

DAYA INHIBISI BERBAGAI EKSTRAK TANAMAN SUKU *LEGUMINOSAE* TERHADAP KERJA ENZIM TRIPSIN

Oleh:

Sri Hartati*)

Abstrack

Telah dilakukan pengujian inhibitor protease terhadap ekstrak dari sembilan tanaman *Leguminosae*.

Dari ekstrak yang diteliti ekstrak daun dan kulit yang memberi keaktifan menghambat lebih dari 50% adalah ekstrak dari tanaman *Caesalpinia pulcherima*, *Caliandra chaetocephala*, *Delonix regia* dan *Leucaena glauca* serta ekstrak daun *Sesbania grandiflora*.

I. Pendahuluan

Zat-zat penghambat kegiatan enzim proteolitik telah banyak ditemukan keberadaannya pada kacang-kacangan, padi-padian dan umbi-umbian (Irvin, E.L., 1969).

Read dan Heas (1938), telah menyelidiki keberadaan inhibitor tripsin dalam ekstrak air tepung kedele. Kemudian selanjutnya, Kunitz (1945; 1946) berhasil mengisolasi dalam bentuk kristalnya yang kemudian disebut sebagai inhibitor Kunitz.

Anti tripsin telah banyak menarik perhatian antara lain mengenai sifat farmakologik yang khas, yang memberi harapan besar bagi penggunaannya dalam bidang kedokteran.

Pada penelitian ini dilakukan pengujian inhibitor tripsin dari beberapa ekstrak tanaman suku *Leguminosae* dengan menggunakan sistim hidroksil aminferiklorida menurut metoda Aoyogi dkk. (1969).

II. Bahan dan Cara

Bahan Tanaman

Digunakan kulit batang kayu dan daun dari beberapa tanaman yang termasuk suku *Leguminosae*, diambil dari beberapa koleksi tanaman Departemen Biologi ITB Bandung dan sekitarnya.

Tanaman tersebut adalah flamboyan (*Delonix regia* RAFIN), turi putih (*Sesbania grandiflora* PERS), petai cina (*Leucaena glauca* BTH.), kaliandra (*Kaliandra Haemotocephala*), dadap (*Erytrina indica* LAM.), bunga merak (*Caesalpinia pulcherima* Swartz), bunga kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*), kacang babi (*Tephrosia vogelii* HOOK.), kihujan (*Pithecolobium saman* PRAIN).

Bahan Kimia

HCL 12%, $2H_2SO_4$, $FeCl_3$ 1% dalam etanol, Triklor asetat, hidroksil amin — HCl, NaOH. $FeCl_3$ yang dipakai adalah PA (E. Merck).

Larutan buffer tris-HCL: Tris (Hidroksil metil) amina metan 1,21 g dan 0,5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, keduanya dilarutkan dalam air suling kemudian pH diatur dengan HCL 0,1 N (10 — 15 tetes) sampai pH 8,2 dan volume ditepatkan 200 ml dengan air suling.

Tripsin (Dipco Co. USA); 2 mg tripsin dalam 10 ml larutan buffer tris HCL.

*) Staf Peneliti PUSLITBANG Kimia Terapan LIPI.

TAME (p-Tosyl-arginine metil ester hidroklorida) IM (Tokyo Kasei Kogyo Co, Jepang); 0,189 g TAME dilarutkan dalam 5 ml bufer tris-HCL.

Ekstraksi

Daun dan kulit pohon dikeringkan, ditumbuk halus dan ditimbang 10 g, masukkan ke dalam erlemeyer 250 ml kemudian ditambah 100 ml metanol 50%, maserasi selama 24 jam, disaring filtratnya dikumpulkan dan ampasnya dimaserasi lagi dengan pelarut yang sama berturut sebanyak 2x. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan sampai 100 ml dengan menggunakan rotavapor pada suhu 40°C. Ekstrak yang diperoleh digunakan untuk pengujian inhibitor tripsin.

Uji enzimatik yang dilakukan terhadap: Ekstrak tanaman dalam air-alkohol; Ekstrak tanaman dalam kloroform; Ekstrak tanaman dibuat pH = 2 (asam) diekstraksi dengan etil asetat, ekstrak dalam air dipakai untuk uji enzimatik.

Penentuan kadar ekstrak

Pipet 1 ml ekstrak tanaman uapkan dalam penangas air sampai kering, kemudian didinginkan dalam eksikator lalu ditimbang beratnya, beberapa kali sampai dicapai konstan.

Uji enzimatik

Ekstrak dalam air: Pipet masing-masing dalam 10 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l ke dalam tabung mikro dengan mikro pipet, kemudian vakumkan dalam deksikator sampai kering, tambahkan ke dalam masing-masing tabung 350 μ l buffer tris-HCL dan 100 μ l larutan TAME lalu dikocok dengan pengaduk otomatis, masukkan ke dalam inkubator suhu 37°C, setelah suhu mencapai

37°C tambahkan larutan tripsin, biarkan selama 15 menit. Tambahkan 1 ml larutan hidroksil amin dalam NaOH simpan dalam suhu kamar selama 25 menit, kemudian tambahkan 0,5 ml larutan triklorasetat. Pipet larutan tersebut 1 ml lalu ditambah larutan FeCL₃ 0,2 M, ukur absorbans pada panjang gelombang 525 μ m.

Ekstrak dalam kloroform: Pipet 10 ml ekstrak air masukkan ke dalam corong pisah 50 ml tambahkan 10 ml kloroform kocok sampai homogen, kemudian biarkan sampai terpisah antara fasa air dan fasa kloroform. Pisahkan fasa kloroform dari fasa air, tentukan kadar ekstrak dalam kloroform. Pipet ekstrak kloroform ini sehingga masing-masing mengandung kadar ekstrak 100 μ g/ml lakukan uji enzimatik seperti di atas.

Ekstrak asam: Pipet 10 ml ekstrak air tambahkan (asamkan) dengan HCl 3 M sampai pH = 2, masukkan ke dalam corong pisah kocok dengan 10 ml etil asetat sampai homogen, biarkan sampai terpisah kembali antara kedua fasa tersebut, kemudian ambil 1 ml ekstrak dalam fasa air encerkan dengan air suling sampai 3 ml, pipet hasil pengenceran tersebut masing-masing 20 μ l dan 50 μ l, lakukan uji enzimatik seperti di atas.

Penentuan persen inhibisi dari hasil reaksi:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

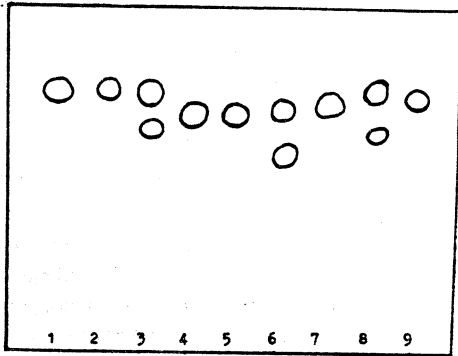
A = serapan sistim tanpa inhibitor; B = serapan sistim dengan inhibitor.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(A - B) - (A - C)}{(A - B)} \times 100$$

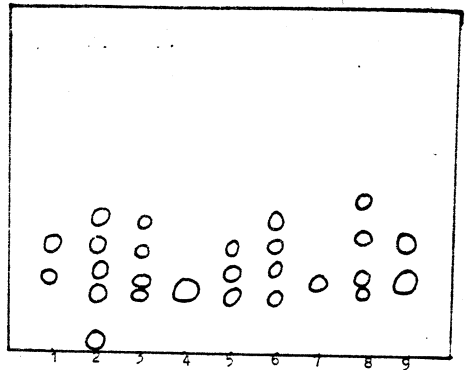
A = serapan sistim tanpa inhibitor dan enzim; B = serapan sistim tanpa inhibitor; C = serapan sistim dengan inhibitor.

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) :

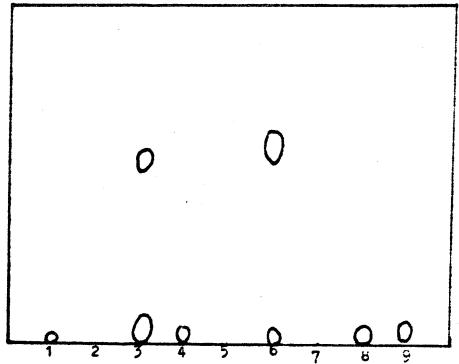
Analisis dilakukan terhadap ekstrak daun dan kulit batang; dalam silika gel G 60 dan larutan elusi n-Butil alkohol : Alkohol : air (4 : 1 : 1) v/v dengan pengamatan: di bawah lampu Uv; dengan pereaksi FeCl_3 1% dalam alkohol; dengan pereaksi Ninhidrin; dengan pereaksi Vanilin sulfat; dengan uap Iodium.



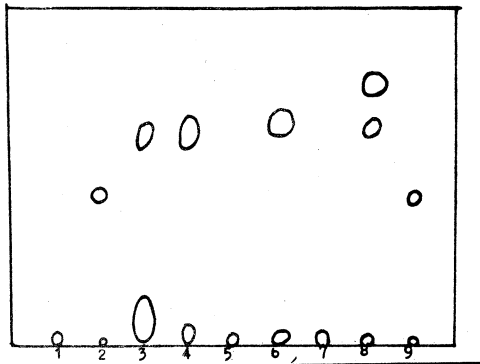
Gambar 1. Hasil KLT ekstrak daun, penampakan di bawah lampu UV.



Gambar 3. Hasil KLT ekstrak daun, penampakan dengan larutan ninhidrin



Gambar 4. Hasil KLT ekstrak daun, penampakan dengan uap Iodium (I₂).



Gambar 2. Hasil KLT ekstrak daun, penampakan dengan larutan FeCl_3 1% dalam alkohol.

Hasil dan Pembahasan

Pada umumnya susut pengeringan dari daun lebih besar daripada kulit batang, seperti tampak pada tabel 1.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak tanaman yang diteliti mengandung inhibitor tripsin (Tabel 2). Kenaikan aktivitas inhibisi sebanding dengan kenaikan konsentrasi. Ekstrak daun bunga merak dan ekstrak kulit batang petai cina berdaya inhibisi paling tinggi.

Hasil penyarian ekstrak dalam kloroform (100 $\mu\text{g/ml}$) menunjukkan persen inhibisi

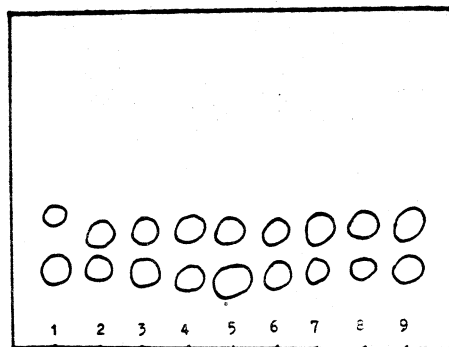
umumnya di bawah 50% (Tabel 3). Ekstrak daun petai cina menunjukkan persen inhibisi paling tinggi yaitu 37%. Ekstrak kulit batang umumnya memberikan daya inhibisi yang lebih kecil dibandingkan terhadap ekstrak dari daunnya.

Hasil pengenceran ekstrak diasamkan sampai pH 2 kemudian diekstraksi dengan etil asetat. Ekstrak airnya diencerkan (1 : 2) dan dipakai untuk uji enzimatik dengan hasil seperti pada tabel 3. Persen inhibisi pada daun umumnya kurang dari 50% dan persen inhibisi tertinggi pada ekstrak kulit adalah 51% yaitu pada kaliandra.

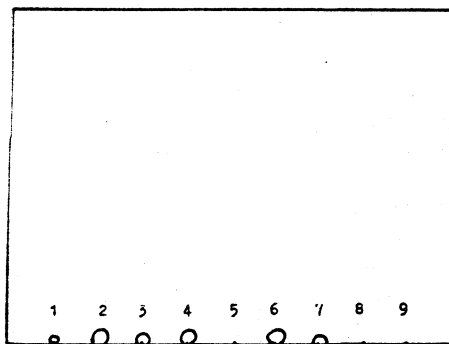
Apabila daya inhibisi dikaitkan dengan hasil KLT akan diperoleh gambaran kemungkinan-kemungkinan kelompok senyawa mana yang mempunyai daya inhibisi tersebut.

Ekstrak daun umumnya memberi noda khas berwarna merah muda apabila hasil KTL diamati di bawah lampu UV (Gambar 1), noda-noda tersebut diperkirakan kelompok fenolik, di mana masing-masing ekstrak dapat dikatakan tidak ada kaitannya, karena dengan noda yang relatif sama tetapi daya inhibisinya berbeda-beda. Tetapi banyaknya peptida pada ekstrak daun (Gambar 3) diperkirakan salah satu kelompok mempunyai kaitan dengan daya inhibisi terhadap enzim tripsin. Daya inhibisi ekstrak daun ini berkaitan pula dengan kelompok senyawa polifenol, (Gambar 2 dan Gambar 4). Banyaknya kelompok noda dan besarnya noda dapat dikaitkan dengan daya inhibisi masing-masing ekstrak.

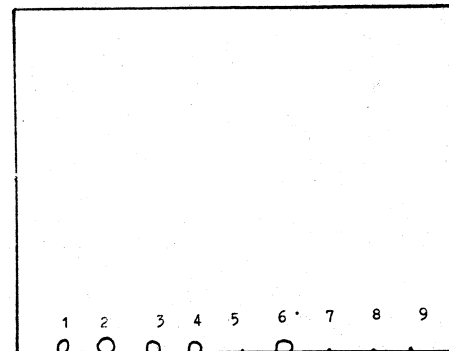
Pada pengujian ekstrak kulit batang, hasil KLT pada pengamatan cara visual (Gambar 6) dan dengan pereaksi $FeCl_3$ (Gambar 7) bahwa kelompok yang mempunyai noda yang besar menunjukkan nilai inhibisi yang tinggi. Tetapi hasil KLT dengan pereaksi ninhidrin, semua ekstrak kulit



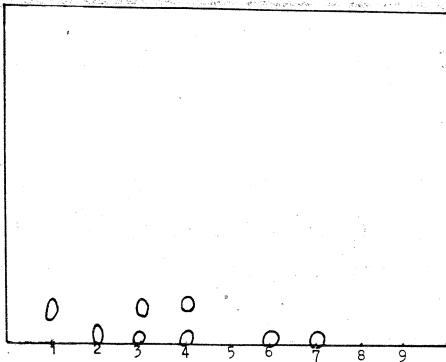
Gambar 5. Hasil KLT ekstrak kulit, penampakan dengan larutan ninhidrin.



Gambar 6. Hasil KLT ekstrak kulit, pengamatan secara visual.



Gambar 7. Hasil KLT ekstrak berbagai kulit dengan penampakan larutan $FeCl_3$ 1% dalam alkohol.



Gambar 8. Hasil KLT ekstrak berbagai kult, penampakan dengan larutan Vanilin-Asam sulfat.

batang menampakkan noda baik dengan Rf dan luas noda relatif sama. Dalam hal ini hasil KLT dengan pereaksi ninhidrin tidak dapat dikaitkan dengan persen inhibisi.

Kesimpulan

Beberapa ekstrak tanaman dari suku *Leguminosae* yang diteliti umumnya mempunyai inhibitor tripsin. Yang berdaya inhibisi cukup potensil diantaranya adalah ekstrak daun bunga merak, kaliandra, petai cina dan flamboyan. Ekstrak kulit batang dari turi putih, petai cina, flamboyan, kaliandra dan bunga merak.

Kemungkinan keberadaan KLT kelompok peptida dan polifenol menyatakan adanya hubungan dengan persen atau aktivitas inhibisi.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Hardiman, Fakultas MIPA, UNPAD Bandung, yang telah memberikan pengarahan dan menyediakan fasilitas selama penelitian.

Daftar Acuan

1. Aoyogi, T et. al. 1969. *Biological Activities of Leupeptins*, J. Antibiotics, 558 — 563.
2. Aoyogi, T. and Umezawa, H. 1970. Structure and Activities of Protease Inhibitor of Microbial Origin, Institut of Microbial Chemistry, 429 — 452.
3. Baker, A. 1941. Beknope Flora Van Java RIJK Sherbarium Leiden, Fam. 119.
4. Board on Science and Technology for International Development Research Council. 1979. Tropical Legumes: Resources for future. National Academic of Sciences, Washington D.C., 1 — 9.
5. Bosterling, B. 1981. Ulrich Quast, Soy Bean Trypsin Inhibitor (Kunitz) is Double Handed, J. Biochemica et Biphysica Acta, 54 — 58.
6. Corner, E. H., Watanabe, K. 1969. Illustrated and Guide to Tropical Plants, Hirokawa Publising Co. Inc., Tokyo, 234 — 314.
7. Jones, G. et. al. 1962. properties of Chromatographically Puried Trypsin Inhibitor from Lima Beans, J. Bichemistry, 66 — 67.
8. Harbone, J. B. et. al. 1971. Chemotaxonomy of *Leguminosae*, Academic Press London and New York, 235 — 536.
9. Harbone, J.B. 1973. Phytochemical methods, Firt Published, Toppan Co., Limited Tokyo, Japan, 4 — 172.
10. Sumathi, S. and Pattambiran, T.N. 1974. Natural Plant Enzym Inhibitor, J. Bichemica et Biphysica Acta. 566 115 — 127.
11. Strard, G. F., LT. Black and Glover, J.D. 1980. Trypsin inhibitor in Soy Pro-

duct: Modification of the Standard Analytical Procedure, J. Cereal Chem., 8, 42 — 45.

12. Whitaker, J. R. and Feeney, R.E. 1973. Enzym Inhibitor in Food; *in*: Com-

mitte on Food Protection and Nutrition Board National Research Council, 2nd Ed., National Academic of Sciences, Washington D.C.; 237 — 287.

Tabel 1. **Persen susut pengeringan bahan dan residu ekstrak**

Tanaman	Kadar air (% b.b)		Kadar ekstrak (% b/v)	
	Daun	Kulit	Daun	Kulit
Flamboyan	59,3	49,5	3,8	1,6
Turi putih	75,5	75,7	3,0	2,0
Petai Cina	68,5	62,3	3,3	1,7
Kaliandra	55,2	50,1	1,0	1,7
Dadap	79,9	75,5	2,5	1,2
Bunga merak	65,4	58,0	3,5	2,2
Bunga kupu-kupu	64,4	65,0	2,1	2,7
Kacang babi	63,0	73,0	2,4	2,2
Kihujan	48,9	43,8	3,0	1,3

Tabel 2. **Persen inhibisi ekstrak kering metanol eks bagian**

Tanaman	Daun		Kulit	
	Ekstrak Kering (μ g/ml)	Persen Inhibisi	Ekstrak Kering (μ g/ml)	Persen inhibisi
Flamboyan	128	22	52	34
	318	43	130	50
	392	14	156	58
	955	32	390	71
	1910	57	780	88
Turi putih	103	2	45	35
	257	3	113	73
	308	—	119	57
	770	—	498	78
	1540	14	995	97
Petai cina	107	4	58	40
	267	20	145	57
	332	4	174	56
	830	20	435	71
	1660	55	870	95
Kaliandra	62	23	40	29
	155	33	99	46
	186	25	119	58
	465	42	298	67
	930	60	595	75

Dadap	84	8	42	1
	211	20	104	3
	253	10	125	—
	633	19	313	—
	1265	35	615	9
Bunga merak	116	10	84	33
	291	46	210	40
	394	41	252	45
	873	61	360	68
	1745	94	1260	86
Bunga kupu-kupu	71	1	90	10
	178	4	224	28
	213	3	269	24
	533	26	673	34
	1065	31	1345	47
Kacang babi	79	1	75	1
	197	3	188	4
	236	—	255	3
	590	9	563	8
	1180	15	1125	20
Kihujan	103	3	45	3
	258	11	113	9
	309	9	135	3
	775	20	338	6
	1545	24	675	15

Tabel 3. Persen inhibisi ekstrak daun dan kulit batang dalam ekstrak air setelah ditarik dengan etil asetat pada pH 2.

Tanaman	Persen inhibisi ekstrak daun		Persen inhibisi ekstrak kulit	
	1*	2**	1*	2**
Flamboyan	15	21	20	27
Turi Putih	—	6	14	25
Petai Cina	6	22	25	27
Kaliandra	12	18	18	51
Dadap	11	17	—	2
Bunga merak	14	31	18	25
Bunga kupu-kupu	—	—	—	6
Kacang babi	—	6	—	5
Kihujan	—	1	2	7

* Contoh ekstrak yang digunakan 20 μ l

** Contoh ekstrak yang digunakan 50 μ l

Tabel 4. Nilai hRf dan warna noda dari hasil KLT ekstrak daun dengan sistim pelarut n-Butil alkohol: Alkohol: Air (4 : 1 : 1 v/v)

Pengamatan Tanaman	UV	FeCL3	Ninhidrin	Uap 12
Flamboyan	75 (mm)	1.1 (bm)	19 (v) 29 (mv)	1.1 (c)
Turi putih	75 (mm)	1.1 (bm) 43 (bm)	3 (mv) 15 (v) 22 (mv) 29 (mv) 38 (mv)	—
Petai Cina	75 (hd) 64 (mc)	7.7 (bm) 43 (bm)	15 (mv) 19 (v) 29 (mv) 38 (mv)	5 (c) 54 (c)
Kaliandra	68 (mm)	2.2 (bm) 43 (bm)	18 (v)	3 (c)
Dadap	68 (mm)	1.1 (bm)	15 (mv) 21 (mv) 29 (mv)	
Bunga merak	71 (mm) 57 (mm)	1.1 (bm) 65 (bm)	14 (mv) 22 (mv) 29 (mv) 39 (mv)	3 (c) 58 (c)
Bunga kupu-kupu	72 (mm)	2.2 (bm)	29 (mv)	—
Kacang babi	75 (hd) 65 (hd)	1.1 (bm) 63 (bm) 76 (bm)	16 (vm) 21 (v) 31 (mv) 44 (mv)	3 (c)
Kihujan	74 (mm)	1.1 (bm) 43 (bm)	19 (v) 30 (mv)	5 (c)

Tabel 5. Nilai hRf dan warna hasil KLT ekstrak kulit dengan sistim pelarut n-Butil alkohol: Alkohol: Air (4 : 1 : 1 v/v)

Pengamatan Tanaman	FeCl ₃	Vanilin sulfat	Ninhidrin	Visual
Flamboyan	1 (bm)	10 (m)	22 (v) 38 (v)	1 (ch)
Turi putih	1 (bm)	2 (m)	22 (v) 34 (v)	1 (ch)
Petai cina	1 (bm)	1 (m) 10 (m)	22 (v) 35 (v)	1 (ch)
Kaliandra	1 (bm)	1 (m) 10 (m)	20 (v) 35 (v)	1 (ch)
Dadap	—	—	20 (v) 34 (v)	—
Bunga merak	1 (bm)	1 (m)	20 (v) 35 (v)	1 (ch)
Bunga kupu-kupu	—	1 (m)	21 (v) 35 (v)	1 (ch)
Kacang babi	—	—	21 (v) 35 (v)	—
Kihujan	—	—	21 (v) 36 (v)	—

Keterangan: mm = merah muda; hd = hijau daun; mc = merah kecoklatan; bm = biru muda; mv = merah violet; v = violet; vm = violet merah; c = coklat; ch = coklat hijau m = merah