

Inhibisi Lipase Pankreas secara *In Vitro* oleh Ekstrak Air dan Etanol Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica*) dan Rimpang Kunci Pepet (*Kaempferiae rotundae*)

Dyah Iswantini Pradono^{1,2*)}, Latifah Kosim Darusman^{1,2)}, dan Ai Susanti²⁾

¹⁾Jurusan Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

²⁾Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

Diterima 24-11-2009

Disetujui 12-10-2010

ABSTRACT

Tamarind and kunci pepet has been used traditionally as herbal medicine to reduce body weight or used as antiobesity. But the mechanism *in vitro* of this herbal in reducing body weight has not been known yet. The objective of this research is to evaluate these herbal as antiobesity by their water and ethanol extracts capability in inhibiting pancreatic lipase activity *in vitro* at pH 8, incubation time 45 minutes, and temperature 40°C. Pancreatic lipase used in this research was human pancreatic lipase with concentration of 1.4×10^{-5} µg/µl and the substrate was sesame oil with concentration of 16.2 µg/µl. The water and ethanol extracts of tamarind leaves contained alkaloids, flavonoids, saponins, steroids, and tannins. Water extract of kunci pepet contained alkaloids, flavonoids, saponins, and tannins, while ethanol extract contained alkaloids, flavonoids, saponins, and triterpenoids. The results of tamarind leaves extracts showed that ethanol extract in concentration of 150 ppm had the highest inhibitory effect, with the value of 49.0%. Water extract of kunci pepet at concentration of 200 ppm had the highest inhibition, with the value of 65.1%. These values were higher than inhibitory effect of Xenical® 100 ppm as the positive control, with the inhibition value of 10.6%.

Keywords: antiobesity, asam jawa (*Tamarindus indica*), inhibition, *in vitro* pancreatic lipase activity, kunci pepet (*Kaempferiae rotunda*)

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini, kecenderungan manusia untuk kembali ke alam semakin meningkat, termasuk penggunaan obat-obat pelangsing yang berasal dari tumbuhan. Kecenderungan ini disebabkan oleh obat pelangsing alami dari tumbuhan dirasakan mempunyai efek samping yang lebih rendah dibandingkan dengan obat-obat pelangsing modern.

Keanekaragaman tumbuhan obat pelangsing di Indonesia merupakan sumber metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan obat pelangsing. Tumbuhan obat pelangsing asli Indonesia, pada kenyataannya sampai saat ini masih banyak digunakan oleh masyarakat. Pengetahuan ini telah diwariskan secara turun-temurun berdasarkan pada adat kebiasaan semata. Dalam rangka inilah diperlukan penelitian sehingga pengobatan secara tradisional dapat dipertanggungjawabkan penggunaannya, termasuk untuk antiobesitas.

Obesitas adalah suatu penyakit multi-faktorial sebagai akibat dari energi yang masuk ke dalam tubuh lebih banyak daripada energi yang dikeluarkan oleh tubuh. Obesitas bagi sebagian orang sangat mengganggu, baik dalam hal penampilan maupun kesehatan. Penyakit-penyakit yang diakibatkan oleh obesitas adalah diabetes melitus tipe II, hipertensi, radang sendi, dan penyakit jantung pembuluh darah yang dapat menyebabkan kematian (Rahardjo *et al.*, 2005). Oleh sebab itu, banyak orang melakukan berbagai cara untuk menurunkan bobot badannya. Lemak yang terdapat di dalam tubuh dihidrolisis pada jaringan pankreas. Apabila aktivitas lipase pankreas meningkat, maka akan meningkatkan penyerapan monogliserida dan asam lemak yang berpengaruh pada obesitas (Joshita *et al.*, 2000). Hal inilah yang akan menimbulkan penimbunan lemak dalam tubuh. Oleh karena itu, aktivitas lipase pankreas harus dihambat supaya penimbunan lemak tidak terjadi.

*Telp: +6281219818810

Email: dyahprado@yahoo.co.id

Lipase pankreas merupakan enzim yang terdapat dalam tubuh manusia, yang terutama berperan dalam penguraian lipid untuk mengabsorpsi asam lemak (Shin *et al.*, 2003). Cara-cara yang dapat digunakan untuk menurunkan bobot badan, yaitu olahraga yang teratur, mengkonsumsi makanan yang rendah kalori, dan mengkonsumsi obat-obat pelangsing yang beredar di pasaran. Cara lain yang dapat digunakan untuk menurunkan bobot badan adalah mengkonsumsi obat yang dapat menghambat nafsu makan (Amfetamin) dan menghambat absorpsi lemak melalui penghambatan aktivitas lipase pankreas (Orlistat). Bahkan, sebagian kalangan wanita banyak yang menggunakan jamu untuk mengatasi masalah kegemukannya, seperti menggunakan jamu Galian Singset, Merit, Ideal, dan sebagainya.

Tanaman obat yang mampu menurunkan bobot badan melalui mekanisme tersebut, di antaranya adalah daun jati belanda, rimpang bangle, malabar tamarind (*Garcinia cambogia*), mangrove jenis *Rhizophora mucronata*, daun asam jawa, rimpang kunci pepet, temu ireng, dan kemuning (Digest, 2006). Malabar tamarind, misalnya, berkhasiat menekan rasa lapar dan meningkatkan rasa kenyang (Digest, 2006), sedangkan tanin yang banyak terkandung di bagian daun jati belanda dapat mengurangi penyerapan makanan dengan cara mengendapkan mukosa usus yang ada dalam permukaan usus (Hendri, 2006). Penelitian mengenai rimpang bangle menunjukkan bahwa ekstrak metanol, flavonoid, dan tanin dapat menghambat Ekstrak teh oolong, ekstrak herba *Cassia nomame*, dan rimpang jahe (Han *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2005), serta rimpang bangle dapat menghambat aktivitas lipase secara *in vitro* (Iswantini *et al.*, 2003; Febriany, 2004; Wirakusumah, 2005; Silitonga, 2008).

Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiobesitas dalam menghambat aktivitas lipase pankreas adalah saponin yang terdapat pada tanaman *Thea sinensis* (Han *et al.*, 2001) dan *Platycodi radix* (Xu *et al.*, 2005), *Panax japonicus* (Han *et al.*, 2005), tanaman *Kochia scoparia* (Han *et al.*, 2006), dan buah *Acanthopanax senticosus* (Li *et al.*, 2007), serta flavonoid dan steroid misalnya pada daun jati belanda (Darusman *et al.*, 2001 & Iswantini *et al.*, 2003). Oleh karena itu, daun asam jawa yang mengandung flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan alkaloid, serta rimpang kunci pepet yang

mengandung saponin, polifenol, flavonoid, dan minyak atsiri diharapkan mampu mendukung potensi tersebut.

Berdasarkan penggunaan di masyarakat, daun asam jawa dan rimpang kunci pepet yang belum diketahui senyawa aktifnya ternyata berpotensi sebagai pelangsing. Belum terdapat paten yang memuat informasi mengenai antiobesitas berbasis daun asam jawa maupun rimpang kunci pepet sehingga penelitian ini perlu dilakukan. Penelitian ini berpotensi menghasilkan suatu formula yang dapat dipatenkan.

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi daya inhibisi ekstrak air dan ekstrak etanol pada daun asam jawa dan rimpang kunci pepet terhadap aktivitas lipase pankreas secara *in vitro* dalam potensinya sebagai antiobesitas.

BAHAN DAN METODE

Lipase pankreas yang digunakan adalah lipase pankreas manusia (Sigma L9780-50 units). Sampel daun asam jawa diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) dan rimpang kunci pepet diperoleh dari Pusat Studi Biofarmaka, Bogor. Pereaksi Natrium dietilditiokarbamat, asam oleat (Sigma), minyak wijen ABC, Xenical® (Roche Pharmaceuticals), dan spektrofotometer UV-Vis U-2800 Hitachi.

Ekstraksi air dan etanol sampel menggunakan simplisia sebanyak ±100 g dan pelarut yang digunakan masing-masing sebanyak 500 ml (3×24 jam) dengan metode maserasi. Uji fitokimia yang dilakukan, yaitu uji alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, tanin, triterpenoid berdasarkan metode Harborne 1987.

Uji Toksisitas terhadap Larva Udang (Meyer *et al.*, 1982). Uji toksisitas dengan menentukan nilai LC₅₀ dilakukan untuk menentukan konsentrasi ambang untuk pengujian *in vitro* artinya uji *in vitro* akan dilakukan dibawah konsentrasi LC₅₀-nya. Uji ini dilakukan dengan menggunakan telur udang *Artemia salina*. *A. salina* yang digunakan untuk uji toksisitas diperoleh dari hasil penetasan dengan menggunakan air laut dengan bantuan aerator untuk memenuhi kadar oksigen yang terlarut.

Uji toksisitas ekstrak dilakukan dengan menggunakan larva udang *A. salina*. Larva udang yang digunakan berumur 48 jam setelah larva udang menetas. Kista *A. salina* sebanyak ± 50 mg dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air laut yang sudah disaring dan dilengkapi aerator. Kista dibiarkan selama 48 jam di bawah pencahayaan lampu agar

menetas sempurna. Setelah menetas, larva *A. salina* sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam *vial* 2 ml, kemudian ditambahkan larutan stok ekstrak dengan konsentrasi 4000 ppm dan ditepatkan volumenya dengan air laut sehingga konsentrasi akhir ekstrak menjadi 0, 10, 100, dan 1000 ppm. Setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung. Nilai konsentrasi letal (LC_{50}) ditentukan dengan metode analisis probit dengan selang kepercayaan 95%.

Uji *In vitro* Ekstrak terhadap Aktivitas Hidrolisis Lipase Pankreas (Han et al., 2005). Metode uji *in vitro* yang digunakan ini mengacu pada metode yang digunakan oleh Han et al., (2005) dengan beberapa modifikasi, yaitu menggunakan substrat triolein, bufer *N*-tris-(hidroksimetil)-metil-2-aminaetana-asam sulfat pada pH 7, suhu 37°C dengan waktu inkubasi 30 menit, dan larutan pengkompleks warna batokuproin dalam kloroform 0.05% (b/v). Metode uji *in vitro* yang digunakan kali ini berbeda dengan metode yang biasa digunakan untuk uji *in vitro* yang menggunakan lipase pankreas oleh Han et al., (2005).

Metode yang digunakan kali ini lebih sederhana, yaitu dengan menggunakan minyak wijen sebagai substrat dan pereaksi-pereaksi lain yang lebih sederhana. Sebanyak 15 µl substrat dan ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah dengan 10 µl albumin 10% dan larutan bufer fosfat pH 8. Setelah itu, 100 µl lipase pankreas dimasukkan ke dalam tabung reaksi tersebut dan diinkubasi pada pH 8, suhu optimum (40°C) selama 45 menit. Setelah mencapai waktu optimum, reaksi dihentikan dengan cara menambahkan 3 ml kloroform. Larutan dalam tabung kemudian dikocok dan disentrifugasi selama 5 menit. Sebanyak 1 ml lapisan kloroform, kemudian diambil dan ditambahkan 4 ml kloroform-heptana (1:1), serta dikocok hingga homogen. Setelah itu, larutan ditambahkan 2,5 ml pereaksi tembaga, dikocok 3 menit hingga homogen, dan disentrifugasi kembali selama 10 menit. Lapisan kloroform diambil sebanyak 3 ml dan ditambahkan 0,25 ml larutan Na-dietilditiokarbamat hingga berwarna kuning. Larutan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 435 nm. Nilai yang diperoleh, kemudian dikonversi dengan perhitungan sehingga diperoleh nilai aktivitas lipase pankreas. Aktivitas lipase pankreas dinyatakan dalam µmol asam oleat/l.menit. kontrol negatif dilakukan tanpa penambahan ekstrak,

sedangkan untuk kontrol positif dilakukan dengan mengganti ekstrak dengan Xenical®.

Penentuan Kadar Flavonoid Total (Codex 1986 diacu dalam Nobre et al., 2005). Metode ini berdasarkan pada Codex (1986) diacu dalam Nobre et al., (2005). Ekstrak terbaik yang memiliki daya inhibisi terbesar yang setara dengan 200 mg simplisia ditimbang dan dimasukkan ke labu bulat. Sistem hidrolisis berupa 1.0 ml larutan heksametilenatetramina 0.5% b/v, 20 ml aseton, dan 2 ml HCl 25% ditambahkan ke dalam labu tersebut. Selanjutnya, ekstrak dihidrolisis dengan pemanasan hingga mendidih selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring menggunakan kapas ke dalam labu takar 100 ml, kemudian residunya ditambahkan 20 ml aseton dan dididihkan kembali (dilakukan 2 kali dan filtrat dikumpulkan ke dalam labu takar, lalu ditera dengan aseton). Sebanyak 20 ml filtrat hasil hidrolisis dan 20 ml akuades dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu diekstraksi dengan etil asetat (ekstraksi yang pertama dengan 15 ml etil asetat, ekstraksi kedua dan ketiga dengan 10 ml etil asetat). Fraksi etil asetat dikumpulkan dalam labu takar 50 ml, kemudian ditera dengan etil asetat.

Pengukuran spektrofotometri. Sebanyak 10 ml larutan fraksi etil asetat dimasukkan ke dalam labu takar 25 ml, lalu direaksikan dengan 1 ml larutan $AlCl_3$ 2% b/v dan ditera dengan larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol. Pengukuran larutan dilakukan pada panjang gelombang 370,8 nm. Kurva standar dibuat dengan kuersetin murni dengan konsentrasi 0; 0.5; 2.5; 5; 7.5, dan 10 ppm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Air dan Ekstraksi. Kadar air daun asam jawa sebesar 9,2%, sedangkan kadar air rimpang kunci pepet sebesar 5,5%. Kadar air daun asam jawa dan rimpang kunci pepet yang diperoleh kurang dari 10% sehingga dapat terhindar dari serangan mikroba selama penyimpanan. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu maserasi dengan air deionisasi dan etanol 70% sebagai larutan pengekstrak. Metode ini berdasarkan pada penelitian Doughari (2006). Rendemen yang diperoleh dari ekstrak air dan etanol daun asam jawa berturut-turut sebesar 20,5 dan 12,2%, sedangkan ekstrak air dan etanol rimpang kunci pepet sebesar 19,2 dan 16,7%. Ekstrak ini selanjutnya diuji kandungan senyawa metabolit sekunder, toksisitasnya terhadap larva udang, daya inhibisi terhadap aktivitas

lipase pankreas secara *in vitro*, dan penentuan kadar flavonoid total dari ekstrak terbaik daya inhibisinya.

Uji Toksisitas terhadap Larva Udang. Uji toksisitas larva udang pada penelitian ini dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk mengamati potensi bioaktivitas dan toksisitas dari masing-masing sampel sehingga dapat ditentukan konsentrasi ekstrak yang aman untuk pengujian. Jumlah larva udang yang mati akibat pengaruh ekstrak ditunjukkan pada Lampiran 1.

Suatu ekstrak tanaman akan bersifat bioaktif apabila mempunyai nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm (Meyer *et al.*, 1982). Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa ekstrak air daun asam jawa, ekstrak etanol daun asam jawa dan rimpang kunci pepet berpotensi sebagai senyawa bioaktif dan dapat dijadikan sebagai obat karena menghasilkan LC_{50} kurang dari 1000 ppm sehingga pada konsentrasi yang rendah telah mampu mematikan 50% populasi larva udang *A. salina*, sedangkan ekstrak air rimpang kunci pepet mempunyai bioaktivitas yang rendah karena untuk mematikan 50% populasi larva udang diperlukan konsentrasi ekstrak di atas 1000 ppm.

Ekstrak yang memiliki potensi bioaktif yang paling tinggi dan bersifat toksik adalah ekstrak etanol daun asam jawa. Hal ini disebabkan oleh ekstrak etanol daun asam jawa memiliki nilai LC_{50} yang paling rendah, yaitu 176.41 ppm yang berarti pada konsentrasi yang kecil ekstrak ini dapat mematikan setengah populasi dari larva udang *A. salina*. Ekstrak yang memiliki potensi bioaktif yang tinggi belum tentu mempunyai daya inhibisi yang tertinggi. Hal ini disebabkan oleh nilai LC_{50} hanya digunakan sebagai batas konsentrasi tertinggi pada penentuan ragam konsentrasi ekstrak dalam uji enzimatik sehingga formulasi obat akan lebih aman jika konsentrasi yang dibuat di bawah LC_{50} .

Uji *In vitro* Ekstrak terhadap Aktivitas Hidrolisis Lipase Pankreas. Penentuan aktivitas lipase pankreas dilakukan dengan menggunakan asam oleat dengan konsentrasi 4,25 μmol sebagai standar dengan nilai serapan sebesar 0,041. Perlakuan standar dimulai pada tahap penambahan kloroform-heptana (1:1) yang

selanjutnya sama seperti prosedur uji aktivitas hidrolisis lipase pankreas. Substrat yang digunakan dalam uji *in vitro* lipase pankreas ini adalah minyak wijen. Minyak wijen digunakan sebagai substrat pada penelitian ini karena minyak wijen merupakan trigliserida rantai panjang yang tidak larut dalam air dan merupakan substrat terbaik selain triolein dan trilinolein dalam pengujian *in vitro* terhadap aktivitas lipase pankreas (Desnuelle & Savary, 1963). Hasil optimasi lipase pankreas yang dilakukan oleh Martatilofa dan Silitonga (2008) menunjukkan bahwa enzim ini memiliki aktivitas optimum pada pH 8, waktu inkubasi 45 menit, dan suhu 40°C. Menurut Hadvary *et al.*, (1988), lipase pankreas juga memiliki aktivitas optimum pada pH 8. Konsentrasi lipase pankreas yang digunakan sebesar $1,4 \times 10^{-5}$ ig/il , konsentrasi substrat yang digunakan sebesar 16.2 ig/il , dan panjang gelombang yang menunjukkan serapan maksimum sebesar 435 nm sehingga penelitian ini menggunakan kondisi optimum tersebut. Suhu dan pH optimum dari suatu enzim sangat penting untuk diketahui karena pada keadaan tersebut enzim mempunyai stabilitas dan aktivitas yang optimum.

Seluruh ekstrak diuji aktivitas lipase pankreas secara *in vitro* dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada berbagai konsentrasi dalam menghambat aktivitas lipase pankreas dan dihitung daya inhibisinya. Ragam konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm serta masing-masing konsentrasi dilakukan dengan tiga kali ulangan. Pengujian pada konsentrasi bervariasi ini ditunjukkan untuk melihat pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak terhadap peningkatan daya inhibisi dan penurunan aktivitas lipase pankreas. Selain itu juga ditunjukkan untuk melihat besarnya daya inhibisi ekstrak pada serangkaian konsentrasi di bawah nilai toksisitasnya (LC_{50}) dan dilakukan pengamatan aktivitas lipase pankreas tanpa penambahan ekstrak (kontrol negatif) untuk melihat pengaruh inhibisi ekstrak tersebut terhadap aktivitas lipase pankreas. Aktivitas lipase pankreas dengan penambahan ekstrak dihitung dengan membandingkan nilai serapannya dengan serapan standar, yaitu asam oleat.

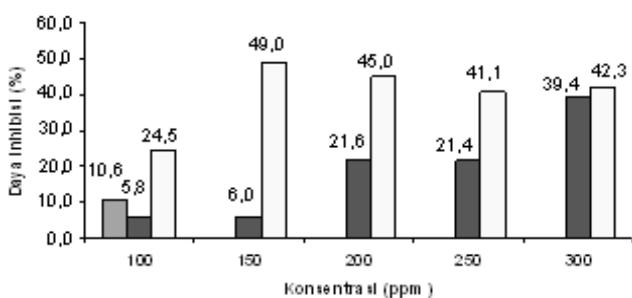
Pengaruh penambahan ekstrak air dan etanol 70% daun asam jawa pada berbagai konsentrasi ditunjukkan oleh Gambar 1. Berdasarkan semua ragam konsentrasi memiliki kemampuan sebagai inhibitor lipase pankreas, daya inhibisinya lebih besar dibandingkan dengan

Tabel 1. Nilai LC_{50} ekstrak air dan ekstrak etanol sampel terhadap larva *A. Salina*

Contoh	Ekstrak	$LC_{50}(\text{ppm})$
Daun asam jawa	Air	550,27
	Etanol	176,41
Rimpang kunci pepet	Air	1140,89
	Etanol	504,43

kontrol positif, dan peningkatan daya inhibisi lipase pankreas tidak berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Artinya, peningkatan konsentrasi ekstrak yang ditambahkan tidak selalu meningkatkan daya inhibisinya.

Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat bahwa kontrol positif memiliki daya inhibisi sebesar 10,6% pada konsentrasi 100 ppm, ekstrak air daun asam jawa memiliki daya inhibisi yang terbesar pada konsentrasi 300 ppm sebesar 49,4%, dan ekstrak etanol memiliki daya inhibisi terbesar pada konsentrasi 150 ppm sebesar 49,0% (Gambar 1). Artinya, ekstrak air dan etanol daun asam jawa pada konsentrasi 300 dan 150 ppm mampu menghambat aktivitas enzim lipase pankreas untuk menghidrolisis asam oleat sebesar 39,4 dan 49,0%. Ekstrak etanol daun asam jawa memiliki daya inhibisi yang paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak air daun asam jawa dan kontrol positif terhadap aktivitas lipase pankreas manusia. Hal ini disebabkan oleh jumlah kandungan senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh ekstrak etanol lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak air daun asam jawa. Hasil ini senada dengan penelitian yang dilakukan oleh Han *et al.*, (1999) dan Rahardjo *et al.*, (2005) menyatakan bahwa ekstrak air tanaman teh oolong dan ekstrak etanol daun jati belanda dapat menghambat aktivitas lipase. Hal ini senada juga dengan Silitonga (2008) yang menyatakan bahwa ekstrak etanol daun jati belanda dan rimpang bangle memiliki daya inhibisi lebih besar dibandingkan dengan ekstrak air. Hal ini sama dengan kemampuan ekstrak etanol CT-II dari buah *Cassia nomame* yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari buah tersebut mampu menghambat aktivitas lipase pankreas porsin secara *in vitro* pada konsentrasi 0.07 sampai dengan 0.1 mg/ml dengan daya inhibisi sebesar 50% dan triolein sebagai substrat, serta pengaruh antiobesitas pada tikus yang mempunyai



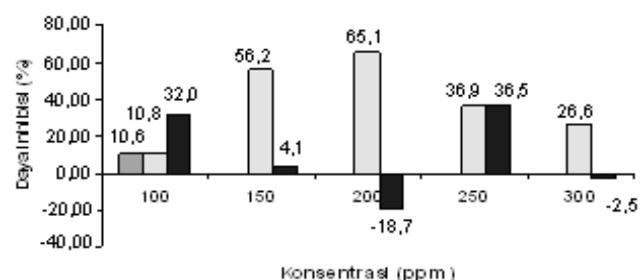
Gambar 1. Daya inhibisi kontrol positif, ekstrak air, dan ekstrak etanol daun asam jawa terhadap aktivitas lipase pankreas

lemak yang tinggi secara *in vivo*, sehingga dapat digunakan sebagai zat tambahan untuk pencegahan obesitas dan hipertrigliseridemia pada manusia (Yamamoto *et al.*, 2000).

Hasil pengujian ekstrak rimpang kunci pepet terhadap aktivitas lipase pankreas terlihat pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa tidak semua ragam konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunci pepet memiliki kemampuan sebagai inhibitor lipase pankreas, sedangkan semua ragam konsentrasi ekstrak air rimpang kunci pepet memiliki kemampuan sebagai inhibitor lipase pankreas. Daya inhibisi ekstrak air dan etanol rimpang kunci pepet pada konsentrasi 100 ppm lebih besar dibandingkan dengan kontrol positif.

Ekstrak air rimpang kunci pepet memiliki daya inhibisi maksimum pada konsentrasi 200 ppm dengan daya inhibisi sebesar 65,1% dan ekstrak etanol pada konsentrasi 250 ppm dengan daya inhibisi sebesar 36,5%. Ekstrak etanol rimpang kunci pepet pada konsentrasi 200 dan 300 ppm memiliki daya inhibisi bernilai negatif dan aktivitas lipase pankreas meningkat. Hal ini diduga ekstrak yang digunakan masih berupa ekstrak kasar yang belum murni karena masih berupa gabungan dari beberapa golongan senyawa yang kemungkinan memiliki respon yang berbeda atau bahkan bersifat antagonis satu sama lain dalam menghambat aktivitas lipase pankreas pada konsentrasi tertentu.

Berdasarkan hasil tersebut terlihat bahwa ekstrak air memiliki daya inhibisi yang paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol. Walaupun dari hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang kunci pepet lebih banyak mengandung senyawa metabolit sekunder. Hasil ini didukung oleh penelitian Han *et al.*, (1999) yang menyatakan bahwa ekstrak air teh oolong dapat menghambat aktivitas



Gambar 2. Daya inhibisi kontrol positif, ekstrak air, dan etanol rimpang kunci pepet terhadap aktivitas lipase pankreas

lipase pankreas pada konsentrasi 500-2000 µg/ml dan senyawa kafein diidentifikasi sebagai aktivator noradrenalin yang menyebabkan lipolisis. Lee *et al.*, (2005) menyatakan bahwa senyawa krosetin dan krosin yang diisolasi dari ekstrak air *Gardenia fructus* berpotensi sebagai inhibitor lipase pankreas secara *in vitro* dengan nilai IC₅₀ sebesar 2,1 dan 2,7 mg/ml (triolein sebagai substrat), krosin dan krosetin juga berpotensi dalam aktivitas hipolipidemik (antiobesitas) pada Triton WR-133 atau minyak jagung yang diberikan pada tikus yang mempunyai lemak tinggi secara *in vivo*.

Daya inhibisi tertinggi ekstrak etanol kedua tanaman melebihi daya inhibisi tertinggi ekstrak etanol beberapa tanaman lainnya terhadap aktivitas lipase, seperti ekstrak etanol daun jati belanda, yaitu 25,3% pada konsentrasi 60 ppm dan rimpang bangle sebesar 29,2% pada konsentrasi 100 ppm (Silitonga 2008), serta daun kemuning sebesar 22,8% pada konsentrasi 30 ppm (Martatilofa 2008). Daya inhibisi ekstrak etanol lebih besar pada daun asam jawa karena pada ekstrak etanol lebih banyak senyawa yang terekstrak dan senyawa tersebut dapat menghambat aktivitas lipase pankreas, sehingga meningkatkan pengaruh penghambatan terhadap enzim tersebut, sedangkan ekstrak air pada rimpang kunci pepet mempunyai daya inhibisi yang paling besar dibandingkan dengan ekstrak etanol.

Senyawa-senyawa yang diperkirakan dapat menghambat aktivitas lipase pankreas pada ekstrak air dan ekstrak etanol daun asam jawa, yaitu flavonoid, saponin, steroid, dan tanin. Senyawa yang diduga dapat menghambat aktivitas lipase pankreas pada ekstrak air rimpang kunci pepet, yaitu flavonoid, tanin, dan saponin, sedangkan senyawa yang diduga dapat menghambat aktivitas ekstrak etanol rimpang kunci pepet, yaitu flavonoid, saponin, dan triterpenoid. Senyawa flavonoid terbukti dapat menghambat aktivitas lipase secara *in vitro*, di antaranya yaitu yang terdapat pada rimpang bangle (Iswantini *et al.*, 2003) dan galangal (Shin *et al.*, 2003). Saponin juga terbukti dapat menghambat aktivitas lipase baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Selain itu, senyawa tanin pada ekstrak tanin rimpang bangle juga memiliki potensi dalam menghambat aktivitas lipase (Iswantini *et al.*, 2003). Senyawa triterpenoid yang terdapat pada ekstrak etanol rimpang kunci pepet dapat menghambat aktivitas lipase pankreas. Hal ini senada dengan Xu *et al.*, (2005) yang

menyatakan bahwa senyawa triterpenoid pada *Platycodi radix* yang mengandung senyawa platikodin A, C, D, dan deaploplatikodin D diketahui dapat menghambat aktivitas lipase pankreas pada konsentrasi 500 µg/ml dengan daya inhibisi sebesar 3.3; 5.2; 34.8, dan 11,7%. Adanya senyawa alkaloid pada ekstrak etanol rimpang kunci pepet diduga mengakibatkan adanya peningkatan aktivitas lipase pankreas sehingga daya inhibisinya menurun, akan tetapi belum ada literatur yang mengatakan bahwa senyawa alkaloid mampu meningkatkan aktivitas lipase pankreas. Oleh karena itu, adanya alkaloid akan memberikan pengaruh yang berlawanan dan mengakibatkan daya inhibisi ekstrak menurun, sedangkan adanya flavonoid, saponin, dan tanin akan memberikan pengaruh yang sinergis dan mengakibatkan daya inhibisi ekstrak meningkat.

Tabel 2 memuat data daya inhibisi maksimum tiap ekstrak tanaman, kontrol negatif (tanpa penambahan ekstrak), dan kontrol positif (dengan penambahan Xenical®). Berdasarkan data tersebut terlihat bahwa semua ekstrak tanaman mempunyai daya inhibisi lebih besar dibandingkan dengan daya inhibisi Xenical® sebagai kontrol positif. Ekstrak air rimpang kunci pepet paling berpotensi dalam menghambat aktivitas lipase pankreas dibandingkan dengan yang lainnya karena daya inhibisinya lebih dari 50%. Ekstrak air rimpang kunci pepet dapat menurunkan aktivitas enzim dari $2,11 \times 10^4$ µmol/l.menit menjadi $1,68 \times 10^4$ µmol/l.menit pada konsentrasi 200 ppm.

Krosin dan krosetin dapat menghambat biosintesis trigliserida sebagaimana halnya kolesterol dan absorpsinya dari intestin dalam darah. Krosin dan krosetin berpotensi sebagai inhibitor pada dosis 50 mg/kg, sedangkan Xenical® pada dosis 10 mg/kg. Jika memperhatikan data tersebut, maka hasil penelitian kali ini membuktikan bahwa ekstrak daun asam jawa dan rimpang kunci pepet memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap penghambatan aktivitas lipase

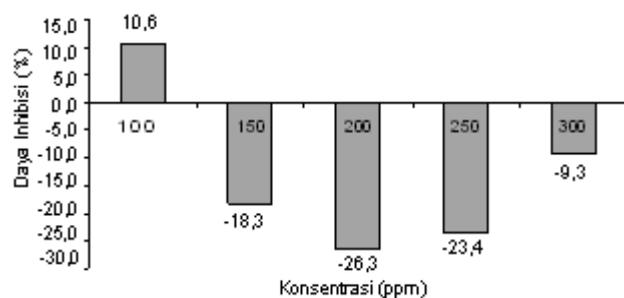
Tabel 2. Daya inhibisi maksimum kontrol negatif, kontrol positif, dan ekstrak tanaman

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Daya Inhibisi (%)
Kontrol (-)	0	0,0
Air daun asam jawa	300	39,4
Etanol daun asam jawa	150	49,0
Air rimpang kunci pepet	200	65,1
Etanol rimpang kunci pepet	250	36,5
Kontrol (+)	100	10,6

pankreas, sehingga sangat memungkinkan untuk digunakan sebagai obat antiobesitas.

Kontrol positif yang digunakan, yaitu Xenical® yang mengandung zat aktif berupa orlistat (tetrahidrolipstatin). Xenical® digunakan sebagai kontrol positif, yaitu untuk membandingkan mekanisme antara sampel dengan kontrol positif terhadap lipase pankreas, tetapi pada penelitian ini mekanisme sampel terhadap lipase pankreas tidak diketahui karena tidak dilakukan penelitian yang lebih lanjut mengenai mekanisme sampel terhadap lipase pankreas.

Berdasarkan Gambar 3 dapat terlihat bahwa daya inhibisi terbesar kontrol positif (Xenical®) sebesar 10,6% pada konsentrasi 100 ppm, sedangkan pada konsentrasi 150 sampai dengan 300 ppm daya inhibisinya bernilai negatif. Artinya, kontrol positif (Xenical®) bekerja maksimum dalam menghambat aktivitas lipase pankreas pada konsentrasi 100 ppm. Nilai daya inhibisi Xenical® tersebut berbeda dengan yang dikemukakan oleh Silitonga (2008) dengan konsentrasi yang sama, yaitu sebesar 17,5%. Hal ini dapat disebabkan oleh konsentrasi substrat yang digunakan berbeda, yaitu 16,7 µg/µl dan pada waktu dilarutkan Xenical® tidak larut sempurna dengan bufer fosfat pH 8 karena Xenical® lebih larut dalam etanol dan metanol (Roche 2008a). Akan tetapi, hasil ini tidak senada dengan Hadvary *et al.*, (1988). Hadvary *et al.*, (1988) menyatakan bahwa orlistat mampu menghambat lipase pankreas hingga 50% pada konsentrasi 0,1 µg/ml secara *in vitro* dan 0,3 µg/ml secara *in vivo* pada cairan usus tikus. Xenical® yang digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini tidak berupa orlistat murni. Metode dan bahan-bahan yang digunakan pun berbeda. Hadvary *et al.*, (1988) menggunakan substrat triolein murni, bufer Tris/HCl, NaCl, CaCl₂, dimetil sulfoksida pada suhu ruang, dan waktu inkubasi 10 menit.



Gambar 3. Daya inhibisi kontrol positif (Xenical®) pada berbagai konsentrasi terhadap aktivitas lipase pankreas

Perbedaan metode uji inhibisi, substrat, dan waktu inkubasi akan sangat mempengaruhi nilai daya inhibisi yang diperoleh dari setiap percobaan. Metode yang digunakan pada penelitian ini dapat dikatakan lebih efektif karena dengan menggunakan substrat dan pereaksi-pereaksi lain yang lebih murah dan sederhana telah dapat memperlihatkan kemampuan inhibisi ekstrak-ekstrak contoh terhadap aktivitas lipase pankreas. Selain itu, kandungan substrat yang digunakan dalam penelitian ini (minyak wijen) tidak mengandung asam linoleat (Arslan *et al.*, 2007) sedangkan triolein mengandung asam linoleat sebesar 60% (Botelho *et al.*, 2009), jadi perbedaan kandungan yang cukup signifikan inilah yang mungkin menyebabkan perbedaan hasil daya inhibisi ekstrak-ekstrak yang diujikan.

Uji Statistik. Berdasarkan data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik, yaitu uji beda perlakuan menggunakan uji Duncan dengan rancangan acak lengkap. Uji ini dilakukan untuk menguji apakah tiap perlakuan memiliki perbedaan yang nyata dalam menghambat aktivitas lipase pankreas (Hanafiah, 2005). Perlakuan yang dibandingkan adalah ekstrak air dan etanol pada daya inhibisi maksimum dari kedua tanaman, serta perlakuan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan terlihat bahwa daya inhibisi ekstrak etanol dari daun asam jawa dan rimpang kunci pepet tidak berbeda nyata karena daya inhibisi kedua tanaman tersebut tidak berbeda jauh. Untuk ekstrak air, daya inhibisi dari kedua tanaman ini berbeda nyata. Hal ini disebabkan oleh nilai daya inhibisi ekstrak air rimpang kunci pepet yang jauh lebih besar dibandingkan dengan ekstrak air daun asam jawa.

Uji beda perlakuan terhadap hasil inhibisi terbaik, yaitu ekstrak etanol daun asam jawa, ekstrak air rimpang kunci pepet, kontrol negatif, dan kontrol positif menyatakan bahwa semua perlakuan memberikan pengaruh daya inhibisi yang berbeda nyata. Perlakuan tersebut, yaitu ekstrak etanol daun asam jawa dengan kontrol negatif, ekstrak air rimpang kunci pepet dengan kontrol negatif, ekstrak etanol daun asam jawa dengan kontrol positif, ekstrak air rimpang kunci pepet dengan kontrol positif, ekstrak etanol daun asam jawa dengan ekstrak air rimpang kunci pepet, dan kontrol negatif dengan kontrol positif.

Kadar Flavonoid Total. Metode ini berdasarkan pada Codex (1986) diacu dalam Nobre *et al.*, (2005) dengan beberapa modifikasi, yaitu sistem hidrolisis yang berupa 1,0 ml urotropin 0,5% dan 2 ml asam hidroklorat diganti dengan larutan heksametilenatetramina 0,5% (b/v) dalam metanol dan 2 ml HCl 25%, serta panjang gelombang yang digunakan dari 425 nm diganti dengan 370,8 nm. Kadar flavonoid dan senyawa fenolik lain di dalam tanaman berbeda-beda di antara setiap bagian, jaringan, dan umur tanaman, serta dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan. Faktor-faktor yang mempengaruhi, yaitu temperatur, sinar UV, sinar tampak, nutrisi, ketersediaan air, dan kadar CO₂ pada atmosfer. Oleh karena itu, pada penelitian ini perlu dilakukan penentuan kadar flavonoid total pada ekstrak yang memiliki daya inhibisi terbesar. Ekstrak yang dinalisis kadar flavonoid totalnya, yaitu ekstrak etanol daun asam jawa dan ekstrak air rimpang kunci pepet. Metode analisis yang biasa digunakan untuk menentukan kadar flavonoid dalam simplisia tanaman obat, yaitu dengan spektrofotometri UV (Codex 1986 diacu dalam Nobre *et al.*, 2005), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Merken & Beecher, 2000), dan elektroforesis kapiler (Marchart *et al.*, 2003). Metode-metode tersebut melibatkan serangkaian tahapan yang membutuhkan waktu yang lama dalam pelaksanaannya. Metode lain yang dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid, yaitu teknik *infra red* (IR) yang digabungkan dengan kemometri. Pada penelitian ini metode yang digunakan, yaitu metode Codex (1986) diacu dalam Nobre *et al.*, (2005) disebut juga metode AlCl₃.

Analisis kadar flavonoid total diawali dengan memilih sampel yang memiliki daya inhibisi terbesar. Setelah didapatkan ekstrak sampel yang memiliki daya inhibisi terbesar, maka dilakukan analisis kadar flavonoid total. Rendemen ekstrak etanol daun asam jawa dan ekstrak etanol rimpang kunci pepet yang diperoleh adalah 12,2 dan 19,2% (b/b). Berdasarkan metode analisis Chang *et al.*, (2002), flavonoid total yang terukur termasuk dari golongan flavon dan flavonol yang terdapat pada ekstrak karena kedua golongan ini yang dapat membentuk kompleks stabil dengan AlCl₃.

Kadar flavonoid total dihitung berdasarkan kurva standar kuersetin sehingga diperoleh persamaan regresi linear, yaitu $y = 0,1064x + 0,0245$ dengan $R^2 = 0,9932$ yang selanjutnya akan digunakan untuk menghitung konsentrasi flavonoid dan kadar flavonoid total.

Berdasarkan hasil percobaan, konsentrasi flavonoid ekstrak etanol daun asam jawa dan ekstrak air rimpang kunci pepet berturut-turut sebesar 0,40 dan 0,024 ppm, sedangkan kadar flavonoid total dari ekstrak etanol daun asam jawa dan ekstrak air rimpang kunci pepet berturut-turut sebesar 0,03 dan $0,02 \times 10^{-2}\%$ (b/b).

Day dan Underwood (2001) mengemukakan bahwa hasil analisis kuantitatif perolehan analit dapat digolongkan menjadi 3 kelompok, yaitu analit yang merupakan konstituen utama, konstituen minor, dan konstituen jejak atau runtu. Analisis kuantitatif flavonoid pada ekstrak etanol daun asam jawa menunjukkan keberadaan flavonoid sebagai konstituen minor karena kadar yang diperoleh berada di antara 0,01-1%, sedangkan ekstrak air rimpang kunci pepet menunjukkan keberadaan flavonoid sebagai konstituen jejak atau runtu karena kadar yang diperoleh kurang dari 0,01%.

KESIMPULAN

Ekstrak air dan etanol daun asam jawa dan rimpang kunci pepet berpotensi sebagai antiobesitas karena mampu menghambat aktivitas lipase pankreas secara *in vitro*. Ekstrak air rimpang kunci pepet memiliki daya inhibisi tertinggi dari semua ekstrak, yaitu sebesar 65,1% pada konsentrasi 200 ppm. Daya inhibisi yang dimiliki oleh ekstrak etanol daun asam jawa, ekstrak air rimpang kunci pepet, kontrol negatif, dan kontrol positif secara statistik berbeda nyata. Ekstrak etanol daun asam jawa memiliki kadar flavonoid dengan konstituen minor, sedangkan ekstrak air rimpang kunci pepet memiliki kadar flavonoid dengan konstituen jejak atau runtu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Kompetensi Nomor: 219/SP2H/PP/DP2M/V/2009, tanggal 30 Mei 2009 atas nama Dr. Dyah Iswantini Pradono, M. Agr.

DAFTAR PUSTAKA

- Arslan, C., Uzun, B., Ulger, S. & Cagiran, M. 2007. Determination of Oil Content and Fatty Acid Composition of Sesame Mutants Suited for Intensive Management Conditions. *Euphytica* 34:193-199.
- Botelho, A.P., Santos-Zago, L.F. & Costa de Oliveira A. 2009. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocyte culture, *Rev. Nutr* 22(5): 767-771.

- Chang, C.C., Yang, M.H. & Wen, H.M. & Chern, J.C.** 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Anal* **10**: 178-182.
- Darusman, L.K., Rohaeti, E. & Sulistiyan.** 2001. Kajian senyawa golongan flavonoid asal tanaman bangle sebagai senyawa peluruh lemak melalui aktivitas lipase. Bogor: *Pusat Studi Biofarmaka Lembaga Penelitian, IPB*.
- Desnuelle, P. & Savary, P.** 1963. Specificities of lipases. *Journal Lipid Res* **4**: 369-384.
- Digest Otc.** 2006. Memilih obat pelangsing. <http://sehat.bugar.multiply.com/journal.html> (29 Des 2008).
- Doughari, J.H.** 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal Pharmaceu Res* **5(2)**: 597-603.
- Febriany, S.** 2004. Potensi ekstrak tunggal bangle dan gabungannya dalam meningkatkan aktivitas enzim lipase secara *in vitro*. *Skripsi Jurusan Kimia, FMIPA*. Bogor: IPB.
- Hadvary, P., Lengsfeld, H. & Wolfer, H.** 1988. Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydroplastin. *Journal Biochem* **256**: 357-361.
- Han, L.K., Takaku, T., Li, J., Kimura, Y. & Okuda, H.** 1999. Anti-obesity action of oolong tea. *Int Journal Obesity* **23**: 98-105.
- Han, L.K et al.** 2001. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *Int Journal Obesity* **25**: 1459-1464.
- Han, L.K., Zheng, N.Y., Yoshikawa, M., Okuda, H. & Kimura, Y.** 2005. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. *BioMed Central* **5**: 1-10.
- Han, L.K et al.** 2006. Reduction of fat storage in mice fed a high-fat diet long term by treatment with saponins prepared from *Kochia scoparia* fruit. *Phytother Res* **20**: 877-882.
- Iswantini, D., Darusman, L.K., Gunawan, E. & Nurulita, Y.** 2003. Identifikasi senyawa bioaktif daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) sebagai pelangsing dengan menggunakan metode enzimatis (enzim lipase). *Jurnal Ilmiah Pertanian Gakuryoku* **9**: 138-142.
- Iswantini, D., Darusman, L.K, Febriany, S.** 2004. Pengaruh ekstrak tunggal dan gabungan dari bangle terhadap aktivitas enzim lipase dalam kajian sebagai pelangsing. Di dalam: *Tanaman Obat Indonesia XXIV. Prosiding Seminar dan Pameran Nasional*; Bogor, 19-20 September 2003. Bogor: Pusat Studi Biofarmaka Lembaga Penelitian Institut Pertanian Bogor. hlm 276-283.
- Joshita, D., Azizahwati. & Wahyuditomo.** 2000. Pengaruh daun jati belanda terhadap kerja enzim lipase secara *in vitro*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* **6(2)**: 16-22.
- Lee, I.A., Lee, J.A., Baek, N.I. & Kim, D.H.** 2005. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin. *Biol Pharm Bull* **28(11)**: 2106-2110.
- Li, F., Li, W., Fu, H., Zhang, Q. & Koike K.** 2007. Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponin from fruit of *Acanthopanax senticosus*. *Chem Pharm Bull* **55(7)**: 1087-1089.
- Marchart, E., Krenn, L. & Kopp, B.** 2003. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. *Planta Med* **69**: 452-456.
- Martatilofa, E.** 2008. Daya inhibisi ekstrak bangle, jati balanda, kemuning, dan formula biolangsing terhadap lipase pancreas. *Skripsi Jurusan Kimia, FMIPA*. Bogor: IPB.
- Merken, H.M. & Beecher, G.R.** 2000. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal Chromatogr A* **897**: 177-184.
- Meyer et al.** 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**: 31-34.
- Nobre, C.P., Raffin, F.N. & Moura, T.F.** 2005. Standardization of extracts from *Momordica charantia* L. (*Cucurbitaceae*) by total flavonoids content determination. *Acta Farm. Bonaerense* **24(4)**: 562-566.
- Rahardjo, S.S.** 2004. Pengaruh ekstrak etanol daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) terhadap aktivitas enzim lipase serum *Rattus norvegicus*. *Tesis Pasca Sarjana*. Yogyakarta: UGM.
- Roche.** 2008a. Xenical® (Orlistat). [terhubung berkala]. <http://www.roche.co.id/bahasa/index.html> (7 Des 2008).
- Shin, J.E, Han, M.J. & Kim, D.H.** 2003. 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* inhibits pancreatic lipase. *Biol Pharm Bull* **26(6)**: 854-857.
- Silitonga, R.F.** 2008. Daya inhibisi ekstrak daun jati belanda dan bangle terhadap aktivitas lipase pankreas sebagai antiobesitas. *Skripsi Jurusan Kimia, FMIPA*. Bogor: IPB.
- Wirakusumah, L.H.** 2005. Fraksinasi dan karakterisasi senyawa aktif flavonoid dari ekstrak kasar metanol rimpang Bangle (*Zingiber cassumar* Roxb.). *Skripsi Jurusan Kimia, FMIPA*. Bogor: IPB.
- Xu, B.J., Han, L.K., Zheng, Y.N, Lee, J.H. & Sung, C.K.** 2005. *In vitro* inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi radix* on pancreatic lipase. *Arch Pharm Res* **28(2)**: 180-185.
- Yamamoto, M et al.** 2000. Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II. An extract from edible herbs, *Nomame Herba*, on rats fed a high-fat diet. *Int Journal Obesity* **24**: 758-764.