

EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI DAUN KELOR (*Moringa oliefera* Lamk.)

Extraction and Characterization of Protease Enzyme from Moringa Leaves (Moringa oliefera Lamk.)

Azmy Nahdhiyati Fathimah dan Agustin Krisna Wardani*

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian – Fakultas Teknologi Pertanian – Universitas Brawijaya
Jl. Veteran – Malang 65145

*Penulis Korespondensi: email wardani8@yahoo.com

ABSTRAK

Protease di dalam daun kelor berpotensi untuk diaplikasikan pada industri. Penelitian ini dilakukan untuk mengekstrak dan mengkarakterisasi enzim protease dari daun kelor (*Moringa oliefera* Lamk.). Protease diekstrak dari daun kelor dengan cara dihomogenisasi menggunakan 100mM buffer kalium pospat pH 7.0 yang mengandung 10 ml 0.3% asam askorbat dan 10 ml 15mM EDTA merupakan buffer ekstraksi dan stabilisator yang paling efektif. Setelah disentrifuse pada 10.000 rpm, protein di dalam ekstrak kasar diendapkan menggunakan 60% ammonium sulfat, endapan dilarutkan kembali dalam 50 mM buffer kalium pospat pH 7 untuk proses dialisis. Hasil dari penelitian ini yaitu telah diperoleh enzim protease dari daun kelor dengan aktivitas tertinggi terdapat pada perlakuan A3E3 dengan penambahan asam askorbat 0.3% dan EDTA 15 mM sebesar 2.45 U/mg. Enzim dengan aktivitas tertinggi yang dihasilkan diendapkan dengan garam amonium sulfat fraksi terbaik 60%. Enzim hasil pengendapan kemudian didialisis. Tingkat kemurnian enzim hasil dialisis sebesar 3.21 kali. Karakterisasi enzim protease A3E3 memiliki aktivitas optimal pada pH 6 dan suhu 60 °C dengan spesifitas substrat kasein. Kestabilan enzim pada suhu 40-60 °C dengan pH 4-7. Enzim ini memiliki nilai K_M sebesar 0.042 mg.mL⁻¹ dan V_{Maks} sebesar 2.33 mg.mL⁻¹.menit⁻¹. Aktivitas enzim ditingkatkan dengan penambahan ion logam ZnCl₂, FeCl₂, dan MgCl₂. Enzim protease ini dihambat oleh inhibitor HgCl₂ dan enzim ini bisa dikategorikan sebagai protease sistein. Enzim protease dari daun kelor ini memiliki berat molekul sebesar 156.23 kDa setelah dikonfirmasi melalui zimogram.

Kata kunci: daun kelor, enzim protease, ekstraksi, karakterisasi, stabilisator

ABSTRACT

Proteases in moringa leaves have the potentials in industrial applications. This study was conducted to extract and characterize the proteolytic enzyme from moringa leaves (*Moringa oliefera* Lamk.). Protease was extracted from moringa leaves by homogenization with 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 containing 10 ml 0.3% ascorbic acid and 10 ml 15 mM EDTA which were found to be the most effective extraction buffer and stabilizers. After centrifugation at 10.000 rpm, protein in the crude extract was precipitated using 60% ammonium sulfate following which the precipitate was re-dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 for dialyzed. The protease enzyme from Moringa leaves showed highest activity (2.45 U/mg) with the addition of 0.3% ascorbic acid and 15 mM EDTA. This result was selected for further precipitation with ammonium sulphate at 60% and then dialyzed against phosphate buffer. The level of purity of the enzyme increased to 3.21 fold. Protease enzyme A3E3 had optimal activity at pH 6 and temperature of 60 °C. The enzyme had good stability at temperatures 40-60 °C and pH 4-7. Enzyme showed highest specificity on casein substrate followed by whey, gelatin, BSA, egg albumin, and soy protein. This enzyme had a K_M value 0,042 mg.mL⁻¹ and V_{max} 2.33 mg.mL⁻¹.min⁻¹. Enzyme activity increased with the addition of metal ions ZnCl₂, FeCl₂ and MgCl₂. This enzyme is inhibited by the HgCl₂ so can be categorized as a cysteine protease. Protease band detected in the zymogram were estimated at 156.23 kDa.

Keywords: characterization, extraction, moringa leaves, protease enzymes, stabilizers

PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu bioteknologi telah menempatkan penggunaan enzim sebagai salah satu alternatif untuk berbagai keperluan, misalnya bidang industri dan pengobatan. Salah satu enzim yang telah banyak dipelajari adalah enzim protease yang berfungsi mengkatalis hidrolisis ikatan peptida pada protein. Enzim protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya sangat luas. Contoh industri pengguna enzim protease antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, bir dan limbah (Moon and Parulekar, 1993). Perdagangan protease mencapai 60% dari total penjualan enzim dunia (Suhartono, 2000). Freedonia Group Inc. (Anonymous, 2010), memprediksi pasar enzim di dunia akan meningkat, yaitu pada tahun 2013 sekitar 7 milyar USD dengan peningkatan permintaan 6.3% per tahun.

Sumber enzim protease yang telah 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 and Shamkant, 2010). Saat ini di Indonesia, enzim proteolitik dari tanaman yang digunakan biasanya didapatkan dari enzim papain dari pepaya dan bromelain dari buah nanas. Selain pepaya dan buah nanas, bahan lain yang dapat digunakan sebagai sumber enzim protease adalah daun kelor. Penggunaan enzim protease dari daun kelor merupakan hal yang menguntungkan. Alternatif penggunaan enzim protease dari daun kelor ini dapat meningkatkan nilai ekonomis dan pemanfaatan dari daun kelor tersebut yang selama ini hanya dianggap sebagai tanaman liar serta penggunaannya masih sebagai bahan untuk sayuran dan pakan ternak saja.

Tanaman kelor (*Moringa oleifera* Lamk) merupakan tanaman yang mudah tumbuh di berbagai jenis tanah, tidak memerlukan perawatan yang intensif, tahan terhadap musim kemarau dan mudah dikembangkan (Simbolan, 2007). Di India telah dilakukan penelitian yang meneliti tentang kandungan enzim protease dengan aktivitas spesifik sebesar 4.27 Unit/mg yang terdapat di dalam daun kelor (Sharmila *et al.*, 2012). Sehingga keberadaan tanaman kelor ini dapat dijadikan sebagai salah satu sumber enzim protease yang cukup potensial.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan enzim protease yang bersumber dari daun kelor. Untuk memperoleh enzim protease pada daun kelor salah satu caranya yaitu dengan cara ekstraksi. Di dalam proses untuk mendapatkan ekstrak enzim protease ini akan mempengaruhi aktivitas enzim protease. Untuk menghindari menurunnya aktivitas enzim protease dari daun kelor ini maka diperlukan stabilisator. Pada penelitian ini digunakan stabilisator berupa EDTA, asam askorbat dan gabungan keduanya untuk mempertahankan aktivitas enzim protease yang bersumber dari daun kelor.

BAHAN DAN METODE

Bahan baku berasal dari daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) yang berada di tengah-tengah tangkai dan warnanya masih hijau berumur lebih dari 4 bulan diambil dari kebun milik Ibu Kanti yang terletak di dusun Jengglik desa Tamanan kecamatan Mojojoto, Kediri. Bahan Kimia yang digunakan yaitu KH_2PO_4 , HCL, NaOH, akuades, reagen folin-cioculteu, Na-K-Tartarat, TCA, kasein dan CuSO_4 yang didapatkan dari toko bahan kimia Makmur Sejati, Malang. Sedangkan alat-alat yang digunakan meliputi : timbangan digital (*Adventure Pro* AV412, blender (*Signora*), glassware (*Pyrex*), dan sentrifuse dingin (*Thermo Scientific*/ SL40).

Ekstraksi Enzim Protease dari Daun Kelor

Daun kelor dipisahkan dengan tangkainya dan dicuci. Ditimbang 100 g dan dihomogenisasi menggunakan blender ditambahkan 200 mL buffer kalium fosfat 100 mM pH 7.0 yang mengandung 10 mL stabilisator:

- | | |
|------|--------------------------------------|
| A1 | = Asam Askorbat 0.1% |
| A2 | = Asam Askorbat 0.2% |
| A3 | = Asam Askorbat 0.3% |
| E1 | = EDTA 5 mM |
| E2 | = EDTA 10 mM |
| E3 | = EDTA 15 mM |
| A1E1 | = Asam Askorbat 0.1 % dan EDTA 5 mM |
| A2E2 | = Asam Askorbat 0.2 % dan EDTA 10 mM |
| A3E3 | = Asam Askorbat 0.3 % dan EDTA 15 mM |

Setiap homogenat disaring melalui sepotong kain tipis dan filtrat disentrifugasi pada 10000 rpm suhu 4 °C selama 30 menit. Aktivitas proteolitik supernatan diukur dan dibandingkan dengan kontrol (tanpa stabilisator) untuk menentukan stabilisator yang paling efektif.

Pemurnian Parsial Enzim Protease Menggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis

Pemurnian parsial enzim protease dari daun kelor dilakukan menggunakan garam ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 60%. Setelah didapatkan pengendapan protein dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Endapan yang didapatkan didialisis menggunakan kantong dialisis yang memiliki MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) 12 – 14 kDa.

Pengujian Aktivitas Enzim Protease

Pengujian aktivitas proteolitik dilakukan dengan metode yang dijelaskan oleh Leewit and Pornsukawang (1980) dengan modifikasi. 1 mL enzim protease dicampur 2 ml larutan kasein 0.5 % dengan 0.5 mL larutan buffer fosfat pH 7 lalu didiamkan selama 10 menit suhu 37 °C. Dihentikan reaksinya dengan menam-bahkan 2.5 mL TCA 5% lalu diinkubasi 30 menit pada suhu ruang. Larutan disentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit. Diambil 1 ml filtrat dan diencerkan sampai 5 ml. Hasil pengenceran diukur absorbansinya dengan UV pada $\lambda = 275$ nm.

Analisis Kadar Protein

Kadar protein dari enzim protease ditentukan dengan metode Lowry modified (Lowry *et al.*, 1951) menggunakan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar protein. Kadar protein dinyatakan sebagai mg/mL.

Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas dan Stabilitas Enzim Protease

Suhu optimal yang dibutuhkan untuk reaksi enzimatik dicari dengan cara mengukur aktivitas enzim protease pada suhu yang bervariasi (30, 40, 50, 60, dan 70). Langkah-langkah uji yang dipakai seperti pada penentuan aktivitas enzim. Stabilitas enzim protease terhadap suhu diukur dengan cara menginkubasikan larutan enzim selama 20, 40, 60 dan 80 menit pada

suhu yang bervariasi (30, 40, 50, 60, dan 70), segera setelah inkubasi larutan enzim didinginkan dengan cepat dan aktivitas enzim protease yang tersisa diukur dengan cara yang sama.

Pengaruh pH terhadap Aktivitas dan Stabilitas Enzim protease

pH optimal yang dibutuhkan untuk reaksi enzimatik dicari dengan cara mengukur aktivitas enzim protease pada pH yang bervariasi (4, 5, 6, 7, 8 dan 9). Langkah-langkah uji yang dipakai seperti pada penentuan aktivitas enzim. Stabilitas enzim protease terhadap suhu diukur dengan cara menginkubasikan larutan enzim selama 1 jam pada suhu 4 °C pada pH yang bervariasi (4, 5, 6, 7, 8 dan 9). Segera setelah inkubasi larutan enzim didinginkan dengan cepat dan aktivitas enzim protease yang tersisa diukur dengan cara yang sama.

Penentuan K_M dan V_{Maks}

Penentuan nilai K_M dan V_{Maks} dihitung pada beberapa level substrat yaitu 0.1–0.6% pada suhu dan pH optimum. Langkah-langkah uji yang dipakai seperti pada penentuan aktivitas enzim. Data aktivitas (V) terhadap konsentrasi (S) yang diperoleh kemudian dialurkan pada persamaan Lineweaver-Burk. Nilai V_{Maks} dan K_M diperoleh dari nilai $1/V_{Maks}$ dan $-1/K_M$.

Penentuan Spesifitas Substrat

Spesifitas Substrat ditentukan dengan menguji aktivitas enzim protease kasar dengan pH dan suhu optimum yang diperoleh pada tahap sebelumnya. Substrat yang digunakan bervariasi, dengan konsentrasi 0.5%, yaitu kasein, BSA, gelatin, egg albumin, soy protein dan whey. Langkah-langkah uji yang dipakai seperti pada penentuan aktivitas enzim.

Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Protease

Pengaruh penambahan ion logam ditentukan dengan menguji aktivitas enzim protease pada pH optimum dan suhu optimum yang diperoleh pada langkah sebelumnya. Ion logam (NaCl , BaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , CuSO_4 , CaCl_2 , FeCl_3 dan AlCl_3) dengan konsentrasi 10 mM dan enzim protease masing-masing ditambahkan 1 mL, kemudian diinkubasi selama satu jam dalam suhu ruang.

Pengaruh Inhibitor terhadap Aktivitas Enzim

Pengaruh penambahan inhibitor ditentukan dengan menguji aktivitas enzim protease pada pH optimum dan suhu optimum yang diperoleh pada langkah sebelumnya. Inhibitor (PMSF, EDTA, HgCl_2 , dan SDS) dengan konsentrasi 10 mM dan enzim protease masing-masing ditambahkan 1 ml, kemudian diinkubasi selama satu jam dalam suhu ruang.

Penentuan Berat Molekul Enzim Protease

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menggunakan metode Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE), lalu untuk mengkonfirmasi pita protein aktif yang mempunyai aktivitas protease menggunakan metode zimogram (*activity staining method*). Dalam penelitian ini digunakan SDS-PAGE dengan stacking gel 5% dan separating gel 10% (Aulanni'am, 2005). Untuk zimogram konsentrasi gel sama, namun terdapat penambahan kasein 1% ke dalam separating gel (Mehzard *et al.*, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Enzim Protease

Ekstraksi enzim protease dari daun kelor ini dilakukan dengan menggunakan pelarut buffer pospat 0.1 M pH 7. Buffer pospat yang digunakan yaitu dua kali volume bahan baku daun kelor. Menurut Whitaker (1994), penambahan buffer pada proses ekstraksi enzim intraseluler dari jaringan tanaman ini yaitu untuk menjaga pH tetap netral.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan penambahan asam askorbat semakin meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi asam askorbat yang ditambahkan. Penambahan asam askorbat

0.3% memiliki aktivitas proteolitik tertinggi yaitu sebesar 2.26 U/mg. Penambahan EDTA dengan konsentrasi yang semakin bertambah semakin meningkatkan aktivitas spesifiknya. Penambahan EDTA 15 mM dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim protease dari daun kelor yaitu sebesar 2.01 U/mg.

Sedangkan penambahan kombinasi asam askorbat 0.3% dan EDTA 15 mM juga semakin meningkatkan aktivitas spesifik protease daun kelor yaitu 2.45 U/mg. Penelitian yang dilakukan oleh Nafi' *et al.* (2013), menyatakan bahwa penambahan asam askorbat dengan kombinasi EDTA pada saat ekstraksi lebih efektif meningkatkan aktivitas enzim protease dan menjaga stabilitasnya jika dibandingkan penambahan asam askorbat saja. Kebanyakan enzim protease yang diekstrak dari tanaman mempunyai gugus aktif thiol (S-H) yang mempunyai sifat berikatan terhadap amino didekatnya yang mempunyai gugus yang sama dan membentuk ikatan disulfida (S-S). Fungsi asam askorbat adalah untuk mencegah agar enzim protease tidak mengalami oksidasi dan membentuk ikatan disulfida yang membuat enzim protease inaktif. Sedangkan EDTA dapat membantu mengikat ion logam yang terdapat pada daun kelor dan dapat menghambat kinerja enzim.

Purifikasi Enzim Protease dari Daun Kelor Menggunakan Ammonium Sulfat

Tabel 1 Menunjukkan nilai aktivitas enzim dan kadar protein Daun Kelor hasil Pemurnian. Hasil ekstraksi enzim merupakan isolat dengan kadar yang masih rendah. Ekstrak kasar enzim protease pada supernatan selanjutnya dipurifikasi secara parsial dengan metode pengendapan ammonium sulfat dan dialisis untuk meningkatkan kadar enzim. Konsentrasi amonium sulfat yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi 60%.

Tabel 1. Nilai Aktivitas Enzim dan Kadar Protein Enzim Protease dari Daun Kelor Hasil Pemurnian

Tahap	Volume Enzim Total (mL)	Aktivitas Enzim Total (U)	Kadar Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Yield	Purification Factor
Ekstrak Kasar	500.00	1225.00	1035.00	1.18	100.00	1.00
Pengendapan	61.00	221.43	108.58	2.04	18.08	1.72
Dialisis	75.50	378.26	99.66	3.80	30.88	3.21

Setelah protein diendapkan dengan ammonium sulfat 60% dan dilarutkan dalam buffer maka tahap selanjutnya adalah proses dialisis. Larutan tersebut mengandung residu ammonium sulfat sehingga perlu didialisis untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya.

Penentuan Kestabilan dan pH Optimum

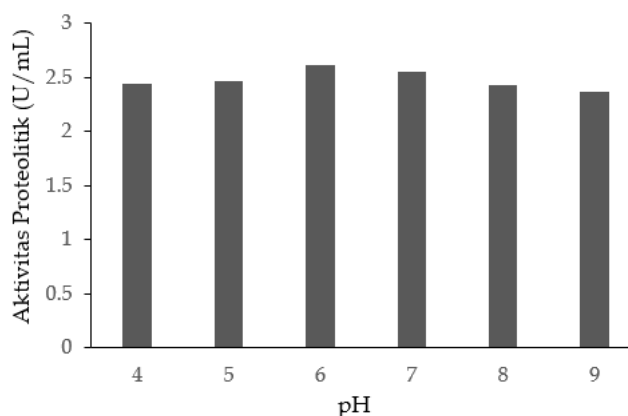
Gambar 1 menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease dari daun kelor memiliki pH optimum 6. Saat pH optimum, enzim mempunyai konformasi sisi aktif yang sesuai dengan substrat kasein yang menyebabkan terbentuknya kompleks enzim substrat yang maksimal, karena gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan, sehingga menghasilkan produk yang maksimal juga.

Enzim protease dari daun kelor memiliki kestabilan pada pH 5-7 dimana aktivitas residu yang dihasilkan tidak kurang dari 90%. Protease pada pH di atas 7 kestabilannya mulai menurun, dibuktikan

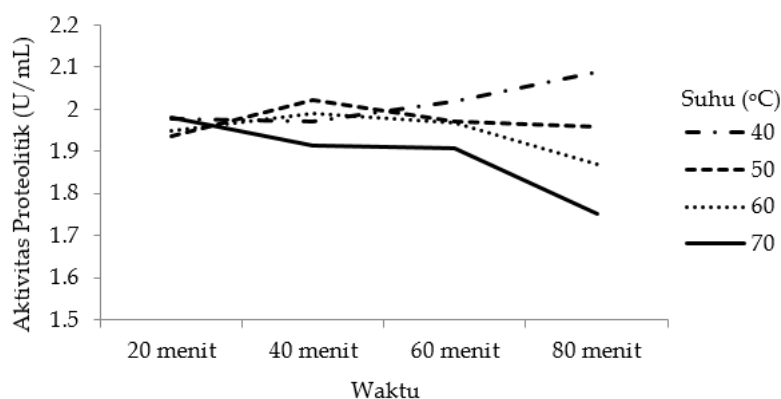
dengan aktivitas relative residu sudah di bawah 90%. Data stabilitas protease dari daun kelor menunjukkan sisi aktif protease dapat bekerja optimal pada kondisi asam dan netral.

Penentuan Kestabilan dan Suhu Optimum

Berdasarkan Gambar 2, aktivitas enzim protease dari daun kelor mengalami peningkatan pada suhu 30 °C sampai suhu 60 °C, dan mengalami penurunan setelah suhu di atas 60 °C. 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.



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim protease dari Daun Kelor Hasil Dialisis



Gambar 2. Pengaruh Suhu terhadap Stabilitas Enzim Protease dari Daun Kelor

Selain itu menurut Montgomery (1993), pada suhu tinggi gaya-gaya ikatan yang penting rusak akibat meningkatnya getaran termal atom-atom sehingga merusak struktur tiga dimensi enzim. Demikian juga substrat dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya akan mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim.

Stabilitas protease terhadap suhu (Gambar 3) menunjukkan bahwa protease dari daun kelor ini relatif stabil pada kisaran suhu 40–60 °C, dimana aktivitas protease pada suhu 40–60 °C relatif stabil dalam kisaran waktu 60 menit. Sedangkan pada suhu 70 °C stabilitas protease sudah mengalami penurunan sejak menit ke 40. Pada suhu 70 °C terjadi penurunan aktivitas enzim yang cukup tajam jika dibandingkan dengan suhu sebelumnya, bahkan pada saat pemanasan 40 menit aktivitas enzim sudah mengalami penurunan.

Protein enzim terdenaturasi dengan cepat pada suhu 70 °C, sehingga aktivitas enzim tidak dapat dipertahankan. Akibatnya terjadi penurunan aktivitas enzim secara drastis jika dibandingkan dengan suhu 40, 50, dan 60 °C. Apabila dilihat dari keadaan di atas, maka enzim protease dari daun kelor memiliki daya tahan yang cukup tinggi terhadap panas. Menurut Naz (2002), termostabilitas enzim protease umumnya berkisar pada suhu 50–60 °C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu tersebut.

Penentuan Spesifitas Substrat

Aktivitas residu enzim protease dari daun kelor yang paling tinggi adalah terhadap substrat kasein yaitu sebesar 100%. Menurut Muchtar *and* Ikram (2012), luasnya aktifitas enzim protease pada sejumlah

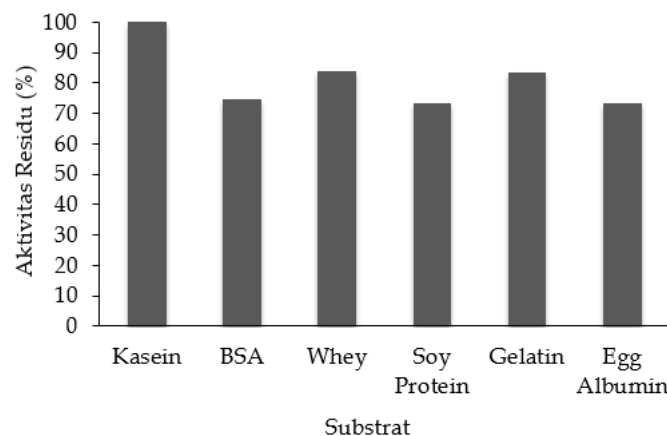
substrat yang berbeda menunjukkan bahwa enzim protease tersebut dapat diaplikasikan pada berbagai bentuk industri yang menggunakan enzim protease. Hal ini juga ditunjukkan oleh enzim protease yang didapat dari daun kelor, enzim protease ini tidak hanya memiliki aktivitas yang tinggi pada substrat kasein, tetapi juga dapat aktif pada substrat lainnya yaitu BSA, gelatin, egg albumin, soy protein dan whey. Namun aktivitas tertinggi enzim protease dari daun kelor ini terdapat pada substrat kasein.

Alasan kasein memiliki aktivitas yang lebih besar karena rantai peptida dari substrat protein mengikat ke alur permukaan enzim. Enzim akan bertindak untuk menggabungkan substrat spesifik dengan sisi aktifnya. Setelah kompleks enzim-substrat terbentuk, residu asam amino dari enzim akan mengikat substrat dan akan mengubahnya menjadi produk. Selain cocok secara fisik, antara enzim dan substrat harus cocok secara kimia juga. Energi yang terbentuk dari kompleks enzim-substrat ini merupakan penentu dalam afinitas substrat (Turk, 1999).

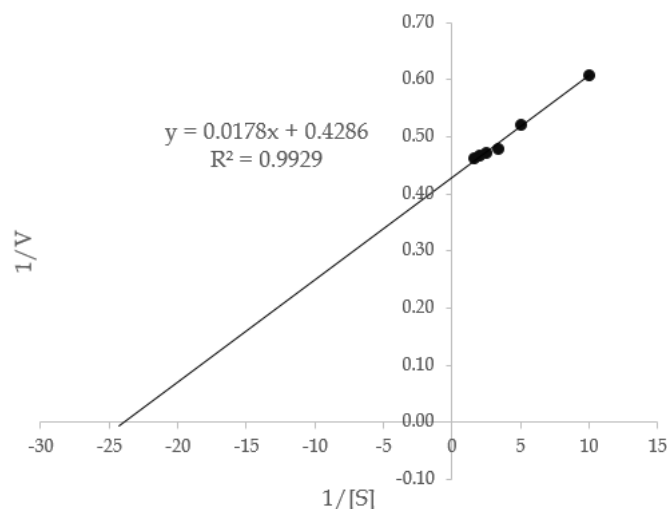
Nilai K_M dan V_{Maks} Enzim Protease

Penentuan nilai K_M dan V_{Maks} enzim protease dari daun kelor dihitung berdasarkan aktivitas enzim tersebut pada variasi konsentrasi substrat dengan pH optimum yaitu 6 dan suhu optimum 60 °C. Berdasarkan hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diperoleh grafik transformasi Lineweaver-Burk.

Gambar 4 menunjukkan grafik transformasi Lineweaver-Burk dari protease daun kelor. Ditentukan Nilai K_M dan V_{Maks} ditentukan dengan persamaan $y = ax + b$ dari



Gambar 3. Aktivitas Enzim Protease dari Daun Kelor pada Beberapa Substrat



Gambar 4. Penentuan nilai K_M dan V_{maks} melalui Transformasi Lineweaver-Burk Enzim Protease dari Daun Kelor

hasil perhitungan diperoleh $b = 1/V_{Maks}$ dan $a = K_M / V_{Maks}$ sehingga nilai $V_{Maks} = 2.33 \text{ mg. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan nilai $K_M = 0.042 \text{ mg. mL}^{-1}$. Konstanta Michaelis-Menten (K_M) merupakan konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan maksimum. Nilai K_M ditentukan untuk mengetahui afinitas enzim terhadap substratnya.

Menurut Aulanni'am (2005), semakin kecil nilai K_M suatu enzim maka semakin besar afinitas dari enzim tersebut dalam membentuk kompleks enzim-substrat sehingga kecepatan reaksi maksimum (V_{Maks}) terjadi peningkatan serta menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi terhadap substrat dan sebaliknya semakin besar nilai Konstanta Michaelis-Menten (K_M) maka semakin kecil afinitas dari enzim tersebut sehingga terjadi penurunan kecepatan reaksinya. Harga V_{Maks} diperoleh $2.33 \text{ mg. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$, hal ini menunjukkan bahwa setiap mili-liter ekstrak kasar enzim protease dari daun kelor menghasilkan produk setiap menitnya maksimal 2.33 mg.

Pengaruh Penambahan Ion Logam

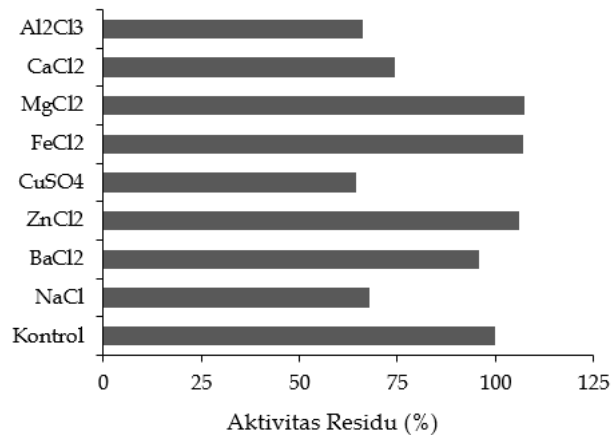
Berdasarkan Gambar 5 menunjukkan aktivitas protease meningkat dengan penambahan MgCl_2 , FeCl_2 , dan ZnCl_2 dimana aktivitas relatif masing-masing perlakuan lebih tinggi dari kontrol yaitu sebesar 107.34, 107.14, dan 105.89%. Peningkatan aktivitas relatif protease oleh MgCl_2 , FeCl_2 , dan ZnCl_2 menunjukkan bahwa ion logam Mg^{2+} , Fe^{2+} dan Zn^{2+} berfungsi sebagai aktivator protease dari

daun kelor. Sedangkan ion logam Ba^{2+} menurunkan aktivitas residu protease sebesar 4.06% dari kontrol. Sedangkan ion logam yang lain yaitu Na^+ , Cu^{2+} , Ca^{2+} dan Al^{3+} menurunkan aktivitas residunya cukup besar. Ion logam berperan dalam aktivitas katalitik protease dan stabilitas konformasi protease (Ogawa *et al.*, 1979). Protease merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis protein. Pada reaksi hidrolisis protein ion logam yang berperan sebagai aktivator membentuk ikatan koordinasi dengan residu asam amino dari protease dan bersifat sebagai akseptor elektron (asam Lewis) sehingga mampu berinteraksi dengan basa yaitu gugus OH^- dari molekul air.

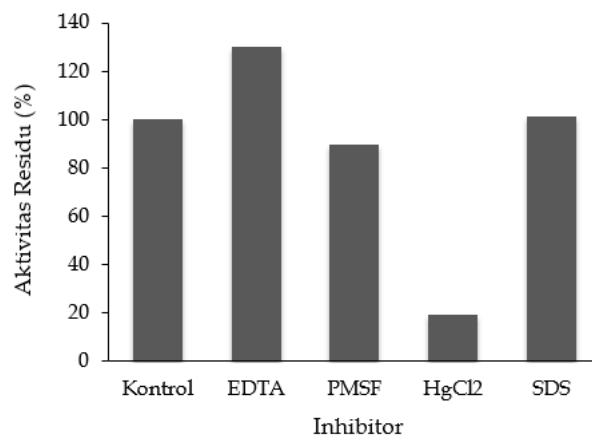
Adanya peningkatan keaktifan karena penambahan ion logam tertentu menunjukkan bahwa ion logam diperlukan sebagai komponen dalam sisi aktif enzim. Mekanisme ion logam dapat memperbesar aktivitas enzim yaitu menjadi bagian integral dari sisi aktif, merubah konstanta kesetimbangan dari reaksi enzimatik, merubah muatan listrik, mengusir ion inhibitor, menukar ion yang kurang efektif pada sisi aktif enzim atau substrat. Pada konsentrasi tertentu ion logam tertentu dapat bertindak sebagai inhibitor, tetapi dapat juga bertindak sebagai aktivator pada konsentrasi lain (Richardson *and* Hyslop, 1985).

Pengaruh Penambahan Inhibitor

Berdasarkan Gambar 6 menunjukkan bahwa *residual activity* semakin meningkat



Gambar 5. Pengaruh Penambahan Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Kelor



Gambar 6. Pengaruh Penambahan Inhibitor terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Kelor

sebesar 29.29% dengan penambahan EDTA. Adanya EDTA dapat membantu dalam mengikat setiap ion logam yang dapat menyerang sisi aktif enzim dan dapat menyebabkan inaktivasi enzim protease.

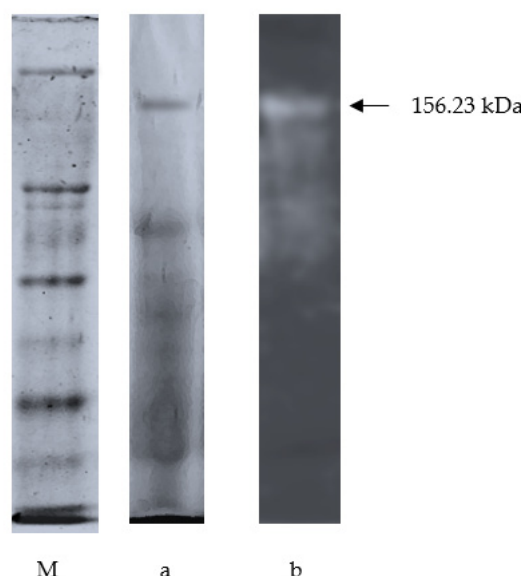
HgCl₂ ditemukan dapat menghambat aktivitas enzim protease yang diekstrak dari daun kelor. Penurunan *residual activity* enzim protease dari daun kelor ini yaitu sebesar 80.63%. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan besar enzim protease yang diekstrak dari daun kelor termasuk ke dalam protease golongan sistein. Penghambatan oleh ion Hg²⁺ ini dapat terjadi karena kelompok sulfhidril dari enzim protease membentuk kompleks dengan logam berat tersebut sehingga dapat menurunkan aktivitasnya (Chen *et al*, 2009).

Penentuan Berat Molekul Enzim Protease

Penentuan berat molekul enzim protease dari daun kelor dilakukan dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate*

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) yang selanjutnya dikonfirmasi dengan zimogram. Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan enam pita protein yang memiliki berat molekul sebesar 21.23, 32.32, 42.03, 60.70, 67.42, dan 156.23 kDa (Gambar 7). Dari enam pita protein yang diperoleh belum diketahui apakah semuanya memiliki aktivitas protease. Oleh karena itu digunakan zimogram untuk mengkonfirmasi pita aktif yang memiliki aktivitas enzim.

Berdasarkan hasil zimogram (Gambar 7a dan 7b) dapat diketahui bahwa hanya ada satu pita protein yang menunjukkan aktivitas protease yaitu pada berat molekul 156.23 kDa. Adanya aktivitas protease pada zimogram ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening. Daerah yang membentuk zona bening merupakan daerah substrat kasein yang telah didegradasi oleh enzim protease. Menurut Mehazard *et al.* (2005), zat warna *Coomassie Brilliant*



Gambar 7. M = Marker Protein, a = Enzim Protease dari Daun Kelor Hasil Pemurnian dan b = Zimogram dari Enzim Protease

Blue akan berikatan dengan protein yang mengandung residu asam amino dengan rantai samping aromatik membentuk kompleks warna biru. Gel SDS-poliakrilamid berkopolimerisasi dengan kasein membentuk zona bening akibat didegradasi oleh enzim protease.

SIMPULAN

Enzim protease dari daun kelor dengan aktivitas tertinggi terdapat pada perlakuan A3E3 dengan penambahan asam askorbat 0.3% dan EDTA 15 mM sebesar 2.45 U/mg. Enzim dengan aktivitas tertinggi yang dihasilkan diendapkan dengan garam amonium sulfat fraksi terbaik 60%. Enzim hasil pengendapan kemudian didialisis. Tingkat kemurnian enzim hasil dialisis sebesar 3.21 kali. Karakterisasi enzim protease A3E3 aktivitas optimal pada pH 6 dan suhu 60 °C dengan spesifitas substrat kasein. Kestabilan enzim pada suhu 40-60 °C dengan pH 4-7. Enzim ini memiliki nilai K_M sebesar 0.042 mg.mL⁻¹ dan V_{Maks} sebesar 2.33 mg.mL⁻¹.menit⁻¹. Aktivitas enzim ditingkatkan dengan penambahan ion logam Zn²⁺, Fe²⁺, dan Mg²⁺. Enzim protease ini dihambat oleh inhibitor HgCl₂ dan enzim ini bisa dikategorikan sebagai protease sistein. Enzim protease dari daun kelor ini memiliki berat molekul sebesar 156.23 kDa setelah dikonfirmasi melalui zimogram

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2010. World Enzyme to 2013 : Demand and Sales Forecast, Market Share, Market Size, Market Leaders. <http://www.fredoniagroup.com/World-Enzyme.html>
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Citra Mentari Group. Malang.
- Chen HQ, Chen XM, Li Y, Wang J, Jin ZY, Xu XM, Zhao JW, Chen TX, and Xie ZJ. 2009. Purification And Characterisation Of Exo- And Endo-Inulinase From *Aspergillus ficuum*. JNSP5-06. *Food Chemistry* 115: 1206-1212.
- Leewit S and Pornsuksawang. 1988. Protease from Bacteria in Soybean Whey. Proc. FoodScience and Technology in Industrial Development. Vol 1. (Ed Manepoon). Thailand. pp. 751-754.
- Mahajan RT dan Shamnkant BB. 2010. Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review. *India J. Pharm. Research* 3(9) : 2048-2068.
- Mehzard J, Desrosier C, Lauzon, Robitaille G, Zhao X, Lacasse P. 2005. Zymogram Technique for Proteolytic Assay. *J. Dairy Sci.* 88: 211-222.
- Montgomery VV. 1993. Structure-stability Relationship in Protein : New Approaches to Stabilizing Enzymes. *Journal Enzyme Microb. Technol.* 6 : 50-59.

- Moon SH and Parulekar SJ. 1993. Some Observation On Protease Producing In Continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering* 41. 43-45.
- Muchtadi D, Palupi NS, dan Astawan M. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB, Bogor.
- Mukhtar H and Ikram-Ul-Haq. 2012. Purification and Characterization of Alkaline Protease Produced by A Mutant Strain Of *Bacillus subtilis*. *Pak. J. Bot*, 44 (5) : 1697-1704.
- Nafi' A, Foo HL, Jamilah B, Ghazali HM. 2013. Properties of proteolytic enzyme from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Food Research Journal* 20(1): 363-368.
- Naz S. 2002. Enzymes and Food. Oxford University Press. Pakistan.
- Ogawa S, Shiro M. 1979. Biochem. Biophys. Res. Common. 90. 674-8.
- Richardson T, Hyslop DB. 1985. Enzymes. In: Fennema OR. Ed. Food Chemistry. Marcel Dekker. New York.
- Sharmila S, Rebecca LJ, Saduzzaman M. 2012. Immobilization of Plant Protease Using Calcium Alginate Beads. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(10):4484-4488.
- Simbolan JM, Simbolan M, Katharina N. 2007. Cegah Malnutrisi dengan Kelor. Kanisius. Yogyakarta.
- Suhartono MT. 2000. Eksplorasi Protease Bakteri Asal Indonesia Untuk Aplikasi Industri Dan Riset Bioteknologi. Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II. 125-133.
- Turk V. 1999. Protease: New Perspectives. Birkhauser. 201.
- Whitaker JR. 1994. Principle of Enzymology for The Food Science. Second Edition. Marcel Decker. New York.