

Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kulit Buah Salak Manonjaya dengan Ikan Zebra (*Danio rerio*) Sebagai Hewan Model

*Antidiabetic Activity of Manonjaya Snakefruit Skin Extract with Zebra Fish (*Danio rerio*) as Animal Model*

Penulis Eti Rohaeti^{1*}, Dea Nurafifah¹, Irmanida Batubara^{1,2}

Afiliasi ¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jl. Kamper, Babakan, Kec. Dramaga, Kabupaten Bogor, Jawa Barat 16680
²Pusat Studi Biofarmaka Tropika, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat., Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Taman Kencana, Jl. Taman Kencana No.3, RT.03/RW.03, Babakan, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor, Jawa Barat 16128

Kata Kunci

- fraksionasi
- ikan zebra
- inhibitor α -glukosidase
- KLT bioautografi

Keywords

- *fractionation*
- *zebra fish*
- *α -glucosidase inhibitor*
- *bioautographic TLC*

Diterima 20 Juli 2020

Direvisi 29 November 2022

Disetujui 30 November 2022

***Penulis Koresponding**

Eti Rohaeti

email:

etirohaeti@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Penelitian bertujuan menentukan fraksi aktif dan profil senyawa aktif pada ekstrak kulit buah salak Manonjaya yang berperan sebagai antidiabetes serta menentukan aktivitas antidiabetes menggunakan hewan uji berupa ikan zebra. Kulit buah diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian difraksionasi menggunakan n-heksana, etil asetat dan metanol. Fraksi etil asetat menunjukkan rendemen dan kadar fenolik total tertinggi juga penghambatan α -glukosidase paling kuat dengan persen inhibisi sebesar 64.43%. Fraksi etil asetat memberikan spot teraktif sebagai inhibitor α -glukosidase. Profil senyawa aktif yang berperan sebagai senyawa antidiabetes ialah flavonoid dari golongan glikosilflavon dan flavon. Aktivitas antidiabetes menggunakan ikan zebra, menunjukkan ekstrak kasar etanol dan fraksi etil asetat dapat menurunkan kadar gula darah ikan zebra yang diinduksi dengan aloksan. Kelompok ekstrak kasar memiliki kadar gula 54.51% lebih rendah dibandingkan kelompok induksi dan 41.70% lebih rendah dibandingkan kontrol negatif. Sementara kelompok fraksi etil asetat memiliki kadar gula 65.10% lebih rendah dibandingkan kelompok induksi dan 55.27% lebih rendah dibandingkan kontrol negatif.

ABSTRACT

This research aimed to determine the active fraction and profile of active compounds in Manonjaya snakefruit skin extract that can be used as antidiabetic and the antidiabetic activity using zebra fish. Manonjaya snakefruit skin was extracted by maceration using 70% ethanol and then fractionated using n-hexane, ethyl acetate and methanol. The ethyl acetate fraction showed the highest yield and total phenolic content as well as the strongest α -glucosidase inhibition with an inhibition percentage of 64.43%. The ethyl acetate fraction provided the most active spot as an α -glucosidase inhibitor. The profile of active compounds that act as antidiabetic compound is flavonoid from glycosylflavone and flavone groups. Antidiabetic activity using zebra fish was indicates that Manonjaya snakefruit skin extract from ethanol extract and ethyl acetate fraction can decrease blood sugar level of zebra fish after induced with alloxan. The crude extract group had 54.51% lower sugar content than the induction group and 41.70% lower than the negative control. Meanwhile, the ethyl acetate fraction group had 65.10% lower sugar content than the induction group and 55.27% lower than the negative control.



PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang berlangsung kronik dimana penderita diabetes tidak bisa memproduksi insulin dalam jumlah yang cukup atau tidak mampu menggunakan insulin secara efektif sehingga terjadi kelebihan gula dalam darah dan baru dirasakan setelah terjadi komplikasi lanjut pada organ tubuh (Misnadiarly, 2006). Diabetes melitus yang paling banyak diderita oleh masyarakat adalah diabetes melitus tipe 2, dimana tidak disebabkan oleh rasio insulin di dalam sirkulasi darah melainkan akibat kelainan dari metabolisme, yaitu meningkatnya kadar glukosa dalam darah akibat terlalu banyak mengonsumsi makanan yang mengandung karbohidrat dan gula. Mengontrol kadar gula dalam darah merupakan salah satu cara untuk mengobati diabetes melitus tipe 2 sehingga dapat menunda absorpsi glukosa, salah satu caranya yaitu dengan menghambat enzim α -glukosidase (Yuhao 2005). Enzim α -glukosidase merupakan enzim yang mampu memecah molekul karbohidrat menjadi glukosa pada dinding usus halus. Inhibisi kerja enzim α -glukosidase dapat mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks dan absorpsinya sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa dalam darah. Indonesia memiliki tanaman dan buah yang mampu menghambat enzim α -glukosidase, namun sebagian besar belum dapat dibuktikan secara ilmiah.

Buah salak (*Salacca edulis* Reinw) merupakan salah satu buah yang sangat melimpah di Indonesia. Buah ini merupakan buah khas dari Indonesia yang dapat ditemukan hampir di setiap daerah. Selain itu, buah salak digemari oleh masyarakat karena memiliki rasa yang bervariasi bergantung tempat tumbuhnya. Di Indonesia semua bagian salak dapat dimanfaatkan, seperti buahnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan, bijinya dapat dibuat menjadi kopi (Nazaruddin & Kristiawati 1992). Kulit salak merupakan limbah yang biasanya tidak digunakan lagi, tetapi ada sebagian kecil masyarakat yang menggunakan kulit salak dan mempercayai bahwa jika meminum air seduhan kulit salak dapat mengurangi penyakit diabetes.

Hasil uji fitokimia pada kulit dan daging buah salak membuktikan terdapatnya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, hidrokuinon, steroid, dan tanin serta beberapa jenis salak tertentu mengandung saponin (Rohaeti *et al*, 2017). Penelitian tersebut menggunakan buah salak dari Cililin, Tasikmalaya, dan Taman Buah Mekarsari serta ekstraknya diuji aktivitas antidiabetesnya dengan cara uji inhibisi α -glukosidase. Nilai IC50 menunjukkan bahwa ekstrak yang berpotensi

sebagai antidiabetes adalah ekstrak kulit buah salak Manonjaya sebesar 17.9 μ l/mL. Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase ini berhubungan dengan tingginya kadar fenol dan flavonoid totalnya.

Berdasarkan jenis senyawa aktif yang berperan sebagai antidiabetes pada ekstrak kulit buah salak Manonjaya dan profil senyawa aktif menggunakan kromatografi lapis tipis telah yang dilaporkan tersebut, maka perlu dilakukan analisis lebih lanjut mengenai aktivitas antidiabetes ekstrak kulit buah salak Manonjaya secara *in vivo* menggunakan ikan zebra sebagai hewan model. Ikan zebra dipilih sebagai hewan model sebab telah dilaporkan kecocokan hewan ini untuk pengamatan penyakit akibat gangguan metabolik termasuk diabetes melitus. Ikan zebra dapat dibuat berkondisi hiperglikemik melalui pemberian agen diabetogenik seperti streptozotocin dan alloxan (Utami 2018). Ikan zebra adalah hewan model unik untuk penelitian biomedis, termasuk studi proses biologis dan penyakit manusia. Ikan zebra memiliki semua organ utama yang terlibat dalam proses metabolisme dan dapat digunakan untuk mempelajari beberapa gangguan metabolisme manusia seperti diabetes melitus tipe 2, dislipidemia, dan penyakit hati (Teame *et al* 2019). Ikan zebra memiliki keunggulan sebagai hewan uji sebab berukuran tubuh kecil, berkemampuan reproduksi tinggi, dan memiliki embrio yang transparan, mampu menyerap bahan-bahan larut air (Amsterdam & Hopkins 2006; Rubistein *et al*. 2006, Khan dan Alhewairini 2018). Sebagai hewan bertulang belakang, ikan zebra memiliki kesamaan genetik dan psikologi dengan mamalia (Shin *et al*. 2012) dan memiliki fisiologi berbasis sistem insulin mamalia. Penelitian ini bertujuan menentukan fraksi aktif dan profil senyawa aktif pada ekstrak kulit buah salak Manonjaya yang berperan sebagai antidiabetes serta menentukan aktivitas antidiabetes menggunakan hewan uji berupa ikan zebra.

METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex), penguap putar, Gluco Strip Test, Accu Check, tanur, oven pengering, eksikator, mikropelat 96-sumur, akuarium, pompa, bejana kromatografi, dan pelat KLT GF254. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah salak Manonjaya dari daerah Tasikmalaya, n-butanol, asam asetat glasial, akuades, etil asetat, n-heksana, metanol, etanol pa, etanol 70% (v/v), akuades, glukosa, enzim α -glukosidase, bufer fosfat pH 7.0, substrat pnitrofenil α -



D-glukopiranos, tablet metformin, HCl 2 N, Na₂CO₃, NaCl 0.9% (v/v), Folin-Ciocalteu 10% (v/v), AlCl₃ 10% (b/v), CH₃COOK 1 M, asam galat, kuersetin, DMSO, ikan zebra, aloksan, dan pakan kering tetramin.

Koleksi dan Preparasi

Sampel (**Gambar 1**) dikoleksi dari kebun salak yang berada di Desa Kalimanggis Kecamatan Manonjaya, Tasikmalaya. Selanjutnya dilakukan pemisahan kulit dengan buah salak, perajangan, dan pengeringan. Setelah sampel sudah kering, sampel digiling sehingga didapatkan simplisia yang berukuran 80 mesh.



Gambar 1. Buah Salak Manonjaya yang Digunakan dalam Penelitian

Ekstraksi Kulit Buah Salak

Simplisia kering kulit buah salak diekstraksi dengan etanol 70% (v/v). Perbandingan sampel dan pelarut etanol sebesar 1:3 menggunakan metode maserasi selama 24 jam, dilakukan triplo. Ekstrak yang telah didapat kemudian diuapkan dengan penguap putar pada suhu 30-40°C sehingga diperoleh ekstrak kasar.

Penentuan Kadar Fenolik Total

Kadar fenolik total ditentukan berdasarkan metode Amarowicz *et al.* (2004), Swain dan Hillis (1959), Nacz dan Shahidi (1989) dan modifikasi prosedur dari pengukuran menggunakan mikropelat 96-sumur. Sebanyak 10 µl larutan ekstrak diambil dan dimasukkan ke dalam mikropelat 96-sumur, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 160 µl. Setelah tercampur, ditambahkan sebanyak 10 µl reagen Folin-Ciocalteu 10% (v/v) dan 20 µl larutan Na₂CO₃ 7% (b/v). Lalu campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, pengukuran dilakukan triplo. Absorbans diukur pada panjang gelombang 750 nm dengan microplate reader. Kadar fenolik total sampel ditentukan sebagai nilai ekuivalen asam galat (EAG) yang dihitung berdasarkan kurva kalibrasi yang dibuat dari absorbans larutan

standar asam galat pada konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25 dan 3,125 ppm.

Penentuan Kadar Flavonoid Total

Kadar flavonoid total ditentukan berdasarkan metode Chang *et al.* (2002) dengan modifikasi. Sebanyak 10 µl larutan ekstrak dimasukkan ke dalam mikropelat 96-sumur, kemudian ditambahkan 60 µl etanol, 10 µl AlCl₃ 10% (b/v), 10 µl CH₃COOK 1 M dan 120 µl akuades. Lalu campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, pengukuran dilakukan triplo. Absorbans diukur pada panjang gelombang 415 nm dengan *microplate reader*. Kadar flavonoid total ditentukan berdasarkan ekuivalen kuersetin (EK) dari kurva kalibrasi larutan standar kuersetin pada konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25 dan 3,125 ppm.

Fraksinasi

Ekstrak kasar yang diperoleh difraksinasi menggunakan pelarut non polar, semi polar, dan polar. Ekstrak etanol kulit salak dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut non polar yaitu n-heksana dengan perbandingan ekstrak:pelarut (1:1). Campuran dikocok selama 5 menit sekali sebanyak 3 kali lalu dibiarkan hingga membentuk dua lapisan. Lapisan atas (lapisan n-heksana) diambil, lapisan bawah kemudian difraksinasi kembali menggunakan pelarut semi polar yaitu etil asetat dengan prosedur yang sama, dan terakhir difraksinasi 4 kembali menggunakan larutan polar yaitu metanol. Ekstrak yang dihasilkan dari ketiga fraksi diuapkan dengan penguap putar. Proses pemisahan dilakukan triplo.

Penentuan Aktivitas Inhibisi α-glukosidase

Sebanyak 10 µL larutan sampel ditambahkan dengan 50 µL bufer fosfat pH 7.00 dan 25 µL larutan substrat p-nitrofenil α-D-glukopiranos, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Campuran ditambahkan 25 µL larutan enzim α-glukoasidase dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37 °C. Setelah selesai diinkubasi, campuran ditambahkan 100 µL Na₂CO₃ 200 mM. Bahan tersebut dimasukkan ke dalam mikropelat 96-sumur. Absorbans sampel dan standar yaitu akarbosa dibaca pada 410 nm.

Bioautografi Inhibitor α-glukosidase

Profil senyawa diuji untuk menentukan fraksi senyawa aktif yang berperan sebagai antidiabetes. Ekstrak ditotolkan pada pelat KLT GF254 menggunakan Linomat, pelat dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang berisi eluen terbaik n-butanol: asam



asetat glasial: air dengan perbandingan 6:2:2, kemudian pelat KLT diangkat dan dikeringkan. Setelah pelat kering kemudian disemprot dengan larutan enzim α -glukosidase dan pelat didokumentasi dan dievaluasi dengan lampu UV 254 dan 366 nm. Kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang dan disemprot dengan substrat p-nitrofenil α -D-glukopiranosida. Spot pita berwarna kuning akan muncul setelah didiamkan pada suhu ruang. Spot tersebut menunjukkan bahwa sampel yang diuji aktif sebagai inhibitor α -glukosidase. Pelat didokumentasi dan dievaluasi pada sinar tampak (Pires *et al.* 2009).

Pemeliharaan dan Persiapan Ikan Zebra

Pemeliharaan dan persiapan ikan zebra sebagai hewan uji adalah sistem sirkulasi akuarium menggunakan filter canister. Sistem aerasinya menggunakan pompa dan selang yang tersambung ke dalam setiap akuarium. Setelah kondisi ruangan dan akuarium siap, ikan zebra sebanyak 200 ekor ditempatkan dalam akuarium dengan ukuran 10 x 15 x 100 cm dan dilakukan masa adaptasi selama 1 bulan. Ikan zebra diberi makan 1 kali sehari dengan pakan kering tetramin sebanyak 4%/ekor/hari (Advash *et al.* 2012).

Induksi Glukosa pada Ikan Zebra

Sebanyak 90 ekor ikan zebra ditempatkan dalam akuarium berisi air keran yang telah didiamkan selama 24 jam. Ikan zebra diinduksi dengan cara perendaman menggunakan larutan aloksan 0.05% (b/v) selama 30 menit, kemudian larutan glukosa 5% (b/v) selama 60 menit, selanjutnya dipindahkan ke dalam akuarium berisi akuades. Induksi dilakukan selama 7 hari pada suhu kamar, larutan aloksan, glukosa dan akuades diganti setiap hari. Jika perwakilan beberapa ekor telah mencapai tingkat hiperglikemia maka ikan zebra telah siap mendapatkan ekstrak. Pengecekan kadar gula darah dilakukan pada hari pertama, ketiga dan ketujuh menggunakan Glucose Strip Test ACCU-CHECK® Active (Shin *et al.* 2012).

Pembuatan Pakan Ekstrak

Pakan kering dimasukkan ke dalam tabung plastik, kemudian ekstrak ditambahkan ke dalam pakan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Proses ini dilakukan sampai ekstrak tercampur sempurna dengan pakan. Variasi nisbah pakan: ekstrak yang dibuat adalah 1:0.6. Untuk kontrol positif menggunakan nisbah pakan: tablet metformin 1:0.6.

Pengujian Ekstrak Kasar dan Ekstrak Fraksi Terpilih dengan Ikan Zebra

Ikan zebra yang telah mengalami diabetes kemudian diberi pakan yang mengandung ekstrak berupa ekstrak kasar dan dari fraksi teraktif yaitu etil asetat selama 3 hari. Kemampuan ekstrak sebagai antidiabetes diukur setelah pemberian pakan ekstrak setiap hari selama 3 hari. Ikan zebra dipindahkan ke dalam wadah berisi air dingin, dengan tujuan membuat ikan zebra pingsan. Setelah pingsan, ikan zebra diangkat dan kelebihan air pada sisik dihilangkan menggunakan tisu. Bobot ikan zebra ditimbang, lalu diletakkan di atas alas keramik dalam posisi melintang, darah diperoleh dengan memotong bagian ekor. Contoh darah ditempelkan pada Glucose Strip Test ACCUCHECK® Active yang akan secara otomatis menyerap darah (Capiotti *et al.* 2014).

Analisis Data

Analisis data-data yang diperoleh dari uji aktivitas antidiabetes ekstrak secara *in vivo* diolah menggunakan software statistical package for social science (SPSS) versi 18. Metode yang digunakan yaitu analisis oneway ANOVA. Analisis ini digunakan untuk menguji adanya perbedaan nilai rerata antar ulangan. Adanya data yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL & PEMBAHASAN

Kadar Fenolik Total, Flavonoid Total, dan Penghambatan α -Glukosidase

Ekstrak kulit buah salak Manonjaya yang didapat sebesar 8.65%. Ekstrak etanol 70% ini mengandung total fenolik sebesar 114.24mg EAG/g ekstrak dan total flavonoid sebesar 16.12 mg EK/g ekstrak (**Tabel 1**). Kadar fenolik total hasil penelitian ini lebih rendah dari penelitian sebelumnya yaitu 136.63 ± 2.43 mg EAG/g ekstrak, sementara total flavonoidnya lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian sebelumnya yaitu 6.45 ± 0.44 mg EK/g ekstrak (Rohaeti *et al.* 2017). Perbedaan kandungan dapat terjadi karena jenis salak berbeda kondisi fisik dengan penelitian sebelumnya. Senyawa golongan fenolik dan flavonoid dapat menghambat kerja enzim α -glukosidase karena mampu menetralkan radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan sel beta pankreas yang memproduksi insulin (Zahid *et al.* 2022).

Ekstrak kulit buah salak Manonjaya memiliki nilai IC_{50} yang baik terhadap enzim α -glukosidase, walaupun tidak sebaik akar bosa yang berperan sebagai kontrol positif (**Tabel 1**). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah salak Manonjaya memiliki potensi sebagai antidiabetes dengan menghambat enzim α -



glukosidase. Jika enzim α -glukosidase dapat dihambat maka katabolisme polisakarida dapat dihambat juga, sehingga dapat mengurangi tingkat kadar gula darah pada penderita diabetes (Prasetyo *et al.* 2019).

Fraksionasi Ekstrak Kulit Salak Manonjaya dan Bioautografi Inhibitor α -Glukosidase

Untuk mengetahui senyawa aktif pada ekstrak etanol 70% kulit salak Manonjaya, dilakukan fraksinasi. Fraksi yang didapat sebanyak tiga fraksi yaitu fraksi *n*-heksana dengan rendemen 0.63%, fraksi etil asetat 0.94% dan fraksi metanol 0.52%. Berdasarkan hasil rendemen tersebut, ekstrak dari fraksi etil asetat memiliki jumlah rendemen yang lebih besar dibandingkan fraksi metanol dan *n*-heksana, hal ini menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak kasar lebih banyak terekstraksi ke dalam pelarut yang bersifat semi polar yaitu etil asetat.

Kandungan total flavonoid, total fenolik dan aktivitas penghambatan enzim alfa glukosidase ketiga fraksi terangkum pada **Tabel 2**. Kadar flavonoid total tertinggi terdapat pada fraksi *n*-heksana, sedangkan kadar flavonoid terendah pada fraksi metanol (**Tabel 2**). Kadar fenolik total tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat, sedangkan kadar fenolik terendah pada fraksi *n*-heksana. Nilai IC_{50} penghambatan kerja enzim alfa glukosidase terbaik ditemukan pada fraksi metanol walaupun tidak berbeda nyata dengan kedua fraksi lainnya. Nilai IC_{50} ini lebih besar dibandingkan nilai IC_{50} ekstrak etanol 70%. Hal ini menunjukkan bahwa setelah difraksinasi, aktivitas penghambatan kerja enzim alfa glukosidase menurun. Aktivitas inhibisi pada fraksi *n*-heksana 33.52%, fraksi etil asetat 64.43%, dan fraksi metanol 16.87%. dengan kontrol positif yaitu akar bosa

memiliki aktivitas inhibisi 88.73% pada konsentrasi 2000 ppm. Berdasarkan persen inhibisi dari ketiga fraksi yang memiliki aktivitas inhibisi terbaik yaitu fraksi etil asetat. Pada riset tahap selanjutnya digunakan fraksi etil asetat sebagai fraksi untuk diuji secara *in vivo* menggunakan ikan zebra.

Penentuan komponen senyawa aktif antidiabetes ditentukan menggunakan KLT Bioautografi. KLT Bioautografi adalah metode kromatografi yang dapat memisahkan dan mengetahui aktivitas dari suatu metabolit sekunder. Ekstrak dari kulit buah salak Manonjaya ditentukan profil senyawanya dilihat dari warna noda pada sinar UV 254 dan 366 nm dan menentukan senyawa tersebut aktif sebagai antidiabetes dilihat dari warna noda pada sinar tampak. Pada deteksi UV 254 nm noda warna hitam yang terbentuk dapat menunjukkan adanya senyawa flavonoid, lignin, alkaloid dan triterpena. Markham (1988) menyatakan bahwa noda berwarna biru pada deteksi UV 366 nm menunjukkan adanya golongan flavonoid. Pada deteksi UV 366 nm semua noda berwarna biru, hal ini menandakan semua noda menunjukkan adanya golongan flavonoid.

Noda pada bioautogram antidiabetes ekstrak kulit buah salak Manonjaya yang menunjukkan aktif sebagai antidiabetes ialah noda yang warna kuningnya memudar pada pelat KLT berwarna putih pada sinar tampak setelah disemprot oleh enzim α -glukosidase (**Gambar 2**). Spot aktif sebagai antidiabetes terdapat pada spot fraksi etil asetat dan ekstrak kasar (**Tabel 3**). Setelah diidentifikasi nilai R_f dan warna noda yang dihasilkan pada UV 254 nm, 366 nm dan sinar tampak (**Tabel 4**), diduga pada spot fraksi etil asetat noda yang aktif ialah pada R_f 0.55 (kuning seulas) merupakan

Tabel 1. Kadar Fenolik Total, Flavonoid Total, dan Nilai IC_{50} Ekstrak Kasar

Sampel	Total Fenolik (mg EAG/g ekstrak)	Total Flavonoid (mg EK/g ekstrak)	IC_{50} (μ g/mL)
Kulit Salak Manonjaya	114.24 \pm 17.29	16.12 \pm 0.18	1.37
Akar bosa	-	-	0.012

Tabel 2 Kadar Fenolik Total, Flavonoid Total, dan Nilai IC_{50} Alfa Glukosidase Fraksi

Fraksi	Total Flavonoid (mg EK/g ekstrak)	Total Fenolik (mg EAG/g ekstrak)	IC_{50} alfa glukosidase (μ g/mL)
<i>n</i> -heksana	398.98	40.82	2.88
etil asetat	149.59	1086.73	3.08
Methanol	81.63	168.37	2.86



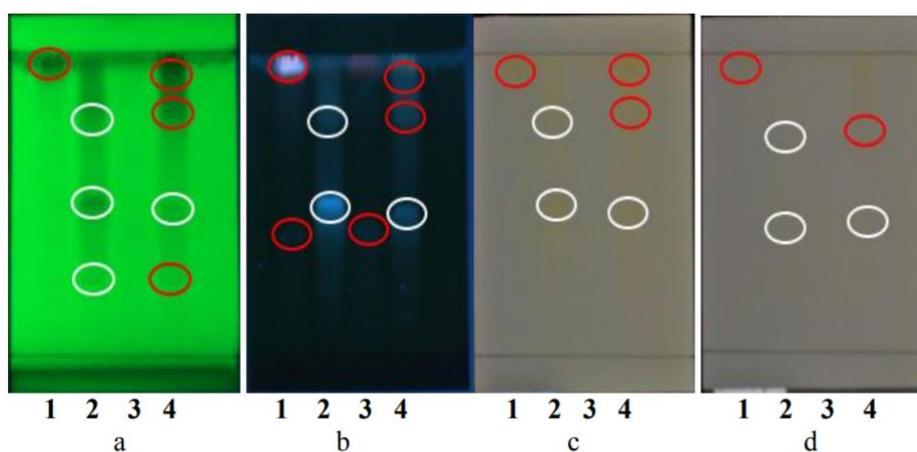
golongan glikosilflavon senyawa isoviteksin dan pada Rf 0.78 (kuning seulas) diduga merupakan golongan flavon senyawa luteolin. Pada spot ekstrak kasar noda dengan Rf 0.56 (kuning seulas) diduga merupakan golongan glikosilflavon senyawa isoviteksin (Harborne 1987). Berdasarkan pada rendemen, kadar flavonoid dan fenolik, dan aktivitas inhibisi yang paling tinggi, serta memiliki spot paling aktif pada KLT bioautografi, maka fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif yang selanjutnya ditentukan aktivitas antidiabetes secara in vivo dengan ikan zebra (*Danio rerio*).

Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kulit Salak Manonjaya Secara in vivo

Pada penelitian ini, ikan zebra dibagi ke dalam 6 kelompok yaitu kelompok induksi (kelompok yang

diinduksi aloksan selama percobaan), kelompok kontrol negativef (kelompok yang diinduksi aloksan selama tujuh hari kemudian diberi pakan standar tanpa induksi), kelompok kontrol positif (kelompok yang diinduksi aloksan selama percobaan dan diberi metformin), kelompok ekstrak kasar (kelompok yang diinduksi aloksan selama percobaan dan diberi ekstrak kasar kulit buah salak Manonjaya), kelompok fraksi etil asetat (kelompok yang diinduksi aloksan selama percobaan dan diberi fraksi etil asetat), dan kelompok normal (kelompok yang tidak diinduksi aloksan sama sekali).

Perubahan gula darah ikan zebra pada tiap kelompok selama 3 hari perlakuan terangkum pada **Tabel 4**. Kelompok yang hanya diinduksi aloksan selama percobaan memiliki kadar gula darah yang



Gambar 2. Kromatogram Ekstrak Kulit Salak (a) 254nm, (b) 366nm, (c) Sinar Tampak dan Bioautogram (d) Sinar Tampak

Keterangan: (1) fraksi n-heksana, (2) fraksi etil asetat (3) fraksi metanol, (4) ekstrak kasar. Bulatan putih menunjukkan noda aktif dan merah menunjukkan noda tidak aktif dalam menghambat enzim

Tabel 3. Identifikasi Golongan Senyawa Aktif berdasarkan Nilai Rf dan Warna Pita pada KLT Bioautografi

Sampel	Rf x100				Golongan	Senyawa	Aktivitas	Struktur
	UV 254nm	UV 366nm	Sinar tampak	α-glukosidase				
Ekstrak kasar etanol	31 (hijau)	-	-	-	Glikosiflavon	Orientin (aglikon luteolin)	-	5,7,3',4'-OH
Fraksi etil asetat	31 (hijau)	-	-	-	Glikosiflavon	Orientin (aglikon luteolin)	-	5,7,3',4'-OH
Fraksi n-heksana	-	47 (biru)	-	-	-	-	-	-
Fraksi metanol	-	48 (biru)	-	-	-	-	-	-
Fraksi etil asetat	55 (hijau)	55 (biru)	55 (kuning)	55 (kuning seulas)	Glikosiflavon	Isoviteksin (aglikon apigenin)	Aktif	5,7,4'-OH
Ekstrak kasar etanol	56 (hitam)	56 (biru)	56 (kuning)	56 (kuning seulas)	Glikosiflavon	Isoviteksin (aglikon apigenin)	Aktif	5,7,4'-OH
Fraksi etil asetat	78 (hitam)	78 (biru)	78 (kuning)	78 (kuning seulas)	Flavon	Luteolin	Aktif	5,7,3',4'-OH
Ekstrak kasar etanol	80 (hitam)	80 (biru)	80 (kuning)	-	Flavon	Luteolin	-	5,7,3',4'-OH
Ekstrak kasar etanol	89 (hitam)	90 (biru)	89 (kuning)	89 (kuning)	Flavon	Apigenin	-	5,7,4'-OH
Fraksi n-heksana	90 (hitam)	89 (biru)	90 (kuning)	90 (hijau)	-	-	-	-



Tabel 4 Rerata Gula Darah Ikan Zebra

Kelompok	Perlakuan 7 hari pertama	Perlakuan 3 hari selanjutnya	Rerata gula darah (mg/dL) pada perlakuan 3 hari		
			Hari 1	Hari 2	Hari 3
Induksi	Induksi aloksan	induksi aloksan, pakan standar	70.33 ± 21.50b	78 ± 12.77c	85 ± 5.29d
Kontrol negatif	Induksi aloksan	pakan standar	57 ± 21.50b	41.33 ± 11.06ab	66.33 ± 0.58cd
Kontrol positif	Induksi aloksan	Induksi aloksan, pakan standar, metformin	34.67 ± 9.07ab	34.67 ± 18.58ab	49.33 ± 29.48bc
Ekstrak kasar	Induksi aloksan	Induksi aloksan, pakan standar, ekstrak kasar	44 ± 28.16ab	63 ± 18.19bc	38.67 ± 15.04ab
Fraksi etil asetat	Induksi aloksan	Induksi aloksan, pakan standar, fraksi etil asetat	37.33 ± 3.21ab	53 ± 17.35bc	29.67 ± 9.07ab
Normal	Tanpa induksi	Pakan standar	16 ± 3.46a	20.33 ± 8.08a	12.67 ± 2.08a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji lanjut Duncan dengan tingkat kepercayaan 95% ($P > 0.05$).

tinggi dan meningkat dari hari ke harinya. Induksi menggunakan aloksan telah dapat meningkatkan kadar gula darah pada ikan zebra. Menurut Jorgens *et al.* (2012) pada ikan zebra dewasa kadar gula darah normalnya sekitar 50-75 mg/dL, karena telah melewati batas kadar gula darah normal pada ikan zebra dan telah mengalami persentase kenaikan kadar gula darah normal yang tinggi, maka ikan zebra dapat dikatakan telah mencapai kondisi hiperglikemia atau telah mengalami diabetes. Kelompok kontrol negatif, masih memiliki kadar gula darah pada rentang normal yaitu paling tinggi 66.33 mg/dL pada hari ketiga setelah tidak diinduksi aloksan. Hal ini menunjukkan adanya *self recovery* pada ikan zebra setelah air tempat hidupnya tidak mengandung aloksan (Wang *et al.* 2022). Kelompok kontrol positif memiliki kadar gula darah yang lebih rendah 25.75% dibandingkan kontrol negatif dan 42.00% lebih rendah dibandingkan kelompok induksi, namun belum mampu mencapai kadar gula darah kelompok normal. Hal ini menunjukkan bahwa metformin dapat menurunkan gula darah dengan cara meregenerasi sel beta di pankreas dalam merangsang pembentukan hormon insulin. Kelompok ekstrak kasar dan kelompok fraksi etil asetat mampu menurunkan kadar gula darah lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kelompok ekstrak kasar memiliki kadar gula 54.51% lebih rendah dibandingkan kelompok induksi dan 41.70% lebih rendah dibandingkan kontrol negative. Sementara kelompok fraksi etil asetat memiliki kadar gula 65.10% lebih rendah dibandingkan kelompok induksi dan 55.27% lebih rendah dibandingkan kontrol negative.

Hasil uji oneway ANOVA terhadap kadar gula darah setelah induksi dan setelah diberi perlakuan

menunjukkan bahwa pada hari 1 ($P > 0.05$), maka secara statistika tidak berbeda nyata artinya tidak ada perubahan yang signifikan antara gula darah setelah induksi dan setelah diberi perlakuan. Pada hari 2 ($P < 0.05$) secara statistika berbeda nyata artinya ada perubahan yang signifikan pada penurunan kadar gula darah ikan zebra yang telah mengalami diabetes, maka dilanjutkan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan pada setiap perlakuan dan perlakuan mana yang memberikan pengaruh signifikan. Hasil uji Duncan, gula darah setelah induksi tidak berbeda nyata dengan kelompok ekstrak kasar dan fraksi aktif, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah salak belum mampu menurunkan kadar gula darah pada ikan secara signifikan. Pada hari 3 ($P < 0.05$) secara statistika berbeda nyata artinya ada perubahan yang signifikan. Hasil uji Duncan, gula darah ikan zebra setelah induksi tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif, tetapi berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif, ekstrak kasar, fraksi aktif dan kelompok normal. Hal ini menunjukkan bahwa secara statistika obat metformin sebagai kontrol positif dan ekstrak kulit buah salak telah mampu menurunkan kadar gula darah ikan zebra yang mengalami diabetes. Kelompok yang memberikan pengaruh signifikan pada penurunan kadar gula darah ikan zebra adalah kelompok ekstrak kasar dan fraksi aktif.

Aktivitas hipoglikemia pada ekstrak kulit buah salak diduga muncul karena kulit buah salak memiliki senyawa inhibitor α -glukosidase. Senyawa ini berperan dalam proses menghambat pencernaan karbohidrat kompleks menjadi glukosa, sehingga asupan glukosa dari usus kedalam darah dapat dikurangi. Selain itu, flavonoid memiliki kemampuan merangsang



pengeluaran insulin dengan cara meregenerasi sel beta pankreas. Flavonoid juga mampu berperan sebagai antioksidan untuk menangkap radikal bebas yang dihasilkan setelah diinduksi menggunakan aloksan (Nurishmaya 2014). Flavonoid yang diduga memiliki aktivitas hipoglikemia pada hewan uji yang diinduksi aloksan adalah dari golongan glikosiflavan dan flavon yang terdapat pada ekstrak kulit buah salak.

SIMPULAN

Fraksi aktif dari ekstrak kasar etanol kulit buah salak Manonjaya adalah fraksi etil asetat dengan nilai rendemen tertinggi 0.94%, kadar fenolik total tertinggi 1087 mg ekuivalen asam galat/g ekstrak, kadar flavonoid total tertinggi 150 mg ekuivalen kuersetin/g ekstrak, penghambatan α -glukosidase paling kuat berdasarkan persen inhibisi 64.43% dan yang memberikan spot teraktif sebagai inhibitor α -glukosidase. Profil senyawa aktif yang berperan sebagai senyawa antidiabetes ialah flavonoid dari golongan glikosiflavan dan flavon. Aktivitas antidiabetes menggunakan ikan zebra, menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah salak Manonjaya dari ekstrak kasar etanol dan fraksi etil asetat dapat menurunkan kadar gula darah ikan zebra yang diinduksi dengan aloksan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Keluarga Ibu Siti Rahma di Tasikmalaya yang telah menyediakan sampel. Riset ini juga didanai oleh kegiatan Bantuan Penguatan Kelembagaan Pusat Unggulan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Perguruan Tinggi tahun 2019 kepada Pusat Studi Biofarmaka Tropika LPPM IPB dengan nomor kontrak 212/301196/III/2019.

DAFTAR PUSTAKA

Amarowicz R, R.B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J. A. Weil. 2004. Free- radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84: 551-562.

Advsh *et al.* 2012. Regular care and maintenance of a ikan zebra (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of Visualized Experiments*. 69(4196):1- 8.

Amsterdam A and Hopkins N. (2006). Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet*. 22(9):473-478.

Capiotti KM, Junior RA, Kist LW, Bogo RM, Bonan CD, Silva RSD. 2014. Persistent impaired glucose

metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 171: 58-65.

- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Analytical*. 10: 178-182.
- Harborne JB. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Bandung (ID): ITB.
- Jorgens K, Hillebrands JL, Hammes HP, Kroll J. 2012. Zebrafish: a model for understanding diabetic complication. *Experimental Clinic Endocrinol Diabetes*. 120: 186-187.
- Khan, F.R. dan Alhewairini, S.S. 2018. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. <https://www.intechopen.com/chapters/64178>.
- Markham KR. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Bandung (ID): ITB.
- Misnadiarly. 2006. Diabetes Mellitus: Gangren, Ulcer, Infeksi, Mengenal Gejala, Menanggulangi dan Mencegah Komplikasi. Jakarta. Pustaka Populer Obor.
- Nacz N, F. Shahidi. 1989. The effect of methanolammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chemistry*. 31: 159-164.
- Nazaruddin, Kristiawati. 1992. 18 Varietas Salak. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Nurishmaya MR. 2014. Pendekatan bioinformatika formulasi jamu baru berkhasiat antidiabetes dengan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai hewan model [Skripsi]. FMIPA Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pires S, Hmicha B, Marston A, Hostettmann K. 2009. A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts. *Phytochemical Analysis*. 20:511-515.
- Prasetyo, A. ., Mumpuni, E. ., & R. Tjandrawinata, R. . (2019). Docking Molekular dari *Trigonella foenum-graceum* sebagai Antidiabetes menggunakan Molegro Virtual Docking. *Jurnal Jamu Indonesia*, 4(2), 74–80. <https://doi.org/10.29244/jji.v4i2.132>
- Rahmawati A. 2009. Kandungan fenol total ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*). [Skripsi]. Jakarta (ID): Universitas Indonesia.
- Rohaeti E, Fauzi M R, Batubara I. 2017. Inhibition of α -glucosidase, total phenolic content and flavonoid content on skin fruit and flesh extracts of some varieties of snakes fruits. *Earth and Environmental Science*. doi:10.1088/1755-1315/58/1/012066.
- Rubistein AL. 2006. Zebrafish assay for drug toxicity screening. *Toxicol*. 2(2):231-240.



- Sahputra FM. 2008. Potensi ekstrak kulit dan daging buah salak sebagai antidiabetes [Skripsi]. FMIPA Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Shin E, Hong B N, and Kang T H. 2012. An optimal establishment of acute hyperglycemia fish zebra model. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 6(42): 2922-2928.
- Sudjadi A, Rohman. 2004. Analisis Obat dan Makanan. Yogyakarta (ID): Yayasan Farmasi Indonesia.
- Swain T, W. E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal Science Food Agriculture*. 10: 63-68.
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C. Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Dua, M. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*. 9(3):68-77.
- Utami, N. 2018. Zebrafish (*Danio rerio*) sebagai hewan model diabetes mellitus. *BioTrens* 9(1):15-19.
- Wang, L., Ma, J., Wu, W., Fang, Y., Liu, F., Yang, Q., Hu, X., Gu, X., He, Z., Sun, D. Jin, L., Zhang, X., 2022. Effect of aerobic exercise as a treatment on type 2 diabetes mellitus with depression-like behavior zebrafish, *Life Sciences*, 300, 120578, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120578>.
- Yuhao L. 2005. Punica granatum flower extract, a potent α -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 239-244.
- Zahid, H.F., Ali, A., Ranadheera, C.S., Fang, Z., Dunshea, F.R., Ajlouni, S. 2022. In vitro bioaccessibility of phenolic compounds and alpha-glucosidase inhibition activity in yoghurts enriched with mango peel powder, *Food Bioscience* 50, Part A, 102011, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102011>.

