



STUDI HIDROLISIS PROTEIN IKAN LEMURU (*Sardinella sp.*)
OLEH *CRUDE* ENZIM PAPAIN DARI GETAH PEPAYA (*Carica papaya*)
BERDASARKAN VARIASI WAKTU INKUBASI

S K R I P S I

Diajukan Untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains
Jurusan Kimia Pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember



Oleh :

Yulia Tri Roesalita

981810301025

S

Asal	Hadiah	Klass
	Pembelian	541.393
Terima	Tgl. 15 JUL 2003	TRI
No. Induk:	SRS	S

@.1

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER

JUNI 2003

MOTTO

*“Tetapi carilah dahulu Kerajaan Allah dan kebenarannya,
maka semuanya itu akan ditambahkan kepadamu “*

(Matius 6 : 33)

*“Hati yang gembira adalah obat yang manjur,
tetapi semangat yang patah mengeringkan tulang”*

(Amsal 17 : 22)

*“Akulah pokok anggur dan kamulah ranting-rantingnya.
Barangsiapa tinggal di dalam Aku dan Aku di dalam dia, ia berbuah banyak,
sebab di luar Aku kamu tidak dapat berbuat apa-apa “*

(Yohanes 15 : 5)

*“Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga,
tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah
dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur “*

(Filipi 4 : 6)

PERSEMBAHAN

Dengan segala cinta kupersembahkan skripsi ini teruntuk:

Papi dan Mami yang selalu berdoa, memberikan dorongan semangat dan dukungan dalam setiap langkahku. Terima kasih atas segala pengorbanan baik material maupun spiritual yang telah kalian berikan

Kakak-kakakku tersayang M' Dewi dan M' Desi, serta adikku Willy yang setia membantu dan mendoakan

Rekan-rekan tim Protease (Dian, Prima, M' Yuni, M' Lutfi), rekan-rekan dilaboratorium biokimia dan organik (M' Nagib, Fia, M' Joe) kalian adalah yang terbaik yang pernah aku miliki dan terima kasih atas kebersamaan yang telah kita lewati

Sahabat-sahabat setiakku Tri, Nurul, Lia, Neny, Yanti yang telah memberikan banyak dorongan dan semangat

Rekan KTB-ku Dian yang selalu memberikan dorongan, bantuan, dan doa

Rekan-rekan PA. Jember M' Nunug, Cen-Cen, Nanda, Yopy, Diaz

Rekan-rekan chemist angkatan 98 yang selalu bersama dalam suka dan duka

Almamater tercinta

DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil kerja/penelitian pada bulan September 2002 sampai Pebruari 2003 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Bersama ini saya menyatakan bahwa isi skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi lain.

Jember, Juni 2003

Yulia Tri. R

ABSTRAK

“Studi Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*) Oleh Crude Enzim Papain dari Getah Pepaya (*Carica papaya*) Berdasarkan Variasi Waktu Inkubasi”, Yulia Tri Roesalita, 981810301025, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Studi hidrolisis protein ikan lemuru (*sardinella sp.*) oleh enzim papain dari getah pepaya (*Carica papaya*) berdasarkan variasi waktu inkubasi telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil hidrolisis enzim papain terhadap daging ikan lemuru berdasarkan variasi waktu inkubasi. Enzim papain diekstrak dari getah buah pepaya untuk selanjutnya difraksinasi dalam 3 tahap yaitu fraksi 0-40%, 40-80%, 80-100%, dan dilakukan uji aktivitas. Fraksi dengan aktivitas tertinggi diinkubasikan terhadap daging ikan lemuru segar berdasarkan variasi waktu 0, 3, 5, dan 7 hari. Hasil hidrolisis selanjutnya dianalisa dengan metode titrasi formol dan SDS-PAGE untuk mengetahui kandungan protein terlarut dan *band-band* pemotongan protein ikan oleh enzim. Dari hasil penelitian didapatkan rendemen tertinggi pada fraksi 40-80% yaitu 8,231 g, dan aktivitas tertinggi juga diperoleh pada fraksi 40-80% sebesar 1,098 unit. Semakin lama waktu inkubasi, maka hasil hidrolisis daging ikan lemuru semakin meningkat dan mencapai maksimum pada hari ke 5. Pada hari tersebut didapat protein terlarut sebesar 7,00%, dan penampakan *band* pada elektroforegram semakin tipis. Hal ini berarti berat molekul protein semakin kecil karena sudah terhidrolisis.

Kata kunci : enzim papain, ikan lemuru, SDS-PAGE

PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada :

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji :

Ketua

(Dosen Pembimbing Utama)

drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP. 131 459 744

Sekretaris

(Dosen Pembimbing Anggota)

A. A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si
NIP. 132 162 523

Anggota I

Drs. Busroni, M.Si
NIP. 131 945 805


Anggota II

Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc, Ph.D
NIP. 131 412 918

Mengesahkan,

Dekan F. MIPA UNEJ




(Sumadi, MS.)
NIP. 130 368 784

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa, karena berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul : **Studi Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*) oleh Crude Enzim Papain dari Getah Pepaya (*Carica papaya*) Berdasarkan Variasi Waktu Inkubasi**. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Sarjana Sains Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu sehingga tersusun karya tulis ini, terutama kepada :

1. Bapak Ir. Sumadi, MS. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
2. Ibu drh. Wuryanti Handayani M. Si. Selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
3. Ibu drh. Wuryanti Handayani M. Si. dan Ibu Anak Agung Istri Ratnadewi S.Si, M.Si, selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan bantuan dan pengarahan sejak penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Bapak Drs. Busroni M. Si dan Bapak Bambang Kuswandi. M. Si. Ph.D selaku Dosen Penguji yang telah memberikan petunjuk dan saran.
5. Bapak Ir. Neran M.Kes selaku Kepala Laboratorium Biokimia dan Bapak Bambang Sugiharto Ph.D selaku Kepala Laboratorium Biologi Molekuler beserta staff atas bantuan yang diberikan selama melakukan penelitian.
6. Pak Adi, Mas Darma, Mas Doel, dan Mas Budi yang telah banyak memberi bantuan dan kemudahan.

Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukannya.

Jember, Juni 2003

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN MOTTO.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
DEKLARASI	iv
ABSTRAK	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	2
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Protein	4
2.1.1 Pengertian Protein.....	4
2.1.2 Struktur Susunan Molekul Protein.....	4
2.1.3 Struktur Protein.....	5
2.1.4 Sifat Fisikokimia Protein	6
2.1.5 Denaturasi Protein.....	6

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN MOTTO.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
DEKLARASI	iv
ABSTRAK	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	2
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Protein	4
2.1.1 Pengertian Protein.....	4
2.1.2 Struktur Susunan Molekul Protein.....	4
2.1.3 Struktur Protein.....	5
2.1.4 Sifat Fisikokimia Protein	6
2.1.5 Denaturasi Protein.....	6

2.2	Ikan Lemuru	7
2.3	Enzim.....	10
	2.3.1 Pengertian Enzim	10
	2.3.2 Pemurnian Enzim	10
	2.3.3 Aktivitas Enzim.....	11
2.4	Enzim Papain.....	13
	2.4.1 Sumber Enzim Papain.....	13
	2.4.2 Sifat Enzim Papain.....	14
2.5	Hidrolisis Protein.....	16
2.6	Penentuan Kadar Protein Terlarut	20
2.7	Pemisahan Protein	21
III.	METODOLOGI.....	23
3.1	Tempat dan Waktu	23
3.2	Alat dan Bahan	23
	3.2.1 Alat.....	23
	3.2.2 Bahan	23
3.3	Diagram Alir Penelitian.....	23
3.4	Prosedur Penelitian.....	25
	3.4.1 Penyadapan Getah Pepaya	25
	3.4.2 Ekstraksi <i>Crude</i> Enzim Papain dari Getah Pepaya	25
	3.4.3 Penentuan Unit Aktivitas <i>Crude</i> Enzim Papain.....	26
	3.4.4 Inkubasi Ikan Lemuru dengan Metode Enzimatik.....	27
	3.4.5 Penentuan Protein Terlarut dengan Metode Titration Formol	28
	3.4.6 Penentuan <i>Band-Band</i> Protein Ikan Lemuru dengan Metode Elektroforegram	28
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1	Ekstrak <i>Crude</i> Enzim Papain dari Getah Pepaya	30
4.2	Aktivitas <i>Crude</i> Enzim Papain	32

4.3	Protein Ikan Lemuru Terhidrolisis	34
4.4	Pengaruh Variasi Lama Inkubasi Terhadap Kandungan Protein Terlarut Ikan Lemuru Terhidrolisis	35
4.5	Pengaruh Variasi Lama Inkubasi Terhadap Elektroforegram Pita-Pita Protein Ikan Lemuru.....	37
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1	Kesimpulan.....	41
5.2	Saran	41
	DAFTAR PUSTAKA	43
	LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komposisi Kimia Ikan Lemuru Tiap 100 g.....	8
Tabel 2. Komposisi Asam Amino Protein Ikan.....	9
Tabel 3. Komposisi Asam Amino Papain.....	15
Tabel 4. Rendemen <i>Crude</i> Enzim Papain Dari Getah Pepaya Dalam 50 mL Larutan.....	30
Tabel 5. Aktivitas <i>Crude</i> Enzim Papain Dari Getah Pepaya Dalam 50 mL Larutan.....	32
Tabel 6. % Nitrogen dan % Protein Terlarut Dalam 100 g Ikan.....	35
Tabel 7. Jarak <i>Band-Band</i> Sub Unit Protein Hasil Hidrolisis.....	39
Tabel 8. Data Absorbansi Dan Penentuan Aktivitas <i>Crude</i> Enzim Papain.....	49
Tabel 9. Data Volume NaOH Dan Penentuan % Protein Terlarut.....	52
Tabel 10. Data Standart Deviasi dari Nilai Absorbansi Penentuan Aktivitas Enzim.....	56
Tabel 11. Teknik Pengendapan Oleh Ammonium Sulfat.....	58

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur Kutub Ganda Aasam Amino Dalam Air	16
Gambar 2. Mekanisme Reaksi Hidrolisis Enzim Sulfidril Terhadap Polipeptida	17
Gambar 3. Mekanisme Reaksi Protein Dengan Formaldehid	20
Gambar 4. Diagram Alir Penelitian	23
Gambar 5. Elektroforegram Sub Unit Protein Ikan Lemuru Terhadap Variasi Waktu Inkubasi	38
Gambar 6. Elektroforegram Waktu Inkubasi 0 Hari	54
Gambar 7. Elektroforegram Waktu Inkubasi 3 Hari	54
Gambar 8. Elektroforegram Waktu Inkubasi 5 Hari	55
Gambar 9. Elektroforegram Waktu Inkubasi 7 Hari	55

DAFTAR GRAFIK

	Halaman
Grafik 1. Kurva Hubungan Persen Protein Terlarut Terhadap Variasi Waktu Inkubasi.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Preparasi Larutan	46
Lampiran 2. Data Absorbansi Dalam Penentuan Aktivitas <i>Crude</i> Enzim Papain	49
Lampiran 3. Perhitungan Aktivitas Enzim Papain	51
Lampiran 4. Data Volume NaOH Dalam Penentuan % Protein Terlarut Ikan Lemuru Hasil Hidrolisis.....	52
Lampiran 5. Perhitungan % Protein Terlarut	53
Lampiran 6. Daftar Gambar Elektroforegram	54
Lampiran 7. Standart Deviasi Data Absorbansi Penentuan Aktivitas Enzim.....	56
Lampiran 8. Perhitungan Standart Deviasi Data Absorbansi Penentuan Aktivitas Enzim.....	57
Lampiran 9. Konsentrasi Akhir Ammonium Sulfat: Penjenuhan Pada 0°C	58

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

cm	= sentimeter
mL	= mili Liter
μ L	= mikro Liter
kDa	= kilo Dalton
SDS-PAGE	= Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamid Gel Elektroforesis
SDS	= Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	= N, N, N', N'-tetrametilene diamine
CBB	= Coomasie Brilliant Blue
APS	= Ammonium Persulfate
Crude	= Ekstrak Kasar
Stacking gel	= Gel Atas
Separating gel	= Gel Bawah



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia sangat kaya akan sumber daya tanaman hortikultura, termasuk aneka jenis tanaman buah-buahan. Salah satu jenis buah asal luar negeri yang telah lama berkembang dan ditanam di wilayah nusantara adalah pepaya. Tanaman pepaya memiliki daya dan hasil guna bagi kehidupan manusia. Tanaman ini layak disebut "multi guna", dimana dari akar, daun, batang, bunga, buah, biji, dan getahnya dapat dimanfaatkan (Rukmana, 1995).

Getah pepaya mengandung enzim papain dan mempunyai kemampuan untuk melunakkan daging, menghaluskan kulit pada industri penyamakan kulit, bahan baku industri farmasi, dan bahan kecantikan (kosmetik). Papain merupakan enzim ekstraseluler komersial yang mempunyai nilai ekonomi tinggi dan paling banyak diproduksi. Menurut Biro Statistik, bahwa pada tahun 1992 import enzim di Indonesia berjumlah lebih dari 41 juta ton dengan nilai sekitar 68 juta dolar Amerika. Jumlah import protease sendiri mencapai sekitar 16 juta ton atau setara dengan kurang lebih 48 milyar rupiah. Apabila Indonesia mampu memenuhi kebutuhan protease maka devisa negara akan dapat dihemat (Jenie, 1994).

Penggunaan enzim papain ini, salah satunya seperti yang telah disebutkan diatas adalah untuk melunakkan daging, artinya papain dapat memecah molekul protein dengan cara menghidrolisa ikatan peptida menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Salah satu aplikasinya dapat dicobakan pada daging ikan, mengingat hasil perikanan merupakan salah satu sumber daya alam potensial dan protein yang dikandung cukup tinggi.

Ikan lemuru merupakan salah satu hasil perikanan, dimana ikan ini kurang diminati masyarakat karena mudah busuk, cepat tengik dan bersisik banyak, sehingga daya jualnya pun rendah. Penanggulangan masalah ini dapat dilakukan dengan pengolahan lebih lanjut menjadi kecap ikan melalui bantuan protease (enzim papain). Diharapkan setelah pengolahan kecap dengan bantuan protease tersebut kandungan proteinnya semakin mudah dicerna oleh tubuh, sehingga daya jualnya di pasaran semakin meningkat.

Protein ikan yang telah dihidrolisis oleh enzim akan terpotong menjadi protein yang lebih sederhana dan mudah larut. Semakin lama waktu kontak antara enzim dengan substrat maka daya kerja enzim untuk mengkatalisis menjadi lebih lama, sehingga menyebabkan protein akan terpotong menjadi lebih kecil. Analisa protein terlarut dapat dilakukan dengan titrasi formol, dan untuk mengetahui sub unit protein hasil hidrolisis dapat menggunakan metode elektroforesis.

Berdasarkan uraian di atas maka penulis mengambil penelitian yang berjudul : " Studi Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*) oleh *Crude* Enzim Papain dari Getah Pepaya (*Carica papaya*) Berdasarkan Waktu Inkubasi ".

1.2 Rumusan masalah

1. bagaimanakah cara ekstraksi *crude* enzim papain dari getah pepaya ?
2. bagaimanakah aktivitas *crude* enzim papain dari getah pepaya terhadap substrat kasein?
3. bagaimanakah pengaruh waktu inkubasi terhadap hidrolisis protein ikan lemuru oleh *crude* enzim papain?

1.3. Batasan masalah

1. protein ikan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daging ikan lemuru segar (*Sardinella sp.*) dari tempat pelelangan ikan Puger Jember.
2. getah pepaya yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari buah pepaya varietas sunrise berumur 2-3 bulan dari kebun petani di Kelurahan Nangkaan Kabupaten Bondowoso.

1.4 Tujuan penelitian

1. mempelajari ekstraksi *crude* enzim papain dari getah pepaya.
2. menentukan aktivitas *crude* enzim papain dari getah pepaya terhadap substrat kasein.
3. mempelajari pengaruh waktu inkubasi terhadap hidrolisis protein ikan lemuru oleh *crude* enzim papain.

1.5 Manfaat penelitian

1. mengetahui ekstraksi *crude* enzim papain dari getah pepaya.
2. meningkatkan nilai jual ikan lemuru melalui penanganan lebih lanjut menjadi kecap ikan.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein

2.1.1 Pengertian Protein

Protein merupakan makromolekul yang paling melimpah di dalam sel. Struktur protein terdiri dari polipeptida yang mempunyai rantai amat panjang (Lehninger, 1990). Protein tersusun dari sejumlah asam amino yang saling berikatan satu sama lain. Ikatan antara asam amino yang satu dengan gugus karbonil dari asam amino yang lain dengan mengeluarkan satu molekul air, ikatan ini disebut ikatan peptida (Anglemier dan Montgomery, 1986 dalam Handani, 1991). Dipeptida masih mempunyai gugus amino (NH_2) dan karboksil (COOH) bebas, sehingga akan bereaksi dengan dipeptida-dipeptida lainnya menjadi polipeptida yang membentuk molekul protein (Winarno, 1992).

2.1.2 Struktur Susunan Molekul Protein

Menurut Winarno (1992) berdasarkan struktur susunan molekulnya protein dapat diklasifikasikan :

- a. Protein fibriler; protein ini berbentuk serabut, tidak larut dalam pelarut-pelarut encer, baik larutan garam, asam basa ataupun alkohol. Susunan molekulnya terdiri dari rantai molekul yang panjang sejajar dengan rantai utama, tidak berbentuk kristal dan bila rantai ditarik memanjang dapat kembali pada keadaan semula. Kegunaan protein ini terutama hanya untuk membentuk struktur bahan dan jaringan. Kadang-kadang protein ini disebut albuminoid dan sklerin. Contoh protein fibriler adalah kolagen yang terdapat pada tulang rawan, miosin pada otot, keratin pada rambut dan fibrin pada gumpalan darah.
- b. Protein globuler; protein ini berbentuk bola, banyak terdapat dalam bahan pangan seperti susu, telur dan daging. Protein ini larut dalam larutan garam dan asam encer, juga lebih mudah berubah di bawah pengaruh suhu, konsentrasi garam, pelarut asam dan basa dibandingkan protein fibriler. Protein ini mudah terdenaturasi yaitu susunan molekulnya berubah yang diikuti dengan perubahan sifat fisik dan fisiologinya seperti yang dialami oleh enzim dan hormon.

2.1.3 Struktur Protein

Menurut Winarno (1992) struktur protein dibagi menjadi beberapa bentuk yaitu :

1. Struktur primer.

Struktur ini merupakan rangkaian unit asam amino yang menentukan sifat dasar dari berbagai protein, dan secara umum menentukan bentuk struktur sekunder dan tersier. Bila protein mengandung banyak asam amino dengan gugus hidrofobik, daya kelarutannya dalam air kurang baik dibandingkan dengan protein yang banyak mengandung asam amino dengan gugus hidrofil.

2. Struktur sekunder.

Dalam kenyataannya struktur protein biasanya merupakan polipeptida yang terlipat-lipat, merupakan bentuk tiga dimensi dengan cabang-cabang rantai polipeptidanya tersusun saling berdekatan, yang biasanya disebut struktur sekunder.

3. Struktur tersier.

Bentuk penyusunan bagian terbesar rantai cabang disebut struktur tersier. Artinya adalah susunan dari struktur sekunder yang satu dengan struktur sekunder bentuk lain. Biasanya bentuk-bentuk sekunder ini dihubungkan dengan ikatan hidrogen, ikatan garam, interaksi hidrofobik dan ikatan disulfida. Ikatan disulfida merupakan ikatan yang terkuat dalam mempertahankan struktur tersier protein. Ikatan hidrofobik terjadi antara ikatan-ikatan nonpolar molekul-molekul, sedang ikatan-ikatan garam ternyata tidak begitu penting perannya terhadap struktur tersier molekul. Ikatan garam mempunyai kecenderungan bereaksi dengan ion-ion lain disekitar molekul.

4. Struktur kuaterner.

Struktur primer, sekunder dan tersier umumnya hanya melibatkan satu rantai polipeptida. Tetapi bila struktur ini melibatkan beberapa polipeptida dalam membentuk suatu protein, maka disebut struktur kuaterner. Pada umumnya ikatan-ikatan yang terjadi sampai terbentuknya protein sama dengan ikatan-ikatan yang terjadi pada struktur tersier.

2.1.4 Sifat Fisikokimia Protein

Sifat fisikokimia setiap protein tidak sama, tergantung pada jumlah dan jenis asam aminonya. Ada protein yang larut dalam air, ada pula yang tidak larut dalam air, tetapi semua protein tidak larut dalam pelarut lemak, misalnya etil eter. Bila dalam suatu larutan protein ditambahkan garam, daya larut protein akan berkurang, akibatnya protein akan terpisah sebagai endapan. Pemisahan protein ini disebut *salting out* (Winarno, 1992).

Apabila protein dipanaskan atau ditambah alkohol, maka protein akan menggumpal. Hal ini disebabkan alkohol menarik mantel air yang melingkupi molekul-molekul protein, selain itu penggumpalan juga terjadi karena aktivitas enzim-enzim proteolitik (Winarno, 1992).

Protein dapat bersifat amfoter (dapat bereaksi dengan asam ataupun basa). Hal ini disebabkan protein mempunyai banyak muatan, karena mempunyai gugus amino dan karboksil pada ujung-ujung rantai molekul protein. Tiap-tiap molekul protein mempunyai daya reaksi dengan asam dan basa yang berbeda, tergantung pada letak dan jumlah gugus amino dan karboksil dalam molekul protein tersebut. Dalam larutan asam (pH rendah), molekul protein akan bermuatan positif dan bila dilakukan elektrolisa maka molekul protein akan bergerak ke arah elektroda negatif (katoda). Sebaliknya bila dalam larutan basa (pH tinggi) molekul protein akan bermuatan negatif dan akan menuju ke elektroda positif (anoda) (Winarno, 1992). Pada pH tertentu muatan gugus amino dan karboksil bebas akan saling menetralkan sehingga molekul protein akan tidak bermuatan (netral). Pada pH ini disebut pH titik isoelektris (Anglemier dan Montgomery, 1976 dalam Handani, 1991).

2.1.5 Denaturasi Protein

Denaturasi protein dapat dilakukan dengan cara fisik dan kimiawi. Secara fisik dapat dilakukan dengan pemanasan atau menggunakan sinar ultraviolet. Sedang cara kimiawi dapat dilakukan dengan penambahan bahan kimia (Anglemier dan Montgomery, 1976 dalam Handani, 1991).

Bila susunan ruang atau rantai polipeptida suatu molekul protein berubah, maka dikatakan protein ini terdenaturasi. Jika ikatan yang membentuk konfigurasi molekul tersebut rusak, maka molekul akan mengembang (Winarno, 1992).

Ada 2 macam denaturasi yaitu pengembangan rantai peptida dan pemecahan protein menjadi unit yang lebih kecil tanpa disertai pengembangan molekul. Yang pertama terjadi pada rantai polipeptida, sedang yang kedua terjadi pada bagian-bagian molekul yang tergabung dalam ikatan sekunder. Ikatan-ikatan yang dipengaruhi oleh proses denaturasi ini adalah ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, ikatan ionik dan ikatan intramolekuler (Winarno, 1992).

Pemekaran atau pengembangan molekul protein yang terdenaturasi akan membuka gugus reaktif yang ada pada rantai polipeptida. Selanjutnya akan terjadi pengikatan kembali pada gugus reaktif yang sama atau berdekatan. Bila unit ikatan yang terbentuk cukup banyak sehingga protein tidak lagi terdispersi sebagai suatu koloid, maka protein tersebut mengalami koagulasi. Apabila ikatan-ikatan antara gugus-gugus reaktif protein tersebut menahan seluruh cairan, akan terbentuk gel. Sedangkan bila cairan terpisah dari protein yang terkoagulasi itu, protein akan mengendap (Winarno, 1992).

Protein yang terdenaturasi berkurang kelarutannya. Lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik berbalik keluar, sedangkan bagian luar yang bersifat hidrofil terlipat kedalam. Pelipatan atau pembalikan terjadi khususnya bila larutan protein telah mendekati pH isoelektris dan akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap (Winarno, 1992).

Molekul protein akan mengendap (koagulasi) oleh karena denaturasi, akan tetapi denaturasi belum tentu mengakibatkan koagulasi. Bisa saja hanya menyebabkan flokulasi, yaitu proteinnya mengendap tetapi dapat kembali pada keadaan semula (Nur, dkk, 1983 dalam Handani, 1991).

2.2 Ikan lemuru (*Sardinella sp*).

Ikan lemuru banyak diproduksi di perairan laut Jawa, namun nilai ekonomis yang dapat diperoleh dari hasil penjualan ikan lemuru relatif rendah. Hal ini disebabkan ikan lemuru mudah busuk, cepat tengik, dan bersisik banyak

sehingga tidak banyak disukai untuk dikonsumsi dalam bentuk segar. Ciri-ciri ikan lemuru adalah bentuk badan panjang, sisik halus, keping tutup insang bawah menyudut dan tutup insang antara berbentuk setengah lingkaran. Dibagian bahu ada noda kuning kehijauan, warna badan keperakan sedang punggungnya gelap. Sirip-siripnya berwarna kekuningan dan sirip ekor kehitam-hitaman. Sedangkan panjang ikan dewasa rata-rata 15 cm.

Sistematika ikan lemuru menurut Blecker dalam Bahri (1990) adalah :

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Kelas	: Fisches
Subkelas	: Telestoi
Ordo	: Malacoptergie
Subordo	: Clupeidae
Family	: Clupeidae
Genus	: Sardinella
Species	: <i>Sardinella longiceps</i> .

Komposisi ikan lemuru sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis kelamin, spesies, umur dan habitatnya (Peterson dalam Santoso, 1997). Komposisi ikan lemuru tiap 100 g dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia lemuru tiap 100 gram.

Komponen	Jumlah
Air (gram)	76
Protein (gram)	20
Lemak (gram)	3
Karbohidrat (gram)	0
Ca ²⁺ (mgram)	20
Fosfor (mgram)	100
Fe (mgram)	1
Vitamin A (SI)	100
Vitamin B1 (mgram)	0.05

Sumber : Anonymous, 1981 dalam Prasetyo, 1990

Kandungan protein produk ikan satu setengah kali lebih tinggi daripada hewan pedaging lainnya. Ada dua keunggulan dari protein ikan yaitu mengandung jaringan ikat sedikit dan komposisi asam amino yang lengkap (Syarief dan Irawati dalam Hardani, 1991). Protein kompleks di dalam jaringan ikan lemuru dapat terhidrolisis dengan enzim protease menjadi senyawa yang lebih sederhana (asam amino). Komposisi asam amino protein ikan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Asam Amino dari Protein Ikan Lemuru

Asam amino	Jumlah dari total protein ikan (%)
Arginin	0,2
Histidin	2,5
Isoleusin	8,5
Lisin	9
Metionin	3,7
Sistein	1,0
Fenilalanin	4,7
Tirosin	5,9
Trionin	5,1
Triptofan	1,5
Valin	7,1

Sumber : Parakkasi, 1980

Berdasarkan kelarutannya pada pelarut-pelarut tertentu, protein pada jaringan ikan dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu miogen, miofibril dan stroma. Protein miogen pada jaringan ikan lemuru dalam jumlah banyak, sekitar 20-30% dari total protein ikan, bersifat larut dalam air dan larutan garam lemah yang mempunyai kekuatan ion kurang dari 0,5. Protein miofibril berkisar antara 65-75% dari total protein, bersifat larut dalam garam yang mempunyai kekuatan ion lebih dari 0,5, berbentuk serabut halus terdiri atas miosin, aktin, tropomiosin, dan aktionin. Protein stroma jumlahnya 10% dari total protein ikan; bersifat tidak larut dalam air, asam atau basa, serta larutan garam netral; merupakan kelompok protein yang terdapat pada jaringan pengikat yang terdiri atas kalogen dan elastin (Nurwanto dalam Bahri, 1990).

2.3 Enzim

2.3.1 Pengertian Enzim

Enzim adalah protein yang mempunyai aktivitas katalitik. Aktivitas katalitik enzim bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein, artinya struktur primer, sekunder, dan tersier protein enzim sangat mempengaruhi aktivitas katalitiknya. Enzim merupakan gabungan antara protein murni atau protein dengan gugusan-gugusan kimiawi lainnya, dimana molekul protein enzim mempunyai BM kurang lebih 10.000 – 1 juta (Lehninger, 1990).

Enzim mempunyai struktur tiga dimensi tertentu yang mampu mengkatalis reaksi biologik (aktivitas biokatalitik). Enzim menaikkan laju reaksi, karena adanya enzim maka reaksi yang terjadi akan mempunyai energi aktivasi lebih rendah dari reaksi biasanya (Arbianto, 1996). Berdasarkan reaksi yang dikatalisis enzim digolongkan dalam 6 kelas yaitu oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase (Lehninger, 1990).

2.3.2 Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim memiliki beberapa tahap mulai dari pemilihan sumber enzim sampai memperoleh enzim yang belum 100 % murni. Metode pemurnian meliputi pemecahan sel, fraksinasi, dialisis, kromatografi kolom dan lain-lain. Pemecahan sel menggunakan blender dan disentrifusi untuk memisahkan bahan-bahan yang tidak larut seperti dinding sel yang diharapkan supernatan banyak. Pengekstraksi yang digunakan biasanya buffer fosfat 0,1 M – 0,5 M pada pH 7,5 untuk melindungi enzim dari asam yang dikeluarkan oleh vakuola. Fraksinasi merupakan tahap awal pemurnian yang didasarkan pada peristiwa *salting out*. Menurut Matthew, 1998 bahwa daya larut protein sangat dipengaruhi oleh konsentrasi garam dalam larutan; dimana untuk menjelaskan konsentrasi garam dalam larutan dengan kekuatan ionik garam. Pada kuat ionik garam yang tinggi, maka kelarutan protein dalam pelarut akan turun, karena penurunan aktivitas pelarut akibat interaksi antar protein lebih tinggi daripada interaksi protein dengan pelarut sehingga protein akan mengendap. Peristiwa tersebut dikenal *salting out*.



Secara umum pengendapan protein menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ karena memiliki daya larut tinggi menghasilkan kuat ionik yang tinggi. Penambahan ammonium sulfat menyebabkan interaksi air dengan ion garam sehingga menurunkan jumlah air dalam larutan. Pengendapan protein berdasarkan perbedaan hidrofobitas protein, protein yang lebih bersifat hidrofob maka konsentrasi garam yang diperlukan lebih rendah daripada protein yang bersifat hidrofil. Protein yang bersifat hidrofob berada di bagian dalam struktur protein dan protein yang bersifat hidrofil berada di bagian luar struktur protein. Menurut Lehninger, 1990 bahwa sifat protein berdasarkan letaknya ada tiga yaitu

1. **Hidrofobik** terletak di bagian dalam struktur protein, meliputi aspartat, glutamat, asparagin, glutamin, lisin, arginin dan histidin.
2. **Hidrofilik** terletak di bagian luar struktur protein, meliputi fenilalanin, leusin, isoleusin, metionin, valin, triptofan.
3. **Polaritas antara** terletak di bagian dalam atau di bagian luar struktur protein, meliputi prolin, treonin, serin, sistein, alanin, glisin, tirosin.

2.3.3 Aktivitas Enzim

Aktivitas suatu enzim dinyatakan sebagai kemampuan enzim tersebut dalam mengubah substrat menjadi suatu produk per satuan waktu (Whitaker dalam Praptiningsih, 1989). Satuan yang biasa digunakan adalah **unit**, **katal** dan **aktivitas spesifik**. Satu **unit** aktivitas enzim dapat diartikan jumlah yang menyebabkan perubahan $1,0 \mu\text{mol}$ substrat menjadi produk per menit pada keadaan pH, suhu, dan konsentrasi enzim yang optimal. Satu **katal** aktivitas enzim menunjukkan perubahan $1,0 \text{ mol}$ substrat menjadi produk dalam 1 detik. Jadi 1 unit sama dengan $1/60 \mu\text{katal}$ atau $0,0167 \mu\text{katal}$. Sedangkan **aktivitas spesifik** adalah jumlah unit/katal enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim. Semakin murni suatu enzim maka aktivitasnya akan semakin besar (Lehninger, 1990).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain konsentrasi enzim, waktu inkubasi, konsentrasi ion Hidrogen (H^+), kadar air dan temperatur.

1. Konsentrasi enzim mempengaruhi kecepatan reaksi, pada batas konsentrasi tertentu kenaikan konsentrasi tidak dapat menaikkan kecepatan reaksi. Dalam hal ini berarti penambahan enzim yang berlebihan tidak mempengaruhi kecepatan reaksi. Pada konsentrasi enzim yang rendah, tidak semua substrat diikat oleh enzim, sehingga banyaknya substrat yang diubah persatuan waktu menurun. Jika konsentrasi enzim dinaikkan, semakin banyak substrat yang terikat sehingga kecepatan reaksi bertambah. Hal ini berlangsung sampai mencapai tingkat kecepatan reaksi maksimum dan ini berarti semua enzim mengikat substrat atau semua enzim telah jenuh. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan produk (Martoharsono, 1982).
2. Waktu inkubasi tergantung pada kecepatan reaksi dan kecepatan reaksi dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dengan faktor-faktor yang mempengaruhi adalah kemampuan aktivitas enzim, lingkungan terjadinya reaksi dan konsentrasi substrat. Waktu yang lama akan menyebabkan daya kerja enzim untuk mengkatalisis lebih lama sehingga hasil katalis tergantung pada konsentrasi substrat yang ada (Indrawati, 1983).
3. Konsentrasi ion Hidrogen (H^+) mempengaruhi aktivitas yang optimal dari suatu jenis enzim. Aktivitas optimal dari enzim pada kisaran pH optimal spesifik untuk jenis enzim tertentu, dimana aktivitas optimal enzim papain pada pH 7. Apabila pH yang digunakan terlalu tinggi atau rendah akan terjadi perubahan yang disebut denaturasi protein (Zubaidi, 1998).
4. Kadar air mempengaruhi aktivitas enzim dengan meningkatkan kecepatan reaksi antara enzim dan substrat. Enzim papain sebagai enzim proteolitik sesuai sifat reaksi katalitiknya termasuk golongan enzim hidrolase yaitu enzim yang mampu memutuskan ikatan antar senyawa substrat dengan bantuan air (Winarno, 1995).

5. Temperatur lingkungan terhadapnya reaksi mempunyai pengaruh yang sangat kompleks terhadap enzim. Pada jenis enzim tertentu, memerlukan tingkat temperatur yang spesifik untuk mencapai kemampuan aktivitas optimal dengan cara tersebut. Menurut Winarno (1992) bahwa semakin tinggi temperatur, semakin naik kecepatan reaksi. Tetapi semakin tinggi temperatur selama proses, maka inaktivasi enzim meningkat juga.

2.4 Enzim Papain

2.4.1 Sumber Enzim Papain

Papain adalah suatu enzim pemecah protein, yang terdapat dalam getah pepaya, baik yang berada di daun, batang maupun buah. Tanaman pepaya telah lama berkembang dan ditanam di Indonesia. Menurut Rukmana, 1995 tanaman pepaya memiliki taksonomi sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisi	: Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
Sub divisi	: Angiosperma (biji berkeping dua)
Kelas	: Dicotyledonae (biji berkeping dua)
Ordo	: Caricales
Famili	: Caricaceae
Spesies	: <i>Carica papaya L</i>

Pada dasarnya pepaya digolongkan menjadi 2 jenis yaitu :

1. Pepaya semangka yang memiliki ciri-ciri daging buah tebal, berwarna merah dan citarasanya manis.
2. Pepaya burung yang memiliki ciri-ciri daging buah berwarna kuning, harum dan citaranya manis.

Di luar negeri pengembangan pepaya diarahkan untuk memproduksi getahnya yang disebut papain. Hampir seluruh bagian tanaman pepaya mengandung papain, dan cara mendapatkan getah adalah melalui penyadapan dengan melukai buah pepaya sehingga getah yang diinginkan menetes keluar untuk selanjutnya ditampung. Biasanya alat penyadap dibuat dari kaca atau tulang.

Menurut Maggy, 1992 bahwa hasil penyadapan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

1. Umur buah. Hal ini disebabkan oleh perubahan sifat fisiologi dan morfologis yang terjadi selama proses perkembangan buah, dari bunga hingga menjadi buah. Buah yang masih muda akan menghasilkan getah yang banyak, namun penyadapan terhadap buah yang terlalu muda tidak dilakukan karena luka goresannya sulit disembunyikan sehingga buah akan cepat busuk. Sebaliknya pepaya yang tua akan menghasilkan getah yang sedikit dengan aktivitas proteolitik yang rendah. Untuk mendapatkan hasil yang terbaik dapat dilakukan penyadapan pada saat buah berumur sekitar 2-3 bulan.
2. Waktu/masa penyadapan. Hal ini erat kaitannya dengan keadaan lingkungan, dimana suhu udara yang tinggi akan menyebabkan pohon pepaya banyak mengalami proses transpirasi sehingga memberikan produk getah dalam jumlah dan kualitas yang menurun. Penyadapan sebaiknya dilakukan pada pagi hari, yaitu antara pukul 05.00-08.00 WIB. Baiknya dalam 1 buah hanya ada 4-5 torehan dengan jarak sekitar 4 cm. Selang waktu yang tepat sekitar 3-4 hari sekali dan penyadapan dilakukan sebanyak kira-kira 7 kali/buah. Dengan demikian pada saat pemanenan buah akan terlihat baik dan tetap laku di pasaran.

2.4.2 Sifat Enzim Papain

Enzim papain bersifat proteolitik artinya enzim yang dapat memotong protein. Getah pepaya mengandung sedikitnya tiga jenis enzim yaitu enzim papain (10 %), Khimopapain (45 %), dan lisozim (20 %). Enzim papain tergolong protease sulfhidril. Secara umum yang dimaksud dengan papain adalah papain yang telah dimurnikan ataupun yang masih kasar. Sifat daya enzimatik papain kasar ini menjadi lebih tinggi karena mengandung tiga macam enzim tersebut (Maggy, 1992).

Enzim papain tergolong dalam kelas hidrolase dan bersifat endoprotease yaitu menguraikan ikatan peptida pada bagian dalam rantai protein, sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida (Winarno, 1992). Sebagai enzim hidrolase, dalam menghidrolisis ikatan perlu penambahan air (Colby, -1985).

Menurut Maggy, 1992 bahwa papain termasuk golongan protease sulfhidril karena mempunyai gugus aktif-SH. Nama papain digunakan baik untuk getah kering maupun enzim proteolitik yang dikristalkan. Papain murni biasanya berbentuk kristal kasar, amorf merupakan granula, berwarna putih sampai coklat muda, ada yang putih keabuan dan bersifat agak higroskopis. Papain hasil pemurnian, mudah larut dalam air, gliserin dan larutan alkoholik berair yang berkonsentrasi rendah, tetapi tidak larut dalam alkohol, kloroform dan eter. pH optimum kerja papain berkisar dari 6,0 sampai 8,0. Pada pH 2 sampai 10 papain masih bersifat stabil. Pada suhu 5 – 60°C keaktifan papain dapat dipertahankan. Papain relatif tahan terhadap suhu tinggi, kecuali jika pemanasan dilakukan pada pH di bawah 4. Dengan jumlah 212 asam amino, berat molekul papain mencapai 21 kd. Komposisi asam amino papain dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Asam Amino Papain

Asam Amino	Jumlah	% Relatif
Lisin	10	4,8
Histidin	2	0,97
Arginin	12	5,86
Aspartat	6	2,98
Asparagin	13	6,34
Glutamat	8	3,88
Glutamin	12	5,86
Trenin	8	3,88
Serin	13	6,34
Prolin	10	4,88
Glisin	28	13,58
Alanin	14	6,58
Valin	18	8,94
Isoleusin	12	5,86
Leusin	11	5,36
Tirosin	12	5,86
Fenilalanin	4	1,93
Triptofan	5	2,44
Sistein	1	0,48
Sistin	6	2,93

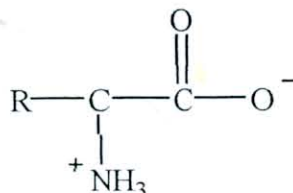
Semua jenis asam amino ikut menyusun struktur papain, kecuali metionin. Bagian penting dalam rantai polipeptida papain adalah asam amino sistein-25 dan histidin-159 yang merupakan bagian utama dalam proses katalisis. Aktivasinya ditentukan oleh 2 gugus -sulfhidril bebas dari semua 6 gugus sulfhidril yang dimiliki (Maggy, 1992).

Struktur primer papain menurut Suhartono, 1992 adalah sebagai berikut :

NH₂ - Ile - Pro - Glu - Tyr - Val - Asp - Trp - Arg - Gln - Lys - Gly - Ala - Val - Trh - Pro - Val - Lys - Asn - Gln - Gly - Ser - Cys - Gly - Ser - Cys - Trp - Ala - Phe - Ser - Ala - Val - Val - Thr - Ile - Glu - Gly - Ile - Ile - Lys - Ile - Arg - Thr - Gly - Asn - Leu - Asn - Gln - Try - Ser - Glu - Glu - Glu - Leu - Leu - Asp - Asp - Arg - Arg - Ser - Tyr - Gly - Cys - Asn - Gly - Gly - Tyr - Pro - Trp - Ser - Ala - Leu - Gln - Leu - Val - Ala - Gln - Tyr - Gly - Ile - His - Tyr - Arg - Asn - Thr - Pro - Tyr - Tyr - Glu - Gly - Val - Gln - Arg - Tyr - Cys - Arg - Ser - Arg - Glu - Lys - Gly - Pro - Tyr - Ala - Ala - Lys - Tyr - Asp - Gyl - Val - Arg - Gln - Val - Gln - Pro - Tyr - Ans - Gln - Gly - Gly - Ala - Leu - Leu - Tyr - Ser - Ile - Ala - Asn - Gln - Pro - Val - Ser - Val - Val - Leu - Gln - Ala - Ala - Gly - Lys - Asp - Phe - Gln - Leu - Tyr - Arg - Gly - Gly - Ile - Phe - Val - Gly - Pro - Cys - Gly - Asn - Lys - Val - Asp - His - Ala - Val - Ala - Ala - Val - Gly - Tyr - Asn - Pro - Gly - Try - Leu - Ile - Lys - Asn - Ser - Trp - Gly - Thr - Gly - Trp - Gly - Glu - Asn - Gly - Tyr - Ile - Arg - Ile - Lys - Arg - Gly - Thr - Gly - Asn - Ser - Tyr - Gly - Val - Cys - Gly - Leu - Tyr - Thr - Ser - Ser - Phe - Tyr - Pro - Val - Lys - Asp - COOH

2.5 Hidrolisis Protein

Asam – asam amino yang letaknya berjauhan dapat terletak berdekatan dalam struktur protein, karena terbentuknya struktur sekunder, tersier, dan kwarterner (bila letaknya lebih dari satu rantai polipeptida). Dalam air menampakkan struktur kutub ganda sebagai berikut:



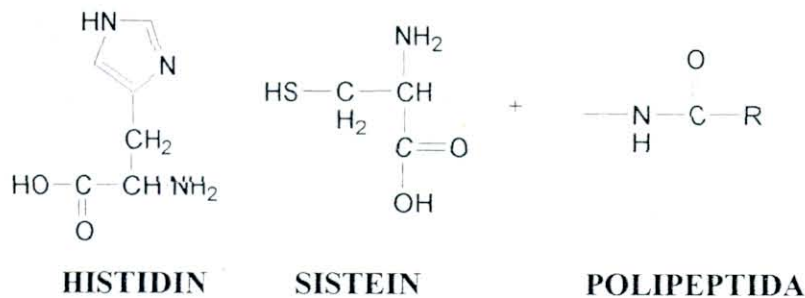
Gambar 1. Struktur Kutub Ganda Asam Amino dalam Air (Martoharsono, 1994).

Hidrolisis terjadi juga pada saat adanya penambahan alkali pada protein sehingga dapat menyebabkan ikatan peptida pada polimer protein terhidrolisis, sehingga menghasilkan monomer – monomer asam amino dan ada sebagian gugus amino yang berubah menjadi amonia. Akibat hidrolisis tersebut jumlah gugus amino berkurang (Achmad, 1994).

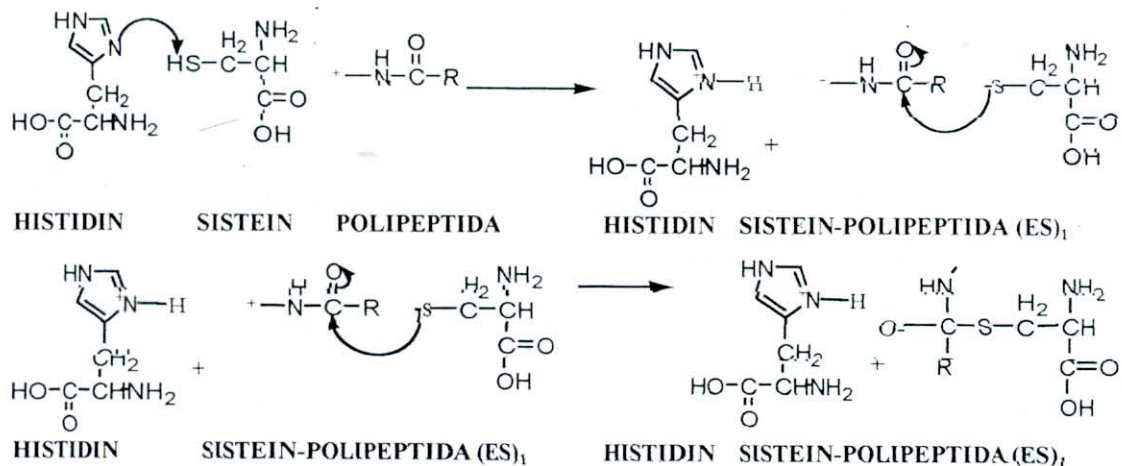
Menurut Matthew and Van Holde (1990) bahwa mekanisme reaksi hidrolisis enzim protease sulfidril terhadap polipeptida terjadi dalam 2 tahap, dimana dapat dijelaskan pada gambar 2 dibawah ini.

1. Reaksi asilasi

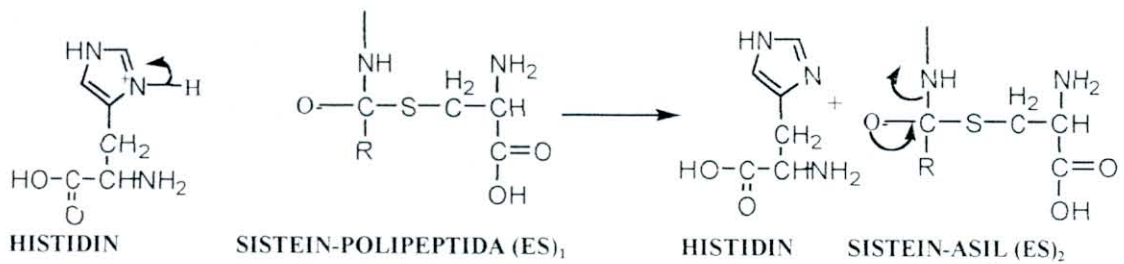
- a. *Difusi substrat (polipeptida) ke enzim (sistein)* dipengaruhi oleh letak atau orientasi .



- b. *Ikatan substrat dengan enzim*; atom N dari imidazol asam amino histidin menyerang atom H dari sistein sehingga bermuatan positif parsial dan S dari sistein menjadi kelebihan elektron dan menyerang C karboksil dari polipeptida.

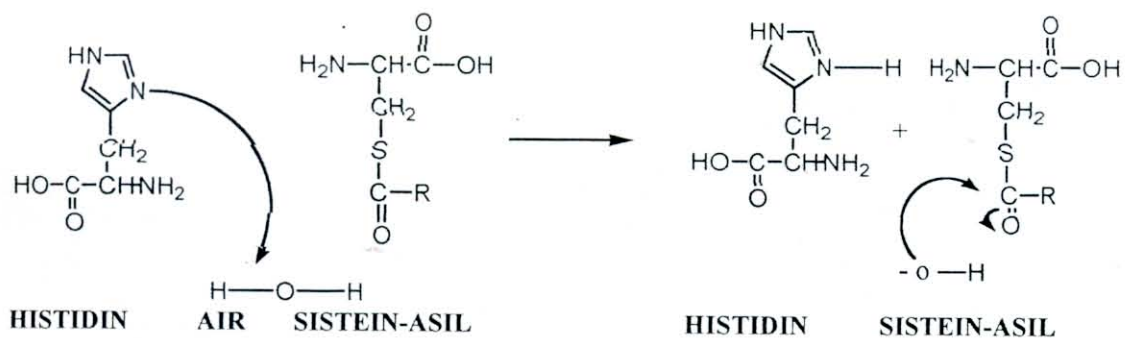


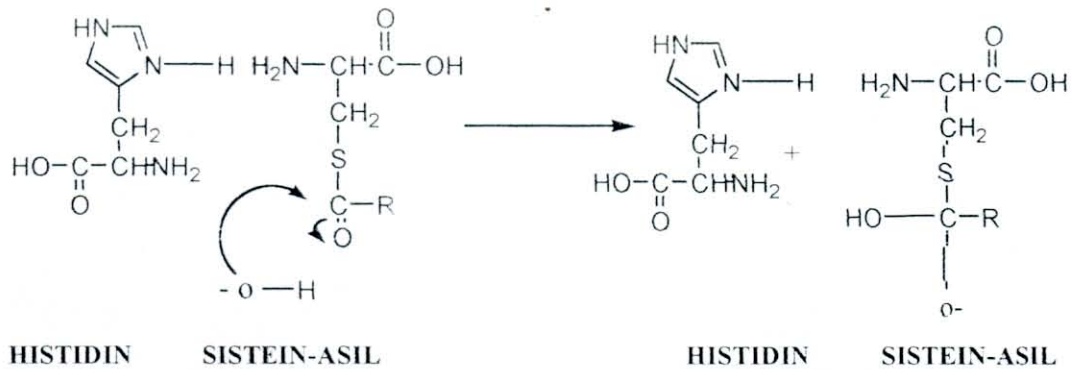
- c. Ikatan enzim substrat diputus dan produk pertama dilepas; ikatan S dan C (ES) menyebabkan satu tangan C-O terputus dan atom O bermuatan negatif parsial. Atom H positif yang terikat N imidazol selanjutnya diserang oleh -NH- dari polipeptida membentuk -NH₂ dan sistein -asil. Mekanisme reaksinya dijelaskan pada halaman selanjutnya.



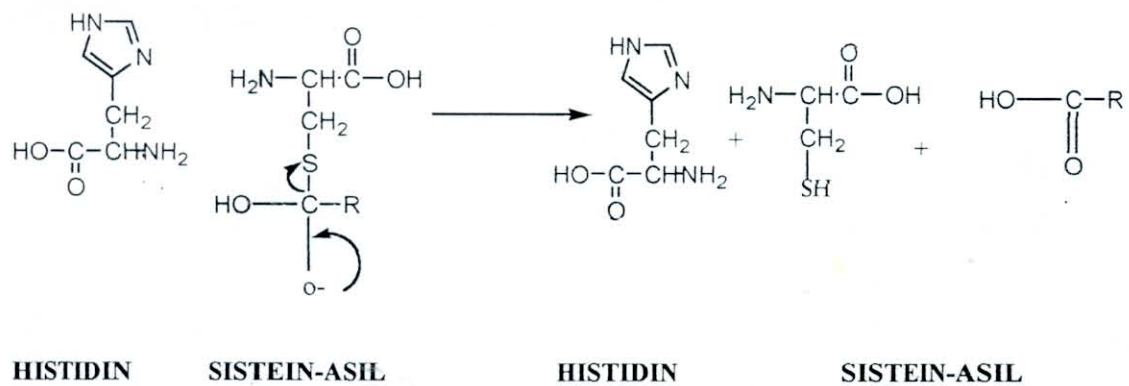
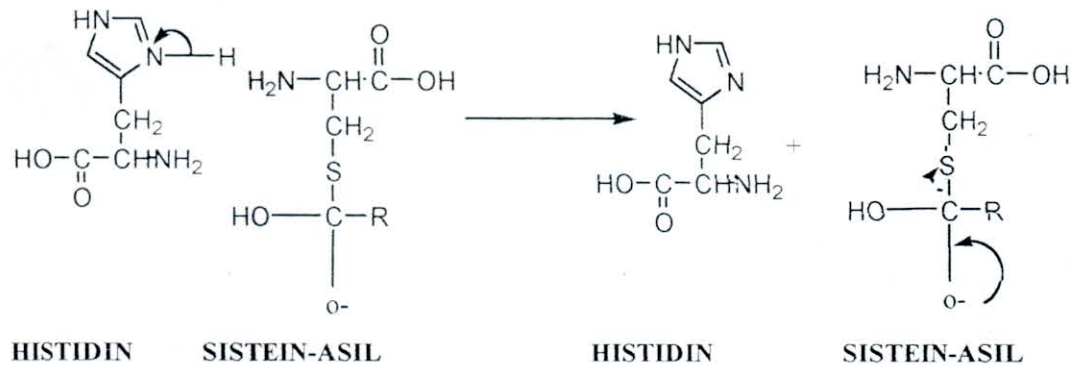
2. Reaksi Deasilasi

- d. Reaksi dengan air; N dari imidazol sebagai nukleofil, menyerang H dari air. OH⁺ akan menyerang atom C dari sistein-asil sehingga atom O bermuatan negatif parsial..





e. Pemutusan ikatan enzim asil dan produk dilepaskan; S dari enzim asil bertindak sebagai nukleofil dan menyerang atom H yang berikatan dengan N imidazol dan melepaskan asil dan enzim kembali.



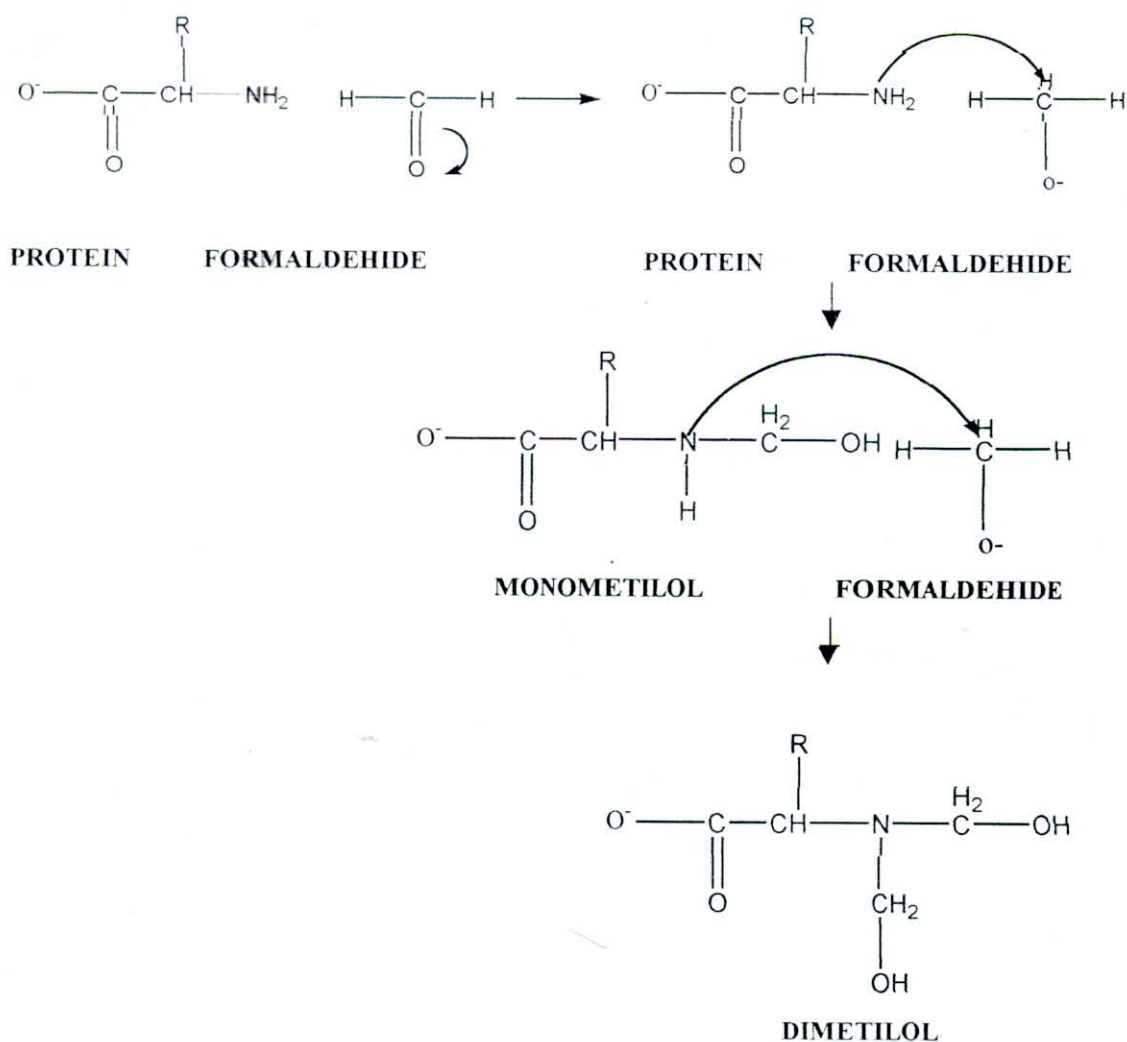
Gambar 2. Mekanisme reaksi hidrolisis enzim sulfidril terhadap polipeptida

Parameter terjadinya hidrolisis protein dapat dilihat dari besarnya kandungan protein terlarut. Salah satu analisis protein terlarut dapat dilakukan dengan metode titrasi formol. Selain itu dengan metode elektrofotesis protein akan memisah berdasarkan berat molekulnya, sehingga dapat diketahui molekul protein sudah terhidrolisis atau belum.

2.6 Penentuan Kadar Protein Terlarut

Penentuan kadar protein, khususnya kadar protein terlarut dapat dilakukan dengan menggunakan metode titrasi formol. Prinsip dasar dari titrasi formol adalah reaksi kesetimbangan asam basa. Hasil yang diperoleh pada titrasi formol yaitu turunan metil-ol. Menurut Fessenden dan Fessenden, 1999 bahwa pada saat basa ditambahkan, ion yang terprotonisasi sempurna diubah menjadi ion dipolar yang netral dan semakin banyak ditambahkan basa, semua bentuk kation diubah menjadi anion.

Menurut Sorensen dalam Santoso, 1997 bahwa mekanisme reaksi protein dengan formaldehid pada titrasi formol dapat dijelaskan pada gambar 3 dibawah ini



Gambar 3. Mekanisme reaksi protein dengan formaldehid pada titrasi formol

2.7 Pemisahan Protein

Protein mempunyai muatan netto positif atau negatif yang mencerminkan campuran asam amino bermuatan yang dikandungnya. Jika sebuah larutan yang mengandung molekul protein mengalami suatu medan listrik, protein itu akan bermigrasi dengan laju yang bergantung pada muatan, ukuran, serta bentuknya. Teknik ini yang disebut elektroforesis. Elektroforesis merupakan salah satu metode yang digunakan untuk pemisahan protein atau enzim yang berada dalam suatu campuran (Alberts, 1994).

Dalam pertengahan tahun 1960-an, sebuah versi modifikasi metoda ini dikenal sebagai elektroforesis gel poliakrilamida Natrium Dodesil Sulfat (SDS – PAGE), telah mengawali revolusi dalam menganalisa protein. Metode ini menggunakan gel poliakrilamida dengan struktur yang silang sebagai matriks lembam yang harus dilalui oleh protein-protein. Gel elektroforesis Natrium Dodesil Sulfat digunakan untuk menentukan sub unit protein oligomerik.

Gel tersebut biasanya disiapkan langsung sebelum digunakan dengan cara polimerisasi dari monomer-monomernya. Ukuran pori gel dapat diatur dengan variasi konsentrasi agen saling-silang (*cross-linking*), sehingga cukup kecil untuk menghambat migrasi molekul-molekul protein yang diminati. Konsentrasi *cross linking* yang sedikit mengakibatkan ukuran pori besar sehingga digunakan untuk analisa dengan berat molekul yang besar. Konsentrasi *cross linking* yang rendah mengakibatkan ukuran pori menjadi kecil sehingga digunakan untuk analisa dengan berat molekul yang kecil. Ikatan saling-silang gel polimerisasi dari monomer-monomer akrilamid dan *N, N'*-metilene bis (*akrilamid*) sebagai agen ikatan saling-silang. Proses polimerisasi disertai dengan penambahan Ammonium persulfat sebagai inisiator dan *N, N, N', N'*-tetrametilene diamine (TEMED) sebagai katalis (Baker, 1995). Protein-protein dicampur dengan semacam deterjen yang bermuatan sangat negatif, yaitu Natrium Dodesil Sulfat (SDS). Natrium Dodesil Sulfat berfungsi menguraikan struktur sekunder, tersier, dan kuarterner melalui pengikatan SDS-protein pada bagian hidrofobik molekul-molekul protein, sehingga molekul-molekul itu menjadi rantai polipeptida yang linier. Merkptoetanol ditambahkan sebagai agen pereduksi untuk mereduksi semua

ikatan disulfida supaya semua unsur polipeptida dalam molekul-molekul yang memiliki banyak subunit itu dapat dianalisis.

Protein-protein yang berukuran sama cenderung menunjukkan perilaku yang serupa karena (1) struktur yang semula telah dijadikan tidak terlipat lagi oleh SDS sehingga semua mempunyai bentuk yang sama, dan (2) masing-masing mengikat SDS dalam jumlah yang sama sehingga karena itu mempunyai muatan positif yang sama pula. Protein-protein lebih besar, dengan muatan yang juga lebih besar akan mengalami gaya listrik yang lebih besar sekaligus gaya tarik yang lebih besar pula. Dalam larutan yang bebas, kedua efek itu akan saling menghilangkan, tetapi dalam jalinan gel poliakrilamida, yang bertindak sebagai penyaring molekul protein-protein besar dimana mengalami hambatan yang jauh lebih besar dibanding protein-protein kecil. Akibatnya, dalam suatu campuran yang kompleks protein-protein saling terpisah membentuk pita-pita yang tersusun menurut berat molekul setiap protein. Protein-protein yang besar dengan mudah dapat dideteksi melalui pewarnaan gel dengan zat pewarna biru Coomasien, misalnya, sedangkan protein-protein kecil dideteksi melalui perlakuan dengan zat pewarna perak (Alberts, 1994).

Keistimewaan SDS-PAGE antara lain :

- (1) Kekuatan pemisahan tinggi untuk ukuran protein dan asam nukleat yang kecil dan sedang (kira-kira sampai 1.10^6 Da),
- (2) Dimungkinkan untuk sampel dengan ukuran besar,
- (3) Interaksi minimal migrasi molekul dengan matrik.,
- (4) Kestabilan fisik matrik (Boyer, 1993).



III. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Jember, sejak bulan Nopember 2002 sampai Pebruari 2003.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

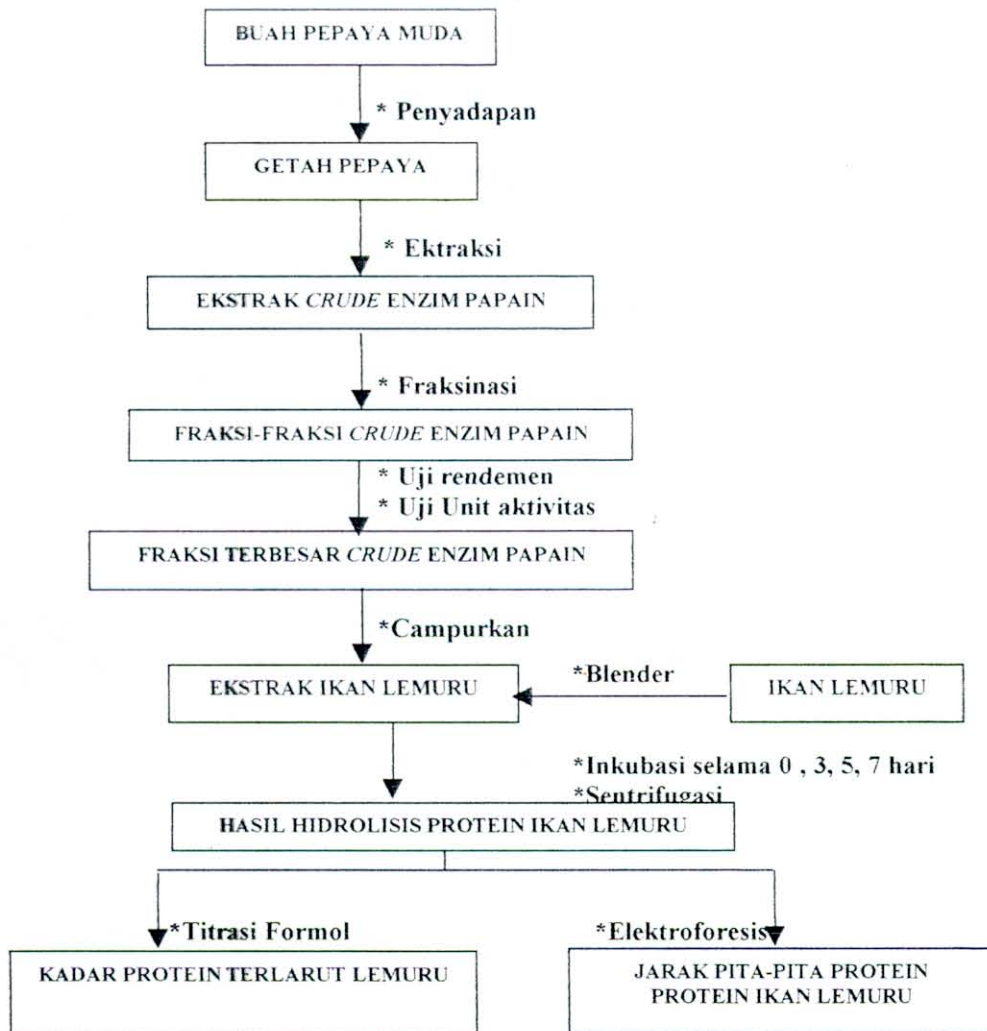
Peralatan yang digunakan meliputi blender, pipet volume, pipet *Mohr*, pipet tetes, pipet mikro, tabung reaksi, gelas kimia, labu ukur dan labu erlemeyer, neraca analitis, biuret, pH meter, spektrofotometer VIS, sentrifuga dingin merk *Sorval*, stopwatch, oven, *shaker water bath*, *freezer*, kertas saring, kain kasa, seperangkat alat elektroforesis.

3.2.2 Bahan

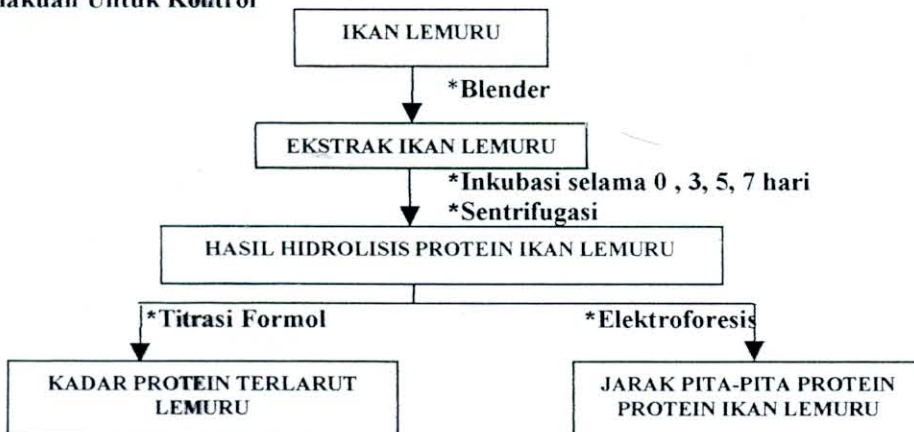
Bahan yang digunakan adalah getah buah pepaya, ikan lemuru yang diperoleh dari tempat pelelangan ikan Puger-Ambulu, Na-phospat, Ammonium sulfat, Kasein *Hammerstin*, Trikloroasetat, Tirosin, Kalsium klorida (II), Natrium karbonat, *Folin Cioulteau*, Natrium klorida, Kalium oksalat, Indikator Phenolptalein, Formaldehide, Natrium hidroksida, asam oksalat, akrilamida, N'N' bis akrilamida, ammonium persulfat, tetraetilmetylen diamina, gliserol, *bromophenol blue*, alkohol 70%, *Coomasie Brilliant Blue*, Natrium Dodesil Sulfat, basa tris, glisin, merkaptoetanol dan Aquadest.

3.3 Diagram alir penelitian

Diagram alir penelitian dicantumkan pada gambar 4.



Perlakuan Untuk Kontrol



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Penyiapan Getah Pepaya (*Carica papaya*) (Rukmana, 1995)

Penyiapan dilakukan pada pukul 05.00 – 08.00 WIB pada 20 buah pepaya jenis pepaya burung varietas “sunrise” berumur kurang lebih 2-3 bulan. Buah pepaya ditoreh dengan arah membujur dari atas ke bawah dengan kedalaman sekitar 0,2 mm, dimana masing-masing goresan dibuat pada jarak sekitar 4 cm. Selanjutnya getah yang keluar ditampung dan segera disimpan dalam *freezer*.

3.4.2 Ekstraksi *Crude Enzim Papain* dari Getah Pepaya dengan Metode Ekstraksi (Praptiningsih, 1987) dan Metode Englard Seifter (Deutscher, 1990).

a. Tahap awal ekstraksi dengan perlakuan sebagai berikut :

Sebanyak 75 gram getah pepaya ditambah 100 mL buffer fosfat pH 7,0 kemudian diblender dan dilanjutkan dengan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm 15 menit pada suhu 4 °C sehingga dihasilkan supernatan dan endapan. Supernatan yang dihasilkan disebut ekstrak kasar enzim papain yang selanjutnya difraksinasi.

b. Tahap fraksinasi dengan perlakuan sebagai berikut :

Volume supernatan yang dihasilkan pada awal ekstraksi diukur dengan labu ukur. Berdasarkan volume supernatan tersebut dapat ditentukan jumlah ammonium sulfat yang akan digunakan untuk mengendapkan protein. Pada tahap fraksinasi jumlah ammonium sulfat ditambahkan secara bertahap yaitu fraksi 0-40%, fraksi 40-80% dan 80-100%. Untuk 1 liter sentrat, jumlah ammonium sulfat yang diperlukan yaitu 226 gram untuk fraksi 0-40%; 258 gram untuk fraksi 40-80% dan 139 gram untuk fraksi 80-100% (sesuai lampiran 9). Sebelum ditambahkan ammonium sulfat fraksi 0-40% maka supernatan diletakkan dalam gelas kimia tetapi disekitar gelas kimia diberi es batu untuk menjaga suhu tetap dingin. Ammonium sulfat dilarutkan pada supernatan sedikit demi sedikit dengan menggunakan pengaduk magnetik. Hasil yang diperoleh kemudian disentrifugasi

pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 7500 rpm selama 15 menit sehingga menghasilkan endapan dan supernatan.

Endapan yang dihasilkan kemudian ditimbang dan selanjutnya ditambahkan 50 mL buffer fosfat pH 7. Supernatan yang diperoleh diperlakukan dengan cara yang sama untuk fraksi 40-80% dan fraksi 80-100%.

Pengukuran rendemen terhadap volume larutan menggunakan rumus :

$$R = \frac{g \text{ endapan}}{\text{vol. pelarut}}$$

3.4.3 Penentuan Unit Aktivitas *Crude* Enzim Papain dengan Metode Begmeyer (Hasnan, 1991)

a. Menyiapkan larutan blanko

Sebanyak 1 mL buffer fosfat 0,2M pH 7 ditambah substrat kasein 1 mL dan aquades 0,2 mL dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA 0,1M sebanyak 2,0 mL dan enzim dalam CaCl₂(2mM) sebanyak 0,2 mL. Kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37⁰C selama 10 menit dan disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.

Selanjutnya filtrat yang dihasilkan diambil 1,5 mL kemudian ditambah 0,4M Na₂CO₃ 5,0 mL dan pereaksi folin 1,0 mL.

Diinkubasi kembali pada suhu 37⁰ C selama 20 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

b. Menyiapkan larutan standart

Sebanyak 1 mL buffer fosfat 0,2M pH 7 ditambah substrat kasein 1 mL dan tirosin standart 0,2 mL kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA 0,1M sebanyak 2,0 mL dan enzim dalam CaCl₂(2mM) sebanyak 0,2 mL. Kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37⁰C selama 10 menit dan disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya filtrat yang dihasilkan diambil 1,5 mL kemudian ditambah 0,4M Na₂CO₃ 5,0 mL dan pereaksi folin 1,0 mL. Diinkubasi kembali pada suhu 37⁰ C selama 20 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

c. Menyiapkan larutan sampel

Sebanyak 1 mL buffer fosfat 0,2M pH 7 ditambah substrat kasein 1 mL dan enzim dalam CaCl_2 0,2 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA 0,1M sebanyak 2,0 mL dan CaCl_2 (2mM) sebanyak 0,2 mL. Kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya filtrat yang dihasilkan diambil 1,5 mL kemudian ditambah 0,4M Na_2CO_3 5,0 mL dan pereaksi folin 1,0 mL. Diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

Pengukuran aktivitas *crude* enzim papain menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas} = \frac{\left(\frac{\text{Abs.spl} - \text{Abs.blk}}{\text{Abs.std} - \text{Abs.blk}} \times \text{faktor pengenceran} \right)}{\text{waktu inkubasi}}$$

dimana : *Abs. spl* : absorbansi sampel

Abs. blk : absorbansi blanko

Abs. std : absorbansi standart

1 unit : sejumlah enzim yang memberikan nilai absorbansi setara dengan $1 \mu\text{mol tyr}$ per menit pada pH 7 dan suhu 37°C

3.4.4 Inkubasi Ikan Lemuru dengan Metode Enzimatik (Anwar, 1994 dan Suprihno , 2002)

Sebanyak 100 gram ikan lemuru ditambahkan 200 mL aquades kemudian diblender. Sebanyak 10 gram ikan lemuru yang halus ditambahkan *crude* enzim papain (yang memiliki unit aktivitas tertinggi hasil pengukuran) dengan perbandingan 1 : 2 terhadap berat ikan lemuru. Untuk perlakuan blanko, sampel tidak ditambahkan *crude* enzim papain. Selanjutnya ditambahkan NaCl 20% dari berat ikan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan lama inkubasi 0 hari, 3 hari, 5 hari, 7 hari. Setelah inkubasi, sampel dipanaskan selama 3 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan disaring. Filtrat dari hasil tersebut (ekstrak ikan) digunakan untuk penentuan kadar protein terlarut dengan titrasi formol dan pita-pita protein dengan metode elektroforegram.

3.4.5 Penentuan Protein Terlarut dengan Metode Titrasi Formol (Sudarmadji, 1984)

a. Menyiapkan larutan blanko

Sebanyak 1 mL aquades ditambahkan 0,02 mL K- oksalat jenuh (K-oksalat : air = 1 : 3); 0,05 mL Phenolptalein 1%; 0,1 mL formaldehyde 40% kemudian dititrasi dengan NaOH 0,1 N (V1) sampai warna merah jambu.

b. Menyiapkan larutan sampel

Sebanyak 0,5 mL sampel (hasil hidrolisis ikan lemuru) ditambahkan 1 mL aquades; 0,02 mL K- oksalat jenuh (K-oksalat:air = 1:3); 0,05 mL Phenolptalein 1%; kemudian dititrasi dengan NaOH 0,1 N (V2) sampai warna merah jambu. Selanjutnya ditambahkan 0,1 mL formaldehyde 40% dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N (V3) sampai warna merah jambu.

Kadar protein terlarut ditentukan dengan rumus berikut :

$$\% N = \frac{V1.N1 - V3.N3}{Berat\ sampel} \times fp \times 14,008 \times 100\%$$

$$\% P = \% N \times faktor\ konversi (6,25)$$

Keterangan :

$V_1.N_1$ = volume NaOH pada blanko

$V_3.N_3$ = volume NaOH titrasi 2 pada sampel

fp = faktor pengenceran (165)

3.4.6 Penentuan Pita-Pita Protein Hasil Hidrolisis Ikan Lemuru dengan Metode Elektroforegram (Sambrook yang dimodifikasi Ratnadewi, 2000)

a. Preparasi alat

Glass plate, spacer, dan sisir dicuci dengan aquades, bilas dengan aquades dan dikeringkan. *Glass plate* dan spacer dipasang, kemudian diisikan air dan didiamkan beberapa menit untuk melihat adanya kebocoran atau tidak.

b. Pembuatan gel elektroforesis SDS-PAGE

Pembuatan *separating gel* (gel bawah) 12,5% pH 8,8 dengan cara mencampurkan 4,0 mL akrylamida 30%; 2,5 mL *Tris HCl* 1,5 M pH 8,8; 100 μ L 10 % (w/v) Natrium Dodesil Sulfat; 3350 μ L aquades steril. Kemudian ditambahkan 20 μ L 10% Ammonium Persulfat dan 5 μ L *Tetraetilmetilene diamine* (TEMED). Pembuatan *stacking gel* 4% pH 6,8 dengan mencampurkan 0,665 mL akrylamida 30%; 1,25 mL *Tris HCl* 0,5 M pH 6,8; 50 μ L 10 % (w/v) Natrium Dodesil Sulfat; 3050 μ L Aquades steril. Kemudian ditambahkan 25 μ L 10% Ammonium Persulfat dan 5 μ L *Tetraetilmetilene diamine* (TEMED), diaduk dan dimasukkan kedalam *glass plate* yaitu diatas *separating gel*. Polimerisasi gel terjadi antara 30-40 menit sampai tanda batas antara gel dan larutan atasnya (aquades). Ketika polimerisasi selesai, aquades dibuang.

c. Preparasi sampel

Sebanyak 18 μ L sampel ditambah 5 μ L buffer sample dipanaskan selama 3 menit pada air mendidih dan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 3 menit.

d. Perlakuan sampel

Sebanyak 20 μ L diinjeksikan kedalam sumur-sumur gel elektroforesis yang telah dipersiapkan. Gel mulai *dirunning* dengan memberikan tegangan 15 Volt. Elektroforesis dinyatakan selesai apabila warna biru *bromophenol blue* telah mencapai 0,5 cm dari bawah *resolving gel*

e. Pengecatan protein

Protein yang telah dipisahkan dengan elektroforesis divisualisasi menggunakan larutan pewarna *Coomassie Brilliant Blue G-250 (staining solution)*. Gel diangkat dari *glass plate* dan dimasukkan kedalam kotak plastik yang berisi larutan stainingkemudian digoyang perlahan menggunakan *rotary rocker* hingga warna *Coomassie Brilliant Blue* dapat diikat oleh protein. Selanjutnya ditambahkan larutan destaining dilakukan berulang kali hingga gel tidak berwarna. Gel tersebut kemudian dikeringkan dengan alat pengering atau didiamkan diudara terbuka.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian ini maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Metode ekstraksi crude enzim papain dari getah pepaya dengan cara fraksinasi berdasarkan variasi konsentrasi ammonium sulfat menghasilkan rendemen tertinggi pada fraksi 40-80% yaitu 0,165 g/mL .
2. Aktivitas terbesar *crude* enzim papain diperoleh pada fraksi 40-80% yaitu sebesar 1,098 Unit/menit dalam 75 g getah.
3. Perbedaan waktu inkubasi 0, 3, 5, dan 7 hari mempengaruhi persen protein terlarut. Persen protein terlarut tertinggi diperoleh pada waktu inkubasi 5 hari yaitu sebesar 7,00%.
4. Waktu inkubasi mempengaruhi berat molekul hasil hidrolisis protein melalui penambahan jarak *band-band* protein hasil hidrolisis pada gel elektroforesis. Semakin lama waktu inkubasi yaitu dari hari ke 0 dan ke 3 maka jarak *band-band* protein semakin bertambah karena molekul proteinnya sudah terpecah menjadi lebih sederhana. Pada hari ke 5 dimungkinkan protein terhidrolisis menjadi lebih sederhana lagi, sehingga pewarna CBB tidak dapat mengikat protein, akibatnya pada gel tidak tampak adanya *band*.
5. Waktu inkubasi terbaik untuk hidrolisis protein ikan lemuru oleh *crude* enzim papain adalah pada hari ke 5.

5.2 Saran

Perlunya penelitian lanjutan sebagai berikut :

1. Penggunaan tanaman pepaya yang tidak disukai masyarakat seperti pepaya gantung sebagai sumber getah.
2. Pemurnian lanjutan untuk menghasilkan enzim papain murni.

3. Penentuan aktivitas enzim papain secara spesifik berdasarkan perhitungan substrat sisa dengan optimasi suhu, pH dan konsentrasi terhadap substrat kasein.
4. Isolasi protein ikan lemuru agar sampel yang diteliti benar-benar isolat protein tanpa mengandung bahan lainnya.
5. Penggunaan pewarnaan yang cocok untuk ukuran berat molekul sampel yang kecil pada proses elektroforesis, agar *band-band* pada gel tampak dengan jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, H. 1994. *Kimia Larutan*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Albert, B. Dennis, B. Julian L. 1994. *Biologi Molekuler Sel*. Terjemahan Alex Tri Kartjono (-----). dari *Molecular Biology of The Cell*. Jakarta: penerbit Gramedia Pustaka Utama.
- Anwar, C. 1994. *Penuntun Praktikum Organik*. Yogyakarta: Depdikbud Universitas Gadjah Mada.
- Bahri, S. 1990. *Pengaruh konsentrasi Enzim Papain dan garam dalam Pembuatan Kecap Ikan Lemuru (Sardinella sp)*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Baker, D. 1995. *Capillary Electrophoresis*. Canada: John Wiley and Sons. Inc.
- Clark Jr, J.M. 1964. *Experimental Biochemistry*. San Francisco: W.H. Freeman And Company.
- Colby, D. 1985. *Ringkasan Biokimia Harper*. Terjemahan Adji Dharma (1996). dari ----- ..Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Deutscher, M. P. 1990. *Method in Enzymology Guide to Protein Purification*. San Diego: Academic Press.
- Drenth, J.; Jansonius, J.N.; Koekoek, R.; dan Wolthers, B.G. *Papain, X-ray Structure. The Enzyme 3*, 485-499.
- Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik*. Terjemahan Aloysius dari *Organic Chemistry*. Jakarta: penerbit Erlangga.
- Godfrey, T. dan Reicheld. 1986. *Industrial Enzymology The Application of Enzymes in Industry*. New York : Stockon Press.
- Hardani, D. 1991. *Pengaruh Perbedaan Berat Ikan Lemuru dengan Berat Bonggol Nanas dalam Pembuatan Kecap Ikan secara Non Fermentasi*. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Hasnan, M. 1991. *Pengaruh Penggunaan Enzim Papain selama Proses Hidrolisis Kecap Ikan*. Skripsi. Bogor.: Jurusan TPG. FATETA Institut Pertanian Bogor.
- Indrawaty. 1983. *Pembuatan Kecap Keong Sawah dengan menggunakan Enzim Bromelin*. Jakarta: Balai Pustaka.

- Jenie, B. Lily, T. 1994. *Produksi Protease oleh Basillus Licheniformis Menggunakan Medium Limbah Udang Windu dan Ampas Tapioka*. Bandung: Buletin Tehnologi dan Industri Pangan. Vol 5. No 2. Jurusan Tehnologi Pangan dan Gizi Fakultas Tehnologi Pertanian.
- Judoamidjojo, M. 1990. *Tehnologi Fermentasi*. Bogor: Penerbit Rajawali Pers dengan Pusat antar Universitas bioteknologi IPB.
- Juorris, G. dan Yuthavong, Y. 1971. *Kinetic Specificity in Papain Catalyzed Hydrolyses*. *Biochem. J.* 124, 107-115.
- Khopkar, S.M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Terjemahan A. Saptorahardjo dari *Basic Concepts of Analytical Chemistry* (1985). Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Lehninger, A.----- *Dasar-Dasar Biokimia*. Terjemahan Maggy Thenawidjaja (1990). dari *The Basic of Biochemistry*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Linn, K.G. 1983. *Definition Of The Site of Reactivity of The Ancestral Protease of The Papain Type*. *Phytochemistry* 22, 2485-2487.
- Maggy, T.S. 1992. *Protease*. Bandung: Depdikbud Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Teknologi Bandung.
- Martoharsono dan Rahayu. 1982. *Enzimologi*. Yogyakarta: Yayasan Fakultas Tehnologi Pertanian Universitas Gajah Mada.
- Matthew H. 1998. *Biochemistry*. America: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Parakkasi, A. 1980. *Ilmu Gizi dan Makanan Ternak*. Bogor: Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Praptiningsih, Y. 1989. *Isolasi Dan Pemurnian Enzim Bromelin dari Bonggol Nanas*. Jember: Fakultas Tehnologi Pertanian Universitas Jember.
- Prasetyo, K. 1990. *Pembuatan Bibit Kecap Ikan dari ikan Lemuru dengan Variasi Konsentrasi Enzim Alacalase 0.6 L dan Lama Inkubasi*. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Ratnadewi, A.A.I. 2001. *Studi Ekspresi Mutan Sup45 Hiperaktif Sup45 Hipersensitif Paramomisin dan Sensitif Temperatur Saccharomyces cervisiae*. Bandung: Bidang Khusus Biokimia Program Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung.

- Rukmana. 1995. *Budidaya Pepaya dan Pascapanen*. Yogyakarta: Percetakan Kanisius.
- Santoso, A. 1997. *Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain Perdagangan terhadap Rendemen Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) pada Isolasi secara enzimatis*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
- Sudarmadji, S. 1996. *Teknik Analisa Biokimia*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Suhartono, M.T. 1992. *Protease*. Bogor: Departement P dan K Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Bioteknologi IPB.
- Suprihno. 2002. *Pengaruh Berat Buah Nanas (*Ananas Comusus Var. dulois*) dan Lama Inkubasi terhadap Kualitas Kecap Ikan yang dibuat secara fermentasi*. Jember. FKIP Program Studi Biologi. Universitas Jember.
- Winarno, F.G. 1992. *Enzim Pangan*. Jakarta: PT. Gramedia.
- _____. 1995. *Kimia Pangan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Whitaker, J.R. 1994. *Principles of Enzymology For The Food Sciences*. New York: Marcell Dekker Inc.
- White, F.D. dan Delory, G.E. 1952. *A Course In Practical Biochemistry For Students of Medicine (Cameron And White)*. London: J&A. Churchill LTD.
- Zubaidi, A. 1998. *Pengaruh Konsentrasi Enzim Bromelin Dan Lama Pemeraman Terhadap rendemen dan Kualitas Minyak Kelapa*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

LAMPIRAN

Lampiran 1. Preparasi larutan

1. Buffer fosfat 0,2 M pH 7

Sebanyak 6,9 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_r=137,99$) dilarutkan dengan aquades sampai 250 mL.

Sebanyak 8,9 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_r=177,99$) dilarutkan dengan aquades sampai 250 mL. Untuk membuat buffer fosfat 0.2 M pH 7 maka larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ditambahkan pada larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sampai pH mencapai pH 7 pada pH meter.

2. Kasein 20 mgram/mL pH 7

Sebanyak 0,2 gram kasein *Hammerstin* ditambahkan 5 mL larutan NaOH 0,1 N dan diletakkan pada penangas sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai kasein larut. Kemudian didinginkan dan ditambahkan larutan buffer fosfat 0,2 M pH 7 sampai 10 mL.

3. Larutan CaCl_2 2mM

Sebanyak 0,011 gram CaCl_2 ($M_r=111$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

4. Larutan Trikloro asetat 0,1 M

Sebanyak 0,818 gram Trikloro asetat ($M_r=163,5$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL.

5. Larutan Na_2CO_3 0,4 M

Sebanyak 2,12 gram Na_2CO_3 ($M_r=106$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

6. Larutan Folin (1:2)

Sebanyak 6 mL larutan folin cioulteau ditambahkan 2 mL aquades.

7. Larutan tirosin 5 mmol/L

Sebanyak 0,023 gram tirosin ($M_r=181$) ditambahkan dengan 12,5 mL larutan NaOH 0,1 N dan diletakkan pada penangas sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai larut. Kemudian didinginkan dan ditambahkan aquades sampai 25 mL

8. Larutan enzim dalam CaCl_2 (2:1)

Sebanyak 0,4 mL ditambahkan 0,2 mL CaCl_2 2 mM

9. Larutan Kalium oksalat jenuh (1:3)

Sebanyak 1 mL larutan Kalium oksalat jenuh ditambahkan 3 mL aquades

10. Larutan indikator phenolptalein 1% w/v

Sebanyak 0,5 gram phenolptalein dilarutkan dengan alkohol (etil alkohol) 70% sampai 50 mL

11. Larutan formaldehyde 40 % v/v

Sebanyak 20 mL larutan formaldehyde dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

12. Akrylamida/bis (30% T, 2.67% C) (Anonymous, Tanpa Tahun)

Sebanyak 29,2 gram akrylamida ditambahkan 0,8 gram N'N'-bis-methylene akrylamida dan dilarutkan dengan penambahan aquades steril sampai volume 100 mL

13. Tris HCL 1.5 M pH 8,8

Sebanyak 9,077 gram basa Tris dilarutkan aquades steril sampai 50 mL. Kemudian ditambahkan 6 N HCL sedikit demi sedikit sampai pH 8,8 dengan menggunakan alat pH meter.

14. Tris HCL 0.5 M pH 6,8

Sebanyak 3 gram basa Tris dilarutkan aquades steril sampai volume 50 mL. Kemudian ditambahkan 6 N HCL sedikit demi sedikit sampai pH 6,8 dengan menggunakan alat pH meter.

15. Natrium Dodesil Sulfat 10% w/v

Sebanyak 2,5 gram Natrium Dodesil Sulfat dilarutkan aquades steril sampai volume 25 mL

16. Buffer sampel

Sebanyak 1,9 mL aquades steril ditambahkan 0,5 mL *Tris HCl* pH 6,8; 0,4 mL glycerol ; 0,8 mL 10% (w/v) Natrium Dodesil Sulfat, 0,2 mL 2- merkaptoetanol, 0,2 mL 1% (w/v) *bromofenol blue*. Sampel dilarutkan dengan perbandingan 1 : 4 kemudian dipanaskan 95°C selama 4 menit.

17. 5 X elektrode buffer

Sebanyak 1,5 gram Basa Tris ditambahkan 7,2 gram glisin, 0,5 gram Natrium Dodesil Sulfat dan aquades steril sampai 100 mL. Disimpan pada 4⁰C. Untuk satu elektroforesis run melarutkan 10 mL 5X stock dengan 40 mL aquades steril.

18. Larutan staining

Sebanyak 20 mL metanol 40 % v/v ditambahkan 7,5 mL larutan asam asetat 15 % v/v dan 0,05 gram *coomasie brilliant blue* 0,1 % w/v.

19. Larutan destaining

Sebanyak 5 ml metanol 10 % v/v ditambahkan 3,72 mL larutan asam asetat 7,5 % v/v.

Lampiran 2. Data Unit Aktivitas Crude Enzim Papain dari Getah Pepaya

Data absorbansi blanko, standart dan sampel pada hasil ekstraksi *crude* enzim papain dicantumkan pada tabel 8 dibawah ini.

Tabel 8. Data absorbansi blanko, standart dan sampel tiap 50 mL larutan *crude* enzim papain.

Fraksi	Blanko (Blk)	Strandar (Std)	Sampel (Spl)	Std-Blk	Spl-Blk	Unit Aktv (rerata)
0-40%	0,028	0,446	A.0,041	0,431	0,011	0,421
	0,026	0,461	0,036			
	0,027	0,466	0,038			
	0,027	0,458	0,038			
			B.0,040			
			0,037			
			0,041			
			0,039			
			C.0,035			
			0,035			
40-80%	0,187	0,631	A.0,199	0,441	0,017	1,098
	0,187	0,626	0,205			
	0,187	0,626	0,208			
	0,187	0,628	0,204			
			B.0,213			
			0,222			
			0,224			
			0,220			
			C.0,223			
			0,227			
80-100%	0,090	0,528	A.0,094	0,438	0,002	0,088
	0,091	0,528	0,092			
	0,092	0,531	0,094			
	0,091	0,529	0,093			
			B.0,092			
			0,095			
			0,095			
			0,094			
			C.0,092			
			0,093			
		0,093				
		0,093	0,438	0,002		

Fraksi	Blanko (Blk)	Strandar (Std)	Sampel (Spl)	Std-Blk	Spl-Blk	Unit Aktv (rerata)
	0,573	0,894	A.0,812			
	0,572	0,896	0,814			
	0,572	0,896	0,814			
	0,572	0,895	0,813	0,323	0,241	
Ekstrak kasar			B.0,813			
			0,815			
			0,814			12,328
			0,814	0,323	0,242	
			C.0,812			
			0,812			
			0,814			
			0,813	0,323	0,241	

Pengukuran unit aktivitas enzim bromelin dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas} = \frac{\left(\frac{\text{Abs.spl} - \text{Abs.blk}}{\text{Abs.std} - \text{Abs.blk}} \times \text{faktor pengenceran} \right)}{\text{waktu inkubasi}}$$

Keterangan : Faktor pengenceran 165 x

Waktu inkubasi 10 menit

Lampiran 3. Perhitungan Aktivitas Enzim Papain pada Tahap Fraksinasi

1. Fraksi 0 - 40%

$$a. \text{ Blanko} = \frac{0,028 + 0,026 + 0,027}{3} = 0,027$$

$$b. \text{ Standar} = \frac{0,446 + 0,461 + 0,466}{3} = 0,458$$

$$c. \text{ Sampel 1} = \frac{0,041 + 0,036 + 0,038}{3} = 0,038$$

$$\text{Sampel 2} = \frac{0,040 + 0,037 + 0,041}{3} = 0,039$$

$$\text{Sampel 3} = \frac{0,035 + 0,035 + 0,040}{3} = 0,037$$

$$d. \text{ Standart} - \text{Blanko} = 0,458 - 0,027 = 0,431$$

$$e. \text{ Sampel 1} - \text{Blanko} = 0,038 - 0,027 = 0,011$$

$$\text{Sampel 2} - \text{Blanko} = 0,039 - 0,027 = 0,012$$

$$\text{Sampel 3} - \text{Blanko} = 0,037 - 0,027 = 0,01$$

$$\bar{U} = \left(\frac{\text{Sampel} - \text{Blanko}}{\text{Standart} - \text{Blanko}} \right) \times \left(\frac{1}{10} \right) \times fp$$

$$U_1 = \left(\frac{0,038 - 0,027}{0,458 - 0,027} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = \left(\frac{0,011}{0,431} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = 0,421$$

$$U_2 = \left(\frac{0,039 - 0,027}{0,458 - 0,027} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = \left(\frac{0,012}{0,431} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = 0,459$$

$$U_3 = \left(\frac{0,037 - 0,027}{0,458 - 0,027} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = \left(\frac{0,01}{0,431} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = 0,383$$

$$f. \text{ Jadi hasil akhir rata-rata} = \frac{U_1 + U_2 + U_3}{3}$$

$$= \frac{(0,421) + (0,459) + (0,383)}{3}$$

$$= 0,421$$

Ket : Perhitungan untuk fraksi 40-80%; 80-100%, dan ekstrak kasar menggunakan cara yang sama.

Lampiran 4. Data % Protein Terlarut dari Hasil Ikan Lemuru yang Terhidrolisis.

Data volume NaOH yang dihasilkan untuk penentuan kadar protein terlarut dari hasil ikan lemuru yang terhidrolisis dicantumkan dalam tabel 9.

Tabel 9. Data volume NaOH dan penentuan kadar protein terlarut untuk 10 gram ikan lemuru.

Nama	Ul ₁	Ul ₂	Ul ₃	rerata	%N	%P
Blanko	82	82,2	83	82,4		
Kontrol	6,3	6,7	8	7	1,06	6,6
Sampel 0 hari	5	5,9	4,8	5,23	1,081	6,75
Sampel 3 hari	3,7	5,9	4,3	4,63	1,09	6,81
Sampel 5 hari	2	2,5	1,8	2,1	1,12	7,00
Sampel 7 hari	3,7	5,9	4	4,53	1,09	6,81

Perhitungan kadar protein terlarut menggunakan rumus :

$$\% N = \frac{V_{blk} \cdot N_{blk} - V_{spl} \cdot N_{spl}}{\text{Berat sampel}} \times fp \times 14,008 \times 100\%$$

$$\% P = \% N \times \text{faktor konversi (6,25)}$$

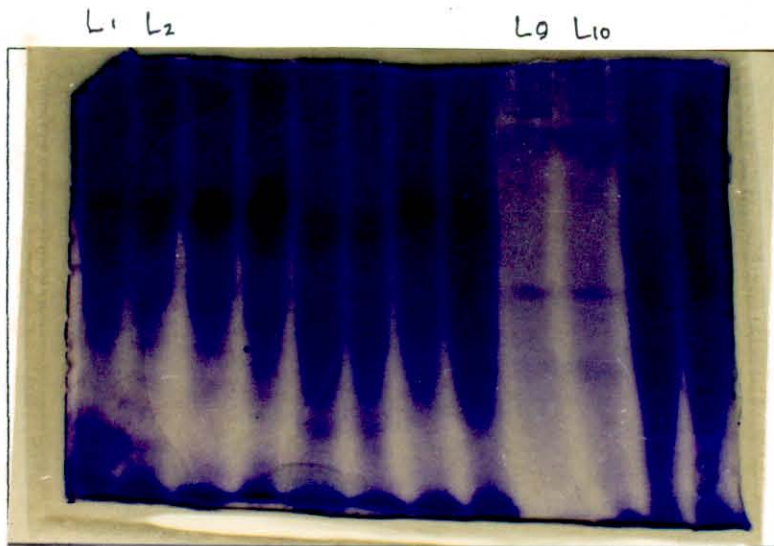
Lampiran 5. Perhitungan % Protein Terlarut**1. Sampel 0 hari**

- a. $V_{2N_2} - V_{3N_3} = (82,4 \times 0,1) - (5,23 \times 0,1)$
 $= 8,24 - 0,523 = 7,72 \text{ mmol}$
- b. $\text{gr} = 7,72 \text{ mmol} \times 14,008$
 $= 108,14 \text{ mg}$
 $= 0.10814 \text{ gr}$
- c. $\%N = \frac{0.10814}{10} \times 100\%$
 $= 1,08 \%$
- d. $\%P = 1,08 \times 6,25$
 $= 6,75 \%$

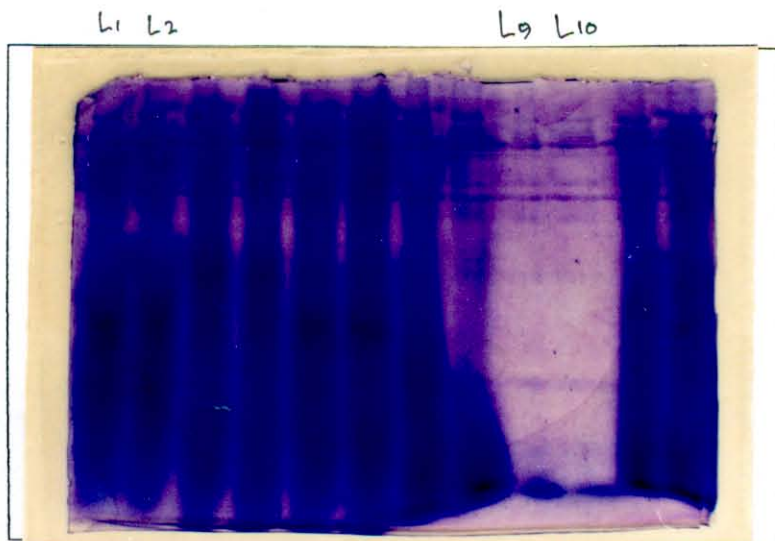
Ket : Untuk sampel 3, 5, 7, dan kontrol perhitungan menggunakan cara yang sama.

Lampiran 6. Daftar gambar elektroforegram

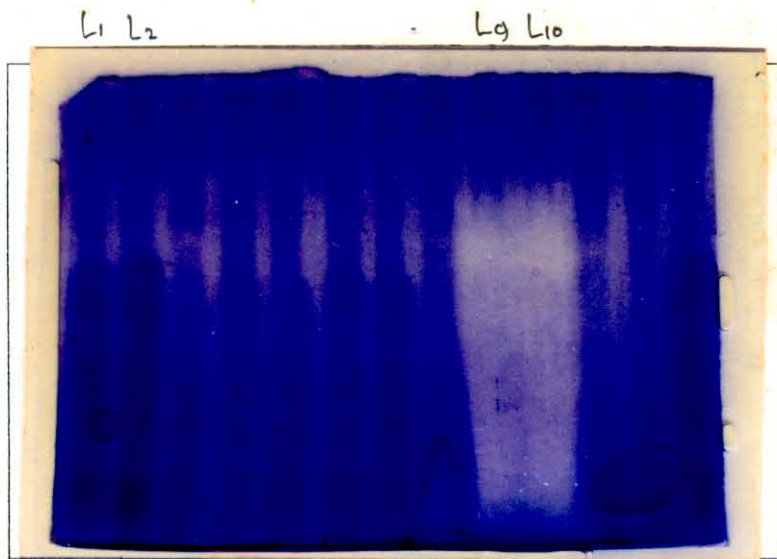
Gambar elektroforegram hasil hidrolisis ikan lemuru oleh *crude* enzim papain dari getah buah pepaya terhadap variasi waktu inkubasi dicantumkan pada gambar 6, 7, 8 dan 9.



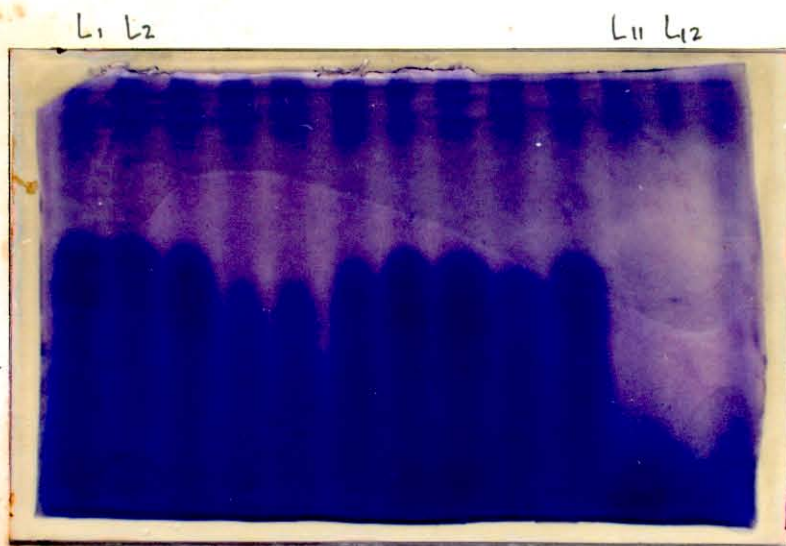
Gambar 6. Elektroforegram protein ikan lemuru yang terhidrolisis pada waktu inkubasi 0 hari. Ket : L₁ , L₂ = Kontrol; L₉ , L₁₀ = hidrolisis protein oleh getah buah pepaya



Gambar 7. Elektroforegram protein ikan lemuru yang terhidrolisis pada waktu inkubasi 3 hari. Ket : L₁ , L₂ = Kontrol; L₉ , L₁₀ = hidrolisis protein oleh getah buah pepaya



Gambar 8. Elektroforegram protein ikan lemuru yang terhidrolisis pada waktu inkubasi 5 hari. Ket : L₁, L₂ = Kontrol; L₉, L₁₀ = hidrolisis protein oleh getah buah pepaya



Gambar 9. Elektroforegram protein ikan lemuru yang terhidrolisis pada waktu inkubasi 7 hari. Ket : L₁, L₂ = Kontrol; L₁₁, L₁₂ = hidrolisis protein oleh getah buah pepaya

Lampiran 7. Standart Deviasi Data Absorbansi Penentuan Unit Aktivitas
Crude Enzim Papain

Tingkat keakurasian dapat ditentukan dengan melihat error dari beberapa ulangan pengukuran. Secara statistik ditunjukkan dengan Standart Deviasi. Data Standart Deviasi ditunjukkan pada tabel 10.

Tabel 10. Data Standart Deviasi Dari Absorbansi Blanko, Standart dan Sampel tiap 50 mL larutan *crude* enzim papain.

Fraksi	Ket	Absorbansi			Rerata	Std.Dev
		Ul. 1	Ul. 2	Ul. 3		
0-40%	B	0,028	0,026	0,027	0,027	0,001
	lanko					
	Standart	0,446	0,461	0,466	0,458	0,010
	Sampel 1	0,041	0,036	0,038	0,038	0,002
	Sampel 2	0,040	0,037	0,041	0,039	0,002
	Sampel 3	0,035	0,035	0,040	0,037	0,003
40-80%	Blanko	0,187	0,187	0,187	0,187	0,000
	Standart	0,631	0,626	0,626	0,628	0,003
	Sampel 1	0,199	0,205	0,208	0,204	0,005
	Sampel 2	0,213	0,222	0,224	0,220	0,006
	Sampel 3	0,223	0,227	0,226	0,225	0,002
80-100%	Blanko	0,090	0,091	0,092	0,091	0,001
	Standart	0,528	0,528	0,531	0,529	0,002
	Sampel 1	0,094	0,092	0,094	0,093	0,001
	Sampel 2	0,092	0,095	0,095	0,094	0,002
	Sampel 3	0,092	0,093	0,093	0,093	0,001
Ekstrak kasar	Blanko	0,573	0,572	0,572	0,572	0,001
	Standart	0,894	0,896	0,896	0,895	0,001
	Sampel 1	0,812	0,814	0,814	0,813	0,001
	Sampel 2	0,813	0,815	0,814	0,814	0,001
	Sampel 3	0,812	0,812	0,814	0,813	0,001

Lampiran 8. Perhitungan Standart Deviasi pada Tabel 10.

Perhitungan Standart deviasi menggunakan rumus :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}, \text{ dimana}$$

SD = Standart Deviasi

n = banyaknya pengulangan

x = nilai pengukuran

\bar{x} = rata-rata nilai pengukuran

1. Fraksi 0-40%

x blanko	x rata-rata	(x - x rata-rata)	(x - x rata-rata) ²
0,028	0,027	0,001	1.10 ⁻⁶
0,026	0,027	-0,001	1.10 ⁻⁶
0,027	0,027	0	0

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{2 \cdot 10^{-6}}{2}} = 0,001$$

x standart	x rata-rata	(x - x rata-rata)	(x - x rata-rata) ²
0,446	0,458	-0,012	1,44.10 ⁻⁴
0,461	0,458	0,003	9.10 ⁻⁶
0,466	0,458	0,008	6,4.10 ⁻⁵

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{2,17 \cdot 10^{-4}}{2}} = 0,01$$

Ket : Untuk masing-masing data lainnya menggunakan cara yang sama

Lampiran 9. Tabel Teknik Pengendapan oleh Ammonium Sulfat

Tabel 11. Teknik pengendapan oleh ammonium sulfat
Konsentrasi akhir ammonium sulfat: persen penjumlahan pada 0°C

Kons. awal (%am Sulfat pada 0°C)	Persentase penjumlahan pada 0°C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Ammonium sulfat (gram) untuk 1 liter larutan																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	679
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	45	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Sumber : dari "Data for biochemistry reseach "(R. M. C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, and K. M. Jones, eds.), 2 nd Ed. Oxford Univ. Press, London, 1969