Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dari Bakteri Endofit Daun Tanaman Sukun (*Artocarpus altilis*) dengan Metode Water Soluble Tetrazolium Salt-1 (Wst-1)

Chossy Fradine[1]*, Destik Wulandari[2], Desi Purwaningsih[3]
[1,3]Fakultas Farmasi/Program Studi D3 Anafarma, Universitas Setia Budi Surakarta
[2]Fakultas Kedokteran Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jakarta
chosy.fradini@gmail.com

ABSTRACT

Endophytic bacteria are bacteria that carry out symbiosis with host plants without causing disease without the host plant. Some endophytic bacteria found in plants are able to produce potential compounds as antioxidants by producing the enzyme SOD (Super Oxide Dismutase). This research aims to determine the results of endophytic bacterial fermentation from the leaves of the breadfruit plant (Artocarpus altilis). This research began with the identification of endophytic bacteria, then continued with the extraction of the SOD enzyme by adding PBS and centrifuging. Purification of the SOD enzyme was carried out using the ammonium sulfate precipitation method. Determination of total protein content using the Lowry method. SOD activity was measured by measuring the percent inhibition value using the Superoxide Dismutase Activity Assay Kit WST-1. The results of the research showed that the isolated bacteria had morphological characteristics in sequence from colony shape, color, size, elevation, edges, cell shape and Gram type for AL 4 bacteria Filamentous, white, medium, flat, Rhizoid, coccus, Gram +, citrate -, Catalase -, for IL11 bacteria Irregular, white, large, flat, entire, bacilli, and Gram +, citrate +, Catalase +. The extraction results from the crude extract produced a sediment weight of 2,915 g for AL4 and 1,653 g for IL11. The total protein content of the crude extract and 30% ammonium sulfate precipitation for isolate AL4 was 1.74 mg/mL and IL11 1.79 mg/ml. Then the percent inhibition value for isolate AL4 with a concentration of 20% was 64.02% and a concentration of 80% was 71.43%.

Keywords: *Artocarpus altilis*, *Endophytes, SOD,* WST 1

ABSTRAK

Bakteri endofit adalah bakteri yang melaksanakan simbiosis dengan tanaman inang dan tidak menimbulkan penyakit tanpa tanaman inang. Sejumlah bakteri endofitik yang ditemukan di tumbuhan bisa menghasilkan senyawa potensial untuk antioksidan dengan menghasilkan enzim SOD (*Super Oksida dismutase*). Penelitian memiliki tujuan untuk memahami hasil fermentasi bakteri endofit dari daun tanaman sukun (*Artocarpus altilis*). Penelitian ini diawali dengan identifikasi bakteri endofit, lalu dilanjutkan dengan ekstraksi enzim SOD dilaksanakan dengan menambah disentifugasi maupun PBS. Pemurnian enzim SOD dilaksanakan menggunakan metode presipitasi ammonium sulfat. Penentuan kadar protein total mempergunakan metode Lowry. Pengukuran aktivitas SOD dilaksanakan dengan pengukuran nilai persen inhibisi menggunakan *Superoksida Dismutase Activity Assay Kit WST-1.* Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang diisolasi memiliki ciri morfologi berurut-urut dari bentuk koloni, warna, ukuran, elevasi, tepian, bentuk sel dan jenis Gramnya untuk bakteri AL 4 Filamentous, putih, sedang, flat, Rhizoid, coccus, Gram +, citrate -, Katalase -, untuk bakteri IL11 Irreguler, putih, besar, flat, entire, basil, dan Gram +, citrate +, Katalase +. Hasil ektraksi dari ekstrak kasar menghasilkan berat endapan seberat AL4 2.915 g dan IL11 1.653 g kadar protein total ekstrak kasar maupun presipitasi amonium sulfat 30% untuk isolate AL4 adalah sebesar 1.74 mg/ mL dan IL11 1.79 mg/ml. Kemudian nilai persen inhibisinya untuk isolate AL4 dengan konsentrasi 20% adalah 64.02 % dan konsentrsi 80% sebesar 71.43%.

Kata kunci: *Artocarpus altilis*, Endofit, SOD, WST 1

PENDAHULUAN

Tubuh manusia memiliki kandungan molekul oksigen yang stabil maupun tidak stabil. Molekul oksigen yang stabil penting guna melakukan pemeliharaan kehidupan sel, sementara molekul oksigen yang tidak stabil seringkali disebut radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul yang mempunyai satu ataupun lebih elektron tidak berpasangan. Radikal bebas ini dibentuk lewat dua acara, yakni secara eksogen maupun endogen. Radikal bebas endogen dibentuk yang merupakan respon normal dari rantai peristiwa di dalam tubuh. Radikal bebas endogen bisa dibentuk dari sisa metabolism protein, lemak, karbohidrat dalam mitokondria, kondisi iskemia maupun proses inflamasi. Radikal bebas endogen dibentuk sebagai respon normal dari rantai peristiwa dalam tubuh. Radikal bebas endogen dapat terbentuk dari sisa metabolisme protein, karbohidrat, dan lemak pada mitokondria, proses inflamasi, dan pada kondisi iskemia. Radikal bebas eksogen didapatkan dari polusi, makanan, dan injeksi. Hal itu membuktikan bahwa terbentuknya radikal bebas dalam tubuh sangatlah mungkin, dan untuk menghambat efek lain yang ditimbulkan oleh radikal bebas maka proses jumlah radikal bebas di dalam tubuh perlu dikurangi. Cara guna menghilangkan radikal bebas salah satunya yakni memberikan antioksidan. Salah satunya adalah antioksidan endogen, seperti superoksida dismutase (SOD)(Novarini *et al*., 2022).

SOD sendiri dapat diisolasi dari berbagai macam mahluk hidup tumbuhan, mikroba (Mandasari *et al*., 2025). Mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan diharapakan juga mampu memiliki kemampuan yang sama dengan tanaman inangnya (Wulandari & Purwaningsih, 2019). Kelebihan lain yang dimiliki oleh bakteri endofit adalah, mudah diperbanyak, dan tidak memerlukan tanaman yang banyak untuk proses ekstraksinya.

Bakteri endofit adalah bakteri yang melaksanakan simbiosis dengan tanaman inang, bakteri ini hidup dalam jaringan tanaman inang dan tidak memunculkan penyakit atau kerusakan pada tanaman inang. Bakteri ini memiliki sifat fakulatif ataupun obligat untuk mengkolonisasi inang, sehingga pada umumnya satu tanaman ditemukan sejumlah spesies ataupun genus bakteri endofit (Bhore *et al*. 2010), namun adapula bakteri endofit yang hanya mampu bersimbiosis pada tanaman inang tertentu. Bakteri endofitik memperoleh nutrisi melalui hasil metabolism tanaman sementara tanaman memperoleh senyawa aktif dan derivat nutrisi yang dibutuhkan sepanjang hidupnya (Linda *et al*., 2024).

Bakteri endofit suatu tanaman dapat menghasilkan produk yang berpotensi untuk antioksidan, antibakteri, antifungi, maupun anti malaria. Peneltian Rizka (2021), menyatakan bakteri endofit dari tanaman *Psidium guajava* L memiliki aktivitas antioksidan. Kuntari *et. al* (2017) juga menyatakan bahwa bakteri endofit dari akar tanaman *Moringa oleifera* L menghasilkan senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan. Bakteri endofit mempunyai potensi dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder diduga diakibatkan oleh transfer genetik dari tanaman inang ke dalam bakteri endofit yang mempunyai aktivitas biologi yang sama dengan metabolit sekunder yang diproduksi inang (Tan *et.al*. 2001). Penelitian Utami, (2015) membuktikan ekstrak daun sukun mempunyai aktivitas antioksidan, dengan aktivitas tertinggi sebesar 77.4%. Penggunaan ekstrak memiliki beberapa kekurangan diantaranya adalah dibutuhkan bahan baku yang banyak untuk mendapatkan ekstrak dari daun sukun. Bakteri endofit digunakan sebagai alternatif penganti penggunaan ekstrak tanaman. Hubungan diantara bakteri endofit dengan tanaman inangnya adalah suatu bentuk simbiosis mutualisme yang saling memberikan keuntungan (Kurnia *et al*., 2014).

Indonesia adalah negara yang kaya dengan beberapa macam jenis flora yang tumbuh di dalamnya. Sukun adalah jenis tanaman yang mempunyai manfaat banyak termasuk bagi pengobatan. Menurut Subiyandono (2018), ekstrak daun sukun

memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian lain yang dilaksanakan Misfadillah (2019), membuktikan fraksi n-heksan, ekstrak metanol, fraksi etil asetat maupun fraksi air daun sukun memiliki aktivitas antioksidan bernilai IC_{50} berurutan sebanyak 2511,29; 471,34; 4182,14 dan 2869,72 μg/mL.

Metode WST-1 merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui secara tidak langsung kemampuan proliferasi sel. Metode WST-1 bila dibandingkan dengan metode MTT, metode WST-1 lebih mudah, akurat, serta sensitif. WST-1 memiliki keunggulan diantaranya mudah digunakan, aman, memiliki reproduktifitas tinggi, indikator merah fenol dalam kultur sel, tidak mengganggu reaksi pewarna pada media. Karena zat warna yang dihasilkan pada akhir percobaan bersifat larut dalam air, maka tidak diperlukan pelarut dan penambahan waktu inkubasi.

Penelitian ini merupakan penelitian dasar mengenai isolasi enzim SOD dari bakteri endofit. Karena data awal yang dihasilkan masih berupa data aktivitas antioksidan dari protein total yang dihasilkan oleh bakteri endofit. Data yang bagus akan membuktikan bahwa penelitian ini dapat dilanjutkan ke tahapan pemurnian protein bahkan sampai formulasi.

METODOLOGI

Identifikasi Endofit

Dilakukan dengan cara uji pewarnaan Gram. Bakteri endofit diambil satu sampai dua ose dicampurkan merata dengan 1 tetes aquadest kemudian difiksasi dengan lampu Bunsen. Preparat ditetesi larutan crystal violet (Gram A), diamkan selama satu menit, dibilas menggunakan air mengalir kemudian dikeringkan. Selanjutnya preparat ditetesi dengan lugol iodin diamkan 1 menit, kemudian dibilas menggunakan alcohol selama tiga puluh detik. Setelah dicuci dengan air mengalir, preparate ditetesi larutan safranin didiamkan selama satu menit. Preparat dicuci menggunakan air mengalir kemudian dikeringkan dan diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1000X. Uji biokimia yang dilaksanakan yaitu uji katalase, koagulase. Uji katalase dilaksanakan dengan Larutan H_2O_2 3% diteteskan diatas objek glass, mengambil 1 ose bakteri uji dalam media kemudian diratakan pada objek glass. Lalu bakteri yang memiliki katalase positif dilaksanakan uji koagulase (Toelle, 2014). Uji koagulase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim. Larutan plasma sitrat diteteskan 1 tetes diatas objek glass kemudian ditambah 1 ose bakteri endofit. Amati dibawah mikroskop dengan melihat ada/tidaknya penggumpalan yang menunjukan hasil positif (Elvira *et al*., 2017).

Proses Fermentasi

Isolat bakteri endofit bertujuan menghasilkan senyawa bioaktif yang akan dipakai sebagai bahan uji antibakteri. Fermentasi isolat murni dilakukan dengan menumbuhkan satu ose bakteri dalam BHI dan kekeruhannya dibandingkan Mc. farland setara dengan $1x10^8$ CFU/ml. Kemudian ambil 1 ml dilakukan dengan menumbuhkan pada medium BHI sejumlah 14 ml di dalam Erlenmeyer steril. Inkubasi dilaksanakan selama 72 jam pada alat shaker dengan kecepatan 1500 rpm agar didapatkan suspensi bakteri endofit.

Proses Ekstraksi

Setelah diinkubasi, hasil fermentasi diambil sejumlah 4 ml serta disentifugasi dalam kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 4^{o}C, selama 10 menit (Iramadhan, 2018; Masfufah *et al*., 2019). Supernatan yang digunakan sebagai uji selanjutnya untuk pemurnian protein dengan amonium sulfat 30%.

Uji Aktivitas Antioksidan

Penyiapan WST *working solution*. Larutan WST sejumlah satu mililiter diencerkan dengan sembilan belas mililiter larutan dapar *assay*. Larutan tersebut akan stabil hingga dua bulan bila disimpan dalam suhu 4^{o}C (Pertiwi, 2019; Qwele *et al*., 2013). Penyiapan *enzyme working solution***.** Larutan enzim disentrifugasi selama lima detik. Setelah itu, larutan diambil mempergunakan pipet.

Kemudian larutan enzim diencerkan sejumlah 15 µl dengan 2,5 ml larutan dapar (Qwele *et al.*, 2013). Pembuatan kontrol negatif beserta positif. Vitamin C sebanyak 50 mg dilarutkan dalam dapar fosfat salin sebanyak 5 ml untuk membuat larutan vitamin C 10.000 ppm yang digunakan sebagai kontrol positif (Rafat *et al*., 2014). Kemudian dapar fosfat salin sebanyak 20 µl digunakan sebagai kontrol negatif.

Penyiapan sampel uji

Ekstrak kasar SOD endofit daun sukun kontrol positif, konsentrasi presipitasi amonium sulfat, kontrol negatif masing-masingnya ditambah 200 µl WST *Working Solution* beserta 20 µl *Enzyme Working Solution*. Komposisi larutan sampel, blanko 1, blanko 2, serta blanko 3 adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi larutan sampel dan blanko

	Sampel (µl)	**Blanko 1 (µl)**	**Blanko 2 (µl)**	**Blanko 3 (µl)**
Larutan sampel	20		20	
ddH2O		20		20
WST *Working Solution*	200	200	200	200
Enzyme Working Solution	20	20		
Larutan dapar			20	20

Menurut Qwele *et al.* (2013).

Selanjutnya larutan sampel, blanko 1, blanko 2, blanko 3 dimasukkan ke plate 48 well. Sesudah itu, dilakukan inkubasi dengan suhu 37^{o}C selama dua puluh menit. Larutan itu kemudian absorbansi dibaca dalam panjang gelombang 450 nm mempergunakan microplate reader (Qwele *et al.,* 2013).

Analisis Data

Aktivitas SOD bisa dilakukan penghitungan mempergunakan persen inhibisi, yang rumusnya adalah sebagai berikut:

$$\%\ \boldsymbol{Inhibisi} = \frac{(\boldsymbol{A\ blanko1} - \boldsymbol{A\ blanko3}) - (\boldsymbol{Asampel} - \boldsymbol{Ablanko2})}{(\boldsymbol{Ablanko1} - \boldsymbol{Ablanko3})}\ \boldsymbol{x}\ 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Bakteri Endofit

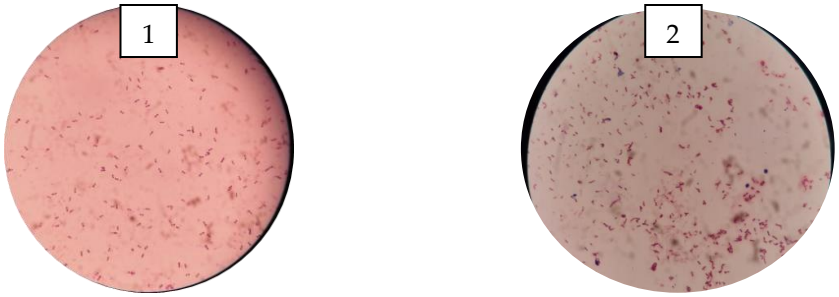
Identifikasi dilakukan melalui pengamatan penampakan ciri morfologi dan fisiologi dari bakteri endofit yang sudah ditanam pada media Nutrien Agar (NA). Berdasarkan Tabel 2, pengamatan morfologi isolat bakteri endofit, terdapat perbedaan pada bentuk koloni, warna, ukuran, elevasi, dan juga tepian, serta terdapat perbedaan pada bentuk sel bakteri setelah dilakukan pewarnaan Gram yang terlihat pada Gambar 1. Perbedaan hasil pengamatan morfologi tersebut memungkinkan bahwa kedua bakteri endofit berasal dari spesies yang berbeda.

Identifikasi secara makroskopis pada bakteri endofit yaitu mempergunakan pewarnaan gram, tujuannya membedakan bakteri berdasar sifat gram negatif atau positif. Bakteri dengan sifar Gram positif yang ditandai dengan sel berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif ditandai dengan warna merah. Pewarnaan Gram mempergunakan empat macam cat warna yaitu Gram A yang memiliki fungsi menjadi cat utama, Gram B yang memiliki fungsi untuk mordant, Gram C yang memiliki fungsi untuk pelarut, Gram D memiliki fungsi untuk cat penutup. Berlandaskan hasil penelitian didapatkan hasil bila bakteri endofit bersifat Gram positif sebab sel memiliki warna ungu sesudah dilaksanakan pewarnaan, sel dengan bentuk batang yang berkoloni menyerupai rantai adalah dengan menggunakan pewarnaan Gram. Tujuan dari pewarnaan Gram (Gambar 1). Sifat Gram bakteri sangatlah memiliki hubungan kuat dengan sifat kimia dan fisik dinding sel sebuah bakteri. Karakteristik bakteri Gram Positif yakni memiliki kandungan peptidoglikan yang

tebal sementara bakteri Gram Negatif memiliki kandungan lipid tebal dalam dinding sel. Perbedaan struktur dinding sel ini menjadikan bakteri Gram Positif memiliki afinitas tinggi pada Kristal violet sementara bakteri Gram memiliki afinitas tinggi pada Kristal violet sementara bakteri Gram negatif memiliki afinitas rendah (Wulandari & Purwaningsih, 2019). Bakteri Gram positif bisa menciptakan komplek diantara kristal violet-lugol, kemudian saat ditambahkan dengan pelarut yang berisikan alkohol akan menjadikan sel terjadi dehidrasi yang menyebabkan menciutnya pori-pori dan penurunan daya serap dinding sel kemudian komplek kristal violet-lugol tidak bisa keluar dari sel diakibatkan sel tetaplah berwarna ungu.

Tabel 2. Hasil Uji Morfologi Bakteri Endofit

Kode Isolat	Morfologi koloni					Morfologi Sel	
	Bentuk	**Warna**	**Ukuran**	**Elevasi**	**Tepian**	**Bentuk**	**Gram**
LA 4A	Filamentous	Putih	Sedang	Flat	Rhizoid	Coccus	+
IL11A	Irregular	Putih	Besar	Flat	Entire	Basil	+



Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram: (1) isolat AL 4, (2) Isolat IL 11

Uji biokimia bakteri berhubungan dengan proses metabolisme sel bakteri, sehingga dipahami potensi sebuah bakteri dalam mempergunakan senyawa untuk sumber energi dalam pertumbuhan, hasil dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 2. Berdasarkan uji SIM (*Sulfide Indol Motility*), semua isolat menunjukkan negatif sulfide, hal tersebut membuktikan isolat tidak bisa menghidrolisis logam berat yang ada pada media, yang ditandai dengan tidak adanya prespitat berwarna hitam. Semua isolat juga membuktikan hasil negatif indol, ditandai dengan tidak munculnya cincin merah di permukaan media yang artinya bahwa isolat bakteri endofit tersebut tidak bisa mempergunakan asam amino untuk sumber energi yang salah satunya adalah asam amino triptofan, yang akan dihidrolisi oleh enzim triptofanase serta menghasilkan asam pirunat, indol, maupun ammnia. Pada uji KIA (*Kliger's Iron Agar*) isolat bakteri endofit menunjukkan hasil K/K yang memiliki arti lereng maupun dasar media memiliki warna merah, berarti isolate bakteri endofit tersebut tidak dapat memfermentasi karbohidrat sehingga tidak adanya perubahan warna merah menjadi warna kuning. Berdasarkan uji LIA (*Lysin Iron Agar*), semua isolat bakteri endofit membuktikan hasil K/K yang berarti dasar maupun lereng media tetap berwarna ungu, tidak adanya perubahan warna, yang berarti bahwa isolat bakteri endofit tersebut mampu mendekarboksilasi asam amino lisin (Haryati dan Chainulfiffah, 2013). Pada uji citrat yang membuktikan hasil positif yakni pada isolat IL11. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat mempergunakan sitrat, dengan demikian asam dihilangkan dari media biakan, kemudian pH dapat meningkat maupun memberikan perubahan warna media dari hijau ke biru (Pattuju, 2014). Sedangkan, pada AL 4 menunjukkan hasil negatif yang berarti bahwa media tetap berwarna hijau, tidak adanya perubahan warna. Hal tersebut

membuktikan isolat bakteri endofit tidak mempergunakan sitrat untuk sumber karbon.

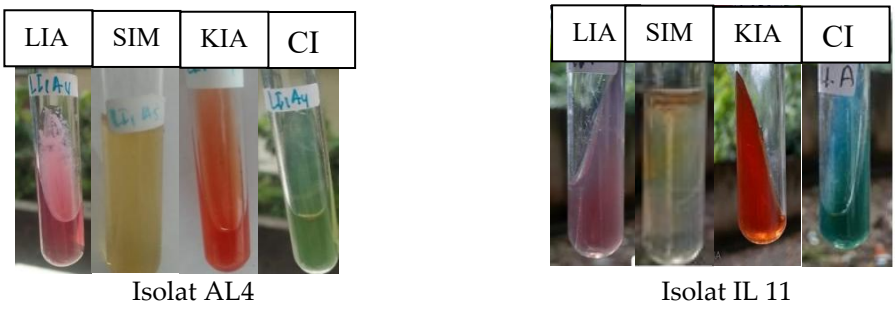
Berdasarkan uji katalase, isolat AL4 bakteri endofit menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terdapatnya gelembung udara sesudah ditetesi larutan H_2O_2 3%. Hal tersebut membuktikan isolat bakteri endofit mampu menghasilkan enzim katalase. Gelembung tersebut dikarenakan adanya penguraian H_2O_2 menjadi air dan oksigen oleh aktivitas enzim katalase yang dihasilkan melalui isolat bakteri tersebut (Fevria & Hartanto, 2020), (Pratiwi, 2015).

Pada uji koagulase semua isolat membuktikan hasil negatif, hal tersebut memperlihatkan tidak adanya penggumpalan yang berarti bahwa isolat bakteri endofit tersebut tidak adanya enzim koagulase guna menggumpalkan fibrinogen didalam plasma (Rochana *et al*., 2023).

Tabel 3. Hasil Uji Biokimia

Biokimia	SIM	KIA	LIA	Citrat	Katalase	Koagulase
AL 4	---	K/K	K/K	-	-	-
IL11	---	K/K	K/K	+	+	-

K/K: pada lereng dan dasar media berwarna merah



Isolat AL4 Isolat IL 11

Gambar 2. Hasil Uji Biokimia menggunakan media SIM (*Sulfide Indol Motil*), KIA (*Klinger Iron Agar*), LIA (*Lysin Iron Agar*), Citrat

Ekstraksi Enzim Isolat Bakteri

Ekstraksi enzim bertujuan untuk mengeluarkan enzim yang terdapat pada bakteri dan memisahkan sel-sel jaringan maupun senyawa pengotor yang bersumber dari media pertumbuhan. Enzim dapat diekstraksi dari dalam sel, dinding sel, ataupun dieskresikan ke media (Hoffman *et al*., 2000). Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang disekresi ke luar sel melewati membran sel dan bekerja di luar sel. Pada proses ekstraksi ini tdak dilakukan pemecahan sel, karena enzim yang akan diisolasi merupakan enzim ekstraseluler. Proses ekstraksi dilakukan pemisahan antara protein dengan pengotor sel dengan dilakaukan dengan sentrifuse. Hasil sentrifugasi berupa supernatan (crude enzyme) dan endapan. Supernatan yang didapatkan memiliki kandungan makromolekul lainnya yang asalnya dari media ekstraksi kemudian dinamakan dengan crude enzyme. Supernatan digunakan untuk pemurnian ekstrak kasar enzim dan menentukan aktivitas enzim. Hasil ekstraksi enzim biasanya terdapat campuran dari beberapa enzim dan kemungkinan berisi senyawa-senyawa yang bukan enzim, maka perlu dilakukan pemurnian enzim sehingga menghasilkan produk murni yang hanya terdapat enzim yang akan diuji. Enzim yang sudah dimurnikan aktivitasnya bisa dipelajari secara in vitro. Hasil dari ekstraksi enzim isolat bakteri endofit diperoleh supernatan dan endapan dari bakteri endofit, sesuai dengan Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Hasil ektraksi enzim dari bakteri endofit

Sampel	Berat Endapan (mg)	
	Ekstrak	Pemurnian
AL4	2,915	1,072
IL11	1,653	1,029

Pemurnian Enzim Isolat Bakteri

Tujuan dari pemurnian enzim yaitu guna melakukan pemisahan enzim yang diinginkan dengan senyawa yang tidak diinginkan. Pemurnian sel yaitu pemisahan sel pengambilan kandungan sitoplasma dan organel sel dengan menghancurkan membran sel, serta pemisahan organel sel dengan molekulnya (Fatchiyah, 2011). Pemurnian yang dipergunakan dalam penelitian yakni garam ammonium sulfat, adalah garam yang efektif karena mengandung anion yang mengandung sulfat, fosfat, dan sitrat. Ammonium sulfat sering dipilih pada proses pemurnian protein karena kelarutan dalam air yang tinggi, harga terjangkau, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, daya pengendapan efektif, stabil, dan bisa dipergunakan dalam beberapa pH (Bimantara *et al.*, 2022). Garam amonium sulfat adalah garam yang bisanya dipergunakan untuk metode pemekatan dan pemurnian enzim, karena ammonium sulfat memiliki kelarutan tinggi, terjangkau, toksisitas yang rendah pada sebagian banyak enzim, dan memiliki efek membuat stabil sejumlah enzim. Penambahan garam amonium sulfat harus dalam konsentrasi yang tinggi, dikarenakan konsentrasi garam rendah akan menaikkan kelarutan protein sebab ion mengalami interaksi dengan gugus bermuatan dalam permukaan protein serta mengganggu dengan kekuatan elektrostatik kuat (salting in) (Metzler, 2003) (Jiang *et al*., 2021). Penambahan garam dengan konsentrasi tinggi akan menjadikan molekul air yang awalnya terikat dalam permukaan hidrofobik protein akan berikatan dengan garam. Bertambah banyaknya molekul air yang berikatan dengan ion garam akan memberikan akibat protein tersebut saling melakukan interaksi, mengendap, maupun teragregrasi (Triana, 2013).

Pemurnian menggunakan ammonium sulfat mempunyai kelemahan yaitu kurang spesifik dalam memurnikan enzim yang diinginkan karena ammonium sulfat mempunyai fungsi mengendapkan protein, seluruh protein yang telah larut tidak dapat diendapkan, dan jika mengandung logam akan merusak enzim (Dewi, 2008). Pada beberapa protein memiliki kelarutan dalam konsentrasi ammonium sulfat yang tidak sama. Pengendapan menggunakan ammonium sulfat bisa dilaksanakan dalam konsentrasi 30-70% (Vijayaraghavan dan Vincent, 2014). Pengendapan protein semakin baik dengan semakin tinggi konsentrasi ammonium sulfat yang ditambahkan, tetapi pengendapan dengan ammonium sulfat mempunyai titik kejenuhan. Berdasarkan Soares *et al.*, (2010), konsentrasi pengendapan ammonium sulfat dari ekstrak kasar terbaik dalam konsentrasi 40%, pengendapan protein semakin berkurang pada konsentrasi 60-100% karena larutan protein terjadi titik kejenuhan. Adapun penelitian yang dilakukan Nurulhanis dan Haryati (2012) dengan pemurnian enzim fibrinolitik *Bacillus* sp. yang diisolasi dari Budu pada konsentrasi 40% dan 50% aktivitas enzim fibrinolitik meningkat. Konsentrasi ammonium sulfat 40% menghasilkan aktivitas enzim tertinggi yaitu 1,803 U/mg.

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi ammonium sulfat 30% untuk mengendapkan enzim SOD. Sebanyak 30% ammonium sulfat ditambahkan sedikit demi sedikit kedalam ekstrak kasar enzim dengan diaduk menggunakan magnetic stirrer. Pengadukan dilaksanakan secara perlahan pada kecepatan 200 rpm.

Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Kadar protein dari setiap sampel berbeda-beda sehingga pengukuran kadar protein sangat dibutuhkan. Pengukuran kadar protein dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan cara penembakan sampel. Penetapan kadar protein dilaksanakan

menggunakan spektrofotometer UV-Vis dalam jenjang gelombang maksimum diantara 400-800 nm. Ketika penelitian, panjangnya gelombang serapan maksimum optimasi yang dipergunakan yaitu 750 nm. Pembanding yang dipergunakan merupakan Bovine Serum Albumine (BSA) dengan seri konsentrasi 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; dan 2 mg/mL. Pengukuran kadar protein sampel dapat diketahui dengan pembuatan kurva standar larutan BSA (Bovine Serum Albumine).

Berdasarkan tabel 5. kadar ekstrak enzim isolat bakteri IL 11A lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak enzim AL 4A. Rendahnya kadar protein pada endapan pemurnian enzim menunjukkan bahwa terdapat protein yang terbuang ketika proses pemurnian. Selama penelitian ini, suhu lingkungan ketika pemurnian enzim sulit dikendalikan sehingga konsentrasi protein menjadi rendah, sesuai dengan hasil penelitia terdahulu yang menemukan bahwa semakin tinggi konsentrasi ammonium sulfat maka protein yang dapat diendapkan akan semakin tinggi pula. Rendahnya konsentrasi pemurnian protein juga dapat disebabkan belum optimalnya penambahan kadar ammonium sulfat (Novarini *et al.,* 2022). Kadar protein total yang berbeda-beda salah satunya dikarenakan dari kedua isolate tersebut kemungkinan berasal dari spesies mikroba yang berbeda, hal itu dibuktikan dari hasil uji identifikasi yang berbeda pula. Spesies yang berbeda sangat dimungkinkan sekali memiliki protein yang berbeda pula.

Tabel 5. Hasil pengukuran kadar protein ekstrak enzim isolat bakteri laut dengan metode Lowry

Sampel	Kadar protein(mg/mL)
AL 4A	1,74
IL 11A	2,09

Uji Aktivitas Enzim SOD Bakteri Endofit

Penetapan kadar protein pada penelitian ini menggunakan metode WST-1. Penelitian ini diawali dengan mencari nilai absorbansi larutan blanko untuk dimasukkan kedalam rumus persen inhibisi. Larutan blanko merupakan larutan yang mengandung sedikit atau tidak ada analit yang digunakan, biasanya blanko digunakan untuk mengkalibrasi instrumen (Krishna, 2012).

Tabel 5. Hasil uji aktivitas enzim SOD

Sampel	inhibisi% 1	inhibisi % 2	inhibisi % 3	Rata-rata
Kontrol (+)	87,30	90,48	88,89	88.89
Kontrol (-)	1,59	0,000	3,18	1.59
Konsentrasi 20% AL4	68.25	63.49	60.32	64.02
Konsentrasi 80% AL4	74.60	71.43	68.25	71.43

Kontrol positif dalam uji ini mempergunakan vitamin C, sementara kontrol negatif mempergunakan PBS. Vitamin C dipakai untuk kontrol positif dikarenakan vitamin C me, sedangkan kontrol negatifnya fungsidari enzim SOD, sementara PBS dipakai untuk kontrol negatif sebab PBS tidak memiliki aktivitas SOD dan sebagai pelarut utama untuk membuat ekstrak dalam penelitian. Berdasarkan table 5, diketahui bahwa hasil uji aktivitas SOD dalam kontrol negatif dan positif, ekstrak enzim SOD menunjukkan hasil yang bervariasi, hal ini dikarena jumlah ekstrak enzim yang digunakan juga berbeda yaitu 20% dan 80%, semakin banyak ekstrak enzim yang digunakan maka semakin tinggi juga aktivitas enzim SOD hal itu dibuktikan dari nilai % inhibisi konsentrasi ekstrak 80% yaitu 71.43% sedang konsentrasi ekstrak 20% sebesar 64.02%. Perbedaan nilai aktivitas SOD ini dikarenakan oleh tingkatan reduksi anion superoksida berhubungan dengan linear dengan aktivitas XO dan dihambat SOD (Mandasari *et al.,* 2025).

KESIMPULAN

Bakteri endofit daun tanaman Sukun (*Artocarpus altilis)* ditemukan beberapa isolate dengan ciri morfologi yang berbeda bentuk sel dan jenis Gramnya untuk bakteri AL 4 Filamentous, putih, sedang, flat, Rhizoid, coccus, Gram +, citrate -, Katalase -, untuk bakteri IL11 Irreguler, putih, besar, flat, entire, basil, dan Gram +, citrate +, Katalase +. Kadar

protein total ekstrak SOD melalui bakteri endofit daun tanaman Sukun AL4 1.74 dan IL 11 2.09. Nilai persen inhibisi melalui bakteri endofit daun sukun memiliki konsentrasi 20% 64.02% dan konsentrasi ekstrak 80% sebesar 71.43%.

DAFTAR PUSTAKA

Bhore SJ, Sathisha G. (2010). Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin-like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. *World J. Agric. Sci*. 6(4):345-52.

Bimantara, R., Indrayati, A., & Purwaningsih, D. (2022). Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Fibrinolitik Bakteri *Bacillus cereus* yang Diisolasi dari Air Hutan Mangrove Maroon Edupark Semarang secara In Vitro. *Jurnal Farmasi Indonesia*, *19*(1): 110–123.

Fevria, R., & Hartanto, I. (2020). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp.) From Sauerkraut. *Sciences and Technology (GCSST)*, *4*, 19–23.

Jiang, Y., Zhu, Y., Zheng, Y., Liu, Z., Zhong, Y., Deng, Y., & Zhao, Y. (2021). Effects of salting-in/out-assisted extractions on structural, physicochemical and functional properties of Tenebrio molitor larvae protein isolates. *Food Chemistry*, *338*(September 2020), 128158.

Khan, Z. & Doty, S.L. (2009). Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants.Plant Soil.Doi 10.1007/s11104- 009-9908-1.

Linda, T. M., Anwar, S. E., Fibriarti, B. L., & Zul, D. (2024). Original article A new source of anti-hyperglycemic agent : endophyte bacteria isolated from stems of sea ferns (*Acrostichum aureum* l .) on Rupat Island, *Riau Province, Indonesia*. *30*(3), 158–164.

Mandasari, M. O., Indrayati, A., & Purwaningsih, D. (2025). Activity of Superoxide Dismutase (SOD) in guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts using the Water Soluble Tetrazolium Salt-1 (WST-1) method. *Jurnal Ilmiah Farmasi (Scientific Journal of Pharmacy*, *21*(May), 32–40

Melliawati, R., Widyaningrum, D.N., Djohan, A.C. & Sukiman, H. (2006). Pengkajian bakteri endofit penghasil senyawa bioaktif untuk proteksi tanaman. *Biodiversitas*. 7(3): 221-224.

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.

Okeke C. U. dan Iweala E. (2007). Antioxidant Profile of *Dioscorea rotundata, Manihot esculenta, Ipomea batatas, Vernonia amygdalina* and *Aloe vera. J Med Res Techool* (4): 4-10.

Pratiwi, A.E, (2015). Isolasi, Seleksi dan Uji Aktivitas Antibakteri Mikroba Endofit dari Daun Tanaman *Gracinia bethami* Pierre terhadap *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Eschericia coli, Shigella dysentriae,* dan *Salmonella typhimurium [Skripsi]. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*.

Rante H, Burnahudin T, Soendaria I. (2013). Isolasi Fungi Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba dari Daun Cabai Katokkon (*Capsicum annuum* L. var chinensis) dan Profil KLT Bioatuografi. *Majalah Farmasi dan Farmakologi 17(2):39-46*.

Rochana, A., Indrayati, A., & Purwaningsih, D. (2023). Skrining Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Bakteri Spons Cuci Piring dengan Metode Clot Lysis Secara In Vitro. *Journal Of Science, Technology, and Entrepreneurship*, *4*, 10–17.

Roostan Zohreh, Alireza Safatieh, Fatemah Mojadi, Hossein Zolgharnein, Kamat Ghanemi, dan Hajar Abiar. (2012). Phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* Isolated from Persian Gulf Sediments. *African Juornal of Microbiology Research.* 6:(21).

Taechowisan, T., Lu, C., Shen. Y. & Lumyong, S. (2005). Secondary Metabolites from

endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungalactivity. *Microbiology*. 151, 1691-1695.

Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Amilolitik pada Umbi *Colocasia esculenta* L. secara Morfolgi, Biokimia, dan Molekuler. *Jurnal Bioteknolgi Dan Biosains Indonesia*, 6(2), 247–258.

Zinniel D.K., Lambrecht, P. & Harris B.N., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G. & Vidaver, A.K. (2002). Isolation and chracterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environmental Microbiol*. 68: 2198-22.