

REVIEW ARTIKEL: METODE PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIDIABETES

Muhammad Rizki Nugraha, Aliya Nur Hasanah
Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
Jalan Raya Bandung Sumedang km 21 Jatinangor 45363
rizkinugraha31@gmail.com

Abstrak

Antidiabetes merupakan suatu aktivitas yang diberikan oleh senyawa tertentu yang dapat mengobati penyakit diabetes. Pengujian aktivitas antidiabetes ini biasa dilakukan pada tanaman herbal. Pengujian aktivitas antidiabetes diuji dengan tiga cara yaitu secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*. Dalam pengujian secara *in vivo*, *in vitro*, dan *in silico* terdapat uji Streptozotocin, uji Aloksan, uji toleransi glukosa, uji resistensi insulin, aktivitas hipoglikemik, α -glucosidase inhibitory assay, α -amylase inhibition assay, RIN-5F cell lines method, dan molecular docking.

Kata kunci: Pengujian aktivitas, Antidiabetes, *In vivo*, *In vitro*, *In silico*

Abstract

Antidiabetes is an activity given by certain compounds that can treat diabetes. Testing of antidiabetic activity is usually done on herbs. Tests of antidiabetic activity were tested in three ways: in vitro, in vivo, and in silico. In vivo, in vitro, and in silico tests there were Streptozotocin, Aloxan test, glucose tolerance test, insulin resistance test, hypoglycemic activity, α -glucosidase inhibitory assay, α -amylase inhibition assay, RIN-5F cell lines method, and molecular docking.

Keyword: Activity testing, Antidiabetic, *In vivo*, *In vitro*, *In silico*.

Pendahuluan

Diabetes mellitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolisme yang ditandai oleh hiperglikemia dan kelainan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. DM tipe 1 (5% -10% dari kasus) biasanya berkembang pada masa kanak-kanak atau awal masa dewasa dan hasil dari destruksi β -sel pankreas yang dimediasi autoimun, yang mengakibatkan defisiensi insulin absolut. Proses autoimun dimediasi oleh makrofag dan limfosit T dengan autoantibodi terhadap antigen sel β (misalnya, antibodi sel islet, antibodi

insulin). DM tipe 2 (90% kasus) ditandai dengan kombinasi beberapa tingkat resistensi insulin dan defisiensi insulin relatif. Resistensi insulin dimanifestasikan oleh peningkatan lipolisis dan produksi asam lemak bebas, peningkatan produksi glukosa hepatic, dan penurunan serapan otot skeletal glukosa (Wells, et al, 2015)

Data yang dimiliki Badan Pusat Statistik Indonesia tahun 2003, menunjukkan bahwa penduduk Indonesia yang berusia diatas 20 tahun sebanyak 133 juta jiwa. Mengacu pada perubahan pertumbuhan penduduk, diperkirakan pada tahun 2030

nanti akan ada 194 juta penduduk yang berusia diatas 20 tahun. Laporan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007 oleh Departemen Kesehatan, menunjukkan rata-rata prevalensi DM di daerah urban untuk usia di atas 15 tahun sebesar 5,7%. Prevalensi terkecil terdapat di Propinsi Papua sebesar 1,7%, dan terbesar di Propinsi Maluku Utara dan Kalimantan Barat yang mencapai 11,1%. Sedangkan prevalensi toleransi glukosa terganggu (TGT), berkisar antara 4,0% di Propinsi Jambi sampai 21,8% di Propinsi Papua Barat dengan rerata sebesar 10.2% (Soelistijo, 2015).

Pengujian aktivitas antidiabetes banyak dilakukan dalam upaya menemukan obat dalam pengobatan penyakit diabetes mellitus. Banyak studi menggunakan tiga pengujian utama yaitu *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*. Pengujian ini dipilih sesuai dengan aiktivitas antidiabetes yang ingin didapat. Tujuan dari *review artikel* ini adalah untuk mengenal ketiga pengujian utama dan dapat menjadi bahan referensi dalam penelitian.

Pokok Bahasan

Pengujian aktivitas antidiabetes dapat diuji dengan tiga acara yaitu secara *in vivo*, *in vitro* dan *in silico*. Pengujian secara *in vivo* pada hewan dibagi menjadi tiga metode yaitu metode streptozotocin, uji Aloksan, uji toleransi glukosa, uji resistensi insulin, dan aktivitas hipoglikemik. Pengujian secara *in vitro* dibagi menjadi

dua metode yaitu metode *α -glucosidase inhibitory assay*, *α -amylase inhibition assay*, dan *RIN-5F cell lines method*. Terakhir merupakan uji *in silico* dengan menggunakan *molecular docking*.

Pengujian In Vivo

Uji Streptozocin

In vivo streptozotocin merupakan metode yang digunakan dengan cara menginduksi tikus atau mencit hingga mencapai kadar gula darah > 200 mg/dL. Mekanisme kerja streptozotocin dalam meningkatkan gula darah disebabkan oleh sifat toksik yang ditimbulkan akan merusak sel β pankreas (Pathak, et al, 2008). Contoh penggunaan metode pada penelitian yang dilakukan oleh Yanto, et al (2016) menggunakan streptozotocin untuk mengetahui aktivitas antidiabetik dari seduhan jahe. Prosedur induksi dilakukan dengan cara tikus dipuasakan selama 8 jam dan diberikan streptozotocin *single dose* 40 mg/kg BB secara i.p dan ditunggu hingga kadar gula darah lebih dari 200 mg/dL.

Uji Aloksan

Uji aloksan digunakan untuk menginduksi diabetes. Aloksan tetrahidrat merupakan substansi diabetogenik yang secara selektif bekerja pada sel β pankreas sebagai organ yang memproduksi insulin. Aloksan dalam darah akan berikatan dengan GLUT-2 (pengangkut glukosa) yang merupakan fasilitas untuk masuknya

aloksan ke dalam sitoplasma sel β pankreas. Di dalam sel β , aloksan akan menimbulkan depolarisasi berlebih pada mitokondria sebagai akibat pemasukan ion Ca^{2+} yang diikuti dengan penggunaan energi berlebih sehingga terjadi kekurangan energi dalam sel. Dua mekanisme ini mengakibatkan kerusakan baik dalam jumlah sel maupun massa sel pankreas sehingga terjadi penurunan pelepasan insulin yang akan menyebabkan hiperglikemia (Lenzen, 2008).

Uji Toleransi dan Uji Resistensi

Uji toleransi dan uji resistensi insulin merupakan uji secara *in vivo* yang digunakan kepada hewan uji. Uji toleransi merupakan uji untuk melihat bagaimana toleransi dari penurunan kadar gula darah pada pemberian obat uji tertentu (Susilawati, et al, 2016). Rohdiana et al (2012) pada penelitiannya untuk menentukan toleransi dari ekstrak teh hijau menggunakan cara dengan membagi 6 kelompok tikus kelompok normal, kontrol negatif, kontrol positif dan tiga variasi dosis yang diberikan secara oral dan diamati kadar gula darah. Tikus yang diberi makan selama 7 hari dan dipuasakan 18 jam dilihat kadar gula darahnya pada interval waktu 0, 60, 120, 180, dan 240 menit. Hasil yang didapat berupa aktivitas antidiabetes dan penurunan kadar gula darah.

Uji resistensi merupakan metode untuk melihat aktivitas antidiabetes dalam

kerjanya meningkatkan sensitivitas insulin. Uji dilakukan dengan membagi kelompok hewan uji dan menginduksi hewan uji dengan menggunakan emulsi tinggi lemak selama 14 hari, hal ini akan menginduksi terjadinya resistensi insulin. Susilawati et al (2016) pada penelitiannya menunjukkan bahwa daun singalawang memiliki aktivitas antidiabetes dengan meningkatkan sensitivitas insulin pada fraksi n-heksan. Hewan uji yang digunakan tikus yang diinduksi emulsi tinggi lemak, dari ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air terlihat peningkatan sensitivitas insulin sangat besar pada fraksi n-heksan. Cara menentukan Sensitivitas insulin dinyatakan dalam nilai KTTI (konstanta tes toleransi insulin) yang merupakan nilai gradien atau kemiringan kurva dikalikan 100 dari kurva regresi linear logaritma natural kadar glukosa darah terhadap waktu (Fitriani, 2014).

Aktivitas Antihipoglikemik

Aktivitas hipoglikemik merupakan uji secara *in vivo* yang digunakan untuk menentukan penurunan kadar gula darah hingga menyebabkan kondisi hipoglikemia (Uddin, et al, 2014). Pengujian ini dilakukan pada hewan uji yang dipuasakan. Uddin et al (2014) pada penelitiannya menggunakan tikus yang dipuasakan dan tikus diberikan glibenklamid dan ekstrak buah *Citrus macroptera* Montr. menunjukkan adanya efek hipoglikemik. Pengujiannya dilakukan dengan cara tikus

dipuaskan selama 24 jam dan hanya diberi minum, tikus diambil darahnya sebelum pemberian dan setelah 2 jam pemberian obat. Penurunan kadar gula darah terjadi pada glibenklamid namun tidak pada ekstrak buah *Citrus macroptera* Montr.

Pengujian *In Vitro*

α -glucosidase inhibitory assay

Metode pengujian dengan cara *In vitro α -glucosidase inhibitory assay* merupakan pengujian yang digunakan untuk melihat aktivitas penghambatan enzim *α -glucosidase* (Kim, et al, 2008). Berdasarkan ulasan yang dilakukan oleh Bösenberg (2008) enzim *α -glucosidase* berperan dalam mengkonversi karbohidrat menjadi glukosa, oleh karena itu jika ada penghambatan aktivitas dari *α -glucosidase* akan menurunkan gula darah. Pengujian dengan cara sampel ditambahkan dimetil sulfoksidan dan ditambahkan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida agar terjadi reaksi enzimatis dan diinkubasi, reaksi dihentikan dengan Na_2CO_3 dan dilihat absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm. Aktivitas dihitung dengan rumus:/

$$\% \text{ hambatan} = \frac{c-s}{c}$$

Keterangan : S= absorbansi sampel
C=absorbansi kontrol (Blanko DMSO)

Aktivitas inhibisi *α -glucosidase* terdapat pada sebagian tanaman daun *Premna serratifolia* Linn (Hardiarti, 2017), daun pandan wangi (Sukandar, et al, 2012), dan buah kiwi (Meira, dan Noraini, 2017)

dimana hasilnya memiliki aktivitas yang lebih tinggi dari acarbose yang merupakan obat inhibitor *α -glucosidase*.

α -amylase uptake

α -amylase uptake merupakan metode secara *in vitro*, berbeda dengan *α -glucosidase* enzim ini mengkatalisis hidrolisis dari α -1,4-glikosidik polisakarida menjadi dekstrin, oligosakarida, maltose, dan D-glukosa (Wang, 2009). Pengujian *α -amilase* berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Uddin et al (2014) dan Kumar et al (2013) ada tiga metode yaitu dengan dinitrosalicylic acid method (DNSA) (Miller, 1959), *starch iodine colour assay* (Xiao, et al, 2006), dan *modified starch iodine protocol* (Hossan, 2009). DNSA merupakan metode dengan melakukan penambahan reagen DNSA ke dalam campuran sampel yang ditambahkan buffer natrium fosfat, larutan *α amylase*, dan larutan pati yang kemudian dilihat pada Panjang gelombang 540 nm dan untuk mengetahui aktivitasnya digunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibition activity} = \frac{\text{Abs (Control)} - \text{Abs (Extract)}}{\text{Abs (Control)}} \times 100.$$

Pengujian dengan *starch iodine colour assay* merupakan metode yang dimodifikasi dari pewarnaan pati-iodin. Pengujian ini sampel dimasukan ditambahkan buffer sodium fosfat, *α -amilase* dan diinkubasi selama 10 menit

pada suhu 37°C, kemudian setelah ditambahkan pati dilakukan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C, ditambahkan iodine kemudian dilihat perubahan warna dan dilihat pada Panjang gelombang 620 nm, aktivitas dari inhibisi α -amilase ditentukan dengan rumus:

$$\text{Inhibition of enzyme activity (\%)} = (C-S) / C \times 100,$$

S adalah absorbansi sampel dan C adalah absorbansi blanko.

Modified starch iodine protocol memiliki prosedur yang sama dengan pati iodine, namun dibedakan dengan penginkubasian setelah penambahan pati menjadi 1 jam, hal ini membuat reaksi enzimatis menjadi lebih lama. Aktivitas dihitung dengan rumus:

$$\% \alpha\text{-amylase inhibition} = \left[1 - \frac{(SA-SBB)-SMB}{AAB} \right] \times 100$$

Dimana SA adalah absorbansi sampel, SMB adalah sampel blanko, SBB adalah substrat blanko, dan AAB adalah α -amilase blanko.

RIN-5F cell lines

RIN-5F *cell lines* merupakan metode *in vitro*. RIN-5F merupakan kloning dari sel β pankreas dan memiliki fungsi yang sama. RIN-5F adalah klon sekunder dari garis sel tumor islet tikus RIN-m (ECACC catalogue no. EC95071701). Kloning dilakukan dengan pengenceran terbatas di RPMI 1640, FBS 10% dan medium berkondisi 20%. Media yang dikondisikan

mengandung hormon pertumbuhan dan prolaktin yang diproduksi oleh sel tumor hipofisis tikus GH3 (katalog ECACC no. EC87012603). Sel RIN-5F mengeluarkan insulin, menghasilkan tingkat tinggi dari enzim APUD kunci, L - dopa - dekarboksilase dan mengandung butiran sekreat yang terikat dengan membrane (Oie, et al, 1983). Secara singkat metode ini digunakan untuk melihat efek sekresi insulin oleh penambahan obat. Obat yang mensekresikan insulin adalah glibenklamid dimana digunakan untuk mengobati pasien dengan DM tipe 2 jika kekurangan insulin. Ketika sel RIN-5F ditambahkan glibenklamid atau sampel maka insulin akan disekresikan sesuai waktu yang ditentukan dengan jumlah nanogram per juta sel. Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Hassan (2010) melihat aktivitas dari tanaman *Gynura procumbens* (Lour.) Merr atau di Indonesia disebut tanaman sambung nyawa dan melihat bagaimana ekstrak air tanaman sambung nyawa dapat memproduksi insulin. Dari hasil yang didapat ekstrak air tanaman sambung nyawa dapat menginduksi sekresi insulin dengan nilai paling tinggi 0,7 nanogram per juta sel dibandingkan dengan glibenklamid nilai paling tinggi 1 nanogram per juta sel.

Pengujian *In Silico*

Molecular Docking

Uji *in silico*, merupakan uji dengan menggunakan komputasi dalam mengetahui struktur 3D molekul dan mempelajari sisi aktif yang berperan didalam molekul. Salah satu metode yang digunakan adalah *molecular docking*. Uji ini dilakukan untuk menentukan bagian yang berperan dalam aktivitas antidiabetes. Vo et al (2016) pada penelitiannya mengenai uji *in silico* tanaman *Euphorbia thymifolia* Linn. menggunakan metode *molecular docking*. Metode *molecular docking* meliputi penyiapan struktur reseptor, penyiapan senyawa bioaktif, simulasi *docking*, dan analisis farmakofor. Dalam penelitiannya digunakan 4 reseptor yaitu 11- β HSD1, GFAT, PTP1B, SIRT6 dan 20 senyawa bioaktif dari tanaman *Euphorbia thymifolia*. Dari ke-20 senyawa bioaktif dianalisis secara farmakofor dan melihat kekuatan ikatan terhadap reseptor. Dari ke-20 senyawa bioaktif terdapat 7 senyawa yang memiliki ikatan absolut yang tinggi terhadap keempat reseptor dengan tenaga lebih dari >8 kcal/mol) yaitu senyawa β -amyrine, taraxerol, 1-O-galloyl- β -d-glucose, corilagin, cosmosiin, quercetin-3-galactoside and quercitrin. Ke-7 senyawa tersebut memiliki potensi dalam mengobati dan perawatan DM tipe 2.

Simpulan

Berbagai metode pengujian antidiabetes secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico* dapat digunakan dan dipilih metode yang sesuai untuk mengetahui aktivitas antidiabetes.

Daftar Pustaka

- Bosenberg, L. H. 2008. The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: a review of recent literatur. *The Journal of Endocrinolgy, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 80-88.
- Fitriani, N. 2014. *Aktivitas Antidiabetes Melitus Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata L.) terhadap Mencit Jantan Swiss Webster*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hardiati, D. 2017. In Vitro α -Glucosidase Inhibitory Activity of Ethanol Extract of Buasbuas (*Premna serratifolia* Linn). *Traditional Medicine Journal*, 80-83.
- Hassan, Z., & al, e. 2010. Antidiabetic Properties and Mechanism of Action of Gynura procumbens Water Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecules*, 9008-9023.
- Hossan, M., E.-S., & H., A. 2009. Antioxidative and anti α -amylase activities of four wild plants consumed by nomads in Egypt. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 217-224.
- Kim, KA, N., H, K., & SM, K. 2008. Potent α -glucosidase Inhibitors Purified from the Red Alga Grateloupia elliptica. *Phytochemistry*, 2820-2825.
- Kumar, A., & al., e. 2013. In Vitro Antidiabetic Activity of Nisamalaki

- Churna. *Sains Malaysiana* , 625–628.
- Lenzen. 2008. The Mechanisms of Alloxan and Streptozotocin Induced Diabetes. *Diabetologia*, 216-226.
- Meila, O. d. 2017. Uji Aktivitas Antidiabetes dari Ekstrak Metanol Buah Kiwi (*Actinidia deliciosa*) melalui Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase. *Jurnal Farmasi Galenika*, 132-137.
- Miller, G. 1959. Use of Dinitrosalicylicacid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- Oie, H. K., & al, e. 1983. Clonal Analysis of Insulin and Somatostatin Secretion and L-Dopa Decarboxylase Expression by a Rat Islet Cell Tumor. *Endocrinology*, 1070-1075.
- Pathak S, D. H. 2008. Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death. *Pubmed Central Journal*, 799-807.
- Pathak S., D. H. 2008. Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death. *Pubmed Central Journal*, 799–807.
- Rohdiana, D., & al, e. 2012. Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Teh Hijau pada Tikus Putih. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*, 32-39.
- Soelistijo, A. S. 2015. *Konsensus Pengolahan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia 2015*. Jakarta: PB PERKENI.
- Sukandar, D. e. 2012. Uji Aktivitas Antidiabetes Fraksi Etil Asetat Daun Pandan Wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) dengan Metode α -Glukosidase. *Valensi*, 534-540.
- Susilawati, E., Adnyana, I. K., & Fisher, N. 2016. Kajian Aktivitas Antidiabetes dari Ekstrak Etanol dan Fraksinya dari Daun Singalawang (*Petiveria alliacea* L.). *PHARMACY*, 182-191.
- Uddin, N., & al, e. 2014. In vitro α -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of *Citrus macroptera* Montr. Fruit. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 473-479.
- Vo, T. H., Tran, N., Nguyen, D., & Le, L. 2016. An In Silico Study on Antidiabetic Activity of Bioactive Compounds in *Euphorbia thymifolia* Linn. *SpringerPlus*, 1359-1371.
- Wang, N. S. 2009. *Experiment no. 5: Starch Hydrolysis by Amylase*. College Park: University of Maryland.
- Wells, G. B., Dipiro, T. J., Schwinghammer, L. T., & Dipiro, V. C. 2015. *Pharmacotherapy Handbook Ninth Edition*. New York: McGraw-Hill Education.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. 2006. A Quantitative Starchiodine Method for Measuring Alpha-Amylase and Glucoamylase Activities. *Analytical Biochemistry*, 146-148.
- Yanto, A. R., Mahmudati, N., & Susetyorini, R. E. 2016. Seduhan Jahe (*Zingiber officinale* Rosce.) dalam Menurunkan Kadar Glukosa darah Tikus Model Diabetes Tipe-2 (NIDDM) Sebagai Sumber Belajar Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*, 258-264.