

EKSTRAKSI, PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI ALKALIN PROTEASE DARI LIMBAH KULIT BUAH NAGA MERAH (*Hylocereus polyrhizus*)

Intan Rosalina Suhito, Maria Goretti M. Purwanto

Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya

E-mail: intanrosalinasuhito@gmail.com, maria_gmp@staff.ubaya.ac.id

Abstract

Red dragon fruit is one of famous fruits in Indonesia. High level of red dragon fruit consumption is followed by the high amount of the fruit peel waste. Red dragon fruit peel contains many important compounds, one of them is alkaline protease. Therefore, red dragon fruit peel can be used as an alternative to get an alkaline protease. This research has some purposes, i.e. to characterize the best pH and temperature for the alkaline protease, to determine the most efficient purification process for the protease and to determine the molecular size of alkaline protease. This research began with obtaining the crude extract of alkaline protease from red dragon fruit peel, followed by pH and temperature characterization, partial purification, i.e. ammonium sulfate precipitation 20%-80%, dialysis and Ion Exchange Chromatography using Biorex Cation Exchange Resins, and finally SDS PAGE. The result showed that the optimum temperature for alkaline protease activity was 60°C and the optimum pH for alkaline protease activity was 8. In the final step of purification, namely ion exchange chromatography (IEC), the specific activity value was $6,2 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\mu\text{g}\cdot\text{min}$, indicating a 3,29 fold purification of the initial crude extract. In this research, the alkaline protease showed a molecular mass of 23 kDa.

Keywords: red dragon fruit peel, alkaline protease and purification of enzyme

PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia memiliki ketertarikan yang tinggi terhadap konsumsi *Hylocereus polyrhizus* atau yang dikenal dengan istilah buah naga merah. Hasil riset menunjukkan bahwa kebutuhan buah naga di Indonesia mencapai 200-400 ton/tahun (Winarsih, 2007). Seiring dengan bertambah tingginya tingkat konsumsi masyarakat terhadap buah naga merah, maka limbahnya juga meningkat yaitu berupa kulit buah naga merah yang umumnya

mencapai 33% dari buah naga utuh, namun sejauh ini tidak memiliki nilai komersial dan justru menjadi limbah dan polutan (Gian et al., 2012). Oleh sebab itu, pemanfaatan kulit buah naga merah diperlukan agar dapat meningkatkan nilai guna dari limbah tersebut.

Berdasarkan penelitian Amid et al. (2013-2014) dan Agarwal et al. (2004), kulit buah naga mengandung alkaline protease termotabil. Protease merupakan golongan enzim hidrolase

yang berperan dalam pemecahan ikatan peptida pada molekul protein (Joanitti et al., 2006). Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan karakterisasi pH serta suhu optimum dari ekstrak kasar alkalin protease yang berasal dari limbah buah naga yang berasal dari kecamatan Bululawang, Malang, Jawa Timur. Selain itu, tujuan lainnya adalah untuk mengetahui metode pemurnian yang efisien bagi ekstrak kasar alkalin protease yang diperoleh.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain makro sentrifuge (Thermo Scientific), mikro sentrifuge (Thermo Scientific), stirrer, waterbath (YNC WBL), tabung selofan dengan MWCO 6000-8000 (SERVAPOR), pH meter (Fisher Scientific), spektrofotomer UV-VIS (Thermo Scientific), kolom kromatografi, dan perangkat SDS-PAGE (Bio-Rad). Bahan-bahan yang diperlukan antara lain kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang ditumbuhkan di daerah Kecamatan Bululawang, Malang, Jawa Timur, Resin Biorex (Bio-Rad), kasein (Nacalai Tesque), Trichloroacetic Acid (TCA) (Merck), akuades, padatan amonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ (Merck), etanol 95% (J. T. BAKER), asam fosfat 85% (Merck), Bovine Serum Albumin (BSA) (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), NaH_2PO_4 (Merck), NaCl (Merck), tabung selofan dengan MWCO 6000-8000 (SERVAPOR), akrilamid (Merck), bis akrilamid (MP Biochemicals), tris base (AMRESCO), HCl (SAP Chemicals), SDS (Promega), TEMED (Merck), 10% APS (Merck), gliserol (Merck), metanol

(Merck), β -mercaptoetanol (Merck), marker SDS PAGE (Vivantis), comassie Blue G-250 (AMRESCO).

Ekstraksi Alkalin Protease (crude extract) dari Kulit Buah Naga Merah

Sebanyak 750 gram kulit buah naga merah dicuci dan direndam dalam akuades steril, lalu dikeringkan dengan kertas tisu. Selanjutnya, buah naga merah bersih diambil kulitnya dan dipotong kecil-kecil $\pm 1 \text{ cm}^2$, kemudian ditambahkan buffer sodium asetat pH 5 yang telah dibekukan dengan perbandingan 1:4 dan dicampur dengan blender selama 2 menit pada suhu $2,5^\circ\text{C}$. Campuran kulit buah naga merah dan buffer sodium asetat selanjutnya difiltrasi dengan menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C (Amid et al., 2014). Diperoleh supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim alkalin protease, lalu disimpan pada suhu 4°C untuk tahapan purifikasi berikutnya.

Karakterisasi pH dan Suhu Terbaik Ekstrak Kasar Enzim

Karakterisasi pH dilakukan pada ekstrak kasar enzim dengan mengukur nilai aktivitas enzim pada perlakuan variasi buffer konsentrasi 0,01 M pada pH 7, 8, 9, 10, dan 11. Sedangkan karakterisasi suhu dilakukan dengan mengukur nilai aktivitas enzim pada perlakuan variasi suhu pada 50°C , 55°C , 60°C , 65°C , 70°C , 75°C dan 80°C . Aktivitas enzim ditentukan dengan metode Casein Assay dengan cara 400 μl larutan kasein direaksikan dengan 200 μl larutan ekstrak kasar alkalin protease serta ditambahkan 700 μl

larutan buffer pH optimum 0,01 M. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Sesudah diinkubasi, reaksi dihentikan dengan menambahkan TCA 1,2 M sebanyak 500 μ l. Kemudian larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan diukur dengan spektrofotometer dengan menggunakan kuvet kuarsa pada panjang gelombang 275 nm (Bergmeyer & Grassl, 1983). Pengukuran kadar protein dilakukan dengan mengambil 50 μ l sampel alkalin protease kemudian ditambahkan reagen Bradford sebanyak 2,5 ml lalu dihomogenkan dengan vortex. Kemudian diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

Tahap Purifikasi Enzim

Purifikasi terhadap ekstrak kasar alkalin protease dilakukan dengan presipitasi menggunakan amonium sulfat, dialisis, dan Ion Exchange Chromatography (IEC). Ekstrak kasar enzim didapatkan secara bertahap pada suhu 4°C dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60%, dan 80%. Pada tahap dialisis digunakan membran dialisis berupa tabung selofan dengan Molecular Weight Cut Off (MWCO) 6000-8000. Sebelum dilakukan metode IEC, diperlukan uji penentuan titik isoelektrik (pI) dengan cara sebanyak 1 ml sampel dengan seri buffer (pH 7,6; 7,8; 8; dan 8,2) ditetesi dengan 5 tetes 0,1% Cationic Wetting Agent (CTAB). Pada tahap IEC, digunakan resin Biorex sebanyak 2 gram kemudian dicampur dengan larutan buffer 0,01 M

yang memiliki pH tertentu dengan pertimbangan nilai pI dari enzim.

Penentuan Ukuran Enzim

Penentuan ukuran molekul alkalin protease dilakukan dengan visualisasi menggunakan SDS PAGE. Komponen separating gel terdiri dari 3,125 ml akrilamid, 2,75 ml Tris HCl pH 8,8 1 M, 1,505 ml akuades, 75 μ l SDS 10%, 75 μ l APS 10%, dan 6,25 μ l TEMED. Komponen stacking gel antara lain 0,45 ml akrilamid-bis 30%, 0,38 ml Tris HCl pH 6,8 1 M, Akuabides 2,11 ml, 30 μ L SDS 10%, 5 μ L TEMED, dan 30 μ L APS 10%. Cara preparasi sampel yaitu ditambahkan loading buffer dengan perbandingan 1:1 dengan kadar protein yang dimasukkan tiap well sebesar 40 μ g, lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Proses running diatur pada tegangan listrik sebesar 100 V. Tahap staining gel dilakukan dengan larutan staining yang terdiri dari 1 gram Coomassive Blue R- 250, 450 ml metanol, 450 ml akuades, dan 100 ml asam asetat glasial. Tahap destaining dilakukan dengan larutan destaining yang terdiri dari 100 ml metanol, 100 ml asam asetat glasial, dan 800 ml akuades.

Analisa Data

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental di laboratorium yang didesain dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan replikasi sebanyak 3 kali. Data parametrik meliputi data aktivitas dan aktivitas spesifik. Mula-mula data diuji terlebih dahulu dengan uji normalitas dan homogenitas untuk menentukan apakah data berdistribusi normal dan homogen. Jika data berdistribusi normal dan

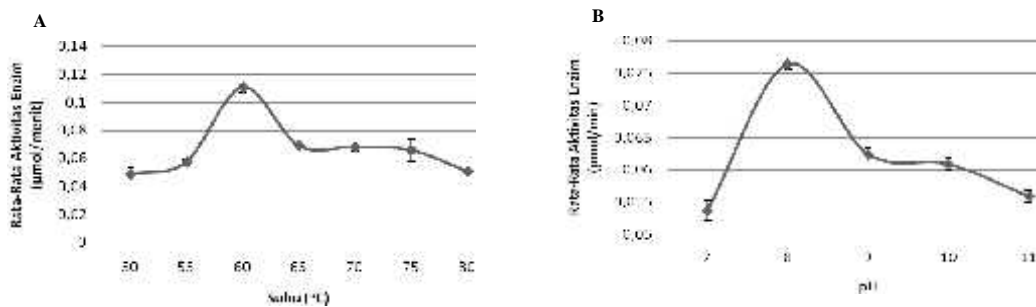
homogen, data diuji dengan metode ANOVA. Jika data tidak berdistribusi normal atau tidak homogen, data diuji

dengan statistik non-parametrik Kruskal-Wallis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Suhu dan pH Terbaik Enzim Alkalin Protease

Suhu dan pH terbaik ditentukan dari nilai aktivitas yang paling tinggi. Hasil uji dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Grafik Karakterisasi Enzim, (A) Suhu Terbaik Enzim Alkalin Protease, (B) pH Terbaik Enzim Alkalin Protease

Aktivitas rata-rata yang paling tinggi diperoleh pada suhu 60°C dan pH 8. Hasil uji statistika menunjukkan bahwa suhu terbaik untuk enzim alkalin protease adalah suhu 60°C, sedangkan pH terbaik enzim alkalin protease yaitu pH 8. Hasil penelitian ini sedikit berbeda dengan Amid et al. (2014) yang menyebutkan bahwa suhu terbaik untuk aktivitas enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah adalah 70°C serta sifatnya termostabil dengan pH terbaik yaitu pH 8. Adanya perbedaan tersebut dapat disebabkan karena adanya perbedaan kondisi wilayah buah naga merah tersebut tumbuh dan berkembang. Suhu dan pH terbaik enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah ini juga berbeda dengan enzim alkalin protease yang diperoleh dari kulit buah lain, misalnya kulit buah mangga yang memiliki suhu terbaik pada

80°C dan pH terbaik pada pH 10 (Kusuma, 2014). Enzim yang berasal dari sumber lain seperti golongan fungi juga belum tentu memiliki karakteristik yang sama dengan enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah. Salah satu contohnya adalah enzim serin protease yang diperoleh dari *Termitomyces albuminosus* yang memiliki suhu terbaik yang sama dengan enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah yaitu 60°C, namun memiliki pH terbaik yang berbeda yaitu pada pH 10,6 (Zheng et al., 2011). Maka dari itu, enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah ini menguntungkan karena suhu terbaiknya tidak terlalu tinggi dibandingkan beberapa enzim lainnya. Demikian juga kondisi pH terbaiknya tidak memerlukan kondisi alkalin yang terlalu ekstrim apabila dibandingkan dengan beberapa enzim sejenisnya.

Proses Pemurnian Ekstrak Kasar Alkalin Protease

Data pada setiap tahap pemurnian ekstrak kasar enzim dengan menggunakan amonium sulfat dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Data Pemurnian Ekstrak Enzim Alkalin Protease dengan Pengendapan Amonium Sulfat

Tahap-an	Volume sampel (ml)	Tirosin ($\mu\text{g/ml}$)	Protein per ml ekstrak (μg)	Protein total (μg)	Aktivitas ($\mu\text{mol/min}$)	Aktivitas total	Aktivitas Spesifik ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}\cdot\text{min}$)	Yield (%)	Purification factor
Awal	50	90,481	777,22	38.861,11	0,1498	7,49054	0,00019	100	1
20	13,5	23,221	681,67	9.202,50	0,0384	0,51904	0,00006	6,93	0,30
40	9,5	33,990	628,33	5.969,17	0,0563	0,53465	0,00009	7,14	0,47
60	5	53,798	599,44	2.997,22	0,0891	0,44537	0,00015	5,95	0,78
80	3	64,952	508,33	1.525,00	0,1075	0,32263	0,00021	4,31	1,11
Super-natan	45	0	177,22	7.975,00	0	0	0	0	0

Pelet pada tingkat pengendapan 80% memiliki nilai aktivitas spesifik sebesar $2,1 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\mu\text{g}\cdot\text{menit}$. Nilai aktivitas spesifik pada pengendapan 80% tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan nilai aktivitas spesifik pada ekstrak kasar enzim alkalin protease maupun fraksi pengendapan amonium sulfat lainnya, sehingga mengindikasikan bahwa hasil pengendapan 80% lebih murni daripada awal yang tampak pada nilai purification factor-nya sebesar 1,11. Akan tetapi yield pada hasil pengendapan 80% mengalami penurunan drastis hingga 4,31%. Berdasarkan fenomena tersebut, dapat diketahui bahwa proses pemurnian enzim alkalin protease dengan menggunakan presipitasi amonium sulfat tidaklah cukup berarti, hal ini serupa

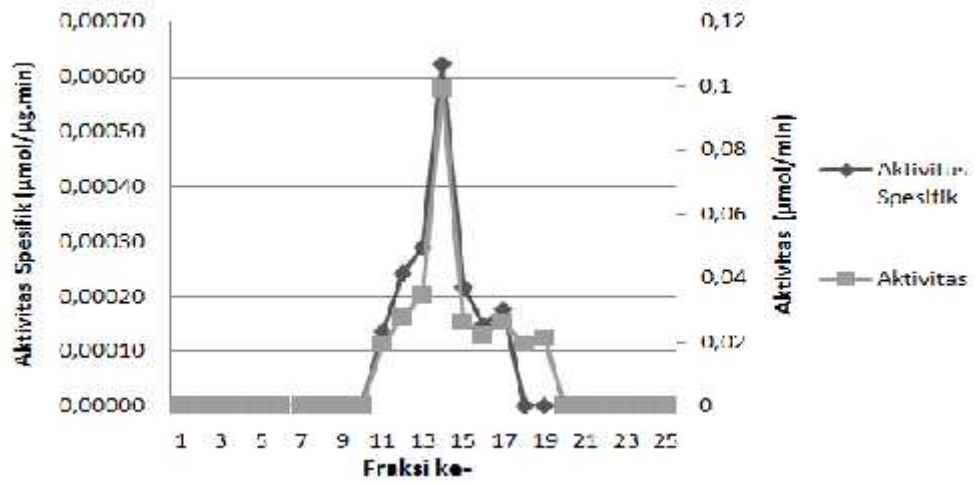
dengan kesimpulan yang didapat oleh Purwanto (2015).

Oleh sebab itu, dilakukan proses pemurnian ekstrak kasar enzim alkalin protease secara langsung dengan metode IEC. Pada tahap ini proses pemurnian dengan menggunakan IEC bertujuan untuk memisahkan protein berdasarkan muatan. Adapun enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah ini bermuatan positif, sehingga resin yang digunakan pada penelitian ini adalah resin kation exchanger yaitu resin biorex.

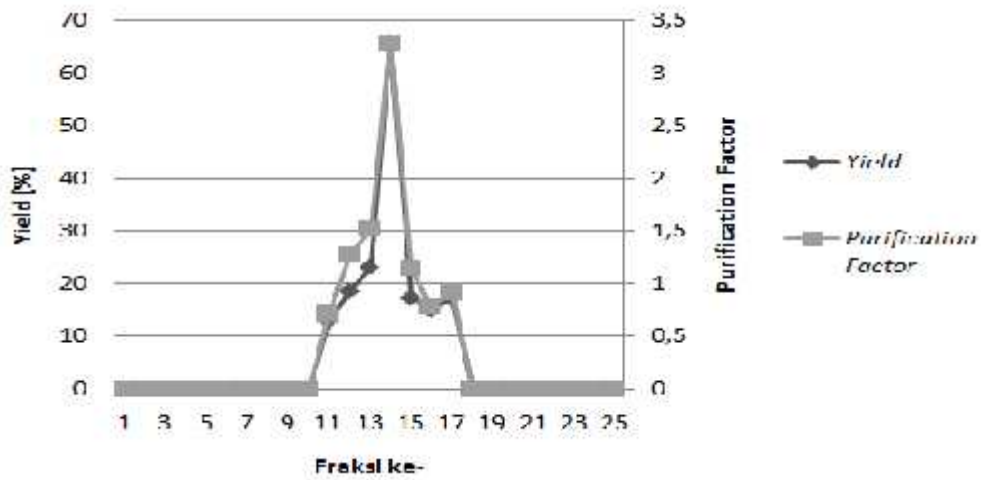
Pada tahap IEC, fraksi yang diperoleh saat proses elusi dikumpulkan dan diuji aktivitas dan kadar proteinnya. Pengujian aktivitas dilakukan dengan uji Casein Assay, sedangkan kadar proteinnya diuji dengan metode Bradford dengan pembacaan pada panjang gelombang 595 nm. Pada hasil

IEC ini didapatkan bahwa fraksi ke-14 memiliki nilai aktivitas dan aktivitas spesifik paling tinggi daripada fraksi

lainnya. Hasil IEC dapat dilihat pada **Gambar 2** dan **Gambar 3**.

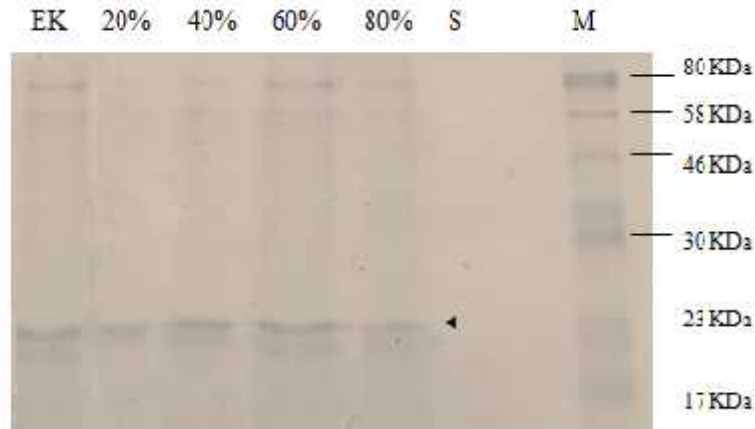


Gambar 2. Grafik Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Fraksi IEC

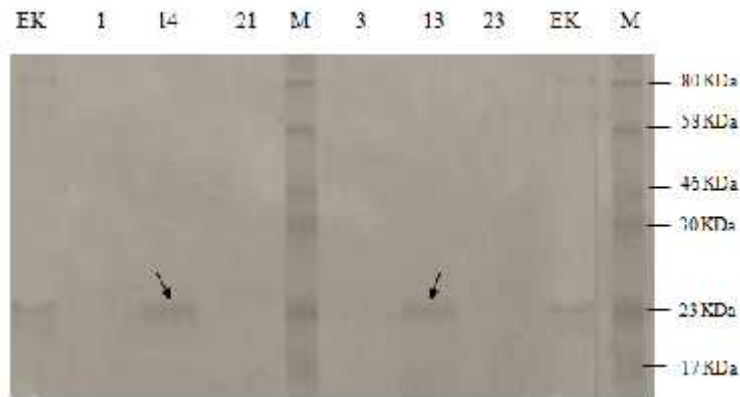


Gambar 3. Grafik Yield dan Purification Factor Fraksi IEC

Penentuan Berat Molekul Protein dengan SDS PAGE



Gambar 4. Hasil SDS PAGE Ekstrak Kasar hingga Pengendapan 80%. M: Marker protein 7 kDa - 175 kDa; S: Supernatan pengendapan 80%; 20%-80%: Pengendapan amonium sulfat dari tingkat kejenuhan 20% -80%; EK: Ekstrak kasar enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah



Gambar 5. Hasil SDS PAGE Fraksi IEC. M: Marker protein 7 kDa - 175 kDa; 1, 2, 13, 14, 21, 23: Fraksi-fraksi IEC yang dipilih; EK: Ekstrak kasar enzim alkalin protease dari kulit buah naga merah

Pada hasil SDS PAGE ditemukan bahwa pada well hasil pengendapan 20-80% (**Gambar 4**) diperoleh 1 band yang tampak jelas berukuran sekitar 23 kDa dan juga 2 band tipis di kisaran 58-80 kDa. Kemudian pada well hasil IEC ekstrak kasar enzim fraksi ke-13 dan 14

(**Gambar 5**) ditemukan adanya 1 band yang jelas pada ukuran sekitar 23 kDa.

Pada penelitian ini ditemukan bahwa terdapat 1 band yang jelas berukuran sekitar 23 kDa dan diduga merupakan alkalin protease yang berbeda jenis dengan penelitian Amid et al. (2014) yang menemukan satu band

pada ukuran sekitar 27 kDa. Alkalin protease yang diperoleh dari sumber lain juga berbeda-beda ukurannya, misalnya pada kulit buah mangga yang mengandung enzim alkalin protease berukuran sekitar 60 kDa dan 65 kDa (Kusuma, 2014), atau pada fungi *Termitomyces albuminosus* yang menghasilkan serin protease berukuran sekitar 30 kDa (Zheng et al., 2011).

Perbedaan ukuran molekul alkalin protease tersebut mungkin dikarenakan sumbernya yang berbeda, metode dan kondisi purifikasi yang berbeda, serta kondisi pertumbuhan tanaman buah naga merah yang berbeda pula. Selain itu, 2 band tipis di kisaran 58-80 kDa yang tampak pada visualisasi hasil pengendapan 20-80% diduga merupakan protein lain yang juga terkandung di dalam ekstrak kasar. Protein tersebut bukanlah protein target yang ingin didapat pada penelitian ini, di mana yang menjadi protein target kali ini adalah alkalin protease berukuran sekitar 20-27 kDa.

Adapun nilai purification factor akhir yang diperoleh pada penelitian ini yaitu sebesar 3,29 dengan nilai yield yaitu 66,05%. Nilai purification factor pada akhir tahap pemurnian tersebut menunjukkan bahwa proses pemurnian

dengan metode IEC bermanfaat pada penelitian ini. Selain itu, nilai yield-nya juga cukup tinggi sehingga dapat dikatakan bahwa pemurnian dengan metode IEC memberikan hasil yang berguna. Hal ini juga tampak dari profil SDS PAGE secara menyeluruh (Gambar 4 dan 5) yang menunjukkan bahwa hanya ada 1 band protein spesifik yang dihasilkan dari tahap IEC apabila dibandingkan dengan ekstrak kasarnya.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu enzim alkalin protease yang didapatkan dari kulit buah naga merah asal kecamatan Bululawang, Malang, Jawa Timur memiliki suhu terbaik sebesar 60°C dan pH terbaik pada pH 8. Metode pemurnian yang efisien bagi ekstrak kasar alkalin protease dari limbah kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) asal Malang yaitu purifikasi ekstrak kasarnya dengan metode Ion Exchange Chromatography (IEC) secara langsung dengan nilai purification factor akhirnya sebesar 3,29 dan yield sebesar 66,05%. Diperoleh hasil 1 band protein dan diperkirakan bahwa ukuran enzim alkalin protease pada penelitian ini berkisar 23 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, D. Patidar., P. Banerjee., T. and Patil., S. 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem.*, 39: 977-981.
- Amid, M., & Zohdi, N. K. 2013. Optimization of Extraction of Novel Pectinase Enzyme Discovered in Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Peel. *Molecules*, 18, 14366-14380.
- Amid, M., Manap, M. Y., & Zohdi, N. K. 2014. Purification and Characterization of Alkaline-Thermostable Protease Enzyme from Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Waste: A Potential Low Cost of the Enzyme. *Biomed Research International*.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., and Stryer L. 2002. *Biochemistry Fifth Edition*. New York, W H Freeman.
- Gian, C., Tenore, E.N., Adriana, B. 2012. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Funct. Foods*, 4, 129–136.
- Joanitti, G., S.M., F., & L.P., S. 2006. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. *Current Enzyme Inhibition*, 2 (3), 199-217.
- Kusuma, Danny. 2014. *Isolasi, Karakterisasi dan Purifikasi Enzim Serin Protease dari Ekstrak Kasar Kulit Mangga Gadung*. Surabaya: Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya.
- Purwanto, M.G.M. 2015, The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification Process of Papain Crude Extract, *Procedia Chemistry*, 18: 127 – 131.
- Winarsih, S. 2007. *Mengenal dan Membudidayakan Buah Naga*. Aneka Ilmu, Semarang.
- Zheng, Suyue, Hexiang Wang, Guoqing Zhang. 2011. A Novel Alkaline Protease from Wild Edible Mushroom *Termitomyces albuminosus*. *Biochimica Polonica*, 58: 269-273.