



ANALISIS HASIL FRAKSINASI PROTEASE DAN LIPASE YANG BERASAL DARI SALURAN PENCERNAAN UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)

Analysis of Protease and Lipase Fractionation Originated from the Digestive Tract of Vannamei Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Hanifah Rahmi*, Hariyanti, Rina Putri A, Devi Wulandari

Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka,
Jl. Delima II/IV, Klender Jakarta Timur 13460

*Email: hanifah_rahmi@uhamka.ac.id

ABSTRACT

*Vannamei shrimp is a fishery commodity with a high consumption value, so it has an impact of high shrimp waste in the form of head and skin. The digestive tract connected to the head of the vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) contains digestive enzymes, including proteases and lipases. This study aims to obtain the protein fraction that has the highest protease and lipase activity. The separation method used was centrifugation followed by precipitation using ammonium sulfate salt and dialysis. The dialysate was purified by gel filtration chromatography at a volume retention of 10 drops per tube. The proteolytic and lipolytic enzyme activity of the fraction was measured using a spectrophotometer. The results showed that fraction 102 had the highest protease activity value of 96.3924 U / mL, while fraction 100 had the highest lipase activity of 531.07 U / mL. This study showed that in the digestive tract of vaname shrimp, protease and lipase activity increased with the level of purity.*

Keywords: *digestive enzymes, gel filtration chromatography, lipase, protease, vannamei shrimp*

ABSTRAK

Udang vaname merupakan komoditi perikanan dengan nilai konsumsi yang tinggi, sehingga berdampak pula dengan tingginya limbah udang yang berupa kepala dan kulit. Saluran pencernaan yang terhubung dengan kepala udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) mengandung enzim pencernaan, diantaranya protease dan lipase. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fraksi protein yang memiliki aktivitas protease dan lipase tertinggi. Metode pemisahan yang dilakukan adalah sentrifugasi dilanjutkan dengan pengendapan menggunakan garam ammonium sulfat dan dialisis. Dialisat dimurnikan dengan kromatografi filtrasi gel pada retensi volume sebanyak 10 tetes tiap tabung. Aktivitas enzim proteolitik dan lipolitik fraksi diukur menggunakan spektrofotometer. Hasil menunjukkan bahwa fraksi 102 memiliki nilai aktivitas protease tertinggi sebesar 96,3924 U mL⁻¹, sedangkan fraksi 100 memiliki aktivitas lipase tertinggi sebesar 531,07 U mL⁻¹. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada saluran pencernaan udang vaname terdapat aktivitas protease dan lipase yang meningkat seiring dengan tingkat kemurniannya.

Kata Kunci: enzim pencernaan, kromatografi filtrasi gel, lipase, protease, udang vaname

PENDAHULUAN

Udang merupakan komoditi yang dapat meningkatkan ekspor sub-sektor perikanan. Menurut data statistik perikanan budidaya dari Kementerian Kelautan dan Perikanan RI, produksi udang di Indonesia rata-rata mengalami peningkatan setiap tahunnya. Produksi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) mengalami peningkatan pada tahun 2014-2018 dari 442.380 ton menjadi 717.094 ton (KKP 2019). Kementerian Kelautan dan Perikanan juga melaporkan bahwa tingginya volume produksi udang nasional disertai pula dengan tingginya volume ekspor udang pada tahun 2018 sebesar 180 ribu ton meningkat dari 147 ribu ton pada tahun 2017, sedangkan nilai ekspor naik dari USD 1,42 milyar menjadi USD 1,80 milyar (Dirjen Perikanan Budidaya 2018).

Udang diekspor dalam bentuk udang beku segar, yang telah mengalami *cold storage* setelah melalui pemisahan kepala dan kulit. Industri udang beku segar mengakibatkan adanya limbah berupa kepala (*carapace*) dan kulit (*peeled*) yang menimbulkan masalah pencemaran lingkungan. Sekitar 40-45% limbah dihasilkan dari hasil konsumsi udang (Kandra et al. 2012). Limbah udang yang dihasilkan mengandung protein, lemak, kitin, dan kitosan yang dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi, contohnya sebagai kapsul (Younes dan Rinaudo 2015). Oleh karena itu, limbah udang (kulit dan kepala) perlu penanganan yang lebih serius terutama karena limbah ini mengandung senyawa kimia yang bermanfaat. Salah satu spesies udang yang banyak dikonsumsi adalah udang vaname. Udang ini menghasilkan limbah yang dapat dimanfaatkan. Sistem saluran pencernaan udang membentang dari kepala hingga ke bagian dalam ekor, yang terbagi dalam 3 bagian yaitu *foregut*, *midgut*, dan *hindgut* (Corteel 2013). Pada limbah kepala udang vaname terdapat saluran pencernaan yang bisa menjadi sumber enzim seperti protease dan lipase (Huang et al. 2019).

Enzim adalah biomolekul berupa protein berbentuk bulat (globular), yang terdiri atas satu rantai polipeptida atau lebih. Enzim berfungsi sebagai katalis atau senyawa yang dapat mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi (Worthington et al. 2019).

Keunggulan enzim sebagai biokatalisator antara lain memiliki spesifikasi tinggi, mempercepat reaksi kimia tanpa pembentukan produk samping, produktivitas tinggi dan dapat menghasilkan produk akhir yang tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan efek kerusakan lingkungan (Gurung et al. 2013). Aktivitas lipase dapat ditemukan secara luas di alam dan dapat diproduksi oleh banyak mikroorganisme. Bakteri, jamur berfilamen, dan ragi dapat memproduksi lipase yang memungkinkan mikroorganisme ini menggunakan lipid asal hewani maupun nabati sebagai sumber karbon dan energi bagi pertumbuhannya (Ribeiro et al. 2011). Lipase telah dimanfaatkan di bidang kimia, kesehatan, farmasi, dan kosmetik, sehingga purifikasi lipase menjadi penting untuk dilakukan. Salah satu manfaat lipase di bidang farmasi yaitu untuk mensintesis lovastatin, sebagai obat yang mampu menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Andualema dan Gessesse 2012).

Protease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino. Protease sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar serta berperan dalam fungsi fisiologis lainnya, seperti pencernaan, maturasi hormon, perakitan virus, respon imun, inflamasi, fertilisasi, koagulasi darah, fibrinolisis, kontrol tekanan darah, sporulasi, germinasi dan patogenesis. Selain itu protease juga diimplikasikan dalam peran regulasi ekspresi gen, perbaikan DNA, dan sintesis DNA (Chitte dan Chaphalkar 2017). Oleh karena itu dibutuhkan pemanfaatan enzim yang optimal dan efisien, dengan perlu dilakukannya pemurnian suatu enzim.

Pemurnian suatu enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa yang tidak dikehendaki. Tahap-tahap pemurnian tergantung dari tujuan akhir, apakah untuk tujuan komersial atau tujuan riset. Enzim yang kasar atau yang dimurnikan sebagian masih dapat dipakai untuk komersial, sedangkan enzim yang murni atau hampir murni digunakan dalam riset atau dipakai dalam produk analitik. Untuk tujuan riset, biasanya digunakan untuk mempelajari aktivitas enzim, struktur dan fungsinya. Jumlah dari protein yang telah dimurnikan tidak hanya bergantung pada material awal

tetapi juga proses karena ada protein yang hilang pada setiap tahap pemurnian. Selain itu, beberapa penelitian melaporkan terdapat sekitar 5-10% atau lebih hasil pemurnian mengandung kontaminasi dengan protein lain. Oleh karenanya perlu tahapan pemurnian yang lebih tinggi untuk meningkatkan kemurnian sampel (Wingfield 2015).

Kromatografi filtrasi gel merupakan salah satu teknik pemisahan protein dan makromolekul biologi lain berdasarkan ukuran molekul. Matriks filtrasi gel berupa gel yang berpori seperti dekstran, agarosa atau poliakrilamida. Contoh matriks komersial tersebut adalah sepharose, sephadex, dan biogel, kemudian dikemas di dalam kolom dan dilusi dengan fase cair. Pori-pori matriks dapat menampung molekul berukuran lebih kecil. Molekul berukuran lebih kecil akan memasuki pori-pori matriks, namun molekul yang besar tidak terperangkap ke dalam pori kolom. Hasil yang dicapai adalah molekul besar akan keluar dari kolom lebih dulu dibanding molekul yang lebih kecil (Bouvier dan Koza 2014).

Pada penelitian yang telah dilakukan mengenai pemurnian dan karakterisasi enzim protease dari *Planomicrobium* sp. dengan metode kromatografi kolom dihasilkan berat molekul 61,4 kDa (Liu et al. 2013), sehingga dapat disimpulkan bahwa enzim protease memiliki berat molekul >20 kDa (Sajuthi et al. 2010). Analisis hasil SDS-PAGE enzim pencernaan pada fraksi amonium sulfat 80% dari saluran pencernaan udang vaname memiliki rerata aktivitas enzim protease sebesar 18,0016 U mL⁻¹ dan aktivitas enzim lipase sebesar 88,5694 U mL⁻¹. Berat molekul dari enzim lipase serta protease dari saluran pencernaan udang vaname memiliki rentang

kisaran 23–62 kDa (Anhar 2018). Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian lanjutan ini bertujuan untuk menentukan aktivitas enzim protease dan lipase dari saluran pencernaan udang vaname dengan pengendapan amonium sulfat 70% dan pemurnian melalui metode kromatografi filtrasi gel.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga Juli 2019 di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Biokimia, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka, Jakarta.

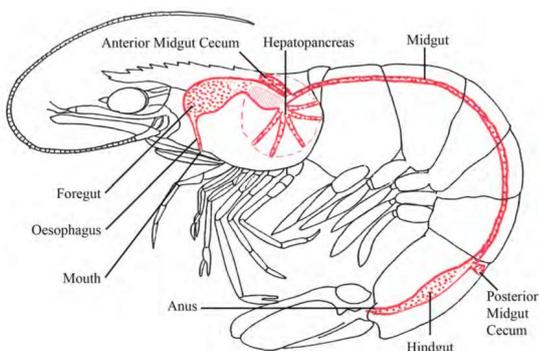
Bahan dan alat

Alat-alat yang digunakan antara lain, sentrifus (Thermo Scientific), timbangan analitik (OHAUS Adventure Pro), pH meter (Hanna Instruments), *magnetic stirrer* (MS H-Pro), mikropipet (Eppendorf Research), *waterbath*, membran selofan 14 kDa, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), kolom kromatografi (Pyrex).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu udang vaname yang dipisahkan dari saluran pencernaannya. Udang vaname diperoleh dari Krabben Fresh Market di Jl. Tenggiri Blok K7A, Muara Baru Ujung, Jakarta Utara (S 6° 8' 4.25"; E 106° 51' 37.087"). Bahan lain yang digunakan antara lain, akuades, dapar fosfat pH 7, amonium sulfat (Merck), EDTA, BaCl₂ (Merck), *bovine serum albumin*, asam fosfat 85%, etanol 96%, asam oleat, tris HCl pH 8,3, minyak zaitun, tirosin, substrat kasein 1,5%. reagen TCA, *coomasie brilliant blue G-250* (AMRESCO), membran selofan, dan sephadex G-100.

Pengambilan sampel saluran pencernaan

Udang vaname (*L. vannamei*) yang digunakan adalah udang yang berumur 4 bulan sebanyak 7,11 kg dengan berat 20 - 25 g per udang. Sampel diperoleh dengan cara membedah kepala udang dan mengeluarkan saluran pencernaannya (Gambar 1 dan 2). Proses ini dilakukan pada suhu 0°C di dalam *cooler box* dengan tujuan untuk mencegah kerusakan enzim (Aslamyah 2011).



Gambar 1. Skema sistem pencernaan udang vaname (Corteel 2013)

Ekstraksi enzim kasar

Sebanyak 540,0985 g isi saluran pencernaan udang vaname dihomogenisasi dengan ditambahkan dapar fosfat pH 7,0 dengan perbandingan 1:2. Kemudian sampel dihaluskan menggunakan *blender* sampai halus. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit (Livshits et al. 2015). Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim intraseluler dari sisa-sisa sel. Endapan hasil sentrifugasi dibuang dan supernatannya digunakan sebagai ekstrak kasar enzim. Supernatan yang diperoleh adalah sebanyak 968 mL.

Presipitasi dengan amonium sulfat

Supernatan yang diperoleh ditambahkan dengan amonium sulfat dengan konsentrasi 0-70%. Penambahan amonium sulfat sebanyak 456,896 gram untuk 968 mL supernatan ini dilakukan sedikit demi sedikit ke dalam ekstrak enzim hingga larut yang dibantu dengan proses pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan akan berubah menjadi keruh karena protein telah mengendap. Presipitasi enzim dibiarkan selama 1 jam pada suhu 20°C, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Hasil dari sentrifugasi, larutan akan membentuk endapan dan supernatan. Endapan yang didapatkan adalah sebanyak 30 mL dan dilanjutkan dengan proses dialisis terhadap endapan yang didapat. Selanjutnya endapan didialisis untuk memisahkan molekul yang besar dari molekul yang kecil melalui membran semipermeabel.

Dialisis

Dialisis dilakukan selama 72 jam pada suhu 4°C menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 125 rpm. Pelarut yang digunakan selama proses dialisis adalah dapar fosfat pH 7. Pergantian pelarut dilakukan setiap 3 jam. Uji kualitatif amonium sulfat terhadap larutan dialisis dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl₂ 1% dan HCl 0,1 N untuk memastikan bahwa garam amonium sulfat sudah tidak terdapat di dalam larutan enzim. Hasil dialisis yang didapatkan adalah sebanyak 20 mL.

Kromatografi filtrasi gel

Hasil dialisis dilanjutkan ke metode kromatografi filtrasi gel, dengan mengaplikasikan ke dalam kolom sephadex

G-100 yang sebelumnya telah dikalibrasi dengan dapar tris HCl 0,1 M pH 8,3 dengan pengelusi 2 kali volume tabung kolom. Langkah-langkahnya yaitu dengan pembuatan kolom sephadex G-100. Tepung sephadex G-100 dikembangkan dengan dapar tris HCl 0,1 M pH 8,3 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Suspensi ini dibiarkan sampai mengembang.

Gel yang sudah mengembang kemudian diaduk perlahan dan dimasukkan lewat batang pengaduk ke dalam kolom kromatografi sampai seperempat dari tinggi kolom kromatografi dan dielusi dengan dapar tris HCl 0,1 M pH 8,3 sebanyak 2 kali volume tabung kolom, hasil fraksi ditampung sebanyak 1 mL per tabung. Gel dibiarkan mengendap semua pada tabung kolom kromatografi. Pemisahan enzim protease dengan kolom sephadex G-100 sebanyak 1,9 mL sampel enzim dimasukkan ke dalam kolom sephadex G-100 kromatografi, lalu dielusi sampai sampel habis dielusi, hasil fraksi ditampung sebanyak 1 mL per tabung. Hasil fraksi dianalisis kandungan proteinnya pada panjang gelombang 280 nm secara langsung diukur pada spektrofotometer UV-Vis. Hasil fraksi yang ditampung, terdapat 17 fraksi yang memiliki serapan tertinggi dengan pengukuran pada panjang gelombang 280 nm, setelah itu dilakukan uji aktivitas enzim.

Penentuan kadar protein

Sebanyak 0,1 mL ekstrak kasar enzim ditambahkan 5 mL pereaksi Bradford, divortex dan diinkubasi selama 10 menit. Serapan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Malle et al. 2015). Panjang gelombang maksimum yang diperoleh sebesar 593,5 nm. Kadar protein dihitung menggunakan persamaan kurva standar larutan BSA (*bovine serum albumin*).



Gambar 2. Udang vaname

Tabel 1. Hasil ekstraksi enzim dari saluran pencernaan udang vaname

No	Keterangan	Hasil
1	Udang vaname	7,11 kg
2	Saluran pencernaan udang vaname	540,0985 g
3	Ekstrak enzim kasar	1080 mL
4	Hasil sentrifugasi I (supernatan)	968 mL
5	Hasil sentrifugasi II (endapan)	30 mL
6	% Rendemen saluran pencernaan udang	7,5963%
7	% Rendemen endapan	5,5545%

Tabel 2. Hasil kadar protein pencernaan dari saluran pencernaan udang vaname

Keterangan	Kadar Protein (mg mL ⁻¹)	Rerata Protein (mg mL ⁻¹)
Ekstrak pengendapan <i>salting out</i>	0,1204	0,1215
	0,1225	
	0,1217	
Dialisis	0,1182	0,1181
	0,1179	
	0,1182	
Kromatografi fraksi ke 100	0,1173	0,1161
	0,1121	
	0,1188	
Kromatografi fraksi ke 102	0,1160	0,1166
	0,1191	
	0,1147	

Uji aktivitas enzim protease

Metode Nakanishi yang dilakukan oleh Ong dan Yang (2017) digunakan untuk uji aktivitas protease dengan menggunakan substrat kasein 2%. Prosedur pengujiannya adalah dengan mencampurkan 0,6 mL kasein 2% dan 0,1 mL larutan enzim. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi diakhiri dengan penambahan 0,6 mL reagen TCA. Blanko yang digunakan adalah 0,6 mL kasein 2% tanpa penambahan larutan enzim dan diinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan TCA sebanyak 0,6 mL. Hasil inkubasi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya dalam mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 µmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat.

Uji aktivitas enzim lipase

Aktivitas lipase diukur dengan metode Kwon dan Rhee yang dilakukan oleh Supriyatna et al. (2015) menggunakan substrat minyak zaitun. Prosedur pengujiannya adalah dengan menambahkan 1 mL larutan minyak zaitun ke dalam 1 mL dapar fosfat pH 7,2. Kemudian sebanyak 0,1 mL sampel enzim ditambahkan ke dalam campuran di atas lalu dihomogenkan dengan *vortex* selama 10 menit. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit lalu ditambahkan 1 mL HCl 6 N dan 5 mL heksana. Campuran dikocok kuat dan ambil lapisan atasnya sebanyak 4 mL, lalu ditambahkan reagen tembaga (II) asetat sebanyak 1 mL. Serapan asam oleat diukur pada panjang gelombang maksimumnya yaitu 746 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi dari Laboratorium Crustasea, Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong menunjukkan bahwa jenis udang yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar udang vaname (*L. vannamei*). Saluran pencernaan yang terdapat di sepanjang bagian atas abdomen udang diperoleh dengan cara pembedahan. Selama proses pembedahan, suhu dijaga tetap dingin agar tidak terjadi kerusakan enzim. Saluran cerna atau usus udang sendiri berwarna hijau, sedangkan kepala udang yang diambil berupa cairan berwarna *orange* serta memiliki tekstur kental.

Saluran cerna udang yang didapat sebanyak 540,09 g dari 7,11 kg udang vaname dengan rendemen sebesar 7,59% (Tabel 1). Hasil rendemen saluran pencernaan udang vaname yang didapatkan lebih besar dari penelitian sebelumnya, yaitu penelitian Anhar (2018) yang memiliki rendemen sebesar 4,33%. Hal ini dapat terjadi karena umur udang yang digunakan pada penelitian ini lebih tua dan berat udang yang digunakan lebih besar dari berat udang sebelumnya, sehingga diperoleh saluran pencernaan yang lebih banyak. Saluran cerna disimpan pada suhu -28°C agar enzim tidak terdenaturasi jika tidak langsung digunakan.

Penambahan 70% amonium sulfat pada ekstrak enzim kasar sebanyak 456,896 gram dilakukan sedikit demi sedikit dengan

bantuan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*, dengan tujuan untuk meningkatkan kecepatan melarut amonium sulfat dan menghomogenkan amonium sulfat ke seluruh bagian ekstrak kasar enzim. Proses pengadukan dilakukan secara perlahan yaitu 100 rpm untuk menghindari terbentuknya buih. Terbentuknya buih akan menyebabkan perubahan konformasi molekul protein (Báez et al. 2011). Endapan yang terbentuk dari penjuanan dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Kadar protein dari hasil pengendapan dapat dilihat pada Tabel 2.

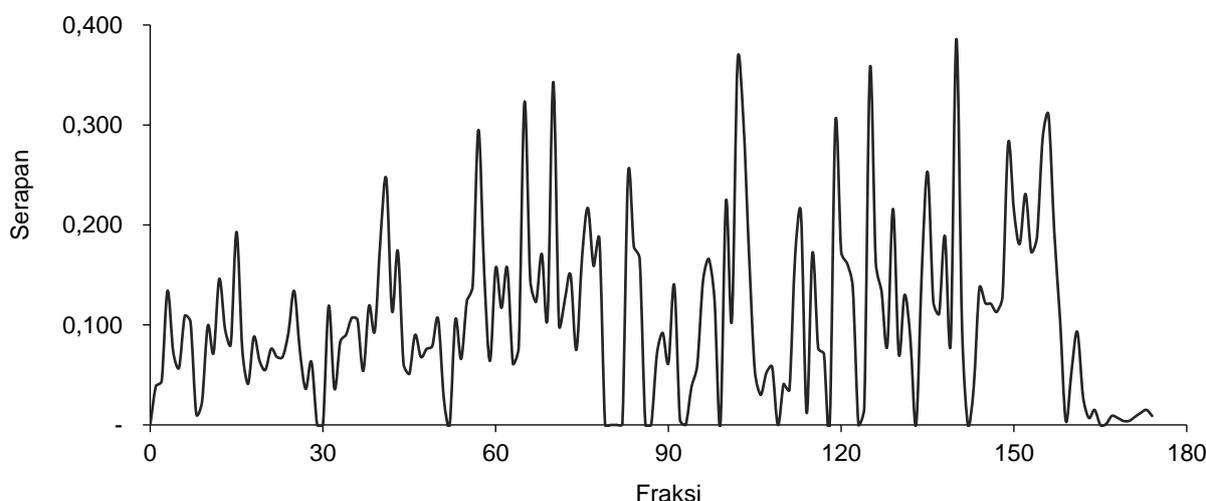
Pengendapan protein bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga didapatkan enzim yang memiliki aktivitas lebih baik karena mengurangi kontaminan yang dapat mengganggu sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat. Prinsip presipitasi menggunakan garam amonium sulfat adalah *salting out*, yang mana pada penambahan konsentrasi garam tertentu akan menyebabkan kelarutan protein menurun (Purwanto 2016).

Pemisahan protein dilanjutkan dengan dialisis, yang merupakan perpindahan molekul terlarut dari suatu campuran yang terjadi akibat proses difusi pada membran semipermeabel berdasarkan ukuran molekul protein (Katoch 2011). Proses ini bertujuan untuk memisahkan residu garam amonium sulfat maupun zat terlarut lainnya berdasarkan ukuran molekul menggunakan membran selofan (Gunarti et al. 2013). Dialisis protein berada di dalam membran selofan karena protein memiliki ukuran molekul yang lebih besar dari ukuran pori

Tabel 3. Hasil uji aktivitas enzim protease dan lipase dari saluran pencernaan udang

No	Fraksi Ke-	Aktivitas Enzim (U mL ⁻¹)	
		Protease	Lipase
1	41	11,4231	345,73
2	56	4,9231	337,73
3	65	4,0209	300,07
4	70	10,0867	265,07
5	76	8,4048	234,57
6	100	13,2873	531,07
7	102	96,3924	147,07
8	113	7,956	497,07
9	125	7,1981	166,40
10	129	21,0652	376,07
11	135	32,115	185,73
12	140	22,906	394,73
13	149	7,3788	165,40
14	150	7,631	201,07
15	152	15,1606	421,40
16	155	16,0446	166,07
17	156	2,3946	186,73
18	Blanko		

membran yaitu 14 kDa. Hasil dialisis yang didapat sebanyak 20 mL dan memiliki kadar protein sebesar 0,1181 mg mL⁻¹ (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan adanya pengurangan volume sebanyak 10 mL dari sebelum dialisis, hal ini dikarenakan sebagian larutan dapat dengan ukuran di bawah ukuran pori membran ikut keluar melewati membran selofan.



Gambar 3. Hasil pengukuran serapan protein pada panjang gelombang 280 nm

Dialisat protein diaplikasikan ke dalam kolom kromatografi filtrasi gel. Kromatografi ini merupakan salah satu metode pemurnian protein dan makromolekul biologi lainnya berdasarkan ukuran molekul. Molekul kecil akan masuk ke dalam polimer gel sebagai fase diam dan akan diikat oleh partikel gel sedangkan molekul yang besar tidak diikat partikel gel sehingga turun terlebih dahulu (Hong et al. 2012).

Hasil kromatografi ditampung sebanyak 174 fraksi (Gambar 3). Tujuh belas fraksi diantaranya diukur aktivitas enzimnya. Pemilihan fraksi ini berdasarkan nilai serapan protein di atas 0,2000 dengan pengukuran pada panjang gelombang 280 nm. Protein menyerap sinar ultraviolet maksimum pada panjang gelombang 280 nm, karena adanya asam amino tirosin, triptofan, dan fenilalanin (Anthis dan Clore 2013). Gel yang digunakan pada pemisahan dengan kromatografi ini adalah sephadex G-100 yang memiliki pemisahan berat molekul sebesar kisaran 4-150 kDa untuk pemisahan protein (Katoch 2011). Molekul protein dengan ukuran kecil akan terjebak masuk ke dalam pori gel, sehingga keluar lebih lama dibandingkan molekul ukuran besar.

Pemilihan fraksi yang memiliki serapan yang tinggi diharapkan memiliki kandungan protein yang tinggi sehingga enzim lipase dan protease yang diperoleh memiliki aktivitas tertinggi. Metode Bradford dipilih sebagai metode untuk pengujian kadar protein karena metode ini cukup akurat, selektif, stabil terhadap keadaan pengotor, dan sangat cepat dalam pengerjaannya dibandingkan dengan metode lainnya (Datki et al. 2019). Uji Bradford melibatkan pewarna *coomasie brilliant blue G-250* (CBBG) yang mana CBBG akan berikatan dengan protein yang terdapat pada sampel larutan dalam suasana asam, sehingga akan dihasilkan warna kebiruan. CBBG yang semula berwarna merah akan menghasilkan warna biru, karena adanya interaksi antara pewarna dengan asam amino penyusun protein. Larutan *bovine serum albumin* merupakan larutan standar yang digunakan dalam penentuan panjang gelombang maksimum.

Kadar protein ditentukan dengan persamaan linier yang dihasilkan dari pembuatan kurva standar. Kurva linier menunjukkan hubungan antara absorbansi dengan kadar protein berbanding lurus. Semakin tinggi nilai absorbansi, maka

semakin tinggi kadar protein yang dihasilkan. Hasil uji kadar protein enzim dari saluran pencernaan udang vaname dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan hasil ini dapat dinyatakan bahwa semakin murni suatu enzim, maka kadar protein yang dihasilkan semakin rendah.

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim protease pada penelitian ini adalah metode Nakanishi (Yusriah dan Kuswytasari 2013). Fraksi yang terkumpul diuji aktivitas enzim lipase dan protease-nya. Aktivitas enzim diukur secara triplo pada sampel untuk mendapatkan rerata aktivitasnya. Pembuatan kurva standar menghasilkan persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0764 + 0,0072x$. Tabel 3 merupakan hasil pengukuran uji aktivitas dari 17 fraksi dengan nilai absorbansi protein tertinggi, aktivitas protease yang diperoleh dari fraksi nomor 102 yaitu $96,3924 \text{ U mL}^{-1}$. Nilai ini dapat diartikan dengan sejumlah enzim protease (mL) yang mampu mengkatalisis $96,3924 \mu\text{mol}$ substrat kasein tiap menit, sedangkan tiap 1 mL enzim lipase mampu mengkatalisis $531,07 \mu\text{mol}$ substrat minyak zaitun per satuan waktu (menit). Aktivitas lipase tertinggi diperoleh pada fraksi ke-100. Hasil uji aktivitas yang diperoleh lebih besar dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Anhar (2018) yang hanya memperoleh nilai aktivitas enzim protease sebesar $18,0016 \text{ U mL}^{-1}$ dan $88,5694 \text{ U mL}^{-1}$ untuk nilai aktivitas lipase. Sehingga aktivitas enzim yang dihasilkan dari studi ini mengalami peningkatan sebanyak $5,35x$ untuk protease dan $6x$ untuk lipase dibanding dengan aktivitas enzim yang dihasilkan Anhar (2018). Perbedaan timbul karena pada penelitian sebelumnya hanya menggunakan teknik penjuanan (*salting out*), sedangkan pada penelitian ini telah dilakukan pemisahan menggunakan metode kromatografi filtrasi gel dengan buffer tris-HCl pH 8,3 sehingga enzim protease dan lipase yang diperoleh lebih murni dan hasil aktivitasnya menjadi lebih besar.

Enzim protease dan lipase yang murni dapat dimanfaatkan pada bidang pangan maupun kesehatan. Pada industri pangan, protease sering dimanfaatkan sebagai pengempuk daging, penggumpal susu, serta sebagai bahan tambahan yang dapat meningkatkan kualitas roti (Raveendran et al. 2018). Enzim lipase dapat digunakan sebagai

bahan tambahan dalam pembuatan keju (Chandra et al. 2020). Dalam industri farmasi, lipase digunakan untuk mensintesis molekul enantiomer. Molekul ini dimanfaatkan pada obat antiinflamasi, antikanker, antiviral, antihipertensi, antikolesterol, anti-alzheimer dan vitamin A (Houde et al. 2004). Tidak kalah dengan lipase, enzim protease juga dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi yaitu sebagai agen terapi pada gangguan pencernaan, inflamasi, serta gangguan kulit (Razzaq et al. 2019).

KESIMPULAN

Fraksi protein dari saluran pencernaan udang vaname (*L. vannamei*) yang memiliki nilai aktivitas enzim proteolitik tertinggi terdapat pada fraksi 102 dengan nilai sebesar 96,3924 U mL⁻¹, sedangkan aktivitas lipolitik tertinggi terdapat pada fraksi 100 dengan nilai sebesar 531,07 U mL⁻¹. Aktivitas enzim dari hasil fraksinasi kromatografi filtrasi gel mengalami peningkatan sebanyak 5,35x untuk protease dan 6x untuk lipase dibandingkan aktivitas enzim dari ekstrak sampel yang belum difraksinasi. Selain kromatografi filtrasi gel, pemurnian akan lebih baik jika dilakukan kombinasi teknik kromatografi sesuai dengan karakteristik enzim.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lemlitbang Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka atas dana penelitian yang diberikan dengan nomor surat kontrak 751/F.03.07/2019.

DAFTAR PUSTAKA

Andualema B, Gessesse A (2012) Microbial lipases and their industrial applications: review. *Biotechnol* 11: 100-118. doi: 10.3923/biotech.2012.100.118

Anhar D (2018) Analisis SDS-PAGE enzim pencernaan pada fraksi ammonium sulfat 80% dari saluran pencernaan udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*). Skripsi, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka

Anthis NJ, Clore GM (2013) Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein Sci* 22: 851-858. doi:

10.1002/pro.2253

Aslamyah S (2011) Kualitas lingkungan dan aktivitas enzim pencernaan udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*) pada berbagai konsentrasi probiotik bioremediasi- *Bacillus* sp. *Fish Sci* 1: 161-178. doi: 10.20527/fs.v1i2.1186

Báez GD, Moro A, Ballerini GA, Busti PA, Delorenzi NJ (2011) Comparison between structural changes of heat-treated and transglutaminase cross-linked beta-lactoglobulin and their effects on foaming properties. *Food Hydrocoll* 25: 1758-1765. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.033

Bouvier ESP, Koza SM (2014) Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *Trends Anal Chem* 63: 85-94. doi: 10.1016/j.trac.2014.08.002

Chandra P, Enespa, Singh R, Arora PK (2020) Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact* 19: 169. doi: 10.1186/s12934-020-01428-8

Chitte R, Chaphalkar S (2017) The world of proteases across microbes, insects, and medicinal trees, Pp 517-524. In: Chakraborti S, Dhalla NS (Eds). *Proteases in Physiology and Pathology*. Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-2513-6_24

Corteel M (2013) White spot syndrome virus infection in *P. vannamei* and *M. rosenbergii*: experimental studies on susceptibility to infection and disease. Thesis, Ghent University, Belgium

Datki Z, Olah Z, Macsai L, Pakaski M, Galik B, Mihaly G, Kalman J (2019) Application of BisANS fluorescent dye for developing a novel protein assay. *PLoS One* 14: e0215863. doi: 10.1371/journal.pone.0215863

Dirjen Perikanan Budidaya (2018) KKP: Budidaya udang masih sangat potensial. <https://kkp.go.id/djpb/artikel/8688-kkp-budidaya-udang-masih-sangat-potensial>. Accessed 7 Oct 2020

Gunarti DR, Rahmi H, Sadikin M (2013) Isolation and purification of thiamine binding protein from mung bean. *HAYATI J Biosci* 20: 1-6. doi: 10.4308/hjb.20.1.1

Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V (2013) A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine,

- and beyond. *Biomed Res Int* 2013: 329121. doi: 10.1155/2013/329121
- Hong P, Koza S, Bouvier ESP (2012) Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 35: 2923-2950. doi: 10.1080/10826076.2012.743724
- Houde A, Kademi A, Leblanc D (2004) Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol* 118: 155-170. doi: 10.1385/ABAB:118:1-3:155
- Huang Z, Wang Y, Qiu M, Sun L, Deng Y, Wang X, Bi S, Gooneratne R, Zhao J (2019) Effects of T-2 toxin on digestive enzyme activity, intestinal histopathology and growth in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Sci Rep* 9: 13175. doi: 10.1038/s41598-019-49004-4
- Kandra P, Challa MM, Jyothi HKP (2012) Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 17-29. doi: 10.1007/s00253-011-3651-2
- Katoch R (2011) *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Springer Science, New York. doi: 10.1007/978-1-4419-9785-2
- KKP (2019) Pengembangan komoditas unggulan strategis perikanan budidaya, dan tata kelola perizinan untuk memacu investasi. *Workshop Pembangunan Perikanan Budidaya berkelanjutan*. Kementerian Kelautan dan Perikanan. <https://wri-indonesia.org/sites/default/files/Bappenas - Double Tree%2C 9 September 2019.pdf>. Accessed 7 Oct 2020
- Liu Q, Sun S, Piao M, Yang JY (2013) Purification and characterization of a protease produced by a *Planomicrobium* sp. L-2 from gut of *Octopus vulgaris*. *Prev Nutr Food Sci* 18: 273-279. doi: 10.3746/pnf.2013.18.4.273
- Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, Generozov EV, Govorun VM (2015) Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* 5: 17319. doi: 10.1038/srep17319
- Malle D, Telussa I, Lasamahu AA (2015) Isolasi dan karakterisasi papain dari buah pepaya (*Carica papaya* L) jenis daun kipas. *Indones J Chem Res* 2: 182-189
- Ong ILH, Yang KL (2017) Recent developments in protease activity assays and sensors. *Analyst* 142: 1867-1881. doi: 10.1039/c6an02647h
- Purwanto MGM (2016) The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract. *Procedia Chem* 18: 127-131. doi: 10.1016/j.proche.2016.01.020
- Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyama SB, Abraham A, Mathew K, Madhavan A, Rebello S, Pandey A (2018) Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol Biotechnol* 56: 16-30. doi: 10.17113/ftb.56.01.18.5491
- Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, Ashraf M (2019) Microbial proteases applications. *Front Bioeng Biotechnol* 7: 110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110
- Ribeiro BD, de Castro AM, Coelho MAZ, Guimaraes DM (2011) Production and use of lipases in bioenergy : a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res* 2011: 615803. doi: 10.4061/2011/615803
- Sajuthi D, Suparto I, Yanti, Praira W (2010) Purifikasi dan pencirian enzim protease fibrinolitik dari ekstrak jamur merang. *Makara Sains* 14: 145-150. doi: 10.7454/mss.v14i2.727
- Supriyatna A, Amalia D, Jauhari AA, Holydaziah D (2015) Aktivitas enzim amilase, lipase, dan protease dari larva. *J Istek* 9: 18-32
- Wingfield PT (2015) Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci* 80: 61.1-6.1.35. doi: 10.1002/0471140864.ps0601s80
- Worthington CC, Worthington V, Worthington A (2019) *Introduction to Enzymes*. Worthington Biochemical Corporation, Lakewood USA
- Younes I, Rinaudo M (2015) Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs* 13: 1133-1174. doi: 10.3390/md13031133
- Yusriah, Kuswytasari ND (2013) Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease *Penicillium* sp. *J Sains dan Seni POMITS* 2: 48-50. doi: 10.12962/j23373520.v2i1.2744