

## AKTIVITAS PROTEASE PADA GETAH BAGIAN BATANG DARI TIGA JENIS SPESIES TANAMAN KAMBOJA (*Plumeria L*)

K. Ratnayani\*, M. Nazib, J. Sibarani, dan A.A.I.A M. Laksmiwati

Progam Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

\*Email: ketut\_ratnayani@unud.ac.id

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji aktivitas protease pada getah bagian batang dari tiga spesies tanaman kamboja yaitu *Plumeria rubra L*, *Plumeria obtusa L* dan *Plumeria pudica Jacq* yang banyak dibudidayakan di wilayah Bali. Pengujian aktivitas protease dilakukan secara spektrofotometri (metode Kurnitz termodifikasi) menggunakan kasein sebagai substrat. Hasil penentuan aktivitas protease pada tiga spesies tanaman kamboja menunjukkan bahwa spesies *Plumeria rubra L* memiliki aktivitas protease rata-rata relatif lebih tinggi yaitu  $0,0398 \pm 0,00034$  U/mL, disusul oleh spesies *Plumeria pudica Jacq*. yaitu  $0,0371 \pm 0,00019$  U/mL, dan *Plumeria obtusa L*. yaitu  $0,0365 \pm 0,00032$  U/mL. Spesies *Plumeria rubra L*. merupakan jenis tanaman kamboja yang paling umum, memiliki paling banyak varietas dan paling banyak dibudidayakan di wilayah Bali dibandingkan spesies lainnya. Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa jenis ini berpotensi sebagai sumber protease alternatif.

**Kata kunci:** aktivitas protease, getah kamboja, tiga spesies

### ABSTRACT

This research aimed to determine the protease activity of the stem latex of three species of frangipani plant, namely *Plumeria rubra L*, *Plumeria obtusa L* and *Plumeria pudica Jacq* which are mostly cultivated in Bali region. The assay of protease activity was based on spectrophotometric determination with Kurnitz modified method using casein as the substrate. The result of the protease activity assay of the three species of frangipani plant showed that the species of *Plumeria rubra L*. had the protease activity relatively higher than others which was of  $0.0398 \pm 0.0003$  U/mL, followed by *Plumeria pudica Jacq*. species which was of  $0.0371 \pm 0.0002$  U/mL, and *Plumeria obtusa L*. which was of  $0.0365 \pm 0.0003$ . The species of *Plumeria rubra L*. is the most common frangipani species cultivated in Bali region. The results of this study suggested that this plant is potential as an alternative of protease source.

**Keywords:** protease activity, frangipani latex, three species

### PENDAHULUAN

Tanaman kamboja (*Plumeria sp*) merupakan salah satu jenis tanaman hias yang saat ini banyak dibudidayakan di wilayah Bali, bahkan telah menjadi tanaman ikon Bali. Keunggulan tanaman kamboja memiliki banyak khasiat sebagai tanaman obat sehingga telah banyak diteliti secara lengkap dari segi fitokimianya tentang berbagai kandungan senyawa aktifnya seperti yang dirangkum oleh Farooque *et al*, 2012. Namun masih sangat sedikit kajian dari aspek biokimianya (khususnya aktivitas enzimatisnya) yang meneliti tanaman tersebut. Salah satu enzim yang telah berhasil diisolasi dari getah tanaman kamboja adalah enzim protease yang diberi nama *plumerin* (Chanda *et al*, 2011). Enzim protease berperan dalam proses degradasi protein contohnya pada industri makanan (roti, susu, hidrolisat protein),

industri deterjen, dan secara tradisional digunakan sebagai pelunak daging. Tingginya harga jual dan pentingnya enzim protease membuat para ilmuwan terpacu untuk mencari sumber-sumber enzim protease baru yang menghasilkan lebih banyak protease dengan aktivitas tinggi. Tanaman merupakan sumber enzim protease yang terbesar yaitu 43,85% (Mahajan and Shamkant, 2010).

Saat ini di wilayah Bali, berkembang berbagai jenis spesies kamboja, bunga kamboja dapat berwarna merah, kuning, putih, dan terdapat beberapa persilangan menghasilkan warna orange, merah tua dan merah muda. Para pakar botani mengemukakan 4 jenis kamboja yakni, *Plumeria obtusa*, *Plumeria pudica*, *Plumeria rubra*, dan *Plumeria acutifolia*. Selain 4 jenis tersebut, dikenal pula *Plumeria rubra* yang memiliki tiga warna dalam satu kelopak yaitu

rubra tricolor dan beberapa persilangan yang memiliki warna bunga dan kelopak bervariasi yaitu rubra hybrida. Spesies *Plumeria rubra* memiliki daun dan kelopak bunga yang meruncing, sedangkan *Plumeria obtusa* memiliki ujung daun dan kelopak bunga yang membulat. Berkembangnya berbagai spesies kamboja menimbulkan ketertarikan untuk meneliti apakah terdapat perbedaan sifat-sifat yang menonjol dari masing-masing spesies tersebut khususnya dari segi enzimatisnya.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk menentukan aktivitas protease yang terkandung pada getah tanaman dari tiga jenis spesies tanaman kamboja yang banyak dibudidayakan di wilayah Bali khususnya wilayah Kecamatan Abiansemal Kabupaten Badung yaitu *Plumeria obtusa L*, *Plumeria pudica Jacq*, dan *Plumeria rubra L*. Aktivitas protease ditentukan dengan metode Kurnitz yang dimodifikasi yaitu dengan cara mereaksikan ekstrak kasar protease dengan substrat kasein selama 30 menit.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan dan materi yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel getah tiga jenis spesies tanaman kamboja (*Plumeria rubra L*, *Plumeria obtusa L*, dan *Plumeria pudica Jacq*) yang dibudidayakan di wilayah kecamatan Abiansemal, Badung, Bali, tirosin, kasein, NaOH, Buffer fosfat (pH 7), Natrium metabisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), dan Asam Trikloroasetat (TCA).

### Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, termos es, alat sentrifugasi, pipet mikro, alat vortex, lemari pendingin, neraca analitik, inkubator, spektrofotometer UV-Vis Genesys 10S.

## CARA KERJA

### Pengumpulan sampel getah kamboja

Pengambilan sampel getah kamboja dilakukan dengan memotong bagian pucuk batang kamboja dengan menggunakan pisau stainless steel, kemudian getah yang menetes ditampung dalam tabung sentrifugasi. Sebanyak 1 mL sampel getah selanjutnya ditambahkan ke dalam 1 mL buffer fosfat pH 7

yang telah mengandung Na-metabisulfit 10% yang bertujuan agar sampel getah terhindar dari proses oksidasi dan disimpan dalam termos es. Getah kemudian disaring dengan kapas untuk memisahkan getah dengan damar yang bersifat lengket, sehingga bagian damarnya akan menempel di dalam kapas, sedangkan bagian cairannya akan lolos yang merupakan getah bebas damar.

### Preparasi ekstrak kasar protease

Proses ekstraksi dilakukan pada suhu 4°C untuk meminimalkan efek denaturasi enzim. Sebanyak 1 mL sampel getah tanaman bebas damar disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C dan supernatan yang dihasilkan siap digunakan sebagai sampel dalam uji aktivitas protease. Ekstrak protease kasar selanjutnya disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C.

### Uji aktivitas ekstrak kasar protease

Sebanyak 1 mL larutan kasein 0,65% ditambahkan dengan 1 mL ekstrak protease kasar lalu divortex dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 50°C, kemudian sebanyak 5 mL larutan TCA 5% ditambahkan ke dalam larutan tersebut lalu divortex kembali dan didiamkan selama 5 menit. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm terhadap larutan blanko. Untuk penentuan jumlah tirosin, maka dilakukan pembuatan kurva standar tirosin dengan memvariasikan konsentrasi tirosin standar menjadi 2,20; 4,40; 6,60; dan 8,80;  $\mu\text{M}$ . Adapun regresi linier kurva standar tirosin yang diperoleh  $y = 0,1070x + 0,0224$  dengan koefisien regresi linier (r) sebesar 0,9905.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil determinasi dan karakter tanaman kamboja

Hasil determinasi yang dilakukan oleh Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya "Eka Karya" Bali-LIPI menunjukkan bahwa tiga spesies tanaman kamboja yang digunakan dalam penelitian ini berturut-turut termasuk ke dalam jenis spesies *Plumeria rubra L*, *Plumeria obtusa L* dan *Plumeria pudica Jacq*. Determinasi tanaman penting dilakukan untuk memastikan ketetapan pemilihan tanaman.

Pada Tabel 1. diberikan penjelasan tentang karakteristik fisik yang membedakan masing-masing spesies tersebut, sedangkan bentuk fisik tiga spesies tanaman kamboja yang digunakan yaitu *Plumeria rubra L*, *Plumeria obtusa L* dan *Plumeria pudica Jacq.* ditunjukkan pada Gambar 1.

### Pengujian aktivitas protease

Uji aktivitas protease yang dilakukan dalam penelitian ini, ditentukan dengan uji kaseinolitik yang memanfaatkan kasein sebagai substrat pada suhu, pH, dan lama waktu tertentu. Reaksi hidrolisis yang terjadi selanjutnya dihentikan dengan menambahkan larutan TCA (asam trikloroasetat). Sehingga enzim dan sisa substrat protein yang tidak terhidrolisis akan terdenaturasi oleh adanya TCA, yang akan mengendap, sedangkan produk hasil hidrolisis yang berupa asam amino (salah satunya yaitu tirosin) tidak mengendap oleh TCA dan akan terlarut dalam supernatan. Tirosin yang larut dalam supernatan tersebut selanjutnya dipisahkan dari enzim dan sisa substrat dengan cara disentrifugasi dan ditentukan serapannya pada 280 nm.

Jumlah asam amino hasil hidrolisis (yang dalam hal ini diwakili oleh tirosin) digunakan untuk menentukan aktivitas protease getah tanaman. Semakin banyak produk tirosin hasil hidrolisis maka semakin besar aktivitas protease ekstrak protease kasar getah tanaman atau semakin banyak pula molekul protein yang dipecah menjadi monomer penyusunnya. Tirosin yang terbentuk dipisahkan dari protein enzim dan sisa substrat dengan melakukan sentrifugasi, setelah itu supernatan yang dihasilkan dapat ditentukan konsentrasi tirosinnya pada  $\lambda$  maks (280 nm). Banyaknya molekul tirosin ( $\mu\text{mol}$ ) selanjutnya dihitung dengan mengkonversikan konsentrasi tirosin hasil hidrolisis ( $\mu\text{mol}$ ). Jumlah tirosin hasil hidrolisis dapat dilihat pada Tabel 2.

### Aktivitas protease pada getah tiga jenis spesies tanaman kamboja

Aktivitas protease (U/mL) dinyatakan dalam unit aktivitas, yaitu satu unit (U) dinyatakan sebagai jumlah protease yang menyebabkan peningkatan satu unit absorbansi

per menit reaksi hidrolisis. Perbandingan aktivitas protease dari tiga spesies tanaman kamboja tersebut dicantumkan pada Tabel 3. Berdasarkan Tabel 3, menunjukkan bahwa spesies *Plumeria rubra L.*, memiliki aktivitas protease rata-rata relatif lebih tinggi daripada dua spesies lainnya yaitu  $0,0398 \pm 0,0003$  U/mL, disusul oleh spesies *Plumeria pudica Jacq.*, yaitu sebesar  $0,0371 \pm 0,0002$  U/mL, dan *Plumeria obtusa L.*, yaitu  $0,0365 \pm 0,0003$  U/mL. Nilai aktivitas protease pada getah ketiga jenis spesies tanaman kamboja ini masih lebih tinggi daripada aktivitas protease yang ditemukan pada getah umbi talas ( $0,0123$  U/mL) dan getah buah labu siam ( $0,0264$  U/mL) (Ratnayani *et al.*, 2015).

Selain itu, nilai aktivitas protease getah kamboja mendekati nilai aktivitas protease relatif getah tanaman *sodom apple (Calotropis procera (Ait.) R.Br.)* yang mencapai  $0,052$  U/mL. Tanaman *sodom apple* merupakan tanaman yang sering digunakan dalam proses pengendapan susu (*milk clotting*) atau pembuatan keju (Oseni and Ekperigin, 2013). Jenis *Plumeria rubra L.* merupakan spesies kamboja yang paling banyak dibudidayakan di wilayah Bali, paling variatif warna bunganya dan paling mudah dibudidayakan. Melimpahnya budidaya tanaman kamboja khususnya spesies *Plumeria rubra L.* di wilayah Bali, menunjukkan bahwa tanaman ini berpotensi sebagai sumber protease alternatif.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Oseni and Ekperigin(2013) ditemukan bahwa bagian getah tumbuhan *Calotropis procera(Sodom apple)* memiliki aktivitas protease yang jauh lebih tinggi dibandingkan bagian tanaman lain (akar, batang muda, daun, buah). Kelebihan lain dari penggunaan protease dari getah kamboja yaitu proses isolasi enzim dari getah relatif lebih sederhana dan efisien, mengingat enzim protease getah merupakan enzim ekstraselular sehingga proses isolasinya dapat dilakukan tanpa tahap pemecahan/lisis sel tumbuhan. Selain itu juga dapat diperoleh isolat enzim yang relatif lebih murni karena dapat dihindari adanya pencampuran enzim lain yang sebagian besar adalah intraselular sehingga tahap isolasi menjadi lebih singkat. Pemanfaatan protease getah diharapkan dapat meningkatkan nilai komersial getah yang selama ini dianggap sebagai limbah dari produk tanaman tersebut.

Tabel 1. Karakteristik Fisik Ketiga Spesies Kamboja.

Spesies Kamboja	Karakteristik
<i>Plumeria obtusa L.</i>	Ujung daun dan kelopak bunga membulat, permukaan daun licin dan mengkilat. Warna hijau daun lebih tua. Warna bunga putih.
<i>Plumeria pudica Jacq.</i>	Bentuk daun bertekuk, diameter batang lebih kecil, mahkota bunga lebih tipis, kumpulan bunga membentuk bouquet pada ujung atas batang. Warna bunga putih. Jenis kamboja ini sering disebut kamboja pagoda.
<i>Plumeria rubra L.</i>	Ujung daun dan kelopak bunga runcing, memiliki paling banyak varietas. Jumlah bunga lebih banyak, dan merupakan spesies yang paling banyak dibudidayakan di wilayah Bali. Jenis spesies ini paling banyak memiliki varietas sehingga menghasilkan berbagai warna bunga yang menarik. Salah satu varietasnya yang terkenal adalah <i>Plumeria rubra var Tricolor</i> di wilayah Bali disebut jepun sudamala dengan aroma harum dan berwarna.

Tabel 2. Jumlah Tirosin Hasil Hidrolisis

Spesies Kamboja	Ulangan	Absorbansi				Rata-rata	Jumlah Tirosin Hasil Hidrolisis (µmol)
		A1	A2	A3			
<i>Plumeria rubra L</i>	1	0,874	0,876	0,882	0,877	0,0564	
	2	0,874	0,891	0,888	0,884	0,0570	
	3	0,886	0,869	0,892	0,882	0,0569	
<b>Rata-rata</b>						<b>0,0568</b>	
<i>Plumeria obtusa L</i>	1	0,810	0,810	0,810	0,810	0,0519	
	2	0,811	0,818	0,813	0,814	0,0522	
	3	0,824	0,820	0,827	0,823	0,0528	
<b>Rata-rata</b>						<b>0,0523</b>	
<i>Plumeria pudica Jacq</i>	1	0,800	0,819	0,821	0,813	0,0530	
	2	0,821	0,812	0,823	0,819	0,0534	
	3	0,823	0,834	0,829	0,829	0,0540	
<b>Rata-rata</b>						<b>0,0535</b>	



Gambar 1. Tiga spesies tanaman kamboja yang menjadi obyek penelitian.  
 (a). *Plumeria obtusa L.* (b). *Plumeria rubra L.* (c). *Plumeria pudica Jacq.*

Tabel 3. Aktivitas protease getah batang tiga jenis spesies tanaman kamboja

Spesies Kamboja	Rata – rata Aktivitas Protease (U/mL)
<i>Plumeria rubra</i>	0,0398 ± 0,00034
<i>Plumeria obtusa</i>	0,0365 ± 0,00032
<i>Plumeria pudica</i>	0,0371 ± 0,00019

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Aktivitas protease *Plumeria rubra L*, *Plumeria pudica Jacq* dan *Plumeria obtusa L* berturut-turut adalah 0,0398 ± 0,00034 U/mL, 0,0371 ± 0,00019 U/mL, dan 0,0365 ± 0,00032 U/mL. Spesies *Plumeria rubra L* memiliki aktivitas protease relative lebih tinggi daripada dua spesies lainnya, Melimpahnya budidaya tanaman kamboja khususnya spesies *Plumeria rubra L* di wilayah Bali, menunjukkan bahwa tanaman ini berpotensi sebagai sumber protease alternatif.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM UNUD atas bantuan dana yang diberikan melalui Hibah Penelitian Dosen Muda dana DIPA-PNPB dengan Kontrak Nomor: 1293/UN14.1.28.1/PP/2015, serta semua pihak yang memberikan dukungan dan saran hingga penelitian ini terselesaikan dengan baik.

### DAFTAR PUSTAKA

Chanda, I., S. K. Basu, S. K. Dutta, and S. R. C. Das, 2011, A Protease Isolated from

the Latex of *Plumeria Rubra* Linn (Apocynaceae) 1: Purification and Characterization, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (6): 705-711

Farooque, A.M.D., A. Mazumder, S. Shambhawe, and R. Mazumder, 2012, Review On *Plumeria Acuminata*, *International Journal Of Research In Pharmacy and Chemistry*, 2 (2): 467- 469.

Mahajan, R.T., and B.B. Shamkant, 2010, Biological aspects of proteolytic enzymes, *Journal Pharmacy Research*, 3 (9): 2048-2068.

Oseni, O. A., and M. M. Ekperigin, 2013, Partial Characterization of Proteolytic and Milk Clotting Enzymes in Sodom Apple *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. (Asclepiadaceae) Plant, *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3: 256-263.

Ratnayani, K., S. Juwarni, A. A. I. A. M. Laksmiwati, 2015, Uji Aktivitas Protease Getah Labu Siam dan Talas Serta Perbandingannya Terhadap Getah Pepaya, *Jurnal Kimia*, 9 (2): 147-152.