

Deteksi Enzim Peroksidase dari Lobak Putih (*Raphanus sativus* L.) Berdasarkan Kadar Proteinnya

Detection of Peroxidase Enzyme from Radish (Raphanus sativus L.) Based on Its Protein Content

Mauliy Nabia Susanto¹, Ahmad Ni'matullah Al-Baarri^{1,2*}, Anang Mohamad Legowo¹

¹Program Studi Teknologi Pangan, Jurusan Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang

²Laboratorium Teknologi Pangan, UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Semarang

*Korespondensi dengan penulis (albari@undip.ac.id)

Artikel ini dikirim pada tanggal 29 Maret 2019 dan dinyatakan diterima tanggal 31 Desember 2021. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui www.ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/tekpangan. eISSN 2597-9892. Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Abstrak

Enzim peroksidase telah banyak digunakan sebagai reagen di bidang farmasi, industri maupun pangan. Lobak putih (*Raphanus sativus* L.) merupakan tanaman yang dikenal dengan kandungan enzim peroksidase dan senyawa bioaktif lainnya yang baik untuk kesehatan, namun pemanfaatannya masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi enzim peroksidase dari lobak putih berdasarkan kadar proteinnya dengan teknik pertukaran ion. Fraksi hasil elusi diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm. Jumlah fraksi yang didapat sebanyak 29 fraksi. Berdasarkan pengamatan absorbansi, maka didapat hasil bahwa fraksi dengan urutan ke-5 merupakan fraksi yang mempunyai nilai absorbansi terbesar dan perkiraan kadar protein sebesar 1,387%, melalui uji Bradford kadar protein yang diperoleh sebesar 0,152%. Penelitian ini telah berhasil untuk melakukan pengambilan enzim peroksidase dan dapat digunakan sebagai informasi mengenai penelitian lebih lanjut.

Kata kunci : enzim peroksidase, ekstraksi, kandungan protein, lobak, pertukaran ion.

Abstract

Peroxidase enzyme has been widely used as reagent in pharmacy, industrial, and also food. Radish (Raphanus sativus L.) is a plant that has been known to contain peroxidase and other bioactive compounds that are good for health, but its applications are still limited. This study aims to detect peroxidase enzymes contained in radish based on its protein content by ion exchange techniques. The elution fraction was measured by absorbance on a spectrophotometer with a wavelength of 280 nm. Total obtained fraction from elution was 29 fractions. Based on absorbance observation, it was found that fraction with the order of-5 is the fraction that has the greatest absorbance value which has protein content estimation of 1,387%, protein content obtained through Bradford test was 0,152%. This study has succeeded in conducting peroxidase enzyme taking and particularly useful for advanced research.

Keywords: radish, peroxidase enzyme, extraction, protein content, ion exchange

Pendahuluan

Enzim peroksidase telah banyak dimanfaatkan terutama dalam bidang industri, kesehatan dan pangan. Enzim ini termasuk kelompok enzim yang sangat penting karena diterapkan di berbagai bidang seperti lingkungan, laboratorium dan farmasi (Rodiyah *et al.*, 2014). Aplikasi di bidang industri telah menunjukkan bahwa enzim peroksidase mampu mereduksi komponen fenolik dalam limbah cair, menyintesis senyawa aromatik dan mengurangi peroksida dari limbah industri (Bódalo *et al.*, 2006). Peroksidase adalah salah satu enzim yang mampu mengkatalis berbagai reaksi oksidasi-reduksi (Diao *et al.*, 2011). Peroksidase itu sendiri merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalis reaksi kimia secara aman tanpa merusak sel atau metabolisme yang ada (Al-Baarri, 2016). Sumber peroksidase dapat ditemukan di bagian tubuh hewan maupun tanaman (Rusdi *et al.*, 2014).

Tanaman lobak (*Raphanus sativus*) merupakan tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional (Shoeb, 2006) dan banyak memiliki enzim peroksidase (Karossi dan Pudjiraharti, 2010). Salah satu metode ekstraksi enzim peroksidase ini yang lazim dilakukan adalah dengan cara pertukaran ion (Pudjiraharti dan Karossi, 2009). Metode ekstraksi jenis ini merupakan metode yang lazim di dunia industri karena dapat dilakukan secara murah dan simpel (Rakhmawati *et al.*, 2009). Prinsip pengambilan enzim dengan metode ini adalah dengan menginteraksikan muatan positif dan

negatif antara molekul spesifik dengan molekul atau resin yang berada di dalam kolom, dengan bantuan larutan buffer yang dapat mengatur pH yang disesuaikan dengan protein yang didapatkan (Motoyama *et al.*, 2007). Metode ini berdasarkan adanya interaksi antara fase gerak dan fase diam (Kempe *et al.*, 1999).

Kromatografi jenis pertukaran ion telah banyak dilakukan seperti pada ekstraksi enzim horseradish peroksidase (HRP) dari bayam telah dilakukan menggunakan amonium sulfat pada konsentrasi 0% hingga 65% (Rusdi *et al.*, 2014). Peroksidase dari daun tomat dengan resin SP-*Sepharose* FF (Utami *et al.*, 2017). Analisis aktivitas peroksidase (POD) buah persik (*Prunus persica* Batsch w. Redhaven) dengan resin Phenyl-*Sepharose* CL-4B untuk mengamati bobot buah dari tahap awal hingga matang (Jiménez-Atiéndzar *et al.*, 2007).

Sampai dengan saat ini telah dilakukan beberapa penelitian mengenai ekstraksi enzim dari tanaman, namun belum ada fokus ekstraksi enzim peroksidase dari buah lobak dengan resin DEAE-*Sepharose* pada kromatografi pertukaran ion yang kemungkinan mempunyai variasi perbedaan aktivitas dan jumlahnya. Penelitian ini difokuskan untuk mendeteksi enzim peroksidase berdasarkan kadar proteinnya. Manfaat untuk memperoleh informasi deteksi kadar protein dari enzim peroksidase lobak (*Raphanus sativus* L.) menggunakan resin DEAE-*Sepharose*.

Materi dan Metode

Materi

Lobak putih (*Raphanus sativus* L.) didapat dari supermarket lokal di sekitar lokasi penelitian, aquades, gel, ovalbumin, peroksidase komersial, kit *bradford*, ABTS dan H₂O₂.

Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2017 hingga Januari 2018 di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

Prosedur Pengambilan Sari Lobak Putih

Pembuatan sari lobak dilakukan dengan cara lobak ditimbang sebanyak 300 g yang terlebih dahulu dikupas hingga bersih, dicuci dengan menggunakan air bebas klorin, kemudian dipotong menjadi 4 bagian dengan berat rata-rata 50 g. Potongan lobak dimasukkan ke dalam *juicer* (Sigmatic SFP 1000, China) untuk didapatkan sari lobak, sisa ampas lobak diperas dengan kain saring sebanyak 2 kali. Proses ini dapat menghasilkan 270 ml sari lobak yang kemudian ditambahkan aquades hingga volume mencapai 300 ml untuk digunakan ke tahap proses selanjutnya.

Prosedur Ekstraksi Peroksidase Lobak

Proses ekstraksi dimulai dengan melakukan pengaliran sari lobak melalui kolom yang telah diisi dengan resin DEAE-*Sepharose* sebanyak 60 g. Pertama-tama, resin dibersihkan dengan mengalirkan 300 ml aquades, dilanjutkan dengan mengalirkan 0,5 mM NaCl sebanyak 300 ml pada kolom, dan kembali dialirkan dengan aquades sebanyak 300 ml. Proses dilakukan dalam suhu 4°C. Selanjutnya, sebanyak 300 ml sari lobak yang telah diperoleh pada tahap sebelumnya, dialirkan ke dalam kolom secara perlahan. Output yang keluar dari kolom dibuang lalu guna mengambil enzim yang terikat pada resin maka dialirkan 10 mM PB pH 7 sebanyak 200 ml yang dilanjutkan dengan mengalirkan 300 ml larutan PB pH 7 yang mengandung NaCl konsentrasi 0,4 mM. Tiap hasil larutan yang terkumpul, ditampung dalam *sentrifuge tube* 10 ml. Berdasarkan tahap kegiatan ekstraksi ini, dapat dikumpulkan sebanyak 29 buah tabung. Tiap tabung disebut dengan istilah fraksi (Rodriguez-lopez *et al.*, 2000) yang kemudian langsung disimpan dalam suhu 4°C dan dalam keadaan tertutup. Resin dicuci dengan mengalirkan 300 ml NaCl 1M dan diikuti dengan pengaliran PB 10 mM pH 7, kemudian aliran ditutup.

Prosedur Analisis Fraksi

Dari 29 fraksi yang didapat dari elusi dilakukan pengecekan absorbansi dengan spektrofotometer (Shimadzu 1800, Jepang) pada panjang gelombang 280 nm. Tiap fraksi sebanyak 100 µl ditambahkan 450 µl H₂O₂ 0,55 mM dan 450 µl 2,2'-azino-bis (3-*ethylbenzothiazoline*-6-*sulphonic acid*) (ABTS) 0,55 mM sebagai radikal bebas (Al-Baarri *et al.*, 2010). Fraksi dengan nilai

absorbansi tertinggi dihitung perkiraan kadar proteinnya. Lima fraksi dengan nilai absorbansi tertinggi dihomogenkan untuk dilakukan pengujian Bradford.

Prosedur Pengujian Protein

Pengukuran kadar protein dengan metode Bradford menggunakan kit Bradford sebagai reagen uji. Kit Bradford dibuat dengan mencampurkan 10 mg *coomasie brilliant blue* R-250 (CBB R-250) dengan 50 ml etanol 95%, kemudian ditambahkan 100 ml asam fosfat 85%. Setelah itu, 100 ml larutan diambil dan ditambahkan 200 ml aquades dan disaring dengan syringe filter (Bradford, 1976).

Kit Bradford sebanyak 5 ml ditambahkan pada 100 μ l sampel enzim peroksidase lalu dihomogenkan dengan vortex (Scilogex MX-5). Kemudian larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm dan diuji pada menit ke-0, menit ke-2 jam pertama. Blanko memiliki komposisi yang sama, namun ekstrak lobak putih diganti dengan 10 mM PB pH 7,0. Pengukuran kadar protein ini ditentukan berdasarkan persamaan linier yang dihasilkan dari pembuatan kurva standar yang didapat dari konsentrasi standar protein ovalbumin (Purwanto, 2014) dengan kisaran 0,4375% sampai 5% dan nilai R^2 yang dihasilkan adalah 0,9723.

Perhitungan Kadar Protein Fraksi

Perkiraan total protein tiap fraksi dihitung dengan cara melihat absorbansi masing-masing fraksi pada panjang gelombang 280 nm (Touch *et al.*, 2005). Kadar perkiraan protein sampel (%) ditentukan dengan cara nilai absorbansi fraksi pada gelombang 280 nm dibagi dengan 1,5 yang merupakan faktor konversi protein.

Analisis Data

Data hasil absorbansi diolah dengan perhitungan kadar protein untuk mendapatkan persentase kadar protein peroksidase lobak.

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi Enzim Peroksidase Lobak

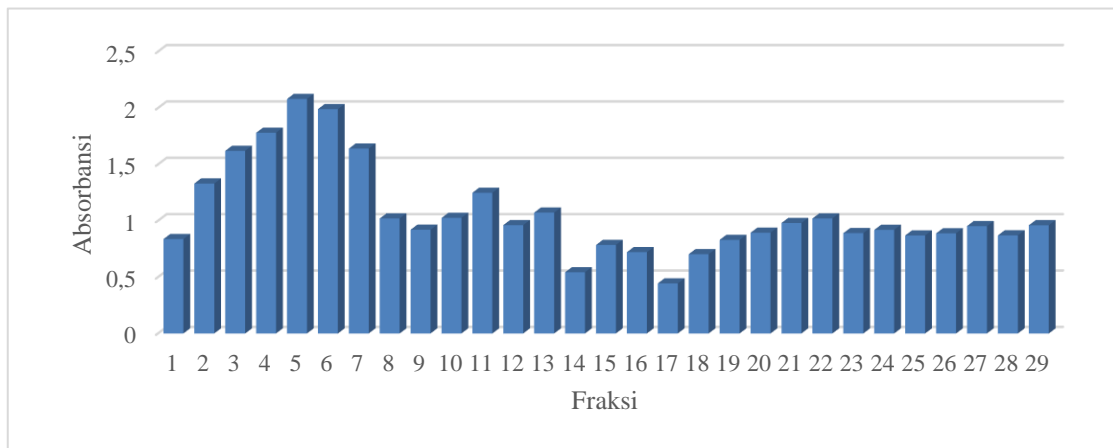
Proses ekstraksi enzim peroksidase dilakukan dengan menggunakan bagian supernatan dari jus lobak yang didapatkan dengan bantuan *juicer*. Supernatan tersebut, lalu diendapkan dan disaring untuk memisahkan padatan yang masih terlarut. Hal ini dilakukan untuk menghindari masalah yang sering muncul pada saat proses pengaliran dengan menggunakan kolom, yaitu masalah berhentinya aliran elusi (Fitriansyah, 2016). Proses elusi dengan menggunakan kolom DEAE-Sepharose, dilakukan pada suhu 4°C guna menjaga kestabilan peroksidase dari lobak (Rusdi *et al.*, 2014).

Proses ekstraksi diawali dengan pencucian resin DEAE-Sepharose menggunakan PB 10 mM pH 7,0 yang mengandung NaCl untuk membersihkan resin dari kemungkinan enzim sisa proses ekstraksi sebelumnya (Al-Baarri *et al.*, 2011). Proses ekstraksi menggunakan resin DEAE-Sepharose yang merupakan resin dengan jenis *anion exchanger*. Resin ini bersifat positif sehingga dapat menarik protein yang bermuatan negatif, seperti sebagian besar protein dari tanaman termasuk lobak. Enzim peroksidase dari lobak dapat terikat karena resin DEAE-Sepharose berfungsi sebagai penukar anion yang kuat (Yu dan Sun, 2012).

Hasil ekstraksi enzim peroksidase dari 300 g lobak didapatkan 29 fraksi yang masing-masing sebanyak 10 ml dalam *sentrifugal tube*. Pengukuran kadar protein dari tiap fraksi dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm. Panjang gelombang 280 nm digunakan untuk mengetahui jumlah protein pada hasil sampel purifikasi protein, protein yang terlarut akan menyerap sinar UV dengan baik. Hal ini sesuai dengan pendapat Purwanto (2014) yang menyatakan bahwa asam amino protein optimum pada spektrofotometer adalah pada panjang gelombang 280 nm, asam amino *Tyrosine* (Tyr/Y), *Tryptophan* (Trp/W) dan *Phenylalanine* (Phe/F) memiliki absorbansi sekitar 280 nm karena adanya cincin aromatik dalam strukturnya.

Berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm, maka didapat nilai absorbansi tertinggi sebesar 2,080 yang didapat dari fraksi nomor 5. Berdasarkan hasil perhitungan pada Lampiran 1, fraksi ini diperkirakan mengandung protein sebesar 1,387%. Nilai absorbansi ini perlu diklarifikasikan lagi dengan jumlah aktivitas enzim dan profil proteinnya. Penelitian sebelumnya dengan menggunakan daun tomat sebagai sumber peroksidase menghasilkan kandungan protein sebesar 0,152% (Utami *et al.*, 2017). Peroksidase juga telah berhasil diambil dari ekstrak daun kangkung dengan protein yang didapat sebesar 0,062% (*Ipomoea aquatica* Forssk.) (Rusdi *et al.*, 2014). Empat fraksi lainnya dengan absorbansi yang tinggi yakni fraksi nomor 3, 4, 6 dan 7 diduga memiliki rentang besar protein yang tidak jauh dari hasil fraksi nomor 5. Pada proses selanjutnya

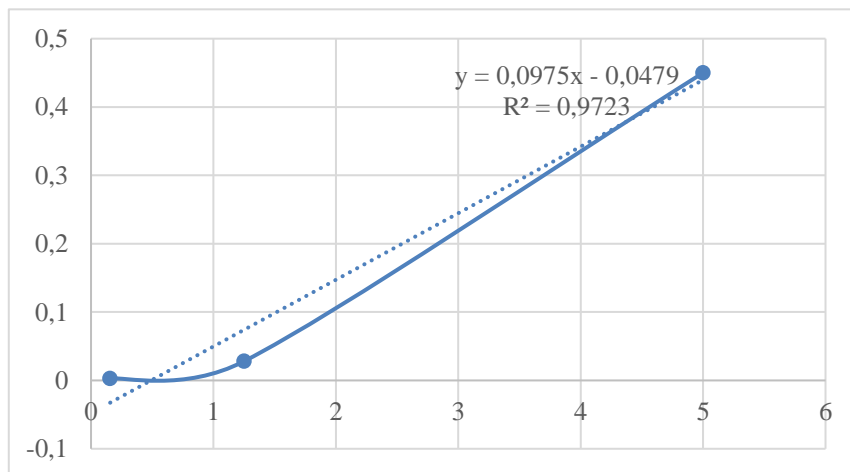
menggunakan kelima fraksi tersebut untuk mengambil rata-rata kandungan protein melalui pengujian Bradford.



Ilustrasi 1. Grafik Absorbansi Enzim Peroksidase Lobak

Kadar Protein dengan Bradford

Penentuan kadar protein dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya dengan metode Bradford, metode Lowry, dan metode Biuret. Metode Bradford adalah metode untuk mengukur konsentrasi protein total secara kolorimetri dalam suatu larutan. Metode ini menggunakan larutan pewarna (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam, sehingga memberikan warna (kebiruan). Karena menghasilkan warna, sehingga secara kolorimetri dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 465-595 nm (cahaya tampak) (Kumaunang dan Kamu, 2011).



Ilustrasi 1 Grafik Kurva Standar Ovalbumin Panjang Gelombang 280 nm

Larutan ovalbumin digunakan sebagai larutan standar dalam penentuan kadar protein dengan konsentrasi 0,4375%, 0,875%, 1,75%, 2,5% dan 5%. Percobaan ini dilakukan dengan menambahkan sejumlah NaCl pada larutan ovalbumin, yang berfungsi sebagai pelarut protein yang akan diukur. Penambahan NaCl ini dapat menyebabkan nilai absorbansinya menurun atau semakin kecil, karena pengompleksan protein dan zat warna CBB dalam reagen Bradford akan semakin sedikit. Semakin kecilnya nilai absorban, menunjukkan bahwa protein yang larut semakin banyak (Khopkar, 2007). Ilustrasi 3 menunjukkan kurva standar yang didapatkan dari ovalbumin sebagai acuan penentuan kadar protein enzim (Purwanto, 2014).

Berdasarkan perkiraan kadar protein dari salah satu fraksi dengan nilai absorbansi tertinggi didapatkan hasil sebesar 1,387%. Berdasarkan Tabel 2, dengan perhitungan pada Lampiran 1, kandungan protein peroksidase dari lobak putih dengan persamaan kurva standar ovalbumin

didapatkan kandungan protein sebesar 0,542% yang lebih rendah jika dibandingkan dengan protein enzim peroksidase komersial maupun dengan perkiraan perhitungan. Hal ini disebabkan karena hanya menggunakan satu fraksi dengan nilai absorbansi tertinggi untuk menghitung kadar protein, serta kemungkinan masih terdapatnya protein lain hasil pengaliran ekstrak lobak putih dalam kolom selama proses kromatografi. Sedangkan pada pengujian Bradford, kandungan protein dihitung dari 5 fraksi dengan nilai absorbansi tertinggi yang dihomogenkan ditambahkan dengan kit Bradford, sehingga kemungkinan kadar protein menjadi lebih rendah, namun nilai absorbansi menunjukkan kemurnian enzim peroksidase yang lebih tinggi.

Tabel 1. Hasil Uji Bradford Enzim Peroksidase

Sampel	Panjang Gelombang	Selisih 1 jam	R ²
Peroksidase Komersial	280 nm	0.018	0.676
Peroksidase Lobak Putih	280 nm	0.005	0.542

Kesimpulan

Pengambilan enzim peroksidase dari lobak putih (*Raphanus sativus* L.) dapat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi pertukaran ion. Dari 29 fraksi yang didapat dari proses ekstraksi, fraksi ke-5 menunjukkan nilai absorbansi tertinggi dengan kisaran kandungan protein sebesar 1,387%. Uji Bradford menunjukkan hasil kandungan protein enzim peroksidase lobak putih sebesar 0,542%.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kemenristekdikti yang telah membiayai seluruh penelitian ini melalui skema penelitian publikasi internasional.

Daftar pustaka

- Al-Baarri, A. N., M. Ogawa and S. Hayakawa. 2010. Scale-up studies on immobilization of lactoperoxidase using milk whey for producing antimicrobial agent. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 35: 185–191. DOI: 10.14710/jitaa.35.3.185-191
- Al-Baarri, A. N. 2016. Peroksidase Daun Tomat dan Aplikasinya untuk Antibakteri. Penerbit Indonesian Food Technologist, Semarang.
- Al-baarri, A.N., M. Hayashi, M. Ogawa and S. Hayakawa. 2011. Effects of Mono-and Disaccharides on the Antimicrobial Activity of Bovine Lactoperoxidase System. *Journal of Food Protection* **74**(1): 134–139. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-184
- Bódalo, A., J. L. Gómez, E. Gómez, J. Bastida and M. F. Máximo. 2006. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemosphere* **63**(4): 626–632. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.08.007
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem* **72**: 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Diao, M., O. H. Kone, N. Ouedraogo, R. G. Bayili, I. H. N. Bassole, and H. Mamoudou. 2011. Comparison of peroxidase activities from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* grown in Burkina Faso. *African Journal of Biochemistry Research* **5**(4): 124-128. ISSN 1996-0778
- Fitriansyah, B., A. N. Al-Baarri dan A. M. Legowo. 2015. Konsentrasi Minimum Sistem Laktoperoksidase untuk Menekan Pertumbuhan *Escherichia coli* pada Susu Sapi Segar. *J. Teknol. dan Industri Pangan* **26**(1): 100-108. DOI: 10.6066/jtip.2015.26.1.100
- Jiménez-Atiénzar, M., M. A. Pedreño, N. Caballero, J. Cabanes and F. García-Carmona. 2007. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from peach mesocarp (*Prunus persica* L. cv. Babygold). *J. Sci. Food Agric* **87**: 1682–1690. DOI: 10.1002/jsfa.2886
- Kumaunang, M. dan V. Kamu. 2011. Aktivitas enzim bromelin dari ekstrak kulit nenas (*Ananas comosus*). *Jurnal Ilmiah Sains* **11**(2):198-201. DOI: <https://doi.org/10.1234/jis.v11i2.207>

- Karossi, A. T. dan S. Pudjiraharti. 2010. Isolasi enzim horseradish peroksidase (HRP) dari kultur sel daun *Armoracia lapatifolia* dengan cara fraksinasi menggunakan amonium sulfat. JKTI **12**(1): 20-25.
- Kempe, H., A. Axelsson, B. Nilsson and G. Zacchi. 1999. Simulation of chromatographic processes applied to separation of protein. Journal of Chromatography A **846**(1-2): 1-12. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)01079-6
- Motoyama, A., T. Xu, C. I. Ruse, J. A. Wohlschlegel and J. R. Yates. 2007. Anion and cation mixed-bed ion exchange for enhanced multidimensional separations of peptides and phosphopeptides. Analytical chemistry **79**(10): 3623-3634. DOI: 10.1021/ac062292d
- Pudjiraharti and A. T. Karossi. 2009. Purification And Characterization Of White Radish (*Raphanus Sativus* L. *Var Long White*) Peroxidase From Cell Culture Extract. Jurnal Teknologi Indonesia **32**(2):91-98. DOI: 10.14203/jti.v32i2.8
- Purwanto, M.G.M. 2014. Perbandingan analisa kadar protein terlarut dengan berbagai metode spektroskopi UV - Visible. Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi **7**(2): 64 - 71. ISSN 0216-1540.
- Rakhmawati, R., E. Anggarwulan and E. Retnaningtyas. 2009. Potency of Lobak (*Raphanus sativus* L. *var. hortensis* Back) as Anticancer and Antimicrobial Candidates. Biodiversitas **10**(3):158-162. DOI: 10.13057/biodiv/d100310
- Rodriguez-Lopez, J. N., J.C. Espin, J. Tudela, V. Martinez, A. Cerda and Garcia-Canovas, F. 2000. Purification and Kinetic Characterization of Peroxidase from Tomato Cultivated under Different Salinity Conditions. Journal of Food Science **65**(1): 15-19. DOI: 10.1021/jf9905774
- Rusdi, B., D. Mulyanti and M. Rodiyah. 2014. Characterization of Peroxidase Enzyme from Water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.) Fraction. Procedia Chemistry **13**(170-176). DOI: 10.1016/j.proche.2014.12.022
- Shoeb, M. 2006. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh Journal Pharmacology **1**: 35-41. DOI: 10.3329/bjp.v1i2.486
- Utami, T., A. N. Al-Baarri dan A. M. Legowo. 2017. Pengambilan Enzim Peroksidase dari Daun Tomat dengan Menggunakan Teknik Pertukaran Ion. Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan **6**(2): 85-88. DOI: 10.17728/jatp.220
- Yu, L. L and Y. Sun. 2012. Trace adsorption of positively charged proteins onto Sepharose FF and Sepharose FF-based anion exchangers. Journal of Chromatography A **1253**: 105–109. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.07.004