

Seleksi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tumbuhan *Ficus* spp. pada Variasi Suhu dan pH

Rischa Karmila Lani, Sri Kasmiyati, dan Andreas Sukmana

Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana

Email : 412015022@student.uksw.edu

Abstrak - Enzim protease merupakan enzim penghidrolisis protein. Enzim protease memiliki peranan penting dalam industri seperti pembuatan deterjen, farmasi, penjernih bir, pengempuk daging, pembuatan keju dan sebagainya. Pemakaian enzim dalam industri terus meningkat sedangkan ketersediaan enzim masih terbatas dan belum mencukupi kebutuhan, oleh karena itu perlu untuk dicari sumber enzim protease yang lain. Tumbuhan *Ficus* spp. merupakan kelompok tumbuhan yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber enzim protease. Pada getah memiliki kandungan protein, fenolik, kitinase, dan protease. Protease yang terkandung dalam getah memiliki aktivitas yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan bagian tumbuhan yang lain. Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi tumbuhan *Ficus* spp. yang memiliki potensi aktivitas protease tertinggi serta karakterisasi enzim proteasenya. Tumbuhan kelompok *Ficus* yang digunakan yaitu *F. benjamina*, *F. septica*, *F. lyrata* dan *F. elastica*. Proses seleksi dilakukan dengan isolasi getah tumbuhan *Ficus* dari tangkai daun kemudian diuji aktivitas proteasenya dengan menggunakan metode Anson. Tumbuhan yang memiliki aktivitas protease tertinggi kemudian dikarakterisasi temperatur optimum dan pH optimumnya. Temperatur divariasikan yaitu 8°C, 25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, dan 70°C dan pH divariasikan yaitu 3,4,5,6,7, dan 8. Penelitian menunjukkan bahwa dari keempat jenis tumbuhan *Ficus*, yang memiliki aktivitas spesifik protease tertinggi yaitu *F. benjamina* dengan aktivitas 18,721 U/mg, berbeda nyata secara statistik dibandingkan dengan ketiga jenis *Ficus* yang lain. *F. benjamina* bekerja optimum pada temperatur 50°C dan pH 7. *F. benjamina* memiliki aktivitas protease yang tinggi sehingga berpotensi sebagai sumber protease alternatif.

Kata kunci : Enzim protease, *Ficus* spp, *Ficus benjamina*, aktivitas spesifik protease

PENDAHULUAN

Enzim merupakan golongan protein yang banyak terdapat pada sel hidup dan memiliki fungsi sebagai biokatalisator pada reaksi-reaksi biokimia dan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam dunia industri pangan dan non pangan adalah enzim protease (Stanbury and Whitaker, 1984). Enzim protease merupakan jenis enzim yang berfungsi sebagai katalis untuk menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein yang menghasilkan peptida atau asam amino (Suhartono,2000). Enzim ini akan mengkatalisis reaksi – reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Enzim protease memiliki daya katalitik yang spesifik dan efisien terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein (Ratnayani,2015).

Protease merupakan enzim yang memiliki peranan yang penting dalam dunia industri pangan seperti dalam pembuatan deterjen, farmasi, penjernih bir, pengempuk daging, pembuatan keju dan sebagainya. Pemakaian enzim dalam industri terus meningkat sedangkan ketersediaan enzim ini khususnya di Indonesia masih terbatas dan lebih banyak diimpor, selain itu enzim yang diproduksi dari jaringan hewan relatif mahal dan ketersediaannya tergantung dari permintaan hewan dari pasaran karena enzim ini harus diambil dari hewan yang sudah mati, oleh karena itu perlu untuk dicari sumber enzim protease yang lain. Sumber enzim protease berasal dari organisme hidup yaitu hewan, mikroba dan tumbuhan. Sumber enzim protease terbesar yaitu

pada tumbuhan (43,85%), lalu bakteri (18,09%), jamur (15,08%), hewan (11,15%), alga (7,42%) dan pada virus (4,41%) (Mahajan dan Shamkant, 2010).

Enzim protease dari tumbuhan memiliki spesifisitas substrat, stabilitas dan aktivitas yang tinggi dalam berbagai variasi pH, temperatur, ion logam dan pelarut organik. Sehingga hal ini yang membuat protease dari tumbuhan menjadi pilihan yang sangat baik untuk industri makanan, medis, bioteknologi dan farmakologi (Mehrnoosh et al., 2011). Protease dari tanaman pada umumnya terdapat pada tanaman tropis. Enzim ini ditemukan pada pepaya (*Carica papaya*), nanas (*Anana sativa*), artichokes (*Cynera cardunculus*), kedelai (*Soya hispida*) dan ficus (*Ficus carica*) (Uhlig, 1998). Pada beberapa tumbuhan seperti *Ficus*, pepaya, enzim protease diambil dari getah. Enzim protease yang pada getah merupakan enzim ekstraseluler yang dapat dilakukan tanpa pemecahan sel tumbuhan sehingga lebih sederhana dan lebih efisien selain itu berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Oseni dan Ekperigin (2013) bahwa protease yang terdapat pada getah memiliki aktivitas yang relatif tinggi dibandingkan pada bagian tumbuhan yang lain. Pada getah terkandung protease, terpenoid, protein, alkaloid, fenolik, protease inhibitor, kitinase, lektin, asam amino, vitamin, dan karbohidrat (Agrawal and Konno, 2009).

Ficus merupakan tumbuhan yang termasuk famili Moraceae, famili ini merupakan tumbuhan yang

menghasilkan getah. Famili ini terdiri dari 60 genus dan sekitar 1400 spesies, salah satu diantaranya adalah *Ficus*. *Ficus* adalah tumbuhan yang dapat hidup pada dataran rendah dan tinggi diseluruh Indonesia. Tumbuhan ini mengandung berbagai macam senyawa kimia yaitu senyawa steroid dan turunannya, terpenoid, alkaloid, senyawa turunan asetofenon, turunan flavonoid, dan senyawa alifatik rantai panjang sehingga aman untuk digunakan sebagai pangan atau obat (Rajab, 2005). Umumnya tumbuhan kelompok ini berperan sebagai tumbuhan pelindung dan tumbuhan obat dengan jumlah sekitar 800 jenis tumbuhan kayu, pohon, dan semak-semak, tersebar di daerah subtropis dan tropis di seluruh dunia. Hasil penelitian sebelumnya telah menunjukkan adanya aktivitas protease dari getah *Ficus* spp (Williams *et al.*,1968). Yang belum diketahui yaitu karakterisasi suhu dan pH optimum serta purifikasi (pemurnian) pada enzim protease.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk menyeleksi tumbuhan *Ficus* spp yang memiliki potensi aktivitas enzim protease tertinggi serta karakterisasi suhu dan pH enzim proteasnya

METODE

Pengambilan dan Penyiapan Sampel Getah

Getah tumbuhan yang digunakan *Ficus* spp yaitu *ficus benjamina*, *ficus lyrata*, *ficus septica* dan *ficus elastica* yang di ambil dari tangkai daun pada pagi hari pukul 07.00-09.00 WIB dan kemudian ditampung dalam *microtube* yang sudah diberi buffer fosfat pH 7 dingin, setelah itu masukkan ke dalam termos es. Setiap 0,1 gram getah ditambahkan 1 ml buffer fosfat 0,05 M (pH 7,0). disentrifus campuran getah dan buffer pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit hingga terbentuk dua lapisan yaitu supernatan dan pelet. Supernatan digunakan sebagai ekstrak protease kasar. Pada tiap tumbuhan dilakukan berbeda pengenceran. *F. benjamina* dilakukan pengenceran 300x, *F. septica* pengenceran 25x, *F. lyrata* pengenceran 10x dan *F. elastica* tidak dilakukan pengenceran.

Uji Aktivitas Protease

Berdasarkan metode *Sigma's Aldrich Protease Activity Assay* yang telah dimodifikasi digunakan untuk melakukan uji aktivitas protease. Sebanyak 0,5 ml larutan kasein 1% (b/v) di pra-inubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Lalu ditambahkan larutan sampel sebanyak 0,5 ml dan divortex lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit dalam *waterbath*. Setelah 10 menit, ditambahkan TCA 5% sebanyak 1,25 ml untuk menghentikan reaksi hidrolisis, kemudian diamkan selama 10 menit. Sentrifus campuran larutan tersebut pada kecepatan 10.000

rpm selama 10 menit lalu diambil 0,5 ml supernatan hasil sentrifus dan direaksikan dengan 1,25 ml Na₂CO₃ dan 0,25 ml reagen Folin-Ciocalteu dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Larutan ini diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada 660 nm. Kurva standart dibuat dengan konsentrasi tirosin berturut-turut 0 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,015 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml dan 0,05 mg/ml ditambahkan 2,5 ml Na₂CO₃ dan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu. Aktivitas proteolitik enzim dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas Protease U/mg} = \frac{\text{Tyrosine } \mu\text{mol}}{\frac{\text{Waktu inkubasi(menit)}}{\text{Berat getah (mg)}}}$$

Pengujian Protein

Pengujian kadar protein enzim menggunakan metode Bradford. Reagen Bradford dibuat dengan melarutkan 10 mg *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 dalam 5 ml etanol 95% lalu tambahkan 10 ml asam fosfat 85% kemudian diencerkan dengan aquadest sampai 100 ml dan disaring menggunakan kertas saring. Dimasukkan 25 µl larutan sampel kedalam tabung reaksi, tambahkan 1 ml reagen Bradford lalu divortex dan diinkubasi gelap selama 5 menit (reagen ini bersifat asam sehingga memberikan warna biru) lalu diukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standart protein menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi berturut-turut 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml dan 1 mg/ml lalu ditambahkan 1 ml reagen Bradford.

Karakterisasi Suhu dan pH

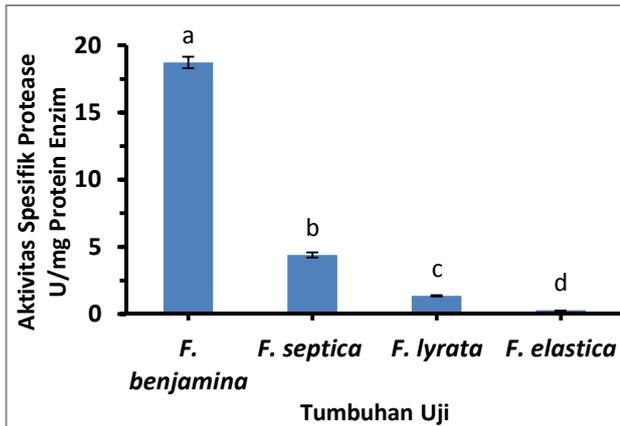
Jenis tumbuhan *Ficus* sp. yang dikarakterisasi yaitu yang memiliki aktivitas spesifik protease tertinggi. Suhu dan pH optimum yang dibutuhkan untuk reaksi enzim dalam mendegradasi substrat dicari dengan mengukur aktivitas enzim pada suhu yang bervariasi yaitu kulkas (8°C), suhu ruang (25°C), 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Dan pH yang bervariasi yaitu 3, 4, 5, 6, 7 dan 8.

Analisis Data

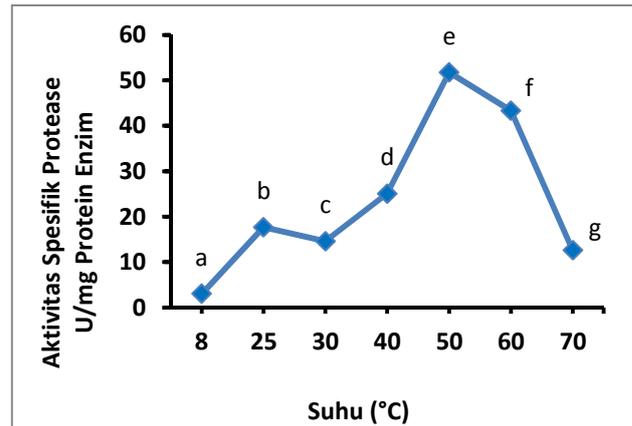
Untuk analisis data digunakan two-way ANOVA selanjutnya menggunakan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk melihat perbedaan pada tiap perlakuan yang digunakan.

Hasil dan Pembahasan

A. Seleksi Aktivitas Protease Tertinggi Pada 4 Jenis Tumbuhan *Ficus* spp.



Gambar 1. Aktivitas spesifik protease dari tumbuhan *Ficus* spp.

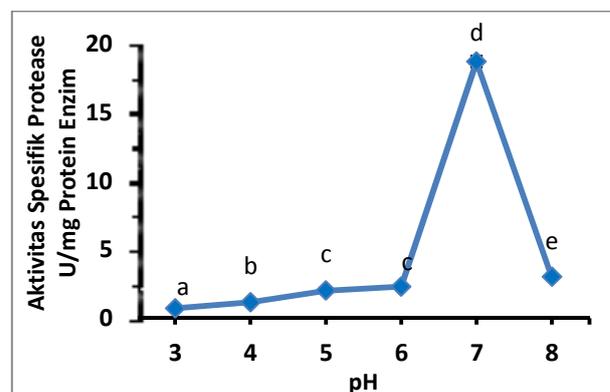


Gambar 2. Perlakuan suhu pada aktivitas spesifik protease dari *Ficus benjamina*

Pada beberapa jenis tumbuhan *Ficus* spp. dilakukan uji aktivitas protease yaitu pada *Ficus benjamina*, *Ficus elastica*, *Ficus septica*, dan *Ficus lyrata*, untuk melihat aktivitas protease tertinggi dari keempat jenis *Ficus*. Aktivitas ini dilihat pada getah tanaman *Ficus* yang mengandung enzim protease direaksikan dengan kasein. Kasein yang sebagai substrat akan dihidrolisis oleh protease menjadi peptida dan asam amino dalam masa inkubasi. Hasil hidrolisis kasein oleh enzim protease diberhentikan dengan menggunakan TCA. Proses pemisahan asam amino dan peptida dengan protein dengan substrat yang belum terhidrolisis dilakukan dengan sentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan merupakan asam amino tirosin hasil hidrolisis oleh protease. Tirosin digunakan sebagai larutan standar uji aktivitas protease untuk mengukur aktivitas dari protease dalam memecahkan protein menjadi asam amino. Hasil pengujian dapat dilihat pada gambar 1. aktivitas spesifik protease yang paling tinggi terdapat pada *Ficus benjamina* (beringin) dengan aktivitas sebesar 18,721 U/mg protein enzim dibandingkan dengan *F. septica*, *F. lyrata* dan *F. elastica*. Secara statistik pada gambar diatas pada tiap tanaman memiliki huruf berbeda yang menunjukkan bahwa tiap jenis *Ficus* dalam uji terdapat beda nyata ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji lebih lanjut yaitu karakterisasi pada *Ficus benjamina* yang memiliki aktivitas tertinggi.

Dalam menentukan karakter enzim protease pada *F. benjamina* dengan menggunakan variasi pH dan suhu untuk mengetahui pH dan suhu optimum.. Pada gambar 2. Variasi suhu yang digunakan yaitu suhu kulkas(8°C), suhu ruang (25°C), 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Suhu optimum dari aktivitas protease yaitu pada 50°C dengan aktivitas sebesar 51,739 U/mg, pada suhu optimum ini terjadi tumbukan pada enzim dan substrat karena meningkatnya energi kinetik yang dapat mempercepat gerak dari substrat dan enzim, sehingga mudah terjadinya pembentukan kompleks enzim-substrat. Jika semakin tinggi suhu maka akan semakin cepat pula laju reaksi akan tetapi jika terlalu tinggi akan dapat merusak struktur dari enzim atau denaturasi enzim, yang mana sebagian protein akan terdenaturasi sehingga keefektifan kerja enzim akan menurun karena terjadi perubahan konformasi sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim. Setiap enzim pada tumbuhan mempunyai suhu optimum tertentu, pada umumnya enzim yang ada pada tumbuhan memiliki suhu optimum 50°C-60°C tetapi sebagian besar enzim sudah terdenaturasi pada suhu 60°C (Noviyanti,2012)). Secara statistik juga pada tiap perlakuan suhu terdapat perbedaan nyata (signifikan $p < 0,05$).

B. Karakterisasi Suhu dan pH pada *Ficus benjamina*



Gambar 3. Perlakuan pH aktivitas spesifik protease dari *Ficus benjamina*

Sedangkan untuk pH optimum *Ficus benjamina* adalah pH 7 dengan aktivitas sebesar 18,721 U/mg. Secara statistik pada tiap perlakuan suhu terdapat perbedaan nyata (signifikan $p < 0,05$), kecuali pada pH 5 dan pH 6 tidak ada beda. pH sangat berpengaruh dalam kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis sebuah reaksi, karena konsentrasi ion hidrogen dapat mempengaruhi aktivitas dari struktur tiga dimensi enzim dalam mengikat substrat. Pada pH optimum ada hubungan antara tingkat ionisasi dan dari asam amino dan dengan sisi aktifnya. Dan jika nilai pH berada dibawah atas diatas pH optimum akan merubah ion substrat dan enzim, yaitu perubahan pada residu asam amino dalam mempertahankan struktur tersier dan kuartener enzim aktif sehingga dapat menurunkan aktivitas dan laju reaksi (Yusriah dan Nengah, 2013)

KESIMPULAN

Dari kelompok tumbuhan *Ficus* didapat *F. benjamina* memiliki aktivitas yang paling tinggi. *F. benjamina* memiliki temperatur optimum adalah 50°C dengan aktivitas 51,739 U/mg protein enzim dan pH optimum adalah 7 dengan aktivitas 18,721 U/mg protein enzim.

SARAN

Dilakukan karakterisasi lanjutan pemurnian enzim, pengujian SDS-PAGE dan lainnya untuk mengetahui secara pasti tingkat kemurnian enzim pada *F. benjamina*

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada dosen pembimbing Dra. Sri Kasmiyati M.Si dan Andreas Sukmana M.Sc yang sudah membantu dalam proses penulisan skripsi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, A. A. and Konno, K., 2009. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivore, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40:311-331
- Mahajan, R. T. dan Shamnkant, B.B., 2010, *Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review*, India J. Pharm., research, 3(9), 2048-2068.
- Mehrnous et al., 2011, *Optimization of the Conditions for Extraction of Serine Protease from Kesinai Plant*

(*Streblus asper*) Leaves Using Response Surface Methodology, *J. Mol.*, 2011, 16: 9245-9260.

- Noviyanti, Tri., Puji A., dan Winda R., 2012. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas enzim Protease Dari Daun Sansakeng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *JKK*, 1(1):31-34
- Oseni, O.A., and Ekperigin, M.M., 2013. *Distribution of proteolytic and milk clotting enzymes in the plant of Sodom apple Calotropis procera (Ait.) R.Br. (Asclepiadaceae)*, *International Journal of Biotechnology Research*, 1 (2) : 024-027
- Rajab, I. 2005. *Isolasi Metabolit Sekunder dari Kulit Batang Ficus deltoidea (Moraceae)*. Tesis. ITB.
- Ratnayani, K., A.A. Ayu S.J., dkk., 2015. Uji Aktivitas Protease Getah Labu Siam dan Talas Serta Perbandingannya Terhadap Getah Pepaya. *Jurnal Kimia*, 9(2):147-152
- Sigma. 2019. *Universal Protease Activity Assay: Casein as a Substrate*. (<https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/protease-activity-assay.html>) diakses tanggal 3 Januari 2019
- Suhartono MT. 2000. *Pemahaman karakteristik biokimia enzim protease dalam mendukung industri berbasis bioteknologi*. [Orasi Ilmiah]. Bogor: IPB.
- Stanbury, P. F & Whitaker, A., 1984, *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- Yusriah dan Nengah D. K. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni POMITS*. 2(1)
- Williams D.C., Valdemiro C. S., and John R.W. 1968. *Proteolytic Activity in the Genus Ficus*. *Journal of Plant Physiol.* Vol.43 :1083-108



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL SAINS DAN ENTREPRENEURSHIP VI TAHUN 2019

"Tumbuh dan Berkembang Bersama untuk Masyarakat 2045: Pergerakan Berbasis Inovasi dan Keberlanjutan di Era Revolusi Industri 4.0 dan Entrepreneurship"

Semarang, 23 Agustus 2019

ISBN : 978-602-99975-3-8