

## SKRINING AKTIVITAS KLOORIFILASE PADA DAUN KATUK (*Sauropus androgynus*)

### CHLOROPHYLLASE ACTIVITY OF KATUK (*Sauropus androgynus*) LEAVES

*Rehmadanta Sitepu1\**, *Heryanto2*

#### **Info Artikel**

*Sejarah Artikel :*  
Diterima 1 Maret 2018  
Disetujui 1 Juni 2018  
Dipublikasikan 16 Juni  
2018

#### **Kata Kunci:**

Klorofilase, Kumis  
Kucing, Katuk, dan  
daun Pecut Kuda

#### **Keywords:**

Chlorophyllase,  
*Orthosiphon aristatus*,  
*Saoropus androgynous*,  
*Stachytarpheta*  
*jamaicensis*.

#### **Abstrak**

**Latar Belakang:** Klorofilase (*Chlase*) merupakan salah satu enzim yang terlibat dalam degradasi klorofil. Enzim ini berfungsi dalam mendegradasi klorofil menjadi fitol dan klorofilid. Beberapa literatur menunjukkan aktivitas klorofilase yang tinggi ada pada tanaman-tanaman herba. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mencari kandidat enzim klorofilase dari beberapa tanaman herba di Indonesia, khususnya herbal. Kandidat klorofilase tersebut nantinya dapat digunakan pada *Photodynamic Therapy* (PDT). PDT sangat efektif dalam membunuh sel kanker dengan mengubah oksigen dilingkungan sel kanker mejadi oksigen radikal sehingga efektif membunuh sel kanker. **Metode:** Skrining aktivitas klorofilase diamati pada daun Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*), daun Katuk (*Saoropus androgynus*), dan daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis*). **Hasil:** Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan metode skrining awal aktivitas klorofilase dan pengujian menggunakan ekstrak klorofil daun Bayan sebagai substrat, maka dapat disimpulkan daun Katuk memiliki aktivitas klorofilase yang baik. **Simpulan dan saran:** isolat aseton daun Katu memiliki aktivitas klorofilase dan sebaiknya dapat dilakukan karakterisasi profil protein klorofilase tersebut.

#### **Abstract**

**Background:** Chlorophyllase (*Chlase*) is one of the enzymes involved in chlorophyll degradation. This enzyme functions in degrading chlorophyll to phytol and chlorophyllid. Some literature shows high activity of chlorophyllase exists in herbaceous plants. **Objectives:** This study aims to find chlorophyllase enzyme candidates from some herbaceous plants in Indonesia, especially herbs. The chlorophyllase candidate can then be used in Photodynamic Therapy (PDT). PDT is very effective in killing cancer cells by converting oxygen in the environment of cancer cells into radical oxygen so effectively kill cancer cells. **Methods:** Screening of chlorophyllase activity observed on leaves of Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*), leaves of Katuk (*Saoropus androgynus*), and leaves of Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis*). **Results:** The results of this study indicate that by using the initial screening method of chlorophyllase activity and testing using Chlorophyll extract of Spinach as substrate, it can be concluded leaves of Katuk has good chlorophyllase activity. **Conclusions and suggestions:** Katu leaf acetone isolate has chlorophyllase activity and it is preferable to characterize the protein profile of the chlorophyllase.

#### **Korespondensi :**

Program Studi Farmasi Universitas Ma Chung. E-mail: rehmadanta@gmail.com



## PENDAHULUAN

Photodynamic Therapy (PDT) merupakan suatu pengobatan terhadap penyakit, khususnya kanker, melalui suatu pemberian photosensitizer (PS) yang kemudian akan diaktivasi oleh suatu gelombang cahaya tertentu. Oksigen yang berada disekitar PS yang sudah teraktivasi akan diubah menjadi oksigen singlet yang memicu apoptosis dan nekrosis sel kanker. Ada juga mekanisme dimana PS bereaksi dengan lingkungan mikro di sekitar sel kanker yang selanjutnya mentransfer elektron ke oksigen sehingga menghasilkan spesies oksigen yang reaktif yang akan membunuh sel kanker.

Pada umumnya PS merupakan turunan klorofil. Fungsi klorofil yang dapat menyerap cahaya menjadi energi merupakan implementasi dari struktur klorofil yang khas. Struktur ini disusun oleh porfirin sebagai struktur utama. Salah satu produk PDT yang telah disetujui FDA pada tahun 1990-an adalah Photofrin®. Produk ini digunakan untuk perlakuan terhadap sel kanker organ dan penyakit kulit. Obat ini merupakan turunan porfirinoid. Turunan klorofil yang sedang banyak dikembangkan sebagai PDT adalah feoforbid, struktur dimana logam Mg hilang dari struktur klorofil. Feoforbid ini merupakan senyawa kromofor yang memiliki serapan pada panjang gelombang antara 650 nm dan 670 nm. Pada penelitian Valentina dkk. Telah dibuat suatu konjugasi feoforbid a dengan molekul monometoksi-polietilen glikol untuk meningkatkan solubilitasnya di dalam darah (Limantara, 2006).

Penelitian ini memang bukan penelitian yang akan langsung dapat menuntun kita untuk dapat langsung menemukan kandidat PDT berikutnya. Namun, penelitian ini adalah awal untuk dapat membuat turunan klorofil sehingga kita dapat menyediakan kandidat PDT. Klorofilase adalah suatu enzim yang mampu memutuskan klorofil secara enzimatik sehingga terbentuk fitol dan klorofilid. Dari beberapa literatur, belum ditemukan mekanisme lain baik secara fisik maupun kimiawi untuk dapat memutuskan rantai panjang ekor klorofil ini.

Untuk itulah skrining aktivitas klorofilase ini akan menjadi sangat penting untuk menemukan kandidat klorofilase baru dari alam Indonesia yang dapat digunakan dalam pembuatan turunan klorofil sebagai dasar kita untuk mengarahkan penelitian ini ke suatu proyek yang besar, penemuan kandidat PDT baru

## METODE PENELITIAN

### Alat

Timbangan Sartorius BT2245, blender laboratorium Waring Commercial, spektrofotometer Labtech, mikropipet soccorex 1000 µl, sentrifugator Hettich, oven Binder, Kulkas untuk menyimpan sampel.

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Kumis Kucing, daun Katuk, daun Pecut Kuda, Bayam, pelarut seperti aseton, n-heksan, etanol, akuades, dan buffer 40 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0

#### Prosedur Rinci

##### Skrining Awal Identifikasi Klorofilase

Masing-masing sampel dipreparasi dengan cara dihaluskan, kemudian perasan air sampel sayuran ditampung. 0,5 ml filtrat air sampel ditambahkan 0,5 ml aseton dan 1 ml buffer 40 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0. Pembuatan preparat ini dilakukan dua perlakuan yang sama (Sampel 1 dan 2). Sampel 1 diinkubasi pada suhu ruang dan sampel 2 diinkubasi pada suhu 35°C. Inkubasi ini dilakukan selama 10 menit. Selanjutnya tambahkan 2 ml heksan:aseton 2:1 ke dalam preparat, kemudian di vorteks kurang lebih 5 menit. Sampel disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Fase aseton yang diperoleh dari hasil sentrifugasi diukur pada panjang gelombang 750 nm, 663 nm, dan 645 nm.

##### Isolasi Klorofil dari Daun Bayam

5 g daun Bayam dilarutkan dengan 30 mL aseton dengan cara digerus di dalam mortir hingga ekstrak klorofil dapat ditarik semua ke dalam aseton. Isolat disaring dengan kasa untuk memperoleh ekstrak klorofil.

##### Penentuan Aktivitas Klorofilase Ekstrak Aseton Daun Bayam

Sampel yang memiliki selanjutnya diuji dengan pigmen klorofil standar. Sejumlah filtrat tanaman seperti disebutkan di atas dihomogenisasi dengan air diambil dan diekstraksi dengan aseton untuk menghilangkan klorofil yang tersisa. Selanjutnya residu dikeringkan dari pelarutnya. Residu yang telah kering dihomogenisasi dengan buffer fosfat pH 7. Untuk menentukan aktivitas klorofilase, 0,15 ml residu ditambahkan dengan 1 ml dapar fosfat, 0,5 ml pigmen standar klorofil a dan 0,35 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Campuran ini diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Kemudian tambahkan 2 ml aseton dan 4 ml n-Heksan. Campuran divorteks selama 5 menit. Hasilnya disentrifugasi 14.000 rpm selama 5 menit. Fase n-heksan dan fase aseton diambil secara terpisah dan diukur pada panjang gelombang 750 nm, 663 nm, dan 645 nm.

##### Penentuan Konsentrasi Klorofil a

Penentuan konsentrasi klorofil a yang digunakan pada kedua metode di atas dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\frac{[11,3 \times (A_{663} - A_{750})]}{[1,11 \times (A_{645} - A_{750})]}$$

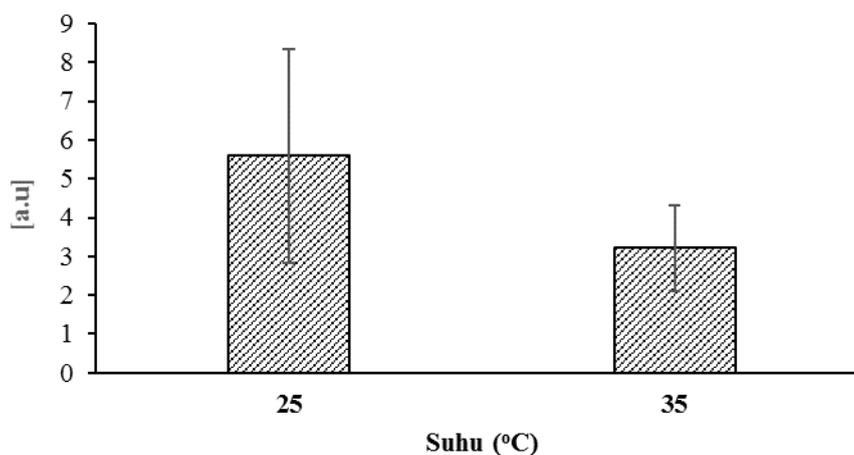
## Analisis Statistik

Semua prosedur analitis dilakukan tiga ulangan secara independen ( $n = 3$ ) dan hasilnya dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  S.D. (standar deviasi). Signifikansi perbedaan antara nilai rata-rata parameter Chlase dilakukan analisis statistik satu varian (ANOVA). Nilai  $p \leq 0,01$  dianggap menjadi asumsi signifikansi secara statistik.

## HASIL PENELITIAN

Daun Kumis Kucing, daun Katuk, dan daun Pecut Kuda adalah tanaman yang digunakan dalam skrining awal aktivitas klorofilase dengan menggunakan klorofil yang berasal dari tanaman itu sendiri. Penambahan larutan penyangga fosfat pH 7,4 digunakan untuk mengaktifasi protein klorofilase. Pelarut yang digunakan adalah aseton dan n-heksan. Sampel diinkubasi pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Kemudian fase aseton diukur untuk menentukan konsentrasi klorofil. Kontrol yang digunakan adalah isolat yang diinkubasi pada suhu ruang. Hasil menunjukkan bahwa tanaman yang memiliki aktivitas klorofilase pada skrining awal aktivitas klorofilase ini adalah daun Katuk seperti pada Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan bahwa konsentrasi klorofil sampel daun Katuk yang diinkubasi  $35^{\circ}\text{C}$  menunjukkan penurunan sekitar 30% dibandingkan dengan kontrol pada suhu kamar.

Untuk menguji aktivitas klorofilase, isolat tanaman sejumlah klorofil yang diperoleh dari ekstrak daun bayam dengan konsentrasi yang sama, dan diinkubasi di dalam oven selama 10 menit pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Metode dilakukan hampir sama dengan metode yang pertama, hanya saja perlu dilakukan pencucian klorofil tanaman sampel dengan aseton dan ditambahkan dengan ekstrak klorofil bayam dengan konsentrasi yang sama untuk tiap-tiap tanaman. Kemudian untuk memperoleh protein, sampel disentrifugasi dan endapannya diambil dan ditambahkan dengan aseton untuk dilarutkan kembali. Pada metode ini, fase aseton diisolasi dan diukur pada  $\lambda$  645 nm, 663 nm, dan 750 nm.



---

***Gambar 1 Konsentrasi klorofil daun Katuk pada pengujian skrining awal aktivitas klorofilase***

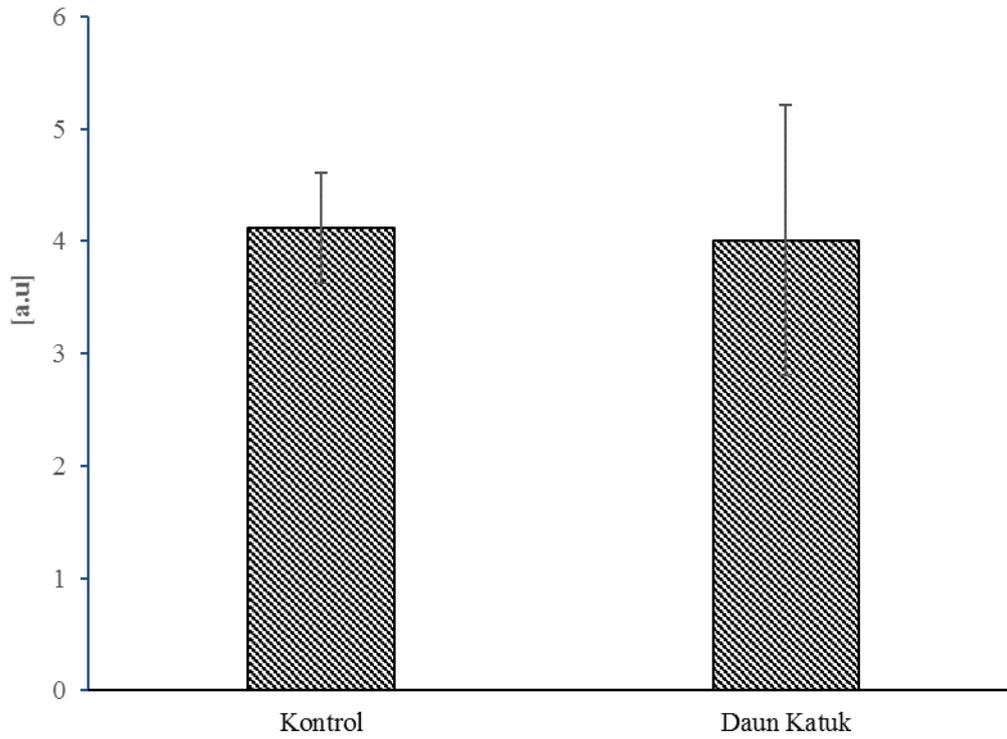
Dari hasil yang ditunjukkan oleh Gambar 2 menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh dari daun Katuk menunjukkan penurunan konsentrasi klorofil bila dibandingkan dengan kontrol yang mengindikasikan adanya aktivitas klorofilase pada tanaman tersebut.

**PEMBAHASAN**

Dari skrining awal tiga spesies tanaman yang berbeda, yaitu daun Kumis Kucing, daun Katuk, dan daun Pecut kuda, dari hasil isolasi klorofil yang diperoleh dari fase aseton, maka dapat terlihat hanya pada daun Katuk yang memiliki aktivitas klorofilase. Isolat yang diperoleh dari fase aseton dari daun Kumis Kucing dan daun Pecut Kuda tidak menunjukkan perubahan konsentrasi klorofil yang signifikan sehingga dari hal ini disimpulkan tidak terdapat aktivitas klorofilase pada kedua tanaman ini. Namun demikian, prosedur yang dilakukan dalam identifikasi awal ini memiliki banyak kelemahan, seperti jumlah klorofil yang digunakan tidak seragam karena bergantung dari sampel dan bagian tanaman. Namun melalui skrining awal ini dapat digunakan sebagai dasar dalam uji aktivitas lanjutan dengan menggunakan ekstrak klorofil yang diperoleh dari daun Bayam. Gambar 1 menunjukkan bagian tanaman yang memiliki aktivitas klorofilase pada daun Katuk.

Untuk mengevaluasi hasil skrining awal, maka dilakukanlah pengujian isolat aseton masing-masing bagian tanaman tersebut dengan menggunakan ekstrak klorofil daun Bayam. Prosedur yang digunakan hampir sama dengan skrining awal, hanya saja tidak menggunakan klorofil yang berasal dari tanaman tersebut, tetapi menggantinya dengan ekstrak klorofil dari daun bayam. Dengan menggunakan ekstrak klorofil daun Bayam, maka konsentrasi klorofil yang diberikan sama sehingga dapat membandingkan aktivitas klorofilase antara tanaman yang satu dengan yang lainnya.

Dari hasil ini menunjukkan adanya aktivitas klorofilase hanya pada daun Katuk. Gambar 2 menunjukkan tingkat penurunan konsentrasi ekstrak klorofil dari daun Bayam pada isolat daun Katuk dibandingkan dengan kontrol. Hal ini mengkonfirmasi kembali terhadap aktivitas klorofilase yang diperoleh dari metode skrining awal untuk aktivitas klorofilase ini.



*Gambar 2 Penurunan konsentrasi klorofil daun Bayam pada perlakuan isolate daun Katuk dibandingkan dengan kontrol.*

---

Nilai klorofil a total dari kontrol diperoleh dengan rata-rata  $4,12 \pm 0,49$  sedangkan untuk nilai konsentrasi klorofil dari isolat daun Katu diperoleh dengan rata-rata  $4,01 \pm 1,20$ . Meskipun nilai penurunannya tidak bergitu banyak, tetapi hasil ini dapat dijadikan acuan untuk melakukan penelitian lanjut terhadap klorofilase yang ada pada daun Katu.

## **SIMPULAN**

Dari hasil ini dapat diperoleh kesimpulan bahwa aktivitas klorofilase dapat teridentifikasi pada bagian tanaman daun Katu. Adanya aktivitas klorofilase ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut seperti isolasi klorofilase, optimasi pH dan suhu, serta sekuensing untuk menentukan urutan asam amino protein ini. Namun hal ini membutuhkan waktu dan biaya yang cukup tinggi. Penelitian selanjutnya akan dilakukan ke arah isolasi dan optimasi klorofilase untuk dapat dilakukan penentuan urutan asam amino enzim tersebut.

## **SARAN**

Penentuan aktivitas klorofilase pada daun Katu ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mulai dari karakterisasi enzim, pemurnian enzim, hingga penentuan urutan asam amino dari enzim klorofilase yang ada pada daun Katu ini.

## **REFERENSI**

- Abrahamse, H., Hamblin, M., Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy, (February). doi:10.1042/BJ20150942
- Care, B. (2015). Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment : The state of the art in clinical trials Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment : The state of the art in clinical, (April). doi:10.1016/j.pdpdt.2015.04.004
- Drazkiewicz, M., & Krupa, Z. (1991). The participation of chlorophyllase in chlorophyll metabolism. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*.
- Gupta, S., Gupta, S. M., & Kumar, N. (2011). Role of chlorophyllase in chlorophyll homeostasis and post-harvest breakdown in Piper betle L . leaf, 48(October), 353–360.

- 
- H, DMínguez-mosquera, M. I. (2001). Properties of Chlorophyllase from *Capsicum annuum* L. Fruits. *Z. Naturforsch*, 56c, 1015–1021.
- Ion, R.-M., Sorescu, A.-A., & Nuta, A. (2014). NEW METALLO-SENSITIZERS IN PHOTODYNAMIC THERAPY. *Advanced Research in Scientific Areas*, (5), 223–228.
- Łabuz, J., Sztatelman, O., & Gabrys, H. (2011). Expression of Enzymes Involved in Chlorophyll Catabolism in *Arabidopsis* Is Light Controlled 1 [ W ], 157(November), 1497–1504. doi:10.1104/pp.111.185504
- Limantara, L., Koehler, P., Wilhelm, B., Porra, Robert, J., & Scheer, H. (2006). Photostability of Bacteriochlorophyll a and Derivatives: Potential Sensitizers for Photodynamic Tumor Therapy. *Photochemistry and Photobiology*.
- Marise, L., Calito, G. M. F., Chorilli, M., Giusti, J. S. M., Bagnato, V. S., Soukos, N. S., ... Fontana, C. R. (2016). Polymeric Nanoparticle-Based Photodynamic Therapy for Chronic Periodontitis in Vivo. *International Journal of Molecular Science*, 17(765). doi:10.3390/ijms17050769
- Oa, I. L., Shemer, T. A., Harpaz-saad, S., Belausov, E., Lovat, N., Krokhin, O., ... Eyal, Y. (2008). Citrus Chlorophyllase Dynamics at Ethylene-Induced Fruit Color-Break : A Study of Chlorophyllase Expression , Posttranslational Processing Kinetics , and in Situ, 148(September), 108–118. doi:10.1104/pp.108.124933
- Ocakoglu, K., Er, O., Kiyak, G., Lambrecht, F. Y., Gunduz, C., & Kayabasi, C. (2015). <sup>131</sup>I-Zn-Chlorophyll Derivative Photosensitizer for Tumor Imaging and Photodynamic Therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(July), 96–101. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.07.047
- Pellosi, D. S., Tessaro, A. L., Moret, F., Gaio, E., Reddi, E., Caetano, W., ... Noboru Hioka. (2016). Pluronic ® mixed micelles as efficient nanocarriers for benzoporphyrin derivatives applied to photodynamic therapy in cancer cells. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 314(August), 143–154. doi:10.1016/j.jphotochem.2015.08.024
- Ramos, U. D., Ayub, L. G., Reino, D. M., Grisi, M. F. M., Jr., M. T., Souza, S. L. S., ...

- Novaes, A. B. (2015). Antimicrobial Photodynamic Therapy as an alternative to Systemic Antibiotics: Results from a Double-Blind, Randomized, Placebo- Controlled, Clinical Study on type 2 Diabetics. *Journal of Clinical Periodontology*, (June 2016). doi:10.1111/jcpe.12498
- Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. (2009). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* Photodynamic therapy ( PDT ): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 96(1), 1–8. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001
- Sytykiewicz, H., Sprawka, I., Czerniewicz, P., & Sempruch, C. (2013). Biochemical characterisation of chlorophyllase from leaves of selected *Prunus* species — A comparative study, 60.
- Xu, J., Gao, J., & Wei, Q. (2016). Combination of Photodynamic Therapy with Radiotherapy for Cancer Treatment. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1–7.