

Kebutuhan enzim protease untuk industri pangan terus meningkat, sementara ketersediaannya belum mencukupi kebutuhan. Oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease yang lain. Salah satunya adalah biduri (Calotropis gigantea) yang merupakan jenis tumbuhan semak liar di daerah tropis termasuk Indonesia. Tanaman ini banyak tumbuh pada lahan kering dan sam pai saat ini belum banyak dimanfaatkan.

Industri pengolahan enzim masih dihadapkan pada permasalahan kurangnya penguasaan teknologi untuk memproduksi enzim dari sumber-sumber bahan baru. Indonesia sebagai negara tropis termasuk Wilayah Jawa Timur sangat cocok ditumbuhi tanaman biduri, terutama pada lahan-lahan marginal, tandus, semak-semak dan area sekitar pantai. Tanaman biduri yang hingga kini tumbuh liar tersebut sangat berpeluang untuk dibudidayakan dengan teknik yang sederhana dan efisien. Pemerintah daerah dan masyarakat sangat berkepentingan untuk menberdayakan potensi tanaman biduri tersebut sebagai salah satu peluang usaha produktif, penyerapan tenaga kerja dan meningkatkan pendapatan daerah.

Hasil penelitian tentang eksplorasi enzim protease dari tanaman biduri menunjukkan bahwa tanaman biduri merupakan sumber enzim protease yang sangat potensial, enzim protease memiliki karakteristik yang dapat digunakan dalam spektrum yang sangat luas untuk pengolahan pangan di antaranya ialah sebagai agen aktif dan pembuatan keju, pengempukan daging, ekstraksi minyak murni dan untuk produksi flavor enhancer alami pengganti MSG (veksin). Enzim biduri juga sangat memungkinkan digunakan untuk memperbaiki performance produk-produk bakery dan pembuatan deterjen. Oleh karena itu, pengembangan dan pemanfaatan tanaman biduri sebagai sumber enzim protease hingga scale up pada level industri perlu dilakukan sehingga potensinya dapat menopang kebutuhan pasar enzim untuk

ENZIM BIDURI

Agen Aktif Potensial untuk Proses Pangan



Yuli Witono



ENZIM BIDURI AGEN AKTIF POTENSIAL UNTUK PROSES PANGAN @2013

Pertama kali diterbitkan dalam bahasa Indonesia
Oleh Penerbit Buku Pustaka Radja, Juli 2013
Jl. Tales II No. 1 Surabaya.
Tlp. 031-72001887, 081249995403
(Lini Penerbit CV. Salsabila Putra Pratama)

**ANGGOTA IKAPI
No. 137/JTI/2011**

Oleh : Yuli Witono

Layout dan desain sampul: Salsabila Creative

Hak cipta dilindungi undang-undang dilarang mengutip
atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit

**ISBN : 978-602-1194-10-2
X+104; 15 cm x 23 cm**

*Buku ini kusembahkan dengan tulus kepada
Tanah Airku, Almamaterku, keluargaku,
kolega dan kawan-kawan seperjuangku
serta para mitra kerjaku
Bacalah isi buku ini, sekaligus baca pula
perjuangan untuk mengisi buku ini*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah S.W.T. yang telah melimpahkan karunia berupa kesabaran dan kekuatan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan buku dengan judul “Enzim Biduri: Agen Aktif Potensial”.

Buku ini memaparkan pokok-pokok bahasan tentang tanaman biduri sebagai sumber enzim protease yang sangat potensial untuk proses pengolahan pangan, teknik isolasi enzim protease dari getah tanaman biduri, karakteristik dan spesifitas protease sebagai enzim protease baru, teknik produksi, dan aplikasinya untuk pengolahan pangan. Pada bagian akhir dari buku ini juga dipaparkan tentang teknik deklorofilasi enzim protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri.

Keberhasilan penulisan buku ini juga tidak lepas dari kontribusi dan dukungan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Ditjen Dikti Kemendikbud R.I. yang telah mengalokasikan pendanaannya melalui program Hibah Bersaing XII Tahun 2004, Hibah Kemitraan (Hilink) Tahun 2008 dan Hibah Kompetensi Tahun 2009-2010.
2. Pimpinan Universitas Jember, FTP dan Jurusan THP serta segenap kawan-kawan dosen terutama yang pernah bergabung dalam tim penelitian di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian FTP UNEJ di antaranya Ir. Wiwik Siti Windrati, MP., Ir. Hj. Siti Hartanti, MT., Ir. Yhulia Praptiningsih, MS., dan para teknisi yang telah membantu menyediakan sarana dan fasilitas selama pelaksanaan penelitian.
3. Para guru, senior dan kolega, diantaranya Prof. Ir. Simon B. Widjanarko, M.App.Sc., Ph.D., Prof. Ir. Achmad Subagio, M.Agr., Ph.D., Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. dan Prof. Dr. Tri Susanto, M.App.Sc. (Almarhum), Ir. Wiwik S. Windrati, MP. dan Dr. Ir. Iwan Taruna, M.Eng. yang selalu memberikan motivasi dan bimbingan kepada penulis.
4. Terima kasih juga disampaikan kepada orang-orang tua penulis yang selalu mendoakan dan mendorong penulis dalam bekerja dan belajar. Juga isteri tercinta dan anak-anak penulis yang selalu sabar dan setia mendampingi serta penuh pengertian dalam menghadapi masa-masa yang sulit selama penulis merintis karier.

5. Para mahasiswa dan alumni yang pernah penulis bimbing dan telah saling membantu, serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu tetapi turut memberikan kontribusi yang berarti selama penulis studi, penelitian dan penyelesaian buku ini.

Semoga segala bantuan dan pengorbanannya yang diberikan kepada penulis mendapatkan balasan yang setimpal dari Allah S.W.T. Penulis juga berharap semoga informasi yang diuraikan dalam buku ini semakin menambah khasanah pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang bermanfaat bagi masyarakat luas terutama para peneliti dan para praktisi industri enzim serta industri pangan yang menggunakan proses enzimatik maupun industri lain yang terkait dan yang tertarik dengan aplikasi enzim protease.

Jember, 2 Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	x
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TANAMAN BIDURI	4
Taksonomi dan Fisiologi.....	4
Sebaran Tanaman Biduri di Jawa Timur	5
Kegunaan Tanaman Biduri	11
Karakteristik Tumbuh Tanaman Biduri.....	12
BAB 3. ENZIM PROTEASE	15
Klasifikasi Enzim Protease.....	15
Manfaat Enzim Protease dalam Industri Pangan	18
Isolasi Enzim Protease.....	20
Aktivitas Enzim Protease	23
Karakterisasi Enzim Protease	25
<i>Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim.....</i>	25
<i>Termostabilitas.....</i>	26
<i>Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim.....</i>	27
<i>Konsentrasi Enzim dan Subtrat.....</i>	28
<i>Kinetika Enzim.....</i>	28
BAB 4. ENZIM PROTEASE BIDURI	30
Ekstraksi dan Purifikasi Enzim Protease Biduri .	30
Karakter Enzim Protease Biduri	34
<i>Suhu Optimum Protease Biduri.....</i>	34
<i>pH Optimum Protease Biduri.....</i>	35
<i>Termostabilitas Protease Biduri</i>	37
<i>Laju Reaksi Enzim Protease Biduri.....</i>	38
<i>Derajat Hidrolisis Substrat oleh Enzim</i>	
<i>Protease Biduri.....</i>	39
<i>Aktivator dan Inhibitor Enzim Protease Biduri..</i>	41
Pola Pemecahan Substrat oleh Protease Biduri..	42
BAB 5. PRODUKSI ENZIM PROTEASE BIDURI	44
Teknologi Produksi Enzim Protease Biduri	
Skala Laboratorium.....	44
<i>pH Optimum Ekstraksi.....</i>	44

	<i>Pengaruh Penambahan Natrium Metabisulfid ($Na_2S_2O_5$)</i>	46
	<i>Penentuan Media untuk Ekstraksi</i>	47
	<i>Teknik Pengeringan</i>	49
	Teknologi Produksi Enzim Protease Biduri	
	Skala Pilot Plan	52
	Teknik Handling (Penanganan) dan Umur	
	Simpan Bahan Baku Tanaman Biduri	59
	Kinerja Enzim Protease Biduri diantara Enzim	
	Protease Komersial	60
BAB 6.	APLIKASI ENZIM PROTEASE BIDURI	64
	Penggunaan Enzim Biduri untuk Pengempukan	
	Daging	64
	<i>Tekstur Daging Olah Pasca Inkubasi</i>	65
	Warna Daging Olah Pasca Inkubasi	67
	<i>Kadar Protein Terlarut Daging Olah Pasca</i>	
	<i>Inkubasi</i>	68
	<i>Aroma Daging Olah Pasca Inkubasi</i>	70
	<i>Rasa Daging Olah Pasca Inkubasi</i>	71
	<i>Kekuatan Tarik dengan Gigitan Daging Olah</i>	
	<i>Pasca Inkubasi</i>	72
	Penggunaan Enzim Biduri pada Proses	
	Pembuatan Keju	73
	<i>Rendemen Keju Hasil Proses Enzimatis</i>	74
	<i>Warna Keju Hasil Proses Enzimatis</i>	76
	<i>Tekstur Keju Hasil Proses Enzimatis</i>	77
	<i>Kadar Air Keju Hasil Proses Enzimatis</i>	78
	<i>Kadar Protein Terlarut Keju Hasil Proses</i>	
	<i>Enzimatis</i>	79
	<i>Kadar Lemak Keju Hasil Proses Enzimatis</i>	81
	<i>Aroma Keju Hasil Proses Enzimatis</i>	81
	<i>Rasa Keju Hasil Proses Enzimatis</i>	82
	Penggunaan Enzim Biduri pada Proses Ekstraksi	
	VCO (Virgin Coconut Oil)	84
	Uji Hidrolisis pada Substrat Protein Kedelai	88
	Enzim Protease Biduri Terimmobilisasi	89
BAB 7.	PENUTUP	91
	DAFTAR PUSTAKA	93
	RIWAYAT HIDUP PENULIS	103

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Tanaman Biduri dan Sistematikanya	4
Gambar 2.	Peta Sebaran Tanaman Biduri di Jawa Timur	7
Gambar 3.	Tanaman Biduri di atas Lahan Marginal, Kering/Tandus, Tanah Berpasir dan Sekitar Pantai.....	13
Gambar 4.	Tanaman Biduri Tumbuh Subur pada celah- celah Bebatuan di sekitar Pesisir Utara Pulau Bali	14
Gambar 5.	Reaksi Katalisa Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida Protein	15
Gambar 6.	Proses Penyadapan Getah Biduri	30
Gambar 7.	Kurva Suhu Optimum Enzim Protease Biduri	34
Gambar 8.	Kurva pH Optimum Enzim Protease Biduri. ...	36
Gambar 9.	Kurva Termostabilitas Enzim Protease Biduri	37
Gambar 10.	Pengaruh Konsentrasi Substrat Kasein terhadap Kecepatan Awal Hidrolisis Enzimatis dari Protease Biduri	39
Gambar 11.	Derajat Hidrolisis Protease Biduri pada berbagai Substrat Protein.....	40
Gambar 12.	Pengaruh Inhibitor dan Aktivator terhadap Aktivitas Protease Biduri.....	41
Gambar 13.	Pengaruh pH Ekstraksi terhadap Rendemen dan Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri	45
Gambar 14.	Pengaruh pH Ekstraksi terhadap Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Protease dari Tanaman Biduri	46
Gambar 15.	Pengaruh Penambahan Na-metabisulfit terhadap Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri	47
Gambar 16.	Pengaruh Media Ekstraksi terhadap Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri.....	47
Gambar 17.	Pengaruh Teknik Pengeringan terhadap Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri.....	49

Gambar 18.	Pengaruh Teknik Pengeringan terhadap Tingkat Kecerahan Protease dari Tanaman Biduri	50
Gambar 19.	Rancangan Awal Alat Mesin dan Alur Proses Produksi Enzim Protease Biduri	54
Gambar 20.	Layout Pabrik Pengolahan Enzim Biduri.....	56
Gambar 21.	Aktivitas Spesifik Protease dari Getah dan Tanaman Biduri pada Berbagai Umur Simpan Bahan Baku	60
Gambar 22.	Perbandingan Aktivitas dan Kadar Protein dari Hasil Hidrolisis Protease Biduri di antara Protease Komersial lainnya pada berbagai Substrat	61
Gambar 23.	Histogram Perbandingan Aktivitas Spesifik Protease Biduri di antara Protease Komersial lainnya pada berbagai Substrat	61
Gambar 24.	Histogram Tekstur Daging Pasca Inkubasi dengan Berbagai Protease	62
Gambar 25.	Tekstur Daging pada berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri	65
Gambar 26.	Warna Daging pada Berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri	67
Gambar 27.	Kadar Protein Terlarut Daging pada Berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri	69
Gambar 28.	Nilai Organoleptik Aroma Daging pada Berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri	70
Gambar 29.	Nilai Organoleptik Rasa Daging pada berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri	71
Gambar 30.	Tingkat Kekuatan Tarik dengan Gigitan Daging pada berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri.....	72

Gambar 31.	Rendemen Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Enzim Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	75
Gambar 32.	Tekstur Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Enzim Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	77
Gambar 33.	Kadar Air Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Enzim Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	79
Gambar 34.	Kadar Protein Terlarut Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Enzim Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	80
Gambar 35.	Kadar Lemak Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Enzim Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	81
Gambar 36.	Nilai Aroma Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Enzim Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	82
Gambar 37.	Nilai Rasa Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Enzim Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	83
Gambar 38.	Fraksinasi Hasil Inkubasi Santan Kelapa dengan Protease Biduri pada Konsentrasi 0% (A₁), 0.05% (A₂), 0.1% (A₃), 0.15% (A₄) dengan Lama Inkubasi 4 Jam (B₃)	86
Gambar 39.	% FFA VCO Hasil Fermentasi Spontan dan % FFA VCO yang dibuat dengan berbagai Konsentrasi Protease Biduri dan Lama Inkubasinya	87
Gambar 40.	Enzim Protease Biduri Terimmobilisasi	89

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Kompilasi Data Hasil Survey Potensi Tanaman Biduri di Jawa Timur.....	8
Tabel 2.	Nilai Warna Keju pada berbagai Kombinasi Perlakuan	76

BAB 1

PENDAHULUAN

Protease merupakan enzim penghidrolisa protein yang banyak digunakan dalam industri pangan, seperti pembuatan keju, penjernih bir, pembuatan roti, pengempuk daging, hidrolisat protein, ekstraksi minyak dan sebagainya. Pemakaian enzim protease 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 US\$ 2 milyar (Suhartono dkk., 1995). Pada tahun 1998 masih menempati posisi pertama penggunaannya dalam industri pangan (Rao *et al.*, 1998). Bahkan sampai tahun 2004, 70% pasar enzim dunia dikuasai oleh enzim protease (mediaindo.co.id, 2004 dalam Witono dkk. 2004).

Enzim protease diproduksi dari makhluk hidup yang meliputi: mikroorganisme, hewan maupun tanaman. Namun demikian untuk memproduksi enzim protease dari beberapa sumber tersebut masih menghadapi banyak kendala. Meskipun mikroba dikenal luas sebagai sumber enzim protease, namun untuk tujuan-tujuan tertentu, enzim protease dari tanaman masih mempunyai peranan yang sangat besar yang belum sepenuhnya dapat digantikan oleh enzim mikroba. Enzim yang diproduksi dari jaringan hewan relatif mahal dan ketersediaannya tergantung pada permintaan hewan-hewan sumber enzim tersebut di pasaran, mengingat enzim harus diekstrak dari hewan-hewan yang sudah mati. Sedangkan enzim protease yang diproduksi dari tanaman seperti papain dari getah pepaya, akan mengakibatkan penurunan kualitas buah segarnya setelah disadap.

Di sisi lain, ketersediaan enzim protease belum mencukupi kebutuhan, sementara pemakaian protease bagi industri pangan cenderung meningkat, oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease yang lain. Salah satunya

adalah biduri (*Calotropis gigantea*) yang merupakan jenis tumbuhan semak liar di daerah tropis termasuk Indonesia. Tanaman ini banyak tumbuh pada lahan kering dan sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan untuk industri.

Tanaman dalam satu genus dengan biduri, yaitu *Calotropis procera* dapat digunakan sebagai sumber enzim protease (Eskin, 1990). Peneliti lain yaitu Aworh and Muller (1987), melaporkan bahwa *Calotropis procera* telah sukses digunakan sebagai sumber enzim protease untuk pembuatan keju. Menurut paradigma *Chemotaxonomy*, tanaman dari genus yang sama memiliki kemiripan dalam komposisi kimianya (Ray, 1989). Hasil penelitian penulis sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman biduri dapat digunakan sebagai sumber enzim protease, dan juga ekstrak kasar protease biduri mempunyai kemampuan untuk mengempukkan daging dan menggumpalkan susu (Witono, 2002a; dan Witono, 2002b). Namun demikian hingga saat ini belum didapat informasi yang komprehensif tentang protease biduri menyangkut teknik isolasi, karakteristik, teknik produksi dan aplikasinya, serta aspek-aspek lain yang terkait dengan keberadaan protease dari tanaman biduri tersebut.

Berdasarkan alasan tersebut, perlu diinformasikan kepada khalayak hasil-hasil kajian tentang eksplorasi enzim protease dari tanaman biduri dan pemanfaatannya pada beberapa pengolahan pangan, sehingga menjadi alternatif sumber enzim protease baru yang pada akhirnya akan meningkatkan ketersediaan enzim protease terutama bagi industri pangan di Indonesia.

Melalui buku ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

- (1) Memperoleh alternatif sumber enzim protease baru yang selama ini disediakan oleh papain (dari pepaya), bromelin (dari bonggol nanas) serta enzim protease dari hewani yang harganya relatif mahal dan kebanyakan masih impor, sehingga akan meningkatkan stok ketersediaan protease

dan diharapkan dapat membantu dalam penghematan devisa negara.

- (2) Memberikan nilai guna dari tanaman biduri yang selama ini belum banyak dimanfaatkan untuk industri.
- (3) Membuka peluang dibukanya pabrik baru atau berkembangnya sumber-sumber bahan baku bagi industri penghasil enzim protease.
- (4) Berkembangnya proses-proses pengolahan pangan secara enzimatis dari sumber alam lokal di Indonesia dengan karakteristik unik dan kualitas yang lebih baik.
- (5) Menambah khasanah iptek dalam rangka penggalian sumber-sumber alam lokal yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut bagi kepentingan masyarakat.

Buku ini menguraikan tentang seluk beluk tanaman biduri dan potensinya sebagai sumber enzim protease, enzim protease secara umum, teknik isolasi dan produksi enzim protease yang diekstrak dari tanaman biduri lengkap dengan karakteristiknya serta aplikasinya pada beberapa proses pangan. Substansi dari buku ini disusun dengan merujuk dari referensi-referensi terkait dan hasil-hasil penelitian penulis yang dilakukan sejak mengambil program magister hingga program doktoral dan hasil-hasil penelitian pasca doktoral yang belum dan telah dipublikasikan baik dalam prosiding maupun jurnal ilmiah.

BAB 2 TANAMAN BIDURI

Taksonomi dan Fisiologi

Biduri dikenal dengan berbagai nama di seluruh Indonesia. Seperti rubik, biduri, lembega, rembega, rumbigo di Sumatra. babakoan, badori, biduri, widuri, saduri, sidoguri, bidhuri, burigha di Jawa. Manori, maduri di Bali. Muduri, rembiga, kore, krokoh, kolonsusu, modo kapauk, modo kampauk di Nusa Tenggara, dan rambega di Sulawesi. Sedangkan di dunia dikenal dengan nama *giant milk weed*, *mudar plant*, *crown flower*, *kapal-kapal*, atau *oscherstrauch*.

Biduri merupakan tanaman lahan kering yang banyak ditemukan pada lahan-lahan kosong dengan periode kering yang lama. Biduri sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan, bahkan pada beberapa daerah dianggap sebagai gulma (Van Stenis, 1992). Gambar beserta sistematika tanaman biduri dalam khasanah botani (Tjitrosoepomo, 1994) ditunjukkan pada Gambar 1.



Devisio	: Spermatophyta
Klas	: Dicotyledoneae
Sub Klas	: Monochlamydae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Calotropis
Species	: <i>Calotropis gigantea</i>

Gambar 1. Tanaman Biduri dan Sistematikanya

Tanaman biduri (*C. gigantea*) merupakan tanaman bergetah, dari seluruh bagian tanaman biduri akan mengalir getah pada tempat yang dilukai atau dipotong. Getahnya berwarna putih dan kelat.

Biduri banyak ditemukan di daerah bermusim kemarau panjang, seperti padang rumput yang kering dan pantai berpasir. Semak tegak, tinggi 0,5-3 m. Batang bulat, tebal, ranting muda berambut tebal berwarna putih. Daun tunggal, bertangkai pendek, letak berhadapan. Helaiian daun berbentuk bulat telur atau bulat panjang, ujung tumpul, pangkal berbentuk jantung, tepi rata, pertulangan menyirip, panjangnya 8-30 cm, lebar 4-15 cm, berwarna hijau. Permukaan atas helaiian daun muda berambut rapat berwarna putih (lambat laun menghilang), sedangkan permukaan bawah tetap berambut tebal berwarna putih. Bunga majemuk dalam anak payung, di ujung atau ketiak daun. Tangkai bunga berambut rapat, mahkota bunga berbentuk kemudi kapal, berwarna nila, kadang-kadang putih. Buahnya buah bumbung, berbentuk bulat telur atau bulat panjang, pangkal buah berupa kaitan, panjang 9-10 cm, berwarna hijau. Bijinya kecil, lonjong, pipih, berwarna cokelat, berambut pendek dan tebal, umbai rambut serupa sutera panjang. Jika salah satu bagian tumbuhan dilukai, akan mengeluarkan getah berwarna putih, encer, rasanya pahit dan kelat, baunya sangat menyengat, dan dapat menyebabkan iritasi pada kulit.

Sebaran Tanaman Biduri di Jawa Timur

Sebagai usaha untuk mendapatkan informasi (gambaran) *real* tentang potensi tanaman biduri khususnya di wilayah Jawa Timur, maka dilakukan survey lapang berkenaan dengan potensi tanaman biduri termasuk potensi lahan kering sebagai peluang pengembangan budidaya biduri lebih lanjut serta aspek-aspek lain yang berkenaan dengan keberadaan tanaman biduri. Survey disampling terhadap sekitar 50% (atau 16) wilayah kabupaten di Jawa Timur dan difokuskan pada wilayah yang memiliki garis pantai dan atau dengan estimasi lahan kering yang relatif luas.

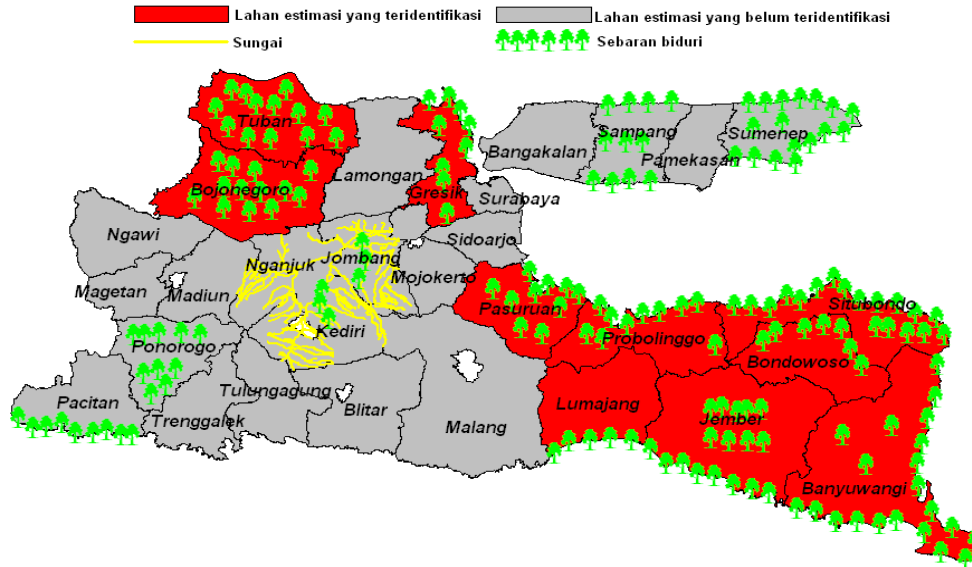
Wilayah kabupaten yang disurvey meliputi: Kabupaten Bojonegoro, Ponorogo dan Bondowoso mewakili wilayah

tengah, tidak berpantai dengan lahan kering relatif luas. Jombang dan Kediri mewakili wilayah tengah, tidak berpantai dan daerah subur. Kabupaten Pacitan mewakili wilayah pantai Selatan dan wilayah kering atau tandus. Kabupaten Gresik dan Situbondo mewakili wilayah pantai utara tidak subur dengan estimasi lahan kering yang juga relatif luas. Kabupaten Pasuruan dan Probolinggo mewakili wilayah pantai Utara yang relatif subur. Kabupaten Lumajang, Jember dan Banyuwangi mewakili wilayah pantai Selatan yang relatif subur. Sedangkan wilayah Madura dan daerah berpantai di dua sisi (Selatan dan Utara) diwakili oleh Kabupaten Sampang dan Sumenep. Selain data demografi responden, aspek-aspek yang ditelusuri adalah: (1) luas lahan kering, penyebaran dan pemanfaatannya oleh masyarakat setempat selama ini; (2) estimasi luas lahan biduri dan penyebarannya, (3) nama lain atau penyebutan tanaman biduri pada setiap wilayah; dan (5) animo atau respon khalayak terhadap prospek tanaman biduri.

Secara umum tanaman biduri yang memiliki banyak sebutan ini belum dimanfaatkan untuk kepentingan industri. Sejauh ini tanaman biduri oleh masyarakat setempat baru digunakan untuk pakan ternak, penyembuh luka/bisul, obat dari gigitan serangga, mengeluarkan duri dan obat sakit gigi. Sebagian masyarakat petani menggunakannya untuk pestisida alami dan kompos. Bahkan sebagian besar masyarakat sekitar melarangnya untuk mendekati tanaman tersebut karena diyakini apabila getahnya mengenai kulit dapat menimbulkan iritasi dan apabila terpercik pada mata dapat mengakibatkan kebutaan. Sebagian besar masyarakat setempat sangat berharap agar dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi dapat menyentuh sampai pada pemanfaatan tanaman biduri yang selama ini hanya dianggap sebagai gulma.

PEMETAAN POTENSI BIDURI DI WILAYAH JAWA TIMUR

Sebaran tanaman biduri di lahan estimasi yang teridentifikasi



Gambar 2. Peta Sebaran Tanaman Biduri di Jawa Timur

Tabel 1. Kompilasi Data Hasil Survey Potensi Tanaman Biduri di Jawa Timur

No.	Kabupaten yang disurvei	Luas Lahan Kering (Ha)	Estimasi Luas Tanaman Biduri	Nama Lain	Pemanfaatan
1	Bojonegoro	49.115	25 Ha, tersebar	Leduri	Obat sakit mata dan sakit gigi
2	Ponorogo	102.311	Menyebar	Leduri & Tok-tokan	Mengeluarkan duri dan obat sakit gigi
3	Pacitan	11.530	Menyebar di pesisir pantai selatan	Leduri	Obat dari gigitan serangga
4	Tuban	126.800	50 Ha, menyebar	Duri	Pakan kambing Jawa
5	Jombang	9.649	Spot-spot di sepanjang Sungai Brantas	-	Pakan jangkrik
6	Kediri	-	Spot-spot di sepanjang Sungai Brantas	Awar-awar	Tidak digunakan
7	Gresik	57.118	3 Ha	Widuri, Kapuk	Biopestisida,

				Duri	pematang bisul & obat sakit gigi
8	Pasuruan	9.040	12 Ha	Kapuk Duri, Leduri	Pakan jangkrik dan Obat sakit gigi
9	Probolinggo	12.000	10 Ha	Berigeh	Obat sakit gigi dan pematang bisul
10	Situbondo	9.234	15 Ha	Berigeh, Tot-cetotan	Obat sakit gigi dan kayu bakar
11	Bondowoso	5.701	4 Ha	Berigeh, Tot-cetotan	Tidak tahu
12	Banyuwangi	-	2 Ha	-	-
13	Jember	40	40 Ha	Kapuk duri, leduri	Obat sakit gigi dan pakan jangkrik
14	Lumajang	26.203	7 Ha, sekitar pesisir pantai Selatan	-	-

15	Sampang	3.121	Tersebar di pesisir selatan dan utara, serta sepanjang jalan raya Propinsi	Berigeh	Obat sakit gigi
16	Sumenep	3.969	Tersebar di sekitar pesisir dan spot-spot sepanjang jalan	Berigeh	Obat sakit gigi dan kompos

Kegunaan Tanaman Biduri

Menurut berbagai sumber, bahwa kulit batang biduri mengandung bahan serat yang dapat digunakan untuk membuat jala. Beberapa masyarakat di Bali, memanfaatkan kayunya untuk arang dalam pembuatan sendawa. Di Thailand, bunga biduri digunakan untuk buket atau karangan bunga. Di India digunakan sebagai salah satu bunga di kuil, sedangkan di Hawaii merupakan simbol keluarga kerajaan.

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 (2002b) menyatakan bahwa ekstrak kasar enzim protease dari tanaman biduri dapat mengempukkan daging dan menggumpalkan susu.

Kulit akar biduri berkhasiat kolagoga, peluruh keringat (diaforetik), perangsang muntah (emetik), memacu kerja enzim pencernaan (alternatif), dan peluruh kencing (diuretik). Kulit kayu biduri berkhasiat emetik, bunga berkhasiat tonik, dan menambah nafsu makan (stomakik). Daun berkhasiat rubifasien dan menghilangkan gatal. Getahnya beracun dan dapat menyebabkan muntah. Namun, berkhasiat sebagai obat pencahar. Apabila diklasifikasikan, maka kegunaannya untuk kesehatan adalah sebagai berikut:

Kulit akar digunakan untuk pengobatan:

- Demam
- Perut terasa penuh
- Kaki pegal dan lemas
- Gigitan ular beracun, Borok kronis, dan
- Penyakit kulit lainnya

Daun digunakan untuk pengobatan:

- Kudis, luka, borok, sariawan,
- Gatal pada cacar (*varicella*)
- Campak (*measles*)
- Demam, dan batuk

Bunga digunakan untuk pengobatan:

- Radang lambung
- Batuk, sesak napas, influenza
- Sifilis sekunder, kencing nanah (*gonorrhoea*) dan kusta (lepra)

Getah digunakan untuk pengobatan:

- Bisul, eksim
- Pembesaran kelenjar getah bening
- Luka pada sifilis, luka dikaki
- Sakit gigi dan
- Mencabut duri yang menusuk kulit

Getah tumbuhan biduri beracun. Karena getahnya terdapat pada semua bagian tumbuhan maka dosis berlebihan dapat menimbulkan tanda-tanda keracunan. Di India, dosis yang digunakan cukup besar, yaitu 3,25 - 3,9 g untuk khasiat emetik, sifilis sekunder, gangguan spasmodik, leukoderma, lepra dan rematik kronis. Akar yang dibakar, lalu ditambah minyak. dapat digunakan untuk memoles kelainan kulit seperti sifilis dan lepra. Jika kulit akar yang ditumbuk halus dan ditambah dengan cukup beras, akan membentuk adonan seperti bubur kental. Adonan ini dapat diborehkan pada kaki yang bengkak karena penyakit kaki gajah, yang disertai bengkak pada kantung buah zakar (*elefantiasis tungkai dan scrotum*). Ibu hamil dilarang minum ekstrak tumbuhan ini karena dapat menyebabkan keguguran.

Karakteristik Tumbuh Tanaman Biduri

Berdasarkan observasi lapang terhadap karakteristik tumbuh tanaman biduri menunjukkan bahwa tanaman biduri secara umum tumbuh pada lahan marginal, tanah tandus / kering, di dataran rendah sekitar pantai, bahkan di cela-cela bebatuan dimana tanaman lain tidak mampu tumbuh, tetapi tanaman biduri dapat tumbuh dengan subur. Tanaman biduri tumbuh di areal terbuka dengan penyinaran matahari yang cukup.



Gambar 3. Tanaman Biduri di atas Lahan Marginal, Kering / Tandus, Tanah Berpasir dan Sekitar Pantai

Kelebihan tanaman biduri yang tidak banyak dimiliki oleh tanaman lain, selain mampu tumbuh subur di atas lahan yang tidak produktif juga daerah dengan curah hujan rendah. Di dataran rendah dengan curah hujan cukup tinggi dan tanah subur, tanaman biduri semakin subur pertumbuhannya, daunnya lebat dan berukuran lebar. Tetapi biduri tidak menunjukkan pertumbuhan yang cepat dan lebat di bawah naungan.



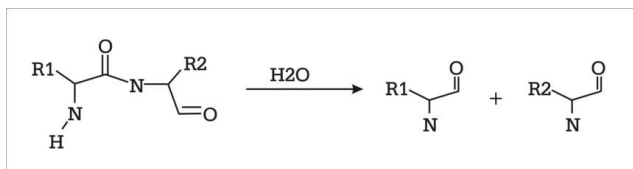
Gambar 4. Tanaman Biduri Tumbuh Subur pada celah-celah Bebatuan di sekitar Pesisir Utara Pulau Bali

BAB 3 ENZIM PROTEASE

Enzim protease berperan besar dalam proses-proses seluler akibat kemampuan proteolitiknya yang esensial. Proses-proses tersebut meliputi digesti, translokasi, tukar ganti protein, sekresi protein, aktivitas enzim dan hormon. Protease juga terlibat dalam aktivitas beberapa toksin yang penting dalam makanan. Oleh karena itu aktivitas protease ini perlu dimanipulasi sehingga dapat dimanfaatkan secara luas (Sperber and Torrie, 1982).

Sebagian enzim ini tidak memerlukan ion aktivator, namun demikian beberapa golongan enzim protease memerlukan aktivator dari kation-kation divalen untuk aktivitasnya. Enzim protease termasuk enzim yang cukup stabil, karena tahan terhadap pH dan suhu lingkungan yang agak ekstrim. Sifat-sifat inilah yang mengakibatkan enzim protease mudah diisolasi dengan metode yang relatif sederhana (Suhartono, 1992).

Spesifitas enzim protease berbeda-beda dalam menghidrolisa 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 dihidrolisa (Whitaker, 1994). Reaksi katalisa protease secara umum adalah menghidrolisa ikatan peptida protein seperti terlihat pada Gambar 5.



R1 = rantai peptida sebelumnya R2 = rantai peptida sesudahnya

Gambar 5. Reaksi Katalisa Protease dalam Menghidrolisis Ikatan Peptida Protein

Klasifikasi Enzim Protease

Enzim protease telah diklasifikasikan berdasarkan aspek-aspek tertentu seperti: sumber enzim, lokasi dalam jaringan, spesifitas, lingkungan pH dan daya kerjanya 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 berasal dari abomasum anak sapi dan cathepsin dari liver atau hepatopankreas ikan (Kolodziejska *et al.*, 1994; Choudury and Gogoi, 1996).

Kemudian perkembangan selanjutnya enzim protease dibagi menjadi dua golongan besar, yaitu ekstraselluler dan intraselluler. Sedangkan Berdasarkan spesifitasnya, digolongkan menjadi eksopeptidase dan endopeptidase (Kaneda *et al.*, 1997). Berdasarkan lingkungan pH dan daya kerjanya, protease dibedakan menjadi protease asam, protease netral dan protease alkalis (Loffler, 1986). Berdasarkan sifat-sifat kimia sisi aktifnya, enzim protease lebih lanjut dibedakan menjadi empat golongan, yaitu protease serin, protease sulfidril, protease logam dan protease asam (Suhartono, dkk., 1995).

Protease serin adalah protease yang mempunyai residu serin pada sisi aktifnya. Enzim ini dapat dihambat dengan DFP (diisopropil fluoro phosfat), namun tidak dapat dihambat oleh EDTA (etilen diamintetra ecetic acid), IAA (iodoasetamid), PCMB (parakloromercuribenzoat), dan oleh diazoasetil norleusin. Seluruh jenis protease serin adalah endopeptidase yang mempunyai sifat aktif pada pH basa 8,5-12 dan memiliki berat molekul sekitar 21.500. Protease serin pada umumnya dihasilkan oleh bakteri ataupun fungi, dan pembentukan enzim ini bisa pada fase eksponensial atau stasioner. Tripsin, chemotripsin, elastase dan substilin termasuk dalam group ini (Suhartono, dkk., 1995).

Protease sulfidril adalah protease yang aktivitasnya tergantung dari adanya gugus sulfidril pada sisi aktifnya, serta sensitifitasnya menunjukkan pemotongan pada sisi karboksil residu asam amino basa. Protease jenis ini dibagi menjadi dua bagian yaitu *klostripain* dan *streptococcal*. Klostripain adalah protease yang dihasilkan oleh *Cl. histolyticum* yang mempunyai BM sekitar 50.000. Sedang protease streptococcal adalah protease yang dihasilkan oleh *streptococci* grup A dengan BM sekitar 32.000 (Rahayu, 1988). Bahan yang bersifat mengoksidasi, mengalkilasi dan semua ion-ion metal dapat menghambat sebagian besar enzim ini, namun untuk menunjukkan keaktifannya diperlukan reagen HCN atau sistein. Protease yang berasal dari tanaman dan beberapa mikroorganisme termasuk golongan protease sulfidril (Suhartono, dkk., 1995).

Enzim protease logam adalah enzim yang aktivitasnya tergantung adanya metal yang terkait pada molekul proteinnya, misalnya: Mg, Zn, Fe, Cad, Ni, dan Cu. Metal ini terikat kuat pada sisi aktif enzim sehingga agak sukar untuk melakukan penghambatan meskipun dilakukan penambahan dengan EDTA. Namun kebanyakan enzim ini dapat dihambat dengan sianida atau racun metal yang lain. Enzim protease logam mempunyai aktivitas maksimal pada pH sekitar netral dan basa. Protease 1 mixobacter aminopeptidase serta protease dari bakteri (misalnya *Cl histolyticum*, *streptococcus*) termasuk golongan ini (Sanogo *et al.*, 1990; Koochmaraie, 1990). Menurut Suhartono, dkk. (1995), protease ini aktif pada rentang pH 7-8, memiliki BM 45.000 dan aktivitasnya dapat ditingkatkan dengan penambahan $Zn^{2+} 10^{-6}$ M, $Mn^{2+} 5 \cdot 10^{-4}$ M dan Mg^{2+} sebanyak 10^{-3} M.

Protease asam adalah enzim yang mempunyai pH optimal di antara 2-4. Enzim ini dapat dihambat dengan p-bromofenacilbromid atau pereaksi diasosasetilnorleusin metil ester, namun tidak dapat dihambat oleh reagen IAA, EDTA, PCMB dan DFP. Pepsin, resin dan protease dari fungi yang

aktif pada pH rendah termasuk dalam group ini (Rao *et al.*, 1998).

Beberapa tanaman lain juga sudah diketahui sebagai sumber enzim protease, yaitu famili kacang-kacangan (*Arachis hypogaea* L.) memproduksi protease pada bijinya. Labu (*Curcubita pepo*) memproduksi protease pada bagian bunganya. Buah semangka (*Cucumis melo*) dilaporkan mengandung protease serta jahe (Suhartono, 1992; Choi and Laursen, 2000).

Penelitian-penelitian untuk mencari sumber-sumber enzim asal tanaman terus dilakukan. Chinas and Canales (1986) mengisolasi enzim protease dari daun *chaya* yang mempunyai pH optimal netral. Noda *et al.* (1994) mengisolasi enzim protease dari buah melon, aktivitas proteolitiknya sangat tinggi dan mungkin mempunyai potensi baik di bidang pangan, karena protease ini termasuk jenis serin yang berbeda dengan enzim asal tanaman lainnya yang umumnya adalah protease sulfidril. Asakura *et al.* (1997) juga berhasil mengisolasi protease asal tanaman yaitu *oryzasin* yang diekstrak dari biji padi.

Ketersediaan enzim protease renin dari anak sapi yang semakin mahal dan terbatas, mendorong para peneliti untuk mencari enzim pengganti renin dari tanaman. *Benincasa cerifera* dan *Calotropis procera* merupakan tanaman yang dapat menggantikan fungsi protease renin, walaupun belum dapat menghasilkan keju yang sempurna (Eskin, 1990). Daun *Cyanara cardonculus* juga telah dilaporkan populer digunakan sebagai sumber enzim penggumpal susu. Penggunaan protease dari tanaman ini menghasilkan komposisi yang tidak berbeda, dibandingkan dengan keju yang dihasilkan dari enzim renin komersial (Sousa and Malcata, 1997).

Manfaat Enzim Protease dalam Industri Pangan

Protease merupakan enzim yang memiliki peranan besar dan mempunyai nilai ekonomi yang tinggi di antara

sejumlah enzim industri saat ini. Protease yang sudah diisolasi dari jaringan, baik dari mikroorganisme, jaringan hewan maupun tumbuhan, mempunyai peranan besar dalam industri pangan. Kemampuan proteolisa dari jenis enzim ini telah banyak diaplikasikan pada industri-industri pembuatan roti, produksi keju, penjernih bir, pengempuk daging dan sebagainya (Smith, 1995).

Penggunaan protease renin dan protease *Mucor* dalam pengolahan keju dan protease dari *Aspergillus oryzae* dalam pembuatan roti, menguasai pasaran enzim protease. Penjualan enzim protease secara total mencapai 40% dari total penjualan enzim (Word, 1983).

Nobuzo (1988) menambahkan bahwa enzim protease mempunyai peran yang penting dalam industri pangan. 60% dari total produksi enzim yang digunakan untuk pengolahan pangan, protease merupakan salah satu enzim terbesar penggunaannya selain amilase dan glikoamilase serta glukosidase. Bahkan menurut Rao *et al.* (1998) sampai tahun 1998 masih menempati posisi pertama dalam penggunaannya dalam industri pangan.

Pemanfaatan dalam industri roti disebabkan enzim protease dapat mengubah sifat viskoelastis adonan dengan menghidrolisa ikatan peptida pada protein gluten. Enzim protease juga menghidrolisa protein adonan roti yang membebaskan asam-asam amino yang bereaksi dengan gula selama pemanggangan roti sehingga menimbulkan aroma dan warna yang diinginkan (Eskin, 1990; Collar *et al.*, 1992).

Protease juga dapat menghidrolisa kasein susu menjadi peptida yang lebih pendek sehingga misel kasein tidak stabil dan kasein mengendap membentuk keju (Scott, 1986). Protease ini juga berperan dalam *ripening* keju (Creamer and Olson, 1982), *ripening* menentukan rasa, aroma dan tekstur keju. Pengendalian aktivitas protease dalam keju diperlukan untuk memperbaiki kualitasnya (Chin and Rosenberg, 1997). Silva and Malcata (2004) telah berhasil memanfaatkan ekstrak

dari tumbuhan *Cynara cardunculus* sebagai koagulan sehingga casein susu mengendap lebih awal.

Enzim protease juga dapat digunakan untuk menghilangkan kekeruhan pada bir. Kekeruhan ini terjadi karena pengaruh suhu dingin selama penyimpanan maupun presipitasi protein oleh senyawa fenol, kekeruhan yang terjadi pada bir linier dengan jumlah fenol yang ada (Siebert and Lynn, 1997). Penggunaan enzim protease merupakan salah satu metode yang efisien untuk mencegah terjadinya kekeruhan. Protein pada bir dapat dihidrolisa menjadi peptida-peptida yang lebih kecil, sehingga mencegah terjadinya pengendapan (Violetta and Dobourdien, 1991).

Pemanfaatan enzim protease terus dikembangkan seperti yang telah dilaporkan oleh Edward dalam Lazano *et al.* (1994), bahwa protease digunakan mendegradasi protein untuk memperbaiki nilai nutrisi dan fungsionalnya. Sanches and Borgos (1997) menggunakan protease untuk memperbaiki sifat gel protein bunga matahari. Izawa *et al.* (1997), menyebutkan bahwa pemilihan enzim protease yang tepat dapat digunakan untuk memperbaiki kualitas hidrolisat protein dengan mengurangi rasa pahitnya.

Kunts (2000) juga menggunakan protease untuk modifikasi sifat fungsional dari hidrolisat protein kedelai. Protein hasil hidrolisis memiliki rentang kegunaan yang sangat luas pada produk pangan. Chen and Diosady (2003) menyatakan bahwa enzim protease dapat memecah globula protein dalam sistem emulsi, ketika sistem emulsi santan pecah maka minyak akan terpisah dengan komponen air. Sehingga protease juga dapat digunakan untuk proses ekstraksi minyak. Purnomo (2006) juga telah berhasil memanfaatkan enzim papain untuk mengekstrak minyak murni (*virgin coconut oil*), yang dikenal sebagai minyak multiguna terutama bagi kesehatan.

Isolasi Enzim Protease

Ekstraksi enzim tergantung pada letak enzim di dalam jaringannya. Enzim-enzim yang termasuk dalam enzim 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 seperti enzim mikroba atau enzim dari rimpang jahe, langkah pertama yang dilakukan adalah memecah dinding sel atau membran sel dan kemudian mengekstraksinya (Whitaker, 1994; Monti *et al.*, 2000; Choi and Laursen, 2000).

Prosedur ekstraksi tergantung pada tipe organisme sebagai sumber enzimnya. Sumber enzim yang berupa jaringan hewan harus diekstraksi sesegera mungkin setelah hewan mati dan tetap dijaga pada suhu dingin untuk mencegah autolisis. Ekstraksi enzim intraseluler dari mikroorganisme memerlukan cara-cara khusus, karena sel-selnya sulit dipecah. Sedangkan ekstraksi enzim intraseluler dari jaringan tanaman umumnya dapat dilakukan dengan memecah dinding sel melalui blender (Palmer, 1991; Naz, 2002).

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 (Naz, 2002). Whitaker (1994) menyatakan bahwa untuk ekstraksi enzim intraseluler dari jaringan tanaman harus ditambahkan buffer untuk menjaga pH di sekitar netral. Buffer ini diperlukan untuk melindungi enzim dari pengaruh asam yang dilepaskan oleh sel-sel selama ekstraksi.

Papain yang merupakan enzim ekstraseluler, dapat diproduksi dari getah, batang maupun daun papaya. Diawali dengan proses penurunan pH jus getah dari batang dan daun menggunakan asam klorida, asam sulfat atau asam asetat

sampai pH 3,5, kemudian diaduk hingga terjadi gumpalan warna hijau dari klorofil sambil dinaikkan suhunya sampai 35°C. Selanjutnya disaring secara bertingkat, dimulai dengan menggunakan alat penyaring biasa, filtrat pertama disaring kembali dengan ultra filter 100 mesh agar kandungan papainnya lebih kental atau dengan menggunakan metode evaporasi. Filtrat hasil saringan ini merupakan residu papain cair yang selanjutnya dapat dikeringkan menjadi tepung papain. Semua tahapan proses tersebut harus berlangsung cepat (Monti *et al.*, 2000).

Hasil ekstraksi enzim merupakan isolat dengan kadar yang masih rendah. Pemurnian akan dapat meningkatkan kadar enzim dari ekstrak kasarnya. Pemurnian enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan baik dengan pelarut organik seperti etanol dan aseton maupun metode *salting out* dengan menggunakan garam ammonium sulfat (Robyt and White, 1987; Noda *et al.*, 1994; Nafaji *et al.*, 2005).

Etanol dan aseton merupakan pelarut organik yang paling banyak digunakan untuk ekstraksi enzim (Soehartono, 1992). Penambahan pelarut organik ke dalam larutan protein akan mengurangi kelarutan protein dalam air dengan cara menurunkan konstanta dielektrik medium, sehingga molekul-molekul protein lebih cenderung berinteraksi dengan molekul protein yang lain dibanding dengan air, keadaan ini terus berlanjut sampai dicapai titik tertentu di mana protein mengendap (Wiseman, 1985). Akan tetapi, pelarut organik dalam kondisi tertentu dapat menimbulkan efek denaturasi pada protein enzim (Suhartono, 1992).

Pemurnian enzim bromelin dapat dilakukan menggunakan alkohol 40-90%, sedangkan pemurnian enzim papain dari getah pepaya dapat dilakukan dengan menggunakan alkohol 90% (Suhartono, 1992). Untuk satu bagian getah pepaya dibutuhkan satu sampai dua bagian etanol murni (Darwis dan Sukara, 1990). Penggunaan aseton

dapat dilakukan untuk pemurnian enzim protease dari rimpang jahe (Thompson *et al.*, 1973).

Garam ammonium sulfat sering digunakan untuk *salting out* protein. karena kelarutannya tinggi, tidak beracun untuk kebanyakan enzim, murah dan pada beberapa kasus memberikan efek menstabilkan enzim (Fox, 1991). Penggunaan amonium sulfat pada pemurnian enzim telah dilaporkan oleh beberapa peneliti antara lain: Noda *et al.* (1994) menggunakan amonium sulfat dengan kejenuhan 50% untuk pemurnian enzim protease dari buah melon. Asakura *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%.

Selanjutnya pada akhir proses ekstraksi yang menggunakan ammonium sulfat, harus dilakukan dialisis untuk memisahkan garam amonium sulfat dari protein enzim yang mengendap bersama-sama ketika *salting out* (Benito *et al.*, 2002; Nafaji *et al.*, 2005). Material dengan berat molekul rendah seperti amonium sulfat dapat dihilangkan melalui proses dialisis dari material dengan berat molekul yang lebih tinggi (makromolekul) seperti protein. Kantong dialisis selopan bersifat semipermeabel yang tidak akan bisa dilewati oleh molekul dengan berat lebih dari 12.000-14.000 yang dilakukan dalam suatu medium (air destilat) (Wiseman, 1985). Dialisis dapat juga dilakukan dalam medium buffer fosfat pH netral berlebih (sebanyak 10 kali volume material dalam kantong selopan), atau dapat juga mengganti dialisat pada setiap periode tertentu (Chang, 1981; Nafaji *et al.*, 2005).

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 pada satuan waktu tertentu (Robit and White, 1987).

Substrat kasein hingga saat ini masih banyak digunakan untuk pengujian aktivitas enzim protease. Choi *et al.* (1999) menguji aktivitas *pure proteinase* dari otot daging *Atlantic menhaden* menggunakan kasein. Nafaji *et al.* (2004) menguji aktivitas protease yang diisolasi dari *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan substrat haemoglobin atau kasein. Sumantha *et al.* (2005) juga menggunakan substrat kasein dalam buffer fosfat pH 7 untuk mengukur aktivitas *neutral metalloprotease* kapang. Savero *et al.* (2007) yang telah berhasil melakukan purifikasi bromelin dengan teknik separasi membran juga menguji aktivitas enzimnya menggunakan kasein dalam buffer fosfat pH 7.

Aktivitas enzim diuji pada suhu yang mudah dipergunakan (25-37°C) dengan konsentrasi substrat jenuh. Beberapa suhu pengujian enzim menggunakan suhu 37°C, namun belum ada standar suhu pengujian spesifik. Oleh karena itu suhu pengujian yang dipergunakan harus disebutkan dalam kasus-kasus pengujian aktivitas enzim (Palmer, 1991).

Pengujian aktivitas protease juga dapat dilakukan pada suhu 37°C antara lain pengujian aktivitas protease yang diisolasi dari udang (Jiang *et al.*, 1991), protease buah melon (Noda *et al.*, 1994), protease dari biji padi (Asakura *et al.*, 1997). Beberapa peneliti juga menguji aktivitas enzim pada suhu 40°C yaitu aktivitas protease dari bakteri pada whey kedelai (Leewit and Pornsuksawang, 1988), aktivitas enzim protease papain (Sanogo *et al.*, 1990), sedangkan Molina and Toldra (1992) menguji aktivitas protease mikroba yang diekstraksi dari *dry cured ham* dilakukan pada suhu 30°C. Tapi kebanyakan peneliti menguji aktivitas protease pada suhu optimal aktivitas enzim yang bersangkutan.

Metode yang paling banyak digunakan untuk mengukur aktivitas enzim protease adalah dengan absorbansi ultraviolet,

dari peptida-peptida hasil hidrolisa substrat yang tidak mengendap dengan penambahan asam trikloroasetat (TCA). Panjang gelombang ultraviolet yang digunakan adalah 280 nm. Absorbansi ini akibat adanya absorbansi oleh asam amino aromatik, sehingga metode ini sangat bermanfaat untuk mengukur aktivitas enzim protease dengan menggunakan substrat yang mempunyai asam amino aromatik (Fox, 1991; Anderson *et al.*, 1995).

Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim merupakan tahapan untuk menentukan sifat-sifat tertentu dari suatu enzim, sehingga dapat diketahui ketahanannya terhadap kondisi lingkungan tertentu di sekitar enzim tersebut. Dengan menentukan karakter atau sifat enzim, maka dapat mempermudah penggunaan enzim dalam bentuk aplikasi produk tertentu. Penentuan karakter enzim berhubungan erat dengan berbagai faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim itu sendiri. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim antara lain:

Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim

Pada umumnya semakin tinggi suhu, maka semakin meningkat pula laju reaksi kimia baik pada substrat yang dikatalisis maupun yang tidak dikatalisis oleh enzim. Namun perlu diingat bahwa enzim adalah protein, jadi semakin tinggi suhu proses maka inaktivasi enzim juga meningkat. Hal tersebut dikarenakan terjadinya denaturasi pada protein enzim sehingga aktivitas enzim akan menurun (Holme and Peck, 1998).

Wong (1995) menyatakan bahwa pengaruh suhu terhadap enzim agak kompleks, misalnya pada suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat perusakan atau pemecahan enzim, sebaliknya semakin tinggi suhu (dalam batas tertentu) maka akan semakin aktif enzim tersebut. Bila suhu masih naik terus, laju kerusakan enzim akan melampaui reaksi

katalisis enzim. Whitaker (1994) juga menyatakan, meskipun kenaikan suhu akan meningkatkan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim, namun kenyataan ini hanya berlaku dalam kisaran suhu yang terbatas dengan tegas. Kecepatan reaksi mula-mula meningkat dengan kenaikan suhu dan peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi. Tetapi pada akhirnya energi kinetik enzim akan melampaui rintangan energi untuk memutuskan ikatan hidrogen dan hidrofobik yang lemah, yang mempertahankan struktur sekunder-tersiernya.

Perubahan-perubahan temperatur dapat mempengaruhi reaksi enzimatik dari beberapa segi, yaitu: kestabilan enzim, perubahan daya kelarutan gas, perubahan pH buffer, afinitas enzim terhadap aktivator dan inhibitor, daya reaksi kompetisi, ionisasi gugus fungsi, afinitas enzim-substrat, velositas konversi dari substrat ke produk, dan derajat asosiasi multipolipeptida dari enzim (Whitaker, 1994).

Termostabilitas

Perbedaan sumber enzim menyebabkan perbedaan daya tahan panas. Enzim yang serupa seperti amilase bila dihasilkan oleh bakteri, memiliki daya tahan yang lebih tinggi terhadap panas dibandingkan dengan enzim amilase yang berasal dari kapang. Umumnya, enzim-enzim bekerja sangat lambat pada suhu di bawah titik beku dan keaktifannya meningkat sampai 45°C.

Hampir semua enzim mempunyai aktivitas optimal pada suhu 30°C sampai 40°C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu 45°C. Hubungan antara suhu dan waktu bagi inaktivasi enzim secara total lebih menarik karena mempunyai nilai praktis yang penting. Penginaktivan enzim tertentu kadang-kadang berguna sebagai indikator untuk menilai seberapa jauh efektivitas proses inaktivasi enzim misalnya pasteurisasi dan sterilisasi dalam pengolahan bahan pangan (Wong, 1995).

Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim

Semua enzim adalah protein, maka faktor-faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim juga merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi struktur sekunder, tersier, dan kuartener dari protein. Kenyataan itu menyebabkan faktor pH lingkungan yang berhubungan dengan kestabilan dan daya ionisasi gugus aktif suatu enzim akan mempengaruhi aktivitas enzim tersebut (Whitaker, 1994).

Enzim memiliki kepekaan yang sangat tinggi terhadap perubahan pH di lingkungannya. Pada umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH disebut dengan pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5 sampai 8,0. Suatu enzim tertentu mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Di sekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Pengendalian pH sehingga mempengaruhi aktivitas enzim sangat diperlukan dalam praktek teknologi pangan. Penggunaan enzim dalam industri pangan memiliki peranan yang penting, pengaturan pH harus ditujukan untuk mendapatkan keaktifan enzim yang maksimal (Wong, 1995).

Menurut Holme dan Peck (1998), pada kisaran pH yang ekstrem baik asam maupun basa terjadi inaktivasi enzim yang bersifat *irreversible*. Pada kisaran pH selebihnya masih dapat terjadi inaktivasi, tetapi bersifat *reversible*. Enzim dapat pula mengalami konformasi bila pH bervariasi. Gugus muatan yang jauh dari daerah terikatnya substrat mungkin diperlukan untuk mempertahankan struktur tersier atau kuartener yang aktif. Dengan berubahnya muatan pada gugus ini, protein dapat terbuka menjadi lebih kompleks atau berdisosiasi menjadi protomer, semua ini mengakibatkan kehilangan aktivitas. Bergantung pada besarnya perubahan, aktivitas bisa

pulih atau tidak ketika enzim tersebut dikembalikan kepada pH-nya yang optimal (Whitaker, 1994).

Konsentrasi Enzim dan Substrat

Enzim merupakan reaktan yang bergabung dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim substrat, (EnzS), yang terurai dan membentuk produk P serta enzim bebas. Kecepatan awal suatu reaksi merupakan kecepatan yang diukur sebelum terbentuk produk yang cukup untuk memungkinkan terjadinya reaksi balik. Kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim selalu sebanding dengan konsentrasi enzim (Harper, 1999).

Jika konsentrasi substrat meningkat sementara semua kondisi lainnya dipertahankan tetap tidak berubah (konstan), percepatan awal yang terukur, maka nilai kecepatan yang diukur kalau substrat yang sudah bereaksi jumlahnya sedikit sekali akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum, kecepatan maksimum dan tidak berlanjut. Percepatan reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai suatu keadaan dimana enzim tersebut dikatakan sudah jenuh oleh substrat (Harper, 1999).

Kinetika Enzim

Enzim merupakan reaktan yang bergabung dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim substrat, (EnzS), yang terurai dan membentuk produk P serta enzim bebas. Kecepatan awal suatu reaksi merupakan kecepatan yang diukur sebelum terbentuk produk yang cukup untuk memungkinkan terjadinya reaksi balik. Kecepatan awal suatu reaksi yang dikatalisis enzim selalu sebanding dengan konsentrasi enzim (Wong, 1995).

Jika konsentrasi substrat meningkat sementara semua kondisi lainnya dipertahankan tetap tidak berubah (konstan), maka nilai kecepatan yang diukur kalau substrat yang sudah bereaksi jumlahnya sedikit sekali akan meningkat hingga mencapai nilai maksimum, kecepatan maksimum dan tidak

berlanjut. Kecepatan reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai suatu keadaan dimana enzim tersebut sudah jenuh oleh substrat (Holme and Peck, 1998).

Debrah and Ohta (1997) mengekstraksi minyak kelapa dengan neutral protease dari *Aspergillus oryzae* 1%. Chen and Diosady (2003) mengekstrak minyak kelapa menggunakan enzim kompleks dengan konsentrasi di bawah 2%. Sementara itu, hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa untuk ekstraksi minyak kelapa murni dapat dilakukan menggunakan protease biduri yang berkisar 0,05-0,15% (b/b) dengan waktu inkubasi 2 sampai 4 jam.

BAB 4 ENZIM PROTEASE BIDURI

Tanaman biduri 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 (2002a) menunjukan bahwa hasil ekstraksi getah tanaman biduri menunjukan adanya aktivitas enzim protease, sehingga tanaman biduri dapat digunakan sebagai alternatif sumber enzim protease.

Ekstraksi dan Purifikasi Enzim Protease Biduri

Ekstraksi

Isolasi enzim bertujuan untuk memisahkan enzim dari jaringan tempat asalnya. Kebanyakan enzim tampak jelas menunjukkan aktivitasnya bila dalam keadaan sudah diekstraksi dan dimurnikan. Ekstraksi enzim dilakukan pada suhu rendah (kurang lebih 4°C), mengingat enzim sering tidak stabil pada suhu yang lebih tinggi (Palmer, 1991; Naz, 2002).



Gambar 6. Proses Penyadapan Getah 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 (2002a) 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 disimpan 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. Berbagai sumber menyatakan bahwa 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 disadap. 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 getah biduri dilakukan 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 filtrate dan mempertahankan kestabilan enzim dari pengaruh perubahan lingkungan serta pengaruh perubahan pH dari ekstrak cairan sel.

Enzim protease tanaman biduri dapat diekstraksi 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 $3,91.10^4$ 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 ditambahkan 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*). tingkat kejenuhan amonium sulfat optimal untuk ekstraksi enzim protease dari tanaman biduri sebesar 65% (Witono dkk., 2007a).

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 fosfat pH netral.

Pengeringan pada enzim dapat meningkatkan daya simpan. Menurut Nafi (2002) pengeringan enzim protease dari tanaman biduri dapat dilakukan dengan freeze drying selama 24 jam untuk 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.

Purifikasi (Pemurnian)

Purifikasi enzim merupakan proses pemisahan enzim dari komponen-komponen selain enzim, sehingga diperoleh enzim yang relatif murni dengan aktivitas spesifik tinggi. Dengan adanya purifikasi, maka akan mudah melakukan karakterisasi protein enzim. Secara umum metode purifikasi enzim tidak berbeda dengan metode purifikasi protein. Karena semua enzim murni yang telah diamati sampai saat ini adalah protein (Naz, 2002).

Purifikasi enzim protease dari ekstrak kasar dapat dilakukan secara bertahap dengan kolom kromatografi yang berisi gel filtrasi atau gel penukar ion. Monti *et al.* (2002) mempurifikasi papain dari *fresh latex* pepaya dalam 1 tahap dengan gel filtrasi Sephadex G-75. Demikian juga Choi *et al.* (1999) mempurifikasi proteinase dari *Atlantic Menhaden Muscle* satu tahap menggunakan CM-Sephadex C-50. Tetapi kebanyakan peneliti melakukan purifikasi secara bertahap, di antaranya Nafaji *et al.* (2005) mempurifikasi protease mikroba melalui Gel Filtrasi Sephadex G-50 dilanjut dengan CM-Sephadex. Sedangkan Benito *et al.* (2002) mempurifikasi

protease ekstraseluler mikroba menggunakan DEAE-Sepharose dan Gel Filtrasi. Demikian juga Kohlmann *et al.* (1991) mempurifikasi enzim protease melalui ion exchanger chromatography dan filtration gel chromatography.

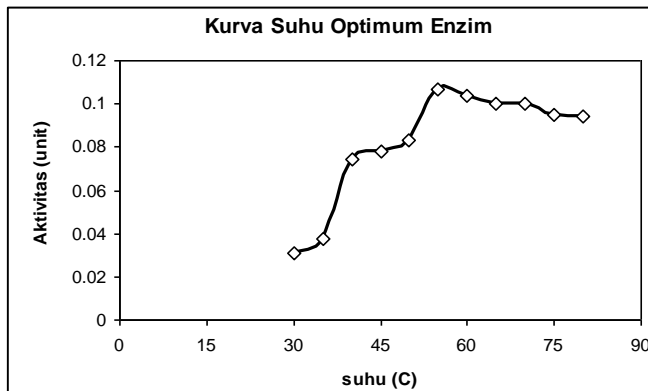
Menurut Muzakhar (2002) purifikasi enzim protease dari ekstrak kasar dapat dilakukan secara bertahap dengan kolom kromatografi menggunakan DEAE toyopearl, butyl toyopearl dan sephadex G-100.

Metode purifikasi yang sesuai untuk enzim protease dari tanaman biduri adalah dilakukan secara bertahap yaitu kromatografi gel filtrasi sephadex G-25, yang dilanjutkan dengan kromatografi penukar ion positif carboxymethyl sephadex C-50 (Witono dkk., 2007b).

Karakter Enzim Protease Biduri

Suhu Optimum Protease Biduri

Temperatur atau suhu inkubasi sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease biduri. Hal tersebut menjadi acuan terutama ketika enzim tersebut diaplikasikan dalam pembuatan produk tertentu.



Gambar 7. Kurva Suhu Optimum Enzim Protease Biduri

Gambar 7 menunjukkan bahwa pada suhu rendah enzim memiliki aktivitas yang relatif rendah, kemudian

aktivitas enzim semakin meningkat seiring dengan peningkatan suhu inkubasi namun ketika suhu inkubasi semakin ditingkatkan dan melewati suhu tersebut, aktivitas enzim tidak lagi meningkat akan tetapi akan semakin menurun. Dari hasil tersebut, menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim protease biduri apabila suhu dinaikkan sampai 55°C, namun jika melebihi suhu 55°C aktivitas enzim protease biduri akan semakin menurun. Hal ini merupakan hasil dari ketidakstabilan enzim terhadap suhu tinggi (Witono dkk., 2007b).

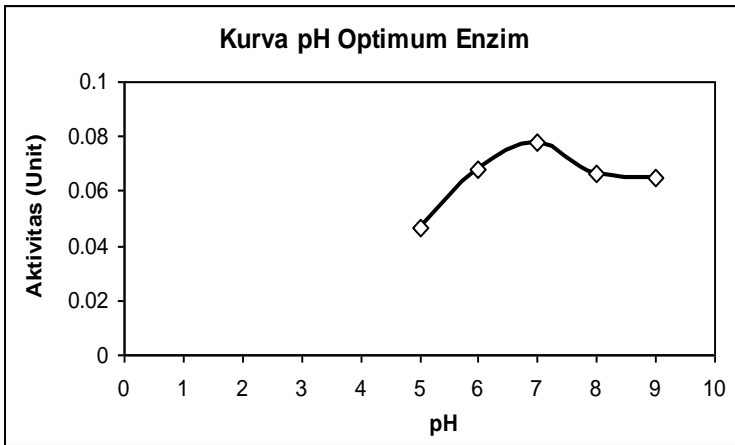
Enzim protease memiliki komponen protein yang sangat besar, sehingga sifat-sifat yang dimiliki oleh enzim protease adalah sifat-sifat yang dimiliki pula oleh protein. Hal tersebut juga terjadi pada enzim protease biduri. Apabila dipanaskan secara terus menerus pada suhu yang semakin tinggi, maka akan terjadi denaturasi protein enzim. Hal tersebut berakibat pada aktivitas enzim protease biduri, sehingga yang terjadi adalah menurunnya aktivitas enzim akibat dari banyaknya protein yang terdenaturasi. Pada suhu 55°C, aktivitas enzim adalah paling tinggi dibandingkan suhu lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pada suhu tersebut enzim mampu beraktivitas secara optimal dibandingkan dengan suhu inkubasi lainnya. Keadaan tersebut menunjukkan bahwa suhu 55°C merupakan suhu optimum enzim protease biduri, dimana enzim dapat melakukan aktivitasnya dengan optimal.

pH Optimum Enzim Protease Biduri

pH (derajat keasaman) merupakan salah satu faktor lingkungan yang berhubungan dengan kestabilan enzim, sehingga akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut.

Gambar 8 menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease biduri meningkat hingga pH 7 dan setelah itu cenderung tetap bahkan menurun. Hal tersebut menunjukkan bahwa pH 7 merupakan pH optimum enzim protease biduri yang

ditunjukkan dengan aktivitas proteolitik yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan pH lainnya (Witono dkk, 2007b). Menurut Winarno (1995), enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH tertentu yang disebut dengan pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5 – 8.



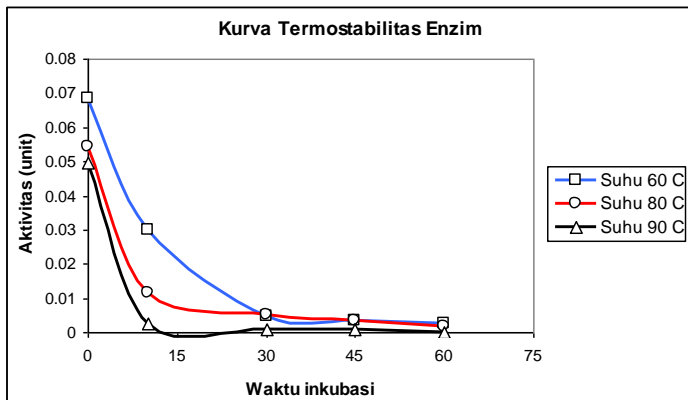
Gambar 8. Kurva pH Optimum Enzim Protease Biduri

Perbedaan pH menyebabkan aktivitas enzim yang dihasilkan juga berbeda-beda. Pada keadaan di atas, aktivitas enzim pada pH 7 merupakan aktivitas yang paling tinggi jika dibandingkan dengan pH lainnya. Adanya penurunan aktivitas enzim setelah melewati pH 7 merupakan akibat dari adanya perubahan keadaan ionik pada gugus residu terminal amino enzim dan perubahan molekul substrat. Menurut Harper (1999), enzim protease dapat mengalami perubahan konformasi bila pH bervariasi, dimana gugus bermuatan yang jauh dari daerah terikatnya substrat mungkin diperlukan untuk mempertahankan struktur tersier atau kuartener yang aktif. Namun, dengan berubahnya muatan pada gugus ini protein dapat terbuka menjadi lebih kompleks atau berdisosiasi menjadi protomer dan hal ini dapat menyebabkan kehilangan aktivitas. Hal ini pula yang terjadi pada aktivitas enzim protease biduri dengan pH yang bervariasi. Pada pH yang

rendah, struktur tersier dan kuartener masih dapat dipertahankan, sehingga enzim protease biduri mampu bereaksi dengan substrat dengan aktivitas yang tinggi, namun ketika pH semakin meningkat melebihi pH optimum akan terjadi perubahan struktur protein enzim menjadi lebih kompleks yang menyebabkan protein enzim mengalami denaturasi yang permanen (*irreversible*) sehingga akibatnya terjadi penurunan aktivitas enzim protease biduri.

Termostabilitas Enzim Protease Biduri

Termostabilitas enzim berhubungan dengan daya tahan enzim terhadap panas atau suhu tinggi. Daya tahan terhadap panas ini digunakan untuk acuan dalam menginaktivasi enzim ketika digunakan untuk aplikasi produk pangan.



Gambar 9. Kurva Termostabilitas Enzim Protease Biduri

Gambar 9 dapat diketahui bahwa aktivitas enzim protease biduri akan semakin menurun seiring dengan lamanya inkubasi dan peningkatan suhu inkubasi. Pada suhu 60°C, masih terdapat aktivitas enzim hingga 10 menit pemanasan bahkan melebihi waktu tersebut tampak aktivitas enzim yang cukup signifikan. Namun pada suhu 90°C terjadi penurunan aktivitas enzim yang cukup tajam jika dibandingkan dengan suhu sebelumnya, bahkan pada saat 10

menit pemanasan aktivitas enzim mendekati 0. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi inaktivasi enzim pada suhu 90°C.

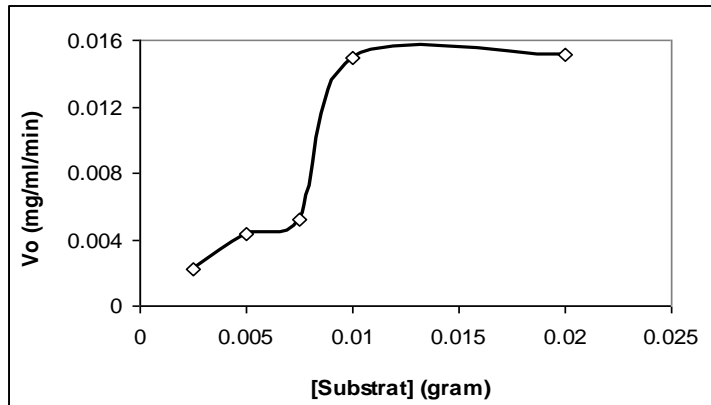
Protein enzim terdenaturasi dengan cepat pada suhu 90°C, sehingga aktivitas enzim tidak dapat dipertahankan. Akibatnya terjadi penurunan aktivitas enzim secara drastis jika dibandingkan dengan suhu 60°C dan 80°C. Apabila dilihat dari keadaan di atas, maka enzim protease biduri memiliki daya tahan yang cukup tinggi terhadap panas. Ini ditunjukkan ketika enzim dipanaskan pada suhu 60°C terdapat aktivitas enzim yang cukup signifikan, sedangkan menurut Winarno (1995) aktivitas optimal enzim pada umumnya berkisar pada suhu 30°C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu 45°C.

Daya tahan terhadap suhu tinggi yang dimiliki oleh enzim protease ini dapat mempermudah proses selanjutnya, terutama ketika enzim tersebut diaplikasikan dalam bidang industri. Jika dalam industri diharapkan proses pengolahan yang relatif cepat, maka inaktivasi enzim dapat dilakukan pada suhu tinggi. Namun, apabila diharapkan untuk proses pengolahan yang berjalan lambat, maka inaktivasi enzim dilakukan pada suhu yang lebih rendah (Witono dkk., 2007b).

Laju Reaksi Enzim Protease Biduri

Reaksi katalitik enzim terhadap substrat yang dihidrolisis menghasilkan kecepatan tertentu yang disebut dengan laju reaksi enzim. Laju reaksi enzim berkaitan erat dengan konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzim tiap satuan waktu. Semakin tinggi konsentrasi substrat, reaksi enzim akan semakin cepat sampai mencapai kecepatan yang konstan (Winarno, 1995).

Pengaruh konsentrasi substrat kasein terhadap kecepatan awal hidrolisis enzimatis protease biduri tertera pada Gambar 10 yang menunjukkan bahwa semakin tinggi substrat kasein yang digunakan maka semakin tinggi pula kecepatan reaksi enzim hingga mencapai kecepatan yang konstan.



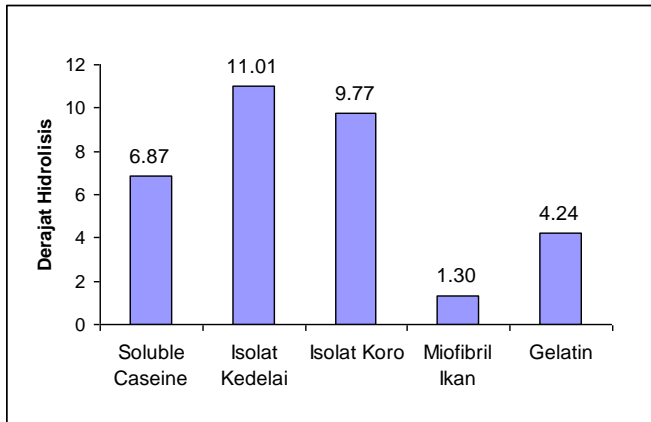
Gambar 10. Pengaruh Konsentrasi Substrat Kasein terhadap Kecepatan Awal Hidrolisis Enzimatis dari Protease Biduri

Derajat Hidrolisis Substrat oleh Enzim Protease Biduri

Derajat Hidrolisis (DH) diartikan sebagai perbandingan jumlah ikatan peptida yang dihidrolisa per gram protein dengan jumlah total ikatan peptida yang dihidrolisis (Van der Ven, 2002). Perbandingan ini ditunjukkan dalam bentuk prosentase dari ikatan peptida yang terpecah menjadi asam amino dalam reaksi hidrolisis.

Sebelum menentukan besarnya derajat hidrolisis, perlu diketahui terlebih dahulu nilai H dan nilai H total. Nilai H yaitu besarnya ikatan peptida yang terpecah menjadi asam amino selama proses hidrolisis berlangsung. Sedangkan H total adalah jumlah total ikatan peptida yang terdapat pada substrat sebelum dihidrolisis oleh enzim.

Histogram derajat hidrolisis protease biduri pada berbagai substrat protein (*soluble caseine*, isolat protein kedelai, isolat protein koro, miofibril ikan dan gelatin) sebagaimana yang dilaporkan oleh Witono dkk. (2009) yang tertera pada Gambar 11.



Gambar 11. Derajat Hidrolisis Protease Biduri pada berbagai Substrat Protein

Gambar 11 menunjukkan bahwa protease biduri mampu menghidrolisis berbagai jenis substrat sampel yang meliputi: *soluble caseine*, isolat protein kedelai, isolat protein koro, miofibril ikan dan gelatin dengan derajat hidrolisis yang bervariasi. Pada konsentrasi dan lama inkubasi yang sama, dihasilkan derajat hidrolisis protease biduri yang berbeda-beda. Perbedaan derajat hidrolisis protease biduri tersebut lebih disebabkan oleh perbedaan jumlah ikatan peptida atau besarnya molekul dari protein substrat. Menurut Nielsen (2001) jumlah total ikatan peptida dari masing-masing substrat tidak sama, sehingga akan berpengaruh terhadap derajat hidrolisis suatu enzim dalam memecah substrat.

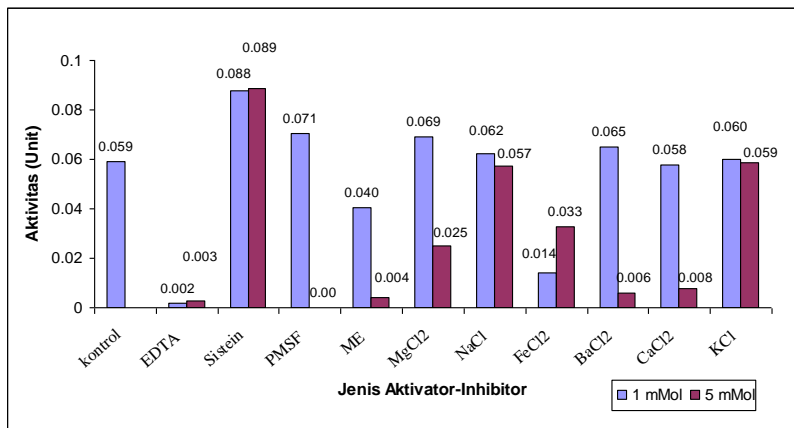
Perbedaan derajat hidrolisis diduga juga dipengaruhi oleh spesifitas protease dalam menghidrolisis substrat. Sebagaimana dinyatakan oleh Fox (1991), bahwa spesifitas enzim protease berbeda-beda dalam menghidrolisa ikatan peptida dalam molekul protein. Whitaker (1994) menambahkan beberapa enzim protease mempunyai syarat khusus untuk aktivitas proteolitiknya. Semakin spesifik suatu

enzim, semakin sedikit jumlah ikatan peptida yang mampu dihidrolisa.

Aktivator dan Inhibitor Enzim Protease Biduri

Aktivator enzim adalah zat yang dapat mempercepat kinerja enzim, seperti misalnya ion chloride yang dapat mempercepat kerja enzim amylase. Sedangkan inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim. Ada dua macam inhibitor, yaitu inhibitor kompetitif dan non kompetitif. Dikatakan inhibitor kompetitif karena berkompetisi dengan substrat untuk mengisi sisi aktif enzim dan dikatakan inhibitor non kompetitif karena tidak bersaing dengan substrat untuk mengisi sisi aktif enzim, tetapi mengisi sisi lain enzim, sehingga sisi aktifnya berubah bentuk dan tidak bisa bereaksi dengan substrat.

Hasil identifikasi berikut pengaruh berbagai inhibitor dan aktivator terhadap aktivitas protease biduri (Witono dkk, 2009) sebagaimana tertera pada Gambar 12.



Gambar 12. Pengaruh Inhibitor dan Aktivator terhadap Aktivitas Protease Biduri

Protease biduri berdasarkan sifat kimia sisi aktifnya termasuk dalam jenis sulfidril (*cysteine protease*). Hal ini memperkuat dugaan dari hasil penelitian sebelumnya (Witono, 2002a) bahwa protease biduri juga aktif dengan

penambahan aktivator spesifik lainnya yakni HCN. Rao *et al.* (1998) menyatakan bahwa protease sulfidril akan meningkatkan aktivitasnya bila ditambah reagen sistein. Suhartono, dkk. (1995) melaporkan bahwa penambahan HCN juga dapat meningkatkan aktivitas protease sulfidril. Sementara itu, Adinarayana *et al.* (2003) dalam percobaannya menggunakan merkaptoetanol yang disebut sebagai penghambat enzim protease sistein. Protease sulfidril (*cysteine protease*) sangat tergantung dengan adanya gugus sulfidril (sistein) pada sisi aktifnya.

Enzim protease biduri juga dihambat oleh EDTA. EDTA merupakan penghambat spesifik bagi jenis protease logam. Adapun mekanisme penghambatan EDTA pada protease sistein dari tanaman biduri ini dapat dijelaskan dengan hipotesa berikut: mengikuti mekanisme umum penghambatan suatu protease sistein (Rzychon *et al.*, 2004), yakni menghalangi interaksi protease dengan substrat, di antaranya dengan cara: (i) memblokir interaksi non-kovalen rantai samping pusat aktif enzim, (ii) mendistorsi interaksi kovalen pusat aktif dengan substrat, (iii) memblokir secara parsial pusat aktif enzim sehingga mengganggu interaksi non-kovalen dengan substrat. Selain itu enzim protease biduri juga dihambat oleh PMSF, $MgCl_2$, $CaCl_2$ dan $BaCl_2$ pada konsentrasi tinggi.

Enzim biduri aktivitasnya meningkat dan stabil dengan penambahan senyawa garam monovalen seperti NaCl atau KCl. Hal ini sesuai dengan fakta bahwa salah satu habitat tanaman biduri sebagai sumber protease berada di area dekat pantai, sehingga stabilitas pada larutan garam diduga sesuai dengan sifat *native* dari protease biduri (Witono dkk., 2009).

Pola Pemecahan Substrat oleh Enzim Protease Biduri

Menurut Kaneda *et al.* (1997), berdasarkan pola pemecahan substratnya, enzim protease digolongkan dalam dua jenis yakni: (1) endopeptidase, merupakan protease yang memotong ikatan peptida di tengah; dan (2) eksopeptidase,

merupakan protease yang memecah ikatan peptida pada terminal (ujung) dari protein. Hasil hidrolisis dari endopeptidase merupakan fragmen peptida dan peptida, sedangkan hasil hidolisis dari golongan eksopeptidase berupa fragmen peptida dan asam-asam amino. Menurut Fox (1991) dan Anderson *et al.* (1995), hasil reaksi suatu enzim dapat diidentifikasi dengan substrat yang dihidrolisis maupun produk hasil hidrolisisnya.

Melalui analisa dengan menggunakan elektroforesis gel dan TLC (Thin Layer Chromatography) (Witono dkk., 2009; Witono and Kang, 2010) didapatkan bahwa enzim protease biduri merupakan eksoprotease atau eksopeptidase. Jenis eksopeptidase memecah polipeptida pada ujung protein, sehingga dihasilkan peptida rantai panjang dan asam-asam amino.

BAB 5

PRODUKSI ENZIM PROTEASE BIDURI

Kajian teknologi produksi enzim protease biduri dilaksanakan dalam dua tahap, yakni skala laboratorium dan skala pilot plan.

Teknologi Produksi Enzim Protease Biduri Skala Laboratorium

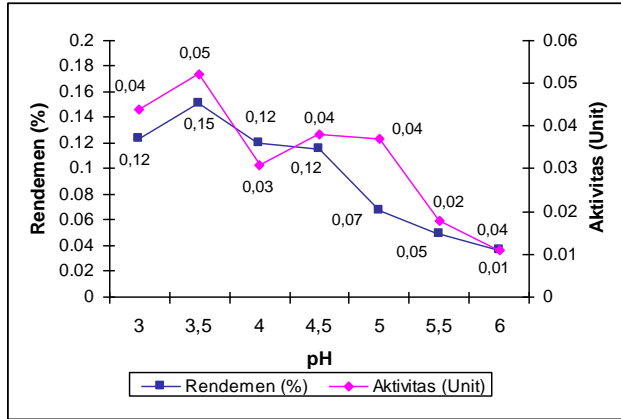
Beberapa faktor yang berpengaruh selama proses produksi protease yang diekstraksi secara langsung dari tanaman biduri (daun dan batang) telah diketahui. Faktor-faktor tersebut adalah pengaruh pH dan penentuan pH optimum ekstraksi, penambahan natrium metabisulfit, penentuan media ekstraksi dan pengaruh teknik pengeringan terhadap aktivitas protease biduri.

pH Optimum Ekstraksi

Pengaruh pH ekstraksi terhadap rendemen dan unit aktivitas protease dari tanaman biduri sebagaimana terlihat pada Gambar 13. Sedangkan pengaruh pH ekstraksi terhadap protein dan aktivitas spesifik protease dari tanaman biduri sebagaimana terlihat pada Gambar 14.

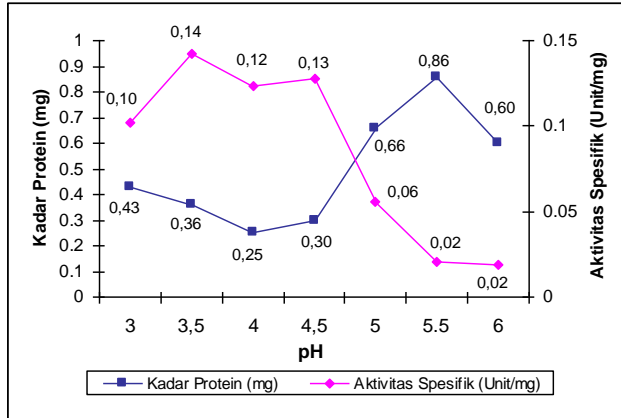
Gambar 13 dan 14 menunjukkan bahwa pH ekstraksi berpengaruh terhadap rendemen dan unit aktivitas, kadar protein maupun aktivitas spesifik protease dari tanaman biduri. Presipitasi pada pH 3,5 dihasilkan protease biduri dengan rendemen, unit aktivitas maupun aktivitas spesifik paling tinggi secara berturut-turut sebesar 0,151%, 0,1426 unit dan 0,0518 unit/mg. Perlakuan pada pH 3,5 diduga merupakan pH isoelektrik bagi protein enzim biduri. Hal ini karena pada titik isoelektrik, protein mempunyai nilai kelarutan terendah, mengingat protein berada dalam bentuk *zwitter ion* (tidak memiliki muatan bersih) dan cenderung membentuk ion dipolar ($\text{NH}_3^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-$). Pada kondisi tersebut gugus hidrofobik protein berbalik keluar dan gugus hidrofilik terlipat kedalam sehingga protein yang semula larut akan mengalami

koagulasi dan kemudian mengendap (presipitasi). Sedangkan protein yang mengendap ini merupakan protein enzim, karena mempunyai aktivitas enzim yang paling tinggi.



Gambar 13. Pengaruh pH Ekstraksi terhadap Rendemen dan Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri

Gambar 14 juga menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi justru berada pada pH 5,5, sedangkan pada pH 3,5 didapat protease dengan kadar protein yang relatif lebih rendah. Pada pH 5,5 ini diduga merupakan pH isoelektrik sebagian besar protein non enzim, sebaliknya pada pH 3,5 merupakan pH isoelektrik sebagian besar protein enzim biduri. Lebih jauh Zayas (1997) menyatakan bahwa sifat kelarutan protein tergantung komposisi asam amino, berat molekul, bentuk dan kandungan gugus polar dan non-polar pada asam amino. Asam amino pada kondisi pH isoelektrik mempunyai ketidaklarutan maksimum disebabkan beda potensialnya mendekati nol. Sedangkan pada pH diatas maupun dibawah isoelektrik mempunyai kelarutan maksimum karena pada pH rendah gugus aminonya terdisosiasi menjadi bermuatan positif dan sebaliknya pada pH tinggi gugus karboksil terdisosiasi menjadi bermuatan negatif.



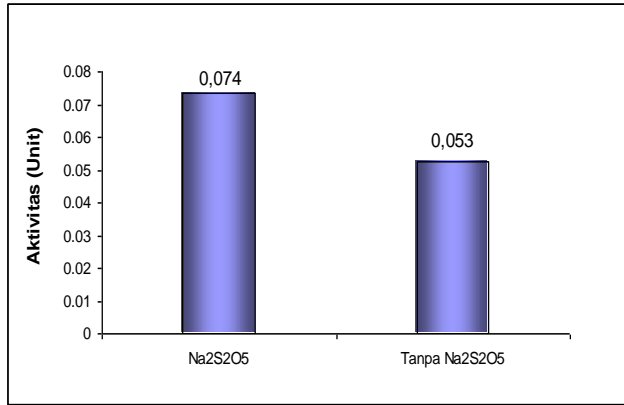
Gambar 14. Pengaruh pH Ekstraksi terhadap Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Protease dari Tanaman Biduri

Pengaruh Penambahan Natrium Metabisulfit ($Na_2S_2O_5$)

Pengaruh penambahan Natrium metabisulfit ($Na_2S_2O_5$) 0,7% terhadap aktivitas protease dari tanaman biduri tertera pada Gambar 15.

Gambar 15 menunjukkan bahwa penambahan Na-metabisulfit 0,7 % selama produksi menghasilkan protease biduri dengan aktivitas lebih tinggi yaitu sebesar 0,074 unit sedangkan bila tanpa penambahan Na-metabisulfit, aktivitasnya hanya sebesar 0,053 unit. Hal ini diduga natrium metabisulfit bersifat melindungi protein enzim, sehingga komformasinya tidak berubah atau tidak mudah rusak selama inkubasi. Rao *et al.* (1998) dan Monti *et al.* (2004) menyatakan bahwa penggunaan Na-metabisulfit sebagai aktivator mampu meningkatkan aktivitas papain. Pada produksi papain dari getah pepaya, adanya penambahan Na-metabisulfit mampu mereduksi ikatan disulfida yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan. Oleh karena itu, perbedaan aktivitas yang dihasilkan dalam produksi enzim protease biduri ini diduga karena adanya ikatan disulfida yang tereduksi. Salah satu peran Na-metabisulfit adalah sebagai

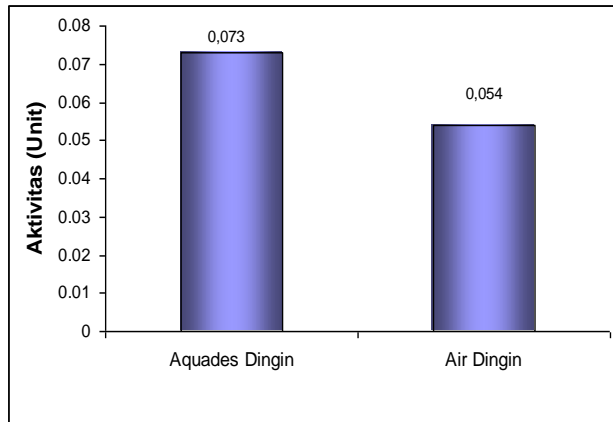
antioksidan. Na-metabisulfit 0,7 % sebagai antioksidan dapat mencegah kerusakan papain akibat oksidasi.



Gambar 15. Pengaruh Penambahan Na-metabisulfit terhadap Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri

Penentuan Media untuk Ekstraksi

Pengaruh media ekstraksi (aquades dingin dan air biasa dingin suhu 12°C) terhadap aktivitas protease dari tanaman biduri dapat dilihat pada histogram Gambar 16.



Gambar 16. Pengaruh Media Ekstraksi terhadap Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri

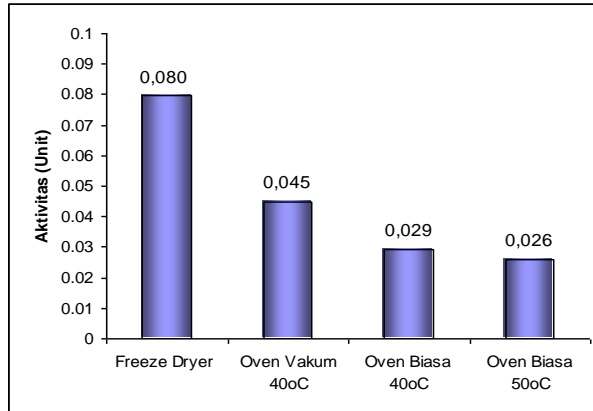
Gambar 16 menunjukkan bahwa penggunaan media ekstraksi berpengaruh terhadap aktivitas protease dari tanaman biduri. Ekstraksi menggunakan aquades dingin ($T = 12^{\circ}\text{C}$) menghasilkan protease biduri dengan aktivitas lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan air biasa dingin ($T = 12^{\circ}\text{C}$). Hal ini karena aquades lebih murni dan tidak mengandung bahan anorganik dibandingkan dengan air biasa. Viessman *et al.* (2005) menyatakan bahwa air destilat dan air terpurifikasi lainnya biasanya bebas dari kontaminan ion-ion anorganik.

Senyawa-senyawa tertentu seperti kalsium, magnesium dan logam seperti besi (Fe) dan seng (Zn) yang terkandung dalam air tanah akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan. Menurut Buckle *et al.* (1987) dan Couvin and Young (2000) bahwa komponen yang terdapat dalam air diantaranya adalah senyawa fenolik, tembaga, besi, mangan, seng, kalsium, magnesium dan klorida. Hasil penelitian Zhuang and Butterfield (1991), menunjukkan bahwa penurunan aktivitas proteolitik pada papain juga dapat disebabkan oleh berikatannya gugus sulfidril papain dengan logam-logam berat, seperti Zn, Cu, Ag dan Hg. Menurut deMan (1997) logam tertentu yang terkandung dalam pelarut dapat menghambat aktivitas enzim. Walaupun ada beberapa jenis enzim tertentu yang justru memerlukan logam sebagai aktivator, diantaranya adalah metaloeksopeptidase yang memerlukan logam divalen sebagai kofaktor.

pH air tanah yang digunakan untuk ekstraksi diduga juga berpengaruh terhadap aktivitas protease dari tanaman biduri. Air tanah sampel yang digunakan selama produksi cenderung bersifat asam atau pH-nya sedikit di bawah 7. Padahal hasil penelitian sebelumnya (Gambar 8) menunjukkan bahwa pH optimal aktivitas protease biduri adalah 7 sebagaimana kebanyakan pH optimal protease yang berasal dari tanaman lainnya.

Teknik Pengeringan

Pengaruh teknik pengeringan terhadap aktivitas protease dari tanaman biduri dapat dilihat pada Gambar 17.



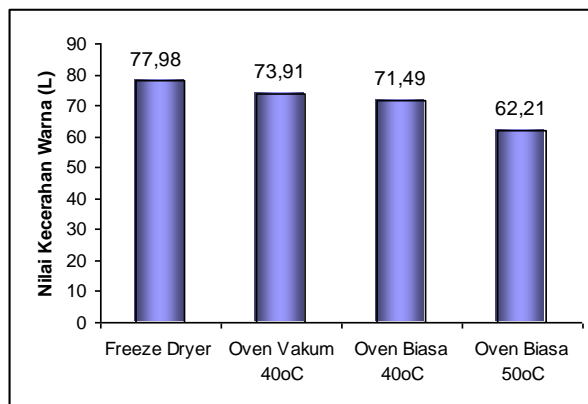
Gambar 17. Pengaruh Teknik Pengeringan terhadap Aktivitas Protease dari Tanaman Biduri

Gambar 17 menunjukkan bahwa dengan pengering beku (*freeze dryer*) dihasilkan protease biduri dengan aktivitas tertinggi (0,080 Unit), disusul penggunaan oven vakum suhu 40°C (0,045 Unit), oven biasa 40°C (0,029 Unit) dan terakhir oven biasa dengan suhu 50°C (0,026 Unit). Hal ini karena dengan teknik pengeringan secara beku, terjadinya kerusakan protein enzim lebih kecil bila dibandingkan dengan cara pengeringan yang lain. Teknik *freeze drying* dalam penelitian ini dilakukan pada suhu sangat rendah (-40°C), sehingga mampu meminimalisir terjadinya denaturasi protein enzim, akibatnya aktivitas enzim tetap tinggi. Disamping itu, proses dehidrasi pada teknik *freeze drying* adalah secara 'sublimasi' (penguapan air secara langsung) dari bentuk padat (beku) diduga dapat mengurangi kerusakan dan migrasi dari komponen-komponen yang terkandung dalam bahan termasuk protein enzim.

Pengeringan secara vakum (*vacuum drying*) diperoleh protease dengan aktivitas proteolitik lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan pengering beku. Namun

cara ini lebih baik bila dibandingkan dengan penggunaan pengering biasa. Hal ini karena kerusakan protein enzim relatif kecil dalam kondisi vakum dan suhu yang digunakan relatif rendah bila dibandingkan penggunaan pengering (oven) biasa. Pada penggunaan pengering biasa yakni suhu 40°C dan 50°C menunjukkan aktivitas proteolitik yang lebih rendah. Oleh karena itu dalam Anonim (2006) dinyatakan bahwa penggunaan oven atau pengering biasa dalam produksi papain dilakukan pada suhu 35°C - 40°C selama 3-4 jam. Aktivitas optimal enzim pada umumnya berkisar pada suhu 20-37°C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu 45°C. Uriyo (2001) melaporkan bahwa pengeringan suhu sekitar 60°C selama 2,5 – 10 jam terjadi penurunan aktivitas enzim biji *cowpeas* dari 21,2 menjadi 19,7 mol/ml/min. Jadi untuk skala produksi, alternatif pertama adalah menggunakan *freeze dryer*. Walau demikian, apabila tidak memungkinkan, maka alternatif kedua dapat menggunakan pengering vakum suhu 40°C, karena aktivitas enzim protease biduri yang dihasilkan masih lebih tinggi dari pada pengering biasa.

Histogram pengaruh teknik pengeringan terhadap tingkat kecerahan warna produk protease dari tanaman biduri sebagaimana tertera pada Gambar 18.



Gambar 18. Pengaruh Teknik Pengeringan terhadap Tingkat Kecerahan Protease dari Tanaman Biduri

Gambar 18 menunjukkan bahwa perlakuan pengeringan menghasilkan tingkat kecerahan warna enzim protease biduri yang berbeda-beda. Hal ini dapat dilihat dari nilai L (tingkat kecerahan)-nya. Semakin besar nilai L maka semakin cerah, sedangkan semakin kecil nilai L maka semakin gelap. Gambar 5.21 terlihat bahwa teknik pengeringan beku (*freeze drying*) menghasilkan protease biduri yang memiliki tingkat kecerahan paling tinggi dengan nilai L sebesar $77,98 \pm 0,94$, sedangkan paling gelap adalah penggunaan oven biasa pada suhu 50°C dengan nilai L sebesar $62,21 \pm 0,20$.

Gambar 18 juga memperlihatkan bahwa penggunaan *vacuum drying* menghasilkan produk enzim yang berwarna lebih cerah daripada penggunaan oven biasa. Warna yang lebih gelap dari produk protease biduri diduga akibat peristiwa *browning* selama proses pengeringan terutama pengering (oven) biasa. Proses *browning* tersebut sangat dimungkinkan akibat adanya oksidasi polifenol menjadi quinon. Pengeringan secara vakum memerlukan waktu lebih cepat bila dibandingkan dengan oven biasa. Hal ini tentu sangat mempengaruhi kecerahan warna enzim yang dihasilkan, karena semakin lama waktu pengeringan maka akan semakin banyak memberi kesempatan terjadinya *browning* enzimatis tersebut.

Sementara, produk enzim hasil pengeringan beku memiliki tingkat kecerahan paling tinggi dibanding cara pengeringan lainnya. Hal ini diduga pada kondisi sangat dingin (beku) terjadi inaktivasi (penghambatan aktivitas) enzim polifenolase. Oleh karena itu, bila ditinjau dari parameter kecerahan warna, juga disarankan agar dalam produksi protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri sebaiknya digunakan teknik pengeringan beku sebagai alternatif pertama atau pengering vakum sebagai alternatif kedua. Hal ini seiring dengan laporan Hagar and Bullerwell (2003), bahwa akhir-akhir ini enzim protease komersial lebih banyak diproduksi melalui teknik

pengeringan beku (*freeze drying*), karena stabilitas enzim bisa bertahan hingga proses aktivisasi dalam media air.

Teknologi Produksi Enzim Protease Biduri Skala Pilot Plan

Pengembangan pabrik pengolahan enzim protease biduri pada hakekatnya dapat dilaksanakan melalui redesign, reposisi serta pembaharuan peralatan dan mesin pabrik pengolahan enzim. Sebagian besar instrumen yang mungkin sudah ada di industri enzim (*existing instrument*) dan dinilai kurang kapabel untuk memproduksi enzim protease dari berbagai jenis (*type*) bahan baku baik dari tanaman biduri maupun sumber-sumber enzim baru yang potensial di Indonesia, dapat di-redesain dan sebagian besar peralatan dapat diperbaharui dengan peralatan proses yang memenuhi standar untuk prosesing enzim.

Tahapan proses produksi enzim protease sebagaimana tertera pada rancangan alat dan mesin dapat dilihat pada Gambar 19 sedangkan layout pabrik pengolahan enzim protease biduri dapat diset up sebagaimana Gambar 20. Tahapan proses produksi enzim protease biduri dikembangkan dari hasil kajian telaah teknologi produksi skala pilot plan. Tahapan produksi enzim protease biduri adalah sebagai berikut:

1. Tanaman biduri hasil panen dilakukan *handling* (penanganan) dan *slicing* (pemotongan), lalu masuk ke mesin penghancur (*blender*) menggunakan pelarut khusus (sebagaimana yang telah dihasilkan dari kajian teknologi skala pilot plan).
2. Selanjutnya diekstrak melalui mesin pemeras (*extractor press machine*), filtrat yang dihasilkan disentrifusi untuk memisahkan antara endapan dan supernatan yang merupakan rendemen (produk) cair enzim protease.
3. Produk cair enzim selanjutnya di-*blending* (dicampur) dengan filler/carier agent (dengan jenis dan komposisi sesuai dengan hasil kajian imobilasi enzim). Filling

dilakukan untuk mempermudah penanganan, aplikasi dan mengoptimalkan nilai (harga) jual enzim.

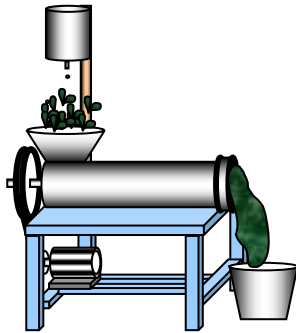
4. Selanjutnya dilakukan pengeringan khusus dengan teknik vacuum drying (yang merujuk dari hasil penelitian tahap sebelumnya).
5. Gumpalan / lapisan kering enzim yang dihasilkan selanjutnya ditepungkan dan disaring menggunakan ayakan ≥ 100 mesh; selanjutnya dikemas.

Serangkaian proses-proses tersebut merujuk dari hasil penelitian tahap sebelumnya dan ditelaah melalui uji coba produksi untuk mendapatkan paket teknologi yang berstandar, efisien dan berpotensi paten.

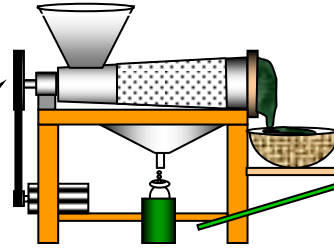
Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam produksi masal enzim protease biduri antara lain adalah penggunaan media ekstraksi dan cara pengeringan. Penggunaan media ekstraksi berpengaruh terhadap aktivitas protease dari tanaman biduri. Ekstraksi menggunakan aquades dingin ($T = 12^{\circ}\text{C}$) menghasilkan protease biduri dengan aktivitas lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan air biasa dingin ($T = 12^{\circ}\text{C}$). Hal ini karena aquades lebih murni dan tidak mengandung bahan anorganik dibandingkan dengan air biasa. Viessman *et al.* (2005) menyatakan bahwa air destilat dan air terpurifikasi lainnya biasanya bebas dari kontaminan ion-ion anorganik.

Senyawa-senyawa tertentu seperti kalsium, magnesium dan logam seperti besi (Fe) dan seng (Zn) yang terkandung dalam air tanah akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan. Menurut Buckle *et al.* (1987) dan Couvin and Young (2000) bahwa komponen yang terdapat dalam air diantaranya adalah senyawa fenolik, tembaga, besi, mangan, seng, kalsium, magnesium dan klorida. Hasil penelitian Zhuang and Butterfield (1991), menunjukkan bahwa penurunan aktivitas proteolitik dari papain juga dapat disebabkan oleh berikatannya gugus sulfidril papain dengan logam-logam berat, seperti Zn, Cu, Ag dan Hg.

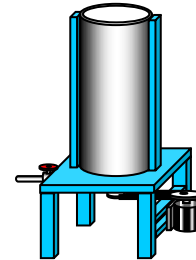
Gumpalan Kering (Butiran kasar)



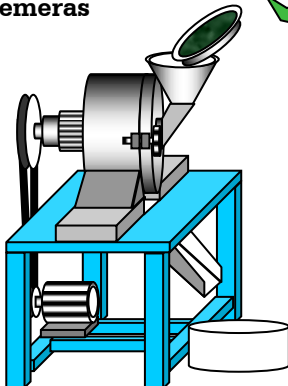
Pemeras



Pemeras



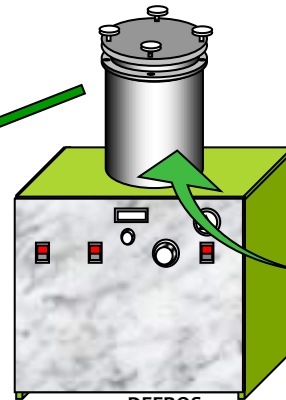
Sentrifus



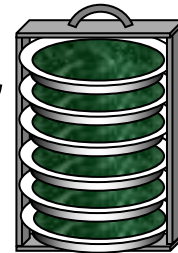
Supernatan



Pembubur



DEFROS

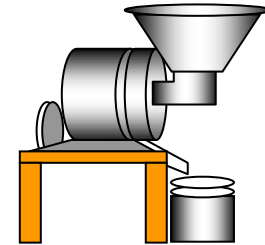


Sentrifus

Keterangan:

°C

Freeze drying



Mesin Pemas

Spesifikasi:

Dimensi (p,l,t) : 150, 60, 100 cm
Rangka Alat : Besi Siku U 10
Tabung (P.D.) : 150 cm, 30 cm
Bahan tabung : Plat SS (Stainless Steel)
3 mm
Saringan : Kasa SS
Penggerak : Motor Listrik 15 HP
Kapasitas : 150 kg/jam
Prinsip Kerja : Pemas Ulir Kerucut

Mesin Pembubur

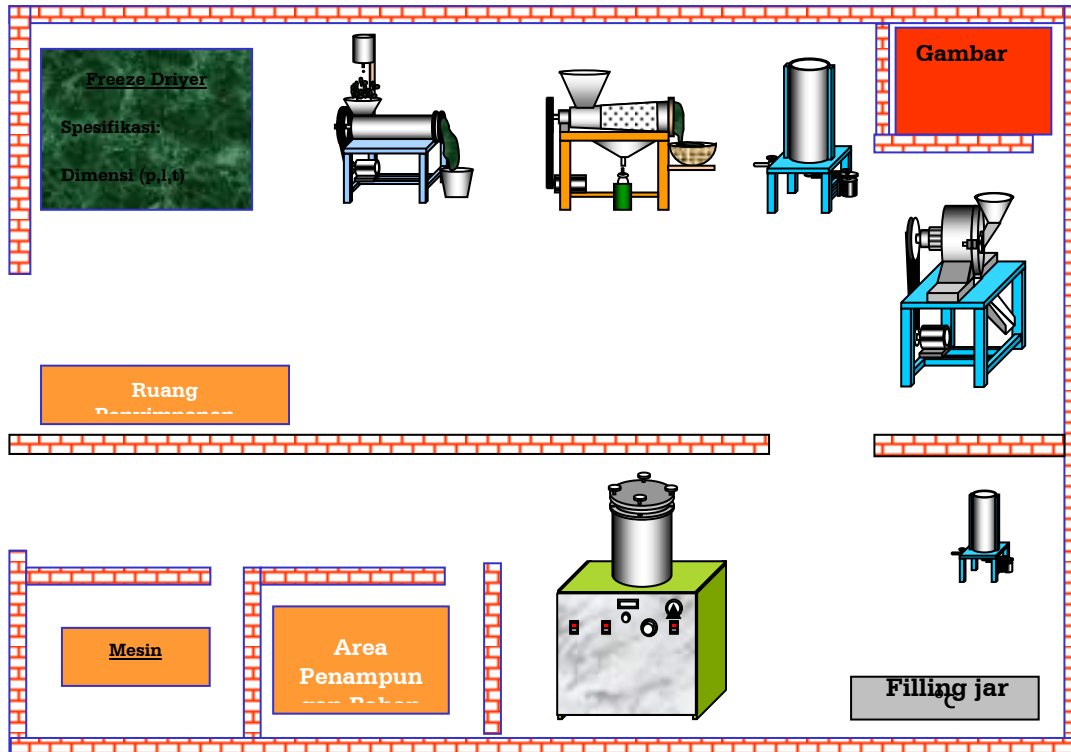
Spesifikasi:

Dimensi (p,l,t) : 100, 50, 80 cm
Rangka : Besi U 6
Diameter tabung : 35 cm
Panjang tabung : 75 cm
Tenaga Penggerak : Motor Listrik 15 HP
Kapasitas : 200 kg/jam
Prinsip Kerja : Ulir

Mesin Sentrifus

Spesifikasi:

Dimensi (p,l,t) : 60, 50, 150 cm
Rangka : besi U5
Bahan Tabung : Plat SS 1 mm
Ukuran Tabung : $\varnothing = 40$ cm,
t = 120 cm
Tenaga Penggerak : Motor Listrik 5 HP
Rpm : 2800 Rpm



Menurut deMan (1997) logam tertentu yang terkandung dalam pelarut dapat menghambat aktivitas enzim. Walaupun ada beberapa jenis enzim tertentu yang justru memerlukan logam sebagai aktivator, diantaranya adalah metaloekso-peptidase yang memerlukan logam divalen sebagai kofaktor.

pH air tanah yang digunakan untuk ekstraksi diduga juga berpengaruh terhadap aktivitas protease dari tanaman biduri. Air tanah sampel yang digunakan selama produksi cenderung bersifat asam atau pH-nya sedikit di bawah 7. Padahal hasil penelitian sebelumnya (Witono, 2007b) menunjukkan bahwa pH optimal aktivitas protease biduri adalah 7 sebagaimana kebanyakan pH optimal protease yang berasal dari tanaman lainnya.

Pengeringan enzim basah dengan menggunakan freeze drier lebih baik daripada menggunakan oven vakum atau oven biasa. Hal ini karena dengan teknik pengeringan secara beku, terjadinya kerusakan protein enzim lebih kecil bila dibandingkan dengan cara pengeringan yang lain. Teknik *freeze drying* dalam penelitian ini dilakukan pada suhu sangat rendah (-40°C), sehingga mampu meminimalisir terjadinya denaturasi protein enzim, akibatnya aktivitas enzim tetap tinggi. Di samping itu, proses dehidrasi pada teknik *freeze drying* adalah secara 'sublimasi' (penguapan air secara langsung) dari bentuk padat (beku) diduga dapat mengurangi kerusakan dan migrasi dari komponen-komponen yang terkandung dalam bahan termasuk protein enzim.

Pengeringan secara vakum (*vacuum drying*) diperoleh protease dengan aktivitas proteolitik lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan pengering beku. Namun cara ini lebih baik bila dibandingkan dengan penggunaan pengering biasa. Hal ini karena kerusakan protein enzim relatif kecil dalam kondisi vakum dan suhu yang digunakan relatif rendah bila dibandingkan penggunaan pengering (oven) biasa. Pada penggunaan pengering biasa yakni suhu 40°C dan 50°C menunjukkan aktivitas proteolitik yang lebih

rendah. Oleh karena itu dalam Anonim (2006) dinyatakan bahwa penggunaan oven atau pengering biasa dalam produksi papain dilakukan pada suhu 35°C - 40°C selama 3-4 jam. Aktivitas optimal enzim pada umumnya berkisar pada suhu 20-37°C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu 45°C. Uriyo (2001) melaporkan bahwa pengeringan suhu sekitar 60°C selama 2,5 – 10 jam terjadi penurunan aktivitas enzim biji *cowpeas* dari 21,2 menjadi 19,7 mol/ml/min. Jadi untuk skala produksi, alternatif pertama adalah menggunakan *freeze dryer*. Walau demikian, apabila tidak memungkinkan, maka alternatif kedua dapat menggunakan pengering vakum suhu 40°C, karena aktivitas enzim protease biduri yang dihasilkan masih lebih tinggi dari pada pengering biasa.

Penggunaan *vacuum drying* menghasilkan produk enzim yang berwarna lebih cerah daripada penggunaan oven biasa. Warna yang lebih gelap dari produk protease biduri diduga akibat peristiwa *browning* selama proses pengeringan terutama pengering (oven) biasa. Proses *browning* tersebut sangat dimungkinkan akibat adanya oksidasi polifenol menjadi quinon. Pengeringan secara vakum memerlukan waktu lebih cepat bila dibandingkan dengan oven biasa. Hal ini tentu sangat mempengaruhi kecerahan warna enzim yang dihasilkan, karena semakin lama waktu pengeringan maka akan semakin banyak memberi kesempatan terjadinya *browning* enzimatis tersebut.

Sementara, produk enzim hasil pengeringan beku memiliki tingkat kecerahan paling tinggi dibanding cara pengeringan lainnya. Hal ini diduga pada kondisi sangat dingin (beku) terjadi inaktivasi (penghambatan aktivitas) enzim polifenolase. Oleh karena itu, bila ditinjau dari parameter kecerahan warna, juga disarankan agar dalam produksi protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri sebaiknya digunakan teknik pengeringan beku sebagai alternatif pertama atau pengering vakum sebagai alternatif kedua. Hal ini seiring dengan laporan Hagar

and Bullerwell (2003), bahwa akhir-akhir ini enzim protease komersial lebih banyak diproduksi melalui teknik pengeringan beku (*freeze drying*), karena stabilitas enzim bisa bertahan hingga proses aktivasi dalam media air.

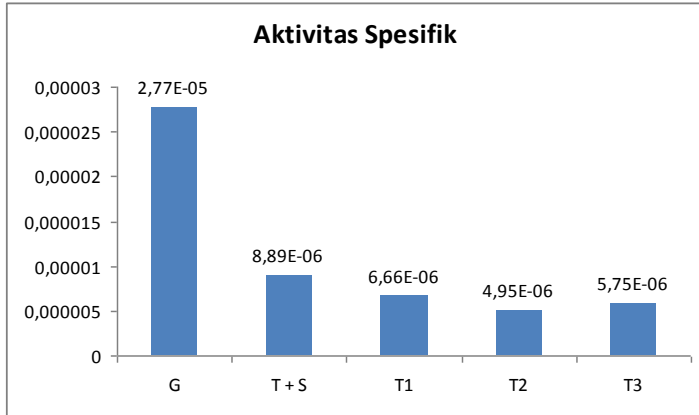
Dalam produksi, pengering vakum digunakan untuk mengeringkan enzim dari daun dan batang, karena pengeringan dengan freeze drier membuat hasil akhirnya lengket dan susah digunakan. Sedangkan freeze drier digunakan untuk mengeringkan enzim protease biduri dari getah (Witono dkk., 2006).

Teknik Handling (Penanganan) dan Umur Simpan Bahan Baku Tanaman Biduri

Telaah pengembangan teknologi produksi enzim dari tanaman (daun dan pucuk batang) biduri dilakukan untuk mengamati pengaruh handling dan umur simpan tanaman biduri hasil panen terhadap aktivitas proteolitik yang dihasilkan. Umur simpan dipelajari sebagai langkah untuk menjawab hambatan jarak panen dengan waktu proses. Informasi ini sangat berguna manakala jarak kebun dengan pabrik sangat jauh atau pengepul memerlukan waktu untuk mengumpulkan hasil panen biduri sebelum sampai dikirim dan diproses lebih lanjut. Adapun pengaruh teknik handling dan umur simpan (tingkat kesegaran) tanaman biduri terhadap aktivitas spesifik protease biduri sebagaimana tertera pada Gambar 21.

Gambar 21 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik protease getah biduri jauh lebih besar dibanding aktivitas spesifik tanaman biduri. Oleh karena itu, selanjutnya getah biduri merupakan penghasil produk protease yang dapat diarahkan untuk produk enzim dengan Grade paling istimewa (Grade A), sedang protease dari tanaman biduri diarahkan untuk produk protease dengan kualifikasi baik sampai kurang baik. Gambar tersebut juga menunjukkan bahwa handling panen tanaman biduri menggunakan es batu (sebagai

pengendali suhu agar tetap rendah) dihasilkan protease dengan aktivitas spesifik yang relatif lebih tinggi dibanding tanaman yang dihandling tanpa es batu.



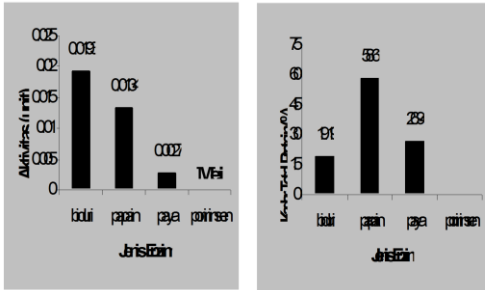
Gambar 21. Aktivitas Spesifik Protease dari Getah dan Tanaman Biduri pada Berbagai Umur Simpan Bahan Baku

Gambar 21 juga memperlihatkan bahwa umur simpan atau tingkat kesegaran tanaman biduri sedikit berpengaruh terhadap aktivitas spesifik protease yang dihasilkan. Oleh karena itu disarankan agar panen biduri dilakukan pada pagi hari sebelum matahari terbit dan secepat mungkin bahan baku diproses lebih lanjut agar diperoleh produk protease biduri dengan aktivitas yang tetap tinggi.

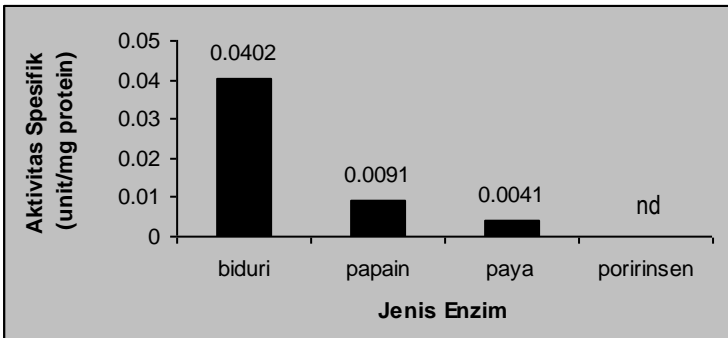
Kinerja Enzim Protease Biduri diantara Enzim Protease Komersial

Kinerja protease biduri dibandingkan dengan enzim-enzim sejenis yang sudah umum di pasaran (papain, paya dan poririnsen). Kinerja protease dilihat berdasarkan parameter kadar protein terlarut hasil hirolisis, unit aktivitas, aktivitas spesifik dan tekstur daging hasil treatment dengan keempat

enzim yang ditambahkan dengan dosis dan waktu inkubasi yang sama. Perbandingan aktivitas enzim beberapa protease pada berbagai substrat dapat dilihat pada Gambar 22 dan Gambar 23.



Gambar 22. Perbandingan Aktivitas dan Kadar Protein dari Hasil Hidrolisis Protease Biduri di antara Protease Komersial lainnya pada berbagai Substrat

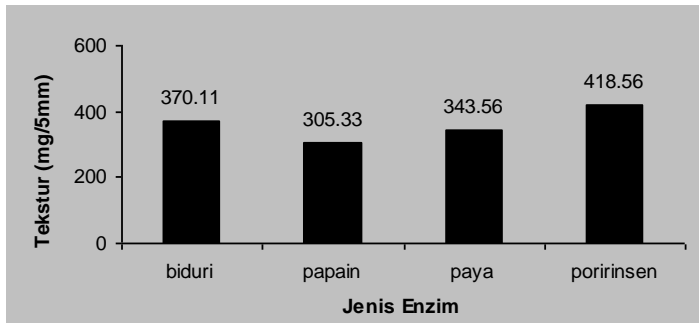


Gambar 23. Histogram Perbandingan Aktivitas Spesifik Protease Biduri di antara Protease Komersial lainnya pada berbagai Substrat

Gambar 22 dan Gambar 23 menunjukkan bahwa protease biduri memiliki unit aktivitas maupun aktivitas spesifik paling tinggi di antara protease lainnya yakni secara berturut-turut sebesar 0.0193 unit dan 0.0402 unit/mg. Sedangkan papain secara berturut-turut sebesar 0.0134 unit dan 0.0091 unit/mg dan paya secara berturut-turut sebesar 0.0027 unit

dan 0.0041 unit/mg. Akan tetapi poririnsen tidak menunjukkan adanya aktivitas proteolitik, hal ini semakin membuktikan dugaan sebelumnya bahwa poririnsen yang beredar di pasaran dan dikenal sebagai bahan pengempuk daging diduga bukan merupakan enzim protease. Demikian halnya dengan papain sampel, ternyata masih menunjukkan kemurnian yang lebih rendah dibanding crude protease biduri. Papain sampel memiliki kadar protein yang paling tinggi, tetapi aktivitas spesifiknya lebih rendah dibanding crude protease biduri. Hal ini memungkinkan kadar protein yang terkandung dalam papain merupakan protein non enzim.

Perbandingan nilai tekstur daging pasca inkubasi dengan berbagai jenis protease ditunjukkan oleh Gambar 24.



Keterangan: semakin tinggi angka pada histogram menunjukkan tekstur daging semakin keras

Gambar 24. Histogram Tekstur Daging Pasca Inkubasi dengan Berbagai Protease

Gambar 24 terlihat bahwa protease memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam melunakkan daging. Secara berturut-turut mulai tekstur yang lunak hingga yang keras adalah daging pasca inkubasi dengan papain, paya, biduri dan poririnsen. Menurut Kang and Warner (1974) dan Titania (2001), papain merupakan enzim proteolitik yang memecahkan jaringan ikat pada daging sehingga daging menjadi lunak. Papain memiliki kemampuan yang baik dalam proses pengempukan daging, dimana keaktifan papain

terletak dalam menghidrolisis serabut otot dan elastin daging. Enzim protease biduri yang diperkirakan sebagai jenis eksopeptidase ternyata juga mampu digunakan sebagai pengempuk daging, akan tetapi kemampuannya tidak setinggi protease yang lain. Hal ini disebabkan kemampuan enzim eksopeptidase dalam menghidrolisis struktur otot daging tidak sebaik enzim endopeptidase. Enzim jenis eksopeptidase memecah struktur protein dari sisi luar sehingga akan menghasilkan fragmen-fragmen yang lebih kecil dibanding jenis endopeptidase yang memecah struktur protein dari bagian dalam. Sedangkan tingkat kemurnian paya diduga sangat rendah sehingga tidak mampu menghasilkan keempukan daging sebaik papain. Poririnsen telah diduga kuat bukan termasuk enzim, atau dapat disebut sebagai bahan kimia pengempuk daging. Oleh karena itu, poririnsen memberikan keempukan pada daging tetapi tidak sebaik jenis enzim yang lain.

Menurut Fogle *et al.* (1986), proses hidrolisa protein jaringan ikat terjadi pada protein kolagen, sedangkan hidrolisa miofibril terjadi pada filamen-filamennya. Suparno (1994) menambahkan bahwa protease menyerang miosin yang merupakan bagian dari filamen pada bagian leher, menjadi meremiosin ringan dengan berat molekul 140.000 dan meremiosin berat dengan berat molekul 340.000, enzim protease selanjutnya dapat mendegradasi meremiosin berat menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil.

BAB 6

APLIKASI ENZIM PROTEASE BIDURI

Selanjutnya enzim protease biduri diaplikasikan untuk membuat berbagai macam produk pangan yang memerlukan enzim sebagai agen aktif seperti pengempukan daging, pembuatan keju, ekstraksi virgin coconut oil (VCO), dan pembuatan hidrolisat protein. Disamping itu, enzim protease biduri diimobilisasi untuk mempermudah penanganan dan penggunaannya.

Penggunaan Enzim Biduri untuk Pengempukan Daging

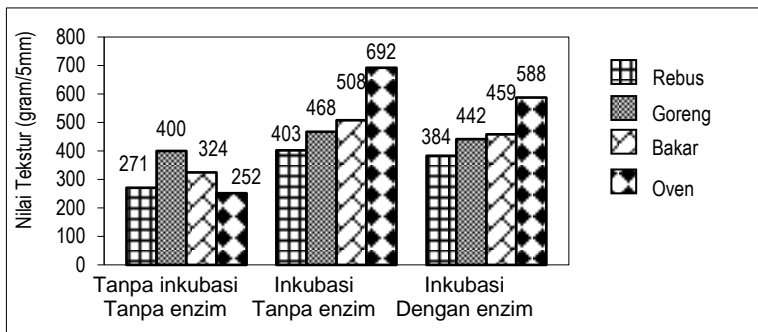
Keempukan merupakan salah satu penentu kualitas daging. Untuk mendapatkan daging yang lebih empuk dapat diperlakukan dengan dengan enzim protease, akan tetapi untuk memproduksi enzim protease sejauh ini masih menghadapi banyak kendala, sementara ketersediannya masih terbatas dan harus diimpor. Untuk pengempukan daging, enzim protease dari tanaman masih sangat sesuai dan di beberapa kasus belum tergantikan oleh sumber enzim lainnya. Oleh karenanya, enzim protease biduri menjadi salah satu pilihan untuk menghasilkan daging dengan tekstur yang empuk. Witono dkk. (2002) telah mempelajari sifat-sifat daging olah yang diperlakukan dengan enzim protease biduri. Setelah diinkubasi dengan protease biduri 0,15%, daging diolah dengan berbagai perlakuan seperti direbus, digoreng, dibakar dan dikeringkan selanjutnya diamati sifat fisik (tekstur dan warna), sifat kimia (protein terlarut) dan sifat sensori (aroma, rasa dan kekuatan tarik dengan kekuatan gigitan gigi) yang dibandingkan dengan sifat-sifat daging olah kontrol 1 (tanpa inkubasi dan tanpa enzim biduri) dan kontrol 2 (inkubasi tanpa enzim biduri).

Hasil penelitian ditinjau dari aspek perlakuan inkubasi enzim biduri menunjukkan bahwa tekstur semakin keras; warna semakin cerah; kadar protein terlarut semakin tinggi

(kecuali metode oven); aroma tidak berubah; rasa semakin gurih dan kekuatan tarik dengan gigitan yang semakin mudah patah. Sedang ditinjau dari aspek pengolahan menunjukkan bahwa tekstur paling empuk dihasilkan dari metode rebus disusul metode goreng, bakar dan oven. Warna paling cerah dari metode rebus, disusul oven, sedangkan metode goreng dan bakar menghasilkan warna daging yang lebih gelap. Kadar protein terlarut dari tinggi hingga rendah dihasilkan dari metode bakar, goreng, oven, dan rebus; aroma dari yang kuat hingga lemah didapat pada metode rebus, goreng, bakar dan oven. Rasa daging pada metode goreng paling gurih dibanding metode lainnya dan kekuatan tarik dengan gigitan yang tidak berbeda pada semua metode pengolahan.

Tekstur Daging Olah Pasca Inkubasi

Histogram nilai tekstur daging pada berbagai metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri tertera pada Gambar 25.



Gambar 25. Tekstur Daging pada berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri

Semakin tinggi angka pada histogram menunjukkan tekstur daging semakin keras. Gambar 25 terlihat bahwa tekstur daging yang diinkubasi dengan enzim biduri lebih keras dibanding kontrol 1 (tanpa inkubasi dan tanpa enzim), akan tetapi lebih lunak dibanding kontrol 2 (inkubasi tanpa

enzim). Hal ini menunjukkan bahwa inkubasi dengan enzim sangat efektif dilakukan pada daging yang akan diolah baik dengan metode rebus, goreng, bakar maupun oven. Sedangkan tekstur daging kontrol 1 (tanpa perlakuan) adalah paling lunak. Hal ini disebabkan oleh sifat awal bahan daging yang lunak sebelum mendapatkan perlakuan inkubasi pada suhu 55°C. Setelah mendapat perlakuan inkubasi suhu 55°C, daging mengkerut dan cenderung mengeras lebih-lebih bila daging diinkubasi tanpa enzim protease.

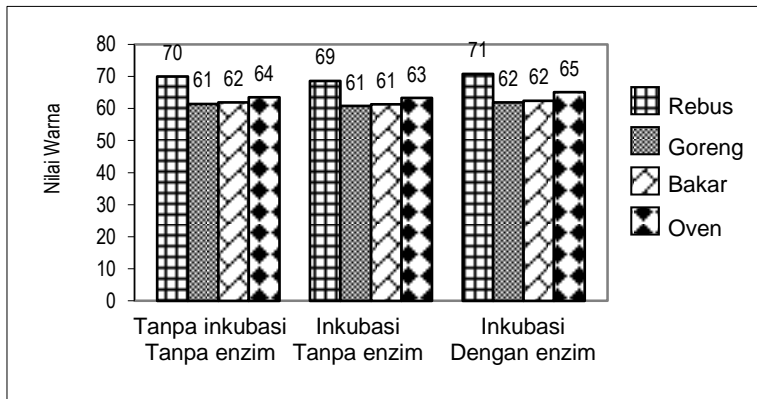
Gambar 25 juga menunjukkan bahwa perbedaan metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri menghasilkan tekstur daging yang berbeda-beda. Secara berturut-turut mulai dari daging yang lunak hingga yang keras didapat dari metode rebus, goreng, bakar dan oven. Perlakuan pemanasan tanpa media akan memicu terjadinya gejala *case hardening* yakni pengerasan pada bagian permukaan daging. Pada metode perebusan didapat tekstur daging yang paling lunak karena bahan dimasukkan dalam air mendidih yang berfungsi sebagai media penghantar panas pada perebusan, sehingga air akan meresap ke jaringan, dengan meresapnya air ke dalam jaringan daging, akan didapat tekstur daging yang relatif lebih lunak.

Selama perebusan mula-mula kolagen mengkerut yang menyebabkan daging memendek. Setelah mengalami pengkerutan, pemanasan yang terus berlanjut akan menyebabkan kolagen pecah dan rusak yang akhirnya menjadi gelatin yang terdispersi dalam air. Molekul kolagen membentuk serat-serat yang terdiri atas tiga rantai polipeptida yang saling melilit satu sama lain. Air panas akan memecah ikatan yang mengikat tiga rantai polipeptida unting ganda dan ketiga molekul itu akhirnya terlepas dan terdispersi. Semakin banyak kolagen yang diubah menjadi gelatin, akan semakin lemah serat-serat kolagennya dan semakin empuk daging tersebut (Winarno, 1993).

Sedangkan pada metode oven, menghasilkan tekstur daging yang paling keras. Ini diduga pada perlakuan tersebut memerlukan waktu yang sangat lama, sehingga dengan suhu yang tinggi (150°C) akan lebih memperkuat tekstur. Sedangkan untuk metode goreng didapat tekstur yang lebih lunak dari pada bakar dan oven, karena dengan adanya media minyak sebagai media penghantar panas. Panas ini akan menurunkan kadar air bahan, dan air dari bagian ini terutama dilepaskan menjadi uap selama penggorengan. Rongga yang ditinggalkan air kemudian diisi oleh minyak dan minyak yang terserap ini akan memberi pengaruh lunak pada bagian kerak, disamping memberi pengaruh basah. Daging dengan perlakuan bakar memiliki tekstur yang keras. Hal ini disebabkan, dengan suhu tinggi maka permukaan daging akan mengeras, sehingga menyebabkan daging menjadi keras, hal ini terjadi pada semua perlakuan pendahuluan.

Warna Daging Olah Pasca Inkubasi

Histogram warna daging pada berbagai metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri terdapat pada Gambar 26.



Gambar 26. Warna Daging pada Berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri

Semakin tinggi angka pada histogram berarti warna semakin cerah. Gambar 26 menunjukkan warna daging yang lebih gelap pada inkubasi dengan enzim dibanding semua kontrol pada semua metode pengolahan. Hal ini karena adanya residu sulfhidril (-SH) dari asam-asam amino dan enzim yang berikatan dengan mioglobin dan hemoglobin yang merupakan komponen pigmen daging. Sebagaimana hasil karakterisasi oleh Witono (2002a), bahwa enzim biduri termasuk jenis protease sulfhidril.

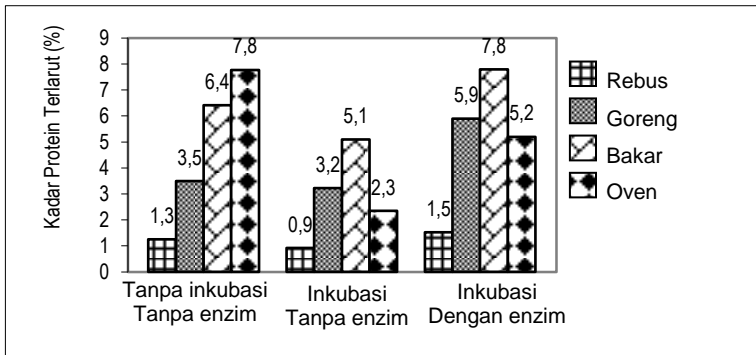
Gambar 26 juga menunjukkan bahwa metode pengolahan berpengaruh terhadap warna daging pasca inkubasi dengan enzim biduri. Metode rebus menunjukkan warna paling cerah, disusul dengan metode oven, sedangkan metode goreng dan bakar menghasilkan warna daging yang lebih gelap. Hal ini karena pada metode goreng digunakan suhu yang sangat tinggi yaitu di atas 100°C. Pada suhu tinggi akan memacu terjadinya perubahan pigmen permukaan daging menjadi semakin gelap. Sebagaimana dinyatakan oleh Meyer (1974) jika terkena panas, pigmen pemberi warna daging yang meliputi oksihemoglobin, oksimioglobin (merah), hemoglobin dan mioglobin (merah ungu) dipecah menjadi metmioglobin yang berwarna coklat.

Kadar Protein Terlarut Daging Olah Pasca Inkubasi

Histogram kadar protein terlarut daging pada berbagai metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri tertera pada Gambar 27.

Gambar 27 memperlihatkan bahwa kontrol 1 (tanpa inkubasi dan tanpa enzim) dan kontrol 2 (inkubasi tanpa enzim) dan inkubasi dengan enzim menghasilkan kadar protein terlarut daging yang berbeda-beda pada metode rebus, goreng dan bakar. Daging yang diinkubasi dengan enzim menghasilkan kadar protein terlarut lebih besar bila dibandingkan dengan kontrol. Hal ini disebabkan, enzim protease berperan dalam mendegradasi protein menjadi

peptida-peptida dan asam-asam amino. Akan tetapi hasil ini berbeda untuk metode oven, yang menghasilkan kadar protein terlarut pada kontrol 1 (tanpa inkubasi dan tanpa enzim) lebih besar dibandingkan dengan perlakuan inkubasi dengan enzim, hal ini diduga pada kontrol 1 kadar airnya masih tinggi, sehingga ketika dioven air yang ada pada bahan tidak dapat menguap secara sempurna (dibandingkan dengan perlakuan yang lain), sehingga penetrasi panas ke dalam bahan tidak maksimal. Sementara perlakuan yang lain sudah matang, perlakuan kontrol ini belum matang. Sehingga susunan ruang atau rantai polipeptida molekul protein belum berubah, ini menyebabkan kadar protein terlarutnya belum sempat terdenaturasi semuanya.



Gambar 27. Kadar Protein Terlarut Daging pada Berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri

Protein yang terdenaturasi berkurang kelarutannya, lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik berbalik ke arah luar. Sedangkan bagian luar yang bersifat hidrofil terlipat ke dalam. Pelipatan atau pembalikan terjadi khususnya bila kelarutan protein telah mendekati pH isoelektris dan akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap. Enzim-enzim yang gugus prostetikanya terdiri

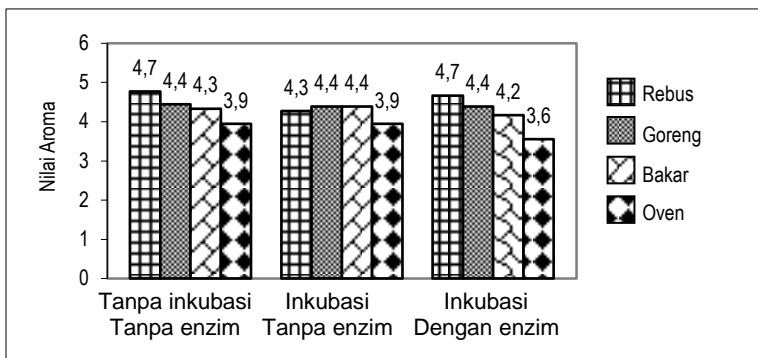
dari protein akan kehilangan aktivitasnya sehingga tidak berfungsi lagi sebagai enzim yang aktif (Winarno, 1993).

Gambar 27 juga memperlihatkan bahwa metode pengolahan berpengaruh terhadap kadar protein daging. Hal ini disebabkan oleh perbedaan suhu dan media pengolahan. Secara berturut-turut, prosentase kadar yang paling tinggi sampai dengan yang paling rendah adalah daging dengan metode bakar, metode goreng, metode oven dan metode rebus.

Perlakuan pembakaran dengan suhu tinggi tanpa media, menyebabkan kerusakan protein terjadi secara cepat hanya pada permukaan daging. Sedangkan pada metode perebusan, walaupun menggunakan suhu yang paling rendah dibandingkan dengan metode pengolahan yang lain, didapat kandungan protein terlarut paling rendah. Ini disebabkan, karena dengan adanya media air, proteinnya banyak yang larut dalam air rebusannya.

Aroma Daging Olah Pasca Inkubasi

Histogram nilai organoleptik aroma daging pada berbagai metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri ditunjukkan pada Gambar 28.

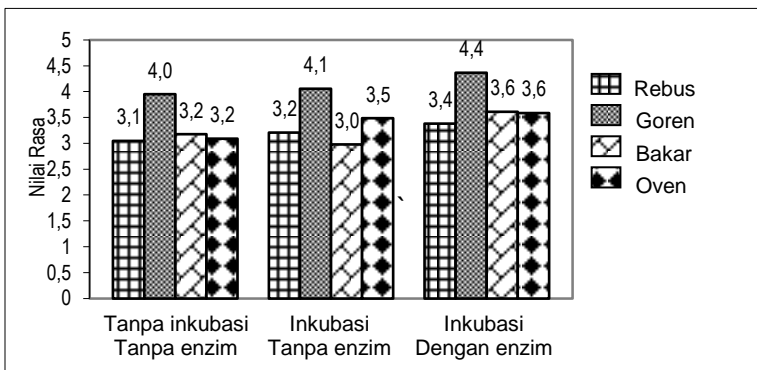


Gambar 28. Nilai Organoleptik Aroma Daging pada Berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri

Semakin tinggi angka pada histogram berarti aroma daging semakin kuat. Gambar 28 tidak menunjukkan adanya perbedaan aroma daging yang nyata antara kontrol 1 tanpa inkubasi dan tanpa enzim, kontrol 2 inkubasi tanpa enzim maupun inkubasi dengan enzim pada semua metode pengolahan. Sedangkan metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan terhadap aroma daging. Secara berurutan dari aroma daging yang paling kuat hingga yang paling lemah didapat pada metode rebus, goreng, bakar dan oven. Suhu pengolahan yang tinggi diduga mengakibatkan senyawa-senyawa aromatik lebih banyak yang hilang saat pengolahan.

Rasa Daging Olah Pasca Inkubasi

Histogram nilai organoleptik rasa daging pada berbagai metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri ditunjukkan pada Gambar 29. Semakin tinggi angka pada histogram berarti rasa daging semakin gurih.



Gambar 29. Nilai Organoleptik Rasa Daging pada berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri

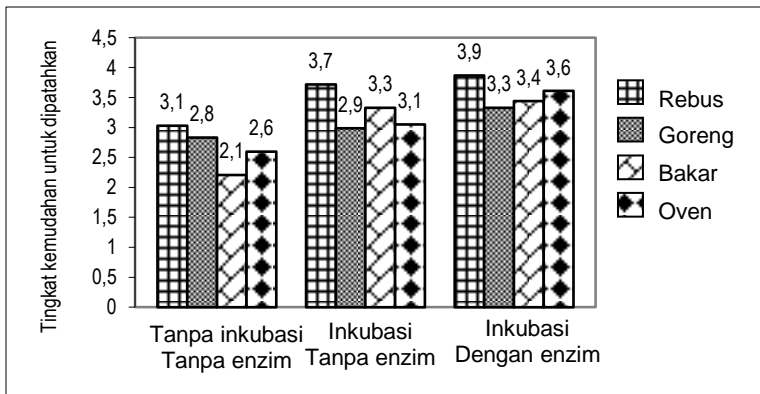
Gambar 29 memperlihatkan adanya pengaruh dengan inkubasi dengan enzim biduri terhadap rasa daging olah. Dibanding dengan semua kontrol, inkubasi dengan enzim

biduri menghasilkan rasa daging yang lebih gurih. Menurut Anonim (2001) salah satu bahan pembangkit cita rasa adalah asam amino-L. Sebagaimana mekanisme kerja enzim protease adalah dengan mendegradasi protein (polipeptida) menjadi peptida-peptida pendek dan asam-asam amino, yang selanjutnya akan menopang cita rasa gurih.

Gambar 29 juga menunjukkan adanya pengaruh metode pengolahan terhadap rasa daging. Daging yang digoreng pasca inkubasi dengan enzim biduri, menghasilkan rasa lebih gurih dari pada metode lainya. Rasa daging dengan metode bakar dan oven cenderung lebih gurih dari pada metode rebus. Hal ini disebabkan oleh perbedaan media pengolahan yang digunakan. Dengan menggunakan media air panas pada metode rebus akan mengurangi senyawa pembentuk cita rasa. Sedangkan dengan media minyak pada metode goreng dapat menambah cita rasa pada bahan yang digoreng.

Kekuatan Tarik dengan Gigitan Daging Olah Pasca Inkubasi

Histogram tingkat kekuatan tarik dengan gigitan pada berbagai metode pengolahan pasca inkubasi dengan enzim biduri ditunjukkan pada Gambar 30.



Gambar 30. Tingkat Kekuatan Tarik dengan Gigitan Daging pada berbagai Metode Pengolahan Pasca Inkubasi dengan Enzim Biduri

Pengujian ini dilakukan agar panelis dapat membedakan tingkat mudah patahnya daging dengan gigitan. Nilai yang tinggi pada histogram menunjukkan daging semakin mudah patah. Gambar 30 menunjukkan perbedaan metode pengolahan yang tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kekuatan tarikan dengan gigitan. Tetapi inkubasi dengan enzim biduri (Gambar 30) menunjukkan adanya pengaruh yang nyata terhadap kekuatan tarik atau tingkat kemudahan untuk dipatahkan menggunakan gigitan. Fenomena ini terjadi pada semua metode pengolahan. Daging yang diinkubasi dengan enzim biduri menjadi lebih mudah patah. Hal ini karena enzim biduri mampu menghidrolisis protein-protein daging yang semula tinggi menjadi protein-protein yang lebih larut dengan BM rendah, sehingga menyebabkan daging menjadi mudah patah dan untuk menggigit tidak memerlukan tenaga yang besar. Menurut Loffler (1986), enzim protease yang digunakan sebagai pengempuk daging bekerja dengan menghidrolisa protein jaringan ikat dan protein miofibril. Selanjutnya Fogle *et al.* (1986) menyatakan bahwa proses hidrolisa jaringan ikat terjadi pada protein kolagen yang tersusun sebagian besar oleh asam amino hidrosiprolin. Hidrolisa protein miofibril terjadi pada filamen-filamennya dan menghasilkan fragmentasi miofibril. Oleh karena berkurangnya jaringan ikat yang mengikat antar serat daging, dan terputusnya serat-serat daging, menyebabkan integritas serat-serat daging berkurang.

Penggunaan Enzim Biduri pada Proses Pembuatan Keju

Pembuatan keju secara enzimatik umumnya dilakukan dengan menggunakan enzim renin yang diekstrak dari lambung anak sapi. Keberadaan renet sebagai sumber renin semakin langka dan mahal, sehingga perlu dicari alternatif enzim protease lain yang lebih murah dan mudah didapat. Salah satu sumber enzim protease yang dapat digunakan adalah ekstrak getah tanaman biduri. Studi pengaruh konsentrasi enzim dari ekstrak getah tanaman biduri dan

lama inkubasinya terhadap sifat-sifat keju yang dihasilkan telah dipelajari (Witono dkk, 2003). Adapun perlakuan yang digunakan sebanyak 9 kombinasi dari 3 level konsentrasi enzim dari ekstrak getah biduri (0,2%, 0,3%, 0,4%) dan 3 level lama inkubasi (60 menit, 90 menit dan 120 menit). Sedangkan parameter yang diamati meliputi: sifat fisik (rendemen, warna dan tekstur), sifat kemis (kadar air, protein terlarut dan lemak) dan organoleptik (aroma dan rasa). Data hasil pengamatan ditampilkan dalam bentuk tabel dan histogram selanjutnya dianalisis secara diskriptif.

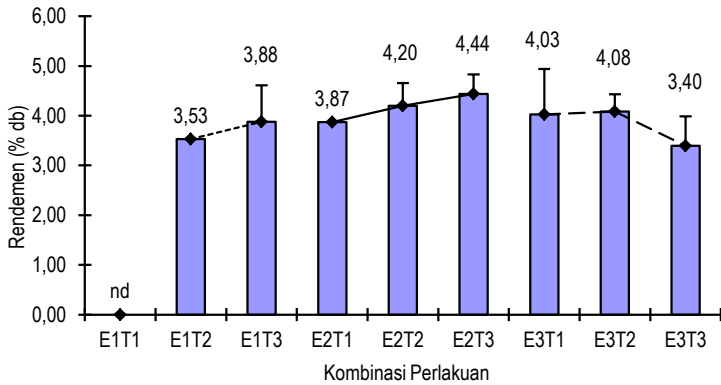
Hasil studi menunjukkan bahwa konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya berpengaruh terhadap parameter rendemen, tekstur, kadar protein terlarut, aroma dan rasa, tetapi tidak memberikan pengaruh terhadap parameter warna, kadar air dan kadar lemak. Kombinasi perlakuan paling sesuai diperoleh pada konsentrasi enzim dari ekstrak getah biduri 0,3% dan lama inkubasi 120 menit yang menghasilkan keju dengan rendemen paling tinggi (4,44%), nilai tekstur sebesar 94,18 gram/mm, kadar protein terlarut paling tinggi sebesar 14,18% (bk), beraroma susu dengan nilai 3,41 dan rasa gurih dengan nilai 3,88.

Rendemen Keju Hasil Proses Enzimatis

Histogram rendemen keju pada berbagai kombinasi perlakuan penambahan enzim protease biduri dan lama inkubasinya tertera pada Gambar 31.

Gambar 31 memperlihatkan bahwa perbedaan kombinasi perlakuan konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya menghasilkan rendemen keju yang berbeda-beda pula. Semakin banyak penambahan enzim biduri sampai konsentrasi 0,3% menghasilkan rendemen yang semakin tinggi; selanjutnya pada konsentrasi 0,4% rendemennya menurun. Begitu juga dengan waktu inkubasi, semakin lama inkubasi menghasilkan rendemen yang semakin tinggi,

kecuali lama inkubasi pada konsentrasi enzim biduri yang tinggi (0,4%) rendemennya ada kecenderungan menurun.



Keterangan: Nd : No detection
E1, E2, E3 : Konsentrasi enzim biduri 0,2%; 0,3%; 0,4%
T1, T2, T3 : Lama inkubasi 60, 90 dan 120 menit

Gambar 31. Rendemen keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim protease biduri dan lama inkubasinya

Gambar 31 juga menunjukkan bahwa rendemen keju tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan E2T3 (enzim biduri sebesar 0,3% dan inkubasi 120 menit) yakni sebesar 4,44%. Sedangkan hasil pendahuluan yang telah dilaksanakan sebelumnya diketahui bahwa pada waktu inkubasi yang lebih lama lagi yaitu di atas 120 menit justru menurunkan persentase rendemen keju yang dihasilkan. Hal ini diduga penambahan enzim biduri 0,3% mampu bekerja maksimal pada waktu inkubasi 120 menit, dimana aktivitas proteolitiknya dalam menghidrolisis protein sangat optimal. Di bawah konsentrasi dan waktu inkubasi tersebut, jumlah enzim belum sebanding dengan jumlah substrat. Sedangkan di atas konsentrasi dan waktu inkubasi tersebut rendemennya menurun. Menurut Sardjoko (1991) aktivitas proteolitik yang berlebihan justru akan menurunkan hasil keju. Hal ini diduga, aktivitas proteolitik yang berlebihan dalam waktu yang relatif

lama, maka enzim protease tidak hanya menghidrolisis *para kasein* yang terletak di dalamnya sesudah *kappa kasein* terhidrolisis dan rusak semua. Hal ini akan mengakibatkan berkurangnya para kasein yang akan berikatan dengan ion kalsium, sehingga menyebabkan agregat yang terbentuk semakin berkurang.

Gambar 31 juga memperlihatkan bahwan rendemen keju pada kombinasi perlakuan E1T1 (enzim biduri 0,2% dan inkubasi 60 menit) tidak terdeteksi. Hal ini menunjukkan pada kombinasi perlakuan tersebut tidak mampu membentuk gumpalan keju, diduga pada konsentrasi enzim yang sangat rendah dalam waktu yang relatif cepat, enzim protease belum menunjukkan aktivitasnya secara optimal, karena enzim protease belum mampu menghidrolisis *kappa kasein* (kasein tidak peka kalsium) secara sempurna, sehingga para kasein (kasein peka kalsium) masih terlindungi oleh *kappa kasein*. Hal ini mengakibatkan kalsium tidak bisa berikatan dengan para kasein sehingga tingkat koagulasi masih relatif rendah.

Warna Keju Hasil Proses Enzimatis

Nilai warna keju pada berbagai kombinasi perlakuan yang diukur melalui colour reader terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Warna Keju pada Berbagai Kombinasi Perlakuan

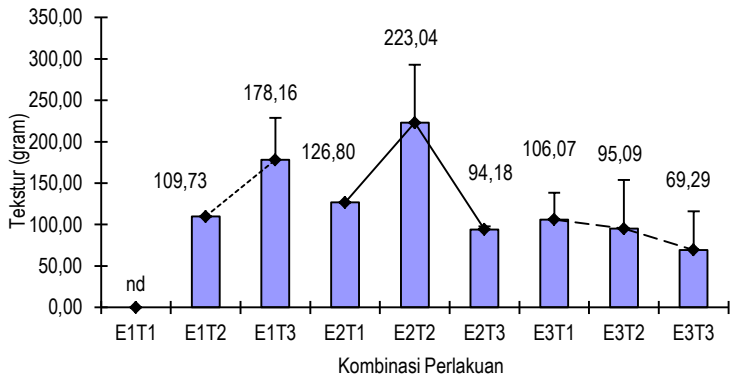
Kombinasi Perlakuan	Nilai		
	W	H	C
E1T1	nd	nd	Nd
E1T2	95,52 (nd)	85,91 (nd)	5,05
E1T3	95,89	86,20	5,62
E2T1	96,06 (nd)	80,07 (nd)	5,80
E2T2	95,34	83,93	5,64
E2T3	95,86	80,68	5,85
E3T1	94,63	83,65	5,96
E3T2	96,44	83,79	5,76
E3T3	97,03	82,61	5,44

Keterangan: W = Derajat putih
H = Ada atau tidaknya perubahan warna pada keju
nd = No detection

Nilai C menyatakan intensitas warna keju. Semakin tinggi nilai C cenderung warnanya semakin kuning. Hal ini menunjukkan adanya karoten pada keju yang dihasilkan. Nilai C relatif tinggi ditunjukkan pada kombinasi perlakuan E2T1 (enzim biduri 0,3% dan inkubasi 60 menit) dan E3T1 (enzim biduri 0,4% dan inkubasi 60 menit). Intensitas warna yang relatif tinggi mengindikasikan kandungan karoten yang relatif tinggi pula. Menurut Winarno (1992), karoten larut dalam pelarut lemak. Oleh karena itu, kadar lemak yang semakin tinggi cenderung nilai C juga semakin tinggi. Sebagaimana ditunjukkan oleh Gambar 26 pada kombinasi perlakuan E2T1 dan E3T1. Semakin tinggi kadar lemak diduga karoten yang terlarut semakin banyak, sehingga nilai C semakin tinggi.

Tekstur Keju Hasil Proses Enzimatis

Histogram tekstur keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya ditunjukkan pada Gambar 32.



Keterangan: Nd : No detection
 E1, E2, E3 : Konsentrasi enzim biduri 0,2%; 0,3%; 0,4%
 T1, T2, T3 : Lama inkubasi 60, 90 dan 120 menit

Gambar 32. Tekstur keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim protease biduri dan lama inkubasinya

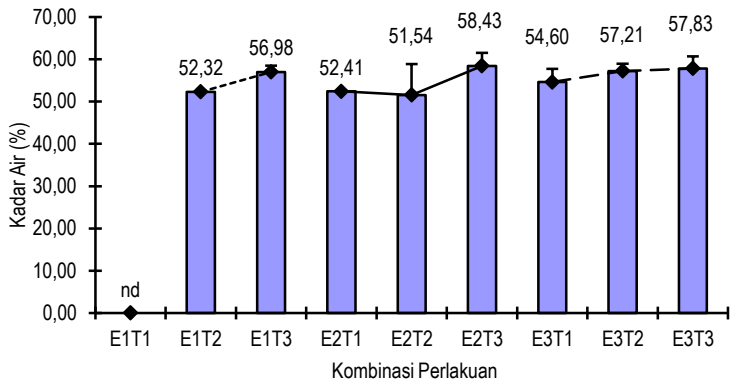
Gambar 32 memperlihatkan bahwa kombinasi perlakuan konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya menunjukkan nilai tekstur yang berbeda-beda. Kombinasi perlakuan E2T2 (enzim biduri 0,3% dan inkubasi 90 menit) menghasilkan tekstur keju yang paling keras. Hal ini disebabkan pada kombinasi perlakuan tersebut, kadar airnya paling rendah dibandingkan kombinasi perlakuan yang lain sehingga teksturnya juga paling keras. Sebagaimana dinyatakan oleh Bourne (1986) bahwa aktivitas air mempunyai pengaruh utama terhadap tekstur beberapa bahan pangan.

Tekstur yang lembek dipengaruhi oleh kadar air yang tinggi. Pada Gambar 33 juga menunjukkan bahwa kadar air keju yang dihasilkan relatif sama yaitu di atas 40%. Menurut Buckle *et al* (1987), berdasarkan pada sifat-sifat teksturnya, keju yang mempunyai kadar air di atas 40% dianggap sebagai keju lunak dalam klasifikasi keju.

Kadar Air Keju Hasil Proses Enzimatis

Histogram kadar air keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya terlihat pada Gambar 33.

Gambar 33 memperlihatkan bahwa kadar air keju pada berbagai kombinasi konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya menunjukkan hasil yang berbeda. Walaupun demikian perbedaan tersebut relatif tidak besar. Kadar air terkecil terdapat pada kombinasi perlakuan E2T2 (enzim biduri 0,3% dan inkubasi 90 menit) dan kadar air tertinggi pada E2T3 (enzim biduri 0,3% dan inkubasi 120 menit). Hal ini diduga dalam waktu inkubasi yang relatif lama, substrat mampu mengikat air lebih banyak. Semakin lama inkubasi, akan semakin tinggi pula tingkat pemutusan rantai peptida, yang menyebabkan ikatan peptida menjadi lebih pendek sehingga gaya tarik-menarik antar polipeptida yang membentuk gumpalan keju menjadi lemah. Sehingga air akan lebih mudah terperangkap di dalamnya.



Keterangan: Nd : No detection
 E1, E2, E3 : Konsentrasi enzim biduri 0,2%; 0,3%; 0,4%
 T1, T2, T3 : Lama inkubasi 60, 90 dan 120 menit

Gambar 33. Kadar air keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim protease biduri dan lama inkubasinya

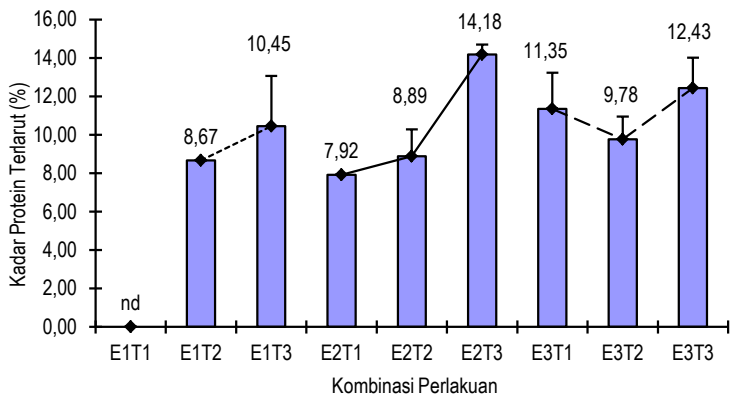
Kadar air yang tinggi diduga juga disebabkan oleh faktor bahan baku susu. Pendeteksian secara kimiawi oleh Ismail (1996) bahwa susu dari petani peternak di Jawa Timur telah dapat dibuat keju *Cheddar* sesuai standar, meskipun kadar airnya sedikit lebih tinggi. Hal ini sesuai fakta yang ditunjukkan pada Gambar 33, bahwa keju yang dihasilkan rata-rata berkadar air relatif tinggi.

Kadar Protein Terlarut Keju Hasil Proses Enzimatis

Histogram kadar protein terlarut keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya terlihat pada Gambar 34.

Gambar 34 memperlihatkan bahwa kadar protein terlarut keju pada berbagai kombinasi perlakuan menunjukkan hasil yang signifikan. Akan tetapi semakin tinggi konsentrasi enzim biduri dan semakin lama inkubasi, tidak menunjukkan kecenderungan yang konsisten. Namun diperoleh kadar protein terlarut tertinggi pada E2T3 (enzim

biduri 0,3% dan inkubasi 120 menit). Karena pada perlakuan tersebut, degradasi protein menjadi asam-asam amino berlangsung secara optimal. Sedangkan pada konsentrasi enzim yang lebih tinggi dengan waktu inkubasi sama (E3T3) didapat kadar protein terlarut yang sedikit lebih rendah, karena dengan konsentrasi enzim yang terlalu tinggi diduga aktifitas enzim justru menurun, sehingga proses degradasi pada kappa kasein menjadi lebih rendah. Hal ini menyebabkan tingkat koagulasi protein juga lebih tinggi. Tingkat penggumpalan yang tinggi ini, menyebabkan protein keju sulit terdeteksi tingkat kelarutannya. Sebaliknya pada konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasi yang lebih rendah proses hidrolisa belum optimal.



Keterangan: Nd : No detection
 E1, E2, E3 : Konsentrasi enzim biduri 0,2%; 0,3%; 0,4%
 T1, T2, T3 : Lama inkubasi 60, 90 dan 120 menit

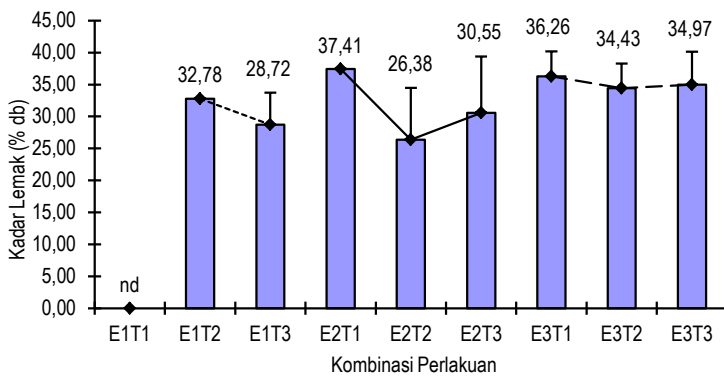
Gambar 34. Kadar protein terlarut keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim protease biduri dan lama inkubasinya

Tingginya kadar protein terlarut pada kombinasi perlakuan E2T3 (enzim biduri 0,3% dan inkubasi 120 menit), diduga karena pada konsentrasi dan lama inkubasi tersebut protein terkoagulasi sempurna, sehingga kadar protein yang

didapat juga cenderung lebih tinggi daripada kombinasi perlakuan yang lain.

Kadar Lemak Keju Hasil Proses Enzimatis

Histogram kadar lemak keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya, terlihat pada Gambar 35.



Keterangan: Nd : No detection
E1, E2, E3 : Konsentrasi enzim biduri 0,2%; 0,3%; 0,4%
T1, T2, T3 : Lama inkubasi 60, 90 dan 120 menit

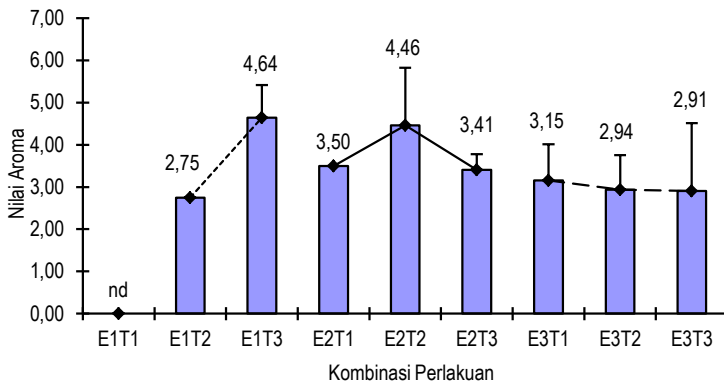
Gambar 35. Kadar lemak keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim protease biduri dan lama inkubasinya

Gambar 35 menunjukkan bahwa dengan semakin tinggi konsentrasi enzim biduri dan semakin lama waktu inkubasi, tidak selalu menghasilkan kadar lemak yang semakin tinggi. Bahkan pada berbagai kombinasi perlakuan seperti E1T2, E2T1, E3T1, E3T2 dan E3T3 menunjukkan kadar lemak yang hampir sama. Hal ini berarti perlakuan konsentrasi dan lama inkubasinya tidak terpengaruh terhadap kadar lemak keju.

Aroma Keju Hasil Proses Enzimatis

Histogram hasil uji organoleptik aroma keju pada berbagai kombinasi konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya ditunjukkan pada Gambar 36.

Semakin rendah angka pada histogram menunjukkan keju yang semakin berbau getah, semakin tinggi angka pada histogram, menunjukkan keju yang semakin berbau susu. Gambar 36 menunjukkan bahwa perbedaan kombinasi perlakuan menghasilkan aroma keju yang berbeda-beda. Semakin tinggi konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya menjadikan keju semakin beraroma getah. Adapun aroma keju yang paling kecil dihasilkan oleh perlakuan E1T3 (enzim biduri 0,2% dan inkubasi 120 menit) yang tidak berbeda dengan E2T2 (enzim biduri 0,3% dan inkubasi 90 menit). Menurut hasil penelitian Nafi' (2002) bahwa ekstrak enzim yang dihasilkan masih terdapat gum. Hal ini memungkinkan keju yang dihasilkan memiliki bau getah.

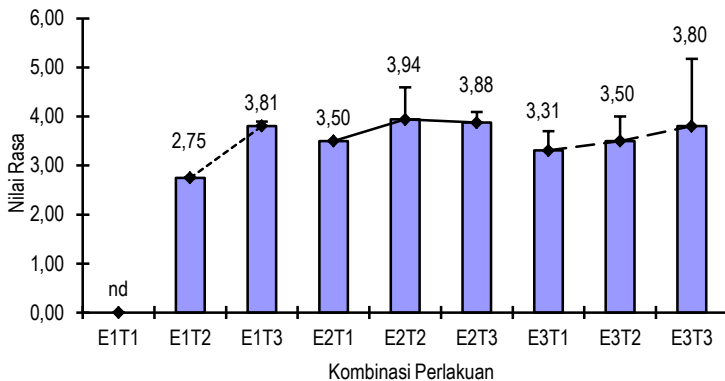


Keterangan: Nd : No detection
 E1, E2, E3 : Konsentrasi enzim biduri 0,2%; 0,3%; 0,4%
 T1, T2, T3 : Lama inkubasi 60, 90 dan 120 menit

Gambar 36. Nilai aroma keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim protease biduri dan lama inkubasinya

Rasa Keju Hasil Proses Enzimatis

Histogram hasil uji organoleptik rasa keju pada berbagai kombinasi konsentrasi enzim biduri dan lama inkubasinya ditunjukkan pada Gambar 37.



Keterangan :

Nd : No detection

E1, E2, E3 : Konsentrasi enzim biduri 0,2%; 0,3%; 0,4%

T1, T2, T3 : Lama inkubasi 60, 90 dan 120 menit

Gambar 37. Nilai rasa keju pada berbagai kombinasi perlakuan konsentrasi enzim protease biduri dan lama inkubasinya

Gambar 37 menunjukkan rasa gurih (skor tertinggi) terdapat pada kombinasi perlakuan E2T2 (enzim biduri 0,3% dan inkubasi 90 menit). Dalam hal ini rasa (Gambar 28) cukup mempunyai korelasi dengan sifat organoleptik aroma. Menurut deMan (1997), bahwa bau dan rasa keju menyatakan juga seluruh ciri bahan yang menghasilkan rasa tersebut. Jadi, jika panelis tidak menyukai aroma keju yang ada, mungkin saja juga tidak tertarik pada rasanya.

Protein susu merupakan komponen utama keju yakni protein yang terdiri dari asam-asam amino yang tersusun oleh ikatan-ikatan peptida. Gambar 37 menyatakan bahwa untuk semua konsentrasi enzim, semakin lama inkubasi cenderung akan meningkatkan rasa keju. Hal ini disebabkan semakin lama inkubasi, tingkat hidrolisis protein akan semakin tinggi sehingga semakin banyak asam-asam amino bebas yang terbentuk yang menyebabkan keju menjadi gurih.

Penggunaan Enzim Biduri pada Proses Ekstraksi VCO (Virgin Coconut Oil)

Biduri merupakan tumbuhan semak liar tropis sumber protease yang sangat potensial untuk beberapa proses pangan (Van Stenis, 1992; Witono dkk, 2006). Protease biduri dapat memecah globula-globula protein yang menyelimuti minyak sehingga diharapkan dapat mempercepat proses pembuatan minyak kelapa murni tanpa mengurangi manfaat dan kualitas minyak kelapa murni yang dihasilkan. Selanjutnya diteliti aplikasi protease biduri dalam proses ekstraksi VCO dengan mempelajari pengaruh konsentrasi protease biduri dan lama inkubasinya terhadap sifat-sifat VCO yang dihasilkan, serta membandingkannya dengan VCO yang dihasilkan secara fermentasi spontan.

Santan sebagai bahan baku dari minyak kelapa merupakan suatu sistem emulsi minyak dalam air. Salah satu agen pengemulsi yang berperan penting dalam sistem tersebut adalah protein. Melalui proses pemecahan protein dalam sistem emulsi santan kelapa, maka antar globula minyak / lemak akan saling bergabung. Enzim protease bersifat sebagai *destabilizer*, yakni mampu menghidrolisis misel santan kelapa yang menyelubungi globula-globula minyak sehingga sistem emulsi tidak stabil, dengan pecahnya misel santan maka antar globula minyak akan bergabung dan membentuk lapisan yang mudah dipisahkan (Gustone, 1996; Debrah and Ohta, 1997).

Teknik aplikasi protease biduri pada proses ekstraksi VCO dapat dilakukan dengan menggunakan konsentrasi protease biduri yang relatif kecil yakni antara 0,05-0,15%. Konsentrasi protease biduri 0,05-0,15% dengan lama inkubasi 2 sampai 4 jam dihasilkan VCO yang memiliki kualitas lebih baik di banding VCO hasil fermentasi spontan ditinjau dari parameter bilangan asam dan *free fatty acid*-nya (Witono dkk, 2007d).

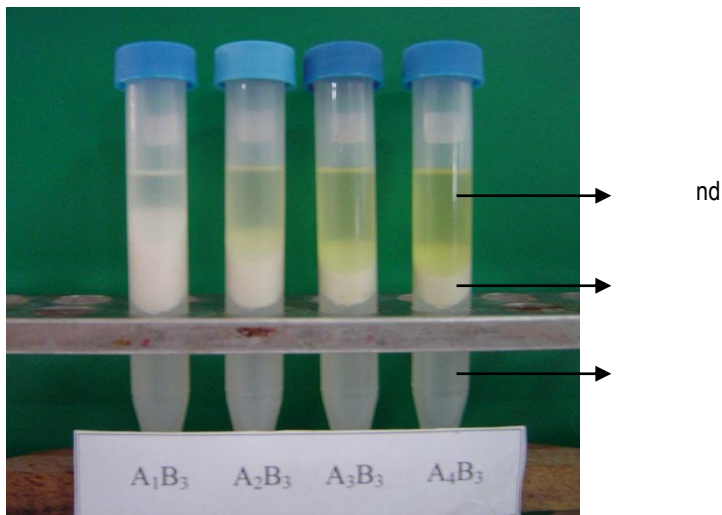
Semakin tinggi konsentrasi protease biduri dan semakin lama waktu inkubasi, dihasilkan rendemen VCO yang semakin tinggi. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi enzim dan semakin lama waktu inkubasinya, semakin banyak jumlah substrat protein yang bereaksi dengan enzim dan semakin lama enzim berinteraksi dengan substrat protein yang menyelubungi globula minyak, sehingga semakin banyak minyak yang terekstrak dari krim santan kelapa. Chen dan Diosady (2003) menyatakan bahwa enzim protease memecah globula protein dalam sistem emulsi, ketika sistem emulsi santan pecah maka minyak akan terpisah dengan komponen air.

Peningkatan rendemen minyak ini menunjukkan enzim protease biduri mampu merusak lapisan film yang terdiri dari persenyawaan protein yang menyelubungi globula minyak, sehingga globula minyak yang satu akan bergabung dengan globula minyak yang lain dan akhirnya menjadi kumpulan minyak yang lebih besar yang akan mengapung pada lapisan atas setelah dilakukan sentrifugasi. Sebagaimana laporan Purnomo (2006), bahwa enzim papain juga dapat digunakan untuk mengekstrak minyak kelapa murni. Enzim papain merupakan jenis enzim protease yang memiliki beberapa kemiripan karakteristik dengan enzim yang dihasilkan dari tanaman biduri, di antaranya ialah pH optimumnya 7 dan termasuk dalam jenis protease sulfidril.

Gambar 38 menunjukkan bahwa rendemen VCO terendah dihasilkan dari perlakuan konsentrasi protease biduri 0 % (w/w) dan waktu inkubasi 2 jam yaitu sebesar 7.26 % dan rendemen VCO tertinggi diperoleh dari perlakuan konsentrasi enzim 0.15 % (w/w) dan waktu inkubasi 4 jam yaitu sebesar 38.43 %. Berarti penggunaan protease biduri sangat efektif dalam ekstraksi VCO, sebagaimana juga ditunjukkan oleh Gambar 29. Dibandingkan dengan VCO tanpa perlakuan enzim (0,00% w/w), pada waktu inkubasi

yang sama (yakni 4 jam) terjadi peningkatan rendemen minyak sebesar 34%.

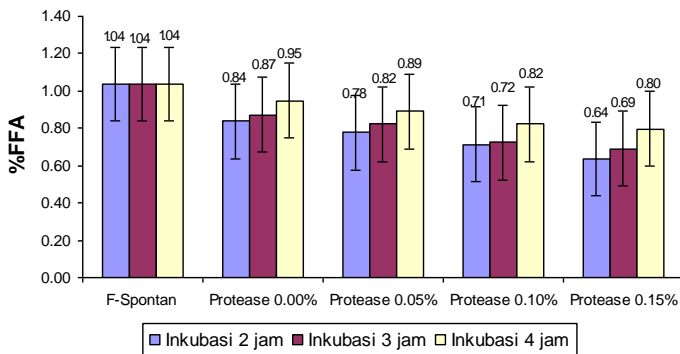
Gambar 38 memperlihatkan dengan jelas bahwa semakin tinggi konsentrasi protease biduri yang digunakan semakin banyak fraksi minyak (lapisan paling atas) yang dihasilkan, atau semakin sedikit sisa krim (lapisan tengah). Sedangkan fraksi air dan whey (lapisan paling bawah) tidak menunjukkan perbedaan. Hasil ini sesuai dengan laporan Chen dan Diosady (2003) bahwa sistem enzim sangat efektif dalam memecah matrix santan kelapa. Akan tetapi hal ini agak berbeda dengan hasil penelitian McGlone dkk. (1986) dengan menggunakan *complex enzymes* (campuran dari beberapa jenis enzim), dihasilkan 3 fraksi yang meliputi fraksi minyak berkualitas tinggi (lapisan atas), fraksi air (lapisan tengah) dan fraksi paling bawah berupa *coconut meal*.



Gambar 38. Fraksinasi hasil inkubasi santan kelapa dengan protease biduri pada konsentrasi 0% (A₁), 0.05% (A₂), 0.10% (A₃), 0.15% (A₄) dengan lama inkubasi 4 jam (B₃).

Konsentrasi protease biduri dan lama inkubasinya berpengaruh (α 0.05%) terhadap % FFA (free fatty acid) dari VCO. Adapun histogram % FFA VCO hasil fermentasi spontan dan % FFA VCO yang dibuat dengan berbagai konsentrasi protease biduri dan lama inkubasinya dapat dilihat pada Gambar 39.

Semakin tinggi konsentrasi enzim protease biduri, maka semakin rendah % FFA VCO yang dihasilkan. FFA minyak sangat berhubungan dengan proses hidrolisis yang terjadi pada minyak tersebut. Seperti halnya pada pengamatan bilangan asam, bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim maka % FFA yang dihasilkan juga semakin rendah. Pada dasarnya pengukuran % FFA hampir sama dengan pengukuran bilangan asam, yakni digunakan untuk mengukur tingkat hidrolisa yang terjadi pada minyak atau lemak. Akan tetapi pengukuran % FFA didasarkan pada jenis asam lemak yang paling banyak terdapat pada minyak yang dianalisa. Karena pada minyak kelapa murni, jenis asam lemak yang paling banyak adalah asam laurat, maka pengukuran % FFA-nya didasarkan pada berat molekul asam laurat (Waisundara *et al.*, 2004).



Gambar 39. % FFA VCO hasil fermentasi spontan dan % FFA VCO yang dibuat dengan berbagai konsentrasi protease biduri dan lama inkubasinya

Gambar 39 dapat diketahui bahwa semakin lama waktu inkubasi, maka semakin tinggi % FFA VCO yang dihasilkan. Hal ini seiring dengan pengamatan bilangan asam, semakin lama waktu inkubasi, maka nilai % FFA-nya juga semakin meningkat, karena semakin lama minyak berinteraksi baik dengan air maupun dengan kemungkinan adanya lipase.

Gambar 39 juga menunjukkan bahwa % FFA VCO yang dihasilkan secara fermentasi spontan lebih tinggi dari pada % FFA VCO yang dihasilkan menggunakan enzim protease biduri. Sebagaimana pada parameter bilangan asam, hal ini disebabkan karena waktu inkubasi pada proses fermentasi spontan yang jauh lebih lama dari pada proses enzimatik. Diduga adanya aktifitas mikroorganisme yang mampu menghidrolisa minyak sehingga menghasilkan asam lemak bebas yang lebih besar.

Witono dkk. (2007d) juga melaporkan bahwa angka peroksida minyak kelapa murni yang dihasilkan tidak terdeteksi (ND). Hal ini diduga peroksida yang terbentuk akibat proses oksidasi minyak terlalu kecil, sehingga tidak dapat terdeteksi dalam pengujian. Kecilnya peroksida yang terbentuk ini diduga karena VCO yang dihasilkan lebih banyak mengandung asam lemak jenuh (90%) dan sangat sedikit mengandung asam lemak tidak jenuh (10%).

Berdasarkan parameter pengamatan yang telah dilakukan, terutama parameter kadar air, angka peroksida, angka asam dan asam lemak bebas (% FFA), maka VCO hasil proses enzimatik menggunakan protease biduri masuk dalam kategori *edible oil* (Standard Codex, 1991). Namun demikian terutama kualitas warna perlu ditingkatkan lebih lanjut, sehingga perbaikan teknologi produksi protease dari tanaman biduri perlu ditelaah lebih lanjut.

Uji Hidrolisis pada Substrat Protein Kedelai

Teknik aplikasi protease biduri pada proses pembuatan hidrolisat protein kedelai dapat dilakukan dengan

menggunakan konsentrasi protease biduri yang relatif kecil yakni antara 0,05-0,15%. Konsentrasi protease biduri 0,15% dengan lama hidrolisis 1,5 ditemukan sebagai perlakuan terbaik. Hidrolisat protein kedelai hasil hidrolisis dengan protease dari tanaman biduri memiliki potensi 'umami' sebagai *flavor enhancer* spesifik (Witono dkk, 2007c).

Enzim Protease Biduri Termobilisasi

Immobilisasi adalah perbanyakan enzim dengan cara penjerapan enzim terhadap suatu bahan penjerap (*absorban*, *immobilisan* atau *carrier agent*) seperti celite dan dekstrin. Enzim yang terimmobilisasi diharapkan dapat digunakan secara berulang (*reuse*) pada produksi bahan pangan atau industri lain. Immobilisasi baik jika aktivitas yang dihasilkan tinggi.



Gambar 40. Enzim Protease Biduri Terimmobilisasi

Immobilisasi enzim protease biduri dapat dilakukan dengan menggunakan immobilisan dari celite pada konsentrasi 0,8 gram celite untuk menjerap 0,1 gram enzim atau menggunakan carrier agent dekstrin dengan proporsi 0,8 sampai 1,5 gram dekstrin untuk membawa 0,1 gram enzim protease biduri. Aktivitas spesifik tertinggi protease biduri terimmobilisasi yang menggunakan celite ialah $5,69 \cdot 10^{-5}$ unit/mg sedangkan yang menggunakan carrier agent dekstrin nilai aktivitas spesifiknya ialah $3,309 \cdot 10^{-6}$ unit/mg. Sehingga immobilisan yang paling baik ialah celite karena memiliki aktivitas spesifik lebih besar dibandingkan dengan penggunaan carrier agent dekstrin.

Biduri merupakan tanaman tropis yang sangat potensial untuk diproduksi sebagai sumber enzim protease. Karakteristik agroklimat wilayah Indonesia sangat cocok untuk pengembangan dan budidaya tanaman biduri. Dengan kultur teknis yang sederhana baik di lahan subur maupun di lahan marginal yang kering dan tandus, tanaman biduri mampu tumbuh dan menghasilkan getah yang dapat diproses lebih lanjut menghasilkan enzim protease.

Enzim protease biduri dapat diproduksi baik dari bagian getah, daun dan seluruh tanamannya. Bagian getah menghasilkan protease paling tinggi aktivitas proteolitiknya, disusul daun dan pucuk batang tanaman. Teknik isolasi protease dari getah biduri yang paling tepat adalah dengan metode presipitasi menggunakan ammonium sulfat 65%. Selanjutnya dialisat yang dihasilkan dipurifikasi melalui kolom kromatografi dengan gel sephadex G-25 dilanjutkan dengan CM Sephadex C-50 Cation Exchanger.

Protease biduri memiliki karakteristik di antaranya ialah: Berat molekul (BM) dibawah 29 kDa, pH optimum sekitar 7 dan suhu optimum sekitar 55°C, yang termasuk dalam protease termostabil. K_m sebesar 21,63 gram dan V_{max} sebesar 18,87 mg/ml/min. Inaktivasi protease biduri dapat dilakukan dengan pemanasan suhu 90°C selama 10 menit atau suhu 80°C selama 10-30 menit. Sedangkan pemanasan suhu 60°C akan inaktif selama 30 menit.

Berdasarkan sifat kimia dari sisi aktifnya, protease biduri termasuk dalam jenis sulfidril (*cysteine protease*) yang memiliki stabilitas pada larutan garam dan deterjen. Protease biduri mampu menghidrolisis berbagai jenis substrat (kasein, isolat protein kedelai, isolat protein koro, miofibril ikan dan gelatin) dengan derajat hidrolisis yang bervariasi. Berdasarkan pola pemecahan substratnya, protease biduri terindikasi

dalam golongan eksopeptidase yang sangat potensial untuk proses pembuatan hidrolisat protein maupun untuk memperbaiki flavor produk pangan tertentu. Di sisi lain, protease biduri ternyata sangat efektif digunakan untuk proses ekstraksi minyak kelapa murni.

Teknik produksi enzim protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri adalah dilakukan dengan teknik presipitasi pada pH 3,5, diekstrak menggunakan aquades dingin yang mengandung Na-metabisulfit 0,7%. Selanjutnya dikeringkan secara *freeze-drying* sebagai alternatif pertama atau *vacuum-drying* suhu 40°C sebagai alternatif kedua.

Enzim protease hasil ekstraksi dari tanaman biduri dapat diaplikasikan untuk proses pengempukan daging, pembuatan keju, ekstraksi minyak murni (VCO), pembuatan hidrolisat protein kedelai. Enzim biduri juga dapat diimobilisasi menggunakan celite sebanyak 0,8 gram celite untuk menjerap 0,1 gram enzim atau menggunakan carrier agent dekstrin dengan proporsi 0,8 sampai 1,5 gram dekstrin untuk membawa 0,1 gram enzim.

Selanjutnya perlunya pengkajian lebih lanjut tentang: (a) potensi antioksidatif dari *crude protease* biduri; (b) peranan protease biduri dalam membantu memperbaiki flavor pada produk makanan yang lain; (c) teknik penanganan atau penyimpanan protease biduri dalam bentuk cair dengan menambahkan senyawa garam sebagai stabilizer; (d) aplikasi enzim protease biduri pada proses produksi flavor enhancer dengan memanfaatkan bahan-bahan dari sumber alam lokal di Indonesia; (e) potensi protease biduri sebagai campuran bahan aktif dalam pembuatan deterjen. Selanjutnya perlu dikembangkan produksi protease dari tanaman biduri dalam skala industri atau skala *pilot plan* untuk kepentingan komersial lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., Ellaiah, P. and Prasad, D.S., 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11, *AAPS PharmSciTech*, 4 (4), 1-9.
- Anderson, E., Sze, K.W.C. and Sathe, S.K., 1995. New Colorimetric Method for the Detection and Quantitation of Proteolytic Enzyme Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (6), 1530-1534.
- Anonim. 2001. Pembuatan Flavour Hewani Alami yang Murah, Multiguna dan Berdaya Simpan Tinggi. FTP - Unej. Jember.
- Anonim, 2006. *Papain Production*. http://practicalaction.org/practicalanswer/productinfo.php?product_id=114. Diakses pada tanggal 15 Desember 2007.
- Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K., and Arai, S., 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.
- Aworh, O.C. and Muller, H.G., 1987. Cheese-Making Properties of Vegetable Rennet from Sodom Apple (*Calotropis Procera*). *J. Food Sci.* 26, 70-77.
- Benito, M.J., Rodriguez, M., Nunes, F., Asensio, M.A., Bermudez, M.E. and Cordoba, J.J., 2002. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 Active against Mea Protein, *J. Applied and Enviromental Microbiology*, 68 (7), 3532-3536.
- Bourne, M.C. 1968. Effect of Water Activity On Texture Profile Parameters of Apple Flesh. *J. Texture Studies*.
- Buckle, K. A., Edwards, R.A., Fleet, G.H. dan Wooton, M., 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh: Purnomo, H. dan Adiono. UI-Press. Jakarta.
- Chang, R., 1981. *Physical Chemistry, With Applications to Biological System*. 2nd ed. London.

- Chen, B.K. and Diosady, L., 2003. Enzymatic Aqueous Processing of Coconut, *International Journal of Applied Science and Engeneering*, 1 (1), 55-61.
- Chinas, F.A.I. and Canales, A.L.M., 1986. Proteolytic Enzyme from *Cnidoscopus chayamansa* "Chaya". *J. Food Sci.*, 61 (1), 142-144.
- Chin, H.W. and Rosenberg, M., 1997. Accumulation of Some Flavour Compound in Full and Reduced Fat Ceddar Cheese under Different Ripening Condition, *J. Food Sci.*, 62 (3), 468-474.
- Choi, K.H. and Laursen, R.A., 2000. Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome (*Zingiber officinale*). *Eur. J. Biochem.* 267, 1516-1526.
- Choi, Y.J., Cho Y.J. and Lanier, T.C., 1999. Purification and Characterization of Proteinase from Alantic Menhaden Muscle, *J. Food Sci.*, 64 (5), 772-775.
- Choudury, G.S. and Gogoi, B.K., 1996. Protease Inactivation in Fish Muscle by High Moisture Twin Screw Extrusion. *J. Food Sci.*, 61 (6), 1219-1222.
- Codex. 1999. *Standard for Edible Fats and Oils not Covered by Individual Standard: Codex Stan 19-1981 (Rev.2-1999)*. <http://www.codexalimentarius.com>.
- Collar, C., Mascaros, A.F. and De Barber, C.B., 1992. Amino Acid Metabolism by Yeast and Lactic Bacteria during Bread Dough Fermentation. *J. Food Sci.*, 57 (6), 1423-1427.
- Copeland, R. A., 1994. *Method for Protein Analysis, A Practical Guide to Laboratory Protocols*. Chapman and Hall. International Thompson Publishing. New York.
- Couvin, S.P., and Young, L.S., 2000. *Bakery Food Manufacture and Quality: Water Control and Effectks*. Blackwell Science Ltd. London.
- Creamer, L.K. and Olson, L.F., 1982. Rheological Evaluation of Maturity Ceddar Cheesa. *J. Food Sci.*, 47 (3), 631-634.

- Darwis, A.A. dan Sukara, E., 1990. *Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim*. P.A.U. Bioteknologi. I.P.B. Bogor.
- Debrah, K.T. and Ohta, Y., 1997. Aqueous Extraction of Coconut Oil by an Enzyme-Assisted Proces. *J. Sci. Food Agric.*, 74, 497-502.
- deMan, M. J., 1997. *Kimia Makanan*. Penerbit ITB. Bandung.
- Eskin, N.A.M., 1990. *Biochemistry of Food*. Second Edition. Academic Press. Inc. New York.
- Fogle, D.R, Plimton, R.F, Ockerman, R.O., Back, L.J. and Pearson, T., 1986. Tenderzation of Beef effect of Enzyme Level and Cooking Method. *J. Food Sci.* 47 (6): 1113-1117.
- Fox, P.F., 1991. *Food Enzymology*. Elsevier Applied Science. New York.
- Gunstone, F.D., 1996. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Chapman & Hall. Maryland.
- Hagar, W.G. and Bullerwell, L.D., 2003. *Supermarkert Proteases*. Biology Department, University of Massachusetts, Boston.
- Heyne, K., 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia III*. Diterjemahkan. Oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kehutanan R.I. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta.
- Holme, D. J. and Peck, H., 1998. *Analytical Biochemistry*. Third Edition. Addison Wesley Longman. New York.
- http://www.mediaindo.co.id/newsprint.asp?Id=2004090705809&Jenis=c&cat_name=Opini. Diakses 12 April 2005
- Ismail, M.N. 1996. *Majalah BPP Teknologi*. Deputi PIDT. Jakarta.
- Jiang, S.T., Moody, M.W. and Chen, H.C., 1991. Purification and Characterization of Protease from Digestive Tract of Grass Shrimp. *J. Food Sci.*, 56 (2), 322-326.
- Izawa, N., Tokuyasu, K. and Hayashi, K., 1997. Debittering of Protein Hidrolysates Using *Aeromonas caviae* Aminopeptidase. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3), 543-545.

- 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.
- Kang, C.K. and Warner, W.D., 1974. Tenderization of Meat With Papaya Latex Proteases. *J. Food Sci.*, 39, 812-818.
- Kohlmann, K.L., Nielsen, S.S., Ladisch, M.R., 1991. Purification and Characterization of an Extracellular Protease Produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *J. Dairy Sci.*, 74, 4125-4136.
- Kolodziejska, Szie, Magdalena and Sikorski, S., 1994. Proteolytic Activity of Crude Enzyme Extracts of Squid *Illex argentinus* Liver. *J. Food Biochem.*, 18, 43-53.
- Koohmaraie, M., 1990. Quantification of Ca²⁺- depend Protease Activites by Hydrophobic and Ion-exchange Chromatography. *J. Animal Sci.* 68. 659-665.
- Kunst, A., 2000. Enzymatic Modification of Soy Proteins to Improve Their Functional Properties, *Magazine of Industrial Protein*, 8 (3), 9-11.
- Lazano, P., Combes, D. and Iborra, J.L., 1994. Food Protein Nutrient Improvment by Protease at Reduced Water Activity. *J. Food Sci.*, 59 (4), 876-880.
- Leewit, S. and Pornsuksawang, 1988. Protease from Bacteria in Soybean Whey. *Proc. Food Science and Technology in Industrial Development*. Vol. I. (Ed Manepoon), 751-754, Thailand.
- Loffler, A., 1986. Proteolytic Enzymes: Sources and Applications. *J. Food Tech.*, 40, 63-70.
- McGlone, O.C., Canales, A.L.M. and Carter, J.V., 1986. Coconut Oil Extraction by a New Enzymatic Process. *J. Food. Sci.* 15(3), 695-697.
- Meyer, L.H. 1962. Food Texture. The Avi Publishing Company Inc. Westpost Cennecticut. USA.
- Molina, I. and Toldra, F., 1992. Detection of Proteolytic Activity in Microorganism Isolated from Dry Cured Ham. *J. Food Sci.*, 57 (6), 1308-1309.

- Monti, R., Basilio, C.A., Trevisan, H.C. and Contiero, J., 2000. Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica papaya*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43 (5), 501-507.
- Monti, R., Contiero, J. and Goulart, A.J., 2004. Isolation of Natural Inhibitors of Papain Obtained from *Carica papaya* Latex, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (5), 747-754.
- Muzakhar, K. 2002. Produksi, Purifikasi dan Karakterisasi CLE dengan memanfaatkan Ampas Tahu Sebagai Sumber Karbon dan Nitrogen pada Solid State fermentation. *J. Sains & Teknologi*, 1(1), 24-31.
- Nafaji, M.F., Deobagkar, D. and Deobagkar, D., 2005, Potential Application of Protease Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100, *Electronic J. of Biotech.*, 8 (2), 193-203.
- Nafi, A., 2002. *Ekstraksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri (Calotropis gigantea) dengan Pelarut Ethanol* [Skripsi], Fakultas Teknologi Pertanian UNEJ. Jember.
- Naz, S., 2002. *Enzymes and Food*, Oxford University Press, Pakistan.
- Nielsen, P.M., 2001. *Food Proteins and Their Applications*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Nobuzo, T., 1988. Recent Topics on Enzyme Utilization for Food in Japan. *Proc. Food Science and Technology in Industrial Development*. Vol. I. (Ed Manepon), 126-137. Thailand.
- Noda, K., Koyanagi, M. and Kamiya, C., 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.
- Purnomo, Y., 2006. *Optimasi Penambahan Crude Papain dan Suhu Inkubasi pada Proses Pembuatan Virgin Coconut Oil (VCO)*. <http://www.kimianet.com//>

- Rahayu, K., 1988. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim*. P.A.U. Pangan dan Gizi. U.G.M. Yogyakarta.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Desphande, V.V., 1998, *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease*, American Society for Microbiology.
- Ray, J., 1989. *Plant Systematics*. Mc Graw Hill Publisher. Toronto. New York.
- Robyt, J.F. and White, B.S., 1987. *Biochemical Technic Theory and Practical*. Kluwer Academic Publisher. New York.
- Rzychon, M., Chmiel, D. and Stec-Niemczyk, J., 2004. Modes of Inhibition of Cysteine Proteases. *Acta Biochimica Polonica*, 51 (4): 861-873.
- Sanches, A.C. and Borgos, J., 1997. Factors Affecting the Gelation Properties of Hydrolyzed Sunflower Proteins. *J. Food Sci.*, 62 (2), 284-288.
- Sanogo, T., Paquet, D. and Linden, G., 1990. Proteolysis of α_{s1} -casein by Papain in a Complex Enviroment Influence of Ionic Strength on The Reaction Product. *J. Food Sci.*, 55 (3), 796-800.
- Sardjoko. 1991. *Bioteknologi (Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya)*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Savero Jr, J.B., Bispo, I.M.B.D., Souza, R.R., Ehrhardt, D.D., Lopes, F.L.G., Santana, J.C.C. and Tambourgi, E.B., 2006. *Bromelain Purification from Annanas Comocos by Membrane Separation Processes*, Laboratory of Separation Processes (DEQ/UFS), Sao Cristovao.
- Scott, R., 1986. *Cheesmaking Practice*. Elsevier Applied Science Publisher. New York.
- Siebert, K.J. and Lynn, P.Y., 1997. Haze Active Protein and Poliphenols in Apple Juice Assesed by Turbidimetry. *J. Food Sci.*, 62 (1), 79-84.
- Silva, S.V. and Malcata, F.X., 2004. Influence of the Coagulant Level on Early Proteolysis in Ovine Cheese-like Systems Made with Sterilized Milk and *Cynara cardunculus*. *J. Food. Sci.* 69 (7), 579-584.

- Smith, J.E., 1995. *Bioteknologi*. Terjemahan. Hartono, EGC. Jakarta.
- Sperber, I. and Torrie, J.H., 1982. Requirement of *Clostridium botulinum* for Growth and Toxin Production. *J. Food Tech.*, 36 (1), 89-97.
- Sousa, M.S. and Malcata, F.X., 1997. Comparison of Plant and Animal Rennet in Terms of Microbiological, Chemical and Proteolysis Characteristics of Ovine Cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1), 74-81.
- Suhartono, M.T., 1992. *Protease*. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Suhartono, M.T., Lestari, L.N. dan Tanoyo, T., 1995. Study on Protease from *Aspergillus oryzae* Isolated from Soy Sauce Processing in Indonesia. *J. Indonesian Trop. Agric.*, 6 (2), 21-25.
- Sumantha, A., Sandya, C., Szakacs, Soccol, C.R. and Pandey, A., 2005. Production and Partial Purification by Fungal Mixed Substrate Fermentation, *Food. Technol. Biotechnol.* 43 (4), 313-319.
- Soeparno. 1994. *Ilmu dan Teknologi Daging*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Tavasolian, B. and Shabbah, F., 1979. Extraction and Partial Purification of Milk Coagulating Enzyme from *Cartamus tinctorius* Seed. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (1), 190-191.
- Thompson, E.H., Wolf, I.D. and Allem, C.E., 1973. Ginger Rhizome: A New Source of Proteolytic Enzyme, *J. Food Sci.*, 38, 652-655.
- Titania, B. 2001. *Papain untuk Pengolahan Daging Ternak*. Bandung.
- Tjitrosoepomo, G., 1994. *Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Tropp, B.E., 1997. *Biochemistry: concept and application*, Brook/Cole Publishing Company, USA.

- Uriyo, M.G., 2001. Changes in Enzyme Activities During Germination of Cowpeas (*Vigna unguiculata*, cv California Blackeye). *J. Food Chemistry*. 73, 7-10.
- Van der Ven, C., 2002. *Biochemical and Functional Characterisation of Casein and Whey Protein Hydrolysates*. Wageningen University. Netherland.
- Van Stenis, T., 1992. *Flora*. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Violetta, J.C. and Dobourdien, D., 1991. *Enzyme in Winemaking. In Food Enzymology*. (Ed Fox), 1-63. Elsevier Applied Science. New York.
- Viessman, Warren and Hammer, M.J., 2005. *Water Supply and Pollution Control*. 7th ed. NJ: Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Waisundara, V.Y., Perera, C.O. and Barlow, P.J., 2004. *Effect of Different Pre-Treatments of Fresh Coconut Kernels on Some of The Quality Attributes of The Coconut Milk Extracted*, Department of Chemistry, Food Science and Technology Program, National University of Singapore, Singapore, 771-777.
- Wang, N.S., 2004. *Enzyme Purification by Salt (Ammonium Sulfate) Precipitation*, Department of Chemical Engineering, University of Maryland.
- Whitaker, J.R., 1994. *Principle of Enzymology for the Food Science*. Second Edition. Marcel Decker. New York.
- Winarno, F.G. 1993. *Enzim Pangan*. PT.Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Winarno, F.G. 1995. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Witono, Y., 2002a. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri. *J. Teknologi Hasil Pertanian* 1(1), 1- 14.
- Witono, Y., 2002b. Pemanfaatan Enzim Protease dari Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan. *J. Sains dan Teknologi*, 1(1): 32 - 37.
- Witono, Y., Subagio, S., Windrati, W.S. dan Muntamimah M. 2002. Sifat-sifat daging olah pasca inkubasi dengan

enzim protease biduri, *Prosiding Seminar Nasional - Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Malang.

- Witono Y., Windrati, W. S. and Subagio, A. 2003. Studi Pembuatan Keju Menggunakan Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*). *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Yogyakarta 22-23 Juli 2003.
- Witono, Y., Subagio, A., Windrati, W.S., Hartanti, S. dan Praptiningsih, J. 2004. Protease dari Getah Biduri, *Prosiding Seminar Nasional*, Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia, Jakarta 14-15 Desember 2004.
- Witono, Y., Subagio, A., Susanto T. dan Widjanarko, S.B., 2006. Telaah Teknik Produksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Yogyakarta 2-3 Agustus 2006.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. dan Widjanarko, S.B. 2007a. Isolasi Enzim Protease dari Getah Biduri, *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, 7(1), 20-26.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. dan Widjanarko, S.B. 2007b. Purifikasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 18 (1), 1-9.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. and Widjanarko, S.B. 2007c. Karakteristik Hidrolisat Protein Kedelai dari Proses Hidrolisis secara Enzimatis Menggunakan Protease dari Tanaman Biduri, *Berkala Penelitian Hayati*. Perhimpunan Biologi Indonesia, 3 (1), 7-13.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. and Widjanarko, S.B. 2007d. Enzymatic Extraction of Virgin Coconut Oil (VCO) Using Protease from Biduri Plant, *Agritech-UGM*, 27 (3), 100-106.
- Witono, Y. and Kang, W.W. 2010. Specific Characteristic of Novel Cystein Protease From Indonesian 'Biduri' Plant (*Calotropis gigantea*), *The Korean Society of Food Science and Technology*, June 2010.

- Word, O.P., 1983. *Properties of Microbial Proteinase. In Microbial Enzyme and Biotechnology.* (Ed Forgety). pp. 56-102. Appl. Publ. London.
- Zayas, J. F., 1997. *Functionality of Protein In Food.* Springer, Berlin.
- Zhuang, P. and Butterfield, D.A., 1991. Denaturation Studies of Active-Site Labeled Papain Using Electron Paramagnetic Resonance and Fluorescence Spectroscopy, *Biophys. J. Biophysical Society*, 60, 623-628.

RIWAYAT HIDUP SINGKAT PENULIS

Penulis adalah putra pertama dari pasangan keluarga Bpk. Ngatemo dan Ibu Sri Linartini yang lahir di Desa Kepatihan Kec. Tirtoyudo Kab. Malang tanggal 12 Desember 1969. Penulis mengenyam pendidikan sejak SD (1975-1982), SMP (1982-1985) dan SMA (1985-1988) di Kab. Malang. Penulis yang berlatar belakang keluarga pas-pasan ini tahun 1988 bertekad melanjutkan pendidikan sarjana (S1) di Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian UNEJ-Jember.



Setelah lulus S1, penulis juga ternyata tidak mudah untuk mendapatkan pekerjaan. Bertani untuk sekedar mengisi waktu dan membantu kedua orangnyapun juga dilakukan. Penulis juga pernah menyisir pekerjaan mulai dari ujung timur sampai ke ujung barat pulau Jawa. Karena kesabaran dan keuletan penulis yang tidak punya koneksi siapa-siapa selain dengan mengandalkan koneksinya pada Allah S.W.T., akhirnya baru tahun 1995 penulis diterima bekerja sebagai karyawan di PT. Miwon Indonesia, lalu setahun kemudian penulis bekerja sebagai dosen di Stiper Tribhuwana (kini UNITRI) Malang. Tahun 1996-2000, melalui support beasiswa TMPD (BPDN) Dikti berhasil mengenyam pendidikan S2 pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian PPS-UNIBRAW (UB) Malang.

Di tengah periode perjalanan studi S2-nya, penulis mencoba mengadu nasib untuk mengembangkan kariernya dengan berkompetisi mengikuti seleksi PNS Dosen di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Sejak tahun 1998 sampai sekarang penulis bekerja sebagai Dosen FTP-UNEJ. Pada pertengahan tahun 2004 penulis juga pernah short-course selama 3 bulan di Van Hall Instituut-Belanda & Sheffield Hallam University-Inggris. Sejak tahun 2004 menempuh pendidikan S3 dengan beasiswa BPPS (BPDN)

Dikti. Selama 14 tahun semenjak aktif menjadi dosen dan peneliti, penulis telah melakukan penelitian sebanyak 31 judul penelitian kompetitif nasional dan telah menghasilkan publikasi ilmiah nasional dan internasional sebanyak 41 judul.

Penulis yang pernah menjadi pengamen sejak SLTA hingga mahasiswa S1 semester IV ini juga pernah diundang sebagai Special Lecturer (Dosen Terbang) Bidang Food Technology pada Kyungpook National University, Gyungwon University dan University of Daegu, Korea (Tahun 2008) dan Yeungnam University & Kyungpook National University, Korea (2010). Juga sebagai Reviewer Nasional PKM DIKTI Tahun 2012 dan Pokja Ahli Badan Ketahanan Pangan Propinsi Jawa Timur (2009 s/d sekarang).

Penulis menikah dengan Idha Kurniawati tahun 1995 putri keempat dari Bpk. H.M. Nur Yasin Sugiono dan Hj. Mujiati yang berasal dari satu desa dengan penulis, dan telah dikaruniai 2 putra, yaitu: Zul Ilman Rafi' Ramadhan (SMA Kelas 2) dan Zul Fahmi Fadhlhan Fadhlillah (SD-5) serta 1 putri, yaitu Zul Alina Khansa Khairina (PAUD).