

**UJI AKTIVITAS ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE DALAM EKSTRAK
ENZIM DAUN STROBERI (*Fragaria x ananassa* Duchesne) DENGAN METODE
RIBOFLAVIN-NITROBLUE TETRAZOLIUM**

***ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE ENZYME EXTRACT OF
STRAWBERRY LEAF (*Fragaria x ananassa* Duchesne) WITH RIBOFLAVIN-
NITROBLUE TETRAZOLIUM METHOD***

Ira Dwi Astuti^{1*}, Ana Indrayati², Fransiska Leviana³

^{1,2,3} Program Studi S1 Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta, Indonesia.

*Corresponding author email: A03227201@mhs.setiabudi.ac.id

Abstrak

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat aktivitas radikal tersebut. Enzim superoksida dismutase (SOD) dapat mencegah pembentukan radikal bebas. Tanaman stroberi (*Fragaria x ananassa* Duchesne) merupakan salah satu tanaman yang memiliki aktivitas enzim SOD. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim superoksida dismutase dalam ekstrak daun stroberi sebelum pemurnian dan sesudah pemurnian. Penelitian ini menggunakan sampel daun stroberi. Tahap penelitian diawali dengan determinasi tanaman lalu ekstraksi enzim dengan PBS dan disentrifugasi. Pemurnian enzim menggunakan presipitasi amonium sulfat 25%, 50%, dan 75% dan dialisis. Penetapan kadar protein total ekstrak kasar dan ekstrak hasil dialisis menggunakan metode *Lowry* dan pengujian aktivitas enzim SOD ekstrak kasar dan ekstrak hasil dialisis dengan menggunakan metode *Riboflavin-Nitroblue Tetrazolium* (RB-NBT) selanjutnya dianalisis *one-way* ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak enzim daun stroberi memiliki kadar protein total sebesar 13,558 mg/mL dan ekstrak enzim hasil dialisis konsentrasi amonium sulfat secara berturut-turut adalah 4,080 mg/mL; 8,174 mg/mL dan 14,806 mg/mL. Nilai persen inhibisi ekstrak kasar daun stroberi sebesar 17,885%, ekstrak hasil dialisis berturut-turut sebesar 20,821%; 26,015%; dan 72,086%.

Kata kunci : Antioksidan, *fragaria x ananassa* duchesne, RB-NBT, superoksida dismutase.

Abstract

*Antioxidants are compounds that can inhibit the activity of these radicals. Superoxide dismutase (SOD) enzymes can prevent the formation of free radicals. The strawberry plant (*Fragaria x ananassa* Duchesne) is one of the plants that has SOD enzyme activity. This study aims to determine the activity of the superoxide dismutase enzyme in strawberry leaf extract before and after purification. This study used strawberry leaf samples. The research stage begins with plant determination and then enzyme extraction*

with PBS and centrifuge. Enzyme purification uses 25%, 50%, and 75% ammonium sulfate precipitation and dialysis. The determination of the total protein content of crude extract and dialysis extract was determined using the Lowry method and the testing of SOD enzyme activity of crude extract and dialysis extract using the Riboflavin-Nitroblue Tetrazolium RB-NBT method was then analyzed by one-way ANOVA. The results showed that the enzyme extract of strawberry leaves had a total protein content of 13.558 mg/ml and the enzyme extract from dialysis with ammonium sulfate concentration was consecutively, 4.080 mg/mL 8,174 mg/mL; 14,806 mg/mL. The percentage value of inhibition of crude extract of strawberry leaves was 17.885%, and the extract from consecutive dialysis was 20.821%; 26,01%5; and 72,086%.

Keywords: *Antioxidants, fragaria x ananassa duches, RB-NBT, superoxide dismutase*

PENDAHULUAN

Keseimbangan antara kandungan antioksidan dan radikal bebas adalah adanya faktor yang berperan dalam mempengaruhi kesehatan manusia. Radikal bebas memiliki potensi untuk menimbulkan penyakit degeneratif dan dapat merusak molekul-molekul penting dalam tubuh. Peningkatan jumlah radikal bebas dapat mengakibatkan penurunan aktivitas enzim antioksidan dalam tubuh, sehingga diperlukan tambahan antioksidan eksternal yang dapat menetralkan radikal bebas tersebut (Nafi'ah, 2018).

Antioksidan ialah senyawa yang memiliki kemampuan untuk mendonorkan proton kepada radikal bebas, sehingga dapat menghambat aktivitas radikal tersebut. Antioksidan dibedakan menjadi 2 jenis berdasarkan cara kerjanya yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer atau antioksidan endogen adalah senyawa yang dengan cepat dapat memberikan atom hidrogen kepada senyawa radikal dan mengubahnya menjadi senyawa yang lebih stabil sebelum dapat bereaksi dengan molekul

lain. Contoh dari antioksidan primer ialah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan *glutation peroksidase* (GPx). Antioksidan sekunder atau disebut antioksidan eksogen merupakan antioksidan non-enzimatik. Contoh antioksidan sekunder ialah vitamin C, vitamin E, dan flavonoid (Kusuma et al., 2023).

Enzim superoksida dismutase (SOD) merupakan antioksidan bentuk enzimatis yang dihasilkan dari rantai transport elektron dalam rangkaian pernafasan sel yang memproduksi hidrogen peroksida (Yuslianti, 2018). SOD berperan dalam mempertahankan kelangsungan hidup sel dengan menghambat pembentukan radikal bebas baru serta mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang memiliki tingkat reaktivitas lebih rendah (Yanty & Siska, 2017). Kemampuan SOD juga mencakup penghambatan pembentukan kerutan, peningkatan penyembuhan luka, pengurangan bekas luka, dan pencerahan pigmen kulit akibat paparan sinar UV.

Stroberi merupakan salah satu buah yang banyak dikonsumsi

masyarakat, tidak hanya dimakan segar tetapi juga diolah menjadi produk seperti sirup dan selai. Tanaman stroberi selain buahnya dapat dimakan ternyata daun, akar, bunganya dapat dimanfaatkan. Daun stroberi kaya akan senyawa bioaktif seperti asam askorbat, antosianin, dan senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan alami. Asam askorbat atau vitamin C dapat meningkatkan kadar SOD dengan cara menangkap radikal bebas superoksida dan mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif (Tarigan et al., 2018).

Mengacu pada latar belakang tersebut maka penelitian ini difokuskan pada pengujian aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) ekstrak daun stroberi (*Fragaria x ananassa* Duch.) dengan metode riboflavin-nitroblue tetrazolium (RB-NBT). Pengujian ini bertujuan untuk menentukan kadar protein total dan persen inhibisi ekstrak enzim SOD daun stroberi pada konsentrasi presipitasi amonium sulfat 25, 50, dan 75% serta ekstrak enzim sebelum pemurnian.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, pH meter, neraca analitik, blender, gelas ukur, kain flanel, kulkas, *centrifuge*, tabung *centrifuge*, kantong selofan, *magnetic stirrer*, labu ukur, beaker glass, termometer, vial, pipet volume dan ukur, spektrofotometer visibel, mikropipet.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun stroberi, aquabidest, *phosphate buffered saline*

(PBS), amonium sulfat, 2% Na₂CO₃, NaOH 0,10 N, 0,5% CuSO₄.5H₂O, 1% Natrium Kalium Tartrat, reagen *Folin-Ciocalteu* phenol, *Bovine Serum Albumin* (BSA), riboflavin, *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), EDTA.

Tahapan Penelitian

1. Determinasi dan Pengambilan Sampel

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur. Pengambilan bahan baku sampel adalah tanaman stroberi yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun stroberi yang diambil adalah daun yang sudah tua, bebas penyakit dan segar.

2. Ekstraksi Enzim SOD Daun Stroberi

Daun stroberi sebanyak 200 gram dicuci dan dikeringkan hingga tidak terdapat air yang menempel pada daun. Daun-daun sampel dipotong menjadi potongan-potongan kecil. Potongan daun ini kemudian dihaluskan menggunakan blender bersama dengan 400 mL larutan PBS pH 7,2. Homogenat yang dihasilkan didiamkan pada suhu 4°C selama semalam untuk memungkinkan protein dalam daun larut dengan baik. Setelah itu, homogenat disaring menggunakan kain flanel untuk memisahkan bagian kasar. Filtrat yang diperoleh, yaitu cairan hasil saringan, kemudian didinginkan kembali pada suhu 4°C sebelum disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C (Tazkiah et al., 2017).

3. Pemurnian Ekstrak Enzim Daun Stroberi

Ekstrak enzim hasil ekstraksi diukur volumenya sebanyak 50 mL. Fraksinasi protein dilakukan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 25%, 50%, dan 75%. Sebanyak 6,7 g amonium sulfat untuk tingkat kejenuhan 25%, 14,55 g untuk 50%, dan 23,8 g untuk 75% ditambahkan masing-masing ke dalam 50 mL ekstrak enzim pada tiga wadah yang berbeda. Amonium sulfat ditambahkan secara bertahap sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer pada suhu 4°C hingga garam larut sempurna. Campuran kemudian didiamkan pada suhu 4°C untuk memberikan waktu terjadinya presipitasi protein. Setelah proses presipitasi selesai, masing-masing campuran disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan endapan protein dari supernatan. Endapan protein yang diperoleh dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat kemudian dipisahkan dari supernatan dan dilarutkan kembali dalam buffer kalium fosfat 0,05 M pH 7,0 hingga diperoleh larutan protein. Larutan protein tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam membran atau kantong dialisis yang telah dipersiapkan sebelumnya (Sari et al., 2023).

Partikel padat yang terbentuk dari setiap konsentrasi amonium sulfat diresuspensikan dalam larutan buffer kalium fosfat 0,05 M pH 7,0. Suspensi ini kemudian dipisahkan dari zat-zat lain yang tidak diinginkan melalui proses dialisis selama 24 jam pada suhu 4°C menggunakan larutan buffer yang sama.

Setelah proses dialisis selesai, larutan protein di dalam kantong dikumpulkan sebagai fraksi hasil dialisis. Apabila terdapat partikel atau protein yang tidak larut, larutan dapat disentrifugasi untuk memisahkan partikel tersebut. Fraksi hasil dialisis kemudian digunakan untuk menentukan kadar protein dan aktivitas SOD. Larutan protein yang telah didialisis selanjutnya disimpan pada suhu 4°C (Pratiwi et al., 2022).

4. Penetapan Kadar Protein Total

Sebanyak 2% Na_2CO_3 dilarutkan dalam 0,10 N NaOH untuk reagen A. Kemudian sebanyak 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan dalam 1% Natrium Kalium Tartrat untuk reagen B. Setelah itu, sebanyak 50 mL reagen A ditambahkan dalam 1 mL reagen B untuk reagen C. Terakhir 10 mL reagen *Folin-Ciocalteu phenol* dilarutkan dalam 10 mL aquabidest untuk reagen D.

Sebanyak 50 mg BSA dilarutkan dalam 50 ml aquabides dan diaduk, 1,5 ml dilarutkan dengan aquabidet 10 ml, larutan diambil 1 ml ditambah 5 ml reagen Lowry C tunggu 10 menit ditambahkan 0,5 mL reagen Lowry D dan larutan tersebut dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Nilai absorbansi yang diperoleh akan digunakan dalam persamaan regresi linier untuk menentukan kadar protein terlarut.

Larutan induk BSA dengan konsentrasi 1000 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dengan volume 0,5; 0,75; 1; 1,25; dan 1,5 ml, lalu ditambahkan aquades hingga mencapai tanda batas. Satu labu ukur

lainnya diisi dengan 10 mL aquades sebagai blanko, masing-masing labu ukur dipipet sebanyak 1 mL dan ditambahkan ke dalam 5 ml reagen Lowry C, kemudian diaduk dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian, ditambahkan lagi 0,5 ml reagen Lowry D dan larutan dibiarkan selama 35 menit. Selanjutnya, setiap kurva baku diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Kurva yang menghubungkan nilai absorbansi dengan konsentrasi dibuat untuk menghasilkan persamaan regresi linier.

5. Uji Aktivitas SOD

Larutan EDTA sebanyak 200 μ L, larutan NBT sebanyak 100 μ L, dan larutan sampel sebanyak 50 μ L dimasukkan dalam tabung reaksi. Larutan dihomogenkan dengan alat vortex dan diinkubasi di dalam tangas es selama 10 menit. Setelah inkubasi, ditambahkan 50 μ L larutan riboflavin dan larutan dapar fosfat sebanyak 3 ml dan diinkubasi pada suhu ruang selama 25 menit. Setelah 25 menit inkubasi larutan dalam kotak cahaya selama 15 selanjutnya absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 560 nm. Sebagai perbandingan, disiapkan larutan tambahan dengan mengganti 50 μ L sampel dengan 50 μ L larutan buffer yang digunakan untuk melarutkan sampel. Larutan pembanding ini menjalani proses yang sama persis dengan sampel. Tingkat aktivitas enzim superoksida dismutase kemudian dinyatakan dalam bentuk persentase penghambatan.

Persentase ini didapatkan dengan menggunakan rumus khusus.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Abs pembanding} - \text{Abs sampel})}{(\text{Abs pembanding})} \times 100\%$$

6. Analisis Data

Analisis kadar protein dan aktivitas enzim SOD dari ekstrak daun stroberi dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 30 dengan metode *One-Way* ANOVA. Prasyarat yang harus dipenuhi adalah data harus terdistribusi secara normal dan homogen. Distribusi normal data ditentukan melalui uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*, di mana nilai signifikansi (sig.) > 0,05 menunjukkan bahwa data memiliki distribusi normal. Sementara itu, homogenitas varians diuji menggunakan *Levene Test*, dengan nilai sig. > 0,05 menunjukkan bahwa data homogen. *One-Way* ANOVA digunakan untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok data. Jika hasil analisis menunjukkan nilai sig. < 0,05, maka terdapat perbedaan signifikan, yang kemudian dianalisis lebih lanjut melalui uji post-hoc menggunakan metode Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi dilaksanakan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan dipilih dalam penelitian agar mengurangi kesalahan dalam pengambilan bahan dan mengurangi tercampurnya tanaman yang akan dipilih dalam penelitian dengan tanaman lain (Klau & Hesturini, 2021). Determinasi dilakukan melalui pencocokan ciri-ciri morfologi pada tanaman stroberi dengan

literatur yang tersedia. Berdasarkan hasil determinasi dengan surat nomor: 000.9.3/2571/102.20/2024 tanggal 07 Agustus 2024 dapat diperoleh kepastian jika tanaman yang dipilih pada penelitian ini ialah tanaman stroberi (*Fragaria ananassa* Duchesne).

Tanaman stroberi yang didapatkan di daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang diterapkan pada penelitian ini adalah daun stroberi yang diambil dengan kondisi segar, tidak rusak, sehat dan sudah tua.

Ekstraksi enzim memiliki tujuan memisahkan enzim dari sel-sel jaringan daun stroberi. ekstraksi enzim daun stroberi diperoleh supernatan sebanyak 300 ml. Supernatan ini mengandung enzim dan senyawa bioaktif terlarut termasuk superoksida dismutase (SOD) yang berfungsi sebagai antioksidan, karena molekul enzim berukuran lebih kecil dan larut dibandingkan partikel besar seperti organel sel sehingga enzim tetap berada di supernatan saat partikel besar mengendap selama sentrifugasi (Pinesti et al., 2023). Endapan yang dihasilkan sebesar 47,431 gram

menunjukkan adanya komponen padat yang tidak terlarut dalam PBS seperti sisa jaringan daun, selulosa dan komponen lain. Hasil sebesar 300 ml untuk supernatan menunjukkan bahwa sebagian besar pelarut berhasil mengekstrak enzim dari daun stroberi. Selanjutnya supernatan yang diperoleh dilakukan proses pemurnian.

Pemurnian ekstrak enzim daun stroberi dilakukan dengan penambahan garam amonium sulfat. Pengendapan dengan amonium sulfat pada penelitian ini menggunakan tiga konsentrasi yaitu 25, 50, 75%. Penambahan garam amonium sulfat mampu menurunkan kelarutan protein dengan mekanisme yakni *salting out*. Prinsip pengendapan protein ialah kelarutan protein pada larutan. Pemurnian tahap lanjut dilakukan dengan dialisis menggunakan kantong selofan. Pemisahan dilakukan untuk menghilangkan sisa garam amonium sulfat yang terendap bersama protein, sehingga garam tersebut tidak mengganggu tahap pengujian berikutnya (Ratnayani et al., 2021). Hasil bobot pelet pemurnian enzim diamati pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil pemurnian ekstrak enzim daun stroberi.

Presipitasi amonium sulfat (%)	Bobot ekstrak sebelum dialisis (g)	Bobot ekstrak sesudah dialisis (g)
25	1,536	1,509
50	1,660	1,637
75	2,069	2,004

Proses dialisis mampu mengurangi bobot ekstrak pada semua konsentrasi amonium sulfat karena sebagian besar garam amonium sulfat yang terlarut dalam endapan telah

dikeluarkan (Ilyas et al., 2020). Konsentrasi amonium sulfat 25% lebih sedikit protein yang terpresipitasi sehingga pengurangan berat endapan setelah dialisis lebih besar karena

sebagian besar komponen yang terlarut adalah garam. Konsentrasi amonium sulfat 25% sebelum dialisis protein mengalami *salting in* karena Garam amonium sulfat tidak dapat bersaing dengan protein, sehingga bagian hidrofilik pada protein tetap dapat berinteraksi dengan molekul air, yang mengakibatkan protein tetap larut. Konsentrasi amonium sulfat 50 dan 75% protein mengalami proses *salting out*. Tujuan pemurnian dengan amonium sulfat bukan sekadar mendapatkan protein paling banyak, tetapi terutama memperkaya enzim target SOD (*superoxide dismutase*) dari campuran protein. Peningkatan konsentrasi garam akan memperkuat kekuatan ioniknya, sehingga interaksi antara garam dan air menjadi lebih kuat, sementara kelarutan protein dalam air semakin menurun. Akibatnya, molekul protein akan terpisah dari pelarutnya dan membentuk endapan. Oleh karena itu, setelah proses dialisis lebih banyak protein yang terpresipitasi (Djenar & Suryadi, 2022).

Berdasarkan **Tabel 1** bobot ekstrak presipitasi amonium sulfat paling tinggi yang dihasilkan dalam penelitian ini yaitu dalam konsentrasi amonium sulfat 75% dan bobot ekstrak presipitasi amonium sulfat terendah dihasilkan pada konsentrasi amonium sulfat 25%. Ekstrak enzim hasil pemurnian ini didapatkan hasil bahwa semakin tinggi penambahan konsentrasi amonium sulfat, maka protein yang mengendap juga semakin banyak (Awaliyah et al., 2016).

Pengukuran kadar protein total penelitian menggunakan metode *Lowry*. Panjang gelombang maksimum dalam

penelitian ini didapatkan 673 nm hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian yang didapat berbeda dengan penelitian sebelumnya disebabkan oleh reagen yang digunakan berlebihan atau dapat juga dipengaruhi pH dan temperatur selama prosedur analisis juga dapat mengubah struktur kompleks warna yang terbentuk sehingga menghasilkan panjang gelombang maksimum lebih tinggi (Harjanto, 2017) dan *operating time* diperoleh 35-39 menit. Pembanding yang digunakan pada metode *Lowry* adalah BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan seri konsentrasi 50, 75, 100, 125 dan 150 mg/L. **Tabel 2** digunakan untuk menentukan persamaan regresi linier.

Grafik kurva tersebut menunjukkan adanya slope positif dengan gradien mendekati 1, ditunjukkan oleh nilai korelasi $R^2 = 0,9981$. Berdasarkan analisis regresi linier, diperoleh nilai konstanta $a = 0,1852$ dan koefisien $b = 0,0039$. Persamaan garis regresi linier yang terbentuk adalah $y = a + bx$, atau $y = 0,1852 + 0,0039x$.

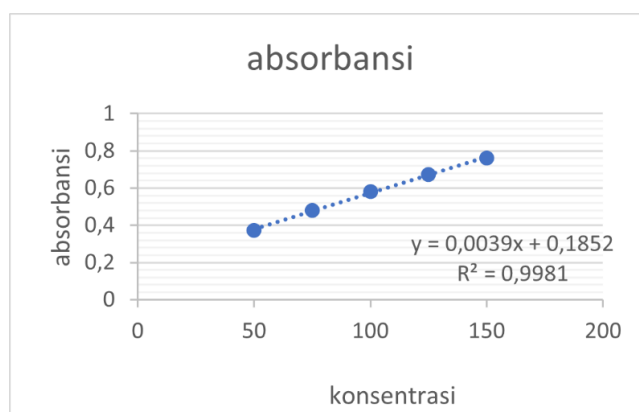
Penetapan kadar protein pada ekstrak enzim daun stroberi menunjukkan bahwa kadar tertinggi ditemukan pada ekstrak hasil dialisis dengan presipitasi amonium sulfat 75%, dapat dilihat pada **Tabel 3**, sementara kadar terendah terdapat pada ekstrak hasil dialisis dengan konsentrasi amonium sulfat 25%. Ekstrak hasil dialisis dengan konsentrasi amonium sulfat 75% memiliki kadar protein lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak enzim serta ekstrak hasil dialisis konsentrasi amonium sulfat 25% dan 50%. Hal tersebut terjadi karena

penggunaan amonium sulfat dalam konsentrasi yang tinggi, di mana peningkatan konsentrasi amonium sulfat berkorelasi dengan peningkatan kadar protein total yang dihasilkan (Mayasari, 2016). Kadar protein total menunjukkan berapa banyak protein yang diperoleh. Aktivitas SOD total menunjukkan berapa banyak aktivitas enzim yang berhasil di pertahankan. Aktivitas spesifik menunjukkan tingkat pengayaan/ kemurnian SOD secara relatif. Konsentrasi 75% tidak otomatis berarti protein pengotor lebih banyak, karena SOD sendiri juga dapat ikut terendapkan pada konsentrasi tersebut. Aktivitas spesifik enzim merupakan

parameter yang digunakan untuk menunjukkan tingkat kemurnian atau pengayaan suatu enzim dalam suatu sampel protein. Pada penelitian SOD (*superoxide dismutase*), aktivitas spesifik dinyatakan sebagai jumlah unit aktivitas SOD per miligram protein total. Satu unit (U) aktivitas SOD menunjukkan jumlah enzim yang mampu mengkatalisis reaksi dismutasi radikal superoksida pada kondisi pengujian yang telah ditetapkan oleh metode analisis. Hal ini dibuktikan dengan uji *posthoc* dengan metode *Tukey* yang menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai $\text{sig} < 0,05$.

Tabel 2. Hasil pembuatan kurva kalibrasi BSA

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
50	0.372
75	0.480
100	0.580
125	0.674
150	0.760



Gambar 1. Kurva dan persamaan kalibrasi konsentrasi absorbansi BSA.

Tabel 3. Kadar protein total sampel dengan metode *Lowry*.

Sampel	Konsentrasi Amonium Sulfat (%)	Kadar Protein (mg/ml)			Rata-rata ± SD
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	

Ekstrak Enzim		13,482	13,661	13,533	13,558 ± 0,092
Ekstrak Hasil	25	3,841	4,251	4,148	4,080 ± 0,213
	50	8,148	8,123	8,251	8,174 ± 0,067
Dialisis	75	14,764	14,841	14,815	14,806 ± 0,039

Aktivitas SOD ekstrak enzim daun stroberi dilakukan menggunakan metode RB-NBT. Nilai absorbansi ekstrak enzim SOD daun stroberi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam rumus untuk memperoleh nilai persen inhibisi. Nilai persen inhibisi yaitu perbandingan selisih absorbansi perbandingan dengan sampel yang menggambarkan persentase hambatan bahan terhadap radikal bebas (Munadia & Aulianshah, 2021).

Absorbansi diukur pada panjang gelombang 560 nm. Panjang gelombang 560 nm adalah panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur absorbansi penyerapan warna yang terbentuk dari

reaksi antara RB-NBT dan NBT-diformazan (Katerji et al., 2019). Semakin tinggi kandungan superoksida dismutase (SOD) dalam ekstrak protein, maka nilai absorbanannya akan semakin rendah karena aktivitas SOD yang mencegah pembentukan warna biru dari nitroblue tetrazolium (NBT). Keunggulan metode RB-NBT dalam pengukuran SOD adalah sensitivitas yang tinggi sehingga dapat mendeteksi aktivitas enzim yang rendah. Selain itu metode ini mudah diterapkan di laboratorium dengan alat spektrofotometer yang umum digunakan.

Tabel 4. Persen inhibisi pengukuran aktivitas SOD daun stroberi.

Sampel	Konsentrasi Amonium Sulfat (%)	% inhibisi			Rata-rata ± SD
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
Ekstrak Enzim		18,021	17,479	18,157	17,885 ± 0,358
Ekstrak Hasil	25	20,189	20,867	21,409	20,821 ± 0,611
	50	25,474	25,880	26,693	26,015 ± 0,620
Dialisis	75	71,680	72,222	72,357	72,086 ± 0,358

Hasil penelitian menunjukkan peningkatan persen inhibisi sama dengan peningkatan aktivitas SOD karena persen inhibisi dapat memberikan gambaran seberapa efektif enzim SOD dalam menghambat fungsi enzim. Semakin tinggi persen inhibisi yang dihasilkan maka semakin besar kemampuan senyawa untuk

menghambat aktivitas SOD (Masrifah et al., 2017).

Presipitasi amonium sulfat 25% walaupun kadar protein total menurun namun aktivitas SOD sedikit meningkat dibandingkan ekstrak enzim, hal ini menunjukkan bahwa presipitasi pada 25% dapat mengurangi beberapa kontaminasi yang menghambat aktivitas enzim meskipun belum memberikan

pemisahan yang optimal untuk enzim SOD.

Presipitasi amonium sulfat 50% terjadi peningkatan aktivitas enzim pada tahap ini menunjukkan bahwa pemisahan SOD dari protein lain lebih baik dibandingkan presipitasi amonium sulfat 25%. Aktivitas ini menunjukkan peningkatan relatif pada kemurnian enzim meskipun masih ada kontaminan yang dapat mempengaruhi aktivitas spesifik. Presipitasi amonium sulfat 75% menunjukkan bahwa SOD merupakan protein yang memiliki kelarutan tinggi sehingga lebih optimal dipisahkan pada tingkat kemurnian presipitasi amonium sulfat yang tinggi. Aktivitas enzim SOD daun stroberi menunjukkan peningkatan signifikansi dengan meningkatnya tingkat kejenuhan amonium sulfat. Aktivitas tertinggi sebesar 72,086% pada konsentrasi amonium sulfat 75% menunjukkan bahwa presipitasi pada tingkat ini adalah yang paling optimal untuk memisahkan enzim SOD dari protein lain.

Uji *post-hoc* Tukey mengungkapkan adanya perbedaan signifikan. Berdasarkan hasil analisis data yang didapat dapat diketahui perlakuan konsentrasi amonium sulfat 75% lebih efektif dalam menghambat dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil ini mengindikasikan bahwa perubahan konsentrasi amonium sulfat dan penggunaan ekstrak enzim memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kemampuan menghambat. Peningkatan konsentrasi amonium sulfat mempengaruhi persen inhibisi dengan konsentrasi yang lebih tinggi

memberikan efek inhibisi yang lebih besar (Novarini et al., 2022).

KESIMPULAN

Kadar protein total pada ekstrak enzim daun stroberi sebesar 13,558 mg/ml dan ekstrak enzim SOD hasil presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75% secara berturut-turut adalah 4,080; 8,174; 14,806 mg/mL. Persen inhibisi ekstrak enzim daun stroberi sebelum pemurnian sebesar 17,885% dan ekstrak enzim SOD hasil presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75% secara berturut-turut adalah 20,821; 26,015; 72,086%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia yang telah diberikan. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Dr. Ana Indrayati, M.Si dan apt. Fransiska Leviana, S.Farm., M.Si sebagai dosen pembimbing, serta seluruh staf pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Selain itu, penulis juga berterima kasih kepada kedua orang tua dan sahabat yang selalu memberikan dukungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Awaliyah, K., Anastasya, A., Nursan, & Risnawati. (2016). *Isolasi protein dan western blot*. Kediri.
- Djenar, N. S., & Suryadi, J. (2022). Isolasi dan Pemurnian Protein dari Lembaga Jagung (Corn Germ) Menggunakan Metode Presipitasi dan Dialisis. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 8(1), 60–66.

- <https://doi.org/10.22487/kovalen.2022.v8.i1.15790>
- Harjanto, S. (2017). Perbandingan Pembacaan Absorbansi Menggunakan Spectronic 20 D+ dan Spectrophotometer UV-Vis T 60U Dalam Penentuan Kadar Protein dengan Larutan Standar BSA. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 20(3), 114–116.
- Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
- Klau, M. H. C., & Hesturini, R. J. (2021). Effect of Ethanol Extract of Dandang Gendis Leaves (*Clinacanthus nutans* (Burm F) Lindau) on Analgesic Power and Stomach Macroscopic Appearance of Mice. *Jurnal Farmasi & Sains Indonesia*, 4(1), 6–12.
<https://doi.org/10.52216/jfsi.v4i1.59>
- Kusuma, I. Maruya, D. Y. Siti, D. I. P. (n.d.). Uji Aktivitas Antioksidan Infusa Daun Strawberry (*Fragaria x annanasa*) Dengan Menggunakan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Vol 16 No 2* (2023).
- Magfirah Ilyas, N., Setiasih, S., Hudiyono, S., Negeri Makassar, U., Daeng Tata Makassar, J., & UNM Parangtambung, K. *Enzim Bromelain dari Bonggol dan Daging Nanas (Ananas comosus)* *Jurnal Chemica Vol. 21 Nomor 2 Desember 2020*.
- Masrifah, Rahman, N., & Abram, P. H. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun dan Kulit Labu Air (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.). *J.Akad.Kim*, 6(2). 98-106.
- Mayasari. (2016). Pemurnian Enzim Amilase Kasar Dari Bakteri *Amilolitik Endogenous* Bekatul Secara Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat. *Skripsi*. Universitas Malik Ibrahim, Malang.
- Munadia, & Aulianshah, V. (2021). Perbandingan Aktivitas Antioksidan Jus dan Infused Water Apel Hijau (*Malus sylvestris* Mill.). *Jurnal Ilmiah Farmasi Simplisia*, 1(1), 8–10.
- Nafi'ah, A. (2018). Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Dan Fraksi Etil Asetat Buah Kepel (*Stelechocarpus buharol*) Terhadap Konsentrasi Enzim Superoksida Dismutase Pada Hepar Tikus Sprague-Dawley Yang Diinduksi Karbon Tetraklorida Secara Akut Dan Subkronis. *Skripsi*. Universitas Gadjah Mada.
- Novarini, T., Indrayati, A., & Purwaningsih, D. (2022). Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dalam Ekstrak Temu Hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) dengan Metode Water Soluble Tetrazolium Salt-1 (WST-1). *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 4(5), 464–472.
<https://doi.org/10.25026/jsk.v4i5.1285>
- Pinesti, A., Indrayati, A., & Cahyo, L. M. (2023). Uji Aktivitas Sod (Superokxide Dismutase) Bakteri Limbah Cair Tahu Dengan Metode Wst-1 (Water Soluble Tetrazolium Salt-1) Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Menggunakan Pcr 16s Rdna. *Jurnal Farmasi Udayana*, 12(2), 94–100.
- Pratiwi, M. E., Peranginangin, J. M., Asiya, I. J., & Indrayati, A. (2022). Potensi enzim superoksida dismutase dari biji Jagung (*Zea*

- mays L.) untuk perbaikan sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan sinar ultraviolet A. *Jurnal Ilmiah Farmasi (Scientific Journal of Pharmacy)*, 18(2), 164–177. <http://journal.uui.ac.id/index.php/JIF>
- Ratnayani, O., Yulianti, E., & Wirajana, I. N. (2021). Fraksinasi selulase mikroba selulolitik dengan amonium sulfat dan amobilisasi pada agar-agar komersial. *Journal of Applied Chemistry*, 8, 1.
- Sari, F. N., Indrayati, A., & Putri, P. R. S. (2023). Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (Sod) Ekstrak Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*) Dengan Metode Water Soluble Tetrazolium Salt-1 (Wst-1). *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 6(1), 82–91. <https://doi.org/10.20884/1.Sb.2014.1.3.41>
- Tarigan, T., Batubara, L., & Ngestiningsih, D. (2018). Uji Efektivitas Vitamin C Dalam Meningkatkan Kadar Superoksida Dismutase (Sod) Plasma Tikus Sprague Dawley Yang Terpapar Heat Stress. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 7(2), 1334–1343.
- Tazkiah, N. P., Rosahdi, T. D., & Supriadin, A. (2017). Isolasi Dan Karakterisasi Enzim Amilase Dari Biji Nangka (*Artocarpus heterophyllus*). In *Syawwal* (Vol. 4, Number 1).
- Yanty, Y. N., & Siska, V. A. (2017). Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*) Sebagai Antioksidan Dalam Formulasi Sediaan Lotio. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 3(2), 166–172.
- Yuslianti, E. R. (2018). *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Edisi Pertama. Cetakan Pertama. Yogyakarta.