

Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dalam Ekstrak Temu Hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) dengan Metode *Water Soluble Tetrazolium Salt-1* (WST-1)

Activity Assay of Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme in The Extract of Temu Hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) with *Water Soluble Tetrazolium Salt-1* (WST-1) Method

Tita Novarini*, Ana Indrayati, Desi Purwaningsih

Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi,
Jl. Let. Jend. Sutoyo, Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

*Email Korespondensi: 24185613a@mhs.setiabudi.ac.id

Abstrak

Reactive oxygen species merupakan radikal bebas yang apabila jumlahnya berlebih akan menyebabkan stres oksidatif. *Reactive oxygen species* dapat dicegah dengan pemberian antioksidan enzim, seperti enzim superoksida dismutase. Tanaman yang memiliki aktivitas superoksida dismutase salah satunya adalah temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein total dan persen inhibisi ekstrak kasar enzim superoksida dismutase temu hitam dan konsentrasi amonium sulfat 25, 50, 75, 100% serta nilai persen inhibisi yang optimum dari konsentrasi amonium sulfat. Penelitian ini diawali dengan determinasi tanaman dan pengambilan sampel temu hitam. Ekstraksi dilakukan dengan cara penambahan dapar fosfat salin dan disentrifugasi. Pemurnian dilakukan dengan metode presipitasi amonium sulfat. Penetapan kadar protein total dengan menggunakan metode *Lowry*. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan metode *water soluble tetrazolium salt-1*. Nilai kadar protein total ekstrak kasar dan presipitasi amonium sulfat 25, 50, 75, 100% pada penelitian ini secara berturut-turut sebesar 0,909; 0,639; 0,710; 0,752; 0,944 mg/mL. Kemudian nilai persen inhibisinya secara berturut-turut adalah 76,720; 23,810; 65,079; 70,370; dan 83,069% dengan konsentrasi yang optimum adalah 100%.

Kata Kunci: *Curcuma aeruginosa* Roxb., superoksida dismutase, water soluble tetrazolium salt-1

Abstract

Reactive oxygen species are free radicals that, in excess, will cause oxidative stress. Reactive oxygen species can be prevented by administering antioxidant enzymes, such as the enzyme superoxide dismutase. One of the plants that has superoxide dismutase activity is temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.). This study aims to determine the total protein content and percent inhibition of the crude extract of the temu hitam superoxide dismutase enzyme and the ammonium sulfate concentration of 25, 50, 75, and 100% and the optimum inhibition value of the ammonium sulfate concentration. This research begins with the determination of plants and taking samples of temu hitam. Extraction is done by adding saline phosphate buffer and centrifugation. Purification was carried out by the ammonium sulfate precipitation method. Determination of total protein content using the *Lowry* method. The measurement of enzyme activity was carried out using the water soluble tetrazolium salt-1 method. The total protein content of crude extract and precipitation of ammonium sulfate 25, 50, 75, 100% in this study was 0.909, respectively; 0.639; 0.710; 0.752; 0.944 mg/mL. The percent inhibition values were 23,810, 65.079, 70,370, and 83,069%, with 100% being the optimum concentration.

Keywords: *Curcuma aeruginosa* Roxb., superoxide dismutase, water soluble tetrazolium salt-1

Submitted: 25 July 2022

Revision: 17 September 2022

Accepted: 14 October 2022

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v4i5.1285>

1 Pendahuluan

Tubuh manusia mengandung molekul oksigen yang stabil dan tidak stabil. Molekul oksigen yang stabil penting untuk memelihara kehidupan sel, sedangkan molekul oksigen yang tidak stabil sering disebut dengan radikal bebas. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas dibentuk melalui 2 cara, yaitu secara endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen dibentuk sebagai respon normal dari rantai peristiwa dalam tubuh, sedangkan radikal bebas endogen dapat terbentuk dari sisa metabolisme protein, karbohidrat, dan lemak pada mitokondria, proses inflamasi, dan pada kondisi iskemia [1], [2].

Reactive oxygen species (ROS) merupakan radikal bebas yang berperan penting pada beberapa proses fisiologis dalam organ tubuh, tetapi apabila jumlahnya berlebihan akan menimbulkan stres oksidatif. Stres oksidatif sendiri merupakan salah satu pemicu penyakit degeneratif [3]. Salah satu cara untuk mencegah

ROS adalah dengan pemberian antioksidan endogen, seperti superoksida dismutase (SOD) [4]. SOD merupakan pertahanan antioksidan yang sangat penting dalam melawan stres oksidatif di dalam tubuh. Enzim ini mempunyai mekanisme pertahanan sel endogen maupun eksogen, memiliki potensi penggunaan dalam pengobatan suatu penyakit, meningkatkan kemampuan obat-obatan dalam mengobati penyakit, serta sebagai nutrisi bagi tubuh. Pada dunia kefarmasian, SOD mempunyai manfaat, diantaranya sebagai agen anti inflamasi serta dapat mencegah perubahan sel akibat prakanker [5].

Salah satu tanaman yang mempunyai aktivitas SOD adalah temu hitam. Temu hitam dipilih karena pada penelitian yang dilakukan oleh Moon-ai *et al.* [6], temu hitam mempunyai nilai IC₅₀ yang rendah baik pada ekstrak kasar maupun dengan penambahan amonium sulfat, yaitu 0,0537 dan 0,0178 µg/mL. Hubungan antara nilai IC₅₀ adalah semakin rendah nilai IC₅₀ yang dihasilkan, maka sampel tersebut mempunyai aktivitas SOD yang semakin tinggi.

Penelitian tersebut meneliti tentang aktivitas SOD dengan metode *nitroblue tetrazolium* (NBT) pada 15 spesies tanaman pada famili Zingiberaceae. Pada penelitian ini, penulis mencoba menggunakan metode *water soluble tetrazolium salt-1* (WST-1) untuk menganalisis aktivitas enzim SOD temu hitam. WST-1 mempunyai mekanisme menghasilkan pewarnaan formazan yang larut air berdasarkan reduksi anion superoksida [7]. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar protein total dan persen inhibisi ekstrak kasar SOD temu hitam pada konsentrasi presipitasi amonium sulfat 25, 50, 75, 100% serta mengetahui persen inhibisi dari konsentrasi presipitasi amonium sulfat yang optimum.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, pisau, pH meter, blender, gelas ukur, kulkas, kain *flannel*, *centrifuga*, botol jar, tabung *centrifuge*, *magnetic stirrer*, *beaker glass*, labu ukur, vial, pipet volume dan ukur, spektrofotometer UV-Vis, mikropipet, *plate 96 well*, inkubator, dan *microplate reader*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temu hitam, *phosphate buffered saline* (PBS), aquabidest, amonium sulfat, 2% Na₂CO₃, NaOH 0,10 N, 0,5% CuSO₄.5H₂O, 1% Natrium Kalium Tartrat, reagen *Folin-Ciocalteu phenol*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), WST-1 *assay kit*, dan vitamin C.

2.2 Determinasi Tanaman dan Pengambilan Sampel

Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Temu hitam diambil di daerah Pulisen, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Temu hitam diambil secara acak, tidak busuk maupun rusak, bebas penyakit, serta segar. Umur pemanenan temu hitam dilakukan saat tanaman berusia 9 bulan setelah penanaman.

2.3 Ekstraksi SOD Temu Hitam

Rimpang temu hitam sebanyak 45 gram berat basah dikupas, lalu dipotong kecil-kecil dengan ukuran sekitar 10x10x10 mm. Setelah itu, dihomogenisasi menggunakan blender dengan penambahan larutan PBS pH 7,2 yang mengandung fosfat 0,02 M dan NaCl 0,15 M sebanyak 150 mL dan dibiarkan semalaman pada suhu 4°C sambil sesekali diaduk serta disaring. Kemudian filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit kemudian diambil supernatannya. Supernatan tersebut merupakan ekstrak kasar (*crude*).

2.4 Pemurnian Parsial Ekstrak SOD

Amonium sulfat sebanyak 4,02 gram dilarutkan dalam 30 mL ekstrak kasar untuk konsentrasi 25%b/v. Kemudian amonium sulfat sebanyak 7,74 gram dilarutkan dalam 30 mL ekstrak kasar untuk konsentrasi 50%b/v. Setelah itu, amonium sulfat sebanyak 14,28 gram dilarutkan dalam 30 mL ekstrak kasar untuk konsentrasi 75%b/v. Kemudian amonium sulfat sebanyak 20,91 gram dilarutkan dalam 30 mL ekstrak kasar untuk konsentrasi 100%b/v. Perhitungan amonium sulfat diambil dari penimbangan amonium sulfat menurut Duong-Ly dan Gabbeli [8]. Setelah itu, amonium sulfat tersebut ditambahkan sedikit demi sedikit dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C. Kemudian larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit di suhu 4°C dan dipisahkan antara supernatan serta peletnya. Terakhir pelet yang dihasilkan ditambahkan PBS dengan perbandingan 1:2.

2.5 Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Sebanyak 2% Na₂CO₃ dilarutkan dalam 0,10 N NaOH untuk reagen A. Kemudian sebanyak 0,5% CuSO₄.5H₂O 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 dengan aquabidest sebanyak 50 mL yang digunakan untuk membuat larutan induk BSA konsentrasi 1000 ppm. Kemudian larutan BSA dimasukkan dalam labu ukur 10 mL sebanyak 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 mL serta ditambah aquabidest hingga tanda batas, sedangkan satu labu ukur diisi dengan 10 mL aquabidest sebagai blanko. Setelah itu, masing-masing labu ukur dipipet sebanyak 1 mL serta ditambahkan dalam 5 mL reagen *Lowry C* dan digojog dan ditunggu selama 10 menit. Kemudian sebanyak 0,5 mL reagen *Lowry D* ditambahkan dan larutan tersebut ditunggu selama 30 menit. Lalu masing-masing kurva baku diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Kurva antara nilai absorbansi serta konsentrasi dibuat untuk memperoleh suatu persamaan regresi linier.

Sebanyak 1 mL sampel dengan pengeceran 100x ditambahkan dalam 5 mL reagen *Lowry C*

dan digojog serta ditunggu selama 10 menit. Kemudian sebanyak 0,5 mL reagen *Lowry D* ditambahkan dan larutan tersebut ditunggu selama 30 menit. Setelah itu, absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum. Nilai absorbansi yang diperoleh akan digunakan dalam persamaan regresi linier untuk memperoleh kadar protein terlarut.

2.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak SOD Temu Hitam

Ekstrak kasar SOD temu hitam, konsentrasi presipitasi amonium sulfat, kontrol positif, dan kontrol negatif masing-masing ditambahkan 200 µl *WST Working Solution* dan 20 µl *Enzyme Working Solution*. Adapun komposisi larutan sampel serta blanko 1, 2, dan 3 pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi larutan sampel dan blanko

	Sampel (µl)	Blanko 1 (µl)	Blanko 2 (µl)	Blanko 3 (µl)
Larutan sampel	20		20	
ddH ₂ O		20		20
WST Working Solution	200	200	200	200
Enzyme Working Solution	20	20		
Larutan dapar			20	20

Menurut Qwele et al. [9]

Kemudian larutan sampel serta blanko 1, 2, dan 3 dimasukkan dalam *plate 96 well*. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Larutan tersebut lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan *microplate reader*. Aktivitas SOD tersebut dapat dihitung menggunakan persen inhibisi dengan rumus pada Persamaan 1.

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}}) - (A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko 2}})}{(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}})} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 1})$$

2.7 Analisis Hasil

Kadar protein dan aktivitas ekstrak SOD temu hitam dianalisis menggunakan SPSS versi

24 dengan metode *One-way ANOVA*. Syarat analisis dengan *One-way ANOVA* adalah data yang terdistribusi normal dan homogen. Nilai sig. > 0,05 pada uji normalitas dengan *Shapiro wilk* memiliki arti data tersebut terdistribusi normal. Kemudian nilai sig. > 0,05 pada uji homogenitas varian dengan *Leave test* memiliki arti data tersebut homogen. Analisis *One-way ANOVA* dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan signifikan pada data tersebut, adanya perbedaan signifikan ditunjukkan dari nilai sig. < 0,05, selanjutnya dilakukan uji *post-hoc* dengan metode *Tukey*.

3 Hasil dan Pembahasan

Determinasi tanaman menggunakan metode membandingkan spesimen dan gambar. Membandingkan spesimen dilakukan dengan cara membandingkan tanaman yang didapatkan

dengan awetan kering (*herbarium*), sedangkan membandingkan gambar dilakukan dengan cara membandingkan tanaman yang didapatkan dengan gambar atau ilustrasi. Kelemahan metode membandingkan gambar adalah pada sumber gambar yang digunakan sebagai pembandingan [10]. Berdasarkan surat No. KM.04.02/2/628/2022 tanggal 21 Maret 2022, sampel tersebut merupakan tanaman temu hitam. Hasil determinasi yang menggunakan tanaman segar tersebut merupakan spesies *Curcuma aeruginosa* Roxb. dengan famili Zingiberaceae.

Tanaman temu hitam diperoleh di daerah Pulisen, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Bagian temu hitam yang digunakan adalah bagian rimpangnya. Rimpang temu hitam yang diambil secara acak, tidak busuk maupun rusak, bebas penyakit, serta segar pada bulan Maret 2022. Umur pemanenan temu hitam dilakukan saat tanaman berusia 9 bulan setelah penanaman. Temu hitam pada penelitian ini dipanen saat usia 9 bulan karena di daerah Boyolali musim hujan dan musim kemaraunya tidak jelas.

Enzim SOD diperoleh dari rimpang temu hitam dengan cara mengeluarkan enzim dari jaringan pada tanaman tersebut secara mekanik (fisik), yaitu dengan cara di blender dan penambahan PBS pH 7,2 yang mengandung fosfat 0,02 M dan NaCl 0,15 M. Fosfat pada PBS berfungsi untuk mempertahankan konsentrasi larutan pada pH konstan, sedangkan NaCl berfungsi untuk membantu larutan PBS dalam mencuci sel [11]. Penambahan dapar pada proses ekstraksi bertujuan untuk mempertahankan kondisi komponen sel tetap optimum, seperti keadaan yang sebenarnya serta tidak mengalami suatu perubahan. PBS digunakan karena mempunyai sifat tidak mengganggu interaksi antara pengikatan protein dan tidak mengganggu kinerja enzim. Sebelum di blender, temu hitam dipotong kecil-kecil terlebih dahulu dengan tujuan mempermudah dalam proses pemblenderan. Proses pemblenderan dimaksudkan untuk memisahkan komponen dan kompartemen sel secara kasar sehingga dapat mempermudah dalam proses homogenisasi [12].

Proses pemblenderan rimpang temu hitam akan dihasilkan komponen sel, protein dan non-protein. Komponen protein yang terdapat di sel

tersebut dapat dipisahkan dengan komponen non-protein dengan cara disaring dan filtrat yang dihasilkan dari proses penyaringan, disentrifugasi dengan kecepatan serta waktu tertentu [13]. Sebelum disaring, temu hitam dibiarkan semalaman pada suhu 4°C setelah proses homogenisasi. Hal ini dilakukan untuk mengendapkan sisa-sisa serat temu hitam, sedangkan suhu 4°C bertujuan untuk mempertahankan agar enzim tidak rusak atau terdenaturasi [14].

Sentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit bertujuan untuk menghasilkan serat enzim yang pekat dan enzim tidak terdenaturasi serta untuk memisahkan supernatan yang diduga merupakan ekstrak kasar (*crude*) enzim dengan sisa-sisa serat pada rimpang temu hitam [15], [16]. Filtrat yang disentrifugasi akan menghasilkan dua bagian yang berbeda, yaitu endapan (*pelet*) yang merupakan pengotor (bukan enzim) serta supernatant yang diduga merupakan enzim. Endapan akan berada pada bagian bawah tabung sentrifus, dikarenakan endapan mempunyai berat jenis yang lebih besar daripada berat jenis dari enzim yang terkandung di dalam temu hitam. Berat jenis endapan yang lebih besar disebabkan oleh sel memiliki densitas yang lebih besar daripada molekul protein. Pada ekstraksi enzim SOD temu hitam didapatkan hasil supernatan sebanyak 139 mL dan pelet 16,891 gram dari 45 gram temu hitam dan PBS 150 mL.

Pemurnian parsial ekstrak SOD temu hitam dilakukan dengan metode presipitasi. Dari pemurnian parsial tersebut didapatkan data bobot pelet ekstrak enzim pada konsentrasi 25, 50, 75, dan 100%. Bobot pelet tersebut dapat dilihat pada tabel 2:

Tabel 2. Bobot pelet ekstrak kasar enzim hasil pemurnian parsial

Sampel (%)	Bobot (g)
Konsentrasi amonium sulfat 25	0,740
Konsentrasi amonium sulfat 50	1,511
Konsentrasi amonium sulfat 75	1,546
Konsentrasi amonium sulfat 100	2,300

Bobot pelet didapatkan dari protein yang mengendap pada pemurnian parsial. Semakin

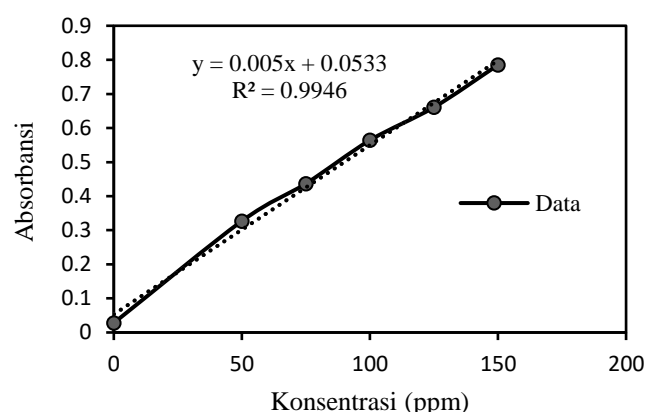
tinggi kadar amonium sulfat yang ditambahkan, maka semakin banyak protein yang mengendap. Pengendapan tersebut hanya mengurangi kelarutan protein dan tidak mendenaturasinya. Larutan amonium sulfat yang tersisa dapat dihilangkan dengan cara melarutkan kembali dalam dapar yang sesuai hingga didapatkan protein yang lebih murni [17].

Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan pada penelitian ini adalah 741,0 nm dengan *operating time* (OT) 40-45 menit. Panjang gelombang yang didapatkan hampir sama dengan panjang gelombang teoritis untuk uji kadar protein total enzim SOD [18]. Perbandingan yang digunakan adalah BSA dengan seri konsentrasi 0, 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm. Pembuatan larutan standar dengan berbagai seri konsentrasi bertujuan untuk menentukan kadar protein dalam suatu sampel dengan menggunakan persamaan regresi linear yang diperoleh dari grafik larutan standar. Kurva standar BSA tersebut diperoleh absorbansi yang menjadi sumbu y serta konsentrasi BSA yang menjadi sumbu x. BSA digunakan sebagai pembanding karena merupakan standar protein total yang diterima secara universal, dan menghasilkan kurva standar yang akurat [19].

Tabel 3. Hasil absorbansi konsentrasi larutan BSA sebagai pembanding

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0,028
50	0,327
75	0,437
100	0,564
125	0,661
150	0,785

Hasil kurva standar BSA pada gambar 1 menunjukkan bahwa kurva *slope* positif dengan nilai linieritas R^2 (koefisien korelasi) yaitu $r = 0,997$ mendekati angka 1. Nilai R^2 menunjukkan bahwa regresi tersebut linier. Persamaan regresi yang linier menunjukkan adanya korelasi yang sangat kuat antara absorbansi dengan konsentrasi.



Gambar 1. Kurva dan persamaan kalibrasi konsentrasi absorbansi BSA

Tabel 4. Kadar protein sampel dengan metode Lowry

Sampel	Kadar (1) mg/mL	Kadar (2) mg/mL	Kadar (3) mg/mL	Rata-rata ± SD
Ekstrak kasar	0,910	0,908	0,906	0,908 ± 0,002 ^{b,c,d,e}
Konsentrasi amonium sulfat				
Konsentrasi 25%	0,634	0,644	0,638	0,639 ± 0,005 ^{a,c,d,e}
Konsentrasi 50%	0,708	0,717	0,706	0,710 ± 0,005 ^{a,b,d,e}
Konsentrasi 75%	0,749	0,757	0,751	0,752 ± 0,004 ^{a,b,c,e}
Konsentrasi 100%	0,946	0,944	0,942	0,944 ± 0,002 ^{a,b,c,d}

Keterangan : (One-way ANOVA)

- a = berbeda signifikan dengan ekstrak kasar,
- b = berbeda signifikan dengan konsentrasi 25%,
- c = berbeda signifikan dengan konsentrasi 50%,
- d = berbeda signifikan dengan konsentrasi 75%,
- e = berbeda signifikan dengan konsentrasi 100%

Hasil kadar protein ekstrak kasar enzim SOD temu hitam dengan metode *Lowry* dapat dilihat pada tabel 4. Hasil yang tertinggi dan terendah diperoleh berturut-turut yaitu pelet konsentrasi amonium sulfat 100% dan 25%. Pelet konsentrasi amonium sulfat 100% memiliki kadar protein yang lebih tinggi karena merupakan konsentrasi amonium sulfat tertinggi. Konsentrasi amonium sulfat berpengaruh terhadap pengendapan protein. Semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan, maka semakin banyak protein yang mengendap. Protein yang mengendap semakin banyak menyebabkan kadar protein semakin tinggi [20]. Hasil SPSS menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan, semakin tinggi juga kadar protein totalnya. Hal ini dibuktikan antara ekstrak kasar dan konsentrasi amonium sulfat 100% nilainya berbeda signifikan.

Tabel 5. Nilai absorbansi blanko pada WST-1 assay

Blanko	Absorbansi
1	0,166
2	0,036
3	0,103

Larutan blanko digunakan sebagai pengoreksi absorbansi senyawa kimia yang akan diukur. Tabel 5 menunjukkan nilai absorbansi blanko 1, 2, dan 3. Nilai absorbansi berbeda-beda ini dikarenakan perbedaan komposisi masing-masing blanko. Masing-masing nilai yang diperoleh dan nilai absorbansi sampel kemudian dimasukkan dalam rumus.

Hasil uji aktivitas enzim SOD temu hitam ditunjukkan pada tabel 6. Kontrol positif pada pengujian ini menggunakan vitamin C, sedangkan kontrol negatifnya menggunakan PBS. Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif karena vitamin C mempunyai aktivitas

SOD, sedangkan PBS digunakan sebagai kontrol negatif karena PBS tidak mempunyai aktivitas SOD dan merupakan pelarut utama dalam pembuatan ekstrak di penelitian ini. Hasil pengujian aktivitas SOD pada kontrol positif dan negatif, ekstrak kasar, serta konsentrasi amonium sulfat 25, 50, 75, 100% mampu menghasilkan enzim SOD dengan hasil yang berbeda-beda. Aktivitas SOD terendah pada perlakuan sampel adalah pada konsentrasi amonium sulfat 25%. Sedangkan aktivitas SOD tertinggi pada perlakuan sampel adalah pada konsentrasi amonium sulfat 100% yang nilainya hampir mendekati dengan kontrol positif. Perbedaan nilai aktivitas SOD disebabkan oleh tingkat reduksi anion superoksida dengan aktivitas xantin oksidase (XO) berhubungan linier serta dihambat oleh SOD.

Tabel 6. Hasil uji aktivitas enzim SOD temu hitam

Sampel	%inhibisi (1) %	%inhibisi (2) %	%inhibisi (3) %	Rata-rata ± SD
Kontrol positif	87,302	90,476	88,889	88,889 ± 1,587 ^{b,d,e,f}
Kontrol negatif	1,587	0,000	3,175	1,587 ± 1,587 ^{a,c,d,e,f,g}
Ekstrak kasar	71,429	76,190	82,540	76,720 ± 5,574 ^{b,d}
Konsentrasi amonium sulfat				
Konsentrasi 25%	25,397	22,222	23,810	23,810 ± 1,587 ^{a,b,c,e,f,g}
Konsentrasi 50%	60,317	65,079	69,841	65,079 ± 4,762 ^{a,b,d,g}
Konsentrasi 75%	77,778	69,841	63,492	70,370 ± 7,158 ^{a,b,d,g}
Konsentrasi 100%	82,540	88,889	77,778	83,069 ± 5,574 ^{b,d,e,f}

Keterangan:

- a = berbeda signifikan dengan kontrol positif,
- b = berbeda signifikan dengan kontrol negatif,
- c = berbeda signifikan dengan ekstrak kasar,
- d = berbeda signifikan dengan konsentrasi 25%,
- e = berbeda signifikan dengan konsentrasi 50%,
- f = berbeda signifikan dengan konsentrasi 75%,
- g = berbeda signifikan dengan konsentrasi 100% (One-way ANOVA)

Hasil uji aktivitas SOD ekstrak kasar temu hitam menunjukkan bahwa besarnya aktivitas SOD dapat dilihat dari nilai absorbansi yang terendah. Uji aktivitas SOD berdasarkan nilai persen inhibisi dari terendah ke tertinggi adalah konsentrasi amonium sulfat 25, 50, 75%, ekstrak kasar, dan konsentrasi amonium sulfat 100%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar temu hitam memiliki aktivitas SOD serta memiliki hasil yang cukup baik pada konsentrasi amonium sulfat 100%. Hasil SPSS menunjukkan bahwa kontrol positif dan negatif, ekstrak kasar, serta presipitasi amonium sulfat

memiliki aktivitas SOD. Kontrol negatif aktivitas SOD didapatkan %inhibisi yang sangat lemah dengan nilai rata-rata sebesar 1,587 ± 1,587. Ekstrak kasar dan konsentrasi presipitasi amonium sulfat 100% memiliki nilai %inhibisi tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif, sehingga untuk konsentrasi amonium sulfat yang paling optimum adalah konsentrasi amonium sulfat 100%. Perbedaan yang tidak signifikan ini bermakna bahwa penggunaan kontrol positif dengan ekstrak kasar dan konsentrasi presipitasi ammonium sulfat 100%

tidak berbeda bermakna dalam menghambat radikal bebas pada perlakuan yang sama.

Hasil antara ekstrak kasar dan konsentrasi presipitasi amonium sulfat 50, 75, dan 100% tidak berbeda signifikan. Nilai tidak berbeda signifikan antara ekstrak kasar dan konsentrasi amonium sulfat ini dapat disebabkan karena pada penelitian ini menggunakan satu kali metode pemurnian, sedangkan pada penelitian aktivitas SOD lain menggunakan dua kali metode pemurnian, yaitu dengan penambahan amonium sulfat dan dialisis. Pada penelitian ini tidak dilakukan pemurnian lebih lanjut dikarenakan keterbatasan alat dan tempat penelitian. Namun, nilai rata-rata %inhibisi konsentrasi presipitasi amonium sulfat 25% sebesar $23,810 \pm 1,587$ berbeda signifikan dengan ekstrak kasar. Hal ini membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan maka akan semakin banyak protein yang diendapkan, sehingga semakin tinggi pula nilai %inhibisi yang diperoleh.

4 Kesimpulan

Nilai kadar protein total pada ekstrak kasar SOD sebesar 0,909 mg/mL dan presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75, 100% pada temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) secara berturut-turut adalah 0,639; 0,710; 0,752; dan 0,944 mg/mL. Nilai persen inhibisi ekstrak kasar SOD 76,720% dan presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75, 100% pada temu hitam secara berturut-turut adalah 23,810; 65,079; 70,370; dan 83,069%. Persen inhibisi yang optimum dari konsentrasi presipitasi amonium sulfat pada SOD adalah pada konsentrasi amonium sulfat 100%.

5 Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Universitas Setia Budi yang telah mendukung penelitian ini.

6 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

7 Daftar Pustaka

- [1] Irianti, T. T., Kuswandi, Nuranto, S., dan Purwanto. 2021. *Antioksidan dan Kesehatan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- [2] Yuslianti, E. R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Deepublish. Yogyakarta.
- [3] Sikka, S. C. 2004. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of Andrology*, 25(1): 5–18. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x>.
- [4] Wahyuningsih, K. A. 2011. Astaxanthin Memberikan Efek Proteksi Terhadap Photoaging. *Damianus Journal of Medicine*, 10(3): 149–160.
- [5] Younus, H. 2018. Therapeutic Potentials of Superoxide Dismutase. *International Journal of Health Sciences*, 12(3): 88–93.
- [6] Moon-ai, W., Niyomploy, P., Boonsombat, R., Sangvanich, P., dan Karnchanatat, A. 2012. A Superoxide Dismutase Purified from the Rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb. as Inhibitor of Nitric Oxide Production in The Macrophage-Like RAW 264.7 Cell Line. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8): 2138–2155. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9640-9>.
- [7] Jeane, M., Asih, I. A. R. A., dan Bogoriani, N. W. 2018. Asupan Glikosida Flavonoid Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.) Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase dan Kadar. *Jurnal Media Sains*, 2(1): 32–36.
- [8] Qwele, K., Hugo, A., Oyedemi, S. O., Moyo, B., Masika, P. J., dan Muchenje, V. 2013. Chemical Composition, Fatty Acid Content and Antioxidant Potential of Meat from Goats Supplemented with Moringa (*Moringa oleifera*) Leaves, Sunflower Cake and Grass Hay. *Meat Science*, 93(3): 455–462. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.009>.
- [9] Simpson, M. G. 2006. *Plant Systematics*. Elsevier Academic Press. California.
- [10] Sultan, S. M., De Planque, M. R. R., Ashburn, P., dan Chong, H. M. H. 2017. Effect of Phosphate Buffered Saline Solutions on Top-Down Fabricated ZnO Nanowire Field Effect Transistor. In S. Singh (Ed.), *Journal of Nanomaterials*. Hindawi. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/5413705>.
- [11] Arjita, I. P. D. 2009. Analisis Protein Jaringan Otak Sapi dengan Metode Isolasi, Purifikasi dan Visualisasi. *Ganeç Swara*, 3(2): 55–58.
- [12] Puspitasari, O., dan Wuryanti, W. 2010. Isolasi Enzim *L-Asparaginase* dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dan Uji Potensi terhadap Kultur Sel Leukemia Tipe K562. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 13(2): 61–65. DOI: <https://doi.org/10.14710/jksa.13.2.61-65>.

- [13] Anna, R., Evy, Y., dan Eli, R. 2013. Eksplorasi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi sebagai Penghasil Enzim Ekstraseluler. In *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9): 1689–1699.
- [14] Prastanto, H., Falaah, A. F., dan Maspanger, D. R. 2014. Pemekatan Lateks Kebun secara Cepat dengan Proses Sentrifugasi Putaran Rendah. *Jurnal Penelitian Karet*, 32(2): 181–188. DOI: <https://doi.org/10.22302/ppk.jpk.v32i2.163>.
- [15] Masruroh, H., Masruroh, U. D., Nugraheni, F. S., dan Paramita, V. 2018. Analisa Kadar Lemak dalam Susu Perah Sapi Menggunakan Gaya Sentrifugasi. *Metana*, 14(1): 25–30. DOI: <https://doi.org/10.14710/metana.v14i1.19172>.
- [16] Wingfield, P. 2016. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 34(1): A-3F. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>.
- [17] Ifemeje, J., Udedi, S., Okechukwu, A., Nwaka, A., Lukong, C., Anene, I., Egbuna, C., dan Ezeude, I. 2015. Determination of Total Protein, Superoxide Dismutase, Catalase Activity and Lipid Peroxidation in Soil Macro-fauna (Earthworm) from Onitsha Municipal Open Waste Dump. *Journal of Scientific Research and Reports*, 6(5): 394–403. DOI: <https://doi.org/10.9734/jsrr/2015/12552>.
- [18] Walker, J. M. 2002. *The Protein Protocols Handbook*. Second Edition. Humana Press. New Jersey.
- [19] Righetti, P. G., dan Boschetti, E. 2013. *Low-Abundance Proteome Discovery*. Elsevier Academic Press. California.
- [20] Krishna, G. 2012. *Livestock Nutrition: Analytical Techniques*. New India Publishing Agency. New Delhi.