

## Identifikasi Tanaman Potensial Penghasil Tanin-protein Kompleks Untuk Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -amylase Kaitannya Sebagai Pestisida Nabati

### *Identification of Potential Plants Producing Tannin-protein Complex for $\alpha$ -amylase as Botanical Pesticide*

Asriyah Firdausi<sup>1)</sup>, Tri Agus Siswoyo<sup>1\*)</sup>, dan Soekadar Wiryadiputra<sup>2\*)</sup>

<sup>1)</sup>Pascasarjana Program Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

<sup>2)</sup>Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman No. 90, Jember, Indonesia

<sup>\*)</sup>Alamat penulis (*corresponding author*): siswoyo.triagus@gmail.com; soekadar@yahoo.com

Naskah diterima (*received*) 16 November 2012, disetujui (*accepted*) 11 Januari 2013

#### Abstrak

Penelitian tentang pestisida nabati perlu dikembangkan melalui metode baru, di antaranya melalui penghambatan aktivitas enzim pencernaan oleh senyawa metabolit sekunder. Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi tanaman potensial penghasil bahan aktif tanin protein kompleks untuk penghambatan aktivitas  $\alpha$ -amylase sebagai langkah awal untuk merakit pestisida nabati. Penelitian dibagi menjadi tiga tahap: 1) identifikasi tanaman potensial penghasil bahan aktif tanin, 2) isolasi tanin protein kompleks, dan 3) pengujian tanin protein kompleks pada aktivitas  $\alpha$ -amylase. Beberapa tanaman yang digunakan antara lain daun sidaguri (*Sida rhombifolia*), daun melinjo (*Gnetum gnemon*), daun gamal (*Gliricidia sepium*), daun lamtoro (*Leucaena leucocephala*), biji pinang (*Areca catechu*) dan simplisia gambir (*Uncaria gambir*) komersial. Biji melinjo digunakan sebagai sumber protein. Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa dari berbagai jenis tanaman yang telah diidentifikasi didapatkan bahan yang berpotensi sebagai sumber tanin-protein kompleks, yakni biji pinang yang diinteraksikan dengan biji melinjo. Tanin-protein kompleks ini memiliki kandungan tanin sebesar 1,77 mg TAE/mL dengan aktivitas antioksidan sebesar 90%, kemampuan untuk menghambat aktivitas  $\alpha$ -amylase sebesar 95% dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 10 mg/mL.

**Kata kunci:** Tanin, protein,  $\alpha$ -amylase, pestisida nabati, *Areca catechu*, *Gnetum gnemon*.

#### Abstract

*Research on the development of botanical pesticides should be developed through new methods, such as by inhibiting the activity of digestive enzymes by secondary metabolites. The aim of this study was to identify some of potential plants as a source of tannin-protein complexes to inhibit the activity of  $\alpha$ -amylase. The study of identification of potential plants producing the active ingredient tannin-protein complex was divided into three stages, 1) identification of potential plants producing tannin, 2) isolation of tannin-protein complexes, and 3) in vitro test of tannin-protein complexes effect of the  $\alpha$ -amylase activity. Some of the observed plants were sidaguri leaf (*Sida rhombifolia*), melinjo leaf (*Gnetum gnemon*), gamal leaf (*Gliricidia sepium*), lamtoro leaf (*Leucaena leucocephala*), betel nut (*Areca catechu*), and crude gambier (*Uncaria gambir*) as a source of tannins and melinjo seed was used as protein source. Betel nut and melinjo seed were the best source of tannin-pro-*

*tein complex, tannin content 1.77 mg TAE/mL with antioxidant activity of 90%, the ability to inhibit the activity of  $\alpha$ -amylase by 95% with  $IC_{50}$  values of 10 mg/mL.*

**Key words:** Tannin, protein,  $\alpha$ -amylase, botanical pesticides, Areca catechu, Gnetum gnemon.

## PENDAHULUAN

Hama tanaman kakao yang paling berperan dalam menurunkan hasil hingga 80% adalah hama penggerek buah kakao (PBK, *Conopomorpha cramerella* (Snell.)) (Lepidoptera: Gracillariidae) (Wiryadiputra, 2009; Wahyudi *et al.*, 2008). Pengendalian hama ini yang umum dipraktekkan oleh petani adalah menggunakan pestisida, baik pestisida nabati, misalnya limbah tembakau (Wiryadiputra, 2003) maupun pestisida kimia yang telah diketahui menyebabkan dampak yang cukup serius terhadap keseimbangan ekosistem (Ramasoota, 2001). Oleh karena itu diperlukan terobosan baru sebagai upaya perakitan pestisida yang lebih berwawasan lingkungan yakni dengan mengembangkan pestisida nabati yang cara kerjanya melalui penghambatan terhadap enzim pencernaan serangga.

*Alfa amylase* ( $\alpha$ -1, 4-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.1) merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -D-(1,4)-glukan pada komponen pati, glikogen dan jenis yang berhubungan dengan karbohidrat untuk diubah menjadi energi yang dapat digunakan oleh serangga untuk pertumbuhannya, bertahan hidup dan beraktivitas (Xiao *et al.*, 2009). *Alfa amylase* merupakan enzim penting dalam pencernaan yang berdampak pada daya hidup serangga. Hama serangga selalu hidup pada kondisi yang kaya polisakarida dan kelangsungan hidupnya sangat tergantung pada keefektifan enzim  $\alpha$ -amylase. Pencernaan pati oleh  $\alpha$ -amylase serangga telah ditunjukkan dan dideskripsikan pada beberapa jenis serangga, termasuk ordo

*Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera*, dan *Hemiptera*. (Mehrabadi & Bandani, 2009; Jimenez *et al.*, 2008).

Penghambatan pada enzim  $\alpha$ -amylase akan menurunkan kemampuan untuk mencerna pati yang merupakan sarana penyedia energi. Penelitian yang dilakukan oleh Mcdougall *et al.* (2003) menunjukkan bahwa senyawa fenolik dari beberapa tanaman mampu menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase. Secara alami, tanaman menghasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder, antara lain terpenin, fenolik, glikosida, dan alkaloid (Hopkins & Huner, 2004; Wang *et al.*, 2009). Senyawa metabolit sekunder memiliki kemampuan proteksi yakni sebagai penghambat aktivitas makan (*antifeedant*), antioksidan serta antibakteri sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai pestisida nabati (Turkmen *et al.*, 2007; Misnawi & Wahyudi, 2008). Salah satu senyawa metabolit sekunder dari golongan polifenol adalah tanin.

Tanin merupakan senyawa makro molekul yang dihasilkan oleh tanaman dan berperan sebagai penolak nutrisi (*antinutrient*) dan penghambat enzim (*enzyme inhibitor*) sehingga mengakibatkan rendahnya hidrolisis pati dan menurunkan respons terhadap gula darah pada hewan (Matsushita *et al.*, 2002). Jenis tanaman yang mengandung tanin antara lain adalah daun sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) yang diketahui mengandung tanin cukup tinggi dan telah digunakan sebagai pestisida nabati pembunuh ulat (*larvasidal*) (Kusuma *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2003). Daun melinjo (*Gnetum*

*gnemon* L.) juga mengandung tanin. Daun gamal (*Gliricidia sepium* Jacq.) dan lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lamk.) mempunyai kandungan tanin 8-10% (Suharti, 2005; Sulastri, 2009). Biji pinang (*Areca catechu* L.) dan simplisia gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) telah dikenal luas sebagai penghasil tanin dengan kandungan tanin masing-masing sebesar 26,6% dan 30-40% (Pambayun, 2007; Hadad *et al.*, 2007).

Senyawa tanin yang terdapat dalam tanaman secara alami memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan protein dan membentuk protein kompleks, demikian pula dengan senyawa pati (Makkar *et al.*, 2007). Senyawa kompleks tersebut bersifat racun yang dapat berperan dalam menghambat pertumbuhan dan mengurangi nafsu makan herbivora melalui penghambatan aktivitas enzim pencernaan yakni  $\alpha$ -amylase. Terhadap penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase belum banyak dilakukan pengamatan. Tulisan ini menyajikan hasil identifikasi tanaman potensial penghasil tanin-protein kompleks, penghambatan aktivitas  $\alpha$ -amylase sebagai langkah awal perakitan pestisida nabati untuk mengendalikan hama kakao yang ramah lingkungan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Analisis Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember, sedangkan bahan lain yang digunakan berstandar kualitas untuk analisis (*analytical grade*). Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan enam perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan berupa contoh jaringan tanaman yaitu daun sidaguri (*Sida rhombifolia* L.), biji, dan daun melinjo (*Gnetum gnemon* L), daun gamal (*Gliricidia sepium* Jacq.), daun lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lamk.), biji pinang (*Areca catechu* L.), dan simplisia gambir (*Uncaria gambir* Roxb.).

Bahan penelitian yang digunakan antara lain adalah *Diphenil Picrilhydrazil* (DPPH), asam galat (*Gallic acid*), asam askorbat (*Ascorbic acid*), *Bovine Serum Albumin* (BSA), dan enzim  $\alpha$ -amylase porcine pancreatic (Sigma), serta bahan pendukung lain dengan kualitas untuk analisis (*analytical grade*).

Sepuluh gram contoh dilarutkan dengan 50 mL 50% metanol, kemudian disentrifusi dengan kecepatan 10.000 rpm (*rotary per minute*) untuk dipisahkan antara supernatan dan pelet, supernatan akan digunakan pada proses berikutnya.

## Total Protein Terlarut

Kandungan protein total diukur dengan metode Bradford (1976). Sepuluh (10)  $\mu$ L contoh ditambah dengan 990  $\mu$ L larutan Bradford, diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran dibandingkan dengan 1 mg/mL *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar untuk mengetahui kandungan total protein terlarut.

## Flavonoid

Penentuan kandungan flavonoid menggunakan metode  $AlCl_3$ , yaitu 50  $\mu$ L pada masing-masing ekstrak contoh dilarutkan pada 500  $\mu$ L air deionisasi (*deionized water*), 30  $\mu$ L 5%  $NaNO_2$  ditambahkan, didiamkan selama lima menit, lalu ditambahkan 30  $\mu$ L 10%  $AlCl_3$ , didiamkan kembali selama enam menit. Setelah enam menit, 200  $\mu$ L 1N NaOH ditambahkan dengan diikuti penambahan 240  $\mu$ L air deionisasi. Besarnya konsentrasi flavonoid yang dihasilkan pada masing-masing ekstrak contoh ditentukan dengan mengukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang

415 nm dengan menggunakan 1 mg/mL Quercetin sebagai standar.

### Polifenol

Kandungan senyawa *polyphenol* diukur menggunakan *Folin-Cicalteau Reagent* dengan menggunakan 1 mg/mL asam galat sebagai standar. Seratus (100)  $\mu$ L ekstrak contoh dilarutkan dalam 2 mL 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , yang kemudian diikuti dengan penambahan pereaksi 100  $\mu$ L 50% *Folin-Cicalteau Reagent*. Larutan dicampur sampai homogen, lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansi dari larutan tersebut diukur dengan menggunakan spektrofotometer U-2001 dengan panjang gelombang 750 nm.

### Interaksi Tanin Protein

Pengujian kandungan tanin dilakukan dengan metode yang dikemukakan oleh Hagerman (2002) dengan menggunakan *tannic acid* sebagai standar. Pengujian kandungan protein dilakukan dengan metode Bradford menggunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar dan untuk pengujian aktivitas antioksidan menggunakan DPPH (*1,1-diphenil-2-picrylhydrazil*).

Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{abs (DPPH)} - \text{abs (DPPH+contoh)}}{\text{abs (DPPH)}} \times 100\%$$

Nilai RF (*rate of flow*) dihitung dengan rumus:

$$\text{RF} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Keterangan (*Note*):

abs (DPPH) = absorbansi (nm) pada DPPH, dan RF = laju alir (*rate of flow*) senyawa antioksidan.

Metode *Radial Difusion Assay* ini dikemukakan oleh Hagerman (2002).

Sebanyak 2,5 g agarose ditambahkan dengan 250 mL 0,05 M bufer asetat pH 5,0 yang mengandung 60  $\mu$ M asam askorbat, dipanaskan dengan *microwave*, kemudian diinkubasi pada suhu 45°C selama 15 menit, selanjutnya ditambahkan BSA dan diletakkan pada petridis. Pada gel di dalam petridis dibuat beberapa lubang sebagai tempat untuk menguji contoh, dan contoh yang dimasukkan sebanyak 7 $\mu$ g GAE (*gallic acid equivalent*).

Tanin-protein kompleks didapat melalui metode presipitasi protein berdasarkan pH. Sumber protein yang digunakan pada penelitian ini adalah biji melinjo yang dilaporkan mempunyai kandungan protein cukup tinggi yakni sekitar 10% (Siswoyo, 2011). Untuk mendapatkan sumber protein dari biji melinjo, 4 g biji melinjo dihaluskan dengan menggunakan 20 mL air, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, dan supernatan akan digunakan sebagai sumber protein dalam membentuk tanin-protein kompleks. Sepuluh (10) mL contoh yang menjadi sumber tanin diinteraksikan dengan protein biji melinjo pada perbandingan 1:2, kemudian diukur pH-nya. Untuk mendapatkan pH rendah (2,4), contoh diberi larutan 1 N HCl dengan cara diteteskan, sampai sesuai dengan pH yang diinginkan sedangkan untuk pH tinggi ( $\geq 8$ ) diberi larutan 1 N NaOH. Contoh disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit untuk diambil peletnya dan digunakan pada proses selanjutnya [Hoon *et al.* (1980) dalam Neves *et al.* (1997)].

### Penghambatan Aktivitas $\alpha$ -amylase

Pengujian aktivitas  $\alpha$ -amylase secara *in vitro* dilakukan berdasarkan hambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase yang berasal dari *porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase*, sedangkan gula reduksi yang dihasilkan dianalisis

menggunakan metode DNS (*dinitrosalisilyc acid*, asam dinotrosalisilat) dengan 1 mg/mL maltose sebagai standar. Dua puluh (20)  $\mu$ L  $\alpha$ -amylase, 100  $\mu$ L 1% pati terlarut (*soluble starch*), dan 400  $\mu$ L bufer diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Lima ratus (500)  $\mu$ L DNS ditambahkan untuk mengakhiri reaksi. Larutan diinkubasikan pada air yang mendidih selama lima menit, absorban diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi tanaman potensial penghasil bahan aktif tanin-protein kompleks dilakukan pada beberapa tanaman yang berada di daerah dekat dengan kebun kakao, dengan harapan mudah diperoleh petani kakao sebagai langkah awal untuk membuat pestisida nabati. Hasil uji kandungan protein, fenolik dan tanin dari sampel yang digunakan, dapat dilihat pada Tabel 1. Fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman. Secara umum, senyawa ini merupakan senyawa yang disintesis dari gula sederhana dan memiliki cincin benzen hidrogen dan oksigen, sedangkan tanin merupakan bagian dari fenolik yang berfungsi sebagai pengikat protein, enzim, penghambat

proses pencernaan serta bersifat sebagai antioksidan.

Pada dasarnya setiap tanaman menghasilkan tanin sebagai metabolit sekunder, hanya jumlahnya berbeda pada setiap tanaman, begitu pula pada setiap bagian tanaman (Frutos *et al.*, 2004; Taiz & Zieger, 2002). Kandungan tanin dan protein berbeda untuk setiap contoh, hal ini disebabkan karena metabolit sekunder yang disintesis oleh setiap tanaman mempunyai distribusi yang terbatas pada famili tertentu, genera, dan bahkan spesies. Hal ini disebabkan oleh lingkungan tempat tanaman itu tumbuh (Hopkins & Huner, 2004; Kayani *et al.*, 2007). Tidak hanya itu, bahkan penelitian yang telah dilakukan oleh Morris *et al.* (1993), dengan menggunakan tanaman *Lotus corniculatus* var. *japonicas* menunjukkan bahwa distribusi tanin pada bagian dari tiap tanaman tersebut juga berbeda.

## Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan secara kualitatif dilakukan dengan metode *dot blot* –DPPH. Metode ini relatif mudah, sederhana dan sensitif untuk seleksi antioksidan pada tanaman, kemudian dilanjutkan dengan metode TLC-DPPH untuk menentukan

Tabel 1. Kandungan protein, fenolik, dan tanin pada beberapa jenis tanaman

Table 1. Protein, phenol, and tannin content in several species of plants

Sampel Tanaman ( <i>Plant species</i> )	Protein ( <i>Protein</i> ) mg/g	Fenolik ( <i>Phenolic</i> ) mg GAE/g	Tanin ( <i>Tannin</i> ) mg TAE/g
Daun sidaguri ( <i>S. rhombifolia leaves</i> )	2.41 $\pm$ 0.02 d	4.18 $\pm$ 0.02 a	5.91 $\pm$ 0.02 a
Daun melinjo ( <i>G. gnemon leaves</i> )	3.18 $\pm$ 0.05 c	12.11 $\pm$ 0.07 d	14.50 $\pm$ 0.19 c
Daun gamal ( <i>G. sepium leaves</i> )	0.97 $\pm$ 0.05 e	7.37 $\pm$ 0.03 c	7.21 $\pm$ 0.09 ab
Daun lamtoro ( <i>L. leucocephala leaves</i> )	0.13 $\pm$ 0.03 f	4.69 $\pm$ 0.06 b	14.90 $\pm$ 0.06 c
Simplisia gambir ( <i>Crude gambier</i> )	12.13 $\pm$ 0.02 b	74.77 $\pm$ 0.10 e	26.90 $\pm$ 0.06 e
Biji pinang ( <i>Arecanut fruit</i> )	14.87 $\pm$ 0.06 a	74.38 $\pm$ 0.04 e	20.74 $\pm$ 0.09 d

Catatan (*Notes*): BSA = (*Bovine serum albumin*); GAE = Ekuivalen asam galat (*Gallic acid equivalent*); QE = Ekuivalen kuersetin (*Quercetin equivalent*); TAE = Ekuivalen asam tanat (*Tannin acid equivalent*).

Angka-angka di dalam kolom yang sama dan diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji jarak Duncan 5% (*Numbers within the column followed with the same letters are not significantly different according to DMRT test at 5% level*).

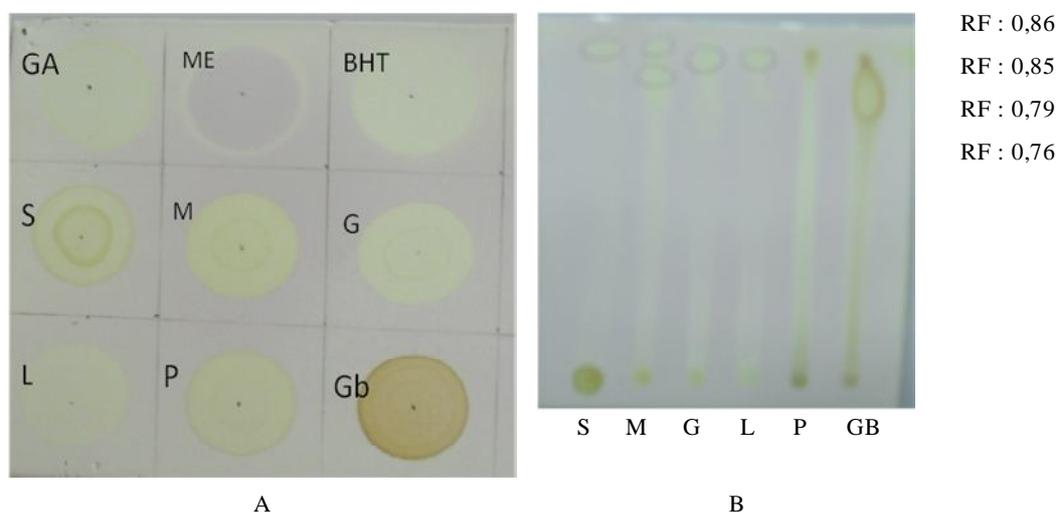
secara spesifik senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Pengujian ini dilakukan menggunakan GA (*gallic acid*) dan BHT (*butylated hydroxytoluene*) sebagai kontrol.

Dari Gambar 1 (A) dapat diketahui bahwa semua contoh yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kemampuan sebagai antioksidan. Hal ini tampak pada reduksi warna ungu yang berubah menjadi putih atau coklat. Warna ungu merupakan senyawa DPPH yang merupakan senyawa radikal bebas dan akan berubah menjadi putih atau coklat apabila senyawa DPPH berikatan dengan senyawa yang merupakan antioksidan. Pada Gambar 1 (B) yakni hasil dari metode TLC-DPPH menunjukkan bahwa terdapat banyak senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan pada masing-masing contoh, namun terdapat pita (*band*) yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan antioksidan utama. Senyawa ini mempunyai nilai laju alir (*rate of flow* = RF)

yang berbeda untuk setiap tanaman. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat beberapa senyawa berbeda yang terkandung pada contoh yang bersifat sebagai antioksidan.

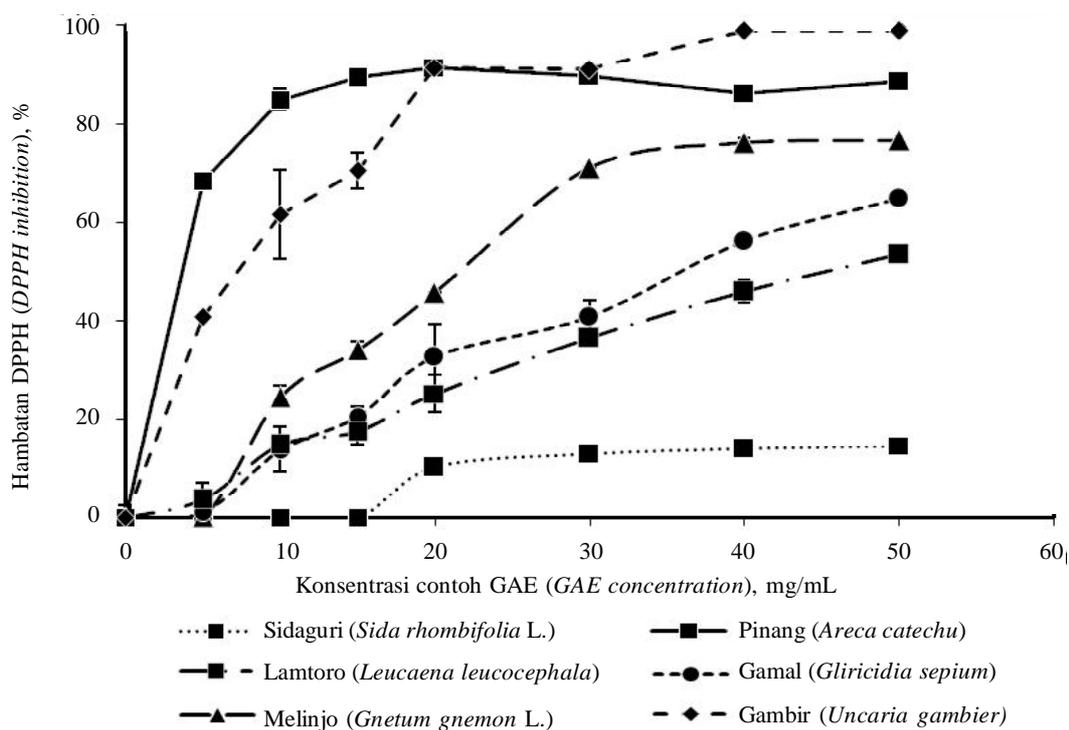
Metode berikutnya yaitu dengan perendaman dalam DPPH yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan secara kuantitatif pada setiap tanaman dan hasilnya tampak pada Gambar 2.

Pada penelitian ini diketahui bahwa contoh memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda. Pada konsentrasi 10 mg GAE/mL, contoh sudah menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi, yaitu pada biji pinang, simplisia gambir, daun melinjo, daun lamtoro, dan daun gamal, namun pada daun sidaguri baru menunjukkan aktivitas antioksidan dalam konsentrasi yang tinggi yakni 40 mg GAE/mL. Hal ini menunjukkan bahwa semua bahan tanaman yang diuji mempunyai potensi untuk dijadikan sebagai sumber antioksidan, namun biji pinang dan simplisia gambir memiliki potensi yang lebih



Gambar 1. (A) Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode *dot blot*, (B) penentuan aktivitas penangkal radikal dengan TLC-DPPH. GA = *gallic acid*; ME = metanol; BHT = *butil hidroksitoluen*; S = daun sidaguri; M = daun melinjo; G = daun gamal; L = daun lamtoro; P = biji pinang; GB = simplisia gambir.

Figure 1. (A) Antioxidant activity test using *dot blot* method, (B) TLC-DPPH. GA = *gallic acid*; ME = metanol; BHT = *butil hidroksitoluen*; S = *Sida rhombifolia L.*; M = *Gnetum gnetum L.*; G = *Gliciridia sepium*; L = *Leucaena leucocephala*; P = *Areca catechu*; GB = *Uncaria gambir*.



Gambar 2. Pengaruh pemberian contoh ekstrak tanaman dengan berbagai konsentrasi pada DPPH.  
 Figure 2. Effect of plant samples with different concentrations on DPPH.

besar untuk dijadikan sebagai sumber tanin. Hasil penghitungan nilai  $IC_{50}$  (inhibitory concentration) dari biji pinang 4,1; simplisia gambir 6,4; daun melinjo 20,0; daun gamal 41,0; dan daun lamtoro 72,4 mg/mL GAE (Gambar 2). Untuk daun sidaguri tidak dapat ditentukan nilai  $IC_{50}$ -nya, hal ini karena aktivitas penghambatannya terhadap DPPH tidak mencapai 50%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dengan meningkatnya aktivitas antioksidan, maka nilai  $IC_{50}$  akan semakin rendah dan contoh tersebut sangat berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber pestisida nabati.

### Interaksi Tanin Protein

Tanin secara alami memiliki kemampuan untuk berikatan dengan protein yang kemudian membentuk tanin protein kompleks. Secara umum, interaksi tanin protein-kompleks yang dapat diendapkan

dapat terjadi jika perbandingan jumlah protein dan tanin lebih dari satu. Apabila kandungan tanin lebih besar daripada kandungan protein maka tanin-protein kompleks yang terbentuk lebih mengarah pada tanin-protein kompleks yang tidak diendapkan. Tanin protein kompleks dapat disintesa secara turbidimetrik berdasarkan gradien pH. Tidak semua tanaman mempunyai nilai pH yang sama dalam pembentukan tanin protein kompleks.

Pada Tabel 2, dapat dilihat bahwa masing-masing contoh memiliki pH yang berbeda dalam pembentukan tanin-protein kompleks. Ada yang terbentuk pada pH asam yakni melinjo pada pH 4, pH netral yakni gambir pada pH 6, dan yang terbanyak adalah pH basa, yaitu daun sidaguri pada pH 8; daun gamal pada pH 10; daun lamtoro pada pH 10 dan biji pinang pada pH 8. Hal ini dipengaruhi oleh jenis protein yang terdapat pada setiap tanaman. Kelarutan tanin

Tabel 2. Kandungan protein, fenolik, dan tanin protein kompleks pada beberapa tanaman contoh

Table 2. Protein, phenolic, and tannin-protein complex contents in several of plant species

Jenis tanaman <i>Plant species</i>	pH	TPT <i>Total soluble protein</i> mg/ml	Fenolik <i>Phenolic</i> mg GAE/ml	Tanin <i>Tannin</i> mg TAE/ml	Hambatan DPPH <i>DPPH inhibition</i> %	P/T
Daun sidaguri <i>S. rhombifolia leaves</i>	8	2.30 ± 0.08 ab	1.63 ± 0.02 b	0.91 ± 0.13 ab	13.62 ± 0.27 ab	2.52
Daun melinjo <i>G. gnemon leaves</i>	4	2.05 ± 0.15 ab	1.39 ± 0.03 b	0.37 ± 0.00 a	18.44 ± 0.23 cd	5.54
Daun gamal <i>G. sepium leaves</i>	10	5.66 ± 0.66 c	0.83 ± 0.00 ab	0.65 ± 0.13 ab	11.76 ± 0.50 a	8.71
Daun lamtoro <i>L. leucocephala leaves</i>	10	1.49 ± 0.02 ab	12.76 ± 5.74 c	0.96 ± 0.02 ab	16.13 ± 0.59 bc	1.55
Simplisia gambir <i>Crude gambier</i>	8	1.01 ± 0.01 a	0.33 ± 0.01 a	0.55 ± 0.09 ab	32.07 ± 0.23 e	1.84
Biji pinang <i>Arecanut fruit</i>	6	4.96 ± 0.68 c	43.55 ± 7.78 d	2.79 ± 0.06 c	86.70 ± 0.05 f	1.78

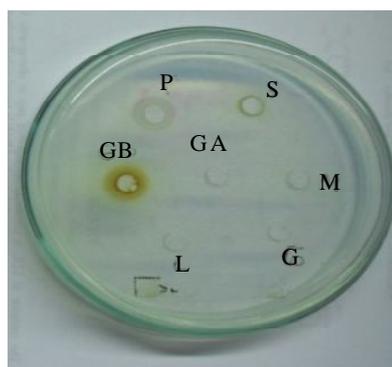
Catatan (Notes): TPT = Total protein terlarut (*Total of soluble protein*); P/T = Rasio antara protein dan tanin (*protein-tannin ratio*).

Angka-angka di dalam kolom yang sama dan diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji jarak Duncan 5 % (*Numbers in the same column followed with the same letters are not significantly different according to DMRT test at 5 % level*).

protein yang paling rendah terjadi pada nilai isoelektrik dari protein (Shahidi & Marian, 2004).

Kemampuan tanin untuk mengendapkan protein dapat terjadi pada pH di bawah 8, kemudian akan menurun tajam pada pH di atasnya disebabkan tanin tidak dapat berikatan dengan protein pada pH tinggi. Pada kondisi tersebut, tanin akan terionisasi dan tidak tersedia untuk ikatan hidrogen. Meskipun demikian, hal ini tidak berlaku untuk daun gamal dan daun lamtoro disebabkan protein yang terdapat di dalamnya tidak seluruhnya tergantung pada pembentukan ikatan hidrogen dengan kelompok fenolik yang tidak terionisasi (Hagerman & Butler, 1978).

Pengujian afinitas contoh untuk berinteraksi dengan protein dilakukan melalui uji radial difusi tanin. Tanin yang berasal dari masing-masing contoh diletakkan pada *agarose* yang mengandung BSA (*Bovine Serum Albumin*), hasilnya tampak pada Gambar 3.



Gambar 3. Difusi radial tanin dari tiap contoh pada protein BSA: P = biji pinang; S = daun sidaguri; M = daun melinjo; G = daun gamal; L = daun lamtoro; GB = simplisia gambir; GA = asam galat.

Figure 3. Radial diffusion of sample in BSA protein: P = Arecanut fruit; S = Sida rhombifolia leaves; M = Gnetum gnemon leaves; G = Gliricidia sepium leaves; L = Leucaena leucocephala leaves; GB = Crude gambier; GA = Gallic acid.

Kemampuan contoh sebagai sumber tanin berinteraksi dengan protein tampak pada hasil uji difusi radial (*radial diffusion*

assay), sebagai tampak pada Gambar 3. Interaksi tanin dengan protein terlihat dari lingkaran cincin (*visible ring*) yang terbentuk. Semakin lebar *visible ring* yang terbentuk, maka kemampuan tanin untuk berinteraksi dengan protein juga semakin besar (Makkar *et al.*, 2007). Hasil radial difusi menunjukkan bahwa sampel yang berasal dari biji pinang dan gambir mempunyai afinitas yang tinggi untuk berikatan dengan protein dibandingkan dengan sampel yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa biji pinang dan gambir berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber tanin.

Pada penelitian ini, biji melinjo dipilih untuk digunakan sebagai sumber protein, karena biji melinjo mempunyai kandungan protein yang cukup tinggi yakni mencapai 10% untuk tiap butir bijinya (Siswoyo, 2011). Selain itu biji melinjo dikenal memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan karakteristik protein pada biji melinjo telah diketahui. Penginteraksian antara sumber tanin dengan protein yang berasal dari biji melinjo diharapkan dapat meningkatkan penghambatan aktivitas  $\alpha$ -amylase. Kandungan protein, fenolik, dan tanin pada tanin protein kompleks disajikan dalam Tabel 3.

Interaksi antara tanin dan protein untuk membentuk tanin protein kompleks dipengaruhi oleh ikatan antara keduanya. Tanin protein kompleks yang terjadi karena ikatan hidrofobik memiliki kemampuan yang lebih

kuat dibandingkan dengan ikatan ion (Shahidi & Marian, 2004) dan setiap tanaman memiliki karakteristik tanin yang berbeda.

Dari Tabel 3 dapat diketahui bahwa tanin protein kompleks yang berasal dari simplisia gambir dan biji melinjo memiliki kandungan tanin yang lebih rendah dibandingkan dengan tanin protein kompleks yang berasal dari biji pinang dan biji melinjo. Demikian pula dengan kemampuan anti-oksidasinya. Oleh karena itu, contoh yang akan dipilih sebagai bahan pestisida tanin protein kompleks adalah yang berasal dari biji pinang dan biji melinjo.

### Aktivitas Penghambatan $\alpha$ -amylase

Telah banyak penelitian yang menyatakan bahwa aktivitas pencernaan akan terganggu dengan adanya  $\alpha$ -amylase inhibitor (Narayanan, 2004; Obame *et al.*, 2007; Vinayaka *et al.*, 2009). Sebagai contoh, aktifitas  $\alpha$ -amylase larva *Tecia solanivora* menurun sebesar 80% dengan adanya biji *Amaranthus hypocondriacus*. Mekanisme penghambatan tanin terhadap bakteri dan beberapa enzim belum diketahui secara pasti. Ada pendapat yang menyatakan bahwa strategi penghambatan  $\alpha$ -amylase serangga antara lain melalui penghambatan interaksi antara sisi substrat yang seharusnya berikatan dengan enzim, menjadi berikatan dengan tanin. Akibatnya terbentuk *subsite* yang menciptakan molekul-molekul lain sehingga struktur yang seharusnya terlibat

Tabel 3. Kandungan protein, fenolik, dan tanin dalam tanin protein kompleks

Table 3. Protein, phenolic, and tannin content in tanin protein complex

Contoh Sample	Fenolik Phenolic	Tanin Tannin	TPT Total soluble protein	Hambatan DPPH/Aktivitas antioksidan DPPH Inhibition/antioxidant activity
	mg GAE/mL	mg TAE/mL	mg/mL	%
P-M	5.30 ± 0.02 b	1.77 ± 0.01 b	0.31 ± 0.001 a	90.05 ± 0.37 b
Gb-M	1.43 ± 0.01 a	0.52 ± 0.00 a	0.27 ± 0.001 a	46.74 ± 0.89 a

Catatan (Notes): BSA = Bovine Serum Albumin; GAE = Gallic acid equivalent; QE = Quercetin equivalent; TAE = Tannic acid equivalent.

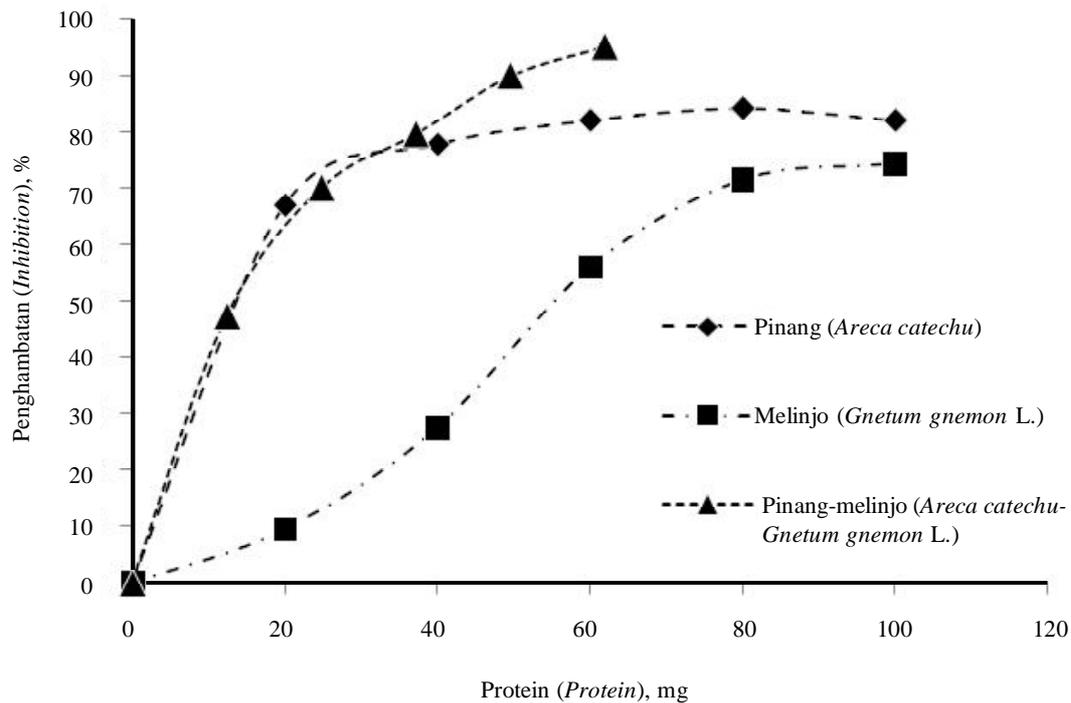
P = Biji pinang (*Areca nut fruit*); Gb = Simplisia gambir (*Crude gambier*); M = Biji melinjo (*Gnetum gnemon bean*).

dalam proses, menjadi berikatan dengan struktur molekul yang bebas yang merupakan molekul inhibitor, hasilnya proses terhambat (Payan, 2004). Selain itu ada yang berpendapat bahwa kemampuan tanin untuk berikatan dengan protein mampu menghambat  $\alpha$ -amylase, glucosyl transferase, dan hal ini menyebabkan enzim tersebut kehilangan fungsi dan terdistorsi menjadi struktur tersier (Miller, 2001).

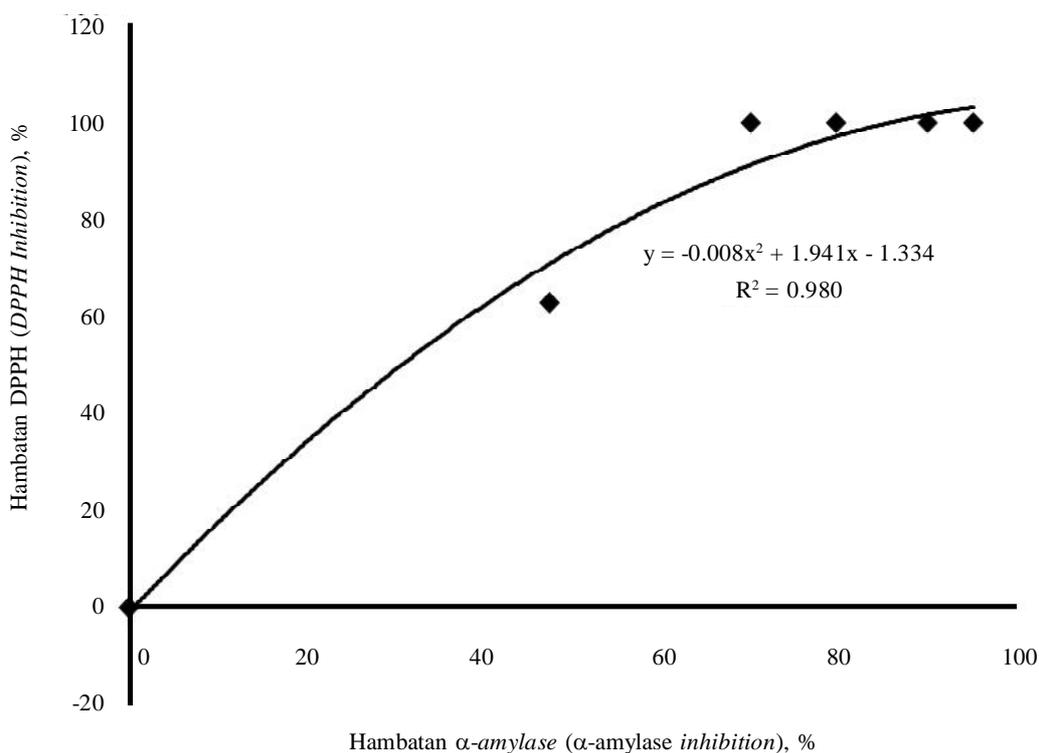
Penghambatan aktivitas  $\alpha$ -amylase dari tanin-protein kompleks yang berasal dari biji pinang-melinjo sebagaimana terlihat pada Gambar 4. Pemberian tanin-protein kompleks ternyata berpengaruh positif terhadap penghambatan aktivitas  $\alpha$ -amylase. Pemberian tanin yang berasal dari ekstrak buah pinang dan protein yang berasal dari biji

melinjo ternyata mampu menghambat aktivitas  $\alpha$ -amylase dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 11 mg/mL dan 51 mg/mL. Namun dengan membentuk tanin protein kompleks yang berasal dari kedua bahan ini ternyata mampu meningkatkan penghambatan terhadap aktivitas  $\alpha$ -amylase, yakni sebesar 95% dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 10 mg/mL.

Korelasi antara aktivitas penghambatan  $\alpha$ -amylase dan aktivitas antioksidan biji pinang-melinjo tampak pada Gambar 5. Dari hasil penelitian ini tampak bahwa terdapat korelasi positif antara antioksidan dan aktivitas penghambatan  $\alpha$ -amylase. Pada tanin-protein kompleks yang berasal dari biji pinang-melinjo, peningkatan aktivitas antioksidan ternyata sejalan dengan meningkatnya penghambatan aktivitas  $\alpha$ -amylase.



Gambar 4. Aktivitas penghambatan  $\alpha$ -amylase oleh tanin-protein kompleks dari biji pinang dan biji melinjo.  
 Figure 4.  $\alpha$ -amylase inhibition activity by tannin protein complex from Arecanut fruit and Gnetum gnemon seed.



Gambar 5. Korelasi antara aktivitas penghambatan  $\alpha$ -amylase dan aktivitas antioksidan dari tanin protein kompleks asal biji Pinang-biji Melinjo.

Figure 5. Correlation between  $\alpha$ -amylase inhibition activity and antioxidant activity from tannin protein complex derived from *Areca catechu*-*Gnetum gnemon* seeds.

## KESIMPULAN

Bahan yang berpotensi sebagai sumber tanin-protein kompleks, yakni biji pinang yang diinteraksikan dengan biji melinjo. Tanin-protein kompleks ini memiliki kandungan tanin sebesar 1,77 mg TAE/mL dengan aktivitas antioksidan sebesar 90%, kemampuan untuk menghambat aktivitas  $\alpha$ -amylase sebesar 95% dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 10 mg/ml.

## DAFTAR PUSTAKA

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prin-

ciple of dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Frutos, P.; G. Hervás; F.J. Giraldez & A.R. Mantecon (2004). Review. Tanins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2, 191–202.

Hadad, M.; N.R. Ahmadi; M. Herman; H. Supriadi & A.M. Hasibuan (2007). *Teknologi Budidaya dan Pengolahan Hasil Gambir*. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri.

Hagerman, A.E. (2002). *Tanin Chemistry*. Miami University, Oxford, USA.

Hagerman, A.E. & L.G. Butler (1978). Protein precipitation method for the quantita-

- tive determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 809–812.
- Hopkins, W.G. & N.P.A Huner (2004). *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley and Sons, Inc. Third Edition. London.
- Islam, M.D.; N.A. Khatune; M.I.I. Waheed & M.D. Haque (2003). Larvicidal activity of a new glucocide, phenyl ethyl D-glucopiranoside from the stem of plant *Sida rhombifolia* Linn. *Pakistan Journal of Biological Science*, 6, 73–75.
- Jimenez., A.V.; J.W. Arboleda; A. Lo´pez A´vila & M.F. Rossi-de-Sa´ (2008). Digestive  $\alpha$ -amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. *Bulletin of Entomological Research*, 98, 575–579.
- Kayani, S.A.; M. Ayeesha; K.H. Abdul; Achakzai & A. Shahla (2007). Distribution of secondary metabolites in plants of Quetta-Balochistan. *Pakistan Journal Botany*, 39, 1173–1179.
- Kusuma, F.; K. Dewi & F. Enny (2009). *Isolasi, Identifikasi, dan Uji Toksisitas Minyak Atsiri Daun Sidaguri (Sida rhombifolia Linn)*. Jurusan Kimia FMIPA UNDIP. Semarang.
- Makkar, H.P.S.; P. Shiddurajju & K. Becker (2007). *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press. New Jersey.
- Matsushita, H.; T. Mio & O. Haruko (2002). Porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase shows binding activity toward N-linked oligosaccharides of glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 4680–4686.
- Mcdougall, G.; S. Faina; D. Patricia; S. Pauline; B. Alison & S. Derek (2003). *Differ Polyphenolic Components of Soft Fruit Inhibit  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase*. Scottish Crop Research Institute. United Kingdom.
- Mehrabadi, M. & A.R. Bandani (2009). Assessing of  $\alpha$ -amylase activity of midgut in wheat bug *Eurygaster Maura*. *American Journal of Applied Sciences*, 6, 478–483.
- Miller, J.M.T. (2001). Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Medical Microbiology*, 50, 299–302.
- Misnawi & T.Wahyudi (2008). Potential uses of cocoa bean infested by *Conopomorpha cramerella* for polyphenol extraction. *ASEAN Food Journal*, 15, 27–34.
- Morris; T.R. Carron; M.P Robbin; & K.J. Webb (1993). Distributions of condensed tannins in flowering plants of *Lotus corniculatus var japonicas* and tannin accumulations by transformed root cultures. *Journal of Experimental Botany*, 43, 221–231.
- Narayanan, K. (2004). Insect defense: its impact on microbial control of insect pest. *Current Science*, 86, 6-12.
- Neves, V.A.; E.J. Lourenco & M.A.M. Silva (1997). Effect of tannins on albumin hydrolysis by tripsin. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17, 208–212.
- Obame, L.C.; J. Koudou; B.S. Kumulungui; I.H.N. Bassolé; P. Edou; A.S. Ouattara & A.S. Traoré (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Canarium schweinfurthii* Engl. Essential oil from Centrafrican Republic. *African Journal Biotechnology*, 6, 2319–2323.
- Pambayun, R.; G. Murdijadi; S. Slamet & R.K. Kapti (2007). Kandungan fenol dan sifat antibakteri dari berbagai ekstrak produk gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *Majalah Farmasi Indonesia*, 18, 141–146.
- Payan, F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylase by plant protein inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696, 171–180.

- Ramasoota, J. (2001). Chemical and botanical pesticide in Vorthern Thailand. *Journal of Health Science*, 10, 1–7.
- Shahidi, F. & N. Marian (2004). *Phenolics in Food and Neutraceuticals*. CRC Press. Washington D.C.
- Siswoyo, T.A. (2011). Biji melinjo tingkatan daya tahan. *Harian Kompas*, 27 Januari 2011.
- Suharti, F.M. (2005). *Proteksi Protein Daun Lamtoro (Leucaena leucocephala) Menggunakan Tanin, Saponin, Minyak dan Pengaruhnya Terhadap RUDP dan Sintesis Protein Mikroba Rumen*. Fakultas Peternakan, Universitas Jendral Soedirman. Purwokerto.
- Sulastri, T. (2009). Analisis kadar tanin ekstrak air dan ekstrak ethanol pada biji pinang sirih. *Jurnal Chemical*, 10, 59–63.
- Taiz, L. & E. Zieger (2002). *Plant Physiology*. Sinauer Associates. 3<sup>th</sup> edition. Sunderland.
- Turkmen, N.; Y.S. Velioglu; F. Sari & G. Polat (2007). Effect of extraction condition on measured total polyphenol content and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12, 484–496.
- Vinayaka, S.; S.P. Swarnalatha; H.R. Preethi; K.S. Surabhi; R. Prashith & S.J. Sudharshan (2009). Studies on in vitro antioxidant, antibacterial, and insecticidal activity of methanolic extract of *Abrus pulchellus* wall (*Fabaceae*). *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 1, 110–116.
- Wahyudi, T.; T.R. Panggabean & Pujiyanto (2008). *Panduan Lengkap Kakao Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Wang, J; H. Liu; J. Zhao; H. Gao; L. Zhou; Z. Liu; Y. Chen & P. Sui (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-Hydroxy-4-Methoxy-benzaldehyde. *Molecules*, 15, 5807–5817.
- Wiryadiputra, S. (2003). Keefektifan limbah tembakau sebagai insektisida nabati untuk mengendalikan hama *Helopheltis* sp. pada kakao. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 9, 35–45.
- Wiryadiputra, S. (2009). *Diagnosis Hama Utama Tanaman Kakao*. Bahan Ajar Program Pascasarjana Universitas Jember. Jember.
- Xiao, Z.; R. Storms & A. Tsang (2009). *A Quantitative Starch-iodine Method for Measuring  $\alpha$ -amylase and Glucoamylase Activities*. Biotechnology Research Institute. Canada.

\*\*\*\*\*.