

PEMURNIAN PROTEASE DARI BUAH DAN DAUN MENGGKUDU (*Morinda citrifolia* L.)

[Purification of Proteases from Fruits and Leaves of Noni (*Morinda citrifolia* L.)]

Dwi Ishartani^{1,2)*}, Elfi²⁾, Nuri Andarwulan^{2,3)}, dan Dahrul Syah^{2,3)}

¹⁾ Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

³⁾ Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, IPB

Diterima 15 Maret 2011 / Disetujui 24 Agustus 2011

ABSTRACT

Proteases have been widely used in cancer treatment, wounds healing, overcoming digestion disorder and other modern pharmaceutical applications. Proteases may be present in fruits and leaves of noni (*Morinda citrifolia* L.) since the plant has been used traditionally in wound healing. This research aimed to purify proteases from noni's fruits and leaves at two maturity stages, i.e. fruits with green-yellow (TK2) and white-yellow (TK4) skin colour, also leaves from shoot and base. Proteases were purified through several steps consisting of extraction, precipitation using saturated ammonium sulfate and dialysis followed by electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) and zymography. The specific activity of the four extracts showed different trend during purification. The specific activity of TK2 fruit, shoot and base leaves decreased whereas TK4 fruits increased. TK2 crude extract had a higher specific activity (3.79 U/mg) than the other crude extracts. SDS-PAGE and zymogram using 12% acrylamide indicated that the dialysates were not pure proteases. The molecular weight profiles of the TK2 dialysates were similar to TK4 dialysates, while those of shoot leaves dialysates were similar to the base leaves dialysates. The SDS-PAGE separated the enzymes in the fruit dialysates into several bands of polypeptides, i.e. 24-26kDa, 14-15kDa, 12-13kDa and the smaller ones, and also separated the enzymes in the dialysates of leaves into two bands, 70kDa and 58-61.5kDa. Protease bands detected in the zymogram of fruits were estimated at ~25kDa, ~27kDa, and 37-38kDa, whereas of those of leaves were estimated at ~29kDa and ~50kDa. The ~25kDa and ~29kDa protein bands appearing in zymogram were similar to papain's and bromelain's molecular weight.

Keywords: purification, proteases, *Morinda citrifolia* L., fruits, leaves

PENDAHULUAN

Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang termasuk *Rubiaceae* sangat populer di kawasan Asia Tenggara, Kepulauan Pasifik dan Karibia, termasuk salah satunya Indonesia. Produksi mengkudu di Indonesia terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Departemen Pertanian Republik Indonesia (2008) melalui websitenya menunjukkan bahwa peningkatan produksi mengkudu sangat pesat, yaitu dari 1910 ton pada tahun 2003 menjadi 14016 ton pada tahun 2007.

Penggunaan buah mengkudu secara tradisional antara lain untuk obat sariawan, cacing, luka, abses, infeksi mulut dan gusi, sakit gigi, memar, rematik, sakit perut, hipertensi, dan makanan darurat saat kelaparan (Nelson, 2006). Pengalaman empiris peternak itik di Brebes menunjukkan daun mengkudu segar mampu meningkatkan kekebalan ternak itik terhadap flu burung (Setiawan, 2007), sedangkan di Tonga daun mengkudu digunakan untuk mengobati luka serta melunakkan daging dan gurita (Walter *et al.*, 2002).

Manfaat mengkudu sejauh ini belum dikaitkan dengan kandungan enzim di dalamnya. Penggunaan mengkudu secara tradisional sebagai obat luka besar kemungkinan salah satunya disebabkan karena adanya aktivitas protease pada buah tersebut. Sinclair dan Ryan (2007) menjelaskan bahwa protease secara khusus berperan dalam pengaturan pendewasaan sel,

perbanyak sel, serta sintesis dan pergantian kolagen dalam proses penyembuhan luka pada kulit.

Freedonia Group Inc. (Anonim^a, 2010) memprediksi pasar enzim di dunia akan terus meningkat, yaitu pada tahun 2013 diperkirakan mencapai US\$ 7 milyar, dengan peningkatan permintaan 6,3% per tahun. Illanes (2008) menyebutkan bahwa enzim dari tumbuhan, misalnya papain dan bromelain, masih relevan digunakan sebagai sumber enzim komersial. Enzim dari tumbuhan pada tahun 2008 menempati 5% dari total *market share* enzim.

Penggunaan buah dan daun mengkudu sebagai obat luka dan pengempuk daging diduga berkaitan dengan aktivitas protease. Tingginya potensi perdagangan enzim protease mendorong dilakukannya eksplorasi protease dari buah dan daun mengkudu. Pengaruh umur buah dan daun terhadap aktivitas protease diamati menggunakan buah dan daun dengan dua tingkat ketuaan berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi sifat fisik dan kimia, memurnikan protease, serta menentukan bobot molekul protease dari buah dan daun mengkudu pada dua tingkat ketuaan yang berbeda.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah dan daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan dua tingkat ketuaan berbeda yang diperoleh dari kebun IPB Darmaga.

*Korespondensi Penulis :
Email : dishtani@yahoo.com

Tanaman mengkudu yang digunakan dikultivasi menggunakan biji sejak tahun 2000 dan telah diidentifikasi oleh ahli botani dari Pusat Penelitian Biologi LIPI (data tidak ditampilkan). Bahan kimia yang digunakan adalah Na asetat, asam asetat, EDTA, gliserol, Polivinilpirolidon (PVP K30), β -mercaptoetanol, silika gel 60 H, ammonium sulfat, *protein marker* BM rendah (Fermentas SM-0431), BSA, kasein Hammerstein, *Coomassie Brilliant Blue* R-250 dan G-250, serta Ag nitrat. Semua bahan kimia yang digunakan mempunyai kualifikasi pro analisis.

Peralatan yang digunakan adalah *stick blender* Aletta A746, sentrifuse Hermle Z383K, kantong dialisis Sigma D9652, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu seri UV-2450, seperangkat alat elektroforesis gel Biorad Mini Protean 3 sel, Gel Doc/Chemi Biorad, dan alat-alat gelas.

Karakterisasi buah dan daun mengkudu

Karakterisasi sifat kimia dilakukan melalui analisis proksimat, yaitu meliputi kadar air (AOAC 931.04, 1999), kadar abu (AOAC 940.26, 1999), kadar protein mikro-Kjeldahl (AOAC 960.52, 1999), kadar lipid (AOAC 963.15, 1999), dan kadar karbohidrat (*by difference*). Karakterisasi sifat fisik dilakukan melalui pengamatan visual, meliputi warna kulit, tekstur, dan pencoklatan enzimatis, dan pembentukan bau menyengat pada suhu ruang (khusus buah).

Pemurnian protease

Proses pemurnian enzim dilakukan pada suhu 4-6°C. Kerja ekstraksi sampai dengan pengendapan dilakukan secara sinambung dalam satu hari untuk meminimalkan efek denaturasi enzim.

Pemurnian enzim dimulai dengan proses ekstraksi menurut Uchikoba *et al.* (2001) yang dimodifikasi untuk buah serta menurut Piero, Petrone (1999) dan Thomas *et al.* (2009) yang dimodifikasi untuk daun. Daging buah dan daun dipotong-potong kemudian ditambah dengan buffer asetat pH 5,0 bersuhu 4°C (buah:buffer asetat = 1:5) yang mengandung 5 mM EDTA, 10% gliserol, 3% (buah) dan 10% (daun) polivinilpirolidon (PVP K30), serta 14 mM β -merkaptoetanol. Campuran tersebut kemudian diblender dengan kecepatan tinggi selama 4 x 15 detik, dan selanjutnya disaring menggunakan dua lapis kain saring dan disentrifus 3775xg (5900rpm) selama 30 menit sehingga dihasilkan ekstrak enzim kasar. Khusus sampel daun, ekstrak enzim kasar yang didapat ditambah dengan silika 1,4% dan divorteks selama 5 menit kemudian disentrifus pada 3775xg (5900rpm) selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan adalah ekstrak hasil penambahan silika (ekstrak silika).

Protein pada ekstrak enzim kasar buah dan ekstrak silika daun selanjutnya diendapkan menggunakan garam ammonium sulfat 100% jenuh (Bollag dan Edelstein, 1991). Endapan enzim yang didapat selanjutnya dilarutkan kembali dalam jumlah yang minimal menggunakan buffer asetat pH 5,0 dan didialisis sehingga diperoleh endapan enzim bebas garam. Dialisis (Bollag dan Edelstein, 1991) dilakukan dengan menggunakan membran selulosa Sigma seri D9652 (cut off 12kDa). Sebelum dilakukan dialisis, kantong selulosa terlebih dahulu dipreparasi sesuai dengan rekomendasi produsen. Dialisis dilakukan selama 5 jam pada suhu 6°C dan setiap satu jam buffernya

diganti. Dialisat yang diperoleh adalah enzim yang telah bebas garam.

Penentuan bobot molekul protease

Enzim bebas garam dianalisis menggunakan elektroforesis, yaitu dengan teknik SDS-PAGE (Bollag dan Edelstein, 1991) dan zimografi (Copeland, 2000). Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel pemisah 12% akrilamid dan gel penahan 5% pada tegangan konstan 70V. Khusus gel pemisah zimografi, gel akrilamid dikopolimerisasi dengan kasein sebagai substrat protease. *Protein marker* berbobot molekul rendah digunakan sebagai penanda, yang terdiri dari β -galaktosidase (116kDa), bovine serum albumin (66,2kDa), ovalbumin (45kDa), laktat dehidrogenase (35kDa), REase Bsp98I (25kDa), β -laktoglobulin (18,4kDa), dan lisosim (14,4kDa). Hasil pemetaan Rf protein penanda (marker) pada sumbu x dan log BM protein penanda pada sumbu y menghasilkan nilai R² sebesar 0,9727 dengan persamaan regresi $y = -1,1502x + 2,0701$ untuk SDS-PAGE dialisat buah, R² sebesar 0,972 dengan persamaan regresi $y = -1,558x + 2,007$ untuk SDS-PAGE dialisat daun, dan persamaan regresi $y = -1,0478x + 2,1163$ dengan nilai R² sebesar 0,9782 untuk zimografi.

Pengukuran kadar protein dan aktivitas protease

Pengukuran kadar protein dan aktivitas protease dilakukan terhadap ekstrak yang didapat dari setiap tahap pemurnian. Pengukuran kadar protein dan aktivitas protease dilakukan menggunakan dua ulangan sampel, masing-masing duplo. Kadar protein diukur berdasarkan metode Bradford (1976) dan aktivitas protease diukur berdasarkan metode Bergmeyer, Grassl (1983) pada pH 8,0 dan suhu 37°C. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1 μ mol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik sifat fisik dan sifat kimia buah dan daun mengkudu

Karakteristik fisik buah dan daun mengkudu yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1. Jika merujuk pada karakteristik warna kulit dan tekstur buah menurut Chan-Blanco *et al.* (2006), buah yang digunakan berada pada tingkat ketuaan 2 (TK2) dan tingkat ketuaan 4 (TK4).

Tabel 1. Karakteristik fisik buah dan daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Bagian tumbuhan		Karakteristik fisik			
		Warna permukaan	Tekstur	Pencoklatan enzimatis	Pembentukan bau menyengat (T ruang)
Buah	TK2 ^a	kuning kehijauan	keras	sangat cepat	lebih dari 24 jam
	TK4 ^b	putih kekuningan	agak lunak	agak cepat	kurang dari 24 jam
Daun	Pucuk	hijau muda, mengkilap	agak renyah	agak cepat	-
	Pangkal	hijau tua, mengkilap	renyah	cepat	-

^a : Tingkat Ketuaan 2 sesuai dengan kriteria Chan-Blanco *et al.* (2006)

^b : Tingkat Ketuaan 4 sesuai dengan kriteria Chan-Blanco *et al.* (2006)

Komposisi kimia buah mengkudu dan daun dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil analisis komposisi kimia buah mengkudu mirip dengan yang dilaporkan oleh West *et al.* (2010) dan khusus untuk kadar abu mirip dengan hasil Laterme *et al.* (2006), sedangkan hasil analisa proksimat daun mengkudu sedikit berbeda jika dibandingkan dengan laporan Leung *et al.* (1972). Perbedaan terjadi diduga karena pengaruh jenis mengkudu, faktor pertumbuhan dan lingkungan tanam mengkudu (Rost *et al.*, 2006).

Kadar padatan daun lebih tinggi dibandingkan dengan buah, serta selama proses pematangan buah dan penuaan daun terjadi penurunan kadar protein (Tabel 2 dan Tabel 3). Penurunan kadar protein diduga berkaitan dengan peningkatan aktivitas protease. Menurut Gan (2007) protein tanaman pada saat pelayuan akan berkurang karena terjadinya degradasi protein seiring dengan meningkatnya aktivitas enzim proteolitik. Protease sistein dipercaya sebagai protease utama yang terlibat dalam hidrolisis protein Nooden (2004).

Penurunan protein pada pematangan buah dapat dijelaskan sebagai mulai terjadinya proses *senescence* pada buah TK4 yang digunakan. Hasil penelitian serupa yang memperlihatkan total protein buah meningkat selama pematangan tetapi kemudian menurun ketika lewat matang dilaporkan juga terjadi pada buah delima (Kulkarni dan Aradhya, 2005), buah melon kultivar Piel de Sapo (Villanueva *et al.*, 2004) dan buah jambu (Bashir dan Abu-Goukh, 2003).

Pemurnian protease buah dan daun mengkudu

Buah dan daun mengkudu diekstrak dengan cara memecah membran selnya menggunakan blender dengan campuran buffer Na asetat pH 5 yang berisi PVP K30, gliserol, EDTA, dan β-merkaptotanol. Konsentrasi PVP K30 yang ditambahkan pada daun (10%) lebih tinggi dibandingkan pada buah (3%) karena menurut Zin *et al.* (2006) daun mengkudu mempunyai kandungan total fenol lebih tinggi, yaitu ± 8342 µg/g daun (buah 119,9 µg/g dan akar 285 µg/g). Selama penghancuran dan penyaringan terbentuk buih yang diduga berkaitan dengan denaturasi protein (Clarkson *et al.*, 1999).

Buah dan daun yang telah diblender kemudian disaring menggunakan dua lapis kain saring hingga diperoleh jus buah

berwarna coklat muda dan jus daun berwarna coklat kehijauan. Setelah disentrifus selama setengah jam, klorofil daun terpisah karena pengikatan ion logam Mg yang ada pada klorofil daun oleh EDTA.

Sentrifugasi jus buah dan daun menghasilkan supernatan berwarna kuning pucat (buah) dan coklat (daun), yang disebut ekstrak kasar enzim. Pada tahap ini ekstrak kasar diukur kadar protein dan aktivitas protease. Nilai absorbansi pada pengukuran kadar protein daun bernilai negatif yang diduga karena penghambatan penyerapan warna oleh pigmen coklat yang diduga diakibatkan oleh polifenol yang masih tinggi dalam ekstrak kasar. Menurut Vedralova *et al.* (1987) melanin yang terbentuk akibat pencoklatan bisa mempengaruhi pembacaan absorbansi hingga 40%. Oleh karena itu ekstrak kasar daun kemudian ditambah silika untuk mengikat polifenol yang masih ada. Dalam penelitian pendahuluan, silika 1,4% efektif mengurangi intensitas warna coklat dan meningkatkan pembacaan absorbansi pada pengukuran kadar protein. Silika gel adalah senyawa polar yang digunakan untuk memisahkan komponen yang dapat dipolarkan seperti hidrokarbon aromatik dan campuran komponen terlarut yang kurang polar seperti fenol, ester dan eter alifatik (Adnan, 1991).

Ekstrak kasar enzim selanjutnya diendapkan menggunakan garam ammonium sulfat 100% jenuh dan didialisis. Data hasil pemurnian enzim protease buah dan daun mengkudu dapat dilihat pada Tabel 3. Sentrifugasi jus mampu meningkatkan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim buah yang dihasilkan, tetapi tidak dengan ekstrak kasar daun. Selama proses penambahan silika (daun), pengendapan dan dialisis, *purification fold* protease buah TK2, daun pucuk, maupun daun pangkal terus menurun sedangkan buah TK4 terus meningkat. Penurunan aktivitas spesifik enzim selama pemurnian diduga disebabkan oleh autolisis. Meskipun tahapan pengendapan mampu meningkatkan aktivitas spesifik protease buah TK4, secara umum aktivitas spesifik tertinggi dicapai ekstrak kasar enzim buah TK2 (3,79U/mg protein). Selain itu juga terlihat bahwa aktivitas protease buah lebih tinggi daripada protease daun, seperti yang terjadi pada buah dan daun pepaya cv. Maradol (Thomas *et al.*, 2009).

Tabel 2. Komposisi kimia buah dan daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) per 100g

Kadar (%)	Buah				Daun					
	TK2 ^a		TK4 ^b		West <i>et al.</i> (2010)	Pucuk		Pangkal		Leung <i>et al.</i> (1972)
	bb ^c	bk ^d	bb ^c	bk ^d		bb ^c	bk ^d	bb ^c	bk ^d	
Air	88,95		89,16		91,63	81,33		78,06		93,70
Abu	1,08	11,44	0,91	9,66	0,54	1,83	11,31	2,31	14,10	0,70
Protein	0,76	7,99	0,72	7,55	0,55	2,98	18,35	2,92	15,14	1,00
Lemak	0,11	1,16	0,10	1,03	0,10	0,30	1,84	0,73	3,77	0,20
Karbohidrat (by difference)	9,10	79,41	9,11	81,76	7,21	13,55	65,98	15,98	66,99	4,40

^a : Tingkat Ketuaan 2 sesuai dengan kriteria Chan-Blanco *et al.* (2006)
^b : Tingkat Ketuaan 4 sesuai dengan kriteria Chan-Blanco *et al.* (2006)
^c : basis basah
^d : basis kering
^e : Laterme *et al.* (2006)

Tabel 3. Pemurnian protease dari buah dan daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Tahap purifikasi	Volume (mL) atau Berat (g)	Total protein (mg)	Total aktivitas (U) ^a	Aktivitas spesifik (U/mg) ^a	Recovery (%)	Purification fold
Buah TK2^b						
Jus*	42,25	32,98	104,54	3,17	100,00	1,00
Ekstrak kasar*	40,25	26,94	102,24	3,79	98,06	1,20
Amm, sulfat 100% jenuh**	2,95	27,39	78,99	2,88	75,71	0,91
Dialisat*	7,05	12,56	24,25	1,94	23,27	0,61
Buah TK4^c						
Jus*	40,00	23,37	39,06	1,68	100,00	1,00
Ekstrak kasar*	38,50	19,55	35,48	1,83	90,85	1,09
Amm, sulfat 100% jenuh**	2,61	18,40	39,08	2,11	100,02	1,27
Dialisat*	7,10	9,58	30,42	3,18	77,88	1,90
Daun Pucuk						
Ekstrak kasar*	46,80	11,47	4,85	0,43	100	1,00
Ekstrak silika*	42,30	11,94	4,32	0,36	89,04	0,86
Amm, sulfat 100% jenuh**	6,92	9,98	2,37	0,24	48,75	0,56
Dialisat*	17,80	9,34	0,26	0,03	5,45	0,07
Daun Pangkal						
Ekstrak kasar*	44,00	11,29	5,40	0,46	100,00	1,00
Ekstrak silika*	41,00	10,23	4,60	0,46	85,46	1,01
Amm, sulfat 100% jenuh**	1,25	9,24	2,22	0,24	41,55	0,53
Dialisat*	17,50	6,91	0,47	0,07	8,78	0,15

^a : U singkatan dari Unit aktivitas. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1 µmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran

^b : Tingkat Ketuaan 2 sesuai dengan kriteria Chan-Blanco *et al.* (2006)

^c : Tingkat Ketuaan 4 sesuai dengan kriteria Chan-Blanco *et al.* (2006)

* : Konsentrasi protein dinyatakan dalam mg/mL dan aktivitas protease dinyatakan dalam U/mL

** : Konsentrasi protein dinyatakan dalam mg/g dan aktivitas protease dinyatakan dalam U/g

Tabel 4. Protease dari ekstrak kasar beberapa tanaman

Sumber protease	Buffer ekstraksi	Prosedur ekstraksi	Aktivitas spesifik (U/mg)	Referensi
<i>Morinda citrifolia</i> L.	Na asetat 0,10M, pH 5,0;	Suhu 6°C.	* 3,79	
* buah TK2 ^a	EDTA; PVPP; gliserol,	Daging buah segar	** 1,83	
** buah TK4 ^a	β-ME	Homogenisasi, filtrasi, sentrifugasi 3775g	*** 0,43	
*** daun pucuk		(5900 rpm), 30 menit.	**** 0,46	
**** daun pangkal				
<i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol	Na fosfat 0,05M, pH 7,0	* Buah disadap getahnya hingga berhenti dan disimpan pada suhu -20°C. Buffer ditambahkan ketika akan dianalisis	* 5,65 ** 10,00 *** 0,13	Thomas <i>et al.</i> (2009)
		** – Suhu 6-8°C.		
		– Daging buah segar		
		– Homogenisasi, sentrifugasi 2500g, 30'		
		*** – Suhu 6-8°C.		
		– Daun kering		
		– Homogenisasi, sentrifugasi 2500g, 30'		
<i>Cucurbita ficifolia</i>	Tanpa buffer	Suhu ruang	25,80	Curotto <i>et al.</i> (1989)
		Daging buah segar		
		Homogenisasi, filtrasi, sentrifugasi.		
<i>Benincasa hispida</i> var. Ryukyu	Na asetat 0,05M, pH 5,0	Suhu 7°C.	65,10	Uchikoba <i>et al.</i> (1998)
		Daging buah beku		
		Homogenisasi, filtrasi, sentrifugasi 3000g, 15'		
<i>Cucumis trigonus</i> R.	Na asetat 0,05M, pH 5,0	Suhu 4°C.	1 500,00	Asif-Ullah <i>et al.</i> (2006)
		Daging buah beku.		
		Homogenisasi, sentrifugasi 12000rpm selama 1 jam.		
<i>Medicago sativa</i> L.	Kalium fosfat 50mM, pH 7, Na ₂ S ₂ O ₃	Daun segar.	0,05	Nieri <i>et al.</i> (1998)
		Homogenisasi, sentrifugasi 20000g selama 30 menit.		
<i>Phaseolus vulgaris</i>		Daun beku.	0,0014	Popovic <i>et al.</i> (1998)
		Homogenisasi, thawing, aduk.		
<i>Lactuca sativa</i>	HEPES-KOH pH 7,5, mannitol, sukrosa, EGTA, sistein	Daun segar.	12,48 x 10 ⁻⁹	Piero dan Petrone (1999)
		Homogenisasi, sentrifugasi 27200g selama 30 menit, sentrifugasi 15000g selama 60 menit.		

Berdasarkan pertimbangan efektifitas pemurnian, waktu serta biaya pemurnian, protease dari buah TK2, daun pucuk, dan daun pangkal dalam bentuk ekstrak kasar lebih potensial untuk diambil secara komersial dibandingkan protease dari buah TK4 karena mampu menghasilkan protease dengan aktivitas spesifik lebih tinggi serta waktu dan biaya pemurnian

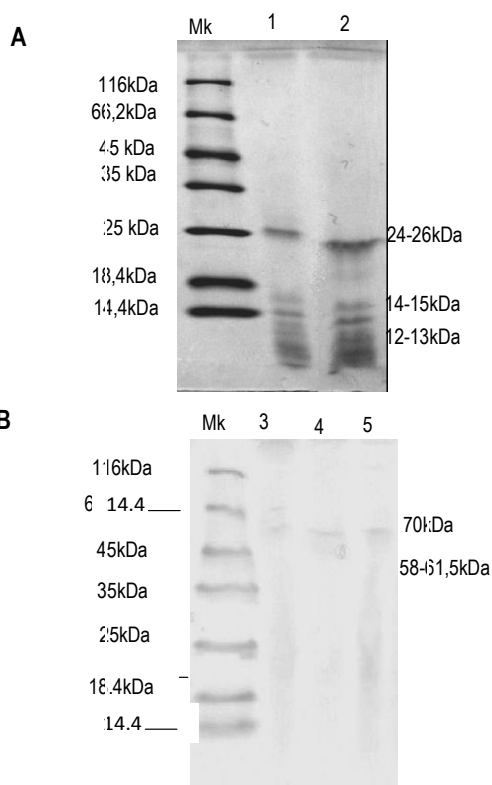
lebih kecil. Pemurnian protease dari buah TK4 lebih potensial jika digunakan untuk keperluan analisis yang membutuhkan enzim yang lebih murni.

Jika dibandingkan dengan protease tanaman lain (Tabel 4) maka protease mengkudu cukup potensial untuk dijadikan sumber protease. Perbaikan proses ekstraksi secara umum

perlu dilakukan untuk mendapatkan aktivitas spesifik yang lebih baik dan komposisi buffer pengestrak yang lebih aman, serta karakterisasi lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik protease mengkudu.

Berat molekul protease

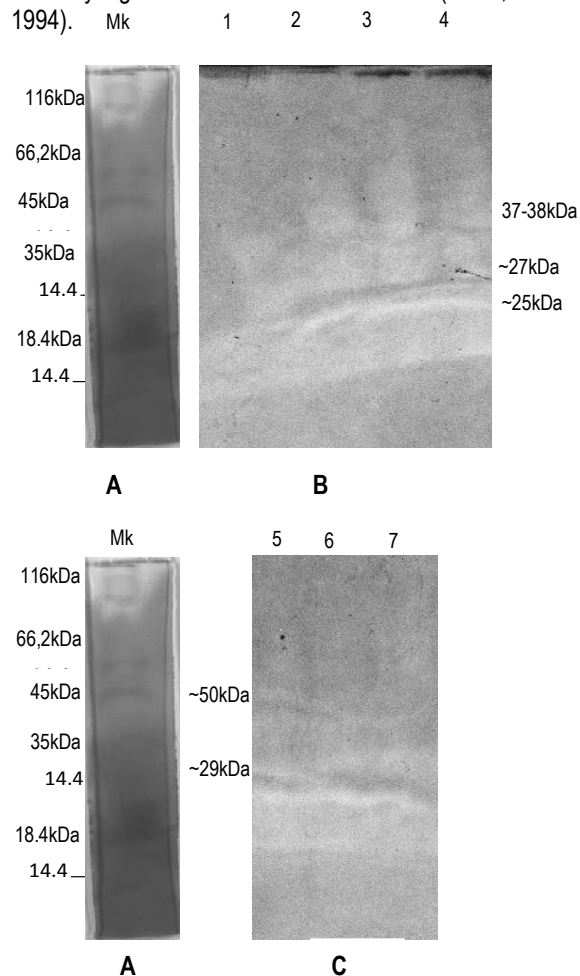
Hasil SDS PAGE (Gambar 1) menunjukkan pada sumur dialisat buah TK2, buah TK4, daun pucuk, maupun daun pangkal terdapat beberapa pita polipeptida. Polipeptida pada dialisat buah diperkirakan ber-BM 24-26kDa, 14-15kDa, 12-13kDa, serta beberapa pita dengan bobot molekul lebih kecil, sedangkan pada daun diperkirakan 70kDa dan 58-61,5kDa. Munculnya beberapa pita polipeptida pada gel SDS-PAGE menunjukkan bahwa dialisat protease yang didapat belum murni (Suhartono, 1989).



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE ekstrak enzim bebas garam. (a) buah; (b) daun. Marker (Mk); buah TK2 (1); buah TK4 (2); daun pucuk (3,4); daun pangkal (5)

Zona bening pada zimogram yang diinkubasi 1 jam (pada Gambar 2 ditunjukkan dengan garis hitam di tengah zimogram) menunjukkan pita polipeptida dengan aktivitas protease (kaseinolitik) pada buah diperkirakan berbobot molekul 37-38kDa, ~27kDa, dan ~25kDa, sedangkan pada daun 50kDa dan 29kDa. Zimogram pada Gambar 2 dicetak invert untuk mempertajam kontras tampilan. Inkubasi zimogram selama semalam menunjukkan hidrolisis kasein yang berlebih sehingga zona bening yang terbentuk menjadi meluas. Umumnya semakin lama waktu inkubasi maka deteksi zona bening semakin jelas, namun selain itu juga meningkatkan difusi protease dan substrat sehingga zona bening hasil hidrolisis

enzim yang berdekatan sulit dibedakan (Lantz, Ciborowski, 1994).



Gambar 2. Zimogram ekstrak enzim bebas garam. a. tampilan normal; Marker (Mk). b,c tampilan invert (zona bening menjadi zona hitam); buah TK4 (1,2); buah TK2 (3,4); daun pangkal (5,6); daun pucuk (7).

Protease mengkudu

Protease dari tumbuhan *Morinda citrifolia* L. atau mengkudu sampai dengan laporan penelitian ini ditulis belum ada dalam database MEROPS, BRENDA, maupun UniProt. MEROPS merupakan online database untuk peptidase, sedangkan BRENDA dan UniProt merupakan online database untuk protein. Pencarian berdasarkan organisme sumber protease pada MEROPS (Anonim^b, 2010) menggunakan hint "morinda", "indian mulberry", atau "noni" tidak berhasil. Sejauh ini enzim dari tumbuhan mengkudu yang telah diarsipkan oleh BRENDA (Anonim^c, 2010) adalah *cinnamyl-alcohol dehydrogenase*, *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase*, *geranyltranstransferase*, *isopentenyl-diphosphate DELTA-isomerase*, dan *isochorismate synthase*, sementara UniProt (Anonim^d, 2011) mengarsipkan enzim *Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase*, *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase*, *NADH dehydrogenase*, *Phosphoenolpyruvate carboxylase*, dan *3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase*. Dengan demikian, pemurnian protease dari buah mengkudu pada penelitian ini nampaknya merupakan hal baru dalam eksplorasi enzim hidrolase pada tumbuhan mengkudu, khususnya protease.

Dugaan adanya protease pada buah dan daun mengkudu berawal dari pengalaman empiris masyarakat Polinesia yang menggunakan mengkudu dalam pengobatan nematoda (sejenis parasit) dan luka (Nelson, 2006). Penggunaan mengkudu sebagai antelmintik (anti parasit) didukung oleh hasil penelitian Satrija *et al.* (2001) yang menunjukkan buah mengkudu yang dikeringkan dapat membunuh parasit ternak *H. contortus* sebesar 73,6–88,8%. Mengkudu sebagai obat luka dibuktikan oleh Rasal *et al.* (2008), yaitu ekstrak air daun mengkudu yang dipekatkan mampu menurunkan waktu epitalisasi kulit yang terluka secara signifikan dibandingkan dengan kontrol.

Efek antelmintik mengkudu diduga berkaitan dengan protease berdasarkan hasil penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa beberapa protease sistein dari tanaman memiliki efek tersebut. Efek antelmintik protease secara *in vitro* dan *in vivo* telah diamati pada ekstrak kasar papain, papain murni komersial, ekstrak kasar bromelain dan ekstrak kasar ficin terhadap *P. muricola* (Stepak *et al.*, 2007) dan *T. muris* (Stepak *et al.*, 2006). Aktivitas protease sistein dari tanaman tersebut meningkat secara *in vivo* ketika dikombinasikan dengan pemberian awal simetidin untuk menetralkan asam lambung.

Papain sendiri menurut ulasan Salas *et al.*, (2008) juga berfungsi sebagai antitumor, debridemen pada luka, serta antiinflamasi dan peredam gangguan lambung. Sementara hasil penelitian yang dihimpun Maurer (2001) menunjukkan bromelain, yang juga termasuk dalam kelas protease sistein, dapat berfungsi sebagai zat antiinflamasi, penghambat agregasi platelet, serta efek fibrinolitik dengan cara mengatur reaksi bertingkat yang dimediasi oleh protease. MEROPS (2010) menempatkan protease papain dan bromelain dalam subfamili yang sama, yaitu subfamili C1A, bersama dengan ficin dari getah fig, ananain dari batang nanas dan aktinidain dari buah kiwi. Penentuan kelas atau famili protease mengkudu perlu diteliti lebih lanjut, salah satunya dengan uji penghambatan inhibitor seperti yang telah dilakukan oleh Pereira *et al.* (2001), Uchikoba *et al.* (2001), Dubey dan Jagannadham (2003), serta Sidrach (2005).

KESIMPULAN

Kandungan protein buah TK2 lebih tinggi daripada buah TK4, dan daun pucuk lebih tinggi dari daun pangkal, yang diduga disebabkan oleh proses pematangan/penuaan. Ekstrak kasar protease dari buah TK2 (3,79U/mg protein) memiliki aktivitas spesifik paling tinggi, diikuti ekstrak kasar buah TK4 (1,83U/mg protein), daun pangkal (0,46U/mg protein), dan daun pucuk (0,42U/mg protein). Selama proses pemurnian, *purification fold* protease buah TK2, daun pucuk, dan daun pangkal terus menurun sedangkan buah TK4 terus meningkat. Protease dari ekstrak kasar buah TK2, daun pucuk, dan daun pangkal lebih potensial untuk diambil secara komersial sedangkan protease dari ekstrak kasar TK4 lebih potensial diambil untuk keperluan analisis.

Hasil SDS-PAGE dan zimografi menunjukkan dialisat yang diperoleh belum murni. Terdapat beberapa polipeptida yang mampu dipisahkan dengan SDS-PAGE, yaitu dengan perkiraan bobot molekul 24–26 kDa, 14–15 kDa, 12–13 kDa, dan beberapa pita dengan bobot molekul lebih kecil pada dialisat buah, serta

70kDa dan 58–61,5kDa pada dialisat daun. Protease yang terdeteksi diperkirakan berbobot molekul ~25kDa, ~27kDa, dan 37–38kDa pada buah, sedangkan pada daun diperkirakan ~29kDa dan ~50kDa.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada SEAFast Center IPB atas bantuan dana dan fasilitas laboratorium selama penelitian, serta Bapak Sawaluddin atas hibah PVP K30.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan M. 1997. Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan. Edisi Pertama. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Anonim^a. 2010. World Enzymes to 2013 : Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders. <http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>. [16 Juni 2010].
- Anonim^b. 2010. Family C1. <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=C1>. [4 Oktober 2010].
- Anonim^c. 2010. Search Result. [http://www.brenda-enzymes.info/php/search_result.php4?a=20&T\[0\]=1](http://www.brenda-enzymes.info/php/search_result.php4?a=20&T[0]=1). [4 Oktober 2010].
- Anonim^d. 2011. Morinda AND Citrifolia in UniProtKB. <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=morinda+AND+citrifolia&sort=score>. [4 Januari 2011].
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis of AOAC International Edisi ke-16. AOAC, Maryland.
- Asif-Ullah M, Kim KS, Yu YG. 2006. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. *Phytochem* 67:870–875.
- Bashir HA, Abu-Goukh ABA. 2003. Compositional changes during guava fruit ripening. *J Food Chem* 80:557–563.
- Bergmeyer HU, Grassl M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. (2). Verlag Chemie, Weinheim.
- Beynon RJ. 1989. Prevention of uncontrolled proteolysis. Di dalam: Haris ELV, Angal, editor. *Protein Purification Methods*. IRL Oxford University Press, New York.
- Bolag DM, Edelstein SJ. 1991. *Protein Methods*. John Wiley and Sons, Inc. Pub., New York.
- Bradford MM. 1976. A rapid dan sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72:234–254.
- Chan-Blanco Y, Vaillant F, Perez AM, Reynes M, Brillouet JM, Brat P. 2006. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *J of Food Comp and Anal* 19:645–654.
- Clarkson JR, Cui ZF, Darton RC. 1999. Protein denaturation in foam: I. Mechanism study. *J of Colloid and Interface Science* 215: 323–332. [abstrak].
- Copeland RA. 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Wiley-VCH, Toronto.

- Curotto E, Gonzales G, O'Reilly S, Tapia G. 1989. Isolation and partial characterization of a protease from *Cucurbita ficifolia*. FEBS 243:363-365.
- Departemen Pertanian, Direktorat Jenderal Hortikultura. 2008. Produksi tanaman biofarmaka di Indonesia periode 2003 – 2007. <http://www.hortikultura.deptan.go.id/index.php?option=comcontent&task=view&id=124&Itemid=160>. [8 Juni 2009].
- Dubey VK, Jagannadham MV. 2003. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. Phytochem. 62:1057-1071.
- Gan S. 2007. Senescence Processes in Plants. Blackwell Publishing, Australia.
- Illanes A. 2008. Enzyme production. Di dalam: Illanes A, editor. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Springer, Valparaiso.
- Kulkarni AP, Aradhya SM. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. Food Chem 93(2):319-324.
- Lantz MS, Ciborowski P. 1994. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. Methods in Enzymol. 235: 563-594.
- Laterme P, Buldgen A, Estrada F, Londono AM. 2006. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. Food Chem 95: 644-652.
- Leung WTW, Butrum RR, Chang FH, Rao MN, Polachi W. 1972. Food Composition Table for Use in East Asia. <http://www.fao.org/docrep/003/X6878E/X6878E00.htm#TOC> [9 September 2010].
- Maurer HR. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology, and medical use. Cell. Mol. Life Sci. 58:1234-1245.
- Nelson SC. 2006. Some Tradisional and Modern Uses of Noni. <http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/uses.asp>. [7 Juli 2010].
- Nieri B, Stefania C, Raffaella V, Amedeo A. 1998. Purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. Phytochem 49: 643 649.
- Nooden LD. 2004. Plant Cell Death Process. Elsevier Academic Press, London.
- Pereira MT, Lopes MTP, Meira WO, Salas CE. 2001. Purification of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* L. and cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. Protein Expression and Purification 22: 24-257.
- Piero ARL, Petrone G. 1999. Purification and partial characterization of an ATP-hydrolyzing serine protease from lettuce leaves. Phytochem. 51:349-356.
- Popovic T, Marjetka K, Vida P, Joie B. Purification and characterization of two cysteine proteinases from *Phaseolus vulgaris* leaves. 1998. Plant Physiol. Biochem 36: 637-645.
- Rasal VP, Arulmozhi S, Purnima A, Shridar Y. 2008. Wound healing and antioxidant activities of *Morinda citrifolia* leaf extract in rats. Iranian J of Pharmacol. and Therapeutics, 7: 49-52.
- Rost TL, Michael GB, Stocking CR, Terence MM. 2006. Plant Biology. Thomson Corporation, Canada.
- Salas CE, Gomes MTR, Hernandez M, Lopes MTP. 2008. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. Phytochem. 69:2263–2269.
- Satrija F, Retnani EB, Ridwan Y, Tiuria R. 2001. Potential use of herbal anthelmintics as alternative antiparasitic drugs for small holder farms in developing countries. Copenhagen: Proceedings of the 10th Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine.
- Setiawan B. 2007. Peternak Itik Gunakan Ramuan Dedaunan. <http://suaramerdeka.com/harian/0701/pan05.htm> [27 Mei 2009].
- Sidrach L, Garcia-Canovas F, Tudela J, Rodriguez-Lopez JN. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. Phytochem. 66: 41–49.
- Sinclair RD, Ryan TJ. 2007. Proteolytic enzymes in wound healing : the role of enzymatic debridement. Aust. J Derm 35(1): 35-41.
- Steppek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. 2006. In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. Parasitol. doi:10.1017/S003118200500973X.
- Steppek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. 2007. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. Parasitol. 134:103–112.
- Suhartono MT. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Thomas GE, Rodolfo HG, Juan MD, Georgina SF, Luis CG, Ingrid RB, Santiago GT. 2009. Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L.cv.Maradol harvest by-products. Process Biochem 44:77-82.
- Uchikoba T, Hosoyamada S, Onjyo M, Arima K, Yonezawa H, Kaneda M. 2001. A serine endopeptidase from the fruits of *Melothria japonica* (Thunb.) Maxim Phytochem 57:1-5
- Walter, Annie, Sam. 2002. Fruits of Oceania. ACIAR Monograph, Canberra.
- Vedralova E, Jan B, Ji D. Protein determination in materials containing melanin. J Biochem and Biophysic Method 14: 343-348.
- West BJ, Deng S, Jensen CJ. 2010. Nutrient and phytochemical analyses of processed noni puree. Food Res Int. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.038.
- Villanueva MJ, Tenorio MD, Esteban MA, Mendoza MC. 2004. Compositional changes during ripening of two cultivars of muskmelon fruits. Food Chem 87:179–185.
- Zin MZ, Hamid AA, Osman A, Saari N. 2006. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Food Chem 94: 169–178.