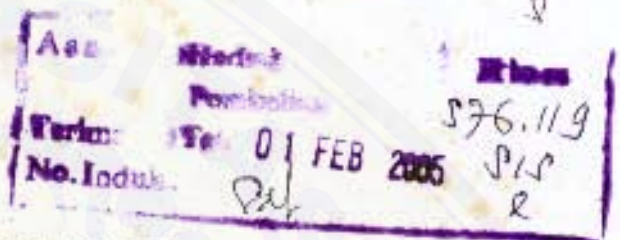




EKSTRAKSI ENZIM PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI
(*Calotropis gigantea*) **MENGGUNAKAN AMONIUM SULFAT**



KARYA ILMIAH TERTULIS
(**SKRIPSI**)

Diajukan Sebagai Syarat Untuk Menyelesaikan
Program Pendidikan Strata Satu (S1) Pada
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

Hery Siswanto

NIM : 001710101038

JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER

2005

Diterima Oleh :

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

SEBAGAI KARYA ILMIAH TERTULIS (SKRIPSI)

Dipertahankan pada :
Hari : Sabtu
Tanggal : 8 Januari 2005
Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Tim Penguji
Ketua



Yuli Witono, S.TP. MP.
NIP.132 206 028

Anggota I



Ir. Wiwik Siti Windrati, MP.
NIP.130 787 732

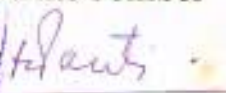
Anggota II



Ir. Yhulia Praptiningsih S, MS.
NIP.130 809 684



Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember



Siti Hartanti, MS.
NIP.130 350 763

MOTTO

"Hidup itu seperti mendaki gunung. Puncak kesuksesan dicapai melalui usaha yang tak kenal lelah untuk terus mendaki, meski terkadang langkah demi langkah yang ditapakan terasa lambat dan menyakitkan."

(Paul G. Stoltz, Phd.)

PERSEMBAHAN

“Kupersembahkan karya tulis sederhana ini untuk semua yang telah menemani dan mewarnai hidupku”

TERIMA KASIH:

Gusti Allah dan Utusannya, Keluarga Sumardi Kediri (Bapak Sumardi dan Ibunda Tasminah, mbak Sri, mas Sugeng n Rehan). **the second family MPA—Khatulistiwa** (candra dkk, rudolf dan pengurusnya, yandra dan angk 3, jalung n pengurus, angkatan 4, 5, 6 dan seterusnya...), **the friends** (dian, nisa, windra, tur, tri.com, agus, li2a, wina, somad) **adhiku kediri** (irma dan lia). **penunggu sekret** (arip n eru dols, weli-dian ukmo, wahab imatekta n mbak ika manifest). **Kawan-kawan CBI** (mas andro, bang dwi, yudi, sulthon, sururi n mas ato'). **sobat IMAKA** (suhu, t-max, riska, mas andi, juli, mbak tyas dll). **Rekan-rekan Angkatan 2000** (mbah Maul dan seluruh anggotanya). **wong kalisat-jampit** (mas eko, sigit, elany, adi, lu2k, windy, lukman n azhar). **Team Biduri 2004** (dirin, zawawi, sofi n anis). **Peneliti Muda Berbakat FTP** (siro, agus b, iksan, nani, fita, ninik, yuli, inggrit-fajs, doni bagaskoro, trio ikan: vi2, uci n ade, sari, sinta-litri dan rahmi). **teknisi Laboratorium** (mbak:ketut, sari, widi, wiem dan mas mistar). **eXplorer peOple's** (mbah mapalus, tina gemapita, nuril palapa, navi'mapensa, sri; ruri ; cempluk mahapena etc). **Komunitas Wining Eleven** (ronaldol.I, aan smith, reza KTB, yuli italiano, apunk juve, ridwan solo fc, bowo kartiko, rosi sastra dan edi toha) **the Champion Manager** (sir maulana, mr. jab, agam wenger, de elu, didik01, rian). **para Komikus sejati** (dedi magoruku kai dan bayu01). **Warkopmania** (cak yono, mustoko, faisol, sohib). **de troublemaker** (lusi, momon, tina, rika, wardi, ida, pipit, ami, ika, yance, elia, desy dan pipin). **seluruh Keluarga Besar Gang Kelinci [BTN Mastrip]** dan semua yang belum tertulis....thank for all.....



Dosen Pembimbing :

Yuli Witono, S.TP, MP (DPU)

Ir. Wiwik Siti Windrati, MP (DPA I)

Ir. Yhulia Praptiningsih, MS (DPA II)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulisan Karya Ilmiah Tertulis dengan judul **“Ekstraksi Enzim Protease Dari Tanaman Biduri Menggunakan Amonium Sulfat”** dapat terselesaikan dengan baik.

Penulisan karya ilmiah ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan akademik dalam rangka menyelesaikan program kesarjanaan (strata satu) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Dalam proses penyelesaian karya tulis ini penulis banyak mendapat bantuan dan fasilitas dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini dengan penuh rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ir. Hj. Siti Hartanti, MS., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Susijahadi, MS., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
3. Dr. Ir. Achmad Subagio, M.Agr., Ph.D., selaku Dosen Wali yang telah memberikan dorongan dan bimbingan kepada penulis selama kuliah dan penelitian.
4. Yuli Witono, S.TP., MP., selaku Dosen Pembimbing Umum (DPU) yang telah bersedia membimbing dalam penyelesaian karya tulis ini.
5. Ir. Wiwik Siti Windrati, MP., selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA I) yang telah memberikan masukan dan saran dalam penyelesaian karya tulis ini.
6. Ir. Yhulia Praptiningsih, MS., selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA II) yang telah memberikan masukan dan saran demi kesempurnaan karya tulis ini.
7. Segenap dosen Fakultas Teknologi Pertanian yang telah memberikan tambahan ilmu pengetahuan kepada penulis

8. Segenap Teknisi laboratorium di Jurusan Teknologi Pertanian yang telah membantu dan mendampingi penulis selama penelitian.
9. Segenap tim Biduri 2004 yang telah bekerja keras dalam penelitian ini.
10. Segenap pihak yang turut serta membantu dalam pelaksanaan penelitian hingga dapat terselesikanya penulisan ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan naskah ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan tulisan ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat kepada penulis khususnya dan masyarakat pada umumnya.

Jember, Januari 2005

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
MOTTO.....	iii
PERSEMBAHAN.....	iv
DOSEN PEMBIMBING.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
RINGKASAN.....	xii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tanaman Biduri.....	3
2.2 Enzim Protease.....	4
2.3 Klasifikasi Enzim Protease.....	5
2.4 Ekstraksi Enzim Protease.....	6
2.5 Ekstraksi Enzim Protease Tanaman Biduri.....	8
2.6 Aktivitas Enzim Protease.....	11

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat Penelitian	12
3.1.1 Bahan	12
3.1.2 Alat	12
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	12
3.3 Metode Penelitian	13
3.3.1 Cara Menjalankan Penelitian.....	13
3.3.2 Rancangan Penelitian.....	14
3.3.3 Parameter Pengamatan	14
3.3.3 Prosedur Analisis.....	16
3.3.3.1 Rendemen	16
3.3.3.2 Kadar Protein.....	16
3.3.3.3 Pengujian Aktivitas Protease dan Metode Lowry	17

IV. PEMBAHASAN

4.1 Rendemen Crude Protease.....	19
4.2 Kadar Protein.....	20
4.3 Aktivitas Protease.....	22
4.4 Total Aktivitas Protease	24
4.5 Aktivitas Spesifik Protease.....	25

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	26
5.2 Saran	26

DAFTAR PUSTAKA	27
-----------------------------	----

LAMPIRAN	30
-----------------------	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi Katalisis Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida.....	5
2. Diagram Alir Penelitian Ekstraksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri Menggunakan Amonium Sulfat.....	15
3. Rendemen Crude Protease pada Berbagai Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	19
4. Kadar Protein dalam Rendemen pada Berbagai Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	21
5. Aktivitas Protease pada Berbagai Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	22
6. Total Aktivitas Protease pada Berbagai Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	23
7. Aktivitas Spesifik Protease pada Berbagai Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Reagensia.....	30
2. Data dan Kurva BSA Standart.....	33
3. Data dan Kurva Tirosin Standart.....	34
4. Data Hasil Pengamatan Rendemen (%).....	35
5. Data Hasil Pengamatan Kadar Protein (%).....	35
6. Data Hasil Pengamatan Aktivitas (Unit).....	36
7. Data Hasil Pengamatan Aktivitas Spesifik (Unit/mg).....	36
8. Data Hasil Pengamatan Total Aktivitas (Unit).....	37

Hery Siswanto (001710101038) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian “**Ekstraksi Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) Menggunakan Amonium Sulfat**” di bimbing oleh **Yuli Witono, S.TP., M.P.**, dan **Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P.**

RINGKASAN

Protease merupakan enzim penghidrolisis protein yang memiliki peranan penting dalam industri pangan. Setiap tahunnya kebutuhan enzim protease terus meningkat sehingga diperlukan sumber penghasil protease baru dari jaringan hidup seperti : mikroorganisme, hewan maupun tanaman. Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan jenis tumbuhan dataran pantai yang belum optimal pemanfaatannya. Adanya aktivitas proteolitik pada getah biduri, maka dapat diharapkan sebagai alternatif sumber protease yang baru.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat kejenuhan amonium sulfat yang optimum dalam ekstraksi enzim protease. Perlakuan yang digunakan dalam ekstraksi adalah tingkat kejenuhan amonium sulfat 35%; 50%; 65%; dan 80% dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil pengamatan di analisis secara deskriptif. Parameter yang diamati meliputi: rendemen (gravimetri), kadar protein terlarut (metode lowry), aktivitas (pengujian aktivitas protease dan metode lowry), total aktivitas, dan aktivitas spesifik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat kejenuhan amonium sulfat optimal adalah 65%. Crude protease endapan yang dihasilkan memiliki rendemen 5,4%, kadar protein 29,7%, aktivitas $1,5 \text{ E}+04$ unit, aktivitas spesifik $1,8 \text{ E}+04$ unit/mg dan total aktivitas $6,7 \text{ E}+05$ unit.

kata kunci : ekstraksi, protease, rendemen, aktivitas



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Protease merupakan enzim penghidrolisis protein yang banyak digunakan dalam industri pangan, seperti pembuatan keju, penjernihan bir, pembuatan roti, pengempuk daging dan lain-lain. Pemakaian enzim protease terus meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 1983 penjualan enzim protease mencapai 40% dari total penjualan enzim dunia (Word, 1983), tahun 1995 meningkat sampai 60% dari total pemakaian enzim dunia yang bernilai lebih dari 2 milyar dolar AS (Suhartono, Lestario dan Tanoyo, 1995).

Meningkatnya kebutuhan enzim protease setiap tahunnya memacu para ahli untuk menemukan sumber-sumber enzim protease yang baru. Selama ini enzim protease di produksi dari jaringan-jaringan hidup seperti mikroorganisme, hewan maupun tanaman. Enzim protease yang diproduksi dari jaringan hewan relatif lebih mahal dan ketersediaanya tergantung pada permintaan hewan-hewan sumber enzim di pasaran (Loffler, 1986). Enzim protease dari jaringan tanaman dapat dihasilkan oleh bagian-bagian tanaman penghasil protease seperti getah pada pepaya, biji kacang-kacangan dari famili aracis hypogese, bunga tanaman labu, buah semangka dan rimpang jahe (Suhartono, 1992; Thompson, Wolf and Allen, 1973).

Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan jenis tumbuhan semak liar yang tumbuh subur di area pantai sampai ketinggian 1000 mdpl di seluruh Indonesia. Tanaman bergetah ini masih belum dimanfaatkan secara optimal, karena keberadaanya selain sebagai gulma juga sebagai makanan ternak. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman dalam satu genus dengan biduri, yaitu *Calotropis procera* telah sukses digunakan sebagai sumber enzim protease (Eskin, 1990). Menurut paradigma Chemotaksonomy, tanaman dari genus yang sama memiliki kemiripan dalam komposisi kimianya (Ray, 1989). Hasil penelitian Witono (2002) menunjukkan bahwa hasil ekstraksi getah tanaman biduri menunjukkan adanya aktivitas enzim protease, sehingga tanaman biduri dapat digunakan sebagai alternatif sumber enzim protease.

Ekstraksi enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan. Selama ini pelarut organik yang sering digunakan untuk pengendapan adalah ethanol dan aseton (Robyt and White, 1987). Ethanol bersifat mudah menguap sehingga dapat menurunkan rendemen enzim kering. Garam amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ sering digunakan dalam proses salting out protein mempunyai sifat-sifat: mudah larut, tidak beracun, memiliki daya pengendapan tinggi dan mudah digunakan dalam proses ekstraksi enzim, serta dapat menstabilkan enzim karena memiliki panas pelarutan yang rendah dan fleksibilitas terhadap pH sehingga tidak mempengaruhi bentuk dan fungsi enzim (Winarno, 1995). Keberhasilan ekstraksi enzim antara lain di pengaruhi oleh tingkat kejenuhan amonium sulfat.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahannya adalah belum di ketahui berapa tingkat kejenuhan amonium sulfat yang optimal untuk ekstraksi enzim protease tanaman biduri, sehingga perlu di lakukan penelitian.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan tingkat kejenuhan amonium sulfat yang optimal untuk ekstraksi enzim protease tanaman biduri.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memperoleh alternatif sumber enzim protease baru.
2. Memberi nilai guna dari tanaman biduri yang selama ini belum banyak di manfaatkan.
3. Memberikan informasi tentang ekstraksi enzim dari tanaman biduri menggunakan garam amonium sulfat.



IL TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Biduri

Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman lahan kering yang banyak di temukan di daerah pantai. Tanaman ini dikenal masyarakat pantai sebagai tanaman obat, tetapi sampai sekarang pemanfaatannya belum optimal. Bahkan di beberapa daerah tanaman biduri dianggap sebagai gulma (Stenis, 1992).

Sistematika biduri dalam khasanah botani menurut Tjitrosoepomo (1994) adalah sebagai berikut :

Divisio	: Spermatopyta
Klas	: Dicotyledone
Sub klas	: Monochlamydae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Calotropis</i>
Species	: <i>Calotropis gigantea</i>

Tanaman biduri merupakan tanaman bergetah, dari seluruh bagian tanaman biduri akan mengalir getah pada tempat yang dilukai atau dipotong. Getahnya berwarna putih, kental tapi tidak tajam. Dalam ilmu kedokteran, cairan getah ini mempunyai kegunaan, seperti menstimulir pematangan bisul, untuk menanggalkan gigi geraham, bahkan di beberapa daerah telah digunakan untuk menyembuhkan luka (Heyne, 1987). Hasil penelitian Witono (2000) menyatakan bahwa ekstrak kasar enzim protease dari tanaman biduri dapat mengempukkan daging dan menggumpalkan susu

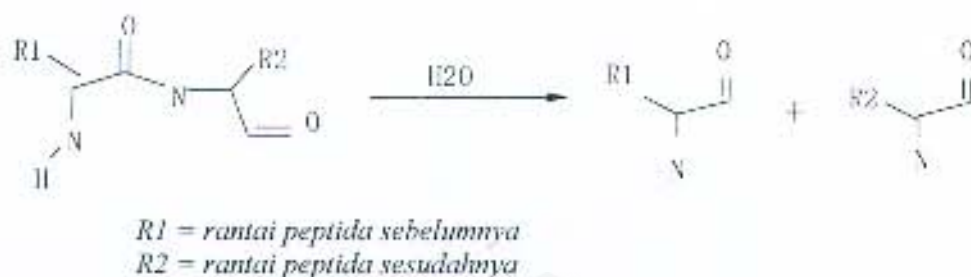
2.2 Enzim Protease

Enzim protease merupakan enzim yang memiliki peranan dan nilai ekonomi yang tinggi dalam industri pangan. Kemampuan proteolitik dari jenis enzim ini telah banyak di aplikasikan pada industri-industri pembuatan roti, produksi keju, penjernih bir, pengempuk daging dan lain sebagainya (Smith, 1995). Bahkan 60% dari total produksi enzim yang digunakan dalam pengolahan pangan, protease merupakan salah satu enzim terbesar penggunaannya setelah amilase dan glukoamilase (Nabuzo, 1988).

Pemanfaatan enzim protease terus di kembangkan seperti telah dilaporkan oleh Lazano, Combes and Ibora (1994), bahwa protease digunakan mendegradasi protein untuk memperbaiki nilai nutrisi dan fungsionalnya. Sanches and Burgos (1997) menggunakan protease untuk memperbaiki sifat gel protein bunga matahari. Izawa, Tokuyasu and Hayashi (1997), menyebutkan bahwa pemilihan enzim protease yang tepat dapat digunakan untuk memperbaiki kualitas protein hidrolisis dengan mengurangi rasa pahitnya.

Hampir semua enzim protease merupakan protein sederhana yang tersusun oleh asam amino, tanpa adanya gugus prostetik atau senyawa non protein yang lain. Enzim protease termasuk enzim yang cukup stabil, karena tahan terhadap pH dan suhu lingkungan yang agak ekstrem. Enzim protease memiliki peranan yang besar terhadap proses-proses seluler akibat kemampuan proteolitiknya. Proses tersebut meliputi tranlokasi, tukar ganti protein, sekresi protein, aktivitas enzim dan hormon.

Spesifitas enzim protease berbeda-beda dalam menghidrolisis ikatan peptida di dalam molekul protein (Fox, 1991). Beberapa enzim protease mempunyai syarat khusus untuk aktivitas proteolitiknya. Semakin spesifik suatu enzim, semakin sedikit jumlah ikatan peptida yang mampu di hidrolisis (Whitaker, 1994). Reaksi katalisis protein secara umum adalah menghidrolisis ikatan peptida protein seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi Katalisis Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida Protein.

Berdasarkan spesifitasnya protease dapat digolongkan menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Istilah eksopeptidase digunakan untuk enzim yang memecah asam amino terminal dari salah satu ujung protein dengan cara menghidrolisis ikatan peptidanya. Sedangkan endopeptidase adalah enzim yang menyerang ikatan peptida yang terdapat pada bagian dalam protein (Loffler, 1986; Kaneda *et al.*, 1997).

2.3 Klasifikasi Enzim Protease

Enzim protease di klasifikasikan berdasarkan aspek-aspek tertentu seperti: sumber enzim, lokasi dalam jaringan, spesifitasnya, lingkungan pH dan daya kerja serta sifat-sifat kimia sisi aktifnya. Berdasarkan sumbernya, enzim protease digolongkan menjadi : (1) enzim protease mikroba ; (2) enzim protease tanaman seperti : papain dari getah pepaya, bromelin dari buah nanas dan fisin dari famili ficus, serta (3) enzim protease hewan seperti : renin dari abomasum anak sapi dan kathepsin dari liver atau hepato pankreas ikan (Kolodziejaska *et al.*, 1994 ; Choudury and Gogoi, 1996).

Dalam perkembangan selanjutnya enzim protease di bagi dalam dua golongan besar, yaitu ekstraseluler dan intraseluler. Dalam jaringan enzim ekstraseluler berperan dalam pemecahan polimer protein yang berukuran besar menjadi kecil (Kaneda *et al.*, 1997). Sedangkan jenis protease intraseluler berperan dalam proses pembentukan dan germinasi spora, proses pematangan protein, proses fertilisasi pada mamalia, proses modifikasi serta sekresi berbagai enzim (Loffler, 1986).

Dilihat dari letak pemecahan ikatan peptida, protease di bedakan menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase menguraikan protein dari ujung rantai sehingga dihasilkan satu asam amino dan sisa peptida. Pada tingkat lanjut, enzim ini akan menghasilkan sejumlah asam amino. Sedangkan golongan endopeptidase menguraikan ikatan peptida pada bagian dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida. Oleh karena itu, kebanyakan endopeptidase hanya akan menghasilkan asam amino dalam jumlah terbatas (Suhartono, 1992).

Protease dapat dibedakan menjadi protease asam, protease netral dan protease alkalis berdasarkan lingkungan pH-nya. Menurut Suhartono *et al.* (1995) berdasarkan sifat-sifat kimia sisi aktifnya, enzim protease dibedakan menjadi : (1) protease serin, enzim yang mempunyai residu serin pada sisi aktifnya; (2) protease sulfidril, enzim yang aktifitasnya tergantung dari adanya gugus sulfidril pada sisi aktifnya, serta sensitifitasnya menunjukkan pemotongan pada sisi karboksil asam amino basa; (3) protease logam, enzim yang aktivitasnya tergantung pada metal yang terkait pada molekul proteinnya misalnya: Mg, Zn, Fe, Cad, Ni dan Cu, serta (3) protease asam, enzim yang mempunyai pH optimal di antara 2-4.

2.4 Ekstraksi Enzim Protease

Ekstraksi enzim bertujuan untuk memisahkan enzim dari jaringan tempat asalnya. Kebanyakan enzim tampak jelas menunjukkan aktivitasnya bila dalam keadaan sudah diisolasi dan dimurnikan. Prosedur ekstraksi tergantung pada tipe organisme sebagai sumber enzimnya. Sumber enzim dari jaringan hewan harus diekstraksi sesegera mungkin setelah hewan mati dan tetap di jaga pada suhu dingin untuk mencegah autolisis. Ekstraksi enzim intraseluler dari mikroorganisme memerlukan cara-cara khusus, karena sel-selnya sulit di pecah (Palmer, 1991).

Pada tanaman, ekstraksi protease tergantung letak enzim dalam jaringannya. Enzim-enzim yang tergolong ekstraseluler, ekstraksi dilakukan dengan memisahkan sel-sel melalui sentrifugasi cairan yang mengandung enzim, kemudian dimurnikan lebih lanjut. Enzim ekstraseluler juga sering diekstraksi dengan cara penyadapan, misalnya papain dan fisin. Apabila enzim yang akan diekstraksi terletak di dalam sel (intraseluler), langkah pertama yang dilakukan adalah memecah dinding sel atau membran sel dan kemudian mengekstraknya (Whitaker, 1994).

Ekstraksi enzim dilakukan pada suhu rendah (kurang lebih 4°C), mengingat enzim sering tidak stabil pada suhu yang lebih tinggi. Karena protein enzim mudah mengalami denaturasi pada suhu yang tinggi. Denaturasi pada enzim dapat merubah struktur protein sehingga dapat mengganggu aktivitas katalitiknya (Harper, *et al.*, 1980). Selain itu suhu dingin yang mendekati 0°C dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Whitaker, 1994).

Kondisi ekstraksi harus dijaga pada kisaran pH tertentu, dan dijaga agar kondisi suhu rendah pada setiap tahapnya, oleh karena itu buffer diperlukan di dalam cairan pengekstrak (Palmer, 1991). Whitaker (1994) menyatakan bahwa ekstraksi enzim intraseluler dari jaringan tanaman harus ditambahkan buffer untuk menjaga pH disekitar netral. Buffer ini diperlukan untuk melindungi enzim dari pengaruh asam yang dilepaskan oleh sel-sel selama ekstraksi.

Ethanol dan aseton merupakan pelarut organik yang paling banyak digunakan untuk ekstraksi enzim (Schwimmer, 1981). Penambahan pelarut organik ke dalam larutan protein akan mengurangi kelarutan protein dalam air dengan cara menurunkan konstanta dielektrik medium, sehingga interaksi antara molekul protein lebih tinggi daripada interaksi protein dengan air. Kondisi ini terus bertahan sampai mencapai titik tertentu dimana protein mengendap (Wiseman, 1985). Selain itu ekstraksi enzim protease juga dapat dilakukan dengan cara mengendapkan protein enzim.

Garam amonium sulfat sering digunakan untuk salting-out protein. Karena memiliki kelarutan yang tinggi, tidak beracun untuk kebanyakan enzim dan mampu menstabilkan enzim (Fox, 1991). Penggunaan amonium sulfat pada pemurnian enzim telah dilaporkan oleh beberapa peneliti antara lain : Noda, Kayonagi and Kamiya (1994) menggunakan amonium sulfat dengan kejenuhan 50% untuk pemurnian enzim dari buah melon. Abe *et al.* (1997) menggunakan amonium sulfat kejenuhan 30-60% untuk mengekstrak dan memurnikan *oryzasin* dari biji padi. Tavasolian and Shabbah (1979) mengendapkan enzim dari biji *Cartamus tinctorius* dengan amonium sulfat kejenuhan 50%.

Dialisis adalah salah satu cara dalam pemurnian protein. Menurut Lehninger (1982) pada dialisis larutan protein ditahan dalam kantung selofan yang bersifat semi permeable. Jika kantung tersebut dimasukan dalam medium maka molekul-molekul kecil dalam kantung seperti garam, glukosa, ion logam akan keluar melewati membran secara difusi. Tetapi molekul besar seperti protein akan tertahan dalam kantung. Dengan mengganti medium diluar kantung beberapa kali, konsentrasi molekul kecil dalam larutan protein dapat diturunkan sampai ke jumlah yang amat kecil.

Pada akhir proses ekstraksi dilakukan pengeringan untuk meningkatkan daya simpan enzim. Untuk produksi papain, getah pepaya biasanya dikeringkan secara tradisional dengan sinar matahari atau dengan oven vakum. Getah pepaya yang dikeringkan dengan menggunakan oven vakum mempunyai daya simpan 20 bulan dengan aktivitas protease yang cukup tinggi (Suhartono, 1992). Menurut Baga (1998) pengeringan beku (freeze drying) dan pengeringan semprot (spray drying) dapat menghasilkan papain dengan kualitas yang lebih baik.

2.5 Ekstraksi Enzim Protease Tanaman Biduri

Enzim protease biduri sama seperti halnya enzim papain yang menurut Suhartono (1992) tergolong enzim ekstraseluler. Bedanya enzim papain bersumber dari getah tanaman pepaya baik yang berada di daun, batang maupun buahnya sedangkan enzim protease biduri diekstrak dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*). Witono (2000) melaporkan bahwa untuk mengisolasi

enzim protease getah biduri dengan memotong tanaman biduri pada bagian atas (pucuknya), getahnya ditampung, disimpan atau dibawa dalam kondisi dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Nafi (2002) menambahkan bahwa bagian getah tanaman biduri menghasilkan enzim protease yang tertinggi jika dibandingkan dengan daun dan batang tanaman biduri.

Secara umum metode ekstraksi enzim protease dari tanaman biduri tidak berbeda dengan enzim lain yang berasal dari tanaman. Beberapa tahap yang dilakukan dalam ekstraksi enzim antara lain penyadapan, penyaringan, pengenceran, ekstraksi, sentrifugasi, dialisis, dan pengeringan.

Proses ekstraksi enzim diawali dengan penyadapan getah dari tanaman biduri dengan cara melukai atau memotong ujung batang tanaman. Getah yang menetes ditampung dalam wadah dan di simpan pada kondisi dingin. Penyadapan getah yang baik dilakukan pada pagi hari sebelum matahari terbit, karena aktivitas transpirasi pada tumbuhan masih rendah. Transpirasi pada tanaman biduri dapat mempengaruhi kandungan air dalam batang, sehingga berpengaruh terhadap kepekatan getah. Menurut Kimball (1994) laju transpirasi dipengaruhi oleh suhu dimana tanaman lebih cepat bertranspirasi pada suhu yang tinggi. Tingginya laju transpirasi pada siang hari menyebabkan getah menjadi pekat dan sulit di sadap. Menurut Suhartono (1992) penyadapan getah pepaya yang dilakukan pada pukul 05.00 sampai 08.00 mampu menghasilkan lateks dalam jumlah dan kualitas yang optimal.

Penyaringan dilakukan pada getah biduri ditujukan untuk memisahkan kotoran-kotoran seperti serangga, ranting-ranting kecil atau potongan daun yang mungkin terbawa saat penyadapan. Pengenceran dengan buffer fosfat pH netral dimaksudkan untuk menurunkan kepekatan filtrat. Selain itu juga untuk mempertahankan kestabilan enzim dari pengaruh perubahan lingkungan.

Enzim protease tanaman biduri dapat di ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik seperti alkohol, dietil eter dan aseton. Nafi (2002) melaporkan bahwa ekstraksi menggunakan ethanol dengan konsentrasi perbandingan sampel dan pelarut 1:3 menghasilkan rendemen sebesar 0,502%, aktivitas sebesar 0,080 unit/mg enzim, dan total aktivitas sebesar $3,91 \cdot 10^4$ unit enzim/g bahan.

Ekstraksi enzim protease juga dapat dilakukan dengan cara pengendapan protein enzim (salting-out). Garam amonium sulfat sering di gunakan dalam salting-out protein. Penambahan garam dalam larutan protein dapat mempengaruhi kelarutan protein. Salting-in terjadi apabila konsentrasi garam yang di tambahkan relatif rendah, sebaliknya akan terjadi salting-out jika konsentrasi garam yang ditambahkan relatif tinggi (Copeland, 1994). Dalam larutan protein garam akan mengalami ionisasi karena interaksinya dengan molekul air. Menurut Tropp (1997) pada salting-in ion-ion garam berikatan dengan residu asam amino dari molekul protein. Tetapi dalam konsentrasi yang tinggi ion-ion garam akan berikatan dengan molekul air sehingga menurunkan interaksi molekul protein dengan pelarut (salting-out).

Ekstraksi enzim protease yang menggunakan garam amonium sulfat, harus dilakukan dialisis untuk memisahkan ion-ion garam dari protein enzim yang mengendap bersama-sama ketika salting-out. Kantung dialisis bersifat semipermeabel yaitu tidak bisa dilewati molekul dengan berat lebih 12.000-14.000 yang dilakukan dalam suatu medium (air destilat) (Suhartono, 1992). Menurut Chang (1981) dialisis dapat dilakukan dalam medium buffer phospat pH netral.

Pengeringan pada enzim dapat meningkatkan daya simpan. Menurut Nafi (2002) pengeringan enzim protease dari tanaman biduri dapat di lakukan dengan freeze drying selama 24 jam dapat menjaga kestabilan enzim dari pengaruh denaturasi. Freeze drying adalah sistem pengeringan beku yang menggunakan udara vakum bertekanan rendah untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam bahan yang telah beku. Pengeringan tidak dilakukan dengan pemanasan, sehingga sangat efektif untuk mengeringkan bahan-bahan protein seperti enzim protease.

2.6 Aktivitas Enzim Protease

Kecepatan reaksi substrat yang dikatalisis enzim dapat ditentukan secara kuantitatif, yang dinyatakan sebagai aktivitas enzim. Aktivitas enzim ini ditentukan berdasarkan kecepatan penguraian substrat maupun kecepatan pembentukan produk. Aktivitas enzim dinyatakan dalam μmol substrat yang terurai atau produk yang terbentuk pada satuan waktu tertentu (Rohyt and White, 1987).

Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan inkubasi pada suhu tertentu. beberapa suhu pengujian enzim menggunakan suhu 37°C , namun belum ada standar suhu pengujian yang spesifik. Oleh karena itu suhu pengujian yang dipergunakan harus di sebutkan dalam kasus-kasus pengujian aktivitas enzim (Palmer, 1991). Beberapa penelitian yang menggunakan suhu inkubasi 37°C antara lain pengujian aktivitas protease yang di isolasi dari udang (Jiang et al, 1991), protease buah melon (Noda, Koyanagi and Kamiya, 1994) dan protease dari biji padi (Abe et al, 1997).

Pengujian aktivitas protease dapat dilakukan dengan menganalisa hasil hidrolisis enzim protease pada substrat dengan metode lowry. Menurut Apriyanto dkk (1989) prinsip metode lowry adalah reaksi antara Cu^{2+} dengan ikatan peptida dan reaksi asam fosmolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin dan triptofan (merupakan residu protein) akan menghasilkan warna biru. Warna yang terbentuk dalam larutan terutama dari hasil reduksi fosmolibdat dan fosfotungstat. Oleh karena itu warna yang terbentuk tergantung pada kadar tirosin dan triptofan dalam protein. Metode Lowry mempunyai keuntungan 100x lebih sensitif dari metode biuret.



III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah getah dari pucuk batang tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang di dapat dari pantai Watu Ulo kecamatan Ambulu kabupaten Jember. Bahan kimia yang digunakan adalah amonium sulfat, buffer phospat pH 7 (Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4 0,05 M), tirosin standar, BSA standart, soluble casein, larutan NaOH 2N, larutan TCA 15% reagen mix-lowry (Na_2CO_3 , asam tartat dan CuSO_4 1%), reagen follin dan aquadest.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Sigma dialysis tubing dan penjepitnya, centrifuge Medifriger dan tabungnya, centrifuge Yenaco model YC-1180 dan tabungnya, freeze drying Snijder Scientific tipe 2040 (Belanda), spectronic 21D Melton Roy dan kuvetnya, pH meter Jen Way tipe 3320 (Jerman), magnetik stirer Stuart Scientific dan batu stirernya, vortex Thermolyne type 16700 Mixer, lemari pendingin, waterbath GFL 1083, neraca analitik Ohaus, pemanas listrik Gerhardt, spatula, pisau stainless steel, beaker glass 100 ml dan 1000 ml, labu ukur 50 ml, botol film dan alat-alat lain yang terkait.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Mutu Divisi Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, mulai bulan April – Agustus 2004.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Cara Menjalankan Penelitian

a. Filtrat Getah

Filtrat getah diperoleh dari getah tanaman biduri yang telah dihilangkan gum-nya. Getah biduri diencerkan dengan larutan buffer fosfat 0,05 M pH = 7 dengan perbandingan 1 gram getah biduri : 5 ml larutan buffer fosfat. Pengenceran ini dimaksudkan untuk menurunkan kepekatan filtrat. Selain itu larutan buffer fosfat juga dapat mencegah perubahan pH secara ekstrem yang dapat menyebabkan denaturasi protein. Pemisahan gum pada getah dilakukan dengan sentrifugasi dingin pada suhu 4°C. Selanjutnya filtrat getah di pisahkan dari endapannya yang sebagian besar mengandung gum dan komponen selain protein.

b. Crude Protease

Ekstraksi enzim protease dilakukan untuk memisahkan molekul protein dari larutan supernatan protease dengan garam amonium sulfat. Tingkat kejenuhan amonium sulfat yang digunakan adalah 35% ; 50% ; 65%; dan 80%. Garam amonium sulfat ditambahkan dalam bentuk padatan supaya volume larutan tidak menjadi lebih besar. Pemisahan protein dalam supernatan protease dapat di percepat dengan sentrifugasi dingin pada suhu 4°C. Supernatan dan endapan yang diperoleh dari sentrifugasi di dialisis dengan larutan buffer fosfat 0,05 M pH = 7 selama 3 hari. Dialisis dilakukan untuk memisahkan protein enzim dari ion garam, ion logam dan molekul-molekul kecil, sehingga dapat memurnikan protein enzim. Filtrat dialisis selanjutnya dikeringkan dengan freeze drying untuk mendapatkan enzim kering (crude enzim) yang memiliki stabilitas tinggi.

3.3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan mengekstrak getah tanaman biduri dengan 4 perlakuan perbedaan konsentrasi amonium sulfat dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil pengamatan di analisis secara deskriptif (Suryabrata, 1994). Ketiga perlakuan masing-masing adalah :

E_1 = ekstraksi pada tingkat kejenuhan 35% amonium sulfat

E_2 = ekstraksi pada tingkat kejenuhan 50% amonium sulfat

E_3 = ekstraksi dengan tingkat kejenuhan 65% amonium sulfat

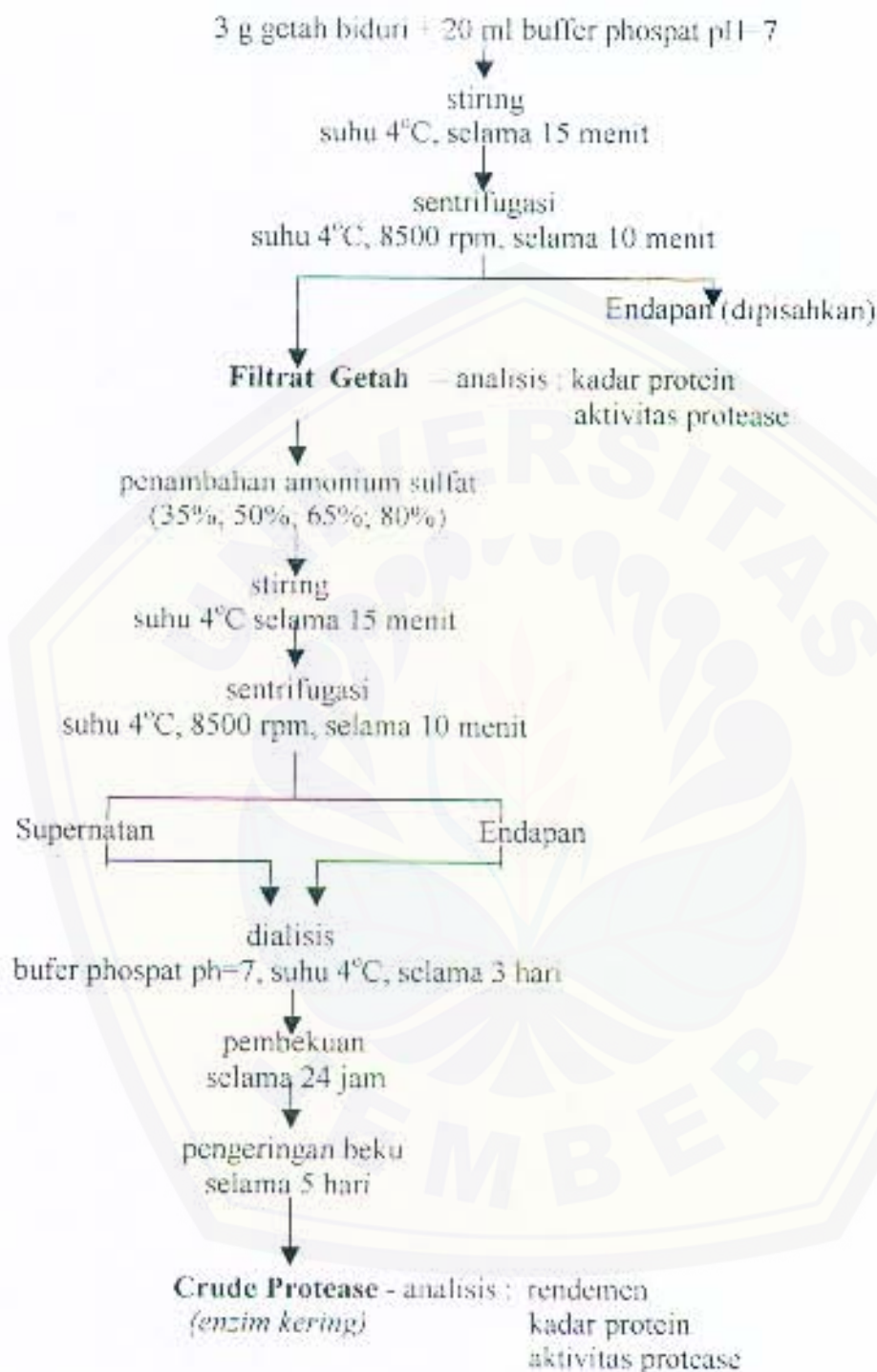
E_4 = ekstraksi dengan tingkat kejenuhan 80% amonium sulfat

Tingkat kejenuhan larutan dapat dicapai dengan menambahkan sejumlah garam amonium sulfat (gram) seperti terlihat pada Lampiran 1. Adapun diagram alir pelaksanaan penelitian sebagaimana tertera pada Gambar 2.

3.4 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah :

- Rendemen (gravimetri).
- Kadar protein (metode lowry).
- Aktivitas (pengujian aktivitas protease dan metode lowry).
- Total aktivitas
- Aktivitas spesifik.



Gambar 2. Diagram Alir Penelitian Ekstraksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri dengan Amonium Sulfat.

3.5 Prosedur Analisis

3.5.1 Rendemen

Pengamatan rendemen dilakukan dengan menimbang crude protease kering kemudian dibandingkan dengan berat sampel dikalikan 100%. Penghitungan rendemen dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

keterangan A: berat ekstrak crude protease (gram)

B: berat getah (gram)

3.5.2 Kadar Protein (Metode Lowry, Walker., 1994)

Pengamatan kadar protein enzim protease dilakukan menggunakan metode lowry (Walker, 1994). Pengamatan dilakukan dengan mengambil sampel sebesar 0,125 ml untuk filtrat getah atau 0,001 gram sampel crude protease. Kemudian dilakukan hidrolisis protein untuk mendapatkan protein terlarut menggunakan 0,100 ml NaOH 2N pada suhu 100^o C selama 10 menit lalu didinginkan dengan air dingin. Protein terlarut yang dihasilkan lalu direaksikan dengan 2 ml reagen mix-lowry dan didiamkan selama 10 menit. Menambahkan 0,25 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Tera dengan aquadest sampai volume 5 ml kemudian baca absorbannya dengan spektrometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar BSA untuk dihitung kadar proteinnya.

3.5.3 Pengujian Aktivitas Protease (Leewit and Pornsuksawang, 1980) dan Metode Lowry (Walker, 1994)

Pengujian aktivitas enzim protease menggunakan substrat soluble casein pada pH optimal, dilakukan dengan menimbang 0,01 gr soluble casein dalam tabung sentrifuse lalu dicampur dengan 3 ml buffer phospat pH 7. Pada suhu 37°C kemudian dilakukan pra inkubasi selama 4 menit. Menambahkan sampel sebesar 0,250 ml untuk filtrat getah atau 0,005 gr untuk sampel crude protease ke dalam campuran, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Pada akhir inkubasi reaksi hidrolisis dihentikan dengan larutan TCA 15% yang ditambahkan sebanyak 1 ml. Sebagai kontrol tidak dilakukan inkubasi dan reaksi hidrolisis dilakukan pada waktu 0 menit, dimana penambahan larutan TCA 15% dilakukan sebelum penambahan supernatan protease. Sentrifuse pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh diambil 1 ml lalu di tambahkan 2,5 ml mix- lowry dan dibiarkan 10 menit. Menambahkan 0,250 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Tera dengan aquadest sampai volume 5 ml dan baca absorbannya dengan spektrometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar tirosin untuk dihitung aktivitas hidrolisisnya.

Aktivitas protease dinyatakan dalam unit aktivitas, dimana satu unit berarti peningkatan konsentrasi protein terlarut sejumlah satu μmol pada setiap menit waktu inkubasi. Aktivitas spesifik enzim dinyatakan dalam unit aktivitas per miligram protein enzim. Perhitungan aktivitas spesifik enzim dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$1 \text{ unit aktivitas} = \frac{[C]}{t}$$

keterangan [C] : kenaikan konsentrasi protein terlarut (μmol tirosin)
t : waktu hidrolisis (menit)

Unit = 1 μmol tirosin yang di bebaskan dari substrat oleh setiap mg enzim pada suhu 37°C per menit.

Total aktivitas dinyatakan sebagai jumlah unit aktivitas enzim yang terdapat dalam total berat sampel.

$$\text{Total Aktivitas} = \text{Aktivitas} \times \frac{\text{Berat Crude Protease}}{\text{Berat Sampel}} \quad (\text{unit})$$

Aktivitas spesifik dinyatakan sebagai total aktivitas protease per 1 gram total proteinnya.

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Total Aktivitas}}{\text{Total Protein}} \quad (\text{unit/mg protein})$$

$$\text{Total Protein} = \text{mg protein (BSA)} \times \frac{\text{Berat Crude Enzim}}{\text{Berat Sampel}}$$



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa tingkat kejenuhan amonium sulfat optimal untuk ekstraksi enzim protease dari tanaman biduri sebesar 65%. Crude protease endapan yang dihasilkan memiliki rendemen sebesar 5,4%, kadar protein 1,6%, aktivitas 1,5 E+04 unit, total aktivitas 6,7 E+05 unit dan aktivitas spesifik.

5.2 Saran

Perlu dilakukan purifikasi lebih lanjut untuk meningkatkan kemurnian enzim tanaman biduri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, H., T. Asakura, H. Watanabe, and S. Arai (1997): **Oryzasin as an Aspartic Proteinase Occuring in Rice Seeds : Purification Characterization and Application to Milk Clotting.** *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4), 1070-1075.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.I. Puspitasari, Sedarnawati, S. Budiyanto (1989): **Analisis Pangan.** P.A.U. Pangan dan Gizi. I.P.B. Bogor
- Baga, K.M. (1998): **Bertanam Pepaya.** Penerbit Swadaya. Jakarta.
- Chang, R. (1981): **Physical Chemistry, With Applications to Biological System.** 2nd ed. London.
- Choudury, G.S. and B.K. Gogoi (1996): **Protease Inactivation in Fish Muscle by High Moisture Twin Screw Extrusion.** *J. Food Sci.* 61 (6), 1219-1222.
- Copeland, R. A. (1994): **Method for Protein Analysis, A Practical Guide to Laboratory Protocols.** Chapman and Hall. International Thompson Publishing. New York, United States of America.
- Drauz, K. and H. Waldmann (1995): **Enzym Catalysis Inorganic Synthesis.** VCH Verlagsgesellschaft mbh. Weinheim. Germany.
- Eskin, N.A.M. (1990): **Biochemistry of Food.** Second Edition. Academic Press. Inc. New York.
- Fox, P.F. (1991): **Food Enzymology.** Elsevier Applied science. New York.
- Harper, A. H., V.W. Rodwell, P.A. Mayer (1980): **Biokimia : Review of Pysiological Chemistry.** Lange Medical Publication. California. USA.
- Heyne, K. (1987): **Tumbuhan Berguna Indonesia III.** Terjemahan. Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kehutanan R.I. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta.
- Izawa, N., K. Tokuyasu and K. Hayashi (1997): **Debittering of protein Hidrolysates Using *Aeromonas caviae* Aminopeptidase.** *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3), 543-545.
- Jiang, S.T., M.W. Moody and H.C. Chen (1991): **Purification and Charaterization of Protease from Digestive Tract of Grass Shrimp.** *J. Food Sci.*, 56 (2), 2100-2102.

- Kaneda, Makoto, Yonezawa and Hirro (1997) **Purification and Some Properties of a Protease from The Sarcocarp of Musk Melon Fruit**. *J. Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (12), 2100-2102.
- Kimball, J. W. (1994): **Biologi**. Terjemahan Tjitrosomo, S.S. dan Sugiri, N. Institut Pertanian Bogor. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Kolodziejska, Szie, Magdalena and S. Sikorski (1994). **Proteolytik Activity of Crude Enzyme Extracts of Squid *illex argentinus* liver**. *J. Food Biochem.*, 18, 43-53.
- Lazano, P., D. Combes and J.L. Iborra (1994): **Food Protein Nutrient Improvement by Protease at Reduced water activity**. *J. Food Sci.*, 59 (4), 876-880.
- Leewit, S. and Pornsuksawang (1988): **Protease from Bacteria in Soybean Whwy. Proc. Food Science and Technology in Industrial Development**. Vol. 1. (Ed Manepoon). Pp. 751-754. Thailand.
- Lehninger, A.L., (1982): **Principles of Biochemistry**. Worth Publisher Inc. United States of America.
- Loffler, A. (1986): **Proteolytic Enzymes ; Sources and Applications**. *J. Food Tech.*, 40, 63-70.
- Mathews, C.K. and K.E. Van Holde (1990) **Biochemistry**. United States of America. The Benjamin/Cumming Publishing Company Inc.
- Nafi³, A. (2002) **Ekstraksi Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) Dengan Pelarut Etanol**. Skripsi Universitas Jember. Jember.
- Nabuzo, T (1988): **Recent Topics on Enzyme Utilization for Food in Japan**. *Proc. Food Science and Technology in Industrial Development*. Vol. 1. (Ed Manepon), 126-137. Thailand.
- Noda, K., M. Koyanagi and C. Kamiya (1994): **Purification and Characterization of an Endoprotease from Melon Fruit**. *J. Food Sci.*, 59 (3), 585-587.
- Palmer, T. (1991) **Understanding Enzymes**. Third Edition, Ellis Haward. New York.
- Ray, J. (1989): **Plant Sysematiks**. Me Graw Hill Publisher. Toronto. New York.
- Robyt, J.F. and B.S. White (1987). **Biochemical Technic Theory and Practical**. Kluwer Academic Publisher. New York.

- Sanches, A.C. and J. Burgos (1997): **Factor Affecting the Gelation Properties of Hydrolyzed Sunflower Proteins**. *J. Food Sci.*, 62 (2), 284-288.
- Schwimmer, S. (1981): **Source Book of Food Enzymology**, The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, U.S.A.
- Smith, J.E. (1995): **Bioteknologi**. Terjemahan. Hartono, EGC. Jakarta.
- Stenis, T. (1992): **Flora**. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Suhartono, M.T. (1992): **Protease**. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Suhartono, M.T., Lestario, L.N. dan Tanoyo, T. (1995): **Study on Protease from *Aspergillus oryzae* Isolated from Soy Sauce Processing in Indonesia**. *J. Indonesia Trop. Agric.*, 6 (2), 21-25
- Suryabrata, S. (1994): **Metodologi Penelitian**. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Tavasolian, B. and F. Shabbah (1979): **Ekstraksi dan Partial Purification of Milk Coagulating Enzyme from *Cartamus tinctorius* Seed**. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (1), 190-191.
- Thompson, E.H., I.D. Wolf and C.E. Allen (1973): **Ginger Rhizoma : A New Source of Proteolytic Enzym**. *J. Food Sci.*, 38. 652-655.
- Tjitrosoepomo, G. (1994): **Principle of Enzymologi for The Food Science**. Second Edition. Marcel Decker. New York.
- Tropp, B.E. (1997): **Biochemistry: concepts and application**. Brooks/Cole Publishing Company. United States of America.
- Walker, J. M. (1994): **The Protein Protocols Handbook**. University of Hertfordshire, Hatfield, United Kingdom.
- Whitaker, J.r. (1994): **Principle of Enzymology for The Food Science**. Second Edition. Mascel Decker. New York.
- Winarno, F.G. (1995): **Enzim Pangan**. P.T. Gramedia Pustaka. Jakarta
- Wiseman, A. (1985): **Enzyme Industrial Applications**. John Wiley an Sons. New York
- Witono, Y. (2000): **Ekstraksi dan Karakterisasi Enzim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea Dryan*)**. Tesis Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Word, O.P. (1983) **Properties of Microbial Protease. In Microbial Enzyme and Biotechnology**. (Ed Forgety). Pp. 56-102. Appl. Publ. London.

Lampiran 1. Pembuatan Reagensia (Darwis dan Sukara, 1990; Sudarmadji dkk, 1991)

1. Pembuatan stok larutan standart

a. Tirosin standart

10 mg tirosin dilarutkan dalam 6 ml HCL 0,1 N, setelah tirosin larut di encerkan dengan aquades sampai volumenya 10 ml.

b. Bovine Serum Albumin (BSA)

50 mg Bovine Serum Albumin (BSA) di larutkan dengan aquades sampai volumenya 10 ml.

2. Pembuatan buffer phosfat

a. NaH_2PO_4 0,05 M

Menimbang 6,8995 gram NaH_2PO_4 dilarutkan sampai 1 liter aquades.

b. Na_2HPO_4 0,05 M

Menimbang 17,907 gram Na_2HPO_4 dilarutkan sampai 1 liter aquades.

3. Penentuan tingkat kejenuhan amonium sulfat

Berdasarkan tabel kejenuhan amonium sulfat, tingkat kejenuhan 100% pada 1 liter larutan sampel dicapai dengan penambahan 767 gram garam amonium sulfat, sehingga untuk mencapai :

a. Tingkat kejenuhan 35%, diperlukan 209 gram amonium sulfat per 1 liter larutan.

b. Tingkat kejenuhan 50%, diperlukan 351 gram amonium sulfat per 1 liter larutan.

c. Tingkat kejenuhan 65%, diperlukan 430 gram amonium sulfat per 1 liter larutan.

d. Tingkat kejenuhan 80%, diperlukan 561 gram amonium sulfat per 1 liter larutan.

Tabel Kejenuhan Amonium Sulfat.

		Kejenuhan Amonium Sulfat (%)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		gram Amonium Sulfat/1 liter larutan																
Kejenuhan Amonium Sulfat (%)	10	56	114	114	176	196	239	245	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	20		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	25			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	30				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	33					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	35						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	40							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	45								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	50									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	55										33	66	101	137	176	214	302	392
	60											33	67	103	141	179	264	353
	65												34	69	105	143	227	314
70													34	70	107	190	275	
75														35	72	153	237	
80															36	115	198	
90																77	157	
100																	79	

4. Pembuatan larutan TCA 15% ($^{b/v}$)

Menimbang 15 gram tri kloro asetat (TCA) dilarutkan dengan aquades sampai volume 100 ml.

5. Pembuatan reagen mix-lowry

Menimbang 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 ml aquades, setelah larut di tambahkan 1 ml CuSO_4 1% dan 1 ml Na K Tartar 2 %.

6. Pembuatan reagen follin

Melarutkan 25 ml follin dalam aquades sampai volume 100 ml.

7. Pembuatan NaOH 2 N

Melarutkan 8 gram NaOH dalam aquades sampai volume 100 ml.

8. Pembuatan HCl 0,1 N

Membuat HCl 0,1 N dari larutan stok HCl 37% adalah sebagai berikut :

Diketahui BM HCl = 36,5 g/mol ; BJ = $1,187 \times 10^3$ g/lit maka berat HCl dalam 1 liter larutan = $0,37 \times 1,187 \times 10^3 = 439,19$ g/lit maka molaritas HCl = berat HCl (BM HCl x 1 liter) = $439,19 / 36,5 = 12,003$ M.

Untuk membuat 100 ml HCl 0,1 N dari HCl 37% diperlukan larutan HCl sebanyak :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \times 12,003 = 100 \times 0,1$$

$$V_1 = 0,83 \text{ ml}$$

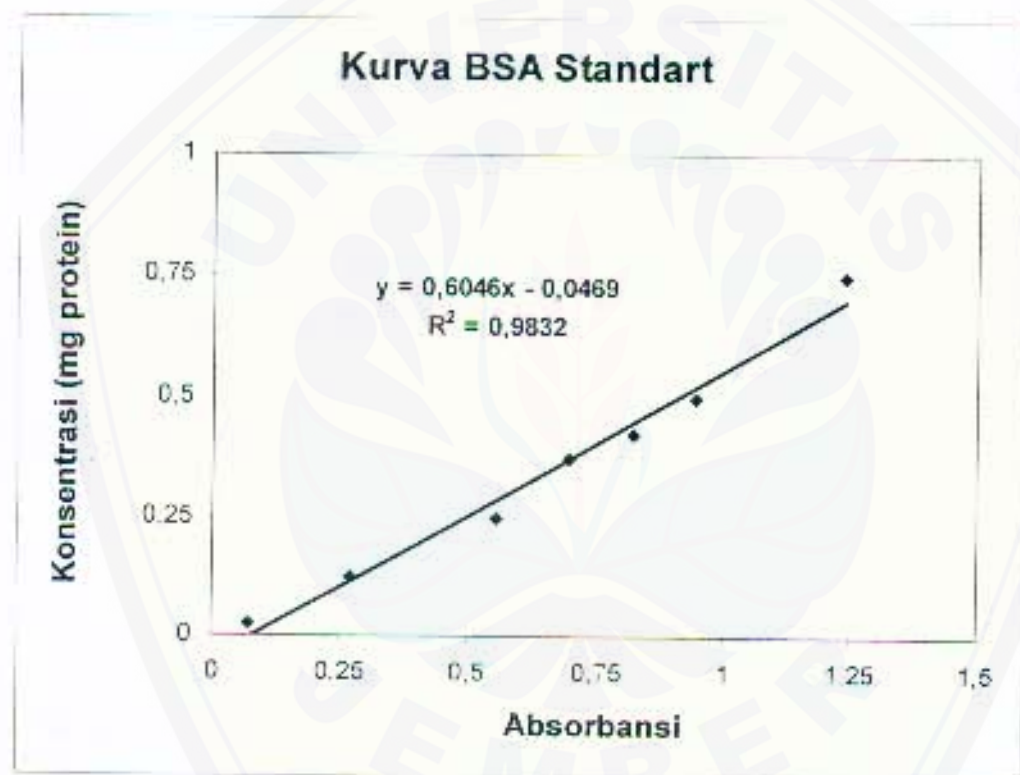
HCl 37% sebanyak 0,83 ml dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian di tera sampai tanda batas.

9. Preparasi kantung dialisis (membran selulosa)

Kantung dialisis sepanjang 20 – 30 cm direndam pada air yang mengalir selama 4 jam. Selanjutnya direndam pada sodium sulfat 0,3% pada suhu 80°C selama 1 menit dan air panas (suhu 60°C) selama 2 menit. Setelah direndam dengan H_2SO_4 0,2% kantung dialisis di cuci dengan air panas.

Lampiran 2. Data dan Kurva BSA Standart

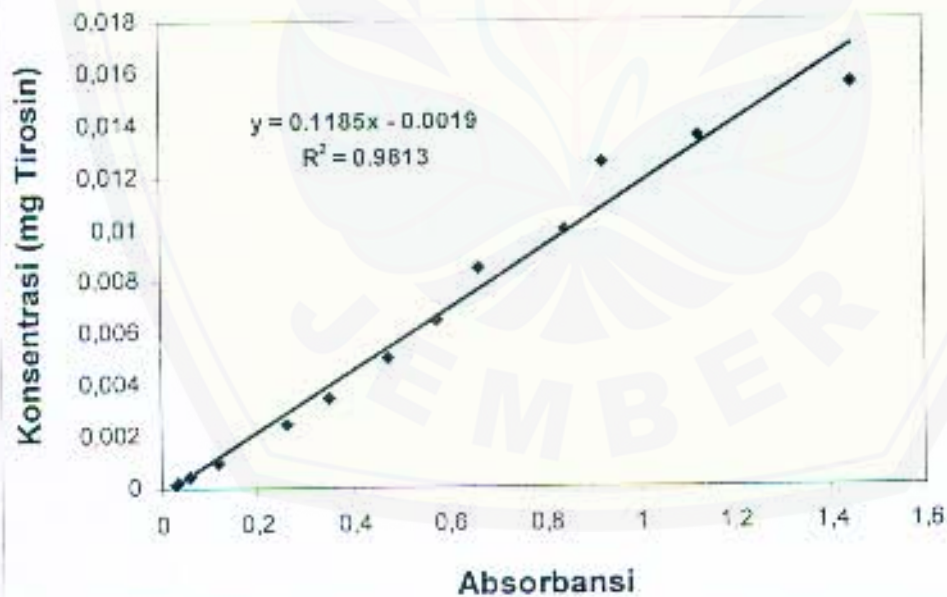
mikroliter	Absorbansi	mg protein
5	0,070	0,025
25	0,269	0,125
50	0,554	0,250
75	0,698	0,375
85	0,823	0,425
100	0,944	0,500
150	1,238	0,750



Lampiran 3. Data dan Kurva Tirosin Standart

mikroliter	Absorbansi	mg tirosin
1,5	0,028	0,0015
2	0,035	0,002
5	0,061	0,005
10	0,120	0,010
25	0,260	0,025
35	0,350	0,035
50	0,471	0,050
65	0,575	0,065
85	0,662	0,085
100	0,846	0,100
125	0,926	0,125
135	1,128	0,135
155	1,450	0,155

Kurva standart Tirosin



Lampiran 4. Data Hasil Pengamatan Rendemen (%)

Crude Protease						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
<i>Supernatan</i>						
35%	5.575	5.900	4.725	16.200	5.400	0.607
50%	5.075	4.225	4.900	14.200	4.733	0.449
65%	4.650	3.025	4.225	11.900	3.967	0.843
80%	4.850	3.342	4.750	12.942	4.314	0.843
<i>Endapan</i>						
35%	1.650	3.025	3.850	8.525	2.842	1.111
50%	4.325	4.925	4.475	13.725	4.575	0.312
65%	5.475	5.425	5.200	16.100	5.367	0.146
80%	5.050	5.675	5.425	16.150	5.383	0.315

Lampiran 5. Data Hasil Pengamatan Kadar Protein (%)

Filtrat Getah						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
35%	2.134	2.066	1.984	6.185	2.062	0.075
50%	2.100	2.207	2.506	6.813	2.271	0.211
65%	2.129	2.062	2.110	6.301	2.100	0.035
80%	2.262	2.178	2.192	6.632	2.211	0.045

Crude Protease						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
<i>Supernatan</i>						
35%	21.006	18.527	13.690	53.222	17.741	3.721
50%	15.504	14.113	12.722	42.339	14.113	1.391
65%	6.858	11.876	1.114	19.848	6.616	5.385
80%	2.384	0.000	1.961	4.344	1.448	1.272
<i>Endapan</i>						
35%	0.328	7.462	2.202	9.993	3.331	3.699
50%	14.718	5.225	5.770	25.713	8.571	5.330
65%	39.446	28.200	21.308	88.954	29.651	9.156
80%	43.557	28.321	28.563	100.441	33.480	8.727

Lampiran 4. Data Hasil Pengamatan Rendemen (%)

Crude Protease						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
<i>Supernatan</i>						
35%	5.575	5.900	4.725	16.200	5.400	0.607
50%	5.075	4.225	4.900	14.200	4.733	0.449
65%	4.650	3.025	4.225	11.900	3.967	0.843
80%	4.850	3.342	4.750	12.942	4.314	0.843
<i>Endapan</i>						
35%	1.650	3.025	3.850	8.525	2.842	1.111
50%	4.325	4.925	4.475	13.725	4.575	0.312
65%	5.475	5.425	5.200	16.100	5.367	0.146
80%	5.050	5.675	5.425	16.150	5.383	0.315

Lampiran 5. Data Hasil Pengamatan Kadar Protein (%)

Filtrat Getah						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
35%	2.134	2.066	1.984	6.185	2.062	0.075
50%	2.100	2.207	2.506	6.813	2.271	0.211
65%	2.129	2.062	2.110	6.301	2.100	0.035
80%	2.262	2.178	2.192	6.632	2.211	0.045

Crude Protease						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
<i>Supernatan</i>						
35%	21.006	18.527	13.690	53.222	17.741	3.721
50%	15.504	14.113	12.722	42.339	14.113	1.391
65%	6.858	11.876	1.114	19.848	6.616	5.385
80%	2.384	0.000	1.961	4.344	1.448	1.272
<i>Endapan</i>						
35%	0.328	7.462	2.202	9.993	3.331	3.699
50%	14.718	5.225	5.770	25.713	8.571	5.330
65%	39.446	28.200	21.308	88.954	29.651	9.156
80%	43.557	28.321	28.563	100.441	33.480	8.727

Lampiran 6. Data Hasil Pengamatan Aktivitas (Unit)

Filtrat Getah						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
35%	61,216	93,542	68,089	2,23E+02	7,4E+01	1,70E+01
50%	71,270	85,852	75,852	2,33E+02	7,8E+01	7,35E+00
65%	81,324	92,779	75,979	2,50E+02	8,3E+01	8,58E+00
80%	69,489	67,707	72,288	2,09E+02	7,0E+01	2,31E+00

Crude Protease						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
Supernatan						
35%	11589,05	13210,99	9573,82	34373,86	1,1E+04	1,82E+03
50%	9103,81	7926,6	7533,31	24563,72	8,2E+03	8,17E+02
65%	3531,65	8606,77	3112,2	15250,62	5,1E+03	3,06E+03
80%	6330,81	2929,08	1988,19	11248,08	3,7E+03	2,28E+03
Endapan						
35%	2773	1569,62	2667,48	7010,1	2,3E+03	6,66E+02
50%	10097,91	4891,99	5833,77	20823,67	6,9E+03	2,77E+03
65%	20300,46	13838,94	11824,49	45963,79	1,5E+04	4,43E+03
80%	14335,89	18050,67	16297,92	48684,48	1,6E+04	1,86E+03

1 unit = 1 μ mol tirosin yang dibebaskan dari substrat soluble casein oleh setiap mg enzim pada suhu 37°C per menit.

Lampiran 7. Data Hasil Pengamatan Aktivitas Spesifik (Unit/mg)

Aktivitas Spesifik (Unit/mg)						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
35%	57,37	90,539	68,633	216,542	72,181	16,867
50%	67,87	77,632	60,524	206,026	68,675	8,582
65%	76,389	90,01	72,022	238,421	79,474	9,382
80%	61,433	62,185	65,953	189,571	63,190	2,422

Aktivitas Spesifik (Unit /mg)						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
<i>Supernatan</i>						
35%	11034,3	14261,62	13986,75	39282,669	1,3E+04	1,79E+03
50%	11744,1	11233	11842,52	34819,608	1,2E+04	3,27E+02
65%	10299,57	14494,34	17546,74	42340,654	1,4E+04	3,64E+03
80%	0	0	20281,44	20281,436	6,8E+03	1,17E+04
<i>Endapan</i>						
35%	16318,18	4206,717	24222,92	44747,820	1,5E+04	1,01E+04
50%	13722,17	18723,75	20222,5	52668,414	1,8E+04	3,40E+03
65%	10292,84	9814,699	11098,75	31206,282	1,0E+04	6,49E+02
80%	6582,577	12747,12	11411,91	30741,610	1,0E+04	3,24E+03

1 unit = 1 μmol tirosin yang dibebaskan dari substrat soluble casein oleh setiap mg enzim pada suhu 37°C per menit.

Lampiran 8. Data Hasil Pengamatan Total Aktivitas (Unit)

Total Aktivitas (unit)						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
35%	4897,286	7483,379	5447,085	1,78E+04	5,9E+03	1,36E+03
50%	5701,622	6852,128	6068,155	1,86E+04	6,2E+03	5,88E+02
65%	6505,958	7422,29	6078,337	2,00E+04	6,7E+03	6,87E+02
80%	5559,082	5416,541	5783,074	1,68E+04	5,6E+03	1,85E+02

Total Aktivitas (Unit)						
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	STDEV
	I	II	III			
<i>Supernatan</i>						
35%	516871,64	589210,33	426992,3	1533074,232	5,1E+05	8,13E+04
50%	369614,84	321819,81	305852,3	997286,936	3,3E+05	3,32E+04
65%	131377,45	320171,71	115773,9	567323,097	1,9E+05	1,14E+05
80%	240570,89	79670,975	77141,74	397383,608	1,3E+05	9,36E+04
<i>Endapan</i>						
35%	36603,609	20719,024	35210,69	92533,318	3,1E+04	8,80E+03
50%	349387,63	169282,92	201848,3	720498,835	2,4E+05	9,60E+04
65%	889160,06	606141,33	517912,8	2013214,217	6,7E+05	1,94E+05
80%	625044,83	819500,19	658435,9	2102980,959	7,0E+05	1,04E+05

1 unit = 1 μmol tirosin yang dibebaskan dari substrat soluble casein oleh setiap mg enzim pada suhu 37°C per menit.