

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) merupakan tanaman yang mudah tumbuh dan telah menyebar di daerah Afrika dan seluruh Asia yang sebagian besar memiliki iklim tropis seperti di Indonesia. Tanaman kelor juga banyak dijumpai di Aceh, Kalimantan, Sulawesi dan Kupang (Sandi et al., 2019). Kelor merupakan tumbuhan dari suku Moringaceae dan secara botani dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| Kingdom     | : Plantae                      |
| Subkingdom  | : Tracheobionta                |
| Superdivisi | : Spermatophyta                |
| Divisi      | : Magnoliophyta                |
| Kelas       | : Magnoliopsida                |
| Sub Kelas   | : Dilleniidae                  |
| Famili      | : Moringaceae                  |
| Genus       | : Moringa                      |
| Spesies     | : <i>Moringa oleifera</i> Lam. |



Sumber : Isnain & Nurhaedah, 2017

Gambar 2.1 Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

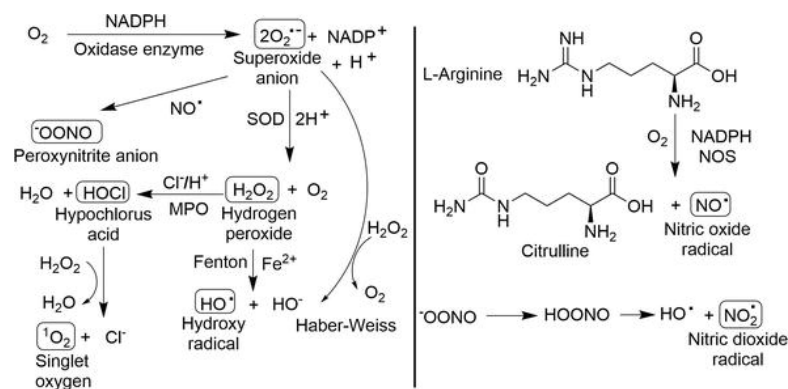
Daun kelor memiliki aktivitas sebagai agen antidiabetes, antikanker, neuroprotektan, antimikroba (Gopalakrishnan et al., 2016), antiasma, antioksidan, antiatherosklerotik, menurunkan tekanan darah dan kolesterol, analgesik dan antidiare (Islam et al., 2021). Daun kelor kaya akan sumber antioksidan karena mengandung senyawa seperti *hexadonic acid*, *phytol* dan *DL-alpha-tocopherol* (Kashyap et al., 2022). Tingginya aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh daun kelor tidak hanya karena adanya kandungan metabolit sekunder tetapi juga karena adanya kandungan antioksidan lain yaitu antioksidan enzimatis. Daun kelor memiliki

aktivitas enzim antioksidan peroksidase (POD), katalase (CAT) dan superoksida dismutase (SOD) berturut-turut 76733,3; 2709,0; 204,0 U/g (Rai et al., 2017).

## 2.2 Radikal Bebas

ROS bersifat sangat reaktif dan mengandung oksigen yang merupakan hasil reduksi molekul oksigen yang tidak lengkap dalam sel. ROS dapat berupa radikal bebas, atau molekul yang memiliki kapasitas untuk menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas terdiri dari atom atau molekul dengan elektron yang tidak berpasangan di kulit terluarnya sehingga tidak stabil, sangat reaktif dan rentan untuk menarik elektron dari molekul lain untuk menstabilkan diri (Shields et al., 2021). ROS merupakan hasil metabolisme aerobik yang tidak dapat dihindari dan utamanya diproduksi di sitosol, mitokondria, peroksisom, mikrosom, neutrofil, makrofag, retikulum endoplasma, lisosom dan membran plasma. Selain itu, ROS dapat terbentuk akibat paparan eksternal termasuk faktor lingkungan seperti defisiensi nutrisi, rokok, cahaya ultraviolet (UV) dan radiasi (Jamshidi-Kia et al., 2020; Zulaikhah, 2017).

ROS memiliki peran ganda yang didasarkan pada efek menguntungkan dan efek merusak pada sistem biologis. Efek ROS yang menguntungkan terjadi pada konsentrasi rendah hingga sedang dimana ROS merupakan hal esensial yang dibutuhkan dalam fungsi fisiologis normal seperti ekspresi gen, pertumbuhan sel dan pertahanan dalam melawan infeksi. Terkadang ROS berperan sebagai zat penstimulasi proses biokimia yang terjadi pada sel seperti biosintesis molekul tiroksin dan prostaglandin. ROS juga dapat menyebabkan efek yang merugikan dimana apabila jumlah ROS berlebihan dapat merusak membran sel dan lipoprotein dimana proses ini disebut peroksidasi lipid. Protein juga dapat dirusak oleh ROS yang menyebabkan perubahan struktur dan penurunan aktivitas enzim. Radikal bebas juga dapat merusak DNA yang dapat menyebabkan mutasi sel (Shinde et al., 2012).



Sumber : Moussa et al., 2020

Gambar 2.2 Generasi ROS dan RNS pada Spesies Hidup

ROS dapat berupa komponen radikal seperti hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ), superoksida ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), oksida nitrit ( $\text{NO}^\bullet$ ), dan peroksil ( $\text{RO}_2^\bullet$ ), serta dapat komponen oksidan non-radikal seperti

asam hipoklorit (HOCl), peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oksigen singlet <sup>1</sup>Δg (1O<sub>2</sub>), dan ozon (O<sub>3</sub>). ROS yang non-radikal tidak memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga cenderung kurang reaktif. Meskipun kurang reaktif, ROS yang non-radikal masih bisa tereduksi secara tidak sempurna sehingga dapat mengalami reaksi redoks yang menghasilkan radikal bebas (Jamshidi-Kia et al., 2020; Zulaikhah, 2017).

### 2.2.1 Superoksida (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

Radikal superoksida dianggap sebagai ROS utama dan dapat memproduksi ROS sekunder melalui interaksi dengan molekul lain baik secara langsung maupun tidak langsung oleh reaksi enzimatik atau reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Superoksida bergantung pada lingkungan dan pH, dimana pada pH rendah radikal superoksida masih ada dalam bentuk yang tidak diinginkan yaitu hidroperoksil. Bagaimanapun secara fisiologis, hidroperoksil memiliki peran yang penting karena hidroperoksil mudah berpenetrasi pada membran biologis daripada dalam bentuk superoksida. Secara spesifik, radikal superoksida memiliki kemampuan dismutasi dimana ketika satu radikal superoksida yang bereaksi dengan superoksida lain dapat membentuk oksigen dan hidrogen peroksida (Ifeanyi, 2018).

### 2.2.2 Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dibentuk secara in vivo melalui reaksi dismutasi yang dikatalisis oleh enzim superoksida dismutase (SOD). Pada kondisi fisiologis normal, peroksisom merupakan penghasil dan pengguna utama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dapat mengganggu keseimbangan homeostatis. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bukan termasuk radikal bebas tetapi memiliki elektron bebas yang dapat merusak sel pada konsentrasi yang relatif kecil (10 μM), tetapi pada konsentrasi tinggi, energi pada sel yang memproduksi enzim seperti gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase menjadi tidak aktif. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> memiliki kelarutan yang tinggi pada larutan air sehingga hidrogen peroksida sangat mudah berpenetrasi ke membran biologis. Ketika H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bertemu dengan ion logam transisi tereduksi seperti besi (Fe<sup>2+</sup>) atau tembaga (Cu<sup>+</sup>), maka dapat terjadi reaksi Fenton dan menghasilkan produksi radikal hidroksil (OH<sup>•</sup>) yang bertindak sebagai oksidan kuat (Ifeanyi, 2018; Phaniendra et al., 2015).

### 2.2.3 Radikal Hidroksil (OH<sup>•</sup>)

Radikal hidroksil (OH<sup>•</sup>) merupakan bentuk netral dari ion hidroksida dan merupakan radikal bebas yang sangat reaktif. Radikal hidroksil (OH<sup>•</sup>) memiliki waktu hidup yang lebih rendah (10<sup>-9</sup>) dibandingkan radikal superoksida yang relatif lebih stabil, karenanya OH<sup>•</sup> dapat bereaksi dengan molekul pada afinitas yang tinggi. OH<sup>•</sup> dapat bereaksi kuat dengan molekul organik maupun non-organik termasuk DNA, protein, lipid

dan karbohidrat sehingga menyebabkan kerusakan berat pada sel dibandingkan bentuk ROS lain.  $\text{OH}^\bullet$  diproduksi melalui dua reaksi biokimia utama yaitu reaksi Haber-Weiss dan reaksi Fenton. Pada kondisi dibawah tekanan, radikal superoksida melepaskan “*free iron*” dari molekul yang mengandung besi dan dibutuhkan untuk bereaksi dengan hidrogen peroksida dalam reaksi Fenton untuk membentuk radikal hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ). Sementara pembentukan radikal hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ) pada reaksi Haber-Weiss terjadi karena adanya reaksi antara radikal superoksida dengan hidrogen peroksida (Ifeanyi, 2018; Phaniendra et al., 2015).

ROS yang dibentuk sebagai hasil produk metabolisme dari mitokondria ini memiliki efek yang berbahaya bagi sel. Ketika tingkat ROS dalam tubuh lebih besar dibandingkan pertahanan antioksidan endogen, akan terjadi keadaan stres oksidatif yang menyebabkan gangguan pada keadaan redoks normal dalam lingkungan sel. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan hingga kematian sel. Parameter yang umumnya dikarakterisasi ketika terjadi stres oksidatif yaitu kadar radikal dan oksidan, penurunan kadar antioksidan, ketidakseimbangan serta kerusakan oksidatif pada komponen sel seperti lipid, protein dan DNA (Ghosh et al., 2018).

Secara *in vivo* DNA memiliki ion logam transisi seperti  $\text{Fe}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^+$  karena adanya muatan negatif yang sangat kuat dari gugus fosfat.  $\text{Fe}^{2+}$  yang terikat pada fosfat dalam menghasilkan  $\text{OH}^\bullet$  karena berikatan dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  dapat cukup bebas melintasi plasma dan membran intraseluler, apabila mencapai nukleus  $\text{H}_2\text{O}_2$  dapat bereaksi dengan ion logam tersebut untuk menghasilkan  $\text{OH}^\bullet$  langsung pada DNA, menyebabkan kerusakan oksidatif langsung atau kerusakan “*site specific*” (Halliwell et al., 2021). Kerusakan pada DNA oleh radikal hidroksil dapat menyebabkan karsinogenesis yaitu proses perubahan sel dari sel normal menjadi sel ganas. Karsinogenesis merupakan proses kompleks dan bertingkat dengan terbentuknya populasi sel abnormal yang mengarah ke mutasi dan perubahan pola ekspresi gen serta menyebabkan penyakit kanker (Simanjuntak, 2012).

### 2.3 Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai substansi yang mampu menetralkan efek berbahaya dari radikal bebas pada tubuh manusia (Jeeva et al., 2015). Secara kimia, antioksidan juga didefinisikan sebagai substansi dalam konsentrasi kecil apabila dibandingkan dengan substrat yang dapat mengoksidasi, memiliki kemampuan dalam menunda atau mencegah oksidasi dari substrat tersebut (Bartosz, 2010). Menurut antioksidan adalah inhibitor oksidasi yang dapat melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas oksigen reaktif dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas yang tak reaktif dan relatif stabil. Antioksidan

dapat menstabilkan radikal bebas yang awalnya tidak stabil dengan mendonorkan satu elektron bebas ke radikal bebas atau dengan menerima satu elektron, sehingga melindungi dan mencegah sel, lipid, protein serta DNA dari kerusakan radikal bebas. Antioksidan dapat bersifat “radikal” ketika mendonorkan elektron untuk radikal bebas, tetapi sifatnya tidak reaktif dan dapat distabilkan dengan antioksidan lain (Andarina & Djauhari, 2017).

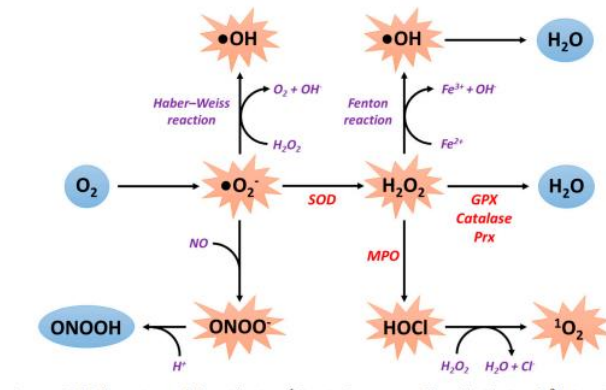
Antioksidan dapat dikategorikan menjadi beberapa jenis kategori seperti berdasarkan kelarutan pada air atau lipid, berdasarkan ukuran (antioksidan molekul kecil dan antioksidan molekul besar), dan berdasarkan cara kerjanya (primer dan sekunder), tetapi pembagian yang paling sering dipakai adalah antioksidan non-enzimatis dan enzimatis (Andarina & Djauhari, 2017; Nimse & Pal, 2015).

### 2.3.1 Antioksidan Non-Enzimatis

Mekanisme kerja antioksidan non-enzimatis adalah dengan mengganggu reaksi rantai radikal bebas. Lini pertahanan pertama antioksidan non-enzimatis adalah dengan menghambat pembentukan spesies reaktif baru dengan mengikat ion logam transisi (besi dan tembaga) oleh protein. Lini pertahanan kedua dalam melawan ROS yang melibatkan antioksidan non-enzimatis dengan kemampuan menonaktifkan radikal dan oksidan secara cepat. Beberapa contoh antioksidan non-enzimatis seperti vitamin C, vitamin E, polifenol/fenolik pada tumbuhan (flavonoid, asam fenolat, stilbenes, lignans), karotenoid, glutathione, mineral (Zn, Mn, Cu, Se), dan lainnya (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018; Nimse & Pal, 2015). Senyawa fenolik pada tumbuhan sangat potensial sebagai antioksidan karena senyawa fenolik memiliki satu (fenol) atau lebih (polifenol) cincin fenol, yaitu gugus hidroksi yang terikat pada cincin aromatis sehingga mudah teroksidasi dengan menyumbangkan atom hidrogen pada radikal bebas dan membentuk radikal fenoksi yang stabil pada reaksi oksidasi (Dhurhania & Novianto, 2018).

### 2.3.2 Antioksidan Enzimatis

Molekul antioksidan sangat esensial dalam melindungi oksidasi radikal, ketika antioksidan tidak dalam keadaan seimbang maka radikal bebas akan diproduksi secara terus menerus pada sel. Enzim antioksidan memiliki berbagai manfaat pada sel salah satunya adanya mekanisme regulasi yang kuat dari enzim antioksidan dapat menginduksi, menghambat atau mengaktifkan beberapa mekanisme seperti transkripsi, translasi, atau mekanisme kontrol post-translasi (Sadi & Sadi, 2010). Enzim antioksidan bekerja dengan memecah dan menghilangkan radikal bebas. Enzim antioksidan akan mengubah produk oksidatif yang berbahaya menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan air, pada beberapa proses yang melibatkan kofaktor seperti tembaga, Zn, Mn, dan besi (Nimse & Pal, 2015).



Sumber : Dubois-deruy et al., 2020

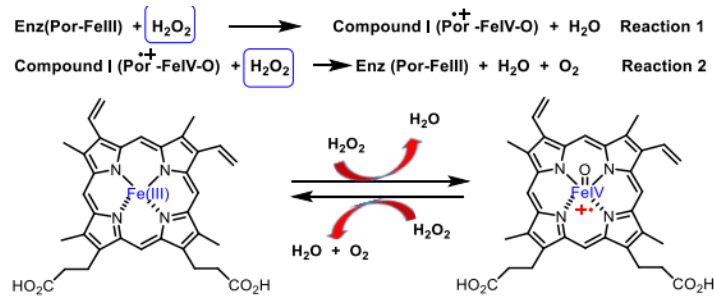
Gambar 2.3 Mekanisme Detoksifikasi Radikal Bebas oleh Enzim Antioksidan

Superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutation peroksidase (GPx) merupakan jenis-jenis enzim antioksidan. Aktivitas antioksidan dari enzim tersebut bekerja dengan melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif akibat substrat radikal bebas oksigen berupa anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), radikal hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ), radikal peroksil ( $RO_2^{\bullet}$ ), dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) (Zulaikhah, 2017). Enzim superoksida dismutase (SOD) pada sitosol dan mitokondria akan mengubah radikal superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ) menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dengan adanya kofaktor ion logam seperti tembaga (Cu), zink (Zn) atau mangan (Mn), selanjutnya enzim katalase pada peroksisom akan menghilangkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dengan mengubahnya menjadi air. Glutation peroksida (GPx) akan menghilangkan hidrogen peroksida dengan mengoksidasi glutation menjadi bentuk yang telah teroksidasi (GSSH) (Nimse & Pal, 2015; Sadi & Sadi, 2010).

## 2.4 Enzim Katalase

Katalase ( $H_2O_2$  oxireductase, EC.1.11.1.6) merupakan enzim yang dapat mengkatalisis hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi oksigen ( $O_2$ ) dan air ( $H_2O$ ) dan hampir ditemukan pada seluruh organisme aerobik (Chaouche et al., 2013). Pada reaksi katalase, terjadi transfer dua elektron antara dua molekul hidrogen peroksida, dimana satu molekul sebagai elektron donor sementara molekul lain berperan sebagai elektron aseptor. Seluruh proses dekomposisi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi molekul oksigen ( $O_2$ ) dan air ( $H_2O$ ) berlangsung dalam dua tahapan proses seperti pada gambar 2.3. Tahapan pertama, katalase dioksidasi oleh molekul peroksida dan membentuk produk antara yaitu *compound I*. Ciri dari *compound I* adalah adanya gugus feroksil yang mengandung  $Fe^{IV}$  dan radikal kation *porphyrin*. Pada reaksi tahap satu ini, molekul air terbentuk. Tahap reaksi kedua yaitu *compound I* direduksi oleh molekul peroksida lain, sehingga katalase kembali ke keadaan awal dan terbentuknya air serta dioksigen (Andrés et al., 2022). Terdekomposisinya  $H_2O_2$  mencegah terbentuknya

radikal hidroksil melalui reaksi Fenton ketika terdapat  $\text{Fe}^{2+}$  yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel (Ighodaro & Akinloye, 2018).



Sumber : Andrés et al., 2022

Gambar 2.4 Tahapan Dekomposisi Hidrogen Peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oleh Katalase

Berdasarkan sifat fisika dan biokimianya katalase dibagi menjadi empat tipe yaitu (Karakus, 2016; Sooch et al., 2014, 2016) :

#### 2.4.1 Katalase Monofungsional

Katalase monofungsional merupakan kelompok katalase terbesar dan paling banyak dipelajari karena katalase tipe ini adalah katalase yang sering dijumpai pada hewan, tanaman dan mikroorganisme. Anggota tipe katalase terbesar ini dapat dibagi secara biokimia berdasarkan dua jenis yaitu subunit besar (75-84 kDa) dengan heme d yang terkait dan subunit kecil (55-69 kDa) dengan heme b yang terkait. Semua enzim subunit kecil yang sejauh ini telah dikarakterisasi ditemukan memiliki ikatan NADP(H). Enzim subunit yang lebih besar telah terbukti menunjukkan stabilitas yang meningkat signifikan terhadap suhu tinggi dan proteolisis.

#### 2.4.2 Katalase-peroksidase

Katalase peroksidase merupakan tipe katalase yang kurang umum namun tidak hanya memiliki aktivitas katalitik tetapi juga aktivitas peroksidatik yang signifikan. Katalase peroksidase ditemukan utamanya pada bakteri aerobik, arkaebakteri dan fungsi serta memiliki bobot molekul pada rentang 120-340 kDa. Katalase peroksidase tidak dapat ditemukan pada tumbuhan dan hewan, tetapi memiliki sifat yang mirip seperti peroksidase pada tumbuhan dan fungi. Struktur katalase peroksidase yang sering dijumpai adalah adanya adisi kovalen dimana tirosin berikatan pada posisi orto dengan metionin sementara triptofan berikatan pada sisi lainnya. Katalase peroksidase salah satunya pernah diobservasi dari HPII *Eschericia coli*.

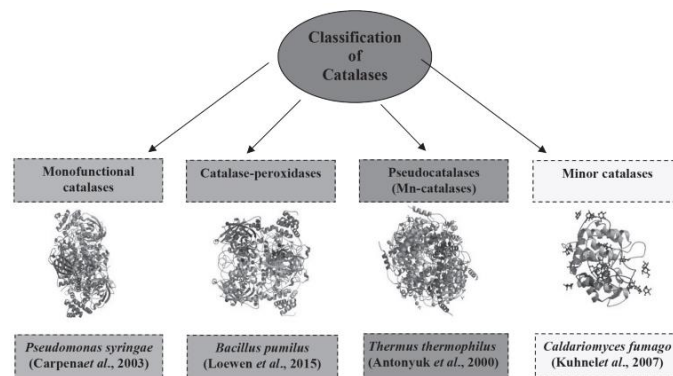
#### 2.4.3 Pseudokatalase (Mn-katalase)

Tipe katalase yang ketiga adalah katalase non-haem dan merupakan keluarga protein bakteri minor dengan mangan pada situs yang aktif daripada molekul haem

sehingga sering juga disebut pseudokatalase atau mangan katalase. Katalase tipe ini menunjukkan massa molekul pada rentang 170-210 kDa. Sejauh ini katalase tipe ini baru berhasil dikarakterisasi dari tiga bakteri yaitu bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum*) dan dua dari bakteri termofilus (*Thermus thermophiles* dan *Thermolophilum album*).

#### 2.4.4 Katalase Minor

Tipe katalase yang keempat adalah katalase minor yang termasuk dalam protein yang mengandung haem dan memiliki aktivitas katalitik yang sangat rendah karena pengaruh komposisi haem. Kloroperoksidase, bromoperoksidase dan fenol-katalase oksidase termasuk ke dalam enzim bifungsional ini. Kloroperoksidase merupakan monomer yang mempunyai 1 ikatan haem yang tersusun pada 8 segmen heliks serta memiliki bobot molekul 42 kDa. Jenis katalase bifungsional minor lain adalah fenol-katalase oksidase yang merupakan protein haem tetramerik dengan bobot molekul 320 kDa. Enzim ini memiliki kemampuan yang unik dalam mengoksidasi sejumlah komponen fenolik saat tidak adanya hidrogen peroksida dan juga memiliki aktivitas katalase.



Sumber : Sooch et al., 2016

Gambar 2.5 Tipe Katalase

Umunya katalase aktif pada pH optimum yaitu 6,0 – 8,0 dan stabil pada suhu 10-30°C sehingga akan memiliki aktivitas yang baik. Katalase dari sumber yang berbeda umumnya berada dalam bentuk tetramer dengan bobot molekul antara 220-270 kDa (Nadeem et al., 2015). Katalase banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang termasuk dalam industri makanan, industri farmasi dan kosmetik, tekstil, produksi kertas, bidang medis dan bioremediasi (Trawczyńska, 2020). Katalase juga berhubungan dengan beberapa penyakit dimana kurangnya katalase atau terganggunya fungsi katalase dalam tubuh dapat berhubungan dengan penyakit diabetes mellitus, vitiligo, penyakit kardiovaskular, hipertensi, anemia, Alzheimer's, bipolar dan skizofrenia (Nandi et al., 2019). Pada bidang farmasi, salah satu penelitian telah menggunakan katalase sebagai enzim antioksidan yang vital dalam



pengobatan neurologis dimana katalase diinkorporasikan dalam sistem poli-nanopartikel (Razaq et al., 2020).

Katalase terdistribusi secara luas pada makhluk hidup dan ditemukan hampir pada seluruh mikroorganisme aerobik karena membutuhkan sistem enzim yang spesifik untuk menetralkan potensi efek letal dari hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) (Chaouche et al., 2013). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa katalase dapat diisolasi dan dimurnikan secara luas pada seluruh makhluk hidup seperti cabe (Katiyar & Kumar, 2020), daun bit (Dincer & Aydemir, 2001), kulit pisang (Farhan et al., 2016) dan kubis (Gholamhoseinian et al., 2006); pada organ hati mamalia seperti dari hati kambing, anjing dan sapi (Nadeem et al., 2015); pada bakteri seperti dari bakteri *Eschericia coli*, *Streptomyces* sp (Sooch et al., 2014) dan *Bacillus* sp (Babiker et al., 2016); serta pada fungi seperti dari *Neurospora crassa* (Santoso et al., 2016), *Aspergillus niger*, dan *Candida* sp (Sooch et al., 2014). Namun isolasi enzim katalase dari organ hati hewan kurang tepat untuk dipilih apabila diinginkan kuantitas dalam jumlah besar, karena sumber utama enzim katalase dengan rasio katalase tertinggi terkandung pada tanaman (Razaq et al., 2020).

## 2.5 Isolasi Enzim

Isolasi enzim merupakan proses pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, kimiawi dan fisik melalui penghancuran membran atau dinding sel. Enzim umumnya hadir dalam organisme hidup dimana setiap sel akan mensintesis sejumlah besar enzim yang berbeda untuk mempertahankan reaksi metabolisme dalam sel. Pilihan prosedur dalam mengisolasi enzim tergantung pada lokasi enzim tersebut. Isolasi enzim yang berada pada intraseluler sering melibatkan pemisahan campuran biologis yang lebih kompleks. Isolasi enzim yang berada pada ekstraseluler umumnya dilepaskan ke media dengan hanya beberapa komponen lainnya. Isolasi enzim yang berasal dari tanaman biasanya dihancurkan dengan alat penghancur atau *grinders* dan enzim yang diinginkan di ekstraksi dengan larutan dapar. Dinding sel juga bisa dihancurkan dengan beberapa perlakuan salah satunya adalah dengan penambahan enzim litik (Aberer et al., 2002).

Beberapa contoh metode isolasi enzim yang digunakan antara lain :

### 2.5.1 Osmotic Shock

Metode ini merupakan salah satu metode isolasi enzim secara mekanis untuk merusak sel yaitu dengan menggunakan dapar dengan tekanan osmotik yang rendah. Karena digunakan dapar maka air akan cenderung mengalir ke dalam sel dan organel melalui proses osmosis sehingga mendorong terjadinya lisis dan melepaskan proteinnya. Penambahan pelarut organik konsentrasi rendah yaitu 2% n-butanol sering ditambahkan ke

dalam dapur untuk meningkatkan proses perusakan membran sel atau dinding sel (Dennison, 2003). Enzim  $\beta$ -galaktosidase berhasil diisolasi dari *Escherichia coli* dengan aktivitas tertinggi sebesar 104 U/g menggunakan metode *osmotic shock* (Nossal & Heppel, 1966).

#### 2.5.2 *The Waring Blender* dan *Virtis Homogenizer*

Alat yang digunakan dalam metode isolasi enzim ini terdiri dari pengaduk berkecepatan tinggi dengan pisau pemotong yang dipasang di bejana kaca. Kecepatan gerakan pisau pemotong menghasilkan gaya geser yang kuat karena adanya aliran laminar, sedangkan garis bejana yang tidak beraturan memberikan pencampuran larutan yang baik secara keseluruhan. Tingkat perusakan membran dan dinding sel bergantung pada kecepatan rotasi pisau pemotong. Pada kecepatan tinggi, blender akan merusak mitokondria dan nukleus bahkan dapat mendenaturasi protein. Metode ini sebagian besar digunakan untuk mendapatkan enzim dari tanaman dan hewan, tetapi kurang efektif apabila ingin didapatkan enzim dari mikroorganisme (Dennison, 2003). Katalase dari daun bit berhasil diisolasi menggunakan *waring blender* pada kecepatan tinggi selama 60 detik dengan aktivitas spesifik katalase sebesar 227,39 U/mg (Dincer & Aydemir, 2001).

#### 2.5.3 Sonikasi

Penggunaan gelombang suara frekuensi tinggi adalah metode efektif untuk merusak dinding sel pada mikroorganisme. Mekanisme “kavitasi mikro” diduga terlibat dalam perusakan dinding sel yaitu produksi perbedaan tekanan transien yang merusak dinding sel. Efisiensi kerusakan sel dipengaruhi oleh *output* daya dari instrument, durasi paparan dan volume bahan yang diproses. Pada umumnya volume yang dapat diolah dalam waktu tertentu tidak besar dan perlu proses pendinginan untuk mencegah penumpukan panas (Dennison, 2003). Metode sonikasi dalam isolasi enzim L-asparaginase dilakukan dari beberapa bakteri yaitu *Escherichia coli*, *Leucosporidium muscorum* dan *Aspergillus terreus* dengan aktivitas spesifik berturut-turut 9,01; 0,07; dan 4,6 IU/mg (Costa-Silva et al., 2018).

Setelah dilakukan perusakan sel, langkah selanjutnya adalah pemisahan enzim ekstraseluler atau intraseluler dari sel atau fragmen seluler. Tahap ini cenderung sulit karena ukuran sel bakteri yang kecil dan hanya ada sedikit perbedaan densitas atau bobot dari sel dengan media fermentasi. Filtrasi secara kontinu biasanya digunakan di industri. Sel dengan bobot yang besar seperti sel pada jamur, dapat dipisahkan dengan metode dekantasi. Saat ini sentrifugasi merupakan proses yang efisien dalam memisahkan sel dan fragmen sel melalui proses kontinu. Residu tanaman dan organ dapat dipisahkan dengan sentrifugasi atau filter

yang lebih sederhana (Aberer et al., 2002). Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan larutan berdasarkan berat molekul protein penyusun organel sel. Hasil dari sentrifugasi ekstrak kasar atau *crude extract* yang mengandung enzim yang diinginkan akan berada di bagian atas (supernatan), sementara organel-organel sel akan mengendap di bagian bawah (Tazkiah et al., 2017).

## 2.6 Purifikasi Enzim

Purifikasi enzim merupakan suatu proses yang kompleks dengan sejumlah metode yang diterapkan secara berurutan untuk mencapai tingkat kemurnian yang tinggi (Ramos & Malcata, 2011). Tujuan proses pemurnian adalah untuk memurnikan suatu enzim yang spesifik dari ekstrak kasar (*crude extract*) sel yang mengandung banyak komponen lain yang tidak diinginkan untuk mendapatkan aktivitas spesifik maksimum dengan *recovery* aktivitas awal yang sebaik mungkin (Confortin et al., 2019). Syarat dasar dalam pemilihan metode purifikasi enzim yang efisien adalah didapatkannya enzim dengan tingkat kemurnian akhir yang tinggi, *recovery* keseluruhan aktivitas enzim yang tinggi dan reproduibilitas (menghasilkan aktivitas enzim yang sama walaupun dilakukan pada tempat dan waktu yang berbeda) (Ramos & Malcata, 2011). Beberapa metode pemurnian yang biasanya digunakan pada skala laboratorium adalah filtrasi, sentrifugasi, ultrafiltrasi, presipitasi dan kromatografi (kromatografi *ion-exchange* dan gel filtrasi) (Bajpai, 2014).

Setelah proses homogenisasi dari bahan baku, langkah pertama dalam purifikasi adalah memisahkan sisa-sisa sel pada supernatan, baik itu dengan metode sedimentasi atau presipitasi atau beralih ke sentrifugasi dan filtrasi agar didapatkan ekstrak yang jernih dan proses yang cepat. Setelah itu, supernatan yang mengandung enzim selanjutnya akan dipisahkan dari kontaminan yang tidak diinginkan seperti molekul organik, anorganik dan protein berbobot kecil lainnya dengan metode *salting-out* menggunakan garam amonium sulfat atau pelarut lain (aseton/etanol) sehingga akan terjadi proses presipitasi, lalu diikuti dengan proses dialisis menggunakan dapar yang sesuai untuk menghilangkan garam yang terikat pada enzim (Ramos & Malcata, 2011).

### 2.6.1 Presipitasi dengan Amonium Sulfat

Proses pengendapan atau presipitasi adalah salah satu opsi yang dapat dipilih untuk pemekatan atau purifikasi suatu enzim. Aktivitas enzim yang didapatkan dengan proses pengendapan protein dapat menghasilkan aktivitas yang lebih baik karena pengendapan protein bertujuan untuk mengurangi kadar air dengan mengurangi kontaminan yang dapat mengganggu sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat (Rahmi et al., 2020). Proses pemurnian melalui proses *salting out* dengan penambahan amonium sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

dimanfaatkan dalam proses pengendapan enzim. Amonium sulfat adalah garam netral yang dapat mempengaruhi kelarutan protein dan enzim serta memiliki kekuatan ionik yang cukup tinggi sehingga dapat terjadi *salting out*. Amonium sulfat juga dipilih karena relatif murah, kelarutan tinggi dalam air, tidak menimbulkan kerusakan pada protein, tidak berbahaya dan memiliki efek penstabil pada beberapa enzim (Wahjuni et al., 2017).

Peristiwa *salting-in* atau terjadinya peningkatan kelarutan protein dalam air apabila dilakukan penambahan garam amonium sulfat pada konsentrasi rendah. Kekuatan ionik merupakan suatu ukuran konsentrasi dan jumlah muatan listrik sumbangan kation dan anion dari garam. Kekuatan ionik dari garam ini akan mempengaruhi fungsi garam dalam kelarutan protein. Kelarutan protein akan menurun apabila terjadi peningkatan kekuatan ion sehingga protein akan mengendap atau dikenal sebagai peristiwa *salting-out* (Malle et al., 2015). Protein dapat mengendap karena protein saling berinteraksi dan beragregasi akibat semakin banyak molekul air yang menyebabkan penarikan selubung air karena berikatan dengan ion-ion garam dan mengelilingi permukaan protein (Nurhayati et al., 2012). Meskipun terjadi pengendapan protein, tetapi tidak menyebabkan kerusakan struktur protein dari enzim dan tidak kehilangan aktivitasnya (Malle et al., 2015; Suharno et al., 2019).

Penambahan amonium sulfat dilakukan secara bertahap untuk mengendapkan enzim dengan derajat kejenuhan tertentu sesuai dengan perbandingan bobot amonium sulfat pada gambar 2.7 (Wahjuni et al., 2017). Penambahan amonium sulfat pada ekstrak enzim kasar dilakukan sedikit demi sedikit dan untuk meningkatkan kecepatan melarut maka ketika penambahan amonium sulfat dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Selain itu pengadukan juga bertujuan untuk menghomogenkan amonium sulfat ke seluruh bagian ekstrak kasar enzim (Rahmi et al., 2020). Proses pengadukan dilakukan perlahan dan konstan untuk mencegah terbentuknya busa pada permukaan supernatan. Terbentuknya busa dapat mendenaturasi atau merusak struktur alami protein karena busa dapat menurunkan tegangan permukaan (Malle et al., 2015).

**Table 1.** Ammonium Sulfate Fractionation Table showing the mass (in grams) of solid ammonium sulfate to add per liter of solution at 20 °C. This table is adapted from *Protein Purification: Principles and Practice* 2<sup>nd</sup> Ed. (1987) Scope RK.

| Starting % saturation | Final Percent Saturation to be Obtained                                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                       | 20                                                                       | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  | 50  | 55  | 60  | 65  | 70  | 75  | 80  | 85  | 90  | 95  | 100 |
|                       | Amount of ammonium sulfate to add (grams) per liter of solution at 20 °C |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 0                     | 113                                                                      | 144 | 176 | 208 | 242 | 277 | 314 | 351 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 | 608 | 657 | 708 | 761 |
| 5                     | 85                                                                       | 115 | 146 | 179 | 212 | 246 | 282 | 319 | 357 | 397 | 439 | 481 | 526 | 572 | 621 | 671 | 723 |
| 10                    | 57                                                                       | 86  | 117 | 149 | 182 | 216 | 251 | 287 | 325 | 364 | 405 | 447 | 491 | 537 | 584 | 634 | 685 |
| 15                    | 28                                                                       | 58  | 88  | 119 | 151 | 185 | 219 | 255 | 292 | 331 | 371 | 413 | 456 | 501 | 548 | 596 | 647 |
| 20                    | 0                                                                        | 29  | 59  | 89  | 121 | 154 | 188 | 223 | 260 | 298 | 337 | 378 | 421 | 465 | 511 | 559 | 609 |
| 25                    |                                                                          | 0   | 29  | 60  | 91  | 123 | 157 | 191 | 227 | 265 | 304 | 344 | 386 | 429 | 475 | 522 | 571 |
| 30                    |                                                                          |     | 0   | 30  | 61  | 92  | 126 | 160 | 195 | 232 | 270 | 309 | 351 | 393 | 438 | 485 | 533 |
| 35                    |                                                                          |     |     | 0   | 30  | 62  | 94  | 128 | 163 | 199 | 236 | 275 | 316 | 358 | 402 | 447 | 495 |
| 40                    |                                                                          |     |     |     | 0   | 31  | 63  | 96  | 130 | 166 | 202 | 241 | 281 | 322 | 365 | 410 | 457 |
| 45                    |                                                                          |     |     |     |     | 0   | 31  | 64  | 97  | 132 | 169 | 206 | 245 | 286 | 329 | 373 | 419 |
| 50                    |                                                                          |     |     |     |     |     | 0   | 32  | 65  | 99  | 135 | 172 | 210 | 250 | 292 | 335 | 381 |
| 55                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     | 0   | 33  | 66  | 101 | 138 | 175 | 215 | 256 | 298 | 343 |
| 60                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 33  | 67  | 103 | 140 | 179 | 219 | 261 | 305 |
| 65                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 34  | 69  | 105 | 143 | 183 | 224 | 266 |
| 70                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 34  | 70  | 107 | 146 | 186 | 228 |
| 75                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 35  | 72  | 110 | 149 | 190 |
| 80                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 36  | 73  | 112 | 152 |
| 85                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 37  | 75  | 114 |
| 90                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 37  | 76  |
| 95                    |                                                                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 38  |

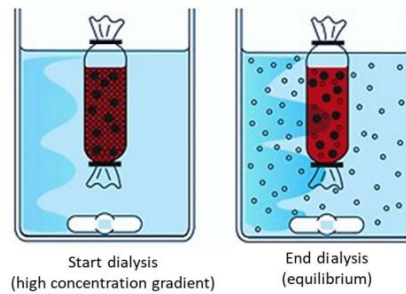
Sumber : Scopes, 1987

Gambar 2.6 Tabel Fraksinasi Amonium Sulfat

Beberapa penelitian yang telah melakukan purifikasi katalase dengan amonium sulfat dari tanaman seperti cabe, daun bit, kubis dan *van apple* dan aktivitas spesifik berturut-turut yaitu 18,70 IU/mg; 1104 U/mg (Dincer & Aydemir, 2001; Gholamhoseinian et al., 2006; Katiyar & Kumar, 2020; Yoruk et al., 2005).

## 2.6.2 Dialisis

Hasil pemurnian dengan garam amonium sulfat didapatkan fraksi endapan protein dengan berbagai tingkat kemurnian. Purifikasi lanjutan dengan dialisis bertujuan untuk menghilangkan amonium sulfat yang masih terkandung dalam protein hasil presipitasi (Hapsari et al., 2021). Dialisis merupakan suatu cara pemisahan berdasarkan perbedaan ukuran molekul protein dimana terjadi perpindahan molekul terlarut dari suatu campuran melalui membran semipermeabel (Rahmi et al., 2020). Pada proses ini, molekul yang berukuran lebih kecil seperti garam dan air dapat melewati membran semipermeabel sementara molekul-molekul berukuran besar seperti protein akan tertahan dalam membran semipermeabel (Malle et al., 2015). Molekul kecil seperti garam dan ion-ion pengganggu akan keluar dari membran semipermeabel sehingga proses dialisis dalam pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan molekul-molekul kecil tersebut yang dapat mempengaruhi kestabilan molekul protein enzim selama penyimpanan (Selvia et al., 2013).



Sumber : Onnainty & Granero, 2019

Gambar 2.7 Proses Dialisis

Pada proses pemisahan enzim dengan garam amonium sulfat, kantong selofan lebih sering digunakan sebagai membran semipermeabel dengan ukuran pori membran tertentu. Sebelum dilakukan proses dialisis, membran selofan perlu direbus terlebih dahulu selama 30 menit dalam larutan 10 mM natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )/1 mM EDTA alkali lalu dicuci dengan air bebas ion sebanyak 2 kali yang bertujuan untuk menghindari kontaminan dari bahan logam (Bollag et al., 1996). Fraksi endapan enzim dari proses pengendapan disimpan dalam membran selofan kemudian direndam dalam larutan buffer dan selama proses dialisa pelarut buffer disirkulasi dengan menggunakan *stirrer* (Djarkasi et al., 2017). Pengadukan bertujuan untuk mencegah molekul terkonsentrasi di sekitar membran dan untuk mempermudah keluarnya molekul berukuran kecil dari membran dialisis. Saat dialisis juga perlu diperhatikan untuk mempertahankan suhu lingkungan dalam kondisi dingin agar mencegah terjadinya penurunan aktivitas enzim (Selvia et al., 2013). Ketika konsentrasi bagian dalam dan bagian luar mencapai kesetimbangan, maka perlu dilakukan pergantian larutan buffer agar proses difusi dapat terus berlanjut (Malle et al., 2015).

Perpindahan molekul amonium sulfat dalam kantong dialisis diuji dengan penambahan reagen  $\text{BaCl}_2$  ke dalam larutan buffer di luar kantong dialisis, apabila tidak terbentuk endapan putih  $\text{BaSO}_4$  ketika ditambahkan  $\text{BaCl}_2$  maka proses dialisis dapat dihentikan (Hapsari et al., 2021; Selvia et al., 2013). Beberapa penelitian yang telah melakukan purifikasi katalase dengan metode dialisis seperti dari jamur *Agaricus bisporus* dan *Nostoc* dengan aktivitas spesifik berturut-turut yaitu 0,89 U/mg dan 0,86 U/mg (Susmitha et al., 2013, 2016).

## 2.7 Uji Aktivitas Enzim

Pengujian aktivitas enzim katalase merupakan salah satu parameter penting selama proses isolasi dan pemurnian enzim yang bertujuan untuk mengetahui keberhasilan proses isolasi enzim katalase dan aktivitas spesifik enzim pada setiap tahap isolasi dan pemurnian. Beberapa metode pengujian aktivitas katalase pernah dilakukan, salah satu metode

pengukuran aktivitas enzim secara kualitatif yang paling sederhana adalah dengan menggunakan  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang akan diuraikan menjadi oksigen ( $\text{O}_2$ ) oleh katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung. Pengukuran aktivitas katalase secara kuantitatif fokus terhadap pengukuran menggunakan kolorimetri dan spektrofotometri (Iwase et al., 2013).

#### 2.7.1 Uji Aktivitas Enzim secara Kualitatif

Jumlah substrat berupa senyawa hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja enzim katalase dan berperan dalam aktivasi enzim katalase. Enzim katalase dapat bereaksi apabila terdapat senyawa hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) yang sifatnya berbahaya, dimana katalase akan menguraikan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) menjadi komponen yang tidak berbahaya berupa air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan oksigen ( $\text{O}_2$ ). Ketika katalase bereaksi dengan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) maka akan terbentuk gelembung, karena terbentuknya gelembung merupakan indikator adanya air dalam wujud uap. Apabila sumber katalase ketika ditetesi dengan reagen  $\text{H}_2\text{O}_2$  membentuk gelembung maka dari uji katalase tersebut dapat dinyatakan positif katalase. Sumber katalase dinyatakan katalase negatif apabila setelah uji katalase dengan penambahan reagen  $\text{H}_2\text{O}_2$  tidak terbentuk gelembung (Amalia et al., 2022).

#### 2.7.2 Uji Aktivitas Enzim secara Kuantitatif

Metode spektrofotometri UV merupakan metode pengukuran aktivitas katalase yang paling umum. Pengukuran aktivitas katalase menggunakan metode spektrofotometri bergantung pada perubahan absorbansi pada panjang gelombang 240 nm dalam larutan hidrogen peroksida konsentrasi tinggi ( $\geq 30$  mM) (Hadwan, 2018). Katalase bekerja sangat cepat sehingga keterlibatan kompleks enzim-substrat tidak dapat diverifikasi. Aktivitas katalase juga bergantung pada konsentrasi awal  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dimana pada konsentrasi  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 mM akan terjadi inaktivasi enzim katalase sehingga pemilihan konsentrasi  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalam pengujian adalah hal yang harus dipertimbangkan. Metode ini cocok digunakan apabila konstituen seluler lain terdapat dalam konsentrasi yang cukup rendah sehingga konstituen tersebut tidak menyerap kuat pada 240 nm, misalnya untuk preparat katalase semi murni dan tidak cocok untuk suspensi sel keruh atau homogenate tanaman yang mengandung peroksidase (Shangari & O'Brien, 2006).

Sampel berisi 100  $\mu\text{L}$  larutan enzim dan 3 mL 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalam 50 mM dapar fosfat pH 7,0, sementara blanko berisi 100  $\mu\text{L}$  50 mM dapar fosfat pH 7,0 dan 3 mL 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalam 50 mM dapar fosfat pH 7,0 (Aebi, 1984; Bergmeyer, 1965). Aktivitas enzim katalase diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 240 nm berdasarkan penurunan nilai absorbansi antara sebelum dan setelah inkubasi

selama 1 menit. Terjadinya penurunan nilai absorbansi menandakan terdapat dekomposisi  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalam reaksi dengan nilai koefisien ekstingsi  $\text{H}_2\text{O}_2$  sebesar 39,4/mM/cm. Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan U/mL dengan batas deteksi katalase sebesar 10 U/mL. Aktivitas 1 unit katalase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengubah 1  $\mu\text{M}$  hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) menjadi air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan oksigen ( $\text{O}_2$ ) per menit pada suhu 25°C (Babiker et al., 2016; Shangari & O'Brien, 2006; Sucahyo & Kasmiyati, 2018). Perhitungan katalase menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas katalase (U/mL)} = \frac{(\Delta \text{ Absorbansi Uji} - \text{Absorbansi Blanko})/\text{Menit}}{(\text{Molaritas } \text{H}_2\text{O}_2) \times (\text{Volume sampel yang diukur})} \times \text{Faktor Pengenceran}$$

## 2.8 Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim katalase dilakukan dengan menentukan bobot molekul enzim katalase menggunakan SDS-PAGE dan menentukan pH dan suhu optimum enzim katalase yang akan mempengaruhi aktivitas spesifik dari enzim katalase.

### 2.8.1 Bobot Molekul Katalase

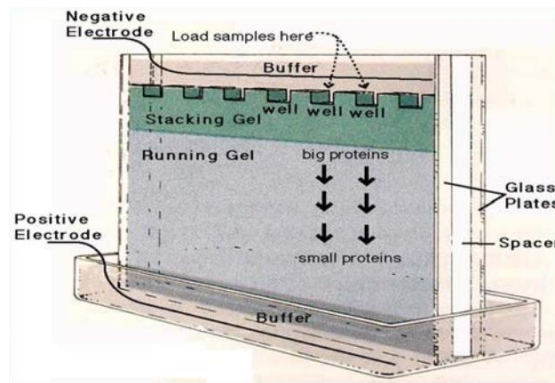
SDS-PAGE (*Sodium Dodecylsulphat Polyacrilamid Gel Electrophoresis*) merupakan metode standar penentuan berat molekul protein. SDS-PAGE adalah teknik elektroforesis yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan bahan pemisah berupa *polyacrylamide*. Karakterisasi berat molekul suatu protein dengan SDS-PAGE menggunakan satuan berupa satuan kilo Dalton atau kDa (Suratmi et al., 2018).

Prinsip kerja SDS-PAGE melibatkan penggunaan deterjen anionic berupa SDS yang menyebabkan denaturasi awal protein sehingga protein bermuatan negative. Kemudian akan terjadi pemisahan protein berdasarkan perbedaan bobot molekul melalui akrilamid matriks gel berpori dengan bantuan elektroforesis. Pergerakan molekul yang lebih kecil pada gel cenderung lebih cepat sehingga akan membentuk pita yang jauh dari sumur/*well*, sedangkan pergerakan molekul yang lebih besar cenderung lebih lambat dan akan terbentuk pita yang lebih dekat dengan sumur pada gel (Machsun & Zulaika, 2017).

Tahapan proses SDS-PAGE dimulai dari preparasi gel, aplikasi sampel, pewarnaan dan *destaining* gel serta pemaparan gel pada cahaya. Sebelumnya, protein akan didenaturasi terlebih dahulu yaitu mengubah struktur protein dari bentuk globular menjadi struktur yang linier. Komponen utama yang dibutuhkan dalam SDS-PAGE adalah gel poliakrilamida yang terdiri dari *separating gel* dan *stacking gel*. Gel poliakrilamida merupakan medium dengan ukuran pori-pori yang kecil yang berfungsi untuk memperlambat gerakan molekul sehingga sesuai digunakan untuk memisahkan protein



berdasarkan ukuran berat molekulnya. *Well* atau sumur yang merupakan tempat meletakkan sampel berada pada *stacking gel*, sementara *separating gel* adalah tempat protein bergerak ke arah anoda. Gel poliakrilamida memiliki ukuran pori-pori tertentu yang dipengaruhi oleh konsentrasi akrilamida. Semakin tinggi konsentrasi gel poliakrilamida yang digunakan maka semakin kecil juga protein yang dapat dipisahkan karena pori-pori gel yang terbentuk pada gel akan semakin rapat. Molekul akan mulai bermigrasi melalui gel poliakrilamid ketika sudah diberikan arus listrik. Molekul akan bermigrasi dari kutub negatif (katoda) menuju kutub positif (anoda) (Rachmania et al., 2017). Enzim yang memiliki bobot molekul besar akan tertahan sehingga pergerakannya lebih lambat dan pita yang dihasilkan akan lebih dekat dengan *well* pada gel. Namun sebaliknya, molekul dengan bobot molekul yang lebih kecil akan menghasilkan pita yang lebih jauh dari *well* karena akan lebih cepat bermigrasi (Machsun & Zulaika, 2017).



Sumber : Roy & Kumar, 2014

Gambar 2.8 Ilustrasi Komponen dan Prinsip Kerja SDS-PAGE

Gel hasil SDS-PAGE diletakkan kembali di atas kaca gel dan diambil fotonya atau di *scan* dengan latar belakang putih. Berat molekul katalase ditentukan dengan membandingkan pita yang terbentuk pada sampel dengan pita yang terbentuk pada kurva *standard marker*. Tebal tipisnya pita protein yang terbentuk dari hasil SDS-PAGE menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama (Rachmania et al., 2017). Katalase yang diisolasi dari daun buah bit memiliki bobot molekul sebesar 58,5 kDa (Dincer & Aydemir, 2001), bobot molekul katalase dari alga *Nostoc* adalah 34 kDa (Susmitha et al., 2016), dari jamur *Agaricus bisporus* sebesar 45 kDa (Susmitha et al., 2013) dan dari bakteri laut *Acinetobacter* sp. YS0810 sebesar 57 kDa (Fu et al., 2014).

### 2.8.2 Suhu dan pH Optimum Katalase

Salah satu faktor utama yang mempengaruhi aktivitas dari suatu enzim antara lain adalah suhu dan pH. Aktivitas enzim akan optimal apabila berada pada suhu dan pH

tertentu. Protein akan terdenaturasi pada suhu tinggi sehingga kecepatan reaksi akan menurun tajam apabila berada diatas suhu optimal enzim. Perubahan besar pada suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim pun dapat terjadi apabila terdapat sedikit saja pergeseran pH dari pH optimum enzim tersebut (Kusumaningrum et al., 2019). Aktivitas enzim secara progresif akan hilang hingga akhirnya enzim menjadi tidak aktif ketika konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal. Selain itu perubahan pada residu asam amino yang bertugas dalam mempertahankan struktur tersier dan kuartener enzim aktif akan terjadi ketika enzim tidak berada pada pH optimum dan akan mempengaruhi kelarutan enzim. Kelarutan enzim akan berkurang ketika sisi hidrofobik molekul enzim menjadi terbuka akibat perubahan struktur tersier dari enzim. Penurunan kelarutan enzim dapat menurunkan aktivitas katalitik enzim secara perlahan (Tazkiah et al., 2017).

Selain pH, faktor suhu juga sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Suhu optimum adalah suhu yang membuat terjadinya reaksi kimia dengan kecepatan paling optimal. Kerusakan enzim dapat terjadi apabila suhu yang digunakan melebihi suhu optimum karena rangkaian asam amino pada enzim berkaitan erat dengan suhu lingkungan (Dini & Munifah, 2014; Istia'nah et al., 2020). Selain itu, dapat terjadi perubahan konformasi susbtrat sehingga substrat tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim yang dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Turunnya aktivitas enzim disebabkan karena tidak terbentuknya kompleks enzim substrat akibat suhu yang melebihi batas suhu optimum enzim (Tazkiah et al., 2017).

Beberapa penelitian yang melakukan penentuan suhu dan pH optimum enzim katalase yang diisolasi dari beberapa tanaman dan didapatkan hasil yang berbeda-beda. Suhu dan pH optimum dengan aktivitas enzim katalase tertinggi dari tanaman *Rumex obtusifolius* L. yaitu pada suhu 25°C dan pH 7,0 (Alici & Arabaci, 2016), dari buah *van apple* yaitu pada suhu optimum 50°C dan pH optimum 5,0 (Yoruk et al., 2005), sementara katalase dari kubis hijau memiliki suhu optimum pada 35°C dan pH optimum pada pH 6,0 (Al-Mudhafr & Al-Dabbagh, 2019). Katalase yang diisolasi dari jamur *Neurospora crassa* memiliki aktivitas tertinggi pada suhu optimum 40°C dan pH optimum 7,0 (Suryani et al., 2017). Katalase yang diisolasi dari bakteri laut *Acinetobacter* sp. YS0810 memiliki aktivitas tertinggi pada suhu optimum 60°C dan pH optimum 11,0 (Fu et al., 2014).