

**UJI AKTIVITAS ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD)
DALAM EKSTRAK TEMU HITAM (*Curcuma aeruginosa*
Roxb.) DENGAN METODE WATER SOLUBLE
TETRAZOLIUM SALT-1 (WST-1)**



Oleh:

**Tita Novarini
24185613A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2022**

**UJI AKTIVITAS ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD)
DALAM EKSTRAK TEMU HITAM (*Curcuma aeruginosa*
Roxb.) DENGAN METODE WATER SOLUBLE
TETRAZOLIUM SALT-1 (WST-1)**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi S1 Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

**Oleh :
Tita Novarini
24185613A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2022**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

UJI AKTIVITAS ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DALAM EKSTRAK TEMU HITAM (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) DENGAN METODE WATER SOLUBLE TETRAZOLIUM SALT-1 (WST-1)

Oleh :

Tita Novarini
24185613A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 20 Juli 2022

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,



Prof. Dr. apt. R.A. Oetari, S.U., M.M., M.Sc.

Pembimbing Utama

Dr. Ana Indrayati, M.Si.

Pembimbing Pendamping

Desi Purwaningsih, M.Si.

Penguji :

1. Dr. Mardiyono, M.Si.

1.

2. apt. Vivin Nopiyanti, M.Sc.

2.

3. apt. Jena Hayu Widyasti, M.Farm.

3.

4. Dr. Ana Indrayati, M.Si.

4.

HALAMAN PERSEMBAHAN



Alhamdulillah segala puji syukur kepada Allah SWT atas rahmat serta hidayah-Nya yang selalu memberikan kekuatan, kesabaran, kelancaran dalam menyusun dan menyelesaikan skripsi ini. Semua ini tidak terlepas dari segala bantuan doa dan motivasi dari orang yang saya hormati dan sayangi. Oleh karena itu, saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. Kedua orang tua yang sangat saya cintai dan sayangi, Bapak saya Sutadi dan Ibu saya Titik Handayani Prihatin serta adik saya Bayu Mahendra Aditama yang senantiasa memberikan kasih sayang, semangat, nasehat, motivasi, dukungan, dan doa untuk kesuksesan anaknya.
2. Dr. Ana Indrayati, M.Si. dan Desi Purwaningsih, M.Si. selaku dosen pembimbing yang senantiasa memberikan pengarahan, masukan, dan motivasi sehingga tercapai skripsi ini. Ucapan terimakasih yang tak terhingga atas ilmu yang telah diberikan sangatlah bermanfaat bagi saya.
3. Seluruh dosen, asisten dosen, staf perpustakaan, dan staf laboratorium yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu, terimakasih atas ilmu yang telah diberikan selama saya menempuh skripsi dan studi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
4. Teman-teman serta sahabat-sahabat saya yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas saran, masukan, dan dukungan selama proses penelitian maupun penyusunan naskah skripsi.
5. Diri sendiri, terimakasih atas semangat, kesetiaan untuk berproses sampai sejauh ini, serta keberanian untuk belajar hal yang baru.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini terdapat jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 28 Juni 2022



Tita Novarini

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr.wb.

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “**Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dalam Ekstrak Temu Hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) dengan Metode *Water Soluble Tetrazolium Salt-1 (WST-1)*”**”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari hambatan dan tantangan, namun berkat kerja keras, bimbingan, dan motivasi dari berbagai pihak sehingga dapat terselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terimakasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA. selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. apt. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Dr. Ana Indrayati, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Desi Purwaningsih, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang sabar memberikan bimbingan, arahan, masukan, dan telah meluangkan waktu membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
4. Tim penguji yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk penyempurnaan skripsi ini.
5. Dosen, karyawan, staff laboratorium serta teman seprofesi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan kepada penulis.
6. Bapak dan Ibu tercinta yang telah memotivasi, memberikan kasih sayang, doa, dan nasihat yang tiada henti demi terselesaikannya skripsi ini.
7. Sahabat-sahabatku yang selalu memberikan semangat dan motivasi selama pengerjaan skripsi ini.
8. Teman-teman S-1 Farmasi angkatan 2018 dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan semangat, dorongan dan bantuannya dalam proses menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penulisan serta penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan dan kelemahan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi penyempurnaan penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya, pembaca, dan perkembangan ilmu farmasi di Indonesia.

Wassalamualaikum wr.wb.

Surakarta, 28 Juni 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tita', written in a cursive style.

Tita Novarini

DAFTAR ISI

	Halaman
PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.
A. Tanaman Temu Hitam.....	Error! Bookmark not defined.
1. Klasifikasi	Error! Bookmark not defined.
2. Nama lain.....	Error! Bookmark not defined.
3. Morfologi tanaman	Error! Bookmark not defined.
4. Kegunaan	Error! Bookmark not defined.
5. Kandungan kimia temu hitam	Error! Bookmark not defined.
B. Antioksidan.....	Error! Bookmark not defined.
1. Pengertian	Error! Bookmark not defined.
2. Penggolongan.....	Error! Bookmark not defined.

- C. Enzim Superoksida Dismutase .. **Error! Bookmark not defined.**
 - 1. Pengertian **Error! Bookmark not defined.**
 - 2. Jenis-jenis enzim SOD..... **Error! Bookmark not defined.**
- B. Metode Ekstraksi Enzim..... **Error! Bookmark not defined.**
 - 1. Isolasi enzim **Error! Bookmark not defined.**
 - 2. Pemurnian enzim **Error! Bookmark not defined.**
- C. Penetapan Kadar Protein **Error! Bookmark not defined.**
 - 1. Macam-macam metode penetapan kadar protein total ...**Error! Bookmark not defined.**
- D. Metode Uji Aktivitas SOD **Error! Bookmark not defined.**
 - 1. Macam-macam metode uji aktivitas SOD .. **Error! Bookmark not defined.**
- E. Metode Water Soluble Tetrazolium Salt-1 **Error! Bookmark not defined.**
- F. Vitamin C **Error! Bookmark not defined.**
- G. Dapar Fosfat Salin **Error! Bookmark not defined.**
- H. Persen Inhibisi **Error! Bookmark not defined.**
- I. Landasan Teori **Error! Bookmark not defined.**
- J. Hipotesis **Error! Bookmark not defined.**
- BAB III METODE PENELITIAN..... **Error! Bookmark not defined.**
 - A. Populasi dan Sampel..... **Error! Bookmark not defined.**
 - 1. Populasi..... **Error! Bookmark not defined.**
 - B. Variabel Penelitian **Error! Bookmark not defined.**
 - 1. Identifikasi variabel utama..... **Error! Bookmark not defined.**
 - 2. Klasifikasi variabel utama..... **Error! Bookmark not defined.**
 - 3. Definisi operasional variabel utama **Error! Bookmark not defined.**
 - C. Alat dan Bahan **Error! Bookmark not defined.**

1. Alat.....	Error! Bookmark not defined.
2. Bahan	Error! Bookmark not defined.
D. Jalannya Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1. Determinasi tanaman	Error! Bookmark not defined.
2. Pengambilan sampel	Error! Bookmark not defined.
3. Ekstraksi SOD temu hitam	Error! Bookmark not defined.
4. Pemurnian parsial ekstrak SOD.....	Error! Bookmark not defined.
5. Penetapan kadar protein dengan metode <i>Lowry</i>	Error! Bookmark not defined.
E. Analisis Hasil.....	Error! Bookmark not defined.
F. Skema Penelitian	Error! Bookmark not defined.
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error! Bookmark not defined.
A. Determinasi Tanaman.....	Error! Bookmark not defined.
B. Pengambilan Sampel	Error! Bookmark not defined.
C. Ekstraksi SOD Temu Hitam	Error! Bookmark not defined.
D. Pemurnian Parsial Ekstrak SOD	Error! Bookmark not defined.
E. Penetapan Kadar Protein dengan Metode <i>Lowry</i>	Error! Bookmark not defined.
F. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak SOD Temu Hitam	Error! Bookmark not defined.
BAB V KESIMPULAN	Error! Bookmark not defined.
A. Kesimpulan.....	Error! Bookmark not defined.
B. Saran	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Komposisi larutan sampel dan blanko.....	Error! Bookmark not defined.
2. Bobot pelet ekstrak kasar enzim hasil pemurnian parsial	Error! Bookmark not defined.
3. Nilai absorbansi konsentrasi larutan BSA sebagai pembanding	Error! Bookmark not defined.
4. Kadar protein sampel dengan metode <i>Lowry</i> ..	Error! Bookmark not defined.
5. Nilai absorbansi blanko pada WST-1 <i>assay</i>	Error! Bookmark not defined.
6. Hasil uji aktivitas enzim SOD temu hitam	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman temu hitam (<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb.).....	Error! Bookmark not defined.
2. Struktur senyawa kurkumin.....	Error! Bookmark not defined.
3. Mekanisme aksi antioksidan enzim.....	Error! Bookmark not defined.
4. Mekanisme aktivitas penangkapan radikal kompleks kurkumin-Cu(ii).....	Error! Bookmark not defined.
5. Penyebaran enzim SOD di lingkungan	Error! Bookmark not defined.
6. Struktur Cu/Zn SOD.....	Error! Bookmark not defined.
7. Struktur Mn SOD	Error! Bookmark not defined.
8. Struktur Fe SOD sitosolik (a) dan Fe SOD kloroplas (b).....	Error! Bookmark not defined.
9. Prinsip uji SOD	Error! Bookmark not defined.
10. Struktur vitamin C.....	Error! Bookmark not defined.
11. Skema <i>plate 96 well</i>	Error! Bookmark not defined.
12. Skema alur penelitian	Error! Bookmark not defined.
13. Skema pembuatan ekstrak enzim temu hitam	Error! Bookmark not defined.
14. Skema pemurnian parsial ekstrak SOD.....	Error! Bookmark not defined.
15. Skema pengukuran kadar protein dengan metode <i>Lowry</i>	Error! Bookmark not defined.
16. Skema uji aktivitas ekstrak kasar SOD	Error! Bookmark not defined.
17. Kurva dan persamaan kalibrasi konsentrasi absorbansi BSA	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Surat keterangan determinasi temu hitam **Error! Bookmark not defined.**
2. Ekstraksi enzim SOD **Error! Bookmark not defined.**
3. Pembuatan larutan PBS pH 7,2 **Error! Bookmark not defined.**
4. Penimbangan amonium sulfat **Error! Bookmark not defined.**
5. Foto hasil pelet dan supernatan variasi konsentrasi presipitasi amonium sulfat **Error! Bookmark not defined.**
6. Pembuatan reagen *Lowry* **Error! Bookmark not defined.**
7. Pembuatan larutan induk dan pengenceran BSA **Error! Bookmark not defined.**
8. Foto larutan induk dan konsentrasi BSA..... **Error! Bookmark not defined.**
9. Absorbansi kurva baku BSA **Error! Bookmark not defined.**
10. Hasil panjang gelombang maksimum **Error! Bookmark not defined.**
11. Hasil *operating time* **Error! Bookmark not defined.**
12. Hasil absorbansi ekstrak kasar enzim SOD temu hitam..... **Error! Bookmark not defined.**
13. Perhitungan protein total ekstrak kasar enzim SOD temu hitam **Error! Bookmark not defined.**
14. Hasil SPSS protein total **Error! Bookmark not defined.**
15. Tanda bukti uji aktivitas SOD **Error! Bookmark not defined.**
16. Hasil uji aktivitas SOD..... **Error! Bookmark not defined.**
17. Perhitungan persen inhibisi **Error! Bookmark not defined.**
18. Hasil SPSS uji aktivitas SOD **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR SINGKATAN

SOD	Superoksida Dismutase
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium Salt-1</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
O ₂ ^{•-}	Radikal anion superoksida
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i>
BHA	<i>Butylated hidroksianisol</i>
tBHQ	<i>tert-Butylhydroquinone</i>
GSH	Glutathione
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
LA	<i>Alpha Lipoic Acid</i>
CoQ	<i>Coenzyme Q</i>
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i>
CAT	Katalase
2-Nap	<i>2-naphthol</i>
2,4 DA	<i>2,4-dichlorophenoxy acetic acid</i>
MDA	Malondialdehid
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>
HAC	<i>Hydroxyapatite Chromatography</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
MTT	<i>Micro Tetrazolium</i>
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>

ABSTRAK

TITA NOVARINI, 2022, UJI AKTIVITAS ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DALAM EKSTRAK TEMU HITAM (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) DENGAN METODE WATER SOLUBLE TETRAZOLIUM SALT-1 (WST-1), SKRIPSI, PROGRAM STUDI S1 FARMASI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA. Dibimbing oleh Dr. Ana Indrayati, M.Si. dan Desi Purwaningsih, M.Si.

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan radikal bebas yang berperan penting dalam proses fisiologis dalam tubuh, tetapi apabila jumlahnya berlebih dapat menyebabkan stres oksidatif. ROS dapat dihilangkan dengan adanya antioksidan endogen, seperti enzim SOD. Enzim SOD merupakan enzim yang mengkatalisis radikal anion superoksida menjadi turunan oksigen, tetapi bukan radikal bebas. Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas SOD adalah temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb). Penelitian ini bertujuan 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.

Penelitian ini diawali dengan determinasi tanaman dan pengambilan sampel temu hitam. Ekstraksi enzim SOD dilakukan dengan cara penambahan PBS dan disentrifugasi. Pemurnian enzim SOD dilakukan dengan metode presipitasi amonium sulfat. Penetapan kadar protein total dengan menggunakan metode *Lowry*. Pengukuran aktivitas SOD dilakukan dengan pengukuran nilai persen inhibisi menggunakan *Superoksida Dismutase Activity Assay Kit* WST-1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein total ekstrak kasar dan presipitasi amonium sulfat 25, 50, 75, serta 100% secara berturut-turut nilainya sebesar 0,909; 0,639; 0,710; 0,752; dan 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 konsentrasi 100%.

Kata kunci : *Curcuma aeruginosa* Roxb., SOD, WST-1.

ABSTRACT

TITA NOVARINI, 2022, 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, THESIS, BACHELOR OF PHARMACY, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA. Supervised by Dr. Ana Indrayati, M.Si. and Desi Purwaningsih, M.Si.

Reactive oxygen species (ROS) are free radicals that play an important role in physiological processes in the body, but if the amount is too high, it can cause oxidative stress. ROS can be eliminated in the presence of endogenous antioxidants such as SOD enzymes. SOD is an enzyme that catalyzes superoxide anion radicals into oxygen derivatives, but not into free radicals. One of the herbs with SOD activity is temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb). This study aims to determine the total protein content and the percentage inhibition of crude temu hitam SOD extract at an ammonium sulfate precipitation concentration of 25, 50, 75, 100% and determine the percentage of inhibition of the optimal concentration of ammonium sulfate precipitation.

This research begins with the determination of plants and the taking of temu hitam samples. The extraction of the SOD enzyme was performed by adding PBS and centrifuging. The purification of the SOD enzyme was carried out by the ammonium sulfate precipitation method. Determination of the total protein content by the Lowry method. Measurement of SOD activity was performed by measuring the percentage inhibition value using the *Superoxide Dismutase Activity Assay Kit* WST-1.

The results showed that the total protein content of the crude extract and the precipitation of ammonium sulfate were 25, 50, 75 and 100% 0.909, respectively; 0.639; 0.710; 0.752; and 0.944 mg/ mL. Then the percent inhibition values were 76,720, respectively; 23,810; 65,079; 70,370; and 83.069%, the optimum concentration being a concentration of 100%.

Kata kunci : *Curcuma aeruginosa* Roxb., SOD, WST-1.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

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 ini dibentuk melalui 2 cara, yaitu secara endogen dan eksogen. 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 (Irianti *et al.*, 2021; Yuslianti, 2018).

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. Pembentukan ROS ini dapat menginduksi peroksida lipid yang bersifat sitotoksik akibat inisiasi suatu reaksi berantai ke dalam membran serta diikuti reaksi propagasi secara keseluruhan sehingga menyebabkan kerusakan pada sel yang menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif sendiri merupakan salah satu pemicu penyakit degeneratif (Sikka, 2004; Yuslianti, 2018). Salah satu cara untuk menghilangkan ROS adalah dengan pemberian antioksidan. Salah satunya adalah antioksidan endogen, seperti superoksida dismutase (SOD) (Wahyuningsih, 2011).

Superoksida dismutase (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. SOD dapat juga digunakan dalam kosmetik sebagai *anti-aging* serta antioksidan karena kemampuannya untuk mengurangi radikal bebas ke kulit dan dapat mencegah keriput, garis halus, membantu penyembuhan luka, melindungi dari paparan sinar UV, serta mengurangi tanda-tanda

penuaan. Enzim ini juga memiliki khasiat untuk masalah kesehatan pada manusia, seperti gangguan sel darah merah, *cystic fibrosis* serta sindrom nefrotik sensitif steroid, serta sindrom nyeri pasca kolesistektomi (Younus, 2018; Islam *et al.*, 2021).

Pemurnian parsial enzim SOD menggunakan metode presipitasi amonium sulfat. Prinsip metode presipitasi adalah penambahan pelarut organik, asam, atau garam ke sampel yang akan diteliti (Perez dan Prakash, 2020). Amonium sulfat dipilih karena protein hasil presipitasi dari aktivitas enzim SOD dengan aseton maupun amonium sulfat lebih tinggi daripada protein hasil presipitasi dengan *Trichloric Acid* (TCA) (Tistama dan Minati, 2017). Penambahan garam amonium sulfat harus dalam konsentrasi tinggi, agar aktivitas enzim mengalami peningkatan. Hal ini membuktikan bahwa tingkat kemurnian suatu enzim akan menentukan nilai aktivitas enzim tersebut (Sarip *et al.*, 2014). Pada penelitian ini menggunakan konsentrasi amonium sulfat 25, 50, 75, dan 100%. Konsentrasi tersebut diambil dari penelitian yang dilakukan oleh Rahman *et al.* (2012), yang mengisolasi enzim SOD dari mesokarp buah merah dengan konsentrasi presipitasi amonium sulfat 25, 50, dan 75%. Pada penelitian tersebut, konsentrasi 75% menghasilkan aktivitas SOD yang paling optimal daripada ekstrak kasar dan konsentrasi 25 maupun 50%.

Salah satu tanaman yang mempunyai aktivitas SOD adalah temu hitam. Temu hitam dipilih karena pada penelitian yang dilakukan oleh Moon-ai *et al.* (2012), mempunyai nilai IC_{50} yang rendah baik pada ekstrak kasar maupun dengan penambahan amonium sulfat. Nilai IC_{50} yang rendah akan mengakibatkan aktivitas SOD menjadi tinggi. Penelitian tersebut meneliti tentang aktivitas SOD dengan metode *nitroblue tetrazolium* (NBT) pada 15 spesies tanaman pada famili Zingiberaceae.

Enzim SOD dari tanaman pernah diteliti oleh Pratiwi (2019) pada jagung dengan nilai persen inhibisi 65,50%, Patandung (2019) pada tomat dengan nilai persen inhibisi 77,83%, dan Febriyanti *et al.* (2013) pada tanaman ekor kucing dengan penghambatan 10 $\mu\text{g/ml}$ yang nilai persen inhibisinya 11,27%, penghambatan 100 $\mu\text{g/ml}$ yang nilai persen inhibisinya 15,20%, serta penghambatan 1000 $\mu\text{g/ml}$ yang nilai persen inhibisinya 22,06%.

Water soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) yang mempunyai nama lain 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-

tetrazolium monosodium salt merupakan salah satu metode pada pengujian aktivitas SOD. WST-1 juga merupakan uji kolorimetri yang sederhana. WST-1 akan menghasilkan pewarnaan formazan yang larut dalam air pada reduksi anion superoksida (Widowati *et al.*, 2005).

Pada uji aktivitas enzim SOD dengan metode WST-1, didapatkan nilai persen inhibisi. Persen inhibisi merupakan perbandingan antara selisih absorbansi blanko dan sampel dengan absorbansi blanko. Persen inhibisi memiliki arti, yaitu persentase hambatan dari suatu bahan yang diuji terhadap radikal bebas (Munadia dan Aulianshah, 2021). Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin melanjutkan penelitian mengenai enzim SOD pada temu hitam dan menggunakan variasi konsentrasi garam amonium sulfat sebesar 25, 50, 75, dan 100% dengan metode WST-1.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat disusun dari latar belakang yang ada adalah sebagai berikut:

Pertama, berapakah kadar protein total ekstrak kasar SOD dan presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75, 100% pada temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.)?

Kedua, berapakah nilai persen inhibisi ekstrak kasar SOD dan presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75, 100% pada temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.)?

Ketiga, berapakah persen inhibisi yang optimum dari konsentrasi presipitasi amonium sulfat pada SOD temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.)?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dapat disusun dari rumusan masalah yang ada adalah sebagai berikut:

Pertama, mengetahui kadar protein total ekstrak kasar SOD dan presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75, 100% pada temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.).

Kedua, mengetahui nilai persen inhibisi ekstrak kasar SOD dan presipitasi amonium sulfat konsentrasi 25, 50, 75, 100% pada temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.).

Ketiga, mengetahui persen inhibisi yang optimum dari konsentrasi presipitasi amonium sulfat pada SOD temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.).

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan di bidang teknologi bahan alam serta memberikan dasar ilmiah potensi SOD yang diekstraksi dari temu hitam dan sebagai acuan dalam pengembangan SOD rekombinan yang bersumber dari tanaman.