

OPTIMALISASI PENGIKATAN TANIN DAUN NANGKA DENGAN PROTEIN *BOVINE SERUM ALBUMIN****OPTIMALISATION BINDING OF JACKFRUIT LEAVES TANNIN WITH BOVINE SERUM ALBUMIN PROTEIN*****Wahidin Teguh Sasongko^{1*}, Lies Mira Yusiati², Zaenal Bachruddin², dan Mugiono¹**¹Badan Tenaga Nuklir Nasional, Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Jl. Lebak Bulus Raya No.49, Jakarta Selatan²Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No.3, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281**INTISARI**

Tanin merupakan senyawa polifenol dengan bobot molekul tinggi dan mempunyai kemampuan mengikat protein. *Albumin* berdasarkan strukturnya termasuk protein sederhana dengan bentuk molekul globular. Optimalisasi pengikatan tanin daun nangka dengan protein *bovine serum albumin* (BSA) dilaksanakan dalam 2 tahap penelitian. Penelitian tahap pertama adalah penentuan kadar tanin daun nangka dan penentuan kadar tanin kondensasi daun nangka yang berasal dari lokasi dengan jenis tanah mediteran. Penelitian tahap kedua adalah optimalisasi pengikatan tanin daun nangka dengan protein *bovine serum albumin*. Penelitian tahap kedua dilakukan dengan dua metode pengukuran, yaitu dengan metode presipitasi protein oleh senyawa phenolik dan penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry. Dari penelitian tahap pertama diketahui kadar total phenol 10,63%, total tanin 7,08% dan tanin kondensasi 5,57%. Hasil optimalisasi menunjukkan bahwa jumlah senyawa phenol yang dapat mengikat protein BSA secara optimal sebesar $5,71 \pm 0,18$ mg/100mg bahan kering daun nangka, 1 g tanin dapat mengikat 23,15 g protein BSA atau 1 g tanin kondensasi dapat mengikat protein BSA sebesar 28,89 g.

(Kata kunci: Tanin, Total phenol, Total tanin, Tanin kondensasi, *Bovine serum albumin*)

ABSTRACT

Tannins are high molecular weight polyphenol compounds with ability to bind proteins. Based on the structure, albumin are simple globular molecule protein. Optimalisation binding of jackfruit leave tannins to bovine serum (BSA) albumin was done in two stages. The first stage was to determine levels of tannins and condensed tannins in jackfruit leaves grown in mediterranean soil types. Second research was optimalisation binding of jackfruit leaf tannins with bovine serum albumin. In the second stage there was the determination of protein-precipitable phenolics compound and protein content using Lowry method. The data showed total phenol content was 10.63%, total tannin was 7.08%, and condensed tannins 5.57%. The optimum capacity phenolic compound to bind protein of bovine serum albumin was 5.71 ± 0.18 mg BSA/100 mg dry matter of jackfruit leaf, while 1 g tannin could bind 23.149 g BSA or 1 g condensed tannin could bind 28.885 g BSA.

(Key words: Tannin, Total phenol, Total tannin, Condensed tannin, *Bovine serum albumin*)

Pendahuluan

Protein untuk ternak ruminansia diperlukan, sehingga protein pakan yang berkualitas perlu dilindungi dari degradasi mikrobial di dalam rumen. Untuk melindungi protein dari degradasi tersebut salah satu cara yaitu dengan menggunakan tanin. Tanin merupakan senyawa polyphenol dengan bobot molekul yang tinggi dan mempunyai kemampuan mengikat protein. Tanin diklasifikasikan

dalam dua kelompok, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi (Makkar, 1999).

Tanin mengikat protein dengan ikatan hidrogen yang sensitif terhadap perubahan pH. Tanin kondensasi akan berikatan stabil pada pH 4 – 7 di dalam rumen, sedangkan pada pH yang ekstrim ikatan tanin dengan protein akan terlepas, yaitu pada pH kurang dari 3 yaitu di dalam abomasum (El-Wazyri *et al.*, 2005) dan pH lebih dari 7 yaitu di dalam intestinum (Perez-Maldonado *et al.*, 1995; Diaz-Hernandez *et al.*, 1997 *cit.* Andrabi, 2005). Diharapkan tanin mampu melindungi protein dari degradasi dalam rumen, namun masih dapat dimanfaatkan bagi ternak pada saluran pencernaan

* Korespondensi (*corresponding author*):

Telp.+ 62 812 945 9603

E-mail: wahidinteguhsasongko@yahoo.com

pasca rumen yaitu di abomasum dan di dalam intestinum.

Selain sebagai senyawa metabolit sekunder pada tanaman, tanin juga berfungsi bagi tanaman untuk mempertahankan diri dari stress lingkungan (Hoffmann *et al.*, 2002), penyakit (Makkar, 2003) dan serangan herbivora (Swain, 1979). Tanin juga memberikan beberapa keuntungan antara lain sebagai antikarsinogen, menghindarkan ternak dari *bloating*, memiliki efek *anthelmintic* (Makkar, 2003) dan memiliki efek defaunasi yang dapat menurunkan emisi metan oleh ruminansia (Animut *et al.*, 2008).

Kurniawati (2008) telah melakukan penentuan kadar tanin pada beberapa hijauan pakan yang belum banyak dikenal dengan menggunakan metode total phenol dan total tanin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar total tanin pada daun nangka relatif lebih tinggi dibandingkan dengan hijauan pakan lainnya.

Menurut Nelson dan Cox (2000) penggolongan protein ditinjau dari strukturnya dibagi menjadi dua golongan besar yaitu golongan protein sederhana dan protein gabungan. Protein sederhana adalah protein yang terdiri atas molekul-molekul asam amino, sedangkan protein gabungan adalah protein yang terdiri atas protein dan gugus bukan protein. Protein sederhana dibagi menjadi dua bagian menurut bentuk molekulnya, yaitu protein fiber dan protein globular. *Albumin* merupakan salah satu protein sederhana dengan bentuk molekul protein globular. *Albumin* mempunyai sifat dapat larut dalam air serta dapat terkoagulasi oleh panas. Larutan albumin dalam air dapat diendapkan dengan penambahan ammonium sulfat hingga jenuh.

Bovine serum albumin (BSA) adalah protein *albumin* yang berasal dari sapi. *Bovine serum albumin* merupakan salah satu protein sederhana yang berbentuk globular. Protein mempunyai struktur dan bentuk yang berbeda antara satu dengan lainnya, sehingga pengikatan antara tanin dan protein *Albumin* perlu dilakukan penelitian.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui kadar tanin dari daun nangka yang optimal untuk dapat mengikat protein BSA. Hasil penelitian ini juga bermanfaat untuk menentukan jumlah tanin yang diperlukan untuk mengikat protein lain.

Materi dan Metode

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada bulan Juli 2010.

Bahan penelitian

Daun nangka yang digunakan sebagai sumber tanin diambil dari lokasi dengan jenis tanah mediteran di Yogyakarta, sedangkan protein *albumin* yang digunakan adalah BSA.

Reagen yang digunakan pada tahap pertama, yaitu untuk penentuan kadar tanin daun nangka adalah folin-ciocalteu (1N). Sodium karbonat (20%), Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) dan Standar asam tanat (0,1mg/ml). Adapun untuk penentuan tanin kondensasi daun nangka reagen yang digunakan adalah reagen Butanol-HCl (*butanol-HCl* 95:5 v/v) dan reagen ferric ammonium sulfat (2% ferric ammonium sulfate dalam 2N HCl).

Reagen yang digunakan pada tahap kedua, yang digunakan buffer acetate dengan pH 4,9, larutan Sodium dodecyl sulfate (1%), SDS-triethanolamine (TEA) (1% SDS) dan 7% TEA, ferric chloride (0,01 M ferric chloride dalam 0,1 M HCl), *Acetic acid glasial* dan larutan BSA, larutan asam tanat 0,5 mg/ml dalam 1% SDS.

Alat penelitian

Alat yang dipakai antara lain: ultrasonik sonopuls bandelin, spektrofotometer, seperangkat alat uji proksimat dan alat-alat gelas.

Preparasi sampel daun nangka

Daun nangka sebanyak 500 g dikeringkan dalam oven pada suhu 55⁰C. Kemudian sampel dihaluskan dengan grinder yang dilengkapi saringan dengan ukuran 2 mesh, kemudian diambil 100 g untuk dihaluskan dengan grinder kembali menggunakan ukuran saringan 0,5 mesh untuk analisis tanin.

Ekstraksi tanin daun nangka

Sampel daun nangka yang telah dipreparasi, sebanyak 200 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 10 ml acetone 70%. Sel dipecahkan menggunakan alat ultrasonik dengan memasukkan katoda alat tersebut pada tabung yang berisi larutan dengan memperkirakan agar larutan di dalam tabung tidak tumpah. Ekstraksi dilakukan selama 20 menit dengan 2x10 menit, istirahat 5 menit diantaranya, pada suhu kamar. Tabung yang berisi sampel daun nangka tadi dimasukkan dalam es agar dingin, kemudian tabung disentrifuse selama 10 menit pada 3.000 g. Supernatan diambil untuk penentuan kadar tanin daun nangka.

Penentuan kadar tanin daun nangka

Kandungan tanin di dalam sampel daun nangka diukur sebagai total phenol dan total tanin

berdasar reaksi oksidasi reduksi dengan menggunakan reagensia *folin-ciocalteu*.

Penentuan total phenol daun nangka.

Supernatan hasil ekstraksi yang telah diperoleh diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 0,5 ml reagen folin dan 2,5 ml sodium karbonat. Larutan di dalam tabung dihomogenkan dengan vortex kemudian didiamkan pada suhu kamar. Setelah 40 menit dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 725 nm. Perhitungannya dengan memasukkan hasil pembacaan spektrofotometer kedalam persamaan regresi yang diperoleh dari kurva standar $Y = 0,271X + 0,031$.

Penentuan total tanin daun nangka. Dalam tabung reaksi dimasukkan 100 mg *polivinil polipyrrolidone* (PVPP). Ditambah 1 ml aquadest dan 1 ml ekstrak tanin (100 mg PVPP cukup untuk mengikat 2 mg total phenol). Bila kandungan total phenol lebih dari 10% harus diencerkan, dihomogenkan dengan vortex. Tabung yang berisi larutan diinkubasi selama 15 menit dalam *refrigerator*. Tabung yang berisi larutan dihomogenkan kembali dan disentrifugasi pada 3.000 g selama 10 menit. Supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi digunakan untuk penentuan total phenol non tanin seperti pada penentuan total phenol ekstrak sampel daun nangka di atas. Total tanin yang dihasilkan diperoleh dari total phenol dikurangi dengan total phenol non tanin.

Penentuan tanin kondensasi daun nangka.

Penentuan tanin terkondensasi didasarkan pada reaksi depolimerisasi oksidatif tanin terkondensasi di dalam butanol-HCl (Makkar, 2003).

Analisis penentuan tanin terkondensasi dari masing-masing sampel daun nangka yaitu dengan diambil sebanyak 0,5 ml ekstrak daun nangka kemudian dimasukkan dalam tabung *hungate*. Masing-masing tabung *hungate* tersebut ditambah dengan 3 ml reagen butanol-HCl dan 0,1 ml dari reagen ferric, kemudian tabung yang berisi larutan dihomogenkan dengan vortex. Masing-masing tabung ditutup, kemudian dimasukkan ke dalam waterbath selama 60 menit dengan suhu 97-100°C. Tabung yang berisi larutan didinginkan pada suhu ruang, setelah dingin dibaca absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 550 nm. Diukur juga blank, yaitu campuran yang tanpa pemanasan. Tanin terkondensasi dihitung dengan formula sebagai berikut: (Absorbansi 550 nm X 78,26 X faktor pengenceran) / (% DM).

Optimalisasi pengikatan tanin daun nangka dengan protein *bovine serum albumin*

Penelitian tahap kedua adalah optimalisasi pengikatan antara protein *bovine serum albumin* dengan tanin yang berasal dari daun nangka. Daun nangka yang digunakan adalah daun nangka yang berasal dari jenis tanah mediteran. Penelitian tahap ini menggunakan metode tanin presipitasi protein menurut Makkar (2003) yang dimodifikasi dengan uji Lowry (Plummer, 1971).

Diambil 6 tabung reaksi masing-masing diisi 2 ml larutan BSA (1 mg BSA/ml buffer acetate). Kemudian tabung yang berisi larutan BSA ditambah dengan larutan methanol 50% dengan volume meningkat dimasukkan ke dalam enam tabung reaksi tersebut, yaitu 0,95; 0,90; 0,85; 0,80; 0,75; 0,7 ml, kemudian secara berturut-turut mulai tabung pertama sampai keenam ditambah dengan 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 ml ekstrak tanin daun nangka, kemudian masing-masing tabung yang berisi larutan dihomogenkan dengan vortex dan dimasukkan dalam *refrigerator* semalam. Endapan yang terbentuk dipisahkan menggunakan sentrifugasi pada 3.000 g selama 10 menit. Endapan ditambah dengan 1,5 ml larutan SDS 1%, kemudian dihomogenkan dengan vortex agar terlarut sempurna.

Diambil 1 ml larutan yang sudah digosok dengan vortex, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 3 ml larutan SDS TEA, kemudian ditambah lagi 1 ml reagen ferric chloride. Dibaca dengan spektrophotometer pada panjang gelombang 510 nm setelah 15-20 menit. Hasil pembacaan dimasukkan persamaan regresi $Y = 2,477X + 0,008$ yang diperoleh dari standar asam tanat untuk diketahui tanin presipitasi dengan protein, sedangkan supernatannya diuji dengan metode Lowry, menggunakan standar protein BSA. Kurva standar protein dengan uji Lowry dengan persamaan regresi $Y = 1,941X + 0,033$.

Hasil dan Pembahasan

Komposisi kimia dan kandungan tanin daun nangka dari jenis tanah mediteran

Komposisi kimia daun nangka yang berasal dari jenis tanah mediteran berdasarkan analisis proksimat mempunyai kandungan bahan kering (BK) 34%, bahan organik (BO) 85,95%, protein kasar (PK) 11,22%, lemak kasar (LK) 2,55%, serat kasar (SK) 21,45%, bahan ekstrak tanpa nitrogen (BETN) 50,73%, dan abu 14,3%.

Tabel pengukuran kadar protein sisa yang tidak mengalami presipitasi dengan senyawa phenolik (*determination of waste protein that was not precipitated by phenolics coumpound*)

Tbg	Larutan ekstrak (µl) (<i>extract solution (µl)</i>)	Daun nangka(mg) (<i>jackfruit leaves (mg)</i>)	Jumlah protein yang terikat (<i>amount of bound protein</i>)			
			(mg)	(mg/mg daun) (<i>mg/mg leaves</i>)	(g/g tanin) (<i>g/g tannin</i>)	(g/g tanin terkondensasi) (g/g condensed tannin)
1	50	1	1,63	1,63	23,15	28,89
2	100	2	1,69	0,85	12,00	14,97
3	150	3	1,73	0,58	8,16	10,19
4	200	4	1,77	0,44	6,28	7,84
5	250	5	1,83	0,37	5,21	6,50
6	300	6	1,83	0,31	4,33	5,41

Hasil analisis total phenol, total tannin, dan tanin terkondensasi daun nangka yang berasal dari jenis tanah mediteran adalah total phenol 10,63%, total tanin 7,08%, dan tanin terkondensasi 5,57%. Hasil tersebut merupakan jumlah tertinggi bila dibandingkan dengan kandungan tanin daun nangka yang berasal dari jenis tanah regosol mempunyai total phenol 6,53%, total tanin 4,78%, dan tanin terkondensasi 3,43%. Dari jenis tanah latosol total phenol 6,23%, total tanin 4,76%, dan tanin terkondensasi 3,41%, sedangkan dari jenis tanah grumosol total phenol 6,97%, total tanin 5,51%, dan tanin terkondensasi 3,31% (Sasongko, 2010).

Jenis tanah mediteran (Suprptoahardjo, 1976) mempunyai kedalaman tanah yang agak tebal (1-2 meter) dan sifat kemasaman agak masam hingga netral. Jenis tanah ini juga mempunyai unsur hara yang sedang sampai tinggi, sehingga akan berguna untuk tanaman yang berada di tanah tersebut.

Pohon nangka dapat tumbuh di berbagai tipe tanah, tanah liat berpasir/liat berlempung yang dalam dengan irigasi yang baik. Umumnya tanah yang cocok yaitu tanah yang gembur dan agak berpasir. Pohon ini hidup pada tanah tandus sampai subur dengan kondisi reaksi tanah asam sampai alkalis. Pohon nangka tahan terhadap pH rendah (tanah masam) dengan pH 6,0-7,5, tetapi yang optimum pH 6-7. Kedalaman air tanah yang cocok bagi pertumbuhan nangka adalah 1-2 m atau antara 1-2,5 m (Anonimus, 2000) sehingga tanah mediteran sesuai untuk tanaman nangka.

Optimalisasi pengikatan tanin daun nangka dengan protein bovine serum albumin

Optimalisasi pengikatan antara tanin yang berasal dari daun nangka dengan protein *bovine serum albumin* (BSA) dilakukan dengan metode presipitasi protein oleh senyawa phenolik.

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa jumlah senyawa phenol yang dapat mengikat protein

BSA secara optimal sebesar 5,71±0,18 mg/100 mg bahan kering daun nangka.

Pengukuran jumlah protein yang dapat terikat oleh tanin dilakukan dengan cara mengukur protein sisa BSA yang tidak terikat oleh tanin. Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry. Dari hasil pengukuran tersebut dapat diperhitungkan jumlah protein yang terikat oleh tanin. Adapun data jumlah protein yang terikat tanin disajikan dalam tabel.

Dari tabel diketahui bahwa kemampuan optimal 1 g tanin dapat mengikat 23,149 g protein atau 1 g tanin kondensasi dapat mengikat protein sebesar 28,885 g. Hasil ini dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Makin banyak daun nangka jumlah protein yang diikat makin banyak, namun demikian kalau dinyatakan per gram daun atau per gram tanin, jumlah protein yang terikat akan semakin sedikit. Dengan kata lain bahwa penambahan tanin yang terlalu banyak akan menimbulkan kejenuhan, sehingga kemampuan untuk mengikat protein menjadi lebih sedikit. Hal ini sesuai dengan persamaan Michaelis-Menten yang menyatakan bahwa pada konsentrasi substrat rendah, kecepatan reaksi tergantung pada konsentrasi substrat, namun pada konsentrasi substrat yang tinggi kecepatan reaksi tidak dipengaruhi oleh konsentrasi, dan kecepatan reaksi sudah mencapai maksimum (Nelson dan Cox, 2000).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa daun nangka yang berasal dari jenis tanah mediteran mempunyai kadar total phenol 10,63%, total tanin 7,08%, dan tanin terkondensasi 5,57%. Level tanin yang optimal untuk binding dengan protein BSA adalah 1 g tanin dapat mengikat 23,15 g protein BSA, atau 1 g tanin terkondensasi dapat mengikat protein sebesar 28,89 g protein BSA.

Daftar Pustaka

- Andrabi, S.M., M.M. Ritchie, C. Stimson, A. Horadagoda, M. Hyde, and D.M. McNeill. 2005. In vivo assessment of the ability of condensed tannins to interfere with the digestibility of plant protein in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122:13-27.
- Animut, G., R. Puchala., A.L. Goetsch., A.K. Patra., T. Sahl., V.H. Varel, and J. Wells. 2008. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 144:228-241.
- Anonimus. 2000. Nangka (*Artocarpus heterophyllus* lamk) tentang budidaya pertanian. Available at <http://www.ristek.go.id>. Accession date: 19 April 2010.
- El-Wazyri, AM., Nasser, M.E.A. and Sallam, S.M.A. 2005. Processing methods of soybean meal : 1-effect of roasting and tannic acid treated-soybean meal on gas production and rumen fermentation in vitro. *Journal of Applied Sciences Research* 1(3):313-320.
- Hoffmann, E.M. Muetzel, S. and Becker, K. 2002. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds. *Brit. J. Nutr.* 87:421-426.
- Kurniawati, A. Sasongko, W.T. dan Andini, L. 2008. Kadar Tanin dan Aktifitas Biologi Tanin dari Beberapa *Lesser Known* Tanaman. *Unpublish.*
- Makkar, H.P.S. 2003. Quantification of Tannins in Three and Shrub Foliage : A Laboratory Manual. Kluwer Academic Publ. The Netherland.
- Makkar, H.P.S. 1999. Role of tannins and saponin in nutrition. In Proceeding of The Seventh Scientific Workshop in Tromso : Effects of Antinutritional Value of Legume Diets.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. First Edition. W. H. Freeman and Company New York. New York. The United States.
- Plummer, D.T. 1971. An Introduction to Practical Biochemistry. Mc. Graw-Hill Publ. New Delhi.
- SuprptoHardjo, M. 1976. Jenis-jenis Tanah di Indonesia. Universitas Gadjah Mada-Bakosurtanal.
- Sasongko, W.T. 2010. Pemanfaatan tanin daun nangka untuk meningkatkan nilai rumen *undegraded* protein pada bahan pakan protein tinggi. Tesis. Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Swain, T. 1979. Tannins and Lignins. In *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Rosenthal, G.A. Janzen D.H. (ed.). Academic press New York.