



Proses Inaktivasi Enzim Gaultherase Melalui *Mixed-Drying Extraction* untuk Pengambilan Gaultherin Sebagai Antikanker

Priyono Kusumo¹, MF.Sri Mulyaningasih¹, dan Mohamad Endy Yulianto²

¹Fakultas Teknik, Universitas 17 Agustus 1945 Semarang

email : priyo330@yahoo.com

²Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro Semarang

email: endy_y@yahoo.com

Abstract

Research destination is to determine the production process of gaultherin from gandapura in optimum manner through gaultherase enzyme inactivation techniques with mixed-drying extraction technology. Research activities include: gaultherin productivity studies and optimization of process parameters. Efforts to improve gaultherin productivity including the effect of addition of drying agent (magnesium sulfate, sodium sulfate, calcium chloride, and calcium sulfate). Optimization study was conducted using a factorial design 2n. Determination of influential variables by using normal probability plots, after the calculation of the main effects and interaction calculations. During the process, measure the content of gaultherin, methyl salicylate, salicylic acid using a spectrophotometer or HPLC-MS. The results show that increasing the concentration of drying agent and ethanol causes greater gaultherin acquisition, especially with the addition of calcium chloride. Results stated that the variable of mixed-drying process extraction for enzyme inactivation of gaultherase which most influential is the pH and concentration of alcohol. The greater pH of extraction, will enhance the result of the active compound gaultherin. The greater solvent concentration, gaultherin that extracted increasing. Optimum Gaultherin production achieved at a concentration 90% of ethanol with the acquisition of active compound 13.10%.

Keywords : *drying agent, enzyme inactivation, extraction, gandapura, gaultherin*

Pendahuluan

Gandapura merupakan salah satu tanaman penghasil minyak atsiri yang masuk dalam daftar Komoditi Binaan Direktorat Jenderal Perkebunan berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian nomor 511/kpts/pd.310/9/2006. Gandapura (*Gaultheria fragrantissima*) dapat tumbuh pada dataran tinggi, 1300-3300 meter dpl (Hernani, 2004). Selama ini gandapura belum dikembangkan secara ekonomis dan tumbuh liar didaerah pegunungan diantaranya di Gunung Lawu, Tawangmangu dan di Wonosobo, Dieng. Salah satu industri penghasil minyak gandapura yang ada di Wonosobo adalah Kelompok Tani Rukun yang berlokasi di Desa Sikunang, Kecamatan Kejajar, Kabupaten Wonosobo.

Minyak gandapura memiliki kandungan metil salisilat antara 93-98%. Namun demikian, minyak gandapura yang dihasilkan Kelompok Tani di Indonesia hanya memiliki kandungan metil salisilat 82,23% (Mauludi, 2003). Disisi lain, kendala utama yang dihadapi kelompok-kelompok tani penyuling minyak gandapura saat ini, adalah bahwa minyak gandapura tidak lagi kompetitif dipasaran mengingat Cina sudah bisa memproduksi minyak gandapura sintetis (Manurung, 2002). Oleh karenanya, perlu pengembangan diversifikasi produk dari tanaman gandapura.

Sebagian besar salisilat yang terdapat pada tanaman gandapura berada dalam bentuk aktif yang disebut gaultherin, yang merupakan konjugasi metil salisilat dengan disakarida. Ketika jaringan tumbuhan tersebut rusak atau terkoyak, gaultherin akan terhidrolisa secara enzimatis menjadi metil salisilat dan terlepas. Proses ini diduga merupakan bagian sistem pertahanan dari tumbuhan gandapura.

Gaultherin memiliki sifat-sifat yang menjadikannya sebagai kandidat terbaik natural aspirin, anti kanker, anti inflamatory dan cardiopulmonary (Ribnický *et al.*, 2003). Secara empirik tanaman dari keluarga gaultheria telah digunakan dalam pengobatan kanker dan leukemia (Hoffman, 2007). Tanaman yang berasal dari gaultheria juga dilaporkan memiliki sifat sebagai senyawa antikarsinogenik. Sebagai natural aspirin, gaultherin memiliki daya sembuh yang sama dengan aspirin sintetis namun memiliki efek negatif yang minimal. Saat ini, aspirin (*Acetylsalicylic acid*) merupakan obat yang paling banyak dikonsumsi oleh penduduk dunia karena sifat dan fungsinya sebagai anti piretik, anti inflamatory dan analgesik. Menurut estimasi, konsumsi aspirin dunia mencapai 20-50 juta pounds pertahun (Barat, 1998). Oleh karenanya, diperkirakan kebutuhan industri farmasi dunia terhadap gaultherin akan meningkat pada tahun-tahun mendatang.





Meskipun demikian, sampai saat ini belum ada metode pengambilan gaultherin yang efektif dari tanaman gandapura. Kesulitan yang dialami dalam proses pengambilan gaultherin adalah selama proses ekstraksi, dengan rusaknya jaringan, maka gaultherin akan dengan segera terhidrolisa menjadi komponen-komponen individualnya yaitu metil salisilat dan disakarida. Proses hidrolisa tersebut diyakini dikatalisasi oleh enzim yang terdapat dalam tanaman itu sendiri yaitu gaultherase (Waters *et al.*, 1931).

Untuk mengatasi hal ini, perlu dicari metode guna mengekstraksi gaultherin dari tanaman pada kondisi dimana aktivitas gaultherase minimal atau inaktif. Dengan demikian reaksi hidrolisa gaultherin menjadi metil salisilat dan disakarida tidak akan terjadi.

Metode Penelitian

Metode pengambilan gaultherin pernah dilakukan pada tahun 1928, diketahui bahwa gaultherin yang terdapat pada *Gaultheria procumbens* hanya dapat diekstrak menggunakan air panas dan penambahan kalsium karbonat. Proses ini diikuti dengan beberapa rangkaian ekstraksi menggunakan pelarut berupa asetik ester hidrat pada suhu 100°C. Proses tersebut hanya menghasilkan yield akhir 4 g/kg daun segar (Bridel dan Grillon, 1928). Yield yang kecil terutama disebabkan oleh gaultherin yang terkandung dalam *Gaultheria procumbens* telah terhidrolisa oleh gaultherase. Aktivitas gaultherase terhambat dengan penambahan senyawa polar. Diyakini bahwa alkohol dapat menghambat aktivitas gaultherase (U.S. Paten No. 2002/0031562 A1, Yulianto dkk., 2008, Kusumo dkk., 2013). Beberapa jenis senyawa kimia lain juga mampu menghambat aktivitas enzim gaultherase, antara lain methylen klorida, acetonitril maupun air panas (U.S. Paten No. 7.033.618). Oleh karenanya, untuk produksi gaultherin dari gandapura perlu menela'ah teknik inaktivasi enzim gaultherase dan ekstraksi gaultherin secara simultan dengan pelarut etanol. Pelarut etanol akan berfungsi ganda, yaitu inaktivasi enzim sekaligus mengekstrak gaultherin. Studi fundamental perpindahan massa telah dilakukan untuk recovery gaultherin melalui proses ekstraksi (Yulianto dkk., 2008, Kusumo dkk., 2013). Hasil kajian menunjukkan, bahwa inaktivasi enzim gaultherase yang berada dalam gandapura menggunakan pelarut etanol sangat potensial dan prospektif, karena mampu meningkatkan perolehan senyawa aktif gaultherin hingga mencapai 14,46% pada pH 8. Namun demikian, gaultherin yang terekoveri belum bisa dihasilkan secara maksimal. Hal ini disebabkan oleh: (i) mekanisme difusi pelarut etanol ke dalam sitoplasma tanaman gandapura sedikit tertahan sel selular, sehingga tidak semua enzim gaultherase mengalami proses *unfolding*, (ii) reaksi hidrolisa gaultherin menjadi metil salisilat dan disakarida masih tetap terjadi, dan (iii) produk gaultherin berupa serbuk padat relatif kurang stabil.

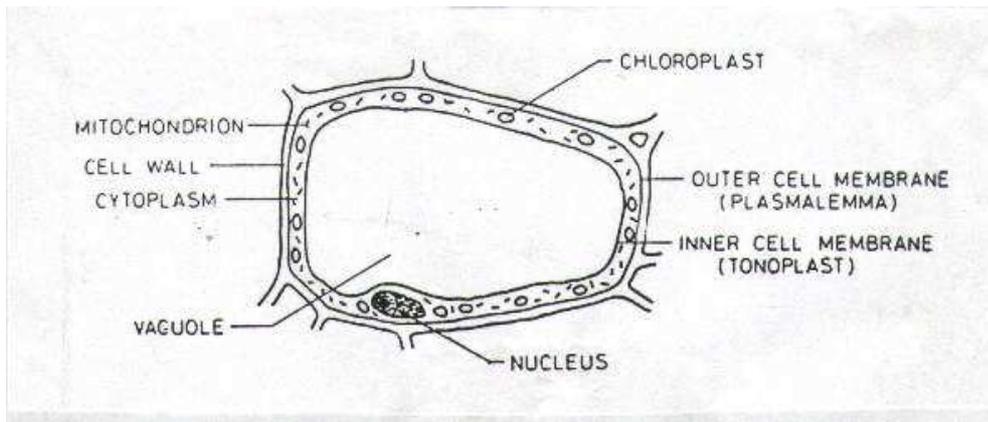
Oleh karena, perlu pengembangan proses ekstraksi dan *drying agent* secara simultan untuk produksi gaultherin dalam bentuk ukuran nanoenkapsulasi. Keunggulan proses ini adalah mampu meringkas tiga proses sekaligus dalam satu tahapan meliputi proses inaktivasi enzim gaultherase, proses ekstraksi, dan proses dehidrasi osmosis. Modifikasi ekstraktor berfungsi sebagai inaktivasi enzim gaultherase dan pengrusakan sel selular, agar gaultherin terekoveri secara maksimal. Sedangkan *drying agent* berfungsi sebagai pengering secara osmosis, yaitu proses pengambilan air dari suatu bahan yang dilakukan dengan menempatkan bahan pada larutan berkonsentrasi tinggi dimana diantara keduanya terdapat membran semipermeabel. Akibatnya kemungkinan terjadinya reaksi hidrolisa gaultherin menjadi metil salisilat relatif rendah.

Ekstraksi dan dehidrasi osmosis dilakukan dalam *mixed-drying extraction*. Alat *mixed-drying extraction* dilengkapi *blade* atau pisau pencacah dibagian bawah. Rasio pelarut : umpan, 10:1. Etanol yang ditambahkan adalah etanol dengan konsentrasi 90 %. pH larutan dijaga pada pH 8 menggunakan buffer pH. Kecepatan putar pengaduk dan kecepatan putar pisau pencacah masing masing 75 dan 125 rpm. *Drying agent* ditambahkan sesuai dengan variabel percobaan. Ekstraksi dilangsungkan selama 60 menit. Padatan kemudian dipisahkan dari ekstrak menggunakan filter atau sentrifugasi. Ekstrak yang telah terpisah dari padatannya kemudian ditambahkan dengan bahan kimia atau dipanaskan guna menghilangkan pelarut. Untuk mendapatkan gaultherin dalam bentuk larutan, ekstrak yang telah dipanaskan dapat diresuspensi menggunakan buffer atau air. Hasil ekstraksi kemudian dianalisa kandungan metil salisilat, asam salisilat menggunakan metode analisa dilute isotop stabil dan kandungan gaultherinnya menggunakan HPLC-MS.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

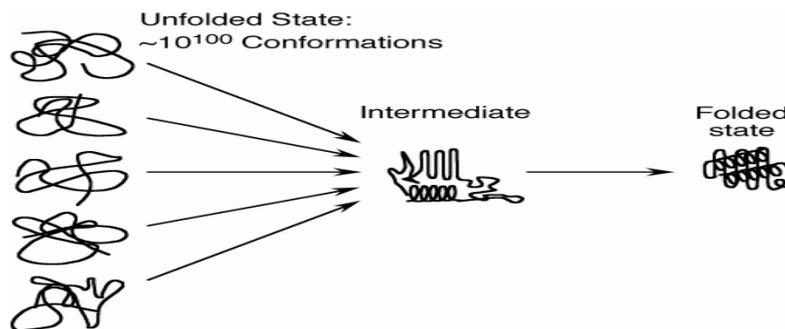
Ekstraksi tanaman gandapura menggunakan senyawa polar berupa etanol berfungsi ganda, yaitu menginaktivkan enzim gaultherase dan mengekstrak senyawa aktif gaultherin. Difusi etanol ke dalam daun gandapura (Gambar 1) bertujuan agar enzim gaultherase yang berada dalam sitoplasma bepenetrasi dengan pelarut, sehingga menyebabkan aktivitas enzim terhambat. Pernyataan ini juga diungkapkan oleh Poulev dkk (2003) bahwa aktivitas gaultherase terhambat dengan penambahan senyawa polar. Mekanisme selanjutnya bahwa pelarut etanol akan menyusup menembus dinding membran tonoplast dan terjadi kontak fasa dengan senyawa aktif gaultherin. Pelarut polar tersebut akan mendifusi ke luar sel daun dengan membawa gaultherin. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kelarutan.





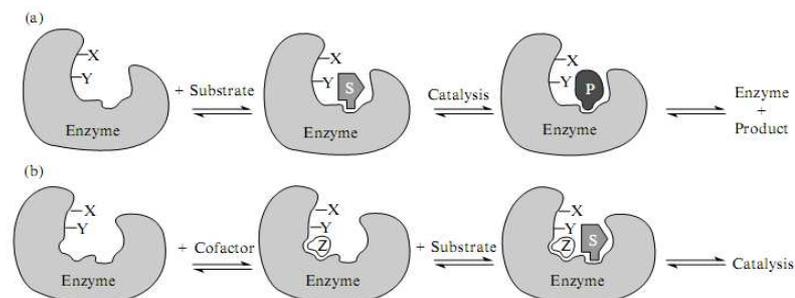
Gambar 1. Sel daun Gandapura

Enzim merupakan suatu molekul raksasa dengan berat molekul yang bervariasi antara 5000 Da-5 juta Da. Enzim termasuk dalam kelompok makromolekul yang lebih besar yakni protein dan terdiri dari rangkaian rantai linear asam-asam amino spesifik. Pada kondisi optimumnya enzim akan mengalami proses folding (Gambar 2). Proses terbentuknya susunan folding pada enzim merupakan proses spontan yang terjadi dalam hitungan detik (Bugg, 2004). Oleh karenanya, jika enzim gaultherase berada dalam keadaan folding, dan juga terjadi kerusakan pada membran tonoplast, mengakibatkan enzim tersebut mengkatalisis reaksi hidrolisa senyawa gaultherin menjadi metil salisilat. Hal ini menyebabkan perolehan senyawa aktif gaultherin relatif rendah



Gambar 2. Proses Folding

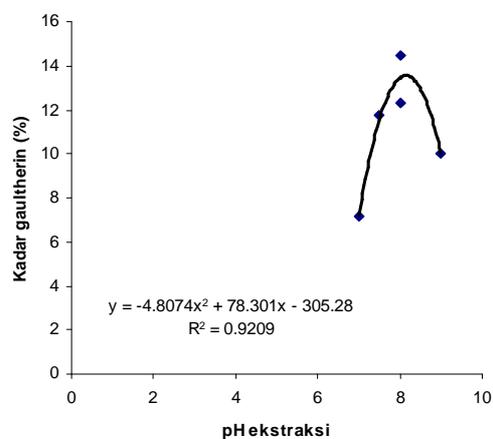
Rangkaian asam amino pada enzim akan membentuk susunan tiga dimensi tertentu yang spesifik pada masing-masing jenis enzim (struktur tersier). Bagian dari struktur tersier enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivitas katalitik enzim disebut sisi aktif. Jumlah sisi aktif dari suatu enzim mencapai 10-20% dari volume total enzim (Bugg 2004). Sisi aktif suatu enzim biasanya berupa suatu celah hidrofilik yang terdiri dari rangkaian rantai asam amino yang akan mengikat substrat (Gambar 3.a) atau mengikat suatu kofaktor (Gambar 3.b) dan mengkatalisis reaksi. Proses folding pada enzim merupakan proses yang melibatkan masuknya rantai asam amino yang bersifat hidrofobik kesisi bagian dalam dari enzim dan proses keluar atau bergesernya rantai asam amino yang bersifat hidrofilik kebagian luar dari susunan tiga dimensi enzim.



Gambar 3. Sisi aktif enzim

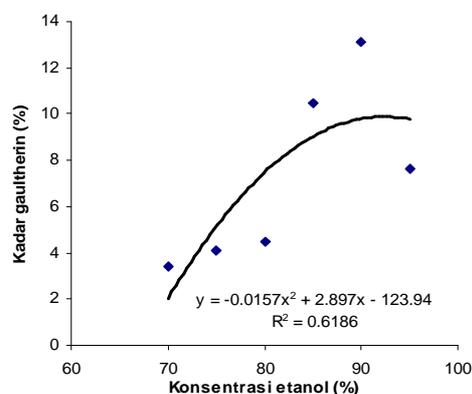
Proses folding pada enzim merupakan proses yang melibatkan masuknya rantai asam amino yang bersifat hidrofobik ke sisi bagian dalam dari enzim dan proses keluar atau bergesernya rantai asam amino yang bersifat hidrofilik ke bagian luar dari susunan tiga dimensi enzim. Untuk mengkonfirmasi bahwa benar gaultherin yang teridentifikasi pada sampel dilakukan analisa lanjutan terhadap sampel. Analisa FAB+ memunculkan bahwa pada peak yang muncul pada saat retensi 14 menit adalah senyawa yang memiliki *molecular ion mass* sebesar 469,0945 m/z. Massa tersebut merupakan massa molekul gaultherin (446 m/z) ditambah dengan massa molekul sodium, yang seringkali muncul. Oleh karenanya, berdasarkan grafik hasil analisa FAB+ kita yakin bahwa sampel yang dianalisa benar mengandung gaultherin.

Gambar 4 menunjukkan bahwa semakin besar pH ekstraksi, akan meningkatkan perolehan senyawa aktif gaultherin. Kondisi optimum *mixed-drying extraction* inaktivasi enzim tercapai pada pH 8 dengan kadar senyawa aktif gaultherin sebesar 14,46%. Hal ini bisa dijelaskan bahwa gaultherase merupakan jenis enzim hidrolase, yang memiliki aktivitas optimum disekitar pH larutan asam lemah. Oleh karenanya, pada kondisi *mixed-drying extraction* basa lemah menyebabkan enzim gaultherase mengalami *unfolding*, akibatnya akan mereduksi reaksi hidrolisa gaultherin menjadi metil salisilat yang dikatalisis oleh enzim gaultherase.



Gambar 4. Grafik hubungan antara pH ekstraksi dengan kadar gaultherin

Gambar 5 menyajikan grafik hubungan antara konsentrasi etanol terhadap kadar gaultherin. Semakin besar konsentrasi pelarut, gaultherin yang terekstrak semakin meningkat. Hal ini terjadi karena memperbesar konsentrasi pelarut berarti memperbesar fasa kontinyu, akibatnya fraksi volum fasa cair yang terdispersi semakin kecil dan diameter partikel juga mengecil. Dengan mengecilnya diameter partikel, maka akan memperluas kontak antar fasa yang disebabkan semakin meningkatnya solut yang terseret dalam fasa pelarut. Akan tetapi, peningkatan konsentrasi senyawa polar lebih lanjut menyebabkan perolehan senyawa aktif gaultherin menurun. Hal ini dimungkinkan, pada konsentrasi etanol diatas 90%, menyebabkan sebagian diluen terikut ke fasa kontinyu karena terjadi peningkatan kelarutan. Produksi gaultherin secara optimum tercapai pada konsentrasi etanol 90% dengan perolehan senyawa aktif sebesar 13,10%.



Gambar 5. Grafik hubungan antara konsentrasi etanol dengan kadar gaultherin



Kesimpulan

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa variabel proses inaktivasi enzim gaultherase melalui *mixed-drying extraction* yang paling berpengaruh adalah pH dan konsentrasi alkohol. Semakin besar pH ekstraksi, akan meningkatkan perolehan senyawa aktif gaultherin. Kondisi optimum inaktivasi enzim melalui *mixed-drying extraction* tercapai pada pH 8 dengan kadar senyawa aktif gaultherin sebesar 14,46%. Semakin besar konsentrasi pelarut, gaultherin yang terekstrak semakin meningkat. Produksi gaultherin secara optimum tercapai pada konsentrasi etanol 90% dengan perolehan senyawa aktif sebesar 13,10%.

Ucapan Terima Kasih

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT serta terima kasih yang sebesar-besarnya kepada DP2M-DIKTI atas dukungan dana dalam kegiatan Penelitian Hibah Bersaing 2014.

Daftar Pustaka

- Barat. 1998. Use of medications and polypharmacy are increasing among the elderly. *Journal of Clinical Epidemiology* 55 (8): 809-817.
- Bridel MM, Grillon S. 1928. Metil Salisilat pada Gaultheria P. *Comptes de Rendus*: 609-611.
- Hernani. 2004. Gandapura: pengolahan, fitokimia, minyak atsiri dan daya herbisida. *Buletin TRO XV (2)*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Penelitian.
- Hoffman EJ. 2007. *Cancer and the Search for Selective Biochemical Inhibitors*. Second Ed CRC Press.
- Kusumo, P., Kasmiyatun, dan M.E. Yulianto. 2013. Pengaruh drying agent pada Ekstraksi dan Inaktivasi Enzim Gaultherase Simultan dari Gandapura (*Gaultheria fragrantissima*). Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan UPN Yogyakarta.
- Manurung R. 2002. Minyak atsiri, peluang bisnis yang belum digarap optimal. *Harian Umum Sore Sinar Harapan*.
- Mauludi L. 2003. Kelayakan usaha pengolahan minyak gandapura di kabupaten wonosobo jawa tengah. *Buletin TRO XIV (2)*. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.
- Poulev, J. M. O'Neal, S. Logendra, R. B. Pouleva, V. Timeva, A. S. Garvey, D. Gleba, I. S. Jenkins, B. T. Halpern, R. Kneer, G. M. Cragg, and I. Raskin. 2003 Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.*, Vol. 46, [2542 - 2547](#).
- Ribnicky., David, Poulev, Alexander, Raskin and Ilya, 2002,"Recovery of gaultherin from plants", U.S. Patents No. 2002/0031562 A1.
- Ribnicky, Poulev. 2003. The determination of salicylates in gaultheria p for use as a natural aspirin alternative. *Journal of Nutraceuticals*. Functional and Medical Food. Hawoth Press Inc.
- Ribnicky., David, Poulev, Alexander, Raskin and Ilya, 2006," Methods of administering gaultherin-containing compositions", U.S. Patent No. 7.033.618.
- Walters A, Robertson. 1931. Synthesis of glycosides, the synthesis of monotroposides. *Journal Of American Engineering*.





Lembar Tanya Jawab

Moderator: Zubaidi Achmad (Teknik Kimia UPN “Veteran” Yogyakarta)

Notulen : Putri Restu D. (Teknik Kimia UPN “Veteran” Yogyakarta)

1. Penanya : Dwi Suheryanto (Balai Besar Kerajinan dan Batik Yogyakarta)

Pertanyaan : Berapakah batas konsentrasi optimal dari etanol yang digunakan? Daun yang digunakan yang tua atau muda? Berapa kadar air dalam daun?

Jawaban : Konsentrasi etanol optimal 90%. Daun tidak dibatasi tua atau muda dan tidak dianalisa kadar airnya.

