

Kajian Senyawa Aktif Penghambat Alpha Glukosidase Dari *Artabotrys* sp. Menggunakan Metode Metabolomik Dan Penambatan Molekuler = Research of Alpha Glucosidase Inhibitor Active Compound Potency from *Artabotrys* sp Using Metabolomic and Molecular Docking

Dela Rosa, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920552197&lokasi=lokal>

Abstrak

Diabetes mellitus tipe II adalah penyakit gangguan metabolik yang gejalanya adalah hiperglikemia atau tingkat glukosa darah yang meningkat, yang disebabkan oleh rusaknya fungsi insulin baik dalam sekresi, kerja, atau keduanya. Penyakit ini adalah penyakit menahun yang bisa menyebabkan berbagai komplikasi. Salah satu pendekatan untuk mengobati penyakit diabetes mellitus tipe II adalah dengan memperlambat penyerapan glukosa melalui penghambatan -glukosidase. Enzim -glukosidase akan mengkatalisis hidrolisis gula kompleks, termasuk karbohidrat, menjadi glukosa yang bisa diserap dalam usus. Dengan demikian penghambatan -glukosidase akan menghambat pembentukan glukosa yang bisa diserap usus, yang kemudian akan memperlambat kenaikan tingkat glukosa darah. Banyaknya penderita diabetes mellitus tipe II mendorong usaha untuk mencari senyawa aktif penghambat -glukosidase baru dari bahan alam, yang diharapkan mempunyai efikasi yang lebih baik atau lebih mudah diekstrak atau disintesis daripada yang ada sekarang. Penelitian ini bertujuan untuk mencari senyawa aktif penghambat -glukosidase dari bahan alam yang ada di Indonesia, khususnya dari tanaman *Artabotrys* sp. Ada 4 jenis tanaman *Artabotrys* sp. yang diteliti keaktifan ekstrak etanolnya terhadap penghambatan -glukosidase: *Artabotrys hexapetalus* (daun dan kulit batang), *Artabotrys suaveolens* (daun dan kulit batang), *Artabotrys blumei* (batang dan ranting), dan *Artabotrys sumatranus* (daun dan ranting). Hasil pengujian menggunakan bioassay menunjukkan bahwa ekstrak etanol yang memiliki aktivitas penghambatan -glukosidase terkuat adalah dari daun *A. sumatranus*, disusul berturut-turut oleh ranting *A. sumatranus*, daun *A. suaveolens*, kulit batang *A. hexapetalus*, kulit batang *A. suaveolens*, batang *A. blumei*, ranting *A. blumei*, dan terakhir daun *A. hexapetalus*. Skrining juga dilakukan dengan pengujian bioassay DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan FRAP (ferric ion reducing antioxidant power) untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol *Artabotrys* sp. yang ada, dan didapatkan bahwa secara umum aktivitas penghambatan -glukosidase mempunyai relasi positif dengan aktivitas antioksidan. Analisis tes total fenolik, total flavonoid, tes aktivitas antioksidan (DPPH dan FRAP), dan tes aktivitas penghambatan -glukosidase; serta relasi antara tes-tes tersebut, menghasilkan prediksi golongan senyawa aktif penghambat -glukosidase pada ekstrak *Artabotrys* sp. dan relasinya terhadap aktivitas antioksidan. Prediksi tahap skrining ini secara umum dikonfirmasi oleh hasil penambatan molekuler pada senyawa-senyawa yang teridentifikasi dari analisis LC-MS/MS (liquid chromatography – tandem mass spectrometry) pada ekstrak yang ada. Penelitian lalu difokuskan pada ekstrak daun *A. sumatranus* yang memiliki potensi yang paling tinggi dalam penghambatan -glukosidase dan memiliki aktivitas antioksidan yang terkuat dibandingkan ekstrak *Artabotrys* sp. yang lain. Perbandingan antara hasil tes aktivitas antioksidan dan penghambatan -glukosidase, serta tes total fenolik dan total flavonoid, memberikan indikasi bahwa kebanyakan senyawa penghambat -glukosidase pada daun *A. sumatranus* memiliki aktivitas antioksidan, dan berasal dari golongan fenolik dan flavonoid. Teknik metabolomik tak bertarget berbasis LC-MSn dengan menggunakan analisis statistik multivariat dan machine learning lalu

dipakai untuk memprediksi senyawa aktif penghambat -glukosidase yang juga memiliki aktivitas antioksidan pada daun *A. sumatranus*. Data input adalah data dari 30 sampel ekstrak daun *A. sumatranus* dengan berbagai kombinasi pelarut etanol dan air, serta pengulangannya, dengan 80 variabel independen (fitur) berupa nilai m/z dari senyawa yang terdeteksi pada ekstrak tersebut. Variabel output (target) adalah aktivitas penghambatan -glukosidase (target utama) dan aktivitas antioksidan (dalam bentuk penghambatan DPPH, target sampingan) yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} dan $1/IC_{50}$. Pendekatan analisis statistik multivariat dilakukan dengan berbagai metode yaitu PCA (Principal Component Analysis), PLS (Partial Least Square), OPLS (Orthogonal Partial Least Square), PLS-DA (Partial Least Square – Discriminant Analysis), dan OPLS – DA (Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis). Pendekatan machine learning dilakukan secara bertingkat, dengan yang pertama membuat model prediksi keaktifan ekstrak terhadap penghambatan -glukosidase (dilakukan dengan metode random forest yang memiliki performansi paling baik dibandingkan metode lain), yang lalu dilanjutkan dengan analisis fitur (senyawa) yang paling berpengaruh pada model prediksi keaktifan ekstrak tersebut dengan metode permutasi acak dan SHAP (Shapley additive explanations). Penggabungan hasil metode statistik multivariat dan machine learning menghasilkan prediksi sembilan senyawa aktif penghambat -glukosidase dari daun *A. sumatranus*. Diantara kesembilan senyawa aktif tersebut hanya enam yang dapat teridentifikasi yaitu mangiferin, neomangiferin, norisocorydine, liriioferin, apigenin-7-O-galaktopyranosida, dan 15,16-dihydrotanshinone. Hasil penambatan molekuler menggunakan -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* menunjukkan hanya mangiferin, apigenin-7-O-galaktopyranosida, dan liriioferin yang memiliki energi bebas pengikatan yang lebih negatif (lebih aktif) dibanding acarbose yang digunakan sebagai pembanding. Sedangkan penambatan molekuler menggunakan sebagian dari -glukosidase pada usus manusia mendapatkan hanya norisocorydine saja yang lebih lemah keaktifannya dibandingkan acarbose. Analisis korelasi menunjukkan bahwa senyawa yang diprediksi aktif, termasuk yang belum teridentifikasi, mempunyai aktivitas antioksidan dan terindikasi berasal dari beberapa biosynthesis pathway. Selanjutnya isolasi senyawa aktif penghambat -glukosidase dilakukan dengan metode fraksinasi yang dipandu dengan bioassay, diikuti dengan elusidasi strukturnya. Senyawa aktif yang didapat adalah mangiferin, yang merupakan salah satu senyawa yang diprediksi aktif dari analisis metabolomik, dengan IC_{50} 83,72 $\mu g/ml$ terhadap -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae*. Kontribusi dari penelitian ini adalah memperkaya wawasan kegunaan dan literatur akan *A. sumatranus* yang belum pernah ada publikasinya. Selain itu, penelitian ini berhasil menemukan beberapa senyawa potensial penghambat -glukosidase yang belum pernah dipublikasikan sebelumnya, seperti apigenin-7-O-galactopyranoside, liriioferine, and norisocorydine; selain yang belum teridentifikasi. Hasil penelitian ini dapat dikembangkan selanjutnya menjadi sediaan herbal.

.....Diabetes mellitus type II is a metabolic disease whose symptom is hyperglycemia or elevated blood glucose level, caused by insulin malfunctions, either in its secretion, action, or both. This disease is a chronic disease that can cause many complications. One of the diabetes mellitus treatments is delaying glucose absorption using -glucosidase inhibition. The -glucosidase enzyme will catalyze the hydrolysis of complex sugar, including carbohydrate, into glucose that can be absorbed in the intestine. Therefore, inhibiting -glucosidase will inhibit the production of glucose that can be absorbed in the intestine, which will then slow down the increase of blood glucose. The large number of diabetes mellitus type II patients drives the efforts to find new active -glucosidase inhibitor compounds from natural products, which are hoped to have better efficacies or can be more easily extracted or synthesized compared to the existing ones. This research goal was to find active -glucosidase inhibitor compounds from natural compounds which are

available in Indonesia, especially from *Artabotrys* sp. plants. There are 4 kinds of *Artabotrys* sp. plants whose ethanol extract's activity in α -glucosidase inhibition was investigated: *Artabotrys hexapetalus* (leaf and stem bark), *Artabotrys suaveolens* (leaf and stem bark), *Artabotrys blumei* (stem and twig), and *Artabotrys sumatranus* (leaf and twig). Bioassay test results showed that ethanol extract that had the strongest α -glucosidase inhibition activity was the leaf of *A. sumatranus*, followed in succession by twig of *A. sumatranus*, leaf of *A. suaveolens*, stem bark of *A. hexapetalus*, stem bark of *A. suaveolens*, stem of *A. blumei*, twig of *A. blumei*, and lastly leaf of *A. hexapetalus*. Screening was also done by doing bioassay tests of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (ferric ion reducing antioxidant power) to know about the antioxidant activities of the ethanol extracts of the available *Artabotrys* sp., and it was found out that in general α -glucosidase inhibition activity had positive relation to antioxidant activity. Analyses of total phenolic test, total flavonoid test, antioxidant activity tests (DPPH and FRAP), and α -glucosidase inhibition activity test; as well as the relation between those tests, lead to predictions of the groups of the active α -glucosidase inhibitor compounds in the extract of *Artabotrys* sp. and their relations to antioxidant activity. These predictions in the screening stage were in general confirmed by the results of molecular docking of the identified compounds from LC-MS/MS (liquid chromatography – tandem mass spectrometry) analyses on the available extracts. The research was then focused on the leaf extract of *A. sumatranus* which had the highest potency in α -glucosidase inhibition and had the strongest antioxidant activity compared to other extracts of *Artabotrys* sp. Comparisons between test results of antioxidant and α -glucosidase activities, as well as total phenolic and total flavonoid, indicated that most of the α -glucosidase inhibitor compounds in the leaf of *A. sumatranus* had antioxidant activities, and belonged to phenolic and flavonoid groups. Untargeted metabolomic techniques based on LC-MSn by using multivariate statistical analysis and machine learning were then used to predict the active α -glucosidase inhibitor compounds which also had antioxidant activities. The input data was data from 30 samples of leaf extracts of *A. sumatranus* with various solvent combinations of ethanol and water, and their duplications, with 80 independent variables (features) consisting of m/z values of detected compounds in those extracts. The output variables (targets) were α -glucosidase inhibition activity (main target) and antioxidant activity (in the form DPPH inhibition, secondary target), which were represented by the value of IC_{50} and $1/IC_{50}$. The multivariate statistical analysis approach was done with several methods, which were PCA (Principal Component Analysis), PLS (Partial Least Square), OPLS (Orthogonal Partial Least Square), PLS-DA (Partial Least Square – Discriminant Analysis), and OPLS – DA (Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis). The machine learning approach was done in stages, with the first one was making a prediction model of the α -glucosidase inhibition activity of the extracts (done with random forest method which had the best performance compared to other methods), and then followed by analysis of the most important features (compounds) in the extract's activity prediction model using random permutation and SHAP (Shapley additive explanations) methods. Combining the results of multivariate statistical methods and machine learning produced a prediction of nine active α -glucosidase inhibitor compounds from the leaf of *A. sumatranus*. From these nine active compounds, only six could be identified which were mangiferin, neomangiferin, norisocorydine, liriioferin, apigenin-7-O-galaktopyranosida, and 15,16-dihydrotanshinone. Molecular docking using α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* showed only mangiferin, apigenin-7-O-galactopyranoside, and liriioferine had more negative free energy binding (more active) than acarbose, which was used as comparison. On the other hand, molecular docking using a part of α -glucosidase from humans showed only norisocorydine had weaker activity than acarbose. The correlation analyses showed

that the predicted active compounds, including the unidentified ones, had antioxidant activities and were indicated to come from several biosynthesis pathways. Next, the isolation active compound as α -glucosidase inhibitor was done by using bioassay-guided fractionation, continued by structure elucidation. The isolated active compound turned out to be mangiferin, which was one the predicted compound from metabolomic analysis, with IC_{50} 83,72 μ g/ml with respect to α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. The contribution of this research is to enrich and broaden the knowledge about the usefulness and literature on *A. sumatranus*, which had no publications before. Moreover, this research succeeded in discovering potential α -glucosidase inhibitors which were not yet published before, such as apigenin-7-O-galactopyranoside, liriiferine, and norisocorydine; besides the unidentified ones. The results of this research can be developed later on to become herbal medicine.