

Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dalam Ekstrak Mesokarp Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamarck) Menggunakan Densitometri Citra Elektroforegram

*Hamidah Rahman, Tutus Gusdinar Kartawinata, Elin Julianti

Program Studi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung,
Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

Abstrak

Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas super oksida dismutase (SOD) mesokarp buah merah (*Pandanus conoideus* Lamarck). Pengujian dilakukan dengan metode elektroforesis gel poliakrilamid dan densitometri citra terhadap ekstrak kasar buah merah dan ekstrak hasil pemurnian dengan dialisis setelah pengendapan dengan amonium sulfat konsentrasi 25, 50 dan 75% b/v. Aktivitas SOD ditunjukkan dengan terbentuknya pita transparan pada gel setelah dua tahap proses pewarnaan yaitu dengan nitro biru tetrazolium dan riboflavin, dan hasil pencitraan gel dianalisis dengan densitometer. Aktivitas SOD ditentukan dengan membandingkan terhadap SOD dari *Escherichia coli* dan diperoleh aktivitas SOD sebesar 420 U/mL atau setara dengan 836 U/gram buah merah.

Kata kunci: Elektroforesis, Densitometer, Superoksida dismutase, Buah merah

Abstract

The aim of this study was to test the activity of SOD buah merah (*Pandanus conoideus* Lamarck). Evaluation was done by polyacrylamide gel electrophoresis and image densitometry was performed to raw extract of buah merah, and the extract pure by dialysis after precipitation with ammonium sulfate concentrations of 25, 50 and 75% w/v. SOD activity was shown by the formation of transparent tape on the gel after the gel staining by nitro blue tetrazolium and riboflavin, then imaging results were analyzed by densitometer. SOD activity was determined by comparing the SOD from *Escherichia coli* and it was 420 U/mL.

Keywords: Electrophoresis, Densitometer, Superoxide dismutase, red fruit

Pendahuluan

Antioksidan enzim disebut juga antioksidan endogen karena terdapat secara alami dalam tubuh dan merupakan sistem pertahanan pertama tubuh terhadap pengaruh aktivitas radikal bebas. Yang termasuk contoh antioksidan enzim adalah super oksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathione peroksidase (Clarkson 1995).

Superoksida dismutase telah diteliti dan diketahui terdapat dalam beberapa organisme hidup, termasuk pada beberapa jenis bakteri dan jamur (Santos *et al.* 2001; Santos *et al.* 2000). Setelah penemuan SOD endogen dalam tubuh, pengaruh dan efek terhadap beberapa penyakit yang terkait dengan keberadaan SOD maka saat ini telah dibuat beberapa sediaan obat maupun kosmetik dengan komposisi SOD. Injeksi SOD telah diberikan kepada pasien dengan osteoarthritis untuk mengurangi rasa sakit melalui mekanisme yang mengurangi inflamasi. Sediaan untuk krim kulit yang mengandung SOD juga dibuat sebagai antioksidan untuk mencegah penuaan dini.

Penentuan aktivitas SOD dilakukan baik dengan teknik konvensional atau dengan menggunakan pereaksi kit. Teknik yang konvensional adalah metoda spektrofotometri dengan menginduksi radikal superoksida yang dihasilkan dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase. Radikal superoksida nantinya akan bereaksi dengan sitokrom C atau dengan nitro biru tetrazolium (NBT) menghasilkan warna formazan ungu kebiruan. SOD yang terdapat dalam sampel akan berkompetisi dengan NBT untuk bereaksi dengan superoksida yang akan menghambat pembentukan warna biru. Warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada $\lambda=560$ nm.

Uji aktivitas SOD pertama kali dilakukan oleh Beauchamp dan Fridovich (1971) menggunakan gel poliakrilamid untuk elektroforesis. Metoda pengukuran ini menggunakan NBT sebagai kompetitor dimana NBT dan SOD pada gel akan berkompetisi untuk radikal superoksida pada saat yang sama. Pada lokasi letak SOD berada, gel akan nampak transparan, sedangkan lokasi tanpa SOD akan berwarna ungu kebiruan karena terjadi reaksi reduksi NBT. Pada metoda ini dilakukan dua kali proses pewarnaan, yaitu

*Penulis korespondensi. E-mail: hamidahr42@gmail.com

dengan NBT kemudian dengan riboflavin untuk terjadinya fotopolimerisasi. Pengukuran aktivitas SOD tidak hanya digunakan untuk mengetahui kandungan SOD, tetapi juga dapat diterapkan untuk diagnosis dan indikasi kondisi kesehatan yang terkait dengan jenis penyakit tertentu.

Isolasi dan pemurnian enzim dapat dilakukan dengan teknik dialisis setelah penambahan sejumlah garam amonium sulfat secara bertingkat (Gegenheimer 1990). Metoda ini berdasarkan pada perbedaan sifat kelarutan enzim maupun protein. Enzim dapat diendapkan dalam suatu larutan dengan menambahkan sejumlah garam netral dengan konsentrasi berlebih yang disebut dengan *salting out*. Endapan yang terbentuk dari setiap tahap fraksionasi ini dapat dipekatkan (*concentrating*), dihilangkan garam (*desalting*) dan dimurnikan (*purifying*). Enzim yang akan dimurnikan ditempatkan dalam plastik selofan dan direndam dalam suatu difusat yang diaduk atau disirkulasikan atau gabungan dari keduanya. Pada saat kesetimbangan dimana konsentrasi molekul yang berukuran kecil di dalam medium sama dengan konsentrasi yang berada dalam plastik selofan, maka molekul yang berukuran besar akan tertahan dalam kantung tersebut.

Maraknya penggunaan buah merah di masyarakat untuk mengobati beberapa jenis penyakit dan disebutkan tingginya kandungan antioksidan menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk menguji adanya kandungan SOD dalam mesokarp buah merah dan mengisolasi SOD dari buah merah sebagai salah satu upaya penemuan sumber bahan obat dari bahan alam Indonesia.

Percobaan

Bahan dan Alat

Sampel buah merah yang baru dipanen diperoleh dari Papua, enzim standar SOD hasil isolasi dari *Escherichia coli* (Sigma Singapura), tris (hidroksi-metil) aminometan, bisakrilamid, tetrametilendiamin (TEMED), nitro biru tetrazolium (NBT), riboflavin, amonium sulfat, amonium persulfat, glisin, dan bromfenol biru. Perangkat alat elektroforesis gel vertikal (BIO-RAD), densitometer (BIO-RAD), pH meter, alat sentrifuga, plastik dialisis, pengocok orbital.

Penyiapan Ekstrak Mesokarp Buah Merah

Buah matang yang baru dipanen dipertahankan suhunya sekitar 4°C. Sebanyak 30 g mesokarp buah merah diekstraksi dengan 60 mL larutan dapar tris-HCl 0,15M pH 7,5 (1:2). Ekstraksi dilakukan dengan *waring blender*. Ekstrak disaring untuk memisahkan dari ampas, disentrifuga suhu 4°C, 4500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh disebut sebagai

ekstrak kasar (A).

Proses Elektroforesis

Proses elektroforesis dilakukan melalui beberapa tahap penyiapan yaitu penyiapan gel, aplikasi sampel, pewarnaan dan pencucian gel, dan pemaparan gel pada cahaya.

Penyiapan gel

Dibuat dua macam gel yaitu gel konsentrasi dan gel pemisahan. Gel konsentrasi dibuat dengan mencampurkan larutan dapar tris-HCl 1,5M pH 6,8 sebanyak 2,5 mL dan bisakrilamid 30% sebanyak 1,3 mL dalam labu ukur 10 mL. Volume larutan digenapkan dengan air suling dan larutan disimpan suhu 2-8°C. Gel pemisahan dibuat dengan mencampurkan larutan dapar tris-HCl 1,5M pH 8,8 sebanyak 6,25 mL dan bisakrilamid 30% sebanyak 8,325 mL dalam labu ukur 25 mL. Volume larutan digenapkan dengan air suling dan larutan disimpan suhu 2-8°C.

Tahap elektroforesis

Untuk membuat satu gel, sebanyak 3,5 mL gel pemisah dipipet ke dalam gelas piala, ditambahkan 10 µL TEMED dan 35 µL amonium persulfat 10%. Dengan menggunakan pipet, campuran dituangkan ke dalam gel *sandwich* sampai kira-kira 1,5 cm dari bagian atas plat hingga rata dan didiamkan sekitar 10 menit hingga terjadi polimerisasi. Sebanyak 1,5 mL gel konsentrasi dipipet ke dalam gelas piala, ditambahkan 10 µL TEMED dan 35 µL amonium persulfat 10%. Dengan menggunakan pipet, gel konsentrasi ini dituangkan di atas gel pemisah dan disisipkan *comb* pada plat gel pada posisi yang tepat, dibiarkan pada suhu kamar selama 1 jam sampai terjadi polimerisasi. Setelah terjadi polimerisasi *comb* dilepaskan dengan hati-hati dan sumur-sumur yang terbentuk akan diisi dengan sampel yang akan diuji aktivitas SOD yaitu ekstrak buah merah. Gel selanjutnya direndam dalam wadah elektroforesis berisi larutan dapar migrasi hingga penuh. Proses elektroforesis dilakukan pada kondisi daya listrik 120 volt dan dihentikan jika indikator migrasi telah mencapai batas bagian bawah dari gel. Pembuatan larutan dapar migrasi dengan menimbang 3,03 g tris dan 14,41 g glisin dilarutkan dengan air suling secukupnya sambil diaduk. pH larutan diatur hingga mencapai pH 8,3. Larutan dicukupkan volumenya hingga 100 mL. Ke dalam labu ukur 1000 mL dimasukkan 100 mL larutan campuran tris dan glisin, volume larutan dicukupkan dengan air suling dan larutan disimpan suhu 2-8°C hingga akan digunakan.

Tahap pewarnaan gel

Setelah elektroforesis, gel dilepaskan dari plat kaca dan direndam dalam pewarna I sambil ditempatkan pada

pengaduk orbital kecepatan 15 rpm selama 20 menit. Gel selanjutnya dicuci dengan larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,8. Gel diwarnai kembali dengan larutan pewarna II sambil ditempatkan pada pengaduk orbital kecepatan 15 rpm selama 15 menit dan dicuci kembali dengan larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,8. Gel selanjutnya dipaparkan di bawah cahaya lampu kurang lebih 10 menit hingga terbentuk pipa transparan.

Pengukuran aktivitas enzim SOD

Aktivitas SOD buah merah ditentukan dengan densitometri. SOD pembanding dari *Escherichia coli* dibuat beberapa seri konsentrasi larutan untuk pembuatan kurva kalibrasi. Sebanyak 10 mg SOD standar dilarutkan dalam dapar tris-HCl 0,15 M pH 7,5 dalam labu ukur 10 mL. Dibuat pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 40, 120, 200, 280, dan 360 µg/mL. Dari setiap konsentrasi tersebut, dipipet masing-masing 25 µL untuk dilakukan elektroforesis. Gel tersebut selanjutnya dilakukan pemayaran dengan densitometer. Tiap pita yang terbentuk pada gel diberi bingkai yang sama ukurannya. Selain itu dibuat bingkai lainnya pada latar belakang gel sebagai blanko. Masing-masing bingkai ditentukan volume-nya secara otomatis dengan *molecular analyst software*. Pita yang transparan menunjukkan daerah aktivitas yang diberikan oleh SOD. Daerah aktivitas yang diperoleh dihitung secara manual, yaitu volume blanko dikurangi volume masing-masing pita. Hasil perhitungan kemudian dibuat dalam kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan garis lurus. Aktivitas SOD sampel buah merah ditentukan dengan menghitung dari kurva kalibrasi.

Isolasi dan Pemurnian Enzim

Ekstrak kasar hasil ekstraksi diukur volumenya untuk menentukan jumlah amonium sulfat yang akan ditambahkan dengan konsentrasi 25% b/v (B), 50% b/v (C) dan 75% b/v (D). Penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Larutan ekstrak selanjutnya disentrifuga suhu 4°C, kecepatan 4500 rpm selama 15 menit. Setiap endapan yang diperoleh dari hasil fraksinasi setelah di-sentrifuga dilakukan dialisis. Endapan dimasukkan dalam plastik selofan dan ditempatkan dalam larutan pendialisasi yaitu larutan dapar tris-HCl 0,015 M pH 7,5 sebanyak 2 liter. Pengadukan dilakukan menggunakan pengaduk magnetik dan setiap 4 jam larutan pendialisasi diganti. Dialisis dilakukan selama kurang lebih 12 jam. Dialisis yang diperoleh dilakukan pengujian aktivitas SOD dengan elektroforesis-densitometer.

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi SOD dari buah merah diawali dengan isolasi enzim tersebut dari sel atau konstituen selular lainnya dengan melakukan penghancuran sel menggunakan

waring blender. Teknik ini dimaksudkan agar enzim dapat terlepas dari sel dan masuk ke dalam larutan pengekstraksi. Ekstraksi enzim dilakukan menggunakan larutan dapar tris-HCl pH 7,5 dan akan diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*). Semua tahap pengerjaan dimulai dari pengambilan sampel hingga aplikasi elektroforesis dilakukan dengan menjaga suhu sekitar 4-6°C dan pH 7,5 karena sifat enzim yang dapat terdegradasi oleh perubahan suhu dan pH.

Tahap selanjutnya adalah isolasi dan pemurnian enzim diawali dengan melakukan sentrifuga untuk memisahkan enzim dari senyawa lain yang tidak larut dan juga menghilangkan sisa sel (*debris*). Kondisi sentrifuga pada suhu 4°C, kecepatan 4500 rpm selama 15 menit. Untuk tahap pemurnian enzim dilakukan dengan reaksi pengendapan menggunakan garam amonium sulfat yang dibuat dalam 3 konsentrasi, yaitu 25, 50 dan 75% b/v. Penambahan kadar amonium sulfat yang tinggi menyebabkan pertambahan kekuatan ion yang disebabkan adanya interaksi ion garam dengan molekul air dan sebaliknya akan menurunkan interaksi protein dengan air. Pengendapan protein dapat terjadi mulai dari protein yang kelarutannya kecil dalam air dan seterusnya. Kelebihan garam amonium sulfat kemudian dihilangkan dengan dialisis. Jumlah penambahan amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah Penambahan Amonium Sulfat

No	Volume Sampel (mL)	Konsentrasi Amonium Sulfat (% b/v)	Jumlah Amonium sulfat yang Ditambahkan (g) *)
C ₁	10	25	1,44
C ₂	10	50	2,88
C ₃	10	75	4,32

*) Penambahan garam ammonium sulfat ditentukan berdasarkan Tabel (Scopes 1987)

Pengujian aktivitas SOD sangat dipengaruhi pada tahap pewarnaan (Hou *et al.* 2003). Pewarna I yaitu nitro biru tetrazolium berfungsi sebagai indikator warna untuk menentukan lokasi terdapatnya SOD pada gel. Selain itu juga sebagai kompetitor ion superoksida. Pewarna II adalah riboflavin dan TEMED yang menghasilkan ion superoksida setelah pemaparan oleh cahaya lampu. Cahaya lampu mengeksitasi riboflavin menghasilkan ion super-oksida. Ion ini akan mereduksi NBT menjadi warna biru keunguan dan ion ini merupakan substrat spesifik untuk SOD. Pada saat ion superoksida bereaksi dengan enzim SOD akan memberikan daerah transparan pada gel dan daerah ini juga menunjukkan lokasi enzim SOD pada gel tersebut seperti terlihat pada Gambar 1.

Aktivitas SOD dari mesokarp buah merah dapat ditentukan dengan densitometer (Chen dan Pan 1996). Besarnya aktivitas SOD merupakan daerah transparan diperoleh dengan menghitung dari kurva kalibrasi yang dibuat dari SOD pembanding hasil isolasi dari *Escherichia coli*. Persamaan garis lurus diperoleh $y=1,8126x-2,1199$ dengan koefisien korelasi $r=0,9638$ dan nilai x adalah daerah aktivitas yang terukur oleh densitometer. Hasil perhitungan aktivitas SOD buah merah seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengukuran Daerah Aktivitas Gel Hasil Elektroforesis dengan Densitometer

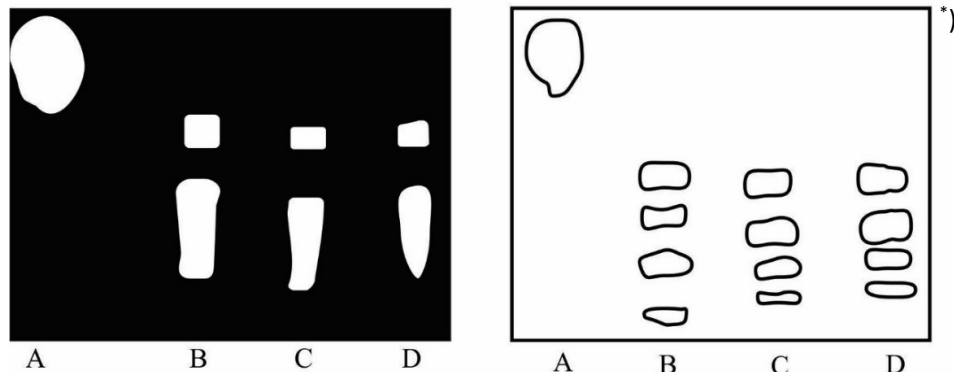
Sampel	Daerah Aktivitas Rata- rata*) yang terukur oleh Densitometer (OD x mm ²)	Aktivitas Enzim (U/μL)
A	3,93 ± 0,36	0,42
B	9,15 ± 0,55	1,21
C	10,90 ± 0,51	1,47
D	15,50 ± 0,42	2,17

*) Daerah aktivitas = volume bingkai blanko – volume bingkai daerah transparan.

Untuk menentukan aktivitas spesifik dari SOD buah merah dilakukan penentuan kadar protein ekstrak buah merah. Aktivitas spesifik dinyatakan dalam unit enzim per mg protein dan hal ini terkait dengan faktor kemurnian enzim (Hohnade 1984). Aktivitas spesifik enzim adalah parameter yang digunakan pada proses pemurnian enzim. Nilai aktivitas spesifik akan naik pada tiap tahap pemurnian. Pada percobaan ini, peningkatan nilai aktivitas sangat kecil. Hal ini dapat disebabkan karena proses pemurnian enzim menggunakan teknik dialisis sangat sederhana dan membutuhkan waktu yang cukup lama sehingga kemungkinan terjadi penurunan aktivitas enzim. Untuk tahap pemurnian yang optimal dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel.

Kadar protein ditentukan dengan metoda spektrofotometri sinar tampak dengan menggunakan pereaksi Biuret dan diperoleh serapan maksimum pada $\lambda=547$ nm. Pembuatan kurva kalibrasi dari serum albumin sapi diperoleh persamaan garis lurus $y=0,1078x + 0,0035$ dengan koefisien korelasi $r=0,9909$. Hasil penentuan kadar protein tampak pada Tabel 3.

Ekstrak enzim kasar memiliki aktifitas spesifik sebesar 80,385 U/mg. Dari hasil pemurnian enzim dengan cara dialisis dapat meningkatkan aktivitas enzim hingga 3,5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasarnya.



Gambar 1. Elektroforegram SOD buah merah dan SOD pembanding dari *E. coli*. (A) SOD pembanding dari *E.coli*, (B) SOD buah merah hasil pengendapan 25% amonium sulfat, (C) SOD buah merah hasil pengendapan 50% amonium sulfat, (D) SOD buah merah hasil pengendapan 75% amonium sulfat. *) sketsa dari gambar 1.

Tabel 3. Rekapitulasi Hasil Pemurnian Enzim SOD dalam Mesokarp Buah Merah

Tahap	Volume (mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Total Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg protein)
A	10	0,0052	420	80.385
B	10	0,0057	1.210	212.280
C	10	0,0063	1.470	233.333
D	10	0,0077	2.170	281.818

Kesimpulan

Pengujian aktivitas enzim SOD dapat dilakukan dengan metoda kombinasi elektroforesis-densitometri. Hasil pengukuran aktivitas isoenzim SOD mesokarp buah merah pada ekstrak kasar sebesar 420 U/mL atau setara dengan 836 U/gram buah merah. Aktivitas enzim SOD dapat meningkat menjadi 3,5 kali lebih tinggi setelah dilakukan pengendapan enzim dengan amonium sulfat.

Daftar Pustaka

Beauchamp C, Fridovich I, 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Anal. Biochem. 44(1): 276-287.

Chen CN, Pan SM, 1996, Assay of Superoxide Dismutase Activity by Combining Electrophoresis and Densitometry, Bot. Bull. Acad. Sin. 37: 101-111.

Clarkson PM, 1995, Antioxidants and Physical Performance, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35: 131-141.

Gegenheimer P, 1990, Preparation of Extracts from Plants, in: Guide to Protein Purification, Deutscher, M.P., (Ed), vol. 182, Academic Press, Inc., New York, 174-190.

Hohnade DC, 1984, Enzymes, in: Clinical Chemistry, Theory, Analysis, and Correlation, Kaplan, L.A., and Pesce, A.J., (Eds), The C.V. Mosby Company, ST. Louis, 152-161.

Hou WC, Lu YL, Liu SY, Lin YH, 2003, Activities of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Leaves of Different Cultivars of *Liriope spicata* L. on 10% SDS-PAGE gels, Bot. Bull. Acad. Sin. 44: 37-41.

Santos R, Fransa T, Laporte ML, Sauvage C, Touati D, Expert D, 2001, Essential Role of Superoxide Dismutase on The Pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937, MPMI 14(6): 758-767.

Santos WG, Pacheco I, Liu MY, Teixeira M, Xavier AV, Legall J, 2000, Purification and Characterization of an Iron Superoxide Dismutase and Catalase from The Sulfate Reducing Bacterium *Desulfovibrio gigas*, J. Bacteriol. 183(3): 796-804.

Scopes RK, 1987, Protein Purification: Principles and Practice, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 245-247.