase didukung oleh Hardoko (2008) bahwa bentuk gel rumput laut lebih bersifat hipokolesterolemik daripada bentuk larutan. Hal yang bersifat inhibitor dari ekstrak dan fraksi dari *Gracilaria gigas* tersebut belum diketahui dengan pasti, tetapi dapat disebabkan oleh adanya komponen bromophenol (Senthil *et al.* (2013), serat pangan



Gambar 1 Regresi hubungan inhibisi dan dosis ekstrak agar, agarosa, dan agaropektin. ◆ ekstrak agar; □ fraksi agaropektin; ▲ fraksi agarosa



Gambar 2 Nilai IC₅₀ dari ekstrak agar, agarosa, agaropektin, dan obat akarbose. Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada $p < 0,05$.

(Hardoko, 2007; Devi *et al.* 2014), fenolik dan florotannin (Ridwan *et al.* 2012; Husni *et al.* 2014), fukoidan (Kim 2012), dan lain-lain. Namun karena ekstrak, agar, fraksi agarosa, dan fraksi agaropektin adalah kelompok polisakarida, maka aktivitas penghambatan terhadap enzim glukosidase lebih dominan berkaitan dengan sifat polisakaridanya.

Mekanisme kerja inhibisi dari polisakarida agar, fraksi agarosa, dan fraksi agaropektin juga belum diketahui dengan pasti. Menurut Kim (2012) terdapat banyak tipe polisakarida yang menunjukkan adanya variasi dalam penghambatan enzim pencernaan karbohidrat pati. Mekanisme penghambatan yang bisa mungkin terjadi adalah (1) inhibitor bergabung dengan muatan negatif pada sisi katalitik enzim seperti dalam kasus akarbose, isoakarbose, dan siklodekstrin (Hansawasdi *et al.* 2000; Nahoum *et al.* 2000; Qian *et al.* 2001); (2) pemblokiran jaringan ikatan hidrogen antara substrat dan residu asam amino pada bagian pengikatan substrat; (3) penghalangan antara enzim dengan substrat (Alam *et al.* 2001; Strobl *et al.* 1995); (4) memperlambat difusi glukosa dari sisi aktif oleh sifat kekentalan serat

pangan sehingga menunda pencernaan karbohidrat dan penyerapan glukosa (Ou *et al.* 2001); (5) mengikat bagian lain dari enzim sehingga enzim tidak berfungsi dengan baik (Ferey-Roux *et al.* 1998); (6) pembentukan kompleks dengan makromolekul berberat molekul besar seperti polifenol dan polisakarida. Penghambatan tersebut dapat bersifat kompetitif dan non-kompetitif. Menurut Sugiwati (2005) pada inhibisi reversibel kompetitif, inhibitor akan berkompetisi dengan substrat normal agar dapat berikatan dengan sisi aktif enzim untuk membentuk kompleks enzim inhibitor.

Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui bahwa, nilai IC₅₀ pada agarosa menghasilkan nilai IC₅₀ paling rendah dibandingkan ekstrak agar-agar dan fraksi agaropektin. Hal ini menandakan bahwa agarosa mempunyai kemampuan untuk menghambat enzim α -glukosidase yang paling tinggi, diikuti oleh ekstrak agar-agar dan fraksi agaropektin. Namun, ekstrak agar-agar dan fraksi agarosa, serta fraksi agaropektin, ketiganya dapat digunakan untuk menjadi alternatif dalam menghambat enzim α -glukosidase dengan daya hambat yang berbeda. Apabila

dibandingkan dengan obat diabetes komersial yaitu akarbosa, terlihat bahwa nilai IC_{50} dari akarbosa (yaitu sekitar 213,28 ppm atau $\mu\text{g/mL}$) lebih tinggi dibandingkan ekstrak agar, agarosa dan agaropektin, sehingga aktivitas inhibisi akarbosa lebih rendah dari ketiga ekstrak rumput laut merah. Aktivitas inhibisi yang lebih tinggi dari agarosa diduga disebabkan oleh kekuatan gel agarosa lebih tinggi daripada agar, dan agaropektin.

Menurut Senthil *et al.* (2013), ekstrak agar dari rumput laut *Gracilaria edulis* dan *Gracilaria corticata* mempunyai nilai IC_{50} yaitu 46 $\mu\text{g/mL}$ dan 87 $\mu\text{g/mL}$ atau ppm, di mana nilai IC_{50} dari ekstrak agar *Gracilaria gigas* lebih tinggi dibandingkan ekstrak agar dari *Gracilaria edulis* dan *Gracilaria corticata*. Adanya perbedaan nilai IC_{50} dari ekstrak agar dapat disebabkan perbedaan spesies dan perbedaan perlakuan dalam proses ekstraksi. Selain itu, menurut Senthil *et al.* (2013), nilai IC_{50} dari akarbosa adalah 51 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan menurut Sugiwati *et al.* (2009), nilai IC_{50} dari akarbosa adalah sekitar 117,45 $\mu\text{g/mL}$. Adanya perbedaan nilai IC_{50} dari akarbosa juga diduga adanya perbedaan masa kedaluwarsa sehingga menimbulkan hasil IC_{50} yang beragam.

KESIMPULAN

Rumput laut *Gracilaria gigas* dapat diekstrak menghasilkan agar-agar yang dapat dipisahkan menjadi faksi agarosa dan agaropektin mampu menghambat aktivitas enzim α -glukosidase.

Aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase paling tinggi adalah fraksi agarosa, diikuti oleh ekstrak agar-agar, fraksi agaropektin, dan obat akarbosa dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah 96,86 ppm, 116,63 ppm, 158,34 ppm, dan 213,28 ppm. Dengan demikian ekstrak agar, fraksi agarosa, dan fraksi agaropektin berpotensi sebagai bahan pangan fungsional antidiabetes.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 2005 . Official Methods of Analysis. Maryland : Association of Official Analytical Chemistry.
- Alam N, Gourinath S, Dey S, Srinivasan A. Singh TP. 2001. Substrate-inhibitor interactions in the kinetics of α -amylase inhibition by Ragi α -amylase/trypsin inhibitor (RATI) and its various N-terminal fragments. *Biochemistry* 40:4229-4233.
- Andrade-Cetto A, Becerra-Jim'enez J, C'ardenas-V'azquez R. 2008. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 27–32
- Armisen R, Galatas F. 1987. Production, Properties and Uses of Agar. In : McHugh D.J., editor. Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. Rome: FAO Fisheries Technical Paper 288.
- Bajorek SA, Morello CM. 2010. Effects of dietary fiber and low glycemic index diet on glucose control in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Annals of Pharmacother* 44 (11):1786-1792.
- Balasubramaniam V, Mustar S, Khalid NM, Rashed AA, Noh MFM, Wilcox MD, Chater PI, Brownlee IA, Pearson JP. 2013. Inhibitory activities of three Malaysian edible seaweeds on lipase and α -amylase. *Journal Application Phycol* 25:1405–1412.
- Balkan G, Coban B, Guven KC. 2005. Fractionation of agarose and *Gracilaria verrucosa* agar and comparison of their IR spectra with different agar. *International Journal Acta Pharmaceutica Turcica* 47:93-106.
- Bhattacharjee R, Mitra A, Dey B, Pal A. 2014. Exploration of anti-diabetic potentials amongst marine species- A Mini Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(2): 65-73.

- Dewi DR, Aulanni'am, Roosdiana A. 2013. Studi pemberian ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum prismaticum*) terhadap kadar MDA dan histologi jaringan pankreas pada tikus *Rattus norvegicus* diabetes mellitus hasil induksi MLD-STZ (Multiple Low Dose-Streptozotocin). *Kimia Student Journal* 2(1):351-357.
- Estiasih T, Harijono, Sunarharum WB, Rahmawati A. 2012. Hypoglycemic activity of water soluble polysaccharides of Yam (*Dioscorea hispida* Dents) prepared by aqueous, papain, and tempeh inoculum assisted extractions. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 6:10-27.
- Ferey-Roux G, Perrier J, Forest E, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Santimone M. 1998. The human pancreatic α -amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1388 (1):10-20.
- Fu XT, Kim SM. 2010. Agarase : Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar. Drugs* 8:200-218.
- Hansawasdi, C., Kawabata, J. and Kasai, T. 2000. α -Amylase inhibitors from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64 (5):1041-1043.
- Hardoko. 2007. Studi penurunan glukosa darah diabet dengan konsumsi rumput laut *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Perikanan (J.Fish.Sci.)* 9(1):116-124.
- Hardoko. 2008. Pengaruh konsumsi gel dan larutan rumput laut *E. cottonii* terhadap hiperkolesterolemia tikus Wistar. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 16(2):94-107.
- Hidayat A. 1978. Metode Analisis Tanah. Bogor: Balai Penelitian Bahan Organik.
- Husni A, Wijayanti R, Ustadi. 2014. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by *Padina pavonica* extracts. *Journal of Biological Sciences* 14(8):515-520.
- Jeon YJ, Athukorala Y, and Lee J. 2005. Characterization of agarose product from agar using DMSO. *Algae Volume* 20 (1):61-67.
- Kang TH, Lee SH, Baik JS, Byung-Sik Kang BS, Lee JS, Lee NH, Jeon YJ. 2011. Preparation of commercial agarose from Jeju Seaweed, *Gelidium amansii* using DMSO extraction and EDTA washing. *Kor. Journal Fish Aquatic Science* 44(6):635-643.
- Kemenkes. 2013. Riset Kesehatan Dasar: Riskesdas. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementrian Kesehatan RI.
- Kim KT. 2012. Seasonal Variation of Seaweed Components and Novel Biological Function of Fucoidan Extracted from Brown Algae in Quebec. Québec: Dissertation Département des Sciences des Aliments et de Nutrition, Faculté des Sciences de L'Agriculture et de L'Alimentation, Université Laval Québec.
- Kim KT, Rioux LE, Turgeon SL. 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 98:27-33.
- Kumar RV, Sinha VR. 2012. A novel synergistic galactomannan-based unit dosage form for sustained release of acarbose. *AAPS Pharmacy Science Technology* 13(1):262-275.
- Lakshmanasenthil S, Vinothkumar T, Geetharamani D, Marudhupandi T, Suja G, Sindhu NS. 2014. Fucoidan—a novel α -amylase inhibitor from *Turbinaria ornata* with relevance to

- NIDDM therapy. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(3):66–70.
- Lee SH, Park MH, Heo SJ, Kang SM, SC, Han JS, Jeon YJ. 2010. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology* 48(10):2633–2637.
- Lee SH, Jeon YJ. 2013. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia* 86:129–136.
- Nagarani N, Kumaraguru AK. 2013. Evaluation of imflammatory, antidiabetic, cytotoxic activity of *Kappahycus alvarezii*. *International Journal Pharmacy Biology Science* 4(1): 921 – 929.
- Nahoum V, Roux G, Anton V, Rougé P, Puigserver A, Bischoff H, Henrissat B, Payan F. 2000. Crystal structures of human pancreatic α -amylase in complex with carbohydrate and proteinaceous inhibitors. *Biochemical Journal* 346:201-208.
- Navard P. 2012. The European Polysaccharide Network of Excellence. France: Springer-Verlag Wien.
- Ortiz-Andrade RR, Sa'nchez-Salgado JC, Navarrete-Va'zquez G, Webster SP, Binnie M, Garcý'a-Jime'nez S, Leo'n-Rivera I, Cigarroa-Va'zquez P, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S. 2008. Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 1(1) :1-8.
- Pratiwi T. 2013. Uji Aktivitas Ekstrak Metanolik *Sargassum hystrix* dan *Eucheuma denticulatum* dalam Menghambat α -Amilase dan α -Glukosidase. [Skripsi]. Yogyakarta: Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, UGM.
- Qian M, Nahoum V, Bonicel J, Bishoff H, Henrissat B, Payan F. 2001. Enzyme-catalyzed condensation reaction in a mammalian alpha-amylase: High resolution structural analysis of an enzyme inhibitor complex. *Biochemistry* 40:7700-7709.
- Ou S, Kwok KC, Li Y, Fu L. 2001. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1026-1029.
- Rachmat R, Rasyid A. 2002. Ekstraksi agarosa dari agarofit *Gracillaria verrucosa*. Prosiding Seminar Nasional rumput Laut dan Mini Simposium Mikroalgae. Makassar: 23-25 Oktober 2002: 138-145.
- Rafiquzzaman SM, Lee JM, Ahmed R, Lee JH, Kim JM, Kong IS. 2015. Characterisation of the hypoglycaemic activity of glycoprotein purified from the edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Food Science and Technology* 50:143–150.
- Roy MC, Anguenot R, Fillion C, Beaulieu M, Bérubé J, Richard D. 2011. Effect of a commercially-available algal phlorotannins extract on digestive enzymes and carbohydrate absorption in vivo. *Food Research International* 44 (9):3026–3029.
- Salamah E, Susanti D dan Wikanta T. 2005. Kualitas agarosa hasil isolasi *Rhodymenia Ciliata* menggunakan DEAE-Selulosa. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 8(1):13-20.
- Senthil SL, Kumar TV, Geetharamani D, Maruthupandi T. 2013. Screening of seaweeds collected from Southeast Coastal area of India for α -amylase inhibitory activity, antioxidant activity and biocompatibility.

- International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5:240-244.
- Strobl S, Muehlhahn P, Bernstein R, Wiltscheck R, Maskos K, Wunderlich M, Huber R, Glockshuber R, Holak TA. 1995. Determination of the three dimensional structure of the bifunctional α -amylase /trypsin inhibitors from Ragi seeds by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34:8281-8293.
- Sugiwati S. 2005. Aktivitas Hipoglikemik dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] sebagai Inhibitor α -Glukosidase Secara *In Vitro* dan *In Vivo* pada Tikus Putih. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sugiwati S, Setiasih S, Afifah E. 2009. Antihyperglycemic activity of the mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] leaf extracts as an α -Glucosidase inhibitor. *Makara Kesehatan* 13(2):74-78.
- Sur M, Guven KC. 2002. Infra red studies on *Phyllopora nervosa* Agar and comparison with various agar and carrageenans. *Turkies Journal Marine Science* 8:143-156.
- Tong T, Li J, Ko DU, Kim BS, Zhang C, Ham KS, Kang SG. 2014. In vitro antioxidant potential and inhibitory effect of seaweed on enzymes relevant for hyperglycemia. *Food Science Biotechnology* 23(6):2037-2044.