

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

Indy widyaningrum¹, Sri Kasmiyati², Andreas sukmana³

^{1,2,3}Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana

Email : Indywidya6@gmail.com

Abstrak - Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim protease memiliki peranan penting yang banyak digunakan dalam bidang industri seperti pembuatan detergen, pengempukan daging, pembuatan keju dan sebagainya. Kebutuhan enzim yang terus meningkat sedangkan ketersediaannya terbatas maka perlu adanya alternatif lainnya. Protease pada getah lebih sederhana dan efisien. Protease getah termasuk enzim ekstraseluler yang mengandung fenolik, kitinase dan protease. Protease yang terkandung pada getah memiliki aktivitas yang relatif lebih tinggi dibandingkan bagian tumbuhan lainnya. Sejumlah spesies *Arthocarpus* spp sudah dibuktikan menghasilkan senyawa protease sebagai sumber protease alternatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seleksi tumbuhan *Arthocarpus* spp dengan uji aktivitas enzim protease yang paling maksimal, mengetahui pH dan suhu optimum proteasenya dengan variasi pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan variasi suhu 8°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C. Pengukuran kandungan protein dilakukan menggunakan metode Bradford, uji aktivitas enzim protease dilakukan menggunakan metode Anson, dan karakterisasi pH dan suhu optimum proteasenya. Hasil uji aktivitas enzim protease pada jenis getah dari kelompok tanaman *Arthocarpus* spp menunjukkan bahwa getah *Arthocarpus heterophyllus* mempunyai aktivitas yang jauh lebih tinggi dari pada jenis tumbuhan *Arthocarpus camansi* (kluwih) dan *Arthocarpus altilis* (sukun) yaitu 2,044 mg/ml sedangkan suhu dan pH optimum yang sesuai untuk jenis getah tumbuhan *Arthocarpus heterophyllus* adalah pada suhu 40°C dan pada pH 7. Berdasarkan data tersebut disimpulkan bahwa getah dari tumbuhan *Arthocarpus heterophyllus* memungkinkan dapat berpotensi sebagai sumber protease alternatif.

Kata kunci : Enzim protease, *Arthocarpus* spp, *Arthocarpus heterophyllus*, aktivitas enzim protease, karakterisasi pH dan suhu.

PENDAHULUAN

Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease di antaranya ialah makanan, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, dan limbah (Moon and Parulekar, 1993). Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim protease berperan sebagai degradasi protein, suatu proses pemecahan protein dari ikatan-ikatan yang terdapat di dalamnya. Degradasi ini dapat terjadi akibat adanya pemanasan atau kontaminasi dengan zat kimia. Protease dibagi menjadi protease serin, protease tiol, protease aspartat dan protease logam. Industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Enzim protease dapat diproduksi dari jaringan-jaringan hidup yang meliputi, mikroorganisme, hewan maupun tanaman antara lain getah pepaya, melon, daun chaya, biji padi dan lain-lain. Namun demikian untuk memproduksi enzim protease dari beberapa sumber tersebut masih menghadapi banyak kendala. Meskipun mikroba dikenal luas sebagai sumber enzim protease, namun untuk tujuan - tujuan tertentu, Enzim protease dari

tanaman masih mempunyai peranan yang sangat besar yang belum sepenuhnya dapat digantikan oleh enzim mikroba. Enzim yang diproduksi dari jaringan hewan relatif mahal dan ketersediaannya tergantung pada permintaan (Sudarmadji dkk, 1984).

Sumber enzim protease diketahui berasal dari hewan, mikroba, dan tanaman. Tanaman merupakan sumber enzim protease terbesar (43,85%) diikuti oleh bakteri (18,09%), jamur (15,08%), hewan (11,15%), alga (7,42%) dan virus (4,41%) (Mahajan dan Shamkant, 2010). Enzim protease dari tanaman memiliki spesifisitas substrat yang luas, aktivitas dan stabilitas yang tinggi pada berbagai variasi temperatur, pH, ion logam, inhibitor serta pelarut organik. Hal ini membuat protease dari tanaman merupakan pilihan yang sangat baik untuk industri makanan, medis, bioteknologi dan farmakologi (Mahajan, 2010)

Getah dari tanaman yang memiliki kandungan enzim protease mempunyai beberapa kelebihan antara lain lebih mudah didapat dengan harga murah contohnya enzim papain dan bromelin, tersedia dalam jumlah yang banyak dan tidak perlu murni. Di sisi yang lain, ketersediaan enzim protease belum mencukupi kebutuhan, sementara pemakaian protease bagi

industri pangan cenderung meningkat, oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease yang lain. Salah satu contohnya pada tumbuhan adalah biduri (*C. gigantea*) yang merupakan jenis tumbuhan semak liar di daerah tropis termasuk Indonesia. Menurut (Witono, Y., 2002) tanaman ini genus yang sama memiliki kemiripan alam komposisi kimianya. banyak tumbuh pada lahan kering dan sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan bahkan pada beberapa daerah dianggap sebagai gulma. Tanaman tersebut dapat digunakan sebagai sumber enzim protease (Eskin, 1990). Menurut paradigma Chemotaksonomy, tanaman dari genus yang sama memiliki kemiripan dalam komposisi kimianya (Bhattacharyya L, Rohrer JS. 2012). Tumbuhan yang biasanya terdapat enzim protease tersebut adalah pepaya (papain), nanas (bromelain) dan getah tanaman biduri, (karatinase), dan ada juga dari jenis Tanaman *Artocarpus* spp yang sudah dibuktikan penelitiannya mengandung enzim protease yaitu pada tanaman nangka *Artocarpus heterophyllus*.

Tumbuhan *Artocarpus* tumbuhan yang masuk pada Famili Moraceae merupakan tumbuhan yang berbatang, berkayu, dan menghasilkan getah. Beberapa spesies yang termasuk dalam Genus *Artocarpus* antara lain cempedak (*A. champeden*), keluwih (*A. altilis*), benda (*A. elastica*), nangka (*Artocarpus heterophyllus*). Diketahui bahwa sejumlah spesies *Artocarpus* banyak menghasilkan senyawa golongan terpenoid, flavonoid, dan stilbenoid. Keunikan struktur metabolit sekunder pada *Artocarpus* menghasilkan efek fisiologis yang luas. (Hakim, 2011) memaparkan senyawa terpenoid dengan kerangka sikloarten berhasil disolasi dari tumbuhan *Artocarpus* antara lain, sikoartenol yang telah berhasil diperoleh dari *A. champeden* (Achmad et al., 1996). Penggunaan enzim protease dari getah tumbuhan jenis *Artocarpus* spp merupakan sumber protease alternatif yang mempunyai faktor ekonomis dan pemanfaatan dari getah tanaman jenis *Artocarpus* itu sendiri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seleksi tumbuhan *Artocarpus* spp dengan uji aktivitas enzim protease yang paling maksimal, mengetahui pH dan suhu optimum proteasenya dengan variasi pH

BAHAN DAN METODE

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga. Alat dan bahan yang digunakan meliputi alat pisau, box es, timbangan analitik, pengaduk, lemari es, cawan petri, oven, desikator, tabung reaksi, *mikrotube*, *waterbath*, spektrofotometer, kuvet, *sentrifuge*, mikropipet, *bluetipe*, *Beaker glass*, pipet volume, pillius, aluminium foil, kapas. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu getah nangka, getah kluwih, getah sukun, buffer fosfat pH 7, kasein, TCA, Na₂CO₃, tyrosin, CBB, etanol 95%, asam fosfat, aquadest, folin dan BSA.

Metode pengambilan getah

Getah tanaman nangka, sukun dan kluwih diambil pada pagi hari diperoleh dengan melukai bagian tanaman muda dengan menggunakan pisau *stainless steel*, ditampung pada mikro tube yang berisi 0,5ml buffer fosfat pH 7, masukkan pada termos es.

Pengukuran konsentrasi protein

Bradford reagent : 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dalam 50 ml etanol 95% dan ditambahkan 100 ml (w/v) Phosphoric acid dan tambahkan aquades sampai volume 1 liter. Saring larutan dengan kertas whatman sebelum digunakan. Masukkan sampel protein sebanyak 20 uL ke dalam tabung mikrosentrifugasi dilakukan 3 kali pengenceran, tambahkan 1ml reagent Bradford kemudian inkubasi gelap selama 5 menit ukur OD pada panjang gelombang 595 nm. Hitung kandungan protein sampel menggunakan grafik standar BSA.

Kurva standart yang digunakan pada konsentrasi 0 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml.

Pengukuran aktivitas enzim protease

Timbang getah pada tiap tumbuhan dan masukkan buffer fosfat. Pra-inkubasi larutan kasein (2% kasein dalam buffer fosfat pH 7) pada 37°C selama 5 menit. Dimasukkan enzim sebanyak 0,5ml kemudian Inkubasi pada suhu 37°C dalam *waterbath* Diletakkan dalam nampan berisi Es, Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,25 ml asam trikloroasetat/TCA (5%), Inkubasi selama 10 menit, Sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit, Supernatan diambil dan tambahkan 1,25ml Na₂CO₃ dan 0,5 reagen Folin-Ciocalteu, Inkubasi larutan

pada suhu 37°C dan dishaker selama 30 menit Absorbansi pada panjang gelombang 660 nm.

Kurva standart dibuat dengan konsentrasi 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, 0,05 mg/ml, 0,05 mg/ml ditambahkan dengan 2,5 ml Na₂CO₃ dan 0,5ml reagen folin.

Karakterisasi Pengaruh Variasi pH dan Suhu terhadap Aktivitas dan Stabilitas Enzim protease

pH

Proses pengambilan getah dilakukan dengan menambahkan buffer fosfat 0,05M masing-masing untuk buffer pH 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 d. Timbang getah pada tiap tumbuhan dan masukkan buffer fosfat. Pra-inkubasi larutan kasein (2% kasein dalam buffer fosfat pH 3, 4, 5, 6, 7 dan 8) pada 37°C selama 5 menit. Dimasukkan enzim sebanyak 0,5ml kemudian Inkubasi pada suhu 37°C dalam waterbath Diletakkan dalam nampan berisi Es, Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,25 ml asam trikloroasetat/TCA (5%), Inkubasi selama 10 menit, Sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit, Supernatan diambil dan tambahkan 1,25ml Na₂CO₃ dan 0,5 reagen Folin-Ciocalteau, Inkubasi larutan pada suhu 37°C dan dishaker selama 30 menit Absorbansi pada panjang gelombang 660 nm.

Suhu

Proses pengambilan getah dilakukan dengan menambahkan buffer fosfat pH 7 . Timbang getah pada tiap tumbuhan dan masukkan buffer fosfat. Pra-inkubasi larutan kasein (2% kasein dalam buffer fosfat pH 7) pada suhu 37°C selama 5 menit. Dimasukkan enzim sebanyak 0,5ml kemudian Inkubasi pada suhu 8 °C, 25 °C, 30°C, 40 °C , 50 °C , 60°C , 70°C dalam waterbath. Kemudian diletakkan dalam nampan berisi Es, Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,25 ml asam trikloroasetat/TCA (5%), Inkubasi selama 10 menit, Sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit, Supernatan diambil dan tambahkan 1,25ml Na₂CO₃ dan 0,5 reagen Folin-Ciocalteau, Inkubasi larutan

pada suhu 37°C dan dishaker selama 30 menit Absorbansi pada panjang gelombang 660 nm.

Aktivitas proteolitik enzim dihitung dengan rumus:

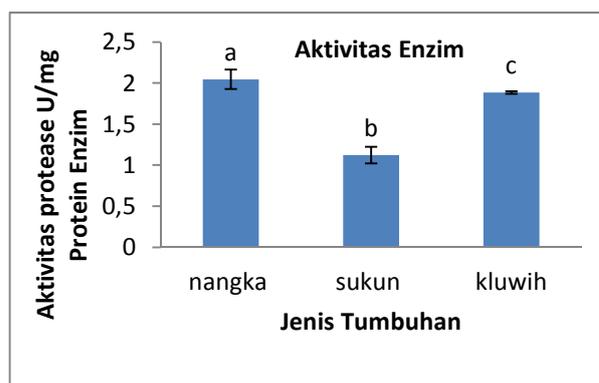
$$\text{Aktivitas protease U/mg} = \frac{\text{Tirosyn } \mu\text{mol}}{\frac{\text{Waktu inkubasi (menit)}}{\text{Berat getah}}}$$

Analisis data

Data hasil dihitung menggunakan metode ANNOVA dan LSD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Seleksi Tumbuhan *Arthocarpus* spp.



Gambar 1. Grafik seleksi tumbuhan dengan menentukan jumlah aktivitas enzim paling tinggi.

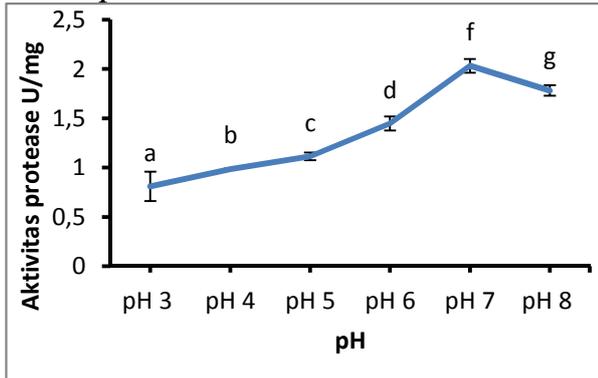
Dari data Gambar 1 hasil uji aktivitas enzim protease pada jenis getah dari kelompok tanaman *Arthocarpus* spp dengan menggunakan pelarut buffer pospat 0.05 M pH 7. Menurut Whitaker, penambahan buffer pada proses ekstraksi enzim intraseluler dari jaringan tanaman ini yaitu untuk menjaga pH tetap netral. Ativitas enzim dari jenis tumbuhan *Arthocarpus* spp. menunjukkan bahwa getah *Arthocarpus heterophyllus* (nangka) mempunyai aktivitas yang jauh lebih tinggi dari pada jenis tumbuhan *Arthocarpus camansi* (kluwih) dan *Arthocarpus altilis* (sukun) yaitu sebesar 2,044 U/ml.

Pada penelitian ini pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan mengadopsi metode Enggel (2004). Prinsip kerja metode ini adalah pengukuran asam amino tirosin yang terhidrolisis dari substratnya.

Enzim akan menghidrolisis substrat kasein dengan bantuan air menjadi asam amino dan peptida. Reaksi dihentikan dengan menambahkan *Trichloroacetic acid* (TCA). Filtrat dan endapan yang terbentuk dipisahkan dengan cara sentrifugasi.

2. Karakterisasi Suhu dan pH pada Aktivitas Enzim protease.

a. pH



Gambar 2. Grafik perlakuan uji aktivitas protease dengan menentukan pH optimum tumbuhan *Artobocarpus heterophyllus*.

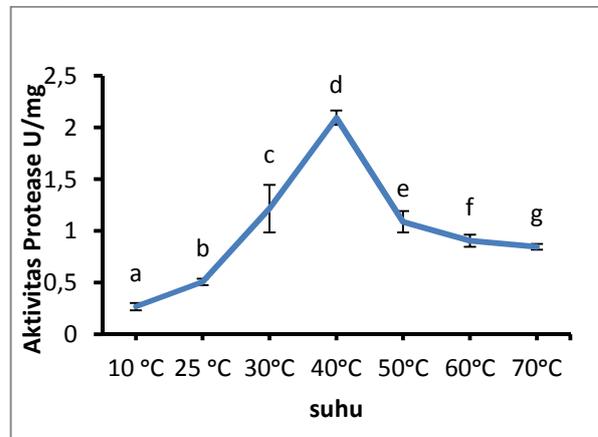
Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease dari getah tumbuhan nangka memiliki pH optimum 7. menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease dari getah tumbuhan nangka memiliki pH optimum sebesar 7. Saat pH optimum, enzim mempunyai konformasi sisi aktif yang sesuai dengan substrat kasein yang menyebabkan terbentuknya kompleks enzim substrat yang maksimal, karena gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan, sehingga menghasilkan produk yang maksimal juga.

Enzim protease dari getah nangka memiliki kestabilan pada pH 7 dimana aktivitas residu yang dihasilkan adalah 4,06 U/mg . Protease pada pH di atas dan dibawah 7 kestabilannya menurun, dibuktikan Saat pH optimum, enzim mempunyai konformasi sisi aktif yang sesuai dengan substrat kasein yang menyebabkan terbentuknya kompleks enzim substrat yang maksimal, karena gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan, sehingga menghasilkan produk yang maksimal juga.

Pada pH 7 merupakan pH optimum yang sesuai untuk perlakuan menggunakan enzim dari jenis

tanaman *Artobocarpus* dengan menggunakan metode folin dan bradford pH 7 memiliki aktivitas yang paling optimal dari pada pH yang digunakan. Pada pH ini diharapkan memberikan aktivitas yang tinggi guna mengetahui pH optimumnya untuk masing-masing masing perlakuan sudah mulai terlihat, Konsentrasi enzim yang rendah akan mengakibatkan aktivitas enzim tidak optimal untuk terjadinya reaksi penggumpalan, sebaliknya bila konsentrasi enzim tinggi kemungkinan substrat yang tersedia tidak memadai dengan kebutuhan aktivitas enzim yang ada.

b. Suhu



Gambar 3. Grafik perlakuan uji aktivitas protease dengan menentukan suhu optimum tumbuhan *Artobocarpus heterophyllus*.

Dari gambar 2 dari suhu yang bervariasi yaitu 8 °C, 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C menunjukan bahwa suhu yang sesuai adalah suhu 40°C yaitu memiliki aktivitas sebesar 2,09 U/mg. Suhu yang digunakan harus sesuai karena penurunan aktivitas enzim terjadi karena enzim mulai mengalami kerusakan gugus aktif. Setelah melewati suhu optimum, aktivitas enzim umumnya mengalami penurunan. Menurut Muchtadi *et al.* (1992), enzim memiliki ikatan-ikatan kimia berupa ikatan hidrogen, ionik maupun van der waals, dan interaksi hidrofobik yang pada keadaan normal memelihara struktur enzim. Pada suhu tinggi, ikatan ini akan putus sehingga protein enzim akan terbuka (terjadi denaturasi) sehingga menyebabkan sisi aktif enzim berubah konformasi dan akan mengurangi aktivitas katalitiknya. Rendahnya aktivitas enzim pada temperatur yang lain karena temperatur tersebut dibandingkan temperatur optimum, disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia.

KESIMPULAN

Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa seleksi dari beberapa jenis tumbuhan *Arthocarpus* spp. *Arthocarpus heteropillus* mempunyai hasil yang lebih tinggi dari *Arthocarpus camansi* (kluwih) dan *Arthocarpus altilis* (sukun) yaitu 2,044 mg/ml.

SARAN

Dilakukannya penelitian lebih mendalam seperti uji menggunakan metode SDS- PAGE guna mengetahui ikatan protein yang terandung didalamnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

Achmad, S. A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Materi 4. Ilmu Kimia Flavonoid. Karunia. Universitas Terbuka Jakarta.

Bhattacharyya L, Rohrer JS. 2012. *Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products*. New Jersey: John Wiley & Sons.

Eskin, N.A.M., 1990, *Biochemistry of Food*. Second Edition. Academic Press. Inc., New York.

Hakim, L. 2011. *Plant Trees Species For Restoration Program In Tanupani, Bromo Tengger Semeru National Park Indonesia*. Biodiversity Journal, 2013, 4 (3): 387-394.

Kosim, M., Surya, R.P., 2010, *Pengaruh Subu pada Protease dari Bacillus subtilis*, Fakultas MIPA ITS, Surabaya.

Mahajan RT dan Shamnkant BB. 2010. *Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review*. India J. Pharm. Research 3(9) : 2048-2068.

Moon Sh And Sj Parulekar. 1993. Some Observation On Protease Producing In Continuous spention Cultures Of *Bacillus Firmus*. *Biotechnology And Bioengineering* 41, 43-54.

Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi, 1984 *Prosedur Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty, Yogyakarta.

Witono, Y., 2002, *Pemanfaatan Enzim Protease Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan*. J. Sains dan Teknologi, 1- 3



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL SAINS DAN ENTREPRENEURSHIP VI TAHUN 2019
"Torch and Stars dalam Fasilitasi untuk Meningkatkan R&D Perekonomian Indonesia Berkelanjutan di Era Revolusi Industri 4.0 dan Entrepreneurship"

Semarang, 21 Agustus 2019