**PEMURNIAN PARSIAL DAN KARAKTERISASI UREASE**

DARI BIJI KACANG PANJANG **(*Vigna unguiculata ssp sesquipedalis* L*.*)**

**PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF UREAE**

**FROM APARAGUS BEAN (*Vigna unguiculata ssp sesquipedalis* L*.*)**

# Zusfahair1, Dian Riana Ningsih1, Amin Fatoni1, Darul Santri Pertiwi1

1 Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto 53123, Indonesia.

email: zusfahair@gmail.com

**ABSTRAK**

Urease adalah enzim yang digunakan dalam hidrolisis urea menjadi amoniak dan asam bikarbonat. Urease telah banyak digunakan dalam proses industri. Tujuan penelitian adalah isolasi dan pemurnian urease dari kacang panjang serta karakterisasinya. Penelitian dimulai dengan melakukan perkecambahan biji kacang panjang selama 8 hari. Kecambah biji kacang panjang selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan buffer fosfat pH 7 dan dipisahkan menggunakan sentrifugasi sehingga diperoleh ekstrak kasar urease. Ekstrak kasar urease selanjutnya difraksinasi menggunakan aseton pada tingkat konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%. Fraksi yang mempunyai aktivitas spesifik paling tinggi selanjutnya ditentukan berat molekul menggunakan metode SDS PAGE dan dikarakterisasi meliputi: pengaruh suhu, pH, konsentrasi substrat, dan penambahan logam terhadap aktivitas urease. Aktivitas urease ditentukan dengan metode Nessler. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik urease dari kacang panjang paling tinggi ditemukan pada Fraksi aseton (FA) 20. Analisis menggunakan SDS PAGE diperoleh beberapa pita protein yang diduga berukuran sekitar 25 KDa dan 17 KDa. Aktivitas urease optimum diperoleh pada suhu 30 oC, pH 7, waktu inkubasi 20 menit dan konsentrasi urea 16.6 mM dengan nilai aktivitas 407.62 U/mL. EDTA dan logam CaCl2, NaCl, NiCl2 dan CuCl2 pada variasi konsentrasi 10-3 ,10-4 , dan 10-5 M merupakan inhibitor urease FA 20 dari kacang panjang.

Kata kunci: aseton, kacang panjang, karakterisasi

**ABSTRACT**

Urease is an enzyme used in urea hydrolysis to ammonia and bicarbonate acid. Urease has been widely used in industrial processes. The study were about isolation and purification of urease from asparagus bean and its characterization. The study started with germination of asparagus bean for 8 days. Germinated asparagus bean were further extracted using phosphate buffer pH 7 and separated by centrifugation to obtain a crude extract of urease. The crude extract of urease was further fractionated using acetone at concentrations of 20, 40, 60, and 80%. The fraction which having the highest specific activity then determined by molecular weight using SDS PAGE method and characterized include: influence of temperature, pH, substrate concentration, and metal addition to urease activity. The urease activity is determined by the Nessler method. The results showed that the specific activity of urease from asparagus bean was highest found in fraction of acetone (FA) 20. Analysis using SDS PAGE obtained some protein bands that allegedly measuring about 25 KDa and 17 KDa. The optimum urease activity was obtained at 30 oC, pH 7, incubation time 20 min and urea concentration 16.6 mM with activity value 407.62 U/mL. EDTA and CaCl2, NaCl, NiCl2 and CuCl2 metals at concentrations of 10-3, 10-4, and 10-5 M were FA 20 urease inhibitors.

Key word: aseton, characterization, asparagus bean.

**PENDAHULUAN**

Urease merupakan enzim yang bekerja sebagai katalis hidrolisis urea menjadi amoniak dan asam karbamat dan asam karbamat kemudian mengalami reaksi hidrolisis secara spontan membentuk amoniak dan asam karbonat ([Banerjee and Aggarwal, 2012](#_ENREF_2)). Reaksi hidrolisis urea oleh urease adalah sebagai berikut:



 Urease merupakan enzim yang berperan penting. Urease dapat mendeteksi urea dalam darah atau urine ([Kumar et al., 2009](#_ENREF_12)), mendeteksi urea dalam susu ([Sharma et al., 2008](#_ENREF_19)), mendeteksi logam berat, menghilangkan urea dalam minuman beralkohol ([Fathima and Jayalakshmi, 2012](#_ENREF_6)), urease dapat membunuh insektisida dan mempunyai aktivitas antijamur ([Carlini and Polacco, 2008](#_ENREF_4)).

Peran urease yang banyak maka perlu dilakukan ekslporasi urease. Urease telah diisolasi dan dimurnikan dari bakteri, jamur dan tanaman ([Follmer, 2008](#_ENREF_7)). Urease telah dimurnikan dari biji pare (*Momordica charantia)* ([Krishna et al., 2011](#_ENREF_11)), buncis (*Cicer arietinum* L.) ([Sana et al., 2009](#_ENREF_17)), biji *Syrian mesquite* (*Prosopis farcta*) ([Hamzah, 2014](#_ENREF_8)), strain *Proteus mirabilis* ([Mohammed et al., 2014](#_ENREF_14)), spesies bakteri Klebsiella ([Fathima and Jayalakshmi, 2012](#_ENREF_6)). Pada penelitian ini telah dilakukan pemurnian parsial urease dari biji kacang panjang.

Kacang panjang merupakan anggota Famili Fabacea yang termasuk ke dalam golongan sayuran dan mengandung zat gizi cukup banyak. Kacang panjang adalah sumber protein yang baik, vitamin A, thiamin, riboflavin, besi, fosfor, kalium, vitamin C, folat, magnesium, dan mangan ([Rahayu et al., 2007](#_ENREF_16)). Kacang panjang merupakan tanaman yang melimpah. Kacang panjang selama ini hanya digunakan untuk sayuran. Nilai ekonomi kacang panjang dapat ditingkatkan salah satunya dengan menggunakan kacang panjang sebagai sumber urease. Urease yang diisolasi dari kacang panjang dilakukan pemurnian parsial menggunakan aseton dan selanjutnya dikarakterisasi. Tujuan penelitian adalah pemurnian parsial dan karakterisasi urease dari biji kacang panjang.

**METODE PENELITIAN**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat alat gelas ditambah alat penunjang spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), SEM, Sentrifuge, seperangkat alat elektroforesis. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adala, biji kacang panjang (*Vigna unguiculata ssp sesquipedalis* L*.*), urea (Merck, Jerman), reagen Nessler (Kalium iodide, MgCl2, KOH), asam asetat (Merck, Jerman), natrium asetat, natrium fosfat (Merck, Jerman), dinatrium hidrogen fosfat (Merck, Jerman), CuCl2, CaCl2, NaCl2, NiCl2, EDTA, Tris (hidroksimetil) aminomethane (Merck, Jerman), HCl (Merck, Jerman), aseton (Merck, Jerman).

**Prosedur Penelitian**:

**Isolasi urease dari biji kacang panjang**

1. **Tahap perkecambahan (**[**EL-Hefnawy et al., 2014**](#_ENREF_5)**)**

Isolasi dilakukan pada bagian biji kacang panjang sebanyak 200 gram biji direndam dalam air selama 6 jam, setelah itu ditiriskan dan dimasukkan ke dalam wadah plastik yang telah diisi kapas basah, lalu ditutup dengan *wrapping* dan didiamkan dalam ruang gelap pada suhu ruang 8 hari.

1. **Tahap ekstraksi (**[**Banerjee and Aggarwal, 2012**](#_ENREF_2)**)**

Kecambah diambil sebanyak 200 gram dan dihaluskan menggunakan mortar selanjutnya direndam dalam 800 mL buffer fosfat pH 7 suhu 4 oC dilakukan pengadukan dengan stirrer selama 3 jam hingga dihasilkan 2 lapisan yaitu filtrat dan suspensi. Filtrat dipisahkan dengan menggunakan kain muslin. Filtrat yang didapat disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 15 menit suhu 4 oC. Supernatan yang dihasilkan digunakan sebagai eksrak kasar.

**Fraksinasi aseton**

Ekstrak kasar difraksinasi secara bertahap menggunakan aseton pada suhu dingin (-12 oC) dengan konsentrasi aseton 20, 40, 60, 80%. Endapan protein yang diperoleh dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 30 menit. semua endapan fraksi dilarutkan dengan 30 mL buffer fosfat 0,2M pH 7. Larutan dialisat disentrifuge selama 10 menit, filtrat yang diperoleh disebut fraksi aseton 20% (FA 30), FA 40, FA 60, dan FA 80. Fraksi aseton selanjutnya diukur aktivitas menggunakan metode Nessler dan kadar protein menggunakan metode Lowry. Ekstrak kasar dan fraksi aseton dengan aktivitas spesifik tertinggi selanjutnya dikarakterisasi meliputi: pengaruh suhu, pH, konsentrasi substrat dan logam terhadap aktivitas urease. Fraksi aseton dengan aktivitas spesifik tertinggi ditentukan juga berat molekul (BM) menggunakan metode SDS PAGE.

**Uji aktivitas urease**

Uji aktivitas urease ([Jayaraman and Jayaraman, 2004](#_ENREF_9)) dilakukan sebagai berikut: sebanyak 1 mL urea konsentrasi 0.1% ditambah 1 mL larutan buffer fosfat pH 7 dimasukkan ke dalam tabung sampel. Sebanyak 0,05 mL larutan urease ditambahkan. Tabung diinkubasi pada suhu 35 oC selama 15 menit. Tabung didinginkan dengan es. Larutan pada tabung sampel ditambah 1 mL 2/3N H2SO4 untuk menghentikan aktivitas enzim urease dan ditambah 1mL Na-Wolframat untuk menyempurnakan kerja H2SO4. Tabung blanko diisi sebanyak 3 mL akuades. Kedua tabung disentrifuse selama 15 menit dan diambil supernatan dengan penyaringan. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Sebanyak 1,5 mL larutan masing-masing tabung sampel dan blanko diambil. Masing-masing larutan sampel dan blanko selanjutnya ditambah 250 µL reagen Nessler. Larutan kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV -Vis pada λ 500 nm. Estimasi urease dilakukan menggunakan kurva standar ammonium sulfat. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai “banyaknya ammonia yang terbentuk (µmol ) per mL per menit dari hasil hidrolisis urea oleh urease”.

**Karakterisasi Enzim**

Uji pertama yang dilakukan dalam karakterisasi adalah uji aktivitas urease pada variasi suhu. Penentuan aktivitas urease pada variasi suhu dilakukan sama seperti pada uji aktivitas namun dilakukan pada variasi suhu inkubasi yaitu 25, 30, 35, 40 dan 45 oC. Campuran diinkubasi 15 menit pada pH 7 0,2 M dan diukur aktivitasnya. Pada kondisi suhu optimum dilakukan penentuan aktivitas urease pada variasi pH dilakukan pada variasi substrat urea 0.1% pH 5, 6, 7, 8 dan 9 dalam 0,2 M larutan bufer. Untuk mempelajari pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas urease digunakan waktu 10, 15, 20, 25 dan 30 menit pada kondisi suhu dan pH optimum. Untuk mempelajari pengaruh konsentrasi substrat pada aktivitas urease digunakan konsentrasi urea 0,05; 0.075; 0,1; 0,125; 0.15 % dilarutkan pada pH optimum kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu inkubasi optimum dan diukur aktivitasnya. Untuk mempelajari pengaruh logam maka digunakan logam CaCl2, NiCl2, NaCl, CuCl2 dan EDTA pada konsentrasi 10-3, 10-4, 10-5 M. Aktivitas enzim diuji dengan menambahkan 1 mL urea 0,1% dan larutan enzim (0,05 mL enzim + 0,1 mL logam + 1,85 mL 0,2 M bufer). Campuran reaksi enzim diatur pada kondisi optimum menggunakan penambahan logam yang ditentukan.

**Analisis SDS PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis***)

Analisis SDS PAGE dilakukan pada kondisi gel poliakrilamida 12% untuk gel bawah dan poliakrilamida 5% untuk gel atas. Fraksi protein yang digunakan untuk analisis 5 µL. Pita protein dideteksi menggunakan pewarnaan *Coomassie brilliant blue*. Kit penanda molekuler (Bio-Rad) digunakan untuk menentukan BM protein.

**Analisis Data**

Analisis data menggunakan Anova untuk membedakan variasi pengulangan dan perbedaan antar perlakuan. Variabel tetap adalah, pH, suhu, konsentrasi substrat dan pengaruh logam. Masing-masing variable dianalisis dengan Anova satu faktor secara terpisah dan dilakukan bertahap. Variabel bebas adalah aktivitas urease. Hasil Anova yang menunjukkan perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Tukey dengan kepercayaan 95%.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian dimulai dengan membuat kecambah kacang panjang dengan waktu inkubasi selama 8 hari. Kecambah selanjutnya digerus menggunakan mortal dan diekstraksi menggunakan buffer fosfat 0,2M pH 7, disaring dan distirer selama 3 jam. Semua pekerjaan dilakukan dalam kondisi dingin. Larutan selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 7000 rpm selama 30 menit suhu 4 0C. Supernatan yang diperoleh disebut dengan ekstrak kasar urease. Ekstrak kasar urease selanjutnya difraksinasi menggunakan aseton dingin pada tingkat konsentrasi 20, 40, 60 dan 80%. Ekstrak kasar urease dan fraksi aseton (FA) dilakukan uji aktivitas dan kadar protein (Tabel 1).

**Tabel 1**. Data fraksinasi urease dari biji kacang panjang menggunakan aseton

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tahap pemurnian** | **Aktivitas (U/mL)** | **Protein (mg/mL)** | **Aktivitas spesifik (U/mg)** |  **Pemurnian** |
|
| Ekstrak kasar | 102.322 ± 3.789 | 0.773 ± 0.003 | 132.359 ± 4.332 | 1.00 |
| FA 20 | 92.895 ± 0.186 | 0.094 ± 0.002 | 983.793 ± 19.528 | 7.43 |
| FA 40 | 154.168 ± 1.299 | 0.381 ± 0.002 | 404.523 ± 4.307 | 3.06 |
| FA 60 | 121.068 ± 1.033 | 0.550 ± 0.003 | 220.009 ± 1.332 | 1.66 |
| FA 80 | 142.599 ± 1.649 | 0.366 ± 0.007 | 389.545 ± 5.412 | 2.94 |

Berdasarkan penelitian yang terlihat pada Tabel 1 menunjukkan bahwa setelah dilakukan fraksinasi setiap fraksi memiliki aktivitas urease dan memiliki aktivitas spesifik yang meningkat. Aktivitas spesifik yang meningkat menunjukkan bahwa enzim yang diperoleh semakin murni. Fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi yaitu FA 20 dengan aktivitas spesifik sebesar 983.793 ± 19.528 U/mg. Fraksi ini diduga mempunyai kelarutan yang relatif rendah, dengan kemurnian 7.43 lebih besar dari pada ekstrak kasarnya. Fraksi-fraksi aseton mempunyai kadar protein yang lebih rendah dari pada ekstrak kasarnya, hal ini karena fraksi aseton telah melalui proses pemisahan-pemisahan yang menyebabkan protein nonenzim yang tercampur dalam enzim berkurang.

Urease dari kacang panjang yang telah difraksinasi menggunakan aseton (FA 20) dan dilanjutkan dengan freze dryer ditentukan berat molekulnya menggunakan SDS-PAGE. Hasil (Gambar 1) menunjukkan bahwa urease dari kacang panjang belum murni dan terdiri dari beberapa pita yang diduga berukuran sekitar 25 KDa dan 17 KDa. Urease dari strain *Proteus mirabilis* terdiri dari beberapa sub unit yang berukuran 66, 45, 29 dan 15 KDa ([Mohammed et al., 2014](#_ENREF_14)).

 

 1 2

**Gambar 1**. SDS PAGE. Marker protein (1) urease FA 20 dari kacang panjang (2).

FA 20 juga dikarakterisasi meliputi penentuan kondisi optimum aktivitas urease seperti suhu, pH, waktu inkubasi, konsentrasi substrat, dan pengaruh penambahan logam terhadap aktivitas urease. Uji aktivitas dilakukan dengan metode Nessler. Metode Nessler terdiri dari suatu analisis kimiawi dengan menggunakan alat spektrofotometer. Reagen Nessler [K2HgI4] akan bereaksi dengan NH3. Reaksi yang menghasilkan larutan berwarna kuning-cokelat yang mengikuti hukum Beer-Lambert. Intensitas warna yang terjadi berbanding lurus dengan konsentrasi NH3 dalam larutan yang bersifat basa. Endapan cokelat yang dihasilkan atau pewarnaan cokelat atau kuning dihasilkan sesuai dengan jumlah ammonia atau ion ammonia yang terdapat. Endapan tersebut adalah merkurium amidoiodida basa yang terdapat dalam sampel, yang kemudian ditentukan secara spektrofotometri ([Vogel, 1951](#_ENREF_21)).

NH4+ + 2[HgI4]2- + 4OH -→ HgO.Hg(NH2)I↓ + 7I- + 3H2

**Karakterisasi Urease FA 20 dari** Biji **Kacang Panjang**

***Pengaruh suhu terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang***

Pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas urease dilakukan untuk mengetahui suhu optimum aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang. Pengujian dilakukan pada variasi suhu 25, 30, 35, 40 dan 45 oC (Gambar 2).

**Gambar 2.** Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang

 panjang*.*

 Berdasarkan data penelitian yang terlihat pada Gambar 2 dan didukung analisis ANOVA (α = 0,05), diketahui bahwa suhu 30 oC berbeda nyata dengan suhu lainnya dan mempunyai nilai aktivitas tertinggi yaitu 96.1 U/mL, sehingga dapat disimpulkan suhu optimum urease dari FA 20 adalah 30 oC. Aktivitas enzim menurun setelah tercapai suhu optimum. Aktivitas enzim bersisa 92, 84, dan 69% berturut turut pada suhu 35, 40 dan 45 0C. Menurut ([Bonner, 2007](#_ENREF_3)) banyak enzim dari tumbuhan stabil pada suhu 30-40 oC dan setelah melewati suhu tersebut komformasi enzim mengalami kerusakan.

***Pengaruh pH terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang***

Urease yang telah dimurnikan secara parsial menggunakan aseton diuji pengaruh pH terhadap aktivitas urease FA 20 pada variasi pH 5-9. Data hasil uji pengaruh pH terhadap aktivitas urease FA 20 dapat dilihat pada Gambar 3.

**Gambar 3.** Pengaruh variasi pH substrat terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang

 panjang*.*

Berdasarkan data penelitian yang terlihat pada Gambar 3 dan didukung analisis ANOVA (α = 0,05), pH optimum urease FA 20 dari biji kacang panjang optimum pada pH 7 menggunakan bufer phosphate 0,2 M dengan nilai aktivitas urease sebesar 97.501 Unit/mL. Urease FA 20 dari biji kacang panjang dikategorikan urease dengan nilai pH netral. Pada pH asam atau basa diduga ada suatu inhibitor yang mempengaruhi enzim sehingga menurunkan aktivitasnya. Sisi aktif enzim dipengaruhi oleh perubahan pH. Perubahan ini mempengaruhi ionisasi asam amino yang terlibat dalam hidrolisis substrat menjadi produk ([Amin et al., 2010](#_ENREF_1)).

 Perubahan pH inkubasi dapat menyebabkan perubahan protonasi asam amino pada sisi aktif, protonasi seringkali merupakan proses reversibel yang tidak mempengaruhi aktivitas urease pada pH optimum. Jika tidak, perubahan pH juga berakibat pada perubahan muatan asam amino penting secara struktural yang sering menyebabkan perubahan ireversibel terhadap struktur asli urease kemudian menurunkan aktivitas pada nilai pH inkubasi yang lain ([Hamzah, 2014](#_ENREF_8)).

***Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang***

Urease yang telah dimurnikan secara parsial menggunakan aseton diuji pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas urease FA 20 pada variasi waktu 10, 15, 20, 25, dan 30 menit. Data yang diperoleh tidak dibagi dengan lama waktu inkubasi. Data hasil uji pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas urease FA 20 dapat dilihat pada Gambar 4.

**Gambar 4.** Pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang

 Data pengamatan pada Gambar 4 dan didukung analisis ANOVA (α = 0,05), menunjukkan bahwa aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang semakin bertambah dengan bertambahnya waktu inkubasi dan aktivitas optimum pada waktu inkubasi 20 menit dengan nilai aktivitas urease sebesar 998.1522 Unit/mL. Hal ini dikarenakan semakin lamanya waktu inkubasi maka kontak yang terjadi antara substrat dan enzim semakin lama sehingga produk yang dihasilkan semakin banyak. Penambahan waktu inkubasi lebih lanjut menurunkan aktivitas urease. Seluruh enzim telah terjenuhi oleh substrat jika diinkubasi dalam waktu yang terlalu panjang sehingga tidak terjadi penambahan produk dan memungkinkan terjadinya reaksi balik terurainya kompleks enzim substrat menjadi enzim bebas dan substrat kembali sehingga produk yang dihasilkan semakin sedikit. Selain itu dalam beberapa kasus, penambahan produk juga memungkinkan terjadinya inhibisi balik pada enzim

***Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang***

Urease yang telah dimurnikan secara parsial menggunakan aseton diuji pengaruh konsentrasi urea terhadap aktivitas urease FA 20 pada konsentrasi urea 0.05; 0.075; 0.1; 0.125 dan 0.15%. Data hasil uji pengaruh konsentrasi urea terhadap aktivitas urease FA 20 dapat dilihat pada Gambar 5.

**Gambar 5.** Pengaruh variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji

 kacang panjang.

Data pada Gambar 5 dan didukung analisis ANOVA (α = 0,05), menunjukkan bahwa aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang bertambah dengan bertambahnya konsentrasi urea dan mencapai optimum pada konsentrasi 16.6 mM dengan nilai aktivitas 407.62 U/mL. Aktivitas enzim selanjutnya tidak lagi dipengaruhi oleh konsentrasi urea. Pola yang sama juga diamati pada urease dari biji kacang gude (*Cajanus cajan)* ([Banerjee and Aggarwal, 2012](#_ENREF_2)). Konsentrasi urea optimum pada hidrolisis urease dari biji buncis (*Cicer arietinum* L.) adalah 25 mM ([Shaela et al., 2013](#_ENREF_18)), biji kedelai adalah 64 mM ([Khan et al., 2013](#_ENREF_10)), biji kacang kapri (*Pisum Sativum* L.) adalah 120 mM ([EL-Hefnawy et al., 2014](#_ENREF_5)).

***Pengaruh penambahan EDTA dan ion logam terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang***

Uji aktivitas penambahan EDTA dan ion logam CaCl2, NaCl, NiCl2 dan CuCl2 dilakukan pada inkubasi suhu 30 oC pH 7, waktu inkubasi 20 menit dan konsentrasi urea 16.6 mM. Data pengaruh penambahan EDTA dan ion logam CaCl2, NaCl, NiCl2 dan CuCl2 masing-masing pada konsentrasi 10-3 ,10-4 , dan 10-5 M terhadap aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2**. Pengaruh penambahan EDTA dan ion logam terhadap aktivitas urease FA 20biji kacang panjang.

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagen (M)** | **Aktivitas relatif (%)** |
| Control | 100 |
| CaCl2 (10-3)  | 84 |
| CaCl2(10-4) | 90 |
| CaCl2(10-5) | 94 |
| NaCl (10-3) | 86 |
| NaCl (10-4) | 83 |
| NaCl (10-5) | 86 |
| EDTA (10-3) | 87 |
| EDTA (10-4) | 91 |
| EDTA (10-5) | 94 |
| NiCl2 (10-3) | 66 |
| NiCl2 (10-4) | 90 |
| NiCl2 (10-5) | 93 |
| CuCl2 (10-3) | 81 |
| CuCl2 (10-4) | 91 |
| CuCl2 (10-5) | 93 |

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa logam EDTA dan logam CaCl2, NaCl, NiCl2 dan CuCl2 mempengaruhi aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang. Semakin bertambah konsentrasi EDTA dan logam yang ditambah maka aktivitas urease semakin menurun. EDTA adalah pengkhelat logam sehingga menurunkan aktivitas enzim. Hal ini karena EDTA mengkhelat ion logam yang berada di sekitar sisi aktif enzim. Penambahan EDTA juga menurunkan aktivitas urease dari biji buncis (*Cicer arietinum* L.) ([Sana et al., 2009](#_ENREF_17)); urease dari jamur *Coccidioides immitis* ([Mirbod et al., 2002](#_ENREF_13)).

Logam CaCl2, NaCl, NiCl2 dan CuCl2 menurunkan aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang. Aktivitas urease FA 20 dari biji kacang panjang tidak berbeda secara signifikan dengan penambahan logam CaCl2, NiCl2 dan CuCl2  10-4 M. Begitu juga dengan penambahan logam CaCl2, NiCl2 dan CuCl2  pada konsentrasi 10-5 M. Inhibisi aktivitas urease terbesar terjadi pada penambahan logam NiCl2 10-3 M. Inhibisi aktivitas urease oleh logam Ni+2 juga terjadi pada urease dari jamur Coccidioides ([Mirbod et al., 2002](#_ENREF_13)), ([Smith et al., 1993](#_ENREF_20)). Penambahan logam CuCl2 dan NaCl juga menurunkan aktivitas urease dari biji buncis (*Cicer arietinum* L.) yang dikecambah ([Pervin et al., 2013](#_ENREF_15)).

**KESIMPULAN**

 Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh kesimpulan: aktivitas spesifik urease dari kacang panjang paling tinggi ditemukan pada Fraksi aseton (FA) 20. Analisis menggunakan SDS PAGE diperoleh beberapa pita protein yang diduga berukuran sekitar 25 KDa dan 17 KDa. Aktivitas urease optimum diperoleh pada suhu 30 oC, pH 7, waktu inkubasi 20 menit dan konsentrasi urea 16.6 mM dengan nilai aktivitas 407.62 U/mL. EDTA dan logam CaCl2, NaCl, NiCl2 dan CuCl2 pada variasi konsentrasi 10-3 ,10-4 , dan 10-5 M merupakan inhibitor urease FA 20 dari kacang panjang

**UCAPAN TERIMAKASIH**

Penelitian dilaksanakan atas bantuan dana Riset Unggulan Unsoed tahun anggaran 2017 berdasarkan keputusan Ketua LPPM Unsoed no: Kept 1246/UN23.14/PN.01.00/2017.

**DAFTAR PUSTAKA**

Amin, F., Bhatti, H. N. & Asgher, M. 2010. Partial purification and characterization of an acid invertase from saccharum officinarum l. *Pak J Bot,* 42**,** 2531-2540.

Banerjee, S. & Aggarwal, A. 2012. Isolation, partial purification, characterization and inhibition of urease (EC 3.5. 1.5) enzyme from the Cajanus cajan seeds. *Asian Journal of Bio Science,* 7**,** 203-209.

Bonner, P. L. 2007. *Protein purification*, Garland Science.

Carlini, C. R. & Polacco, J. C. 2008. Toxic properties of urease. *Crop Science,* 48**,** 1665-1672.

El-Hefnawy, M. E., Sakran, M., Ismail, A. I. & Aboelfetoh, E. F. 2014. Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating Pisum Sativum L. seeds. *BMC biochemistry,* 15**,** 15.

Fathima, F. & Jayalakshmi, S. 2012. Characterization of urease enzyme from marine bacterium Klebsiella species. *African Journal of Microbiology Research,* 6**,** 5914-5923.

Follmer, C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry,* 69**,** 18-28.

Hamzah, N. A. 2014. Main properties of urease partially purified from seeds of Syrian mesquite (Prosopis farcta). *J Babylon University Pure and Applied Sc i,* 22**,** 1071-1079.

Jayaraman, J. & Jayaraman, J. 2004. *Laboratory manual in biochemistry*, Kalyani Publishers.

Khan, M., Javed, M. M., Zahoor, S. & Haq, U. 2013. Kinetics and thermodynamic study of urease extracted from soybeans. *Biologia,* 59**,** 7-14.

Krishna, B. L., Singh, A. N., Patra, S. & Dubey, V. K. 2011. Purification, characterization and immobilization of urease from Momordica charantia seeds. *Process Biochemistry,* 46**,** 1486-1491.

Kumar, S., Dwevedi, A. & Kayastha, A. M. 2009. Immobilization of soybean (Glycine max) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 58**,** 138-145.

Mirbod, F., Schaller, R. & Cole, G. 2002. Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus Coccidioides immitis. *Medical mycology,* 40**,** 35-44.

Mohammed, S. O., Elshahaby, O. & Hafez, E. E. 2014. Characterization and purification of urease enzyme from new proteus mirabilis strain. *Journal of Advanced Scientific Research,* 5**,** 12-20.

Pervin, S., Sana, N. K., Jahan, M. G. S., Khan, M. M. H., Karim, M. R., Sarkar, B. C. & Shaha, R. K. 2013. Research & Reviews in.

Rahayu, E., Haryanto, E. & Suhartini, T. 2007. Budidaya Kacang Panjang. *Penebar Swadaya. Jakarta*.

Sana, N. K., Pervin, S., Jahan, M. G. S., Khan, M. M. H., Karim, M. R. & Shaha, R. K. 2009. Partial Purification and Characterization of Urease from Germinating Chickpea (Cicer arietinum L.) Seed. *Research & Reviews in BioSciences,* 3.

Shaela, P. M., Sana, N., Habibur, R. M. & Shaha, R. 2013. Effects of some environmental variables on urease in germinating chickpea (Cicer arietinum L.) Seed. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry,* 9.

Sharma, R., Rajput, Y. S., Kaur, S. & Tomar, S. K. 2008. A method for estimation of urea using ammonia electrode and its applicability to milk samples. *Journal of dairy research,* 75**,** 466-470.

Smith, P. T., King Jr, A. D. & Goodman, N. 1993. Isolation and characterization of urease from Aspergillus niger. *Microbiology,* 139**,** 957-962.

Vogel, A. I. 1951. *Text-book Of Quantitative Inorganic Analysis: Theory And Practice*, Longmans Green And Co.; London.