

Aktivitas Proteolitik Buah Mangga Bacang (*Mangifera Foetida*) Dan Umbi Keladi Tikus (*Typhonium Divaricatum*) Dibandingkan Dengan Proteolitik Buah Nanas (*Ananas Comosus*)

¹Ni Luh Made Noviana Dewi, ¹A. A. I. A. Mayun Laksmiwati, ¹Ni Komang Ariati

¹Prodi Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali, Indonesia

*Email : niluhmade_novianadewi@yahoo.co.id

ABSTRAK

Buah nanas (*Ananas Comosus*) mengandung enzim bromelin yang dapat menimbulkan rasa gatal dan menyebabkan iritasi. Beberapa tumbuhan lain yang juga dapat menyebabkan rasa gatal dan mengakibatkan iritasi seperti mangga bacang (*Mangifera Foetida*), dan keladi tikus (*Typhonium Divaricatum*). Adanya rasa gatal kemungkinan besar disebabkan dengan adanya enzim proteolitik. Tujuan penelitian ini adalah uji aktivitas enzim proteolitik pada buah mangga bacang, dan umbi keladi tikus dibandingkan dengan buah nanas. Uji aktivitas proteolitik dilakukan secara spektrofotometri dengan metode Enggel. Hasil pengujian aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa umbi keladi tikus dan buah mangga bacang memiliki aktivitas proteolitik, walaupun nilai aktivitasnya lebih rendah daripada buah nanas. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh aktivitas proteolitik dari buah mangga bacang, dan umbi keladi tikus berturut - turut yaitu $0,199 \pm 0,015$ U/mL dan $0,184 \pm 0,021$ U/mL. Perbandingan aktivitas proteolitik buah mangga bacang dan umbi keladi tikus terhadap buah nanas berturut – turut 1 : 2 dan 2 : 5.

Kata Kunci: buah nanas, mangga bacang, keladi tikus, proteolitik

ABSTRACT

Pineapple fruit (*Ananas Comosus*) is known to contain bromelin enzyme that can cause itching and irritation. Some plants that also can cause itching and irritation namely mango bacang (*Mangifera Foetida*) and keladi tikus (*Typhonium Divaricatum*). The presence of itching is most likely due to the presence of proteolytic enzyme. The aims of this study was to test the activity of proteolytic enzyme in mango bacang and keladi tikus compared to proteolytic that of in pineapple fruit. Proteolytic activity test was done by spectrophotometry based enggel's method. The results found that mango bacang and keladi tikus had proteolytic activities, although the values of their activities were lower than that of pineapple fruit. The values of proteolytic activities of mango bacang and keladi tikus were 0.199 ± 0.015 U/mL and 0.184 ± 0.021 U/mL respectively. Comparison of proteolytic activity of mango bacang and keladi tikus against of that pineapple were 1 : 2 and 2 : 5, respectively.

Keywords: pineapple fruit, mango bacang, keladi tikus, proteolytic

PENDAHULUAN

Enzim adalah suatu unit protein fungsional yang berfungsi sebagai biokatalisator pada reaksi kimia sehingga enzim mengkatalisis reaksi-reaksi dalam metabolisme sel dalam tubuh. Pengaruh enzim terhadap substratnya dapat mempercepat reaksi kimia tanpa produk samping (Lehninger, 1982). Penggunaan enzim

sangatlah menarik kaitannya dengan pengembangan industri, pertanian, produk pangan maupun farmasi. Akan tetapi Indonesia hingga saat ini masih mengimpor enzim. Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber alam hayati oleh karena itu, sangatlah penting untuk mengembangkan teknik pengolahan enzim dari sumber alam. Enzim dari bahan alam memiliki sifat spesifik

dan tidak beracun sehingga dapat mengurangi dampak pencemaran. Kesadaran masyarakat masih kurang pada penggunaan bahan alam dalam penentuan aktivitas enzim, yang dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi yang ramah lingkungan.

Proteolitik adalah suatu enzim yang mempunyai kemampuan mengkatalisis penguraian ikatan-ikatan peptide molekul protein sehingga dapat membentuk rantai peptida yang pendek dan asam amino bebas. Tanaman merupakan sumber enzim proteolitik terbesar (43,85%) bakteri (18,09%), jamur (15,08%), hewan (11,15%), alga (7,42%) dan virus ((4,41%). Enzim proteolitik dari tanaman memiliki spesifisitas substrat yang luas, aktivitas, kestabilan dan karakterisasi pada berbagai variasi seperti temperatur, pH, ion logam, inhibitor serta pelarut organik. (Poedjadi,1994). Enzim proteolitik yang berasal dari tanaman, seperti pepaya ada (enzim papain), nanas (enzim bromelin) dan kiwi (enzim actinidin) (Poedjadi,1994)

Varietas tumbuhan yang sering digunakan dalam penelitian tentang enzim adalah nanas. Pada buah nanas ditemukan enzim proteolitik berupa bromelin yang merupakan endopeptidase. Enzim bromelin mempunyai gugus sulfhidril pada pusat aktifnya. Aktivitas optimumnya ditunjukkan pada pH 7,5 dan suhu 70°C dengan waktu inkubasi selama 40 menit. Enzim ini biasanya ditemukan lebih banyak di bagian daging buah nanas yang termasuk dalam family bromeliaceae (Hui,1992).

Saat ini belum banyak yang membandingkan buah nanas yang mengandung enzim proteolitik dengan tanaman lain yang kemungkinan mengandung enzim proteolitik. Buah nanas menimbulkan gatal yang dapat menyebabkan iritasi karena keberadaan enzim proteolitik. Adapun beberapa tumbuhan yang dapat menimbulkan gatal seperti mangga bacang, dan keladi tikus. (Hui,1992). Adanya rasa gatal kemungkinan besar disebabkan karena adanya enzim proteolitik sehingga perlu dilakukan penelitian terhadap uji aktivitas enzim proteolitik dari beberapa jenis tanaman seperti buah mangga bacang dan keladi tikus yang selanjutnya dibandingkan dengan enzim dari buah nanas.

Penentuan aktivitas enzim proteolitik dilakukan untuk mendapatkan informasi awal tentang mangga bacang, dan keladi tikus. Aktivitas proteolitik (U/ml) dinyatakan dalam unit aktivitas, yaitu satu unit (U) dinyatakan sebagai jumlah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis kasein dan μmol tirosin setiap menit pada kondisi percobaan.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah buah mangga bacang, umbi keladi tikus, dan buah nanas. Bahan – bahan kimia yang digunakan; akuades; tirosin; kasein 2% ; K_2HPO_4 0.05 M; KH_2PO_4 0.05 M; asam trikloroasetat (TCA) 0.11 M; natrium karbonat 0,5 M; dan reagen ninhidrin.

Peralatan

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian adalah pisau *stainless steel*, botol semprot, tabung sentrifugasi, tabung reaksi, alat sentrifugasi K3 series, pipet mikro, alat *Vortex maxi mix II*, blender, lemari pendingin, *waterbath*, neraca analitik, alat inkubasi memmert, dan *spektrofotometer Genesys 10S UV-Vis*.

Preparasi sampel

Buah nanas, buah mangga bacang, umbi keladi tikus diambil dengan cara yang sesuai dengan karakteristik tanaman tersebut. Daging buah nanas bagian dagingnya diperoleh dari mengupas kulit buah yang sudah matang dengan pisau *stainless steel* kemudian ditampung dalam cawan. Sedangkan untuk keladi tikus diperoleh dengan membelahnya menggunakan pisau *stainless steel* kemudian diambil bagian dagingnya. Masing-masing ditampung dalam cawan yang berbeda. Pada mangga bacang, diperoleh dengan mengupas bagian kulit mangga dengan pisau *stainless steel* kemudian dagingnya diambil dan ditampung dalam cawan.

Ekstrak proteolitik kasar

Masing – masing sampel dibersihkan atau dicuci kemudian diparut kemudian 1 g hasil parutan dari masing-masing sampel dihomogenisasi dengan melarutkan dalam 4

ml bufer fosfat 0.05 M pH 7 sedikit demi sedikit. Larutan yang diperoleh disentrifugasi pada 7000 rpm selama 15 menit, kemudian akan terpisah menjadi 2 fase yaitu supernatan dan endapannya (residu). Selanjutnya supernatan dipisahkan dari endapannya. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar proteolitik. Selanjutnya disimpan pada suhu 4°C (Kuswanto, 1988).

Penentuan aktivitas ekstrak proteolitik kasar

Sebanyak 2 ml larutan kasein 2% (b/v) dimasukkan ke dalam tabung reaksi A dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah 10 menit 2,5 ml larutan TCA 0,11 M ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan divortex. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 ml ekstrak proteolitik kasar dan didiamkan selama 5 menit. Campuran selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit hingga terbentuk dua fase. Lapisan supernatan yang diperoleh selanjutnya ditentukan kadar tirosinnya secara kolorimetri.

Metode penentuan aktivitas enzim mengikuti metode yang dimodifikasi oleh (Enggel et al, 2004). Sebanyak 2 ml larutan kasein 2% (b/v) di pra-inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit dalam tabung B. Setelah 5 menit, sebanyak 1 ml ekstrak proteolitik kasar ditambahkan, lalu campuran ini divortex dan inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Pada akhir inkubasi reaksi hidrolisis dihentikan dengan menambahkan 2,5 ml larutan TCA 0,11 M. Setelah itu campuran divortex dan didiamkan selama 5 menit. Campuran selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit hingga terbentuk dua fase yaitu endapan dan supernatan. Supernatan yang diperoleh dari tabung 1 ditentukan kadar tirosinnya secara kolorimetri.

Penentuan kadar tirosin secara kolorimetri dilakukan dengan menggunakan reagen ninhidrin. Masing – masing sebanyak 1 ml supernatan yang didapatkan dari tabung A dan tabung B ditempatkan dalam tabung baru yang berbeda. Setelah itu, ke dalam masing – masing tabung ditambahkan 1 ml Na₂CO₃ 0.5 M lalu divortex serta didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan 1 ml reagen ninhidrin lalu campuran dibiarkan

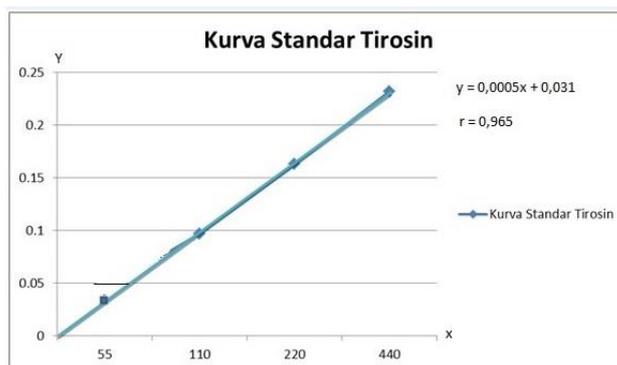
selama 30 menit. Setelah 30 menit, larutan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Konsentrasi tirosin hasil hidrolisis yang terdapat pada tabung A dan tabung B dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier kurva standar tirosin. Konsentrasi tirosin dalam sampel yang telah didapatkan selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar tirosin (µmol). Kadar tirosin hasil hidrolisis digunakan untuk menentukan aktivitas proteolitik sampel tanaman.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Proteolitik Kasar

Sebelum melakukan uji aktivitas ekstrak proteolitik kasar, dilakukan pembuatan kurva standar tirosin. Tirosin sebagai larutan standar untuk mengukur aktivitas proteolitik dalam memecah protein menjadi asam amino. Konsentrasi standar divariasikan dari 55; 110; 220; dan 440 µM kemudian diukur absorbansinya dan dibuat kurva standar. Dari kurva standar diperoleh persamaan regresi linier kurva standar tirosin $y = 0,0005x + 0,031$ dengan koefisien regresi linier $r = 0,965$ (Gambar 1). Persamaan linier tirosin akan digunakan sebagai kurva standar untuk diinterplotasikan dengan nilai absorbansi yang diperoleh. Dalam penentuan ekstraksi proteolitik kasar cara yang dilakukan adalah dengan menggunakan ekstraksi. Ekstraksi adalah suatu proses dimana terjadi pemisahan antara satu atau beberapa zat dan dapat larut dari suatu kesatuan yang tidak bisa larut dengan menggunakan bantuan bahan pelarut.

Tujuan ekstraksi adalah untuk mengeluarkan enzim dari dalam sel – sel jaringan. Dalam ekstraksi pada penelitian ini digunakan masing-masing 1 gr sampel yang telah dihaluskan yaitu mangga bacang, keladi tikus dan buah nanas. Masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan 4 ml buffer fosfat lalu disentrifugasi pada 7000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi diperoleh 2 fase yaitu supernatan dan endapan atau residu (Tabel 1). Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari residunya yang disebut dengan istilah supernatant ekstrak kasar.



Gambar 1. Kurva Standar Tirosin

Tabel 1. Ciri Fisik Ekstrak Proteolitik Kasar Sampel

Ekstrak Sampel	Pengamatan
Ekstrak Mangga Bacang	Supernatan : Warna keruh dan tidak berbuih Endapan : Tekstur padat dan tidak kental
Ekstrak Keladi Tikus	Supernatan : Warna sedikit Keruh dan tidak berbuih Endapan : Tekstur padat dan tidak kental
Ekstrak Buah Nanas	Supernatan : Warna Keruh dan tidak berbuih Endapan : Tekstur padat dan tidak kental

Pengujian Aktivitas Ekstrak Proteolitik Kasar

Uji aktivitas yang dilakukan sesuai dengan metode *Enggel et al* (2004). Supernatan ekstrak kasar masing – masing sampel sebanyak 1 mL diuji aktivitas proteolitiknya dengan menggunakan 2 mL kasein 2% sebagai substrat. Reaksi antara substrat dengan ekstrak proteolitik sampel dilakukan selama 10 menit pada suhu 37⁰ C dalam inkubator dan pH 7. Setelah 10 menit, reaksi hidrolisis dihentikan dengan penambahan 2,5 mL TCA (asam trikloroasetat) 0,11 M.

TCA dapat menghentikan aktivitas proteolitik dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis karena asam trikloroasetat mampu mendenaturasi molekul protein. Oleh karena proteolitik merupakan molekul protein, maka proteolitik akan terdenaturasi dan kehilangan kemampuannya untuk mengkatalisa reaksi hidrolisis. Setelah reaksi hidrolisis dihentikan, asam amino yang dihasilkan selama kurun waktu 10 menit dapat ditentukan kadarnya dengan mengurangi jumlah asam amino setelah inkubasi dengan jumlah asam amino sebelum inkubasi. Hal ini disebabkan karena asam amino bebas secara alami merupakan

salah satu komponen penyusun pada sampel, sehingga dengan mengurangi jumlah asam amino setelah inkubasi dengan asam amino sebelum inkubasi, maka didapatkan jumlah asam amino hasil hidrolisis (sebagai produk aktivitas proteolitik). Jumlah asam amino (tirosin) hasil hidrolisis digunakan untuk menentukan aktivitas sampel. Semakin banyak tirosin hasil hidrolisis maka aktivitas proteolitik semakin besar atau semakin banyak pula molekul protein yang dipecah menjadi monomer penyusunnya.

Hasil uji aktivitas proteolitik buah nanas menunjukkan bahwa buah nanas memiliki aktivitas proteolitik sebesar 2.486 Unit/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik yang ada pada buah nanas disebabkan karena nanas mengandung bromelain yang merupakan enzim proteolitik–campuran protease sistein yang dapat menghidrolisis protein. Hasil uji aktivitas keladi tikus dan mangga bacang berturut – turut sebesar 0,184 Unit/mL dan 0,199 Unit/mL. Perbedaan nilai aktivitas proteolitik pada buah nanas, keladi tikus dan mangga bacang yang dilakukan pada penelitian ini, disebabkan perbedaan kadar proteolitik (sifat kinetik) masing masing proteolitik sebagai

katalis, sifat fisik (kondisi optimum) ataupun jenis proteolitik yang terkandung pada tanaman. Setiap jenis enzim memiliki sifat yang spesifik dan sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungannya. Ketidaksesuaian kondisi lingkungan dapat membuat turunnya aktivitas enzim, inaktifnya enzim dan rusaknya struktur enzim. Kondisi lingkungan seperti suhu dan pH dapat memberikan pengaruh yang berbeda bagi setiap jenis proteolitik.

Hasil pengujian aktivitas setiap milliliter sampel tanaman buah nenas, keladi tikus dan mangga bacang ditunjukkan pada Tabel 2.

Perbandingan Aktivitas Proteolitik

Perbandingan aktivitas proteolitik sampel tanaman keladi tikus, dan mangga bacang terhadap buah nenas ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 2 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik Setiap Mililiter Sampel Tanaman

Jenis Sampel	Pengulangan	A.P permililiter Sampel (U/mL)	Rata – rata A.P Permililiter Sampel (U/mL)	SD
Mangga Bacang	1	0,270	0,199	± 0,015
	2	0,249		
	3	0,279		
Keladi Tikus	1	0,218	0,184	± 0,021
	2	0,184		
	3	0,181		
Buah Nanas	1	3.150	2,486	± 0,050
	2	3.205		
	3	3.104		

Keterangan: A.P = Aktivitas Proteolitik

Tabel 3. Perbandingan Aktivitas Proteolitik Sampel Terhadap Buah Nanas

Aktivitas Proteolitik	Rasio Perbandingan Aktivitas Proteolitik
Keladi Tikus : Buah Nanas	2 : 5
Mangga Bacang : Buah Nanas	1 : 2

Perbandingan aktivitas proteolitik mangga bacang dan keladi tikus terhadap buah nenas bila diurutkan dari perbandingan aktivitas sampel tanaman terhadap buah nenas dari yang tertinggi ke terendah berturut – turut yaitu Mangga bacang dan Keladi Tikus. Hasil perbandingan aktivitas mangga bacang terhadap aktivitas buah nenas 1: 2 menunjukkan bahwa buah nenas memiliki aktivitas proteolitik yang lebih besar dibandingkan sampel mangga bacang. Hal ini menandakan bahwa mangga bacang memiliki potensi sebagai sumber proteolitik alternatif.

Perbandingan aktivitas proteolitik keladi tikus terhadap buah nenas yaitu 2 : 5. Hasil perbandingan ini menandakan bahwa aktivitas proteolitik buah nenas lebih besar

dibandingkan aktivitas proteolitik keladi tikus. Meskipun aktivitas proteolitik keladi tikus lebih kecil dibandingkan buah nenas. Hal ini juga dapat menunjukkan bahwa tanaman ini berpotensi sebagai sumber proteolitik alternatif.

Hasil perbandingan aktivitas proteolitik keladi tikus dan mangga bacang terhadap buah nenas secara keseluruhan menunjukkan bahwa buah nenas memiliki aktivitas proteolitik lebih besar.

SIMPULAN

Hasil pengujian aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa keladi tikus dan mangga bacang memiliki aktivitas proteolitik. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh

aktivitas proteolitik dari tanaman mangga bacang, dan keladi tikus yaitu 0,199 U/mL dan 0,184 U/mL. Aktivitas proteolitik mangga bacang dan keladi tikus lebih kecil dibandingkan aktivitas proteolitik buah nanas yang mana perbandingan aktivitas proteolitik mangga bacang dan keladi tikus terhadap buah nanas berturut – turut (1 : 2) dan (2 : 5).

SARAN

Perlu dilakukan penentuan aktivitas proteolitik khususnya untuk mangga bacang dan keladi tikus dengan metode lain yang dapat menentukan lebih jelas aktivitas enzim yang dimiliki.

REFERENSI

- Arunachalam and Sarita. (2009). Protease Enzymes: An-Eco-Friendly Alternative for Leather Industry. Indian Journal of Science and Technology Vol.2 No.12. ISSN: 0974-6846
- Bhaskar, N. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste protein : optimization of hydrolysis condition for a commercial neutral protease. Journal Bioresource Technology 99:4150-4111
- Enggell, J., Meriandini, A. & Natalia, L. (2004). Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. J. Mikrobiologi Indonesia 9 (1): 9-12
- Harrach, T., Schulze, F.K., Nuck, R., Grunow, D., and Maurer, H.R. (1995). Isolation and Partial Characterization of Basic Proteinases from Stem Bromelain. J Protein Chem 14, 41-52
- Herdyastuti N. (2006). Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar. Berk. Penel. Hayati vol. 12: 75-77
- Hopkin & Norman. (2008). Introduction to plant 4 th edition. Wiley John Wiley & Sons Inc. United States of America
- Mahajan RT dan Shamkant BB. (2010). Biological Aspect of Proteolytic Enzymes: A Review. India J. Pharm Research 3(9) : 2048-2068
- Motyán, J. A., F. Toth, dan J. Tozser. (2013). Research application of proteolytic enzymes in molecular biology. Biomolecules. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine. Biomolecules 3: 923-942
- Nadzirah, K.Z., Zainal, S., Noriham, A., and Normah, I. (2013). Efficacy of selected Purification Techniques for Bromelain, International Food Research Journal, 20(1):43-46