

POTENSI EKSTRAK DAUN MURBEI SEBAGAI AGEN LEPAS LAMBAT KARBOHIDRAT NON STRUKTURAL DALAM SISTEM RUMEN

Syahriani Syahrir¹, K.G Wiryawan², A. Parakkasi², M. Winugroho³

1) Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan UNHAS

2) Fakultas Peternakan Institut Peternakan Bogor

3) Balai Penelitian Ternak, Bogor

Abstrak

Daun murbei mengandung senyawa *1-deoxynojirimycin* yang mampu menghambat proses hidrolisis oligosakarida menjadi monomer-monomernya, namun penghambatannya tidak komplit. Karena itu senyawa tersebut diduga dapat menghambat hidrolisis karbohidrat non struktural asal konsentrat atau daun murbei dalam sistem rumen. Tujuan penelitian ini adalah mengamati penghambatan laju hidrolisis beberapa jenis karbohidrat oleh ekstrak daun murbei yang mengandung senyawa *1-deoxynojirimycin*, dalam media yang mengandung enzim cairan rumen dan dalam sistem rumen *in vitro*. Karbohidrat uji terdiri atas glukosa, maltosa, sukrosa, pati, selulosa dan laktosa serta tanpa EDM dan penambahan EDM dengan DNJ sebesar 0.06%. Peubah yang diamati terdiri atas total gula tereduksi. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa ekstrak daun murbei yang mengandung senyawa *1-deoxynojirimycin* dapat menjadi agen mekanisme lepas lambat karbohidrat non struktural dalam sistem rumen, khususnya maltosa, ditandai dengan laju hidrolisis maltosa yang lebih lambat pada media maltosa yang ditambahkan ekstrak daun murbei.

Kata Kunci: Ekstrak daun murbei, karbohidrat, hidrolisis, *1-deoxynojirimycin*

Abstract

Mulberry leave contain *1-deoxynojirimycin* (DNJ) which can inhibit hydrolysis of oligosakarida to monomers, but that inhibiting are not complete. Therefore, that compound is estimated that it can inhibit hydrolysis of non structural carbohydrate in the rumen system. The aim of this experiment was to study the rapid hydrolysis of several carbohydrates by mulberry leaf extract that contain compound *1-deoxynojirimycin*, in media that contain liquid enzyme rumen and in system rumen *in vitro*. The carbohydrate tested consists of glucose, maltosa, sukrosa, cellulose and lactose with or without mulberry leave extract (MLE). The parameter observed was total sugar reduction. The result showed that leaf extract murbei that contain compound *1-deoxynojirimycin* can be a slow release agent for non structural carbohydrate in the system rumen, especially for maltosa, marked by slower hydrolysis rate of maltosa in maltose media that added leaf extract murbei.

keyword: Mulberry leaf extract, carbohydrate, hydrolysis, *1-deoxynojirimycin*

Pendahuluan

Peningkatan fermentabilitas bahan pakan ruminansia dapat dilakukan dengan menyediakan karbohidrat non struktural (*readily available carbohydrate*=RAC) dan amoniak/nitrogen secara seimbang dan berkesinambungan dalam sistem rumen, dan mekanisme lepas lambat (*slow release*) nutrisi tersebut adalah alternatif yang efektif. Lepas lambat nitrogen dalam sistem rumen telah banyak diinformasikan antara lain dalam bentuk produk urea kalsium ($(Ca(urea)_4Cl_2)$ (US Patent 5733590 1998), sedangkan lepas lambat RAC belum banyak dikaji.

Penyediaan RAC yang cukup umumnya dilakukan dengan pemberian konsentrat. Namun, konsentrat yang tinggi dalam ransum dapat mengakibatkan dominasi bakteri homofermentatif asam laktat dalam sistem rumen. Akibatnya, keseimbangan mikroba rumen terganggu, bahkan konsentrasi RAC yang ekstrim dalam sistem rumen dapat mengakibatkan kematian (Wiryawan & Brooker 1996). Oleh karena itu, penyediaan RAC yang berkesinambungan dalam sistem rumen dengan mekanisme lepas lambat RAC juga dibutuhkan.

Daun murbei mengandung senyawa *1-deoxynojirimycin* (Oku *et al.* 2006) yang mampu menghambat proses hidrolisis oligosakarida menjadi monomer-monomernya (Breitmeier 1997; Arai

et al. 1998; Yatsunami *et al.* 2003; Kimura *et al.* 2004), namun penghambatannya tidak komplis (Gross *et al.* 1981; Mellor *et al.* 2002; Chapel *et al.* 2006). Karena itu senyawa tersebut diduga dapat menghambat hidrolisis karbohidrat non struktural asal konsentrat atau daun murbei dalam sistem rumen. Keberadaan daun murbei yang mengandung senyawa aktif dalam ransum diharapkan dapat menyediakan karbohidrat non struktural secara seimbang dan berkesinambungan dalam sistem rumen, sehingga fermentabilitas pakan berserat tinggi menjadi lebih baik.

Tujuan penelitian ini adalah mengamati penghambatan laju hidrolisis beberapa jenis karbohidrat oleh ekstrak daun murbei yang mengandung senyawa *1-deoxynojirimycin*, dalam media yang mengandung enzim cairan rumen dan dalam sistem rumen *in vitro*.

Metode

Guna mengkaji jenis karbohidrat yang dilepas secara lambat dalam sistem rumen oleh senyawa *1-deoxynojirimycin* (DNJ), dilakukan uji aktivitas enzim rumen dan uji daya lepas lambat beberapa macam karbohidrat dengan kehadiran ekstrak daun murbei (EDM) yang mengandung senyawa DNJ. Uji aktivitas enzim rumen menggunakan enzim kasar yang dikoleksi dari cairan rumen sapi potong yang diperoleh dari RPH serta beberapa bahan kimia untuk preparasi, sedangkan uji daya lepas lambat beberapa macam karbohidrat dengan kehadiran EDM yang mengandung senyawa DNJ dilakukan dengan teknik *in vitro* (Tilley & Terry 1963). Bahan yang diujikan terdiri atas glukosa, maltosa, sukrosa, pati, selulosa dan laktosa. Sebagai sumber senyawa DNJ digunakan ekstrak daun murbei.

Ekstrak daun murbei diperoleh dengan melakukan ekstraksi daun murbei varietas *Morus alba* sebagai berikut: daun murbei dikeringkan terlebih dahulu di dalam oven 60°C selama 24 jam, kemudian digiling halus. Tepung daun murbei diolah untuk mendapatkan ekstrak daun murbei. Pembuatan ekstrak daun murbei dilakukan dengan menggunakan ethanol 50% (Oku *et al.* 2006). Sebanyak 5 kg tepung daun murbei halus dimasukkan ke dalam ember berkapasitas 60 liter. Kemudian ditambahkan ethanol 50% sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai ethanol yang ditambahkan mencapai 25 liter. Ember lalu ditutup rapat dan didiamkan dalam suhu kamar selama 24 jam. Setiap jam dilakukan pengadukan. Pada akhir maserasi dilakukan penyaringan berlapis. Supernatan disisihkan dan ampas dimaserasi ulang (maserasi II) dengan prosedur yang sama seperti maserasi I. Seluruh supernatan yang dihasilkan selanjutnya dimasukkan ke evaporator untuk menghilangkan pelarut ethanolnya. Hasil ekstraksi daun murbei siap digunakan atau disimpan di dalam freezer. Sebanyak 4.785 kg BK tepung daun murbei yang diekstrak menggunakan 50 liter ethanol menghasilkan 4.7 liter EDM yang siap digunakan, sehingga 1 kg BK tepung daun murbei setara dengan 1 liter ekstraknya.

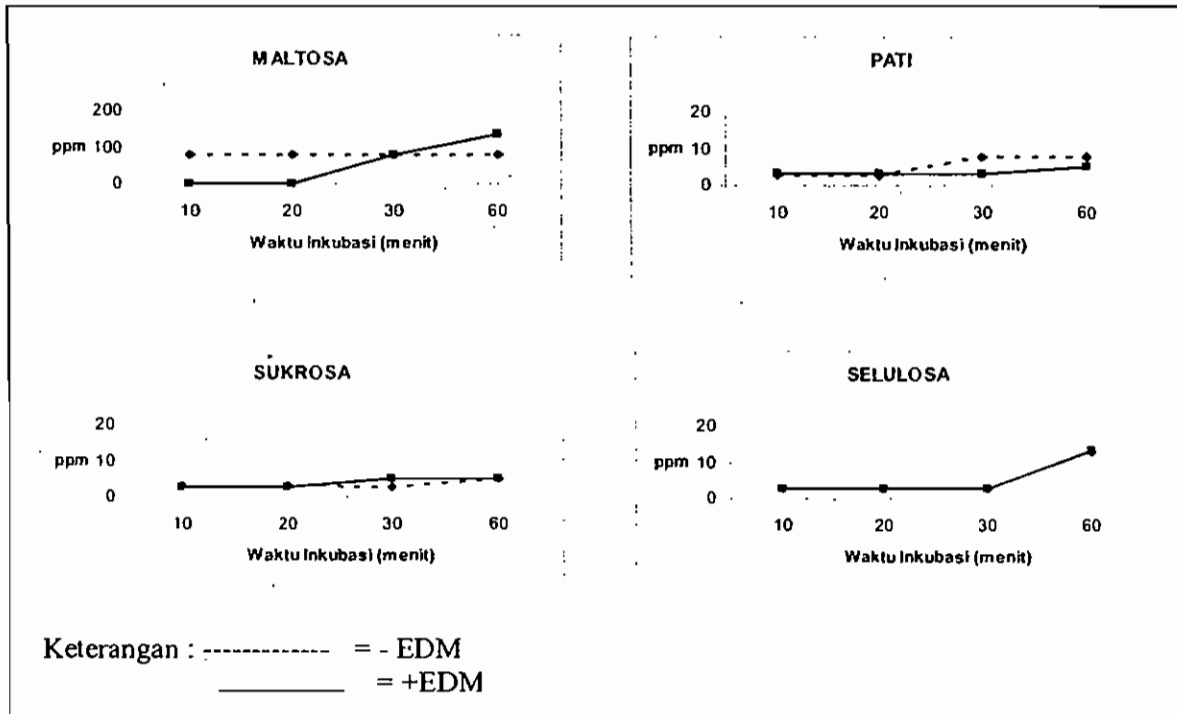
Preparasi enzim kasar dari cairan rumen dilakukan dengan prosedur sebagai berikut: cairan rumen segar yang telah disaring, diambil sebanyak 100 ml, lalu disentrifus dengan kecepatan 10 000 g pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan dicampur dengan larutan amonium sulfat 60% dan didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya supernatan disentrifus kembali dengan kecepatan 10 000 g pada suhu 4°C selama 10 menit. Endapan enzim yang dihasilkan ditambahkan buffer fosfat pH 7 sebanyak 10 ml, dan enzim siap digunakan. Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan prosedur sebagai berikut: Larutan substrat dibuat dengan menimbang 1 gram substrat uji dan dilarutkan ke dalam 100 ml buffer sitrat. Sebanyak 0,5 ml larutan substrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 ml stok enzim cairan rumen. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 39°C selama 10, 20, 30 dan 60 menit. Setelah inkubasi selesai, larutan ditambahkan 2 ml DNS, dicampur merata, dipanaskan pada suhu 90°C selama 5 menit, dan terakhir didinginkan. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 µm. Sebagai kontrol, dilakukan pekerjaan dengan beberapa tingkat konsentrasi substrat, tanpa menambahkan enzim cairan rumen.

Uji daya lepas lambat beberapa macam karbohidrat dengan kehadiran EDM yang mengandung senyawa DNJ dilakukan dengan teknik *in vitro* (Tilley & Terry 1963). Karbohidrat uji terdiri atas glukosa, maltosa, sukrosa, pati, selulosa dan laktosa serta tanpa EDM dan penambahan EDM dengan DNJ sebesar 0.06%. Peubah yang diamati terdiri atas total gula tereduksi.

Hasil dan Pembahasan

Aktivitas enzim dapat diamati dengan mengukur produk yang dihasilkan dari proses hidrolisis substrat. Gambar 1 disajikan dinamika konsentrasi gula reduksi dari hasil hidrolisis substrat yang berbeda oleh enzim kasar yang diperoleh dari cairan rumen, dengan waktu fermentasi yang berbeda

dan dengan atau tanpa penambahan ekstrak daun murbei. Dari gambar tersebut terlihat bahwa gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis maltosa lebih tinggi dibandingkan dengan substrat lainnya. Pada inkubasi sampai 30 menit, hidrolisis sukrosa, pati dan selulosa oleh enzim kasar cairan rumen belum menghasilkan gula reduksi. Gula reduksi dari hidrolisis pati dan selulosa terdeteksi pada inkubasi selama 60 menit. Hal ini disebabkan oleh proses hidrolisis pati dan selulosa menjadi glukosa membutuhkan jenis enzim dan tahap hidrolisis yang lebih panjang dibandingkan dengan maltosa.



Gambar 1 Dinamika konsentrasi gula reduksi dengan substrat dan waktu fermentasi yang berbeda dan dengan atau tanpa penambahan ekstrak daun murbei.

Berbeda dengan pati dan selulosa, rendahnya gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis sukrosa dapat disebabkan oleh jenis ikatan kimia yang berbeda antara maltosa dan sukrosa. Maltosa merupakan pereduksi sempurna dengan ikatan α -glukosidase, dan proses hidrolisisnya menghasilkan 2 molekul glukosa, sedangkan sukrosa bukan pereduksi dan mempunyai ikatan α - β -glikosidik. Untuk memutus ikatan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dibutuhkan enzim yang spesifik, yang mungkin kurang dalam cairan rumen yang dikoleksi untuk mendapatkan enzim kasar.

Penambahan ekstrak daun murbei pada media dengan substrat berupa maltosa mengakibatkan penghambatan aktivitas enzim maltase. Hal ini ditandai dengan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan pada inkubasi sampai 20 menit yang sangat sedikit terdeteksi pada medium yang ditambahkan EDM, dibandingkan dengan yang tidak ditambahkan EDM.

Pengamatan terhadap penghambatan aktivitas enzim oleh EDM juga telah dilakukan oleh Oku (2006), yang membandingkan aktivitas beberapa enzim, antara lain maltase, sukrase dan laktase pada media yang ditambahkan EDM. Enzim yang digunakan diperoleh dari usus halus manusia dan tikus. Dari penelitian tersebut dilaporkan bahwa penghambatan aktivitas enzim maltase dan sukrase oleh EDM sangat tinggi dibandingkan dengan laktase.

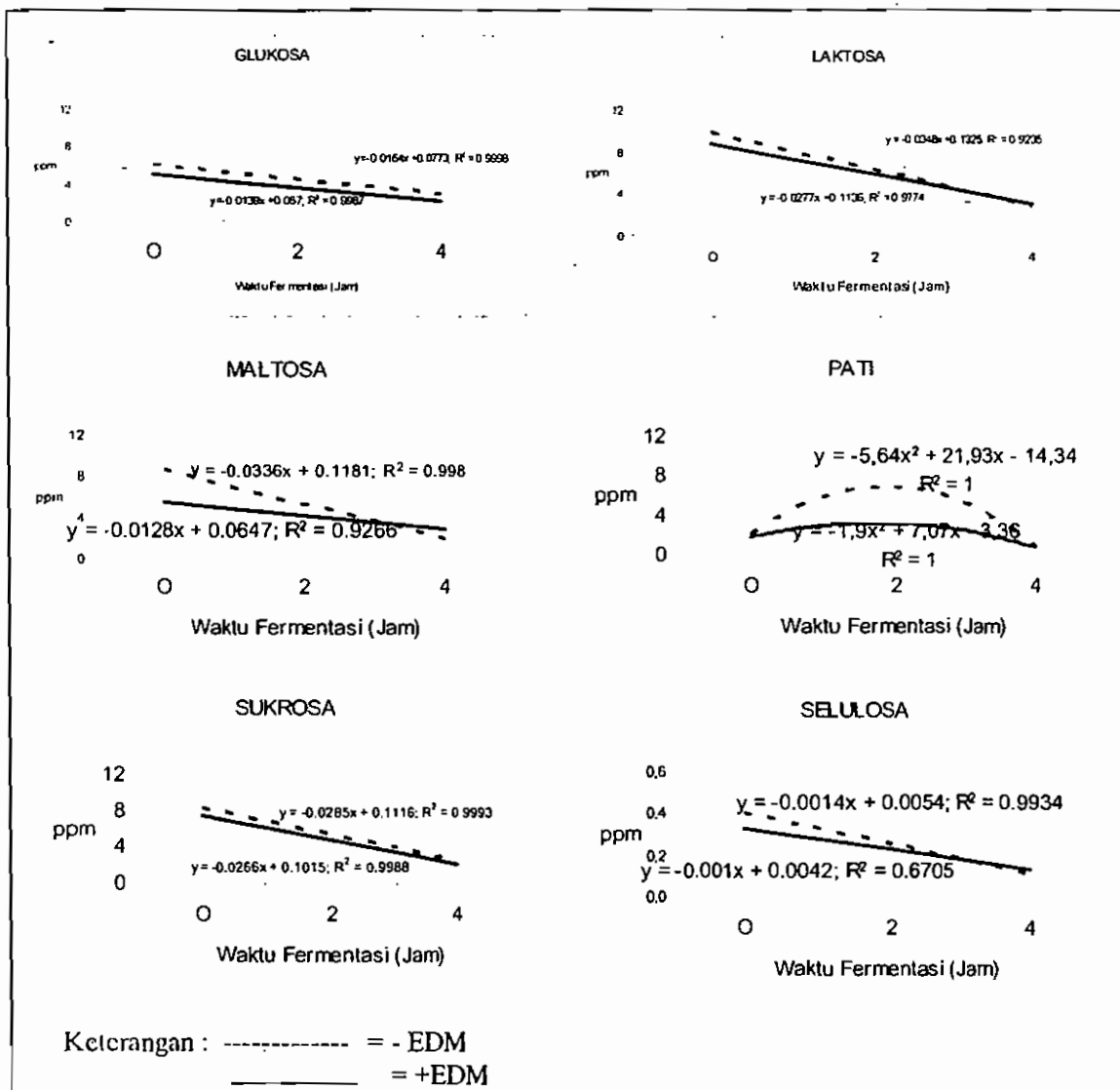
Tingkat konsentrasi gula tereduksi dan laju pengurangannya menggambarkan tingkat hidrolisis karbohidrat dalam media serta efektivitas proses fermentasi. Pada awal proses fermentasi, konsentrasi gula tereduksi yang tinggi menggambarkan tingkat hidrolisis substrat yang cepat, sedangkan laju pengurangan konsentrasi gula tereduksi yang semakin tajam menggambarkan tingkat pemanfaatan gula tereduksi pada proses fermentasi yang semakin tinggi.

Konsentrasi gula tereduksi yang terukur pada substrat berupa karbohidrat non struktural berkisar pada nilai 4 ppm sampai 12 ppm, sedangkan pada substrat berupa selulosa, konsentrasi gula tereduksi

ada pada kisaran nilai 2 ppm sampai 4,5 ppm (Gambar 2). Nilai tersebut mengindikasikan tingkat hidrolisis karbohidrat non struktural yang lebih cepat dibandingkan dengan karbohidrat struktural.

Konsentrasi gula tereduksi pada awal fermentasi lebih tinggi pada media yang tidak ditambahkan EDM, dibandingkan dengan yang ditambahkan EDM. Hal ini mengindikasikan adanya penghambatan hidrolisis karbohidrat akibat penambahan EDM yang mengandung senyawa *1-deoxynojirimycin*

Nilai mutlak gradien grafik hubungan antara waktu fermentasi dengan konsentrasi gula tereduksi menggambarkan laju kehilangan gula tereduksi dalam media. Gula tereduksi tersebut akan masuk ketahapan proses glikolisis atau metabolisme (Russel and Wallace 1997). Nilai mutlak gradien lebih tinggi pada media yang mendapat DNJ dibandingkan tanpa DNJ untuk semua substrat (Gambar 2). Perbedaan nilai tersebut mengindikasikan adanya perbaikan proses fermentasi pada media yang ditambahkan EDM pada semua substrat. Perbedaan nilai mutlak gradien grafik tertinggi terdapat pada maltosa (3,36 vs 1,28), sejalan dengan nilai pH media maltosa yang ditambahkan EDM cenderung lebih tinggi pada 4 jam fermentasi, sehingga penghambatan hidrolisis maltosa oleh senyawa DNJ lebih tinggi dibanding dengan jenis karbohidrat lainnya.



Gambar 2 Dinamika konsentrasi gula tereduksi cairan rumen dengan substrat dan waktu fermentasi yang berbeda dan dengan atau tanpa penambahan ekstrak daun murbei.

Senyawa DNJ tidak memblokir proses glikolisis semua tipe oligosakarida (Gross *et al.* 1983). Hal yang sama dinyatakan oleh Hock & Elstner (2005) bahwa senyawa DNJ dapat menghambat aktivitas α -glukosidase secara kompetitif, namun tidak menghambat aktivitas β -glukosidase, α dan β mannosidase maupun β -galaktosidase.

Kesimpulan

Ekstrak daun murbei yang mengandung senyawa 1-deoxynojirimycin dapat menjadi agen mekanisme lepas lambat karbohidrat non struktural dalam sistem rumen, khususnya maltosa. Hal ini ditandai dengan laju hidrolisis maltosa yang lebih lambat pada media maltosa yang ditambahkan ekstrak daun murbei.

Ucapan Terima Kasih

Kepada Badan Litbang Perta Kepada Badan Litbang Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui Program KKP3T dengan kontrak nomor: 712/LB/620/I.1/3/2008 tanggal 4 Maret 2008. atas nama Dr. Ir. Komang G Wiryawan.

Daftar Pustaka

- Arai M *et al.* 1998. N-Methyl-1-deoxynojirimycin (MOR-14), an α -glucosidase inhibitor, markedly reduced infarct size in rabbit hearts. *A Heart Assoc* 97:1290-1297
- Breitmeier D. 1997. Acarbose and 1-deoxynojirimycin inhibit maltose and maltooligosaccharide hydrolysis of human intestinal glucoamylase-maltase in two different substrate-induced modes. *Archives Biochem & Biophys* 346(1): 7-14.
- Chapel C *et al.* 2006. Antiviral effect of α -glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles. *J Gen Virol* 87: 861-871
- Gross V *et al.* 1983. 1-Deoxynojirimycins impairs oligosaccharide processing of alpha 1-proteinase inhibitor and inhibits its secretion in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 258 (20): 12203-12209.
- Kimura TK *et al.* 2004. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J Agric Food Chem* 52 (6):1415-1418
- Machii H, Koyama A, Yamanouchi H. 2002. *Mulberry Breeding, Cultivation and Utilization in Japan*. Sanchez MD, editor. *Mulberry for Animal Production. Proceedings of an electronic conference carried out, May and August 2000*. Roma: FAO Animal Production and Health Paper 147. hlm 63-72
- Oku T *et al.* 2006. Inhibitory effects of extractives from leaves of *Morus alba* on human and rat small intestinal disaccharidase activity. *J of Nutr* 95: 933-938.
- Romaniouk AV, Silva A, Feng J, Vijay IK. 2004. Synthesis of a novel photoaffinity derivative of 1-deoxynojirimycin for active site-directed labeling of glucosidase I. *Glycobiology* 14 (4): 301-310
- Russell JB, Wallace RJ. 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. Di dalam: Hobson PN, Stewart CS, editor. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Ed ke-2. London: Blackie Academic & Professional. hlm 246-282.
- Tilley JMA, Terry RA. 1963. Two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. Di dalam: Close WH, Menke KH. Editor. 1986. *Manual Selected Topics in Animal Nutrition*. Germany: University of Hohenheim, The Institute of Animal Nutrition, Stuttgart
- Trujillo FU. 2002. Mulberry for rearing dairy heifers. Di dalam: Sanchez MD, editor. *Mulberry for Animal Production. Proceedings of an electronic conference carried out, May and August 2000*. Roma: FAO Animal Production and Health Paper 147. hlm 203-206
- Wiryawan KG, Brooker JD. 1996. Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain fed sheep. *Aust J Agric Res* 46:1555-1568
- Yatsunami K *et al.* 2003. α -Glucosidase inhibitory activity in leaves of some mulberry varieties. *J of Food Sci Technol* 9 (4): 392-394.