Jurnal Kimia Andalas, ISSN 0853-8018
Volume 4, Nomor 2, Tahun 1998 (118-123)

EKSTRAKSI ENZIM PROTEASE DARI MADU LEBAH

Zulkarnain Chaidir

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas, Padang 25163

INTISARI

Salah satu bentuk uji kualitas madu lebah yang dilakukan oleh pedagang kaki lima adalah dengan cara mengamati perubahan tekstur kuning telur bila dicampur dengan madu lebah. Untuk mengetahui penyebab terjadinya perubahan tekstur kuning telur dilakukan suatu penelitian yang diawali dengan mengekstrak protein dari 4 macam merk dagang madu lebah yang ada di pasaran, dengan menggunakan aseton dingin (± 4^0 C). Ekstrak yang diperoleh dari madu lebah tersebut diuji dengan *ninhidrin*, ternyata 2 merk dagang memberikan reaksi positif. Selanjutnya dilakukan pengujian aktifitas protease menggunakan metoda *Kunizt*. Kedua protein memiliki aktifitas protease masing-masing 0.5 dan 0.4 unit/ml. Perubahan tekstur kuning telur yang dicampur dengan madu lebah tidak sepenuhnya disebabkan oleh enzim protease yang ada dalam madu lebah.

ABSTRACT

Traditionally, the quality of honey bee was tested by monitoring the charged of texture of yellow eggs before and after treated with that honey. To know how that charged if texture changes, the protein of four different trade marks was extracted using cold acetone (± 4^0 C). This Extract was tested by ninhydrin. Result of this investigation indicated that two of the treat mark gave positive reaction. Than protease activity of these protein were determined by Kunizt method. The result were 0,5 and 0,4 unit/ml, respectively. This charged of texture of yellow egg, that be mixed with honey bee was not caused by protease enzyme of that honey bee.

PENDAHULUAN

Madu lebah merupakan suatu cairan kental berasa manis berwarna kuning kecoklatan merupakan bahan makanan yang disediakan khusus untuk ratu lebah. Madu lebah banyak diperdagangkan orang, yang digunakan sebagai obat atau campuran obat[1]. Madu murni yang digunakan selama satu minggu dapat menurunkan tensi penderita hiprtensi terutama bagi wanita hamil[2]. Disamping itu Munstedt. dan Lang[3], menyatakan madu baik untuk pencegahan penyumbatan arteri. Campuran madu dengan yoghurt serta pectins dapat menurunkan berat badan bagi pasien penderita kegemukan/obesitas

Khasiat madu lebah erat kaitannya dengan kandungan kimia madu lebah tersebut. Madu yang telah masak mengandung fruktosa (41 %), glukosa (35 %), mineral (0,2 %), sukrosa (1,9 %), dekstrin (1,5 %), zat-zat lain yang belum ditentukan (3,4 %), vitamin A, B1, B2 dan asam pantotenat[4,5]. Sementara sari madu rata-rata mengandung (41,3%) protein, (13,55%) lemak, (20,3%)glukosa dan levulosa[3,6]. Kandungan kimia madu lebah maupun sari madu perlu dilakukan suatu penelitian kearah tersebut, terutama sekali terhadap protein yang terkandung dalam madu lebah.

Salah satu metoda pengujian kemurnian madu lebah yang dikembangkan dan dipercayai oleh masyarakat adalah dengan menguji kemampuan madu lebah untuk mengubah warna dan bentuk kuning telur. Madu lebah dicampur dengan kuning telur, kemudian dilihat perubahan yang terjadi pada kuning telur. Bila kuning telur berubah menjadi seperti telur yang sudah dimasak setelah dicampur dengan madu, maka madu diyakini adalah madu asli. Hipotesa peneliti adalah bahwa proses pematangan telur oleh madu lebah disebabkan karena adanya protease dalam madu lebah.

BAHAN DAN METODA

Persiapan Sampel

Sampel madu lebah yang akan diteliti diperoleh dari Pasar Raya Padang dari berbagai macam merk dagang dan tanpa merk dagang. Selanjutnya dilakukan pengujian awal dengan menggunakan kuning telur dari masing-masing sampel dengan cara mengambil kuning telur sebanyak 2 ml yang telah dipisahkan dari putih telur dan ditambahkan kedalamnya ± 1 ml madu lebah. Reaksi yang positif ditandai dengan terjadinya perubahan bentuk dan warna dari kuning telur, sedangkan yang negatif tidak terjadi perubahan apa-apa. Hasil pengujian baik yang positif maupun yang negatif dilakukan pengekstrakan protein dari masing-masing sampel.

Ekstraksi Protein Dari Madu Lebah

Sejumlah madu lebah dari berbagai merk diencerkan dengan buffer fosfat pH 7, selanjutnya ditambahkan aseton dingin secara bertahap sampai volumenya sama dengan volume sampel. Koloid yang terbentuk disentrifuse, supernatan dipisahkan dari endapan yang terbentuk. Kemudian endapan dikeringkan dan selanjutnya disuspensikan kembali dalam buffer fosfat pH 7, suspensi yang terjadi siap diuji dengan pereaksi spesifik antara lain; pereaksi ninhidrin. Endapan yang positif dengan pereaksi-ninhydrin dilanjutkan dengan pengujian aktifitas proteasenya.

Pengujian Aktifitas Enzim Protease Kasar

Pengujian aktifitas enzim protease kasar memakai substrat kasein dengan menggunakan metoda Anson yakni mengukur serapan hidrolisat dan blanko yang telah diwarnai dengan reagen folin fenolceocalteu pada panjang gelombang 660 nm., 2 ml hidrolisat atau blanko ditambah 4 ml NaOH 0,5 N dan 1 ml perekasi folin fenolceocalteu dan didiamkan selama 30 menit kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 660 nm. Substrat yang digunakan untuk pengujian aktifitas enzim protease ini adalah kasein dengan konsentrasi 2% b/v. Larutan kasein (2% b/v) didalam tabung reaksi ditambah dengan 2,5 ml larutan buffer fosfat 0,05 M, pH 7 serta 0,5 ml sistein 0,065 M dan 0,5 ml larutan EDTA 0,01 M. Kemudian campuran reaksi diprainkubasi pada suhu 37 ^{o}C selama 5 menit. Setelah prainkubasi, kedalam campuran reaksi ditambahkan larutan enzim kasar sebanyak 1 ml, kemudian inkubasi diteruskan selama 30 menit. Hal yang sama dilakukan dengan menginaktifkan enzimnya terlebih dahulu disebut dengan blanko. Reaksi dihentikan dengan penambahan 5 ml campuran larutan TCA. Setelah itu filtrat dipisahkan dari endapan protein dengan penyaringan dan filtrat diambil. Kedalam 2 ml filtrat (hidrolisat dan blanko) masing-masing ditambah 4 ml NaOH 0,5 N dan 1 ml pereaksi folin fenolceocalteu. Campuran diaduk dan diamkan selama 30 menit. Kemudian masing-masingnya diukur serapannya pada panjang gelombang 660 nm. Selisih serapan antara sampel dan blanko setiap serapan 0,01 sama dengan 1 unit aktifitas enzim[1,7].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian madu lebah yang dengan menggunakan kuning telur dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Hasil pengujian madu lebah menggunakan kuning telur (2 ml kuning telur + 2 ml madu lebah).

No.	Merk Dagang Madu Lebah	Pengamatan
1.	A	(+)
2.	B	(++)
3.	C	(+++)
4.	D	(+)

A = Madu lebah yang dibeli dari pedagang kaki lima; B = Madu lebah yang dibeli dari toko obat pada label berasal dari Sumbawa; C = Madu lebah yang dibeli dari petani berasal dari Riau; D = Madu lebah yang dibeli dari toko obat.

Dari Tabel 1 di atas ternyata sampel C memberikan perubahan kuning telur sangat nyata sekali ditandai dengan pengamatan (+++). Perubahan ini besar kemungkinan karena adanya protein enzim (protease), sehingga terjadi proses hidrolisis. Selain itu mungkin juga disebabkan oleh adanya asam asetat yang terdapat pada madu lebah akibat kontaminasi dengan mikroba, sehingga terjadi proses fermentasi, dimana gula yang ada pada madu lebah dirubah oleh mikroba menjadi asam asetat. Untuk membuktikan penyebab perubahan kuning telur oleh madu lebah, maka dilakukan isolasi protein dari madu lebah menggunakan aseton dingin pada suhu sekitar 4 ^{o}C.

Protein hasil isolasi diuji dengan larutan ninhidrin 1%, adapun hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Pengujian protein hasil isolasi dari madu lebah dengan menggunakan pereaksi ninhidrin 1%

No.	Merk Dagang Madu Lebah	Pengamatan
1.	A	(-)
2.	B	(++)
3.	C	(+++)
4.	D	(-)

- = tidak terjadi perubahan warna; ++ = warna agak pekat; +++ = warna lebih pekat.

Pada Tabel 2 diatas dapat dilihat bahwa madu lebah yang diperoleh dari toko obat (B) dan protein hasil isolasi madu lebah yang berasal dari petani Riau, memunjukkan reaksi yang positif dengan ninhidrin. Hal ini menunjukkan bahwa kedua madu lebah tersebut mengandung protein, tapi protein tersebut belum tentu apakah protein enzim (protease). Selanjutnya untuk membuktikan apakah protein tersebut protease atau tidak, maka dilakukan

uji aktifitas menggunakan substrat kasein 2%. Hasil pengujian aktifitas protein hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3. Hasil pengujian aktifitas protein hasil isolasi dari madu lebah dengan menggunakan substrat kasein 2% pada suhu 37 ^{o}C dan pH 7.

No.	Merk Dagang Madu Lebah	Aktifitas (unit/ml/detik)*
1.	A	0
2.	B	0,5
3.	C	0,4
4.	D	0

* 1 unit aktifitas enzim adalah perbedaan 0,01 Absorban atau DO (densiti optik).

Dari pengujian aktifitas protein hasil isolasi sebagaimana terlihat pada Tabel 3 di atas ternyata aktifitas dari protein hasil isolasi yang berasal dari sampel B dan C relatif kecil sekali, yakni hanya 0,5 dan 0,4 unit. Sedangkan sampel A dan D tidak memiliki aktifitas, hal ini didukung oleh data yang ada pada Tabel 2. Dimana sampel A dan D hasil pengujian dengan ninhidrin negatif. Sehingga perubahan kuning telur yang terjadi diperkirakan bukan disebabkan oleh aktifitas enzim protease tetapi oleh karena adanya asam asetat yang terdapat pada madu lebah yang merupakan proses hidrolisis protein kuning telur oleh asam asetat.

KESIMPULAN

Dari hasil percobaan yang telah dilakukan dan dibandingkan dengan literatur yang ada, maka dapat diambil kesimpulan bahwa pengujian dengan kuning telur untuk menentukan asli atau tidaknya suatu madu lebah tidak ada hubungannya dengan protein yang dikandung oleh madu lebah. Dari pengujian madu lebah dengan kuning telur ternyata semuanya mengalami perubahan tekstur kuning telur. Tetapi tidak semua madu lebah mengandung enzim protease. Dari empat sampel yang diuji hanya dua yang memiliki aktifitas dengan substrat kasein 2% pada kondisi pH 7, suhu 37 ^{o}C, lama inkubasi 30 menit, yakni 0,5 unit/ml dan 0,4 unit/ml.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih banyak pada Direktur Eksekutif Proyek HEDS yang telah membantu biaya penelitian dari tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. M.L.Anson, *J.Gen.Phisiol* 22,79, 1938.
2. Ali, O.A. Al-Swayeh.. *J - Ethnopharmacol*, 55(3) , 231-238, 1997.
3. Munstedt., U. Lang, American Bee Journal, 137(4), 296-297, 1997.
4. R.J. Alexander, *American Association of Cereal Chemist*, 42(5), 420 – 421, 1997.
5. JD. Kerkvliet, *International Bee Research Association*, 35, 110-117, 1996.
6. Nakamoto *et al. J. Agric, Biol.Chem.* 48, 1627-1628, 1984.
7. M. Kubo, *et al* , *J. Fermenrt. Tech* 66(1), 13-18, 1988.