Submit : 7 September 2022
Review : 11 Oktober 2022
Accepted : 28 Oktober 2022

AGRIBIOS : Jurnal Ilmiah
Vol 20, No 2, November 2022

PEMURNIAN DAN UJI AKTIVITAS PROTEASE SULFIHIDRIL BATANG KAMBOJA (*Plumeria obusta*)

Trias Ayu Laksanawati[1*)], M Habbib Khirzin[2)], Kiky Mey Shinta[3)]
[1,2,3]Teknologi Pengolahan Hasil Ternak, Politeknik Negeri Banyuwangi, Banyuwangi
*Email Korespondensi : trias@poliwangi.ac.id

Abstrak

Batang kamboja (*Plumeria obtusa)* merupakan bagian terbesar dari tanaman kamboja yang mengandung protease sulfihidril, namun masih belum banyak dimanfaatkan. Pemanfaatan protease sulfihidril dari batang kamboja dilakukan karena memiliki aktivitas proteolisis yang baik. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas protease sulfihidril batang kamboja agar dapat mengetahui efektivitasnya dalam menghidrolisis protein. Uji aktivitas enzim protease sulfihidril dapat ditentukan dengan metode *caseein assay* menggunakan kasein sebagai substrat. Selain itu juga dilakukan pemurnian enzim untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar batang kamboja yang mengandung banyak unsur lainnya. Pemurnian protease sulfihidril dilakukan dengan pengendapan menggunakan ammonium sulfat konsentrasi 20% sampai 80%. Hasil aktivitas tertinggi enzim protease sulfhidril terdapat pada pengendapan 60% ammonium sulfat dengan nilai protein 132,5485 µg, aktivitas total sebesar 0,4389 U/ml, *purification factor* sebesar 1,0066 dan *yield* 40,9790%.

Kata Kunci: Aktivitas Enzim; Ammonium Sulfat; Batang Kamboja; Pemurnian; Protease Sulfihidril

Abstract

The stem of frangipani (Plumeria obtusa) is the largest part of the frangipani plant which contains sulfhydryl proteases, but is still not widely used. The use of sulfhydryl proteases from frangipani stems is carried out because they have good proteolytic activity. The sulfhydryl protease enzyme activity test can be determined by the caseein assay method using casein as a substrate. In addition, enzyme purification was also carried out to separate certain enzyme proteins from the crude extract of frangipani stems which contained many other elements. The purification of sulfhydryl proteases was carried out by precipitation using ammonium sulfate at a concentration of 20% to 80%. The highest activity of the sulfhydryl protease enzyme was found in the precipitation of 60% ammonium sulfate with a protein value of 132.5485 g, a total activity of 0.4389 U/ml, a purification factor of 1.0066 and a yield of 40.9790%.

Keywords: *Enzyme Activity; Ammonium Sulfate; Frangipani Stem; Purification; Sulfhydryl Protease*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan tanaman herbal dan berkhasiat untuk obat, salah satunya yaitu tanaman kamboja (*Plumeria obtusa)*. Tanaman kamboja banyak terdapat diarea pemakaman warga. Seluruh bagian tanaman ini memiliki khasiat obat karena mengandung berbagai senyawa kimia, diantaranya triterpenoid, amyrin, lopenol, farnesol, dan fenil alkohol yang terbukti sebagai zat antibakteri (*Idrees et al*., 2020). Batang kamboja memiliki persentase terbanyak dari keseluruhan bagian tanaman kamboja, namun pemanfaatannya yang relatif rendah sehingga menjadikan batang kamboja sebagai limbah dan tidak memiliki nilai komersial. Menurut (Yuswanto, 2015). Kamboja memiliki kandungan protease yang dimanfaatkan sebagai *autolitik debridement*

untuk penanganan luka yang baik. Enzim protease pada tanaman kamboja merupakan enzim protease sulfhidril yang memiliki residu sulfhidril pada sisi aktifnya, memiliki pH optimal 7,5 sampai 8 dengan suhu optimal 55℃ (Ratnayani *et al.,* 2018). Protease merupakan enzim yang memiliki aktivitas proteolisis yang mampu memecah protein. Selain itu, protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisika-kimia dan katalitik yang sangat bervariasi (Suhartono, 2000). Protease disebut juga peptidase atau proteinase yang merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptide. Untuk mengetahui efektifitas enzim dalam menghidrolisis protein menjadi asam aminonya maka perlu dilakukan pengujian aktivitas enzim tersebut. Dalam memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar batang kamboja yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan pemurnian enzim. Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat – sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan dan berat molekul serta ukurannya. Salah satu metode yang digunakan untuk pemurnian enzim yaitu dengan pengendapan menggunakan ammonium sulfat. Penambahan ammonium sulfat kedalam laruatn protein akan memberikan pengaruh terhadap kelautan enzim yaitu menurunkan kelarutannya di dalam air *(salting out).* Amonium sulfat digunakan dalam proses pemurnian karena sifatnya yang sangat larut, murah dan memiliki tingkat pemurnian tertinggi, serta tidak mengubah pH larutan protein yang dapat mengakibatkan denaturasi protein (Rosalina Suhito, 2017). Proses pemurnian menggunakan amonium sulfat memanfaatkan kadar garam tinggi untuk mengendapkan protein, kelarutan protein akan menurun apabila berada pada kondisi tersebut (Cutler, 2004). Berdasarkan latar belakang permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pemurnian enzim dari ekstrak kasar protease sulfhidril dari batang kamboja *(Plumeria obtusa)* dan dilakukan uji aktivitas enzimnya.

METODE PENELITIAN

Alat Dan Bahan

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Teknologi Pengolahan Hasil Ternak Politeknik Negeri Banyuwangi. Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu batang kamboja, trichloroacetic acid (TCA for analysis, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), kasein (bovine milk, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, Tris-HCL, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, dan amonium sulfat (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), etanol 96% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), kain saring, dan BSA (bovine serum albumin). Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu colonical flask, sentrifuge, magnetic stirrer, waterbath shaker, vortex, micropipette, serta peralatan gelas lainnya.

Ekstraksi Protease Sulfhidril Kasar Batang Kamboja (*Plumeria Obtusa*)

Setiap 100 mg batang kamboja *Plumeria obtusa* dilakukan dengan proses perendaman dengan menggunakan 100 ml etanol 96% selama 30 menit. kemudian dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dan dihaluskan setelah itu disaring menggunakan kain saring dan diambil ekstraknya. Ekstraksi enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* dilakukan dengan menggunakan *buffer phosphate* 0,1 M pH 7 dengan perbandingan 1:1, selanjutnya diambil filtratnya. Filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4℃ (Zohdi *et al.,* 2013). Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar protease sulfihidril kemudian disimpan padasuhu 4^oC untuk tahapan pemurnian.

Pengukuran Aktivitas Enzim Menggunakan Metode *Cassein Assay*

Aktivitas enzim dapat ditentukan dengan metode *caseein Assay* menggunakan kasein sebagai substrat pada suhu suhu 55^{o}C dan pada kondisi pH 7,5. Larutan kasein 400 µl direaksikan dengan 200 µl larutan ekstrak protease sulfhidril, kemudian ditambahkan 700 µl larutan *buffer phosphate* pH 7,5 konentrasi 0,01M, kemudian diinkubasiselama 30 menit. Inkubasi dihentikan dengan penambahan TCA 1,2 M sebanyak 500 µl, sehingga enzim dan sisa substrat terdenaturasi, kecuali produk hasil hidrolisis yang berupa asam amino (salah satunya yaitu tirosin). Tirosin yang larutdalam campuran reaksi tersebut selanjutnya dipisahkan dari enzim dan sisa substrat dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan diukur dengan spektrofotometer dengan menggunakan kuvet kuarsa pada panjang gelombang 275 nm, kemudian dapat dilakukan perhitungan aktivitas enzim berdasarkan berat tirosin yang diperoleh (Cutler, 2004). Penentuan kadar protein bisa didapatkan dengan membuat kurva standar protein BSA *(bovine serum albumin*). *Bovine serum albumin* (BSA) sering digunakan sebagai standar untuk pengukuran kadar protein terlarut dengan menggunakan metode *Bradford*.

$$\text{Aktivitas per ml} = \frac{\text{M x V larutan uji}}{\text{Mr tirosin x t x V enzim}}$$

$$\text{Aktivitas total} = \text{aktivitas per ml x V sampel}$$

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{aktivitas per ml}}{\text{total protein}}$$

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{aktivitas total}}{\text{aktifitas total awal}} \text{x } 100\%$$

$$\text{Purification factor} = \frac{\text{aktivitas spesifik}}{\text{aktifitas spesifik awal}}$$

Keterangan:

Aktivitas per ml	: µmol produk tirosin per ml yang terbentuk tiap menit
M	: berat tirosin per ml
Mr tirosin	: berat molekul tirosin
t	: waktu inkubasi
V enzim	: volume ekstrak enzim protease

Pemurnian Menggunakan Amonium Sulfat

Larutan hasil ekstraksi kasar enzim protease sulfhidril diendapkan secara bertahap pada suhu ruang dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60% dan 80%. Padatan amonium sulfat yang diperlukan ditimbang, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam ekstrak enzim hingga larut dengan proses pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Hasil pengendapan disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit pada suhu ruang. Supernatan yang didapat diambil dan digunakan untuk pengendapan selanjutnya, sedangkan peletnya dilarutkan dengan *buffer* pH 7,5 optimum untuk uji aktivitas, penambahan amonium sulfat dilakukan secara bertahap hingga mencapai 80%. Hasilnya adalah enzim dengan nilai *purification factor* dan *yield* terbaik dipakai untuk tahap dialisis (Rosalina Suhito, 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

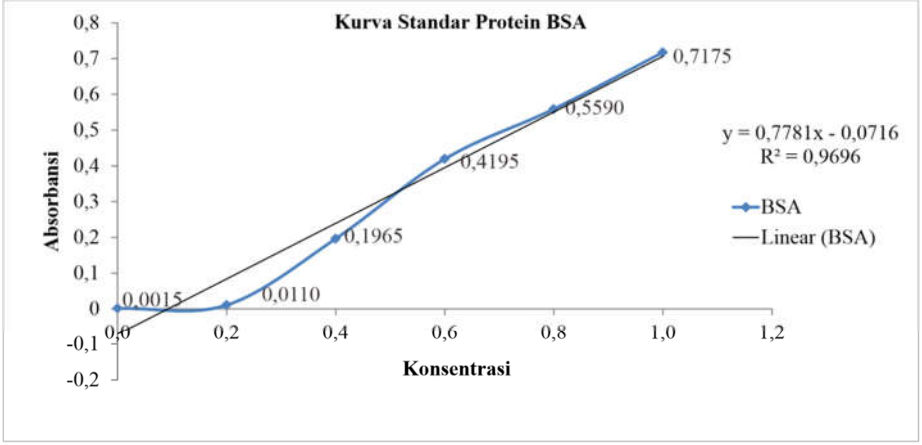
Ekstraksi Protease Sulfihidril Kasar

Ekstraksi protease sulfihidril kasar dari batang kamboja diawali dengan perendaman batang kamboja menggunakan etanol 96% untuk melarutkan getah kamboja

yang mengandung *plumerin* yang bersifat racun yang dapat menyebabkan infeksi pada tenggorokan apabila dikonsumsi. Etanol merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan getah pada batang kamboja, penggunaan etanol sebagai pelarut getah kamboja dikarenakan etanol memiliki sifat mudah menguap dan tidak berwarna. Ekstraksi enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* dilakukan dengan menggunakan *buffer phosphate* 0,1 M pH 7 dengan perbandingan 1:1 dan disentrifuge 6.000 rpm selama 5 menit hingga terbentuk lapisan residu dan supernatan. Penambahan *buffer* pada proses ekstraksi enzim dari jaringan tanaman ini untuk menjaga pH tetap netral. Lapisan residu harus dipisahkan dari supernatan karena lapisan ini sebagian besar komponen selain protein. Lapisan supernatan yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai ekstrak protease sulfihidril kasar. Ciri- ciri ekstrak protease sulfihidil kasar yang diperoleh yaitu berwarna hijau muda, keruh, tidak kental, sedikit berbuih.

Penentuan Kadar Protein Enzim

Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan penentuan konsentrasi kadar protein pada ekstrak kasar enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa*. Penentuan kadar protein bisa didapatkan dengan membuat kurva standar protein BSA *(bovine serum albumin*). *Bovine serum albumin* (BSA) sering digunakan sebagai standar untuk pengukuran kadar protein terlarut dengan menggunakan metode *Bradford* karena tingkat kemurniannya tinggi dan harganya relatif murah (Utami *et al.,* 2016). Hasil absorbansi sampel yang diperoleh dari spektrofotometer dimasukkan ke dalam persamaan linier. Persamaan yang telah diperoleh yaitu y = 0,7781x - 0,0716 , selanjutnya nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan tersebut, sehingga diperoleh kadar protein enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa*. Kurva standar BSA dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Standar Protein BSA

Nilai R^2 BSA sebesar 0,9696 atau 96,96% yang menunjukkan bahwa seiring dengan meningkatnya konsentrasi BSA maka korelasi terhadap peningkatan nilai absorbansi sangat kuat, sedangkan 3,04% dipengaruhi oleh faktor lainnya. Nilai R^2 mendekati angka 1 maka menggambarkan adanya korelasi yang sangat akurat, dimana konsentrasi dan nilai absorbansi sangat berpengaruh sangat nyata terhadap kadar protein larutan uji. Kadar protein yang diperoleh selanjutnya dimasukkan dalam rumus perhitungan aktivitas enzim.

Pengendapan Enzim Menggunakan Ammonium Sulfat

Enzim protease sulfhidril dari batang kamboja masih tercampur berbagai macam protein lain sehingga perlu dilakukan pemurnian untuk mendapatkan enzim yang lebih murni. Prosedur awal pemurnian yaitu dengan metode pengendapan secara bertahap

menggunakan amonium sulfat (Rohishoh, 2012). Pengendapan dengan amonium sulfat menggunakan prinsip *salting out*, prinsip *salting out* didasari oleh kompetisi antara ion garam dan molekul protein untuk berikatan dengan air. Penambahan amonium sulfat dengan konsentrasi tinggi mengakibatkan molekul air akan terikat dengan ion-ion garam, sehingga molekul air yang berikatan dengan protein akan semakin berkurang. Kondisi ini menyebabkan menurunnya kelarutan protein sehingga protein akan mengendap (Scopes, 1994). Amonium sulfat digunakan dalam proses pemurnian enzim karena sifatnya yang sangat larut, murah dan memiliki tingkat pemurnian tertinggi, serta tidak mengubah pH larutan protein yang dapat mengakibatkan denaturasi protein (Rosalina Suhito, 2017). Proses purifikasi menggunakan amonium sulfat memanfaatkan kadar garam tinggi untuk mengendapkan protein, kelarutan protein akan menurun apabila berada pada kondisi tersebut (Cutler, 2004). Hasil dari pengendapan enzim protease menggunakan amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Protease Sulfhidril Dengan Pengendapan Amonium Sulfat

Pengendapan	volume (ml)	Protein(µg)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas total	Aktivitas Spesifik (U/ml)	*Yield* (%)	*Purification factor*
Awal	10	64,69091 ± 0,0006	0,1071 ± 0,002517	0,0107 ± 0,001528	0,0016550 ± 0.0000577	100 ± 0	1 ± 0
20%	1,2	110,75183 ± 0,00155	0,1833 ± 0,003215	0,1528 ± 0,003215	0,0016552 ± 0,0000577	14,2667 ± 0,00152	1,0001 ± 0,0025
40%	0,7	115,48130 ± 0,00105	0,1911 ± 0,007937	0,2731 ± 0,002517	0,0016556 ± 0,0001000	25,5017 ± 0,00200	1,0002 ± 0,0036
60%	0,5	132,54851 ± 0,00057	0,21940 ± 0,002517	0,4389 ± 0,002517	0,0016677 ± 0,0001000	40,9790 ± 0,0115	1,0066 ± 0,0100
80%	0,4	120,00514 ± 0,00051	0,1271 ± 0,00200	0,3178 ± 0,001528	0,0015552 ± 0,0000577	29,6808 ± 0,00642	0,9396 ± 0,0035

Data pada Tabel 1 menunjukan bahwa kadar protein dan aktivitas enzim mengalami peningkatan dari pengendapan menggunakan ammonium sulfat 0% sampai dengan 60%, lalu mengalami penurunan pada pengendapan menggunakan ammonium sulfat 80%. Kadar protein dan aktivitas tertinggi enzim protease sulfhidril terdapat pada pengendapan 60% dengan nilai protein 132,5485 µg, aktivitas total sebesar 0.4389 U/ml, *purification factor* sebesar 1.0066 dan *yield* 40,9790%, hal ini disebabkan pengendapan enzim protease sulfhidril paling sempurna ada padakonsentrasi amonium sulfat 60%. Pengendapan 80% menunjukkan penurunan aktivitas enzim protease sulfhidril, hal ini disebabkan karena enzim telah jenuh dengan amonium sulfat atau garam amonium sulfat ikut terikat pada protein sehingga menyebabkan nilai aktivitas enzim turun (Rohishoh, 2012). Penelitian sebelumnya yang dilakukan Bahri *et al* (2012) melakukan karakterisasi enzim dari kecambah biji jagung menggunakan garam ammonium sulfat dengan konsentrasi 55% jenuh untuk menghasilkan aktivitas enzim tertinggi. Penelitian Sriwahyuning *et al* (2015) menggunakan garam ammonium sulfat optimum 60% untuk mengisolasi enzim dari biji buah durian. Hasil berbeda pada garam ammonium sulfat optimum yang diperoleh dari setiap penelitian pemurnian enzim disebabkan factor lingkungan seperti suhu, pH serta sumber sampel yang berbeda. Ekstrak kasar enzim protease sulfhidril yang dihasilkan pada tahapan ini berubah menjadi enzim semi murni, hal tersebut dapat dilihat dari nilai aktivitas total atau jumlah unit enzim per milligram protein yang terus naik dari pengendapan 20% hingga 60%. Jumlah nilai *yield* menunjukkan persentase jumlah kenaikan aktivitas total enzim pada setiap tahap pengendapan amonium sulfat dimana terus meningkat seiring dengan

proses pengendapan. Aktivitas spesifik atau aktivitas spesifik ekstrak per milligram protein mengalami kenaikan dengan nilai tertinggi pada pengendapan 60% dengan *purification factor* atau kenaikan nilai pemurnian enzim yang juga meningkat dari ekstrak kasarnya.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protease sulfihidril dari batang kamboja dengan pemurnian menggunakan pengendapan ammonium sulfat 60% memiliki nilai aktivitas total enzim tertinggi yaitu sebesar 0.4389 U/ml, nilai protein 132,5485 µg, purification factor sebesar 1.0066 dan yield 40,9790%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Akademik Pendidikan Tinggi Vokasi, Direktorat Jenderal Pendidikan Vokasi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi yang telah mendanai penelitian ini pada tahun 2022.

REFERENSI

Bahri, S., Mirzan, Moh., dan Hasan, Moh. (2012). Karakterisasi Enzim Amilase Dari Kecambah Biji Jagung Ketan (Zea mays ceratina L.). *Jurnal Natural Science.* 1 (1), 132-143.

Cutler, P. (2004). Protein Purification Protocols (Google eBook). *Protein Purification Protocols*, *59*, 484.

Idrees, S., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Jilani, M. I., & Memon, N. (2020). Medicinal Plants of South Asia. In P. M. R. Morse (Ed.), *Novel Sources for Drug Discovery* (pp. 1–699).

Ratnayani, K., Nazib, M., Sibarani, J., & Laksmiwati, A. A. I.. M. (2018). Aktivitas Protease Pada Getah Bagian Batang Dari Tiga Jenis Spesies Tanaman Kamboja (Plumeria L). *Jurnal Kimia*, *Plumeria L*, 147.

Rohishoh, N. (2012). Produksi dan pemurnian enzim glukosa oksidase dari *Skripsi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Airlangga.*, 978–979.

Rosalina Suhito, I. (2017). Karakterisasi, D A N Alkalin, Enzim Limbah, Dari Naga, Buah Hylocereus, Merah. April.

Scopes, Robert K. (1994). *Protein Purification Principle and Practice* Third Edition. New York, Springer Science + Business Media.

Sriwahyuni, L., Rosahdi, T.D., dan Supriadin, A. (2015). Isolasi Dan Karakterisasi Amilase Dari Biji Durian (Durio Sp.). Al Kimiya. 2(10)

Suhartono, M.T. (2000). Pemahaman Karakteristik Biokimia Enzim Protease dalam Menunjang Industri berbasis Bioteknologi. Buku Orasi Ilmiah guru Besar ilmu Dasar- Dasar Biokimia Dasar. Bogor: Fateta IPB.

Utami, P., Lestari, S., & Lestari, S. (2016). Pengaruh Metode Pemasakan Terhadap Komposisi Kimia Dan Asam Amino Ikan Seluang (Rasbora Argyrotaenia). *Fishtech*, *5*(1), 73–84.

Yuswanto, T. J. A. (2015). Ekstrak getah pepaya sebagai autolitik debridement luka kronis. 10(77), 296–300.

Zohdi, N. K., & Amid, M. (2013). *Optimization of extraction of novel pectinase enzyme discovered in red pitaya (Hylocereus polyrhizus) peel*. *Molecules*, *18*(11), 14366–14