

Identifikasi dan Isolasi Metabolit Sekunder Penghambat α -amilase dari Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) dengan Pendekatan Metabolomik dan Penambatan Molekul

Norainny Yunitasari
19/450312/SPA/00694

INTISARI

Daun *Vernonia amygdalina* dilaporkan memiliki aktivitas biologi sebagai antidiabetes. Aktivitas antidiabetes ekstrak metanol daun *Vernonia amygdalina* telah dibuktikan secara *in vitro* sebagai penghambat α -amilase. Pada ekstrak tersebut dapat diisolasi senyawa golongan glikosida (saponin steroid). Pada penelitian ini dilakukan studi lanjutan pada daun *Vernonia amygdalina* untuk mendapatkan senyawa aktif yang bertanggung jawab sebagai penghambat α -amilase dengan acuan hasil uji aktivitas sebagai penuntun proses isolasi.

Serbuk daun tersebut dimaserasi dengan metanol selama 4 hari. Ekstrak metanol dipartisi secara berurutan menggunakan n-heksana, diklorometana, dan etil asetat. Semua hasil partisi diuji fitokimia, aktivitas penghambat α -amilase, dan juga dianalisis dengan FTIR serta LC-HRMS (untuk keperluan kajian metabolomik dan penambatan molekul). Isolasi senyawa aktif dilakukan menggunakan pemisahan kromatografi kolom dengan menerapkan *activity guide*. Identifikasi senyawa menggunakan analisis $^1\text{H-NMR}$ dan GCMS. Kajian penambatan molekul juga dilakukan untuk lebih memahami aktivitas senyawa hasil isolasi secara *in silico*.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan keberadaan senyawa fenolik, flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid pada fraksi daun *Vernonia amygdalina*. Fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas penghambat α -amilase terbaik dengan nilai IC_{50} 3 $\mu\text{g/mL}$. Hasil analisis metabolomik menunjukkan bahwa gugus fungsi yang berpengaruh pada fraksi etil asetat di antaranya gugus fungsi O-H, N-H, C-H, C=C, dan C=O. Hasil analisis penambatan molekul menunjukkan bahwa senyawa yang berpotensi sebagai penghambat α -amilase memiliki struktur dengan gugus fungsi O-H, C=C, C=O, dan C-H. Proses pemisahan menghasilkan padatan putih pada dinding vial di subfraksi 14-18. Hasil identifikasi dari padatan tersebut menunjukkan adanya golongan senyawa steroid, yaitu kampesterol dan β -sitosterol. Aktivitas dari kedua senyawa dikaji menggunakan penambatan molekul. Hasil pengkajian menunjukkan kedua senyawa masih belum memiliki aktivitas yang lebih baik daripada senyawa pembanding (rosiglitazone). Nilai E_i dan K_i dari senyawa kampesterol, β -sitosterol, dan rosiglitazone, masing-masing secara berurutan sebesar -8,52 kcal/mol dan $567,85 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, -8,50 kcal/mol dan $583,13 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, serta -10,84 kcal/mol dan $11,34 \times 10^{-3} \mu\text{M}$. Senyawa rosiglitazone masih memiliki aktivitas yang lebih baik dibanding senyawa hasil isolasi karena dapat membentuk ikatan hidrogen yang lebih banyak dengan sisi aktif enzim.

Kata Kunci: Isolasi, Kromatografi Kolom, Steroid, $^1\text{H-NMR}$, GCMS

Identification and Isolation of α -amylase Inhibiting Secondary Metabolites from African Leaf (*Vernonia amygdalina*) with Metabolomic and Molecular Docking Approaches

Norainny Yunitasari
19/450312/SPA/00694

ABSTRACT

Vernonia amygdalina leaves are reported to have biological activity as an antidiabetic. The methanol extract of *Vernonia amygdalina* leaves has been demonstrated in *vitro* antidiabetic activity as an inhibitor of α -amylase. From these extracts glycosides (steroid saponins) can be isolated. In this research, a further investigation was conducted on the leaves of *Vernonia amygdalina* to obtain the active compounds responsible as an inhibitor of α -amylase by applying the activity test results as a guide for the isolation process.

The leaf powder was macerated with methanol for 4 days. The methanol extract was partitioned sequentially using n-hexane, dichloromethane and ethyl acetate. All partitioned fractions were subjected to phytochemicals, α -amylase inhibitory activity, and also analyzed by FTIR and LC-HRMS (for the purposes of metabolomics and molecular docking studies). Isolation of active compounds was carried out using column chromatography separation with the application of an activity guide. Identification of compounds was performed using $^1\text{H-NMR}$ and GCMS analysis. Molecular docking studies were also carried out to better understand the activity of the isolated compounds in silico.

The phytochemical screening results showed the presence of phenolic compounds, flavonoids, saponins, tannins, and alkaloids in *Vernonia amygdalina* leaf fractions. The ethyl acetate fraction exhibited the best α -amylase inhibitory activity with an IC_{50} value of 3 $\mu\text{g/mL}$. The results of the metabolomics analysis showed that the functional groups influencing the ethyl acetate fraction included O–H, N–H, C–H, C=C, and C=O functional groups. The results of the molecular docking analysis indicated that potential α -amylase inhibitors have structures with O–H, C=C, C=O, and C–H functional groups. The separation process produced a white solid on the walls of the vial in subfraction 14-18. The results of the identification of these solids indicated the presence of a class of steroid compounds, namely campesterol and β -sitosterol. The activity of both compounds was studied using molecular docking. The results of the study showed that the two compounds still did not have better activity than the reference compound (rosiglitazone). The E_i and K_i values of the compounds campesterol, β -sitosterol and rosiglitazone are -8,52 kcal/mol and $567,85 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, -8,50 kcal/mol and $583,13 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, as well as -10,84 kcal/mol and $11,34 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, respectively. The rosiglitazone compound still has better activity than the isolated compound because it could form more hydrogen bonds with the active site of the enzyme.

Keywords: Isolation, Column Chromatography, Steroids, $^1\text{H-NMR}$, GCMS