



**MEMBANDINGKAN KINERJA PROTEASE BIDURI (*Calotropis gigantea*)  
DENGAN PROTEASE DAN BAHAN PENGEMPUK DAGING KOMERSIAL**

**SKRIPSI**

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk  
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu  
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Universitas Jember

Asal:	Harah Pembelian	Kelas
Terima Tgl : 16 SEP 2006		664.92
Oleh :	No. Induk :	IVA
KLASIR / PENYALIN :		m

**Putra Aviva Ivada**  
**NIM 021710101060**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2006**

Dosen Pembimbing Skripsi

Dosen Pembimbing Utama

**Ir. Hj. Siti Hartanti, MS.**

Dosen Pembimbing Anggota I

**Ir. Yhulia Draptiningsih S, MS.**

Dosen Pembimbing Anggota II

**Yuli Witono, S.TP., MP.**

## Kepersembahkan Karya Ilmiah Tertulis ini Kepada :

Almamater Fakultas Teknologi Pertanian, yang  
kubanggakan;

Ibunda Sri Komariyati dan Ayahanda Ghufron Ihsan  
tercinta, yang selalu mendoakan dan setia memberikan  
kasih sayang serta pengorbanan selama ini;

Mbah kakung, Alm. Syaibani Mursyid, Mbah Putri  
Wasilah, dan Budek, Alimah A Fauziah,  
terima kasih atas seluruh doa dan kebaikannya;

Saudara-saudaraku, Mas Yuda, Nova, Dian dan Vita,  
terima kasih semangat dan dukungannya serta  
hiburannya, ayo kita buat Bapak-Ibu bangga sama kita;

"Engkau" calon permaisuri hidupku kelak;

Temannya seperjuangan.

### Thanks To :

- √ Terima Kasih ya **Allah SWT**... Puji syukur kepunjatan atas segala limpahan rahmat-Mu, restu-Mu, anugerah-Mu, dan ijin-Mu, hingga karya ini dapat terselesaikan. Esolawat serta Salam bagi Nabi Besar **Muhammad SAW**, yang sampai detik ini dan selamanya menjadi junjungan kita semua.
- √ Seluruh teman-teman angkatan 2002....
- √ **Bunga\_ku**... Engkau pelangi dinatiku. Engkau indah, cantik, tapi kamu hanya bisa sekedar dipandang, tak bisa dimiliki..
- √ Teman Se-Kosa, **Haniph, Mas Dephiet, Mas Jepang, Arif, Mika, Rio**, Thanks kebersamaannya.
- √ Teman Seperjuangan, **Aestrin "Aoen"** (I thanks banget dan coba ngertiin aku, maaf kalo aku sering buat salah, marah, aku minta maaf sebesar-besarnya), **Bekti "bektos"** (thanks banget my bro... bantuan, nasihat, pelajaran yang benar-bener berarti buat hidupku... pokoknya thanks banget). Adek Seperjuangan, **"Dinar, wulan, Ika"** (semangat, kita bantu Pak Yuli menaklukkan Biduri... hehe).
- √ Sahabat-sahabatku : **Afnee** (pada dasarnya, kamu inspirasiku, makasih jadi tempat curhatku dulu), **Nui'** (Salah satu Charlie's Angle yang baik hati, tulus ikhlas, jujur, ada adanya...thanks my friend), **Riza** (Gelatin??? Apaan tuh... hehe, tetap semangat ya Riza..), **Roni "Rooney"** (Tepung Kentang apa dedak ayam sech?? Lo baik banget sih ron!!), **Naryo "Norman"** (jangan jadi buaya juga donk!!, urus dulu edible filmnya), **Fajar** (kamu emang tipe lelaki dunia akhirat, amin)
- √ Teman-teman Lab\_Atas : **Memey** (itu sosis apa sambel pecel sih??..heh, tetap gila ya mey), **Guntur** (Thanks bgt Bos, kapan ya kita nge-Lab kareng lagi??!!), **Munir** (Makasih banyak pak, sorry sering buat salah ya, sosismu aromanya enak pak!!), **Hasyim** (kamu inspirasi banyak orang sim, termasuk aku), **Suci** (jangan diem terus ya, aku senang kalo kamu banyak ngomong), **Yuli** (kamu orang yang tetap semangat dalam keadaan apapun), **Eni** (Keep Smile Eni... itu ibadah lo!!), **Abas** (Alex nggak arah ngelupain kamu bas...), **Kentir** (Hati-hati sama pancrannya...??), **widi** (Semangat terus..senyum donk), **Uus**

(Ceritamu akan kujaga us), **Agus 'PJT'** (The Great Man,...Keren banget Bro...gilingan Lo!!), **Ung-Q 'Husen'** (Yang ini kasih tale sampai...tes), **Yulina** (makasih tabung freeze-nya ya!!), Team Mocal-T1, **Pras 'Sual'**, **Lusy 'uchol'**, **Noven 'adam'**, **Rini 'Lapis'**, **Eva 'Epha'** (walau sesaat, tapi kenangan kalian banyak lo!!!, thanks ya)

- √ **Arieska** (Kalo minggu pagi itu niat jogging ato makan sih??), **Mardiana** (Ibu yang penuh kasih sayang!!), **Sonya & Ernita** (Smangat buat Edible-nya), **Fifit** (jangan marah ya erupuknya diambil anak-anak!!).
- √ **Adeke\_adekeku** : **Ari '03** (makasih semangat, dukungan ma doanya ya...) **Iin '04** (makasih banyak ya dah nemenin aku, kamu lucu banget in), **Dian '04** (tasya??? Emangnya mirip?? Iya juga sih..hehe), **Mira, Aden, zulfa, Nyit2, Semuanya anak 2004** (makasih dah altera sama aku, aku senang banget...maaf kalo' aku ngecewain kalian)
- √ **Indi 'imoet'**, takkan terganti setiap kenangan yang telah terukir, tetap inah dan melekat dihati... makasih Indi.
- √ **UKMO SAHARA**, dan seluruh teman2 UKMO, **Mei, Dani, Yus**, Semuanya... temporer, bernang dan berkumpul selama ini...
- √ Semua Ternisi yang selalu membantuku dan memuatuken beria : **Mbak Sari, Mbak Ketut, Mbak wim, Mbak Neni, Pak Mistar, Mas Dian dan Mas Tazor.**
- √ Adeke-adeke relasku 2003,2004,2005, Semangat terus ya...
- √ **OnTHEL-er**, Engkau istri kedua gw.. makasih banyak bantuannya, maaf gw jarang nyuci lo...
- √ **Nokia 3610**, walau jelek tapi lo ngasih gw kemudahan...

## **MOTTO**

"Dan barang siapa yang ingin menjadi sekaya-kayannya manusia, hendaklah ia meyakinkan, bahwa apa yang ada dalam genggamannya Allah lebih dapat dipercayakan daripada apa yang ada dalam genggamannya sendiri"  
*(Al-Hadist)*

"Sebaik-baik orang diantara kalian adalah orang yang belajar al-Quran dan Mengajarkannya"  
*(HR. Bukhari)*

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Putra Aviva Ivada

N I M : 021710101060

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul :  
"Membandingkan Kinerja Protease Biduri dengan Protease dan Bahan Pengempuk  
Daging Komersial" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika disebutkan  
sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya  
jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan  
sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan  
dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika  
ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juli 2006  
Yang Menyatakan,

Putra Aviva Ivada  
NIM. 021710101060

**PENGESAHAN**

Diterima Oleh :

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER**

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

---

Dipertanggungjawabkan pada :

Hari : Sabtu

Tanggal : 22 Juli 2006

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian

Tim Penguji :

Ketua




Ir. Hj. Siti Hartanti., MS.  
NIP. 130 350 763

Sekretaris



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

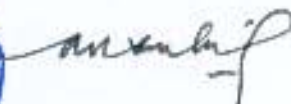
Anggota



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

Mengetahui

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian



Marzuki Moen'im., M.SIE  
NIP. 130 531 986



## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah yang berjudul "**Membandingkan Kinerja Protease Biduri(*Calotropis Gigantea*) dengan Protase dan Bahan Pengempuk Daging Komersial**". Karya tulis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tiada terhingga kepada :

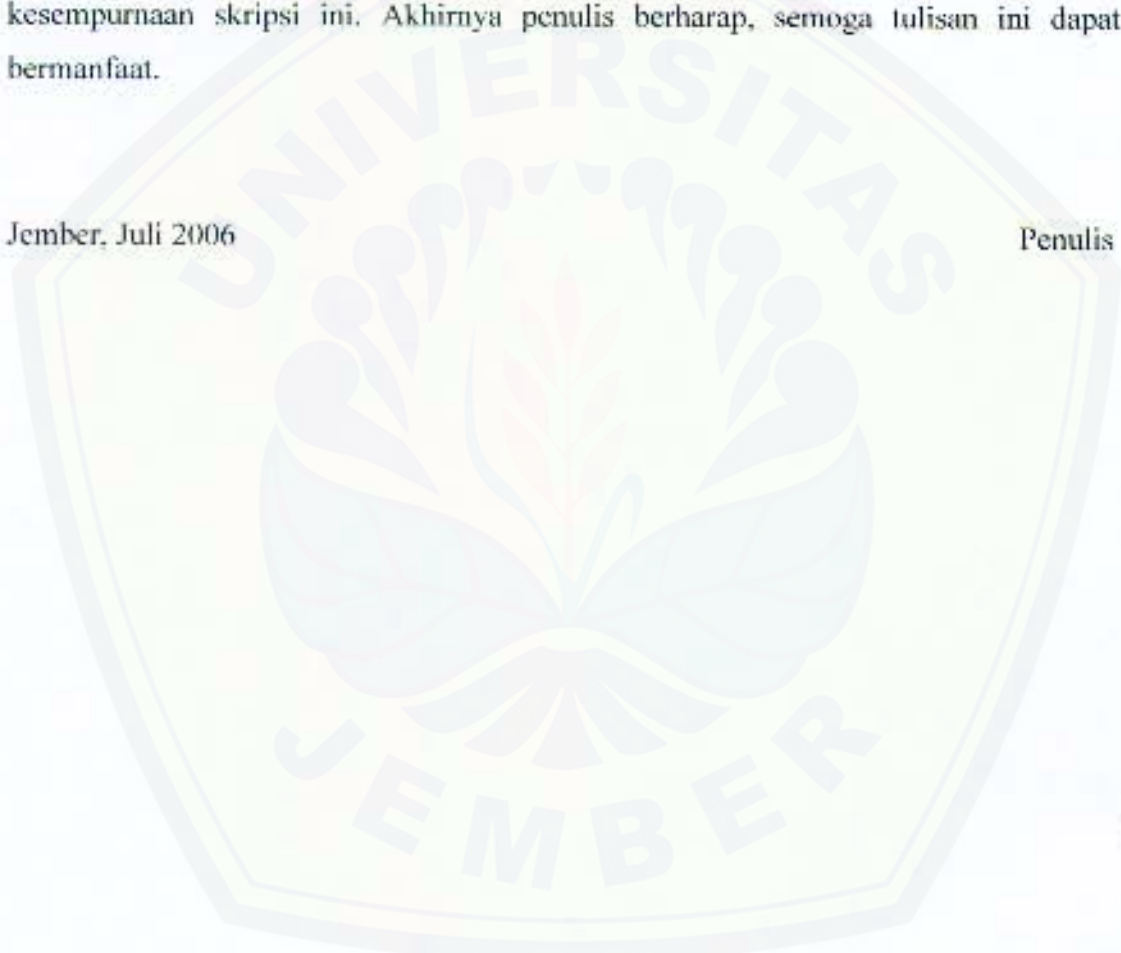
1. Ir. Achmad Marzuki Mun'im, M,SIE., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Hj. Siti Hartanti, MS., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu dan pikiran dalam pelaksanaan penelitian ini;
3. Ir. Yhulia Praptiningsih S, MS., selaku Dosen Pembimbing Anggota I yang telah membimbing pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini;
4. Yuli Witono., S.TP, MP., selaku Dosen Pembimbing Anggota II yang telah memberikan pengarahan demi selesainya penelitian dan penulisan skripsi ini;
5. Ir. Achmad Marzuki Mun'im, M,SIE., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan akademik selama kuliah;
6. Para teknisi laboratotium Mbak Sari, Mbak Ketut, Mbak Neni, Mbak Wim, Pak Mistar, Mas Tazor dan Mas Dian, serta Mas Nafi' yang telah memberikan pengarahan selama penelitian;
7. Kakekku, Alm. Syaibani Mursyid, terima kasih telah memberikan pelajaran berharga selama di dunia. Semoga Engkau diterima disisi-Nya.
8. Ibu, Bapak, Nenek, Budeku, Kakak serta Adik-adikku yang selama ini telah memberikan dorongan dan doanya demi terselesaikannya skripsi ini;

9. Rekan kerjaku, Aestrin dan Bekti, Guntur, Afni, Nuri, Suci yang telah membantu selama penelitian.
10. Teman-teman seangkatan dan seperjuangan "THP 2002" dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih untuk kalian semua.

Dengan menyadari sepenuhnya segala keterbatasan yang ada pada diri penulis, maka penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat.

Jember, Juli 2006

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTTO .....	v
HALAMAN PERNYATAAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
RINGKASAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Tanaman Biduri ( <i>Calotropis gigantea</i> ) .....	4
2.2 Enzim .....	5
2.3 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	7
2.3.1 Suhu dan Thermostabilitas enzim .....	7
2.3.2 Keasaman (pH) .....	8
2.3.3 Konsentrasi Enzim dan Substrat.....	9
2.4 Enzim Protease.....	9
2.4.1 Klasifikasi Enzim Protease .....	11

2.4.2 Sumber-sumber Enzim Protease .....	13
2.4.3 Enzim Biduri .....	14
2.4.4. Enzim Papain.....	14
2.4.5 Manfaat Enzim Protease .....	17
2.5 Daging Sapi.....	17
2.5.1 Struktur Otot Daging.....	19
2.5.2 Mekanisme Pengempukan Daging Menggunakan Enzim Protease .....	20
2.6 Kedelai.....	21
2.7 Kasein .....	24
2.8 Derajat Hidrolisis.....	25
2.9 Aktivitas Enzim Protease .....	26
<b>BAB 3. METODELOGI PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
3.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	28
3.1.1 Bahan.....	28
3.1.2 Alat .....	28
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	28
3.3 Metode Penelitian .....	29
3.3.1 Cara Menjalankan Penelitian .....	29
3.3.2 Rancangan Penelitian .....	29
3.3.3 Parameter Pengamatan .....	29
3.4 Prosedur Analisis .....	33
3.4.1 Derajat Hidrolisis .....	33
3.4.2 Kadar protein terlarut .....	33
3.4.3 Pengujian Aktivitas Protease .....	34
3.4.4 Tekstur .....	35
3.4.5 Water Holding Capacity .....	35

<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>36</b>
4.1 Derajat Hidrolisis.....	36
4.2 Kadar Protein Terlarut.....	37
4.3 Aktivitas Enzim.....	38
4.4 Tekstur.....	40
4.5 Water Holding Capacity (WHC).....	41
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>42</b>
5.2 Saran.....	42
5.1 Kesimpulan.....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>47</b>

DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Susunan Asam Amino Pada Enzim Papain.....	16
2. Komposisi Daging Sapi .....	18
3. Komposisi Kedelai .....	21
4. Komposisi Asam Amino Esensial Biji Kedelai dan Asam Amino Esensial yang dianjurkan FAO .....	22
5. Komposisi Penyusun Fraksi-fraksi Protein Kedelai .....	22
6. Nilai Derajat Hidrolisis (DH) Enzim Protamex <sup>TM</sup> dan Enzim Papain .....	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi Katalisis Protease.....	11
2. Reaksi TNBS dengan Asam Amino.....	25
3. Diagram Alir Pengujian Kinerja Enzim Protease pada Soluble Casein .....	30
4. Diagram Alir Pengujian Kinerja Enzim Protease pada Substrat Daging.....	31
5. Diagram Alir Pengujian Kinerja Enzim Protease pada Substrat Kedelai.....	32
6. Histogram Derajat Hidrolisis Pada Berbagai Substrat dan Jenis Enzim.....	36
7. Histogram Kadar Protein Terlarut pada Berbagai Jenis Enzim dan Substrat.....	37
8. Histogram Aktivitas Enzim pada Berbagai Jenis Enzim .....	38
9. Histogram Total Protein pada Berbagai Jenis Enzim .....	39
10. Histogram Aktivitas Spesifik pada Berbagai Jenis Enzim .....	39
11. Histogram Tekstur Daging Setelah Pengempukan pada Berbagai Jenis Enzim .....	40
12. Histogram WHC Daging Setelah Pengempukan pada Berbagai Jenis Enzim .....	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Reagensia.....	47
2. Data dan Kurva BSA Standart.....	49
3. Data dan Kurva Tirosin Standart .....	50
4. Data dan Kurva Glysin Standart (h).....	51
5. Data Hasil Perhitungan Kadar Derajat Hidrolisis Pada Berbagai Substrat dan Jenis Enzim.....	52
6. Data Hasil Perhitungan Kadar Protein Terlarut Pada Berbagai Substrat dan Jenis Enzim.....	53
7. Data Hasil Perhitungan Aktivitas Pada Berbagai Jenis Enzim.....	54
8. Data Hasil Pengamatan Tekstur Daging Pasca Inkubasi Pada Berbagai Jenis Enzim.....	55
9. Data Hasil Pengamatan WHC Daging Pasca Inkubasi Pada Berbagai Jenis Enzim.....	55
10. Data Hasil Pengukuran pH Poririnsen .....	55



Putra Aviva Ivada (021710101060) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, "Membandingkan Kinerja Protease Biduri (*Calotropis gigantea*) dengan Protease dan Bahan Pengempuk Daging Komersial", dibimbing oleh Ir.Hj. Siti Hartanti, MS dan Ir. Yhulia Praptningsih, MS.

#### RINGKASAN

Protease merupakan enzim penghidrolisis protein, yaitu enzim yang memutuskan ikatan peptida pada rantai protein sehingga dihasilkan asam amino atau peptida berantai pendek. Enzim protease banyak digunakan dalam industri pangan seperti pembuatan keju, penjernihan bir, pembuatan roti, pengempuk daging, dan lain-lain. Kebutuhan akan enzim protease yang terus meningkat memicu para ahli untuk menemukan sumber protease baru yang salah satunya yang mampu dikembangkan adalah tanaman biduri. Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan jenis tumbuhan dataran pantai yang memiliki aktivitas proteolitik seperti halnya tanaman pepaya, nanas, dan *ficus sp.* Akan tetapi belum diperoleh gambaran yang lebih konkrit tentang seberapa besar tingkat hidrolisis protease biduri di antara enzim protease komersial. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar aktivitas protease biduri dibanding protease komersial.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa derajat hidrolisis crude protease biduri lebih rendah dibanding enzim papain, enzim paya maupun poririnsen pada substrat daging dan kedelai, tetapi lebih tinggi dibanding paya dan poririnsen pada substrat soluble casein. Sedangkan aktivitasnya, crude protease biduri paling tinggi di antara papain, paya maupun poririnsen. Demikian juga aktivitas spesifiknya menunjukkan jauh lebih tinggi dibanding papain, paya maupun poririnsen. Akan tetapi tekstur daging pasca inkubasi dengan crude protease biduri masih lebih keras dibanding pasca inkubasi dengan papain maupun paya. Sehingga crude protease biduri kurang cocok bila diaplikasikan untuk pengempukan daging.



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hampir semua reaksi biologis dipercepat oleh suatu senyawa makro molekul spesifik yaitu enzim. Dari reaksi yang sangat sederhana seperti transportasi karbon dioksida sampai yang sangat rumit seperti replikasi kromosom (Winarno, 1994).

Protease merupakan enzim penghidrolisis protein yang banyak digunakan dalam industri pangan seperti pembuatan keju, penjernihan bir, pembuatan roti, pengempuk daging, dan lain-lain. Pemakaian enzim protease terus meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 1983 penjualan enzim protease mencapai 40% dari total penjualan enzim dunia dan pada tahun 1995 meningkat sampai 60% dari total pemakaian enzim dunia yang bernilai lebih dari 2 milyar dolar AS (Suhartono dkk, 1995; Word, 1983). Sedangkan pada tahun 2004, 70% pasar enzim dunia didominasi oleh enzim protease (mediaindo.co.id, 2004).

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

Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan jenis tumbuhan semak liar yang tumbuh subur di area pantai sampai ketinggian 1000 mdpl diseluruh Indonesia. Tanaman bergetah ini masih belum dimanfaatkan secara optimal, karena keberadaannya sebagai gulma juga sebagai makanan ternak. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman dalam satu genus dengan biduri, yaitu *Calotropis procera* telah sukses digunakan sebagai sumber enzim protease

(Eskin, 1990). Menurut paradigma Chemotaksonomy, tanaman dari genus yang sama memiliki kemiripan dalam komposisi kimianya (Ray, 1989). Hasil penelitian Witono (2002) menunjukkan bahwa ekstrak getah tanaman biduri menunjukkan adanya aktivitas enzim protease, sehingga tanaman biduri dapat digunakan sebagai alternatif sumber enzim protease.

Anisa (2005) menyatakan, produksi enzim protease biduri secara massal atau produksi dalam skala besar dapat dilakukan. Fraksi residu tanaman biduri memiliki aktivitas protease terbesar dengan pH optimum untuk ekstraksi protease biduri adalah pH 3,5. Produksi enzim protease biduri dari batang dan daun memerlukan Na-metabisulfit 0,7% dengan menggunakan pelarut air suhu 10°C dan teknik pengeringan dengan menggunakan pengering beku (*freeze dryer*).

Supaya dapat dikembangkan kearah produksi secara komersial, maka perlu diketahui bagaimana aktivitas enzim protease biduri dibandingkan dengan enzim protease komersial.

## 1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan dari penelitian ini adalah bagaimana perbedaan derajat hidrolisis, kadar protein terlarut, aktivitas enzim, water holding capacity dan tekstur substrat oleh protease yang diekstrak dari tanaman biduri terhadap substrat daging, kedelai dan soluble casein dibandingkan protease maupun bahan pengempuk daging komersial, sehingga perlu diteliti.

## 1.3 Tujuan Penelitian

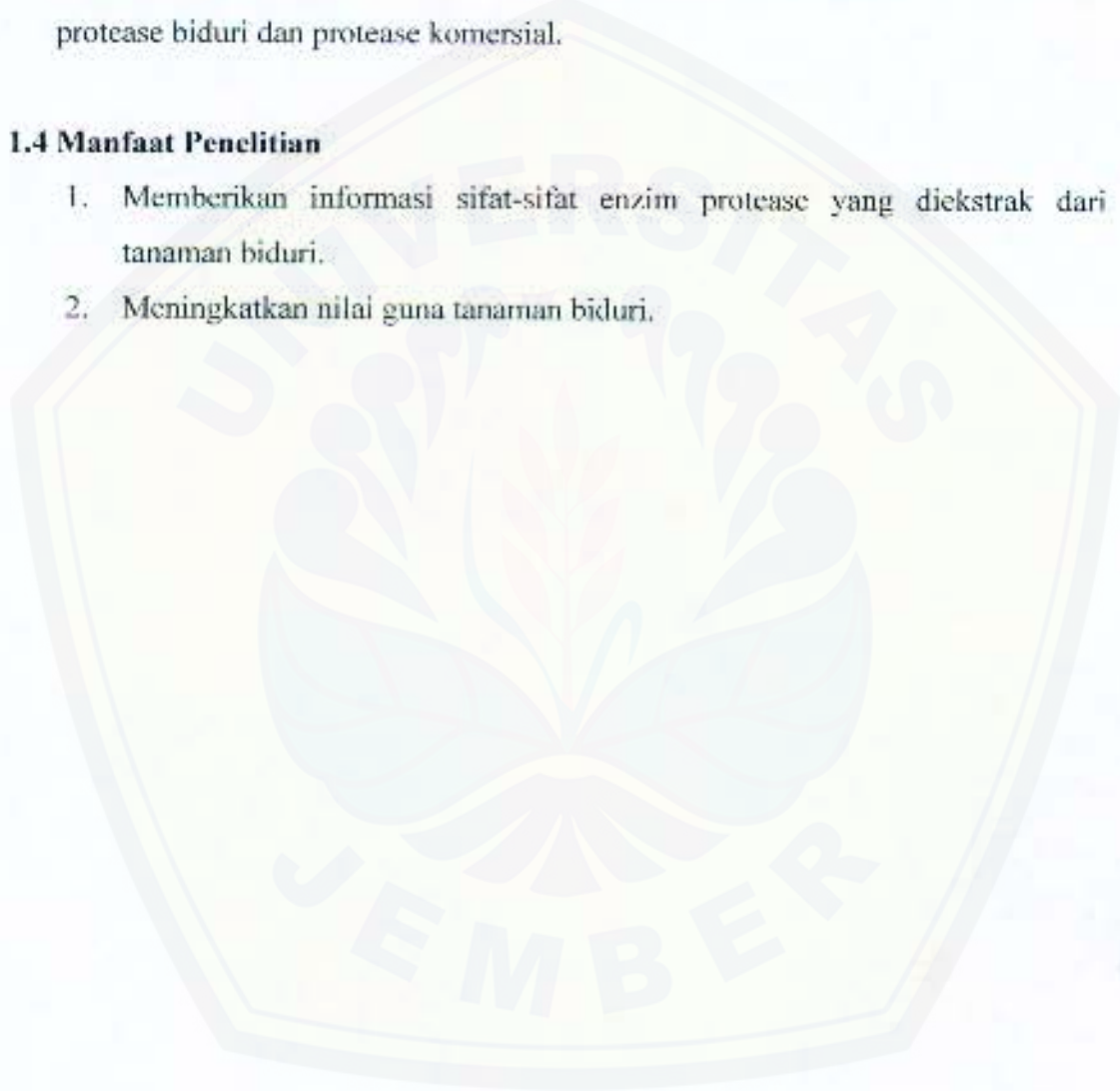
Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui seberapa besar aktivitas protease biduri dibanding protease dan bahan pengempuk daging komersial. Sedangkan tujuan khususnya adalah :

1. Mengetahui perbedaan derajat hidrolisis protease biduri dan protease komersial pada substrat daging, kedelai, dan soluble casein.

2. Mengetahui perbedaan kadar protein terlarut hasil hidrolisis protease biduri dan protease komersial pada substrat daging, kedelai, dan soluble casein.
3. Mengetahui perbedaan aktivitas proteolitik enzim biduri dan protease komersial.
4. Mengetahui perbedaan water holding capacity dan tekstur daging hasil hidrolisis protease biduri dan protease komersial.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi sifat-sifat enzim protease yang diekstrak dari tanaman biduri.
2. Meningkatkan nilai guna tanaman biduri.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)

Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman lahan kering dengan ketinggian 0,5-3,0 m 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 (Stenis, 1992).

Tanaman biduri sebenarnya sudah dimanfaatkan. Oleh masyarakat beberapa daerah di Indonesia, tanaman ini telah dimanfaatkan untuk keperluan tertentu, mulai dari akar, batang, kulit, biji beserta bulu biji, daun sampai bunganya (Stenis, 1992). Ampas dari akar biduri dapat digunakan sebagai obat luka dari gigitan ular beracun dengan membalutkan pada bagian yang terluka. Akar yang ditumbuk halus dan dicampur dengan tepung beras berguna untuk menggosok kaki yang terasa penat (Heyne, 1987).

Beberapa masyarakat di Bali, memanfaatkan kayunya untuk arang dalam pembuatan sendawa. Oleh masyarakat Yogyakarta, daunnya sering digunakan untuk menghilangkan gatal pada anak-anak terutama akibat cacar, sedangkan di Palembang daun yang dilayukan dan ditumbuk dengan kapur sirih hingga menjadi bubur kental dapat digunakan untuk menyembuhkan penyakit kudis. Bunganya oleh wanita-wanita Cina digunakan sebagai bahan tambahan penghias tubuh. Sedangkan bulu bijinya dapat digunakan untuk bahan tambahan industri kecil. Selain itu dalam ilmu kedokteran, cairan getah ini mempunyai kegunaan, seperti menstimulir pematangan bisul, untuk menanggalkan gigi geraham dan telah digunakan untuk menyembuhkan luka (Heyne, 1987).



Sistematika biduri (*Calotropis gigantea*) adalah sebagai berikut. (Tjitrosopomo, 1994)

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

Tanaman biduri merupakan tanaman bergetah, dari seluruh tanaman biduri akan mengalir getah pada tempat yang dilukai atau dipotong. Getahnya berwarna putih kelat, tetapi tidak tajam (Heyne, 1987). Getah dari sejenis tanaman biduri yakni *Calotropis procera* telah berhasil digunakan untuk pembuatan keju (Eskin, 1990). Witono (2000) melaporkan bahwa ekstrak getah tanaman biduri merupakan sumber enzim protease yang potensial seperti halnya papain dari pepaya, bromelin dari nanas, dan ficin dari tanaman ficus.

## 2.2 Enzim

Enzim memiliki tempat terpenting dalam biokimia analitis dan banyak penelitian dilakukan untuk mendeteksi enzim secara kuantitatif. Enzim merupakan protein kompleks yang diproduksi oleh sel dan bertindak sebagai katalisator dalam reaksi biokimia spesifik. Seperti umumnya katalisator, enzim bekerja mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasi reaksi. Menurut Winarno (1995), enzim dibagi menjadi enam kelompok berdasarkan tipe reaksi katalisisnya, yaitu :

1. Oksidoreduktase : adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Enzim oksidoreduktasi ada beberapa jenis, antara lain oksidase dan dehidrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen, sedangkan dehidrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.

2. Transferase : adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu radikal atau gugus.
3. Hidrolase : adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Hidrolase merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan.
4. Liase : adalah enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan C-C dan ikatan O-O dengan tidak menggunakan molekul air.
5. Isomerase : adalah enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom dalam molekul substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat atau dengan perubahan posisi isomer, misalnya merubah aldosa menjadi ketosa.
6. Ligase : adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pembentukan ikatan C-O, C-C, dan C-S dalam biosintesis koenzim A serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamin.

Komponen suatu enzim yaitu koenzim dan apoenzim. Koenzim merupakan fraksi nonprotein enzim yang diperlukan untuk aktivitas enzim. Sebagian besar koenzim berupa turunan dari vitamin B kompleks, unsur anorganik seperti kalsium ( $\text{Ca}^{++}$ ), kalium ( $\text{K}^+$ ) juga merupakan koenzim beberapa enzim. Sifat-sifat koenzim antara lain adalah tidak terikat kuat dengan enzim, dan satu molekul koenzim dapat berperan pada banyak reaksi yang dikatalisis oleh sejumlah enzim. Apoenzim merupakan fraksi protein suatu enzim yang mempunyai aktivitas spesifik, dalam aksinya perlu diaktifkan dengan penambahan koenzim atau gugus prostetik (Makfoeld, 2002).

Enzim bereaksi dan bergabung dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat, kemudian terurai dan membentuk produk serta enzim bebas. Enzim dengan jenis tertentu akan bekerja terhadap substrat tertentu pula, sehingga setiap enzim memiliki spesifitas tertentu terhadap substrat (Harper, 1999). Spesifitas enzim sangat penting dalam pengolahan pangan untuk mengubah salah satu komponen bahan, dan untuk analisis pangan (Winarno, 1995).

Enzim memiliki spesifitas aktivitas yaitu peranan enzim sebagai katalis hanya terhadap satu reaksi atau beberapa reaksi yang sejenis saja. Secara umum, derajat spesifitas enzim ada 4 macam (Winarno, 1986).

1. Spesifitas stereokimia, yaitu menunjukkan spesifitas untuk mengkatalisis bentuk isomer tertentu.
2. Spesifitas kelompok atau fungsional, yaitu bekerja terhadap pemutusan atau pemasangan suatu pengikatan yang mengikat gugus fungsional tertentu. Contoh : tripsin adalah protease yang hanya aktif pada ikatan peptida pada sisi karboksil dari arginin dan lisin.
3. Spesifitas yang rendah, tidak membedakan jenis substrat tetapi hanya spesifik pada ikatan yang akan dipecah.
4. Spesifitas absolut, hanya menyerang satu jenis substrat tunggal. Sebagian besar enzim termasuk pada kategori ini.

### **2.3 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim**

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain suhu dan thermostabilitas enzim, keasaman (pH), konsentrasi enzim-substrat.

#### **2.3.1 Suhu dan Thermostabilitas enzim**

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

Kecepatan reaksi mula-mula meningkat dengan kenaikan suhu dan peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi. Akan tetapi pada batas tertentu akan terjadi kerusakan enzim yang lebih lanjut yang akan diikuti dengan hilangnya aktivitas katalitiknya. Hampir semua enzim mempunyai aktivitas optimal pada suhu sekitar 30°C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu 45°C (Schwimmer, 1981; Winarno, 1995). Menurut Otsuki *et al.*, (1978) dalam Mee *et al.*,



(1986), suhu optimal untuk aktivitas protease sulfhidril adalah 60°C. Denaturasi akan terjadi dengan cepat apabila suhu mencapai 70°C.

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 fungsional, afinitas enzim-substrat, velositas konversi dari substrat ke produk, dan derajat asosiasi multipolipeptida dari enzim (Whittaker, 1994).

Perbedaan sumber atau asal enzim menyebabkan perbedaan daya tahan panas. Enzim amilase dari bakteri, memiliki daya tahan lebih tinggi terhadap panas dibandingkan dengan enzim amilase yang berasal dari kapang. Pada umumnya, enzim-enzim bekerja sangat lambat pada suhu dibawah titik beku dan aktivitasnya meningkat sampai pada 45°C. Istilah yang digunakan untuk menyatakan pengaruh suhu pada laju reaksi enzim adalah koefisien suhu  $Q_{10}$ . Untuk reaksi-reaksi enzim nilai  $Q_{10}$  biasanya sekitar 2,0 yang berarti bahwa laju reaksi akan mencapai dua kali lipat untuk setiap kenaikan suhu 10°C, sampai denaturasi terjadi (Winarno,1995).

### 2.3.2 Keasaman (pH)

Semua enzim adalah protein. Karena itu, faktor-faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim adalah faktor-faktor yang mempengaruhi struktur sekunder, tersier, dan kuaterner dari protein. Kenyataan itu menyebabkan faktor pH lingkungan yang berhubungan dengan kestabilan dan daya ionisasi gugus aktif suatu enzim akan mempengaruhi aktivitas enzim tersebut (Whittaker, 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 yang disebut dengan pH optimum, yang

umumnya antara pH 4,5 sampai 8,0. Suatu enzim tertentu mempunyai kisaran pH optimum sangat sempit. Disekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Pengendalian pH sangat diperlukan dalam praktek teknologi pangan. (Winarno, 1995).

Menurut Holme dan Peck (1998), pada kisaran pH yang ekstrem baik asam maupun basa terjadi inaktivasi 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 kuaterner yang aktif. Dengan berubahnya muatan pada gugus ini, protein terbuka sehingga akan kehilangan aktivitas. Bergantung pada besarnya perubahan ini, aktivitas bisa pulih atau tidak ketika enzim tersebut dikembalikan kepada pH-nya yang optimal (Harper, 1999).

### 2.3.3 Konsentrasi Enzim dan Substrat

Enzim merupakan reaktan yang bergabung dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat, (Enz/S), kemudian 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 konstan, maka percepatan reaksi meningkat hingga mencapai suatu keadaan enzim jenuh oleh substrat (Harper, 1999).

## 2.4 Enzim Protease

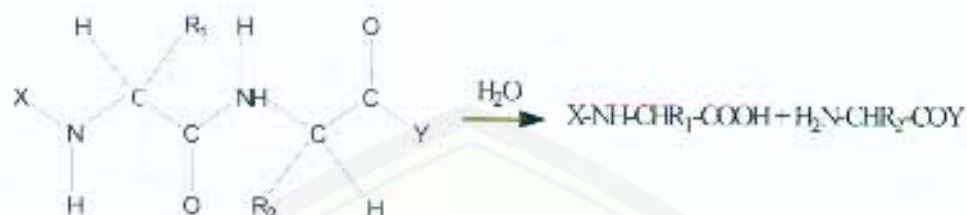
Enzim protease merupakan enzim yang banyak digunakan dalam industri pangan. Saat ini, enzim protease menduduki tempat teratas dalam hal pemenuhan kebutuhan enzim dunia. Sebanyak 70% pasar enzim dunia didominasi oleh enzim

protease (mediaindo.co.id, 2004). Enzim protease yang sudah diisolasi dari jaringan baik dari mikroorganisme, jaringan hewan maupun tumbuh-tumbuhan mempunyai peranan besar dalam berbagai industri. Protease merupakan enzim penghidrolisis protein yang banyak digunakan dalam industri pangan seperti pembuatan keju, penjernihan bir, pembuatan roti, pengempuk daging, dan lain-lain (Smith, 1995). Enzim protease merupakan sekelompok besar enzim yang terdapat secara luas di alam. Enzim protease berbentuk molekul dengan ukuran yang relatif kecil, padat, dan memiliki struktur berbentuk bola yang dapat mengkatalisis atau memecah ikatan peptida dalam protein (Polgar, 1989). Enzim protease memiliki peranan yang sangat penting dalam proses biologi makhluk hidup, misalnya dalam aktivitas metabolisme dan penentuan gen, modifikasi enzim, serta hidrolisis protein dari ukuran besar menjadi kecil atau lebih sederhana (Rao *et al*, 1998). Enzim protease berperan besar dalam proses-proses seluler akibat kemampuan proteolitisnya 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 bahan makanan. Oleh karena itu aktivitas protease ini perlu dimanipulasi sehingga dapat dimanfaatkan secara luas.

Hampir semua enzim protease merupakan protein sederhana yang tersusun oleh asam amino. Sebagian enzim protease tidak memerlukan ion aktivator, namun ada beberapa enzim protease memerlukan aktivator 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-metode yang relatif sederhana (Suhartono dkk, 1992).

Reaksi katalisis protease secara umum adalah menghidrolisis ikatan peptida seperti pada Gambar 2.1. Namun demikian berbagai jenis enzim protease mempunyai spesifitas hidrolisis yang berbeda-beda. Beberapa enzim protease mempunyai syarat khusus untuk aktivitas proteasennya. Semakin spesifik suatu

enzim, semakin sedikit jumlah ikatan peptida yang mampu dihidrolisis (Whittaker, 1994).



X = rantai peptida sebelumnya

Y = rantai peptida sesudahnya

**Gambar 2.1** Reaksi Katalisis Protease.

#### 2.4.1 Klasifikasi Enzim Protease

Enzim protease pada mulanya digolongkan berdasarkan sumbernya, misalnya dari dunia tumbuh-tumbuhan dikenal getah pepaya penghasil papain dan buah nanas sebagai penghasil bromelin. Bagian hewan yang digunakan sebagai penghasil enzim protease adalah saluran pencernaan (lambung, perut, usus) yang dikenal dengan bagian abomasum anak sapi penghasil renin. Liver atau hepatopankreas dari ikan adalah sumber chatepsin (Kolodziejaska *et al.*, 1994; Choudury and Gogoi, 1996).

Perkembangan selanjutnya enzim protease dibagi dua golongan besar, yaitu ekstraseluler dan intraseluler. Enzim protease yang bersifat ekstraseluler adalah enzim yang menghidrolisis substrat polimer protein berukuran besar menjadi kecil sehingga dapat dimanfaatkan oleh sel yang menghasilkan (Kaneda *et al.*, 1997). Sedangkan jenis protease intraseluler berperan penting dalam proses pembentukan dan germinasi spora, aktivitas sifat patogenik beberapa virus, proses pematangan protein, proses fertilisasi pada mamalia, proses koagulasi darah, fibrinolisis, pengontrolan tekanan darah, proses modifikasi serta sekresi berbagai enzim (Loffler, 1986).

Protease berdasarkan spesifitas hidrolisisnya digolongkan menjadi eksopeptidase dan endopeptidase (Kaneda *et al.*, 1997). Golongan eksopeptidase adalah enzim protease yang menguraikan protein dari ujung rantai protein sehingga dihasilkan satu asam amino dan sisa peptida. Pada tingkat lajut enzim ini akan menghasilkan sejumlah asam amino. Golongan eksopeptidase dapat dibagi lagi menjadi karboksi (ekso) peptidase dan amino (ekso) peptidase yang berturut-turut memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan gugus amino terminal.

Golongan endopeptidase menurut Löffler (1986) adalah enzim yang menguraikan ikatan peptida pada bagian dalam rantai protein secara acak, sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida. Oleh karena itu kebanyakan endopeptidase hanya akan menghasilkan asam amino dalam jumlah terbatas (Suhartono dkk, 1992). Spesifitas endopeptidase lebih kompleks. Protease jenis tripsin menghidrolisis ikatan peptida pada asam amino lisin dan arginin, sedangkan khitripsin memecah ikatan peptida pada sisi asam amino hidrofobik.

Berdasarkan sifat-sifat kimia dari lokasi aktif, enzim protease dapat dibagi menjadi empat golongan sebagai berikut (Harley, 1960 dalam Winarno 1995) :

- a. Enzim protease serin, yaitu enzim protease yang mempunyai residu serin dalam lokasi aktifnya. Semua enzim tersebut bersifat endopeptidase. Enzim yang termasuk golongan ini adalah tripsin, kimotripsin, elastase, dan subtilin.
- b. Enzim protease sulfhidril, yaitu enzim protease yang mempunyai residu sulfhidril pada lokasi aktif. Enzim ini dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator, dan logam berat. Yang termasuk golongan protease sulfhidril adalah protease dari tanaman dan mikroba misalnya papain, ficin dan bromelain.
- c. Enzim protease metal, yaitu enzim protease yang aktivitasnya memerlukan ion logam. Biasanya satu mol enzim memerlukan satu mol ion logam. Logam tersebut dapat berupa Mg, Zn, Co, Fe, Hg, Ni, dan sebagainya. Enzim tersebut dihambat oleh EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) yang dapat mengkelat logam sehingga aktifitas enzim hilang. Contoh enzim yang termasuk

golongan protease logam ini adalah protease 1 mixobacter aminopeptidase, serta protease dari bakteri (misalnya *Clostridium histolyticum*, *Streptococcus*).

- d. Enzim protease asam, yaitu enzim protease yang pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil. Aktivitasnya dapat dihambat atau dicegah oleh *p*-bromofenasilbromida. Yang termasuk enzim protease asam ini adalah pepsin, renin, dan protease kapang. Enzim tersebut aktif hanya pada pH rendah.

#### 2.4.2 Sumber-sumber Enzim Protease

Enzim protease dapat diproduksi dari jaringan-jaringan hidup meliputi tanaman, hewan, maupun mikroorganisme. Enzim protease yang dihasilkan dari tanaman antara lain dari getah tanaman pepaya yaitu enzim papain dan enzim kimopapain, enzim ficin dari tanaman *ficus*, enzim bromelain yang diisolasi dari batang atau sari buah nanas. Enzim yang dihasilkan oleh getah pepaya, tanaman ficus dan tanaman nanas tergolong jenis protease sulfhidril. Enzim kimopapain yang dihasilkan dari getah pepaya merupakan bentuk kristal dari getah pepaya dengan daya kerja yang sama dengan enzim papain namun memiliki daya tahan panas yang lebih besar dibandingkan dengan enzim papain. Enzim bromelain yang didapatkan dari buah nanas dapat diperoleh pada buah nanas yang masih muda maupun yang sudah tua, bahkan aktivitas bromelain pada buah nanas yang muda lebih tinggi dibandingkan dengan buah nanas yang sudah tua (Winarno, 1995). Beberapa tanaman lain juga sudah diketahui sebagai sumber enzim protease yaitu famili kacang-kacangan (*Arachis hypogaeae* L.), labu (*Curcubita melo*), jahe serta buah semangka (Suhartono dkk, 1992; Thompson *et al.*, 1973).

Enzim protease yang dihasilkan dari hewan antara lain renin diproduksi dari lambung sapi. Enzim protease yang diproduksi dari jaringan hewan relatif lebih mahal dan ketersediannya tergantung pada permintaan hewan-hewan sumber enzim dipasaran (Loffler, 1986). Liver atau hepatopankreas dari ikan adalah sumber chatepsin (Kolodziejaska *et al.*, 1994; Choudury add Gogoi, 1996).

Sedangkan protease yang dihasilkan dari mikroba pada umumnya dihasilkan oleh kapang, antara lain *Penicillium roqueforti* dan *Penicillium camemberti* serta *Rhizopus sp.* Mikroba yang dianggap aman dalam memproduksi enzim protease pangan antara lain *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, dan *Aspergillus niger* (Winarno, 1986).

Ketersediaan enzim protease renin dari anak sapi yang semakin mahal, mendorong para peneliti untuk mencari pengganti renin dari tanaman. *Benincasa caerifera*, *Calotropis procera* merupakan tanaman yang dapat menggantikan fungsi protease renin, walaupun belum dapat menghasilkan keju yang sempurna (I'skin, 1990). Meskipun mikroba dikenal luas sebagai sumber enzim protease, namun untuk tujuan-tujuan khusus misalnya pengempuk daging, enzim protease tanaman masih mempunyai peranan yang sangat besar yang belum sepenuhnya dapat digantikan oleh enzim dari mikroba (Suhartono dkk, 1992).

#### 2.4.3 Enzim Biduri

Enzim biduri diproduksi dari jaringan batang dan daun tanaman biduri. Aktivitas enzim biduri sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungannya. Beberapa sifat dari enzim protease biduri yaitu mempunyai suhu optimum 55°C, memiliki pH optimum pada pH 7. Enzim protease biduri dapat diinaktivasi pada suhu diatas 60°C, karena pada suhu tersebut daya tahan enzim terhadap panas mulai menurun (Prathama, 2005).

#### 2.4.4. Enzim Papain

Enzim papain adalah enzim yang terdapat dalam getah pepaya, merupakan jenis enzim proteolitik. Kualitas getah sangat menentukan aktivitas proteolitik. Kualitas getah tergantung pada bagian tanaman asal getah tersebut. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan bagian tanaman yang mengandung getah dengan kualitas aktivitas proteolitik yang baik ada pada bagian buah, diikuti batang kemudian pada daun (Muhidin, 1999).

Papain termasuk golongan protease sulkhidril. Protease golongan ini akan dihambat aktivitasnya oleh oksidator, gugus alkil dan ion-ion logam berat yang akan mengikat gugus thiol. Papain memiliki stabilitas yang baik pada pH 5 dan optimum pada pH 7 untuk aktivitasnya terhadap kasein. Selain kasein, beberapa peptida dan protein lain juga dapat dihidrolisis oleh papain (Yamamoto, 1975).

Suhartono dkk (1992) menyatakan papain mempunyai aktivitas proteolitik tertinggi bila berada pada lingkungan yang mempunyai pH antara 6 sampai 8 dan kestabilan enzim ini masih cukup baik pada pH 2 sampai 10. Menurut Muchtadi (1992) enzim papain stabil pada suhu tinggi, dengan pH mendekati netral. Inaktivasi enzim terjadi saat pH lingkungan menjadi asam ( $\text{pH} < 4$ ) dalam kondisi suhu tinggi. Smith dan Kimmel (1960) didalam Dondy *et al* (1998) menyatakan enzim papain menjadi inaktif sempurna pada pH kurang dari 2.

Papain tersusun oleh 212 asam amino. Bagian terpenting dari struktur ini adalah gugus sistein 25 dan histidin 159 yang merupakan bagian utama dalam proses katalisasi (Muchtadi, 1992). Susunan lengkap asam-asam amino penyusun papain dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Beberapa kegunaan enzim papain antara lain (Titania, 2001)

1. Pengempuk daging. Daging apabila diperlakukan dengan enzim papain maka terjadi reaksi pemutusan ikatan peptida sehingga rantai protein terpotong-potong membentuk rantai yang lebih pendek.
2. Pembuatan konsentrat protein, papain dapat digunakan sebagai bahan penghancur sisa atau buangan industri pengalengan ikan menjadi bubur ikan atau konsentrat protein hewani.
3. Penghasil pepton dan asam-asam amino. Namun kegiatan ini dapat berlangsung kalau pH, suhu, kemurnian, dan konsentrasi papain berada pada kondisi yang tepat. Hal ini sering digunakan pada pembuatan pepton dan asam-asam amino. Pepton dan asam amino umumnya sangat dibutuhkan pada penelitian mikrobiologi.



4. Penjernih bir. Dalam industri bir enzim papain digunakan sebagai anti dingin, artinya pada saat cuaca dingin biasanya bir yang ada dalam botol terlihat adanya endapan. Endapan yang tampak seperti kabut putih yang ada dalam botol bir dapat diatasi dengan penambahan papain. Dengan demikian bir akan tampak jernih.

**Tabel 2.1** Susunan Asam Amino Pada Enzim Papain

Asam Amino	Jumlah	Asam Amino	Jumlah
Lisin	10	Glisin	28
Histidin	2	Alanin	14
Arginin	12	Valin	18
Asam Aspartat	6	Isoleusin	12
Asparagin	13	Leusin	11
Asam Glutamat	8	Tirosin	19
Glutamin	12	Fenilalanin	4
Threonin	8	Triptofan	5
Serin	13	Sistein	1
Prolin	10	Sistin	6

Sumber : Koekoek didalam Boyer (1960)

Papain memiliki spesifitas yang luas. Papain bersifat endopeptidase yang berarti memotong atau menguraikan ikatan peptida pada bagian dalam rantai protein secara acak, sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida. Menurut Moihara (1970) dalam Reed (1975), papain memiliki spesifitas yang sangat baik untuk memotong rantai protein antara asam amino asparagin-glutamin, asam glutamat-alanin, leusin-valin, fenilalanin-tirosin, tirosin-threonin. Papain bersifat sangat aktif dalam menghidrolisis amida dan ester. Benzoyl-L-argininamide (BAA) merupakan substrat yang sangat baik untuk papain.

Kualitas papain sangat ditentukan oleh kekuatan atau kemampuan papain untuk memecah protein. Kemampuan ini disebut aktivitas proteolitik (Proteolytic Activity) yang sering dinyatakan dalam satuan unit. Sehubungan dengan metode

analisisnya maka dikenal beberapa macam satuan unit, diantaranya FCCU (Food Chemical Codex Units), MCU (Milk Clotting Units), CDU (Caccin Digestion Units), dan SU (Soxhlet units)

#### **2.4.5 Manfaat Enzim Protease**

Enzim protease yang sudah diisolasi dari jaringan, baik mikroorganisme, jaringan hewan maupun tumbuhan, mempunyai peranan besar dalam berbagai industri. Kemampuan proteolisis dari jenis enzim ini telah banyak diaplikasikan pada industri-industri pangan seperti pembuatan roti, pembuatan keju, penjernihan bir, pengempuk daging, dan lain-lain (Smith, 1995).

Pemanfaatan dalam industri roti disebabkan enzim protease dapat mengubah sifat viskositas adonan dengan menghidrolisis ikatan peptida pada protein gluten. Enzim protease juga menghidrolisis protein adonan roti yang menghasilkan asam-amino yang kemudian bereaksi dengan gula selama pemanggangan roti sehingga menimbulkan aroma dan warna yang diinginkan (Eskin, 1990).

Pada pembuatan keju, enzim protease menghidrolisis kasein susu menjadi peptida yang lebih pendek sehingga misel kasein tidak stabil dan kasein mengendap membentuk keju, dan berperan dalam ripening keju yang menentukan rasa, aroma dan tekstur keju (Scoot, 1986; Creamer and Olson, 1982).

Penghilangan kekeruhan pada bir. Kekeruhan terjadi karena pengaruh suhu dingin selama penyimpanan maupun presipitasi protein oleh senyawa fenol, (Siebert and Lynn, 1997). Penggunaan enzim protease merupakan salah satu metode yang efisien untuk mencegah terjadinya kekeruhan. Protein pada bir dihidrolisis menjadi peptida-peptida yang lebih pendek, sehingga mencegah terjadinya pengendapan (Vielettaz and Dobourdien, 1991).

#### **2.5 Daging Sapi**

Daging merupakan bahan makanan utama yang dikonsumsi manusia, baik diperoleh dari hewan-hewan piaraan atau hewan-hewan buruan (Hadiwiyoto, 1983).

Daging juga didefinisikan sebagai semua jaringan hewan dan semua produk hasil pengolahan jaringan-jaringan tersebut yang sesuai untuk dimakan serta tidak menimbulkan gangguan kesehatan. Organ-organ misalnya hati, ginjal, otak, paru-paru, jantung, limpa, pankreas, dan jaringan otot termasuk dalam definisi ini. Komposisi daging sapi ditampilkan pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.2** Komposisi Daging Sapi (Soedarmo, 1974)

Komponen	Kadar (per 100 g bahan)
Kalori	207 Kal
Protein	18.8 g
Lemak	14 g
Karbohidrat	0 g
Ca	10 mg
P	200 mg
Fe	2.2 mg
Vitamin A	40 SI
Vitamin B1	0,13 mg
Vitamin C	0 mg

Protein daging dapat diklasifikasikan dalam 3 kelompok besar, yaitu miofibril, stroma, dan sarkoplasma. Masing-masing protein memiliki fungsi yang berbeda yang memberikan kontribusi pada daging (Buckle *et al.*, 1985).

Komponen protein miofibril yang terpenting dalam struktur serabut otot adalah aktin dan miosin. Protein miofibril merupakan protein yang berlimpah dalam otot dan penting dalam proses kontraksi (mengejang) dan relaksasi (istirahat) otot. Saat kontraksi otot, aktin dan miosin akan saling membentuk formasi tumpang tindih dan membentuk protein kompleks yang disebut aktomiosin (Soeparno, 1994).

Stroma terdiri dari kolagen, elastin dan retikulin. Kolagen merupakan protein yang banyak ditemukan dalam organ tanduk, bagian ujung kaki, tulang, kulit, urat (tendon), tulang rawan, dan otot. Kolagen berwarna putih, tipis, transparan, dan keras. Pada daging, kolagen merupakan faktor utama yang mempengaruhi kemampuan daging setelah proses pemasakan. Pemasakan pada suhu tertentu akan

mengubah kolagen yang keras menjadi gelatin yang sifatnya empuk (Soeparno, 1994).

Elastin dapat ditemukan pada dinding sistem sirkulasi dan jaringan ikat yang tersebar diseluruh tubuh dan berperan memberikan elastisitas pada jaringan. Elastin berwarna kekuningan. Berbeda dengan kolagen, elastin tidak akan larut bila dipanaskan dan harus dipisahkan dari bagian daging. Retikulin jumlahnya lebih sedikit bila dibandingkan kolagen dan elastin, dan umumnya terdapat pada hewan yang muda (Bahar, 2003).

### 2.5.1 Struktur Otot Daging

Struktur otot merupakan struktur yang lurus dan panjang yang dibungkus oleh membran halus transparan yang disebut sarkoplasma. Sarkoplasma berbentuk gel atau sel yang lengket. Serabut otot berdiameter 10-100 mikron. Zat-zat seperti mineral, vitamin dan enzim, mioglobin dan sebagian protein terdapat dalam sarkoplasma didalam serabut otot (Winarno, 1993).

Otot tersusun dari banyak ikatan serabut otot yang lazim disebut fasikuli. Fasikuli ini terdiri dari serabut-serabut otot, sedangkan serabut otot tersusun dari banyak fibril yang disebut miofibril. Miofibril tersusun dari banyak filamen yang disebut miofilamen. Jadi berdasarkan urutan ukuran (dari ukuran terbesar sampai dengan ukuran yang terkecil), otot tersusun dari fasikuli, serabut otot, miofibril dan miofilamen (Soeparno, 1994).

Didalam serabut otot terdapat serabut yang lebih halus disebut miofibril, dengan garis tengah 1-3 mikron. Adanya penampakan strip-strip pada serabut otot, yang terlihat dibawah mikroskop, biasanya disebabkan adanya miofibril tersebut. Miofibril terdiri atas bagian yang lebih kecil lagi yang disebut miofilamen. Miofilamen tersebut ada yang tebal (100Å) ada pula yang tipis (10Å), yang letaknya saling bergantian sepanjang miofibril. Miofilamen yang tebal mengandung aktin. Baik miosin maupun aktin adalah molekul-molekul protein yang tidak simetris.

Aktin ada dua jenis, yaitu globular (monomer) dan fibriler, yaitu bentuk polimer dari monomer tersebut (Fogle *et al.*, 1986).

Bila otot berkontraksi atau setelah ternak dipotong, aktin globuler polimerisasi membentuk aktin fibriler dan membentuk ikatan kompleks dengan miosin yang terdapat pada daging, dalam bentuk aktomiosin, di samping itu jenis protein ketiga yang disebut tropomiosin juga terdapat pada bagian yang berkontraksi dalam daging (Buckle *et al.*, 1985).

### 2.5.2 Mekanisme Pengempukan Daging Menggunakan Enzim Protease

Salah satu penilaian mutu daging adalah sifat keempukannya yang dapat dinyatakan dengan sifat mudahnya dikunyah (Winarno, 1995). Faktor yang mempengaruhi keempukan daging digolongkan menjadi faktor *entemortem* seperti genetik dan *postmortem* yang diantaranya meliputi metode penyimpanan dingin, pelayuan dan pembekuan termasuk lama dan temperatur penyimpanan, dan metode pengolahan, pemasakan dan penambahan bahan pengempuk.

Penggunaan enzim untuk pengempuk daging disebabkan oleh kemampuan enzim tersebut menghidrolisis protein daging (Löffler, 1986). Hidrolisis protein-protein daging akan menurunkan integritas dari protein penyusun sehingga menyebabkan daging menjadi lunak (Fogle *et al.*, 1986).

Enzim protease dari tanaman yang biasa digunakan untuk pengempukan daging adalah papain. Untuk mendapatkan daging yang empuk telah diusahakan berbagai cara, diantaranya penambahan larutan enzim pada potongan-potongan daging yang tipis sebelum pemasakan. Cara pencelupan daging dalam larutan yang mengandung enzim proteolitik tanaman juga dapat dipergunakan, tetapi enzim biasanya tidak cukup mampu menetrasi daging, sehingga bagian dalam daging tidak terpengaruh (Suparno, 1994). Untuk mendapatkan penyebaran enzim lebih merata, dilakukan beberapa usaha diantaranya dengan menusuk-nusuk daging dengan garpu sebelum diberi papain dan dengan penyuntikan larutan enzim ke dalam berbagai tempat di dalam daging (Winarno, 1995).

## 2.6 Kedelai

Kacang kedelai tergolong bahan makanan yang mempunyai susunan zat makanan lengkap, mengandung hampir semua zat makanan yang diperlukan tubuh dalam jumlah yang tidak sedikit (Soedarmo, 1974).

Kedelai selain mengandung protein yang tinggi, juga mengandung lemak dan vitamin serta mineral yang penting, karena itu kedelai sering mendapat julukan sebagai *gold from soil* (Sumarno dan Hartono, 1985). Komposisi kedelai secara rinci seperti terlihat pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.3** Komposisi Kedelai

Komponen	Kedelai Basah (jumlah per 100 g bdd)	Kedelai Kering (jumlah per 100 g bdd)
Protein (g)	30.2	34.1
Lemak (g)	15.6	18.1
Karbohidrat (g)	30.1	34.8
Kalsium (mg)	196.0	227.0
Fosfor (mg)	508.0	585.0
Besi (mg)	6.9	8.8
Vitamin A (SI)	95.0	110.0
Vitamin B1 (mg)	0.93	1.07
Air (g)	20.0	7.5
Bagian dapat dimakan (%)	100	100

Sumber : (Soedarmo, 1974)

Protein merupakan bagian utama pada kedelai. Sekitar 90% dari protein kedelai adalah globulin yang terdapat sebagai protein cadangan, sisanya merupakan enzim-enzim intraseluler (lipoksigenase, urease, amilase), hemaglutinin, protein inhibitor dan lipoprotein membran (Kinsella, 1979). Komponen utama dari protein cadangan pada kedelai akan sangat berpengaruh terhadap mutu dari produk pangan yang dihasilkan, terutama pada sifat fisik dan nilai gizinya (Mori *et al.*, 1981).

**Tabel 2.4** Komposisi Asam Amino Esensial Biji Kedelai dan Asam Amino Esensial yang dianjurkan FAO (Winarno dan Rahman, 1974 dalam Susanto dan Sancto, 1994).

Asam Amino Esensial	Kedelai (g/100g bahan)	Pola FAO (g/100g bahan)
Isoleusin	4.8	4.3
Leusin	7.8	4.9
Lisin	6.5	4.3
Fenil Alanin	5.1	2.9
Tirosin	3.9	2.9
Mctionin	1.4	2.3
Treonin	4.2	2.9
Triptofan	1.3	1.4
Valin	5.0	2.9

Protein kedelai mempunyai asam amino lisin yang cukup tinggi sehingga dapat sebagai pelengkap pada sereal yang kekurangan asam amino lisin. sebaliknya protein kedelai mempunyai asam amino pembatas berupa mctionin (Suhardi, 1989). Komposisi asam amino esensial kedelai dibandingkan dengan asam amino standart FAO ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Protein kedelai dapat diklasifikasikan menurut sifat sedimentasinya. Menurut Wolf dan Cowan (1977), berdasarkan hasil fraksinasi, protein kedelai terdiri atas empat fraksi yaitu fraksi 2 S, 7 S, 11 S, dan 15 S. Distribusi protein kedelai secara rinci terlihat pada Tabel 2.4.

**Tabel 2.5** Komposisi Penyusun Fraksi-fraksi Protein Kedelai

Fraksi	Jumlah ( % Total )	Komponen	Berat Molekul
2 S	22	Tripsin inhibitor	8.000-21.500
7 S	37	Sitokrom C	12.000
		Hemaglutenin	110.000
		Lipoksigenase	102.000
		B amilase	61.000
11 S	31	7 S globulin	180.000-210.000
		11 S globulin	350.000
15 S	11	15 S globulin	600.000

Sumber : (Wolf dan Cowan, 1977)

Globulin 7 S merupakan glikoprotein yang mengandung 3,8-5,4% karbohidrat, mengandung sembilan residu terminal amino dan kesembilan polipeptida tersebut akan mengalami sejumlah reaksi (Wolf dan Cowan, 1997).

Struktur kuartener globulin 7 S tersusun dari enam kombinasi yang berbeda dari tiga sub unit yaitu  $\alpha$  mempunyai berat molekul 57.000,  $\alpha'$  mempunyai berat molekul 56.000 dan  $\beta$  mempunyai berat molekul 42.000, dan berikatan melalui interaksi hidrofobik (Utsumi dan Kinsella, 1985). Globulin 7 S tidak mengandung grup sulfhidril dan kandungan asam amino sulfurnya sangat rendah (Yu dan Damodaran, 1991).

Globulin 11 S mengandung delapan glisin, dua fenil alanin, dan dua leusin residu terminal amino per mol, sedikit mengandung karbohidrat dan mempunyai sub-sub unit yang berbeda dalam muatan maupun berat molekul (Iwabuchi dan Yamauchi, 1987). Globulin 11 S merupakan struktur kuartener yang terdiri dari dua belas sub unit dalam setiap heksamer yang identik. Tiga sub unit dalam setiap heksamer tersebut bersifat asam dan lainnya bersifat basa. Setiap pasangan dari sub unit asam dan basa dihubungkan dengan ikatan di sulfida, (Yu dan Damodaran, 1991).

Menurut Iwabuchi dan Yamauchi (1987), pasangan-pasangan unit pada struktur kuartener dari globulin 11 S, masing-masing mempunyai berat molekul sekitar 54.000-64.000 dan setiap pasang sub unit tersebut mempunyai pola umum yaitu A-SS-B. A mewakili suatu sub unit asam dengan berat molekul 34.000-44.000 dan B mewakili suatu sub unit basa dengan berat molekul 20.000. Perbedaan struktur dari globulin 7 S dan 11 S berperan dalam bervariasinya sifat fungsional makanan yang dihasilkan, seperti sifat pembentukan gel, daya ikat komponen cita rasa, suhu penggumpalan, kelarutan, dan kandungan nitrogen serta sulfur (Suhardi, 1989).



## 2.7 Kasein

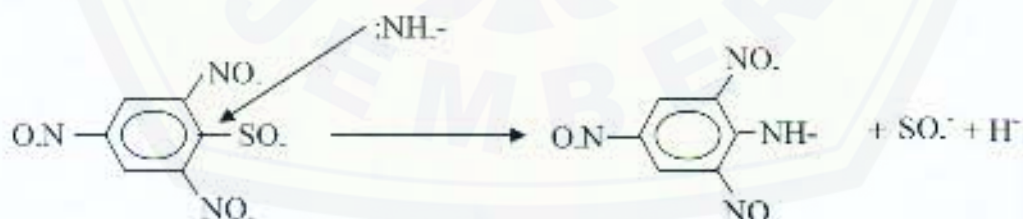
Protein dalam susu dapat dibagi dibagi dua fraksi, yaitu kasein dan protein serum. Kasein merupakan 80% dari seluruh protein susu. Kasein merupakan senyawa fosfo-gliko-protein berbentuk misela dengan diameter  $0,1\mu$ , berikatan dengan kalium fosfat dan sitrat yang meliputi 75% protein dari susu sapi. Kasein alami terdiri atas protein 94%, kalsium (Ca) 35%, fosfor (P) 2,2%, asam sitrat 0,5%, dan magnesium (Mg) 0,1%. Kasein dapat dipisahkan menjadi tiga fraksi utam yaitu  $\alpha$ -kasein,  $\beta$ -kasein dan kappa-kasein.  $\alpha$ -kasein terdiri dari 50%,  $\beta$ -kasein sekitar sepertiga, dan kappa-kasein sekitar 15% dari senyawa kompleks kasein.. Baik  $\alpha$ -kasein maupun  $\beta$ -kasein dapat diendapkan oleh ion-ion kalsium yang terdapat dalam susu asal tidak ada senyawa lain yang disebut calcium-insentive kappa-kasein. Adanya kalsium insentive kappa-kasein menyebabkan kompleks menjadi stabil (Winarno, 1995).

Terbentuknya struktur misela dan tersuspensinya kasein dalam fase berair disebabkan oleh fraksi  $\alpha$ -kasein, yang bersifat hidrofilik dan melapisi fraksi protein hidrofobik. Adanya tiga fraksi kasein ( $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$ ) dibedakan berdasarkan mobilitas elektroforesanya. Fraksi  $\alpha$  dibedakan menjadi  $\alpha_1$  dan Kappa-kasein yang mempunyai BM antara 19.000-31.000. Kappa (K)-kasein merupakan komponen yang sangat menentukan struktur misela yang dapat dipecah oleh rennet menjadi para-kappa-kasein dan glikopeptida yang larut. Pemecahan ikatan fenilalanin-metionin dari (K) kappa-kasein membebaskan makro glikopeptida yang mengakibatkan bagian permukaan hidrofilik misela hilang. Hasil pemecahan menyisakan suatu masa rantai hidrofobik akan membentuk kurd yang bersifat tidak larut, seperti pada pembuatan keju. Kasein mengandung lisin, kekurangan sistin (0,4%) tetapi kaya akan metionin (kira-kira 3%); dapat dihidrolisis menjadi oligopeptida yang larut dan mudah dicerna (Makfoeld, 2002).

## 2.8 Darajat Hidrolisis

Hidrolisis protein adalah proses terputusnya ikatan peptida menjadi molekul yang lebih sederhana. Parameter yang umum digunakan untuk menggambarkan hasil proses hidrolisis adalah derajat hidrolisis (DH), yang digunakan sebagai indikator terjadinya hidrolisis (Van der Ven, 2002). DH adalah salah satu parameter dasar yang perlu dikendalikan karena sifat dari hidrolisat protein berhubungan erat dengan DH (Nielsen dalam Damodaran, 1997). DH diartikan sebagai perbandingan jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis per jumlah total ikatan peptida per gram protein (Van der Ven, 2002). Beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengukur DH adalah metode pH stat, OPA, TNBS, osmometry, ninhydrin, titrasi formol, nitrogen terlarut, brix, index TCA, panjang rantai peptida, perubahan pH, viscositas dan titrasi pH dasar (Damodaran, 1997).

Asam Trinitrobenzen Sulfat (TNBS) merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan dalam industri, untuk menentukan konsentrasi asam amino bebas. Metode ini ditetapkan untuk analisis hidrolisis enzimatis dan pertama kali digunakan oleh Satake *et al.*, (1960) setelah itu disempurnakan oleh Nissen (1979). Metode TNBS merupakan pengujian secara spektrofotometrik pada bentuk kromofor melalui reaksi kimia antara TNBS terhadap kelompok amino primer sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.2.



**Gambar 2.2** Reaksi TNBS dengan Asam Amino

Reaksi tersebut terjadi pada kondisi alkali, yang dilakukan dengan menambahkan larutan buffer bikarbonat pH 8,2 dan pada kondisi gelap (ruangan gelap), karena TNBS bersifat sensitif terhadap cahaya. Pada konsep TNBS yang

dikembangkan oleh Nissen (1979), dapat pula digunakan Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) untuk memecah asam amino dalam reaksi yang lebih sempurna/lebih baik.

Reaksi berakhir dengan menurunkan pH menggunakan asam dan terbentuk warna kuning cerah yang disebabkan oleh penyerapan cahaya pada bentuk kromofor. Intensitas warna dapat diukur pada absorbansi atau densitas optik yang secara linier berkaitan erat dengan konsentrasi asam amino bebas.

Derajat hidrolisis antara lain dipengaruhi oleh jenis substrat dan enzim yang diuji. Penelitian sebelumnya, derajat hidrolisis beberapa substrat yang dihidrolisis oleh enzim protease biduri yaitu soluble casein sebesar 12,72%, isolat koro pedang 2,94%, daging sapi 3,29%, dan ikan segar 3,18% (Prathama, 2005). Pada Tabel 2.5 ditunjukkan nilai DH substrat yang dihidrolisis oleh enzim papain dan enzim protamex<sup>TM</sup> (Nusantara, 2005; Suryaningsih, 2005) :

**Tabel 2.6** Nilai Derajat Hidrolisis (DH) Enzim Protamex<sup>TM</sup> dan Enzim Papain

Jenis Enzim	Jenis Substrat	Perbandingan Enzim : Substrat (gr)	Nilai DH
Enzim Protamex <sup>TM</sup>	Isolat Koro Pedang (hidrolisis 30 menit)	0.265 : 1	4.928
Enzim Papain	Ikan (hidrolisis 30 menit)	0.002 : 1	39

## 2.9 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 (Robyt and White, 1987). Menurut Winarno (1995), aktivitas spesifik hanya dapat digunakan untuk preparat enzim yang murni, yaitu jumlah satuan enzim per miligram enzim protein meskipun kadang-kadang aktivitas spesifik dapat pula digunakan preparat yang tidak murni. Jika aktivitas enzim murni diketahui, maka derajat kemurnian enzim pada suatu preparat enzim dapat ditentukan. Beberapa pengujian enzim menggunakan suhu 37°C, namun belum ada standart 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 pada buah melon (Noda *et al.*, 1994), protease dari biji padi (Abe *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).

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



### BAB 3. METODELOGI PENELITIAN

#### 3.1 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.1.1 Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging sapi segar, kedelai putih, protease yang diekstrak dari tanaman biduri, enzim papain dari Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, paya dari pasar tanjung jember dan poririnsen dari aneka kimia jember. Bahan kimia yang digunakan adalah jenis Pro Analyti, Merck, Jerman yaitu 0,05 M buffer Phospat pH 7 dan 4% pH 8,2 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M, dan 4%), soluble casein, NaOH 2N, larutan TCA 15%, reagen mix-lowry ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Natrium Kalium tartat 2%, dan  $\text{CuSO}_4$  1%), follin, reagen TNBS, HCl 1N.

##### 3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : blender stainless steel, centrifuge Medifiger, spectronic 21 D Melton Roy, pH meter Jen Way tipe 3320 (Jerman), magnetik stirrer Stuart, vortex Thermolyne 16700, lemari pendingin by Freezetechn, waterbath GFL 1083, neraca analitic Ohaus, pemanas listrik Gerhardt, spatula, peralatan kaca, kain saring, pisau stainless stell, telenan, dan alat-alat gelas.

#### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2005 – Maret 2006.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Cara Menjalankan Penelitian

Pembandingan kinerja protease biduri terhadap protease komersial dilakukan pada tiga substrat yaitu kasein terlarut, kedelai (protein nabati), dan daging (protein hewani). Protease yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim biduri (P1), enzim papain(P2), paya (P3) dan poririnsen(P4). Diagram alir penelitian ditampilkan pada Gambar 3.1, 3.2, dan 3.3.

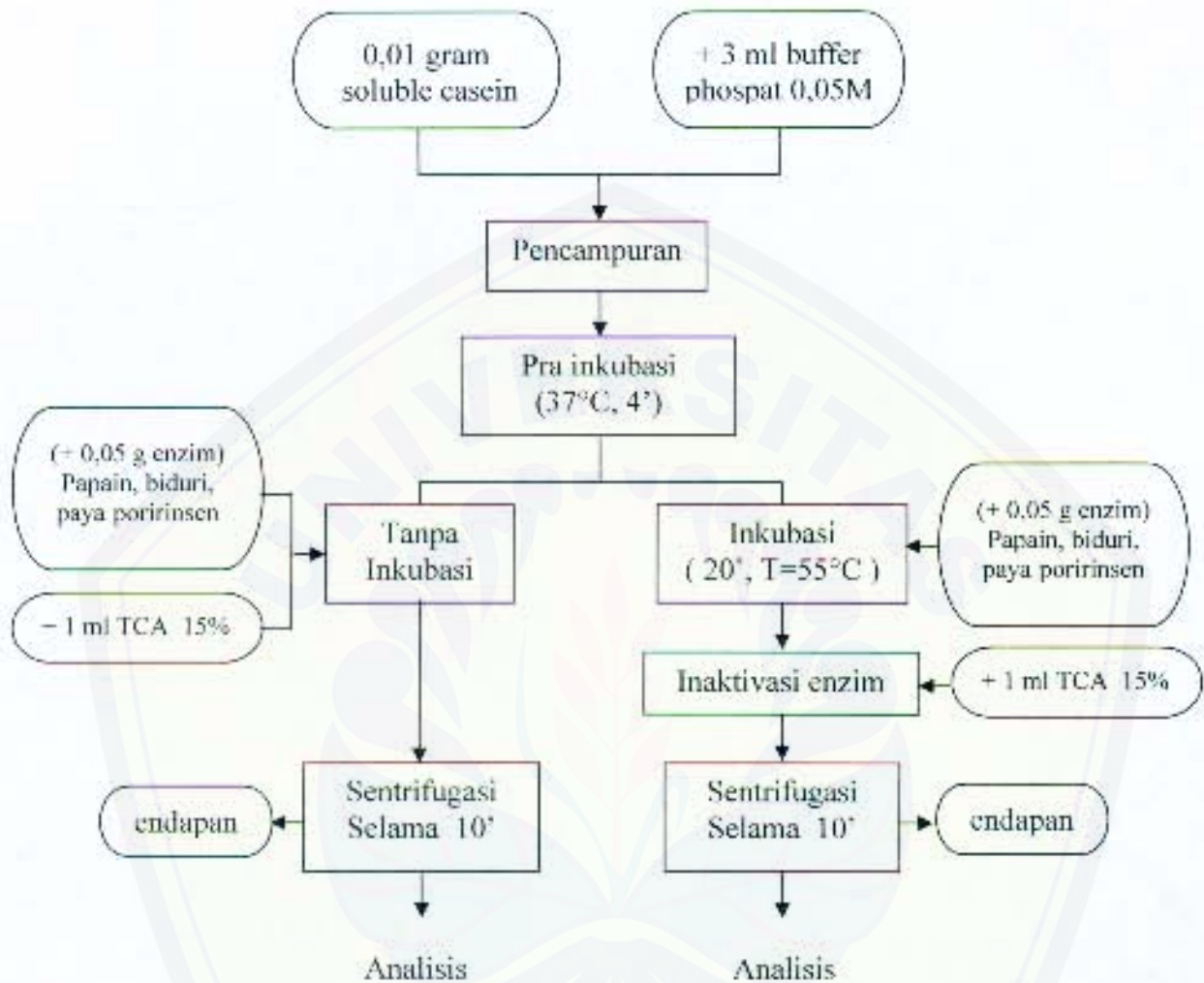
#### 3.3.2 Rancangan Penelitian

Analisa data dilakukan secara diskriptif (Suryabrata, 2002). Data yang diperoleh ditabulasi dan diploting dalam bentuk histogram. Semua perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

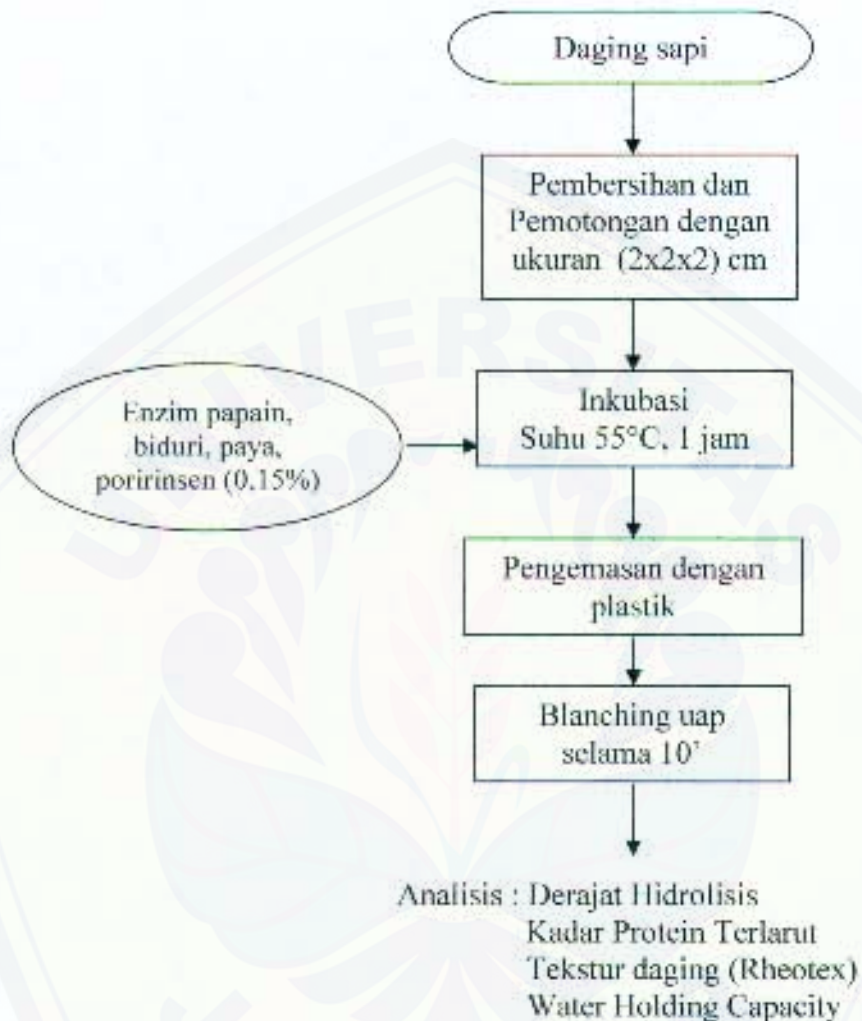
#### 3.3.3 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah :

- a. Derajat Hidrolisis (Metode TNBS, Apriyantono, *et al.*1989)
- b. Kadar Protein terlarut (metode Lowry, Walker., 1994)
- c. Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim Protease (Metode Lowry)
- d. Untuk daging dianalisis juga :
  1. Tekstur ( Metode Rheotex)
  2. WHC (Water Holding Capacity) (Subagio, dkk, 2003)

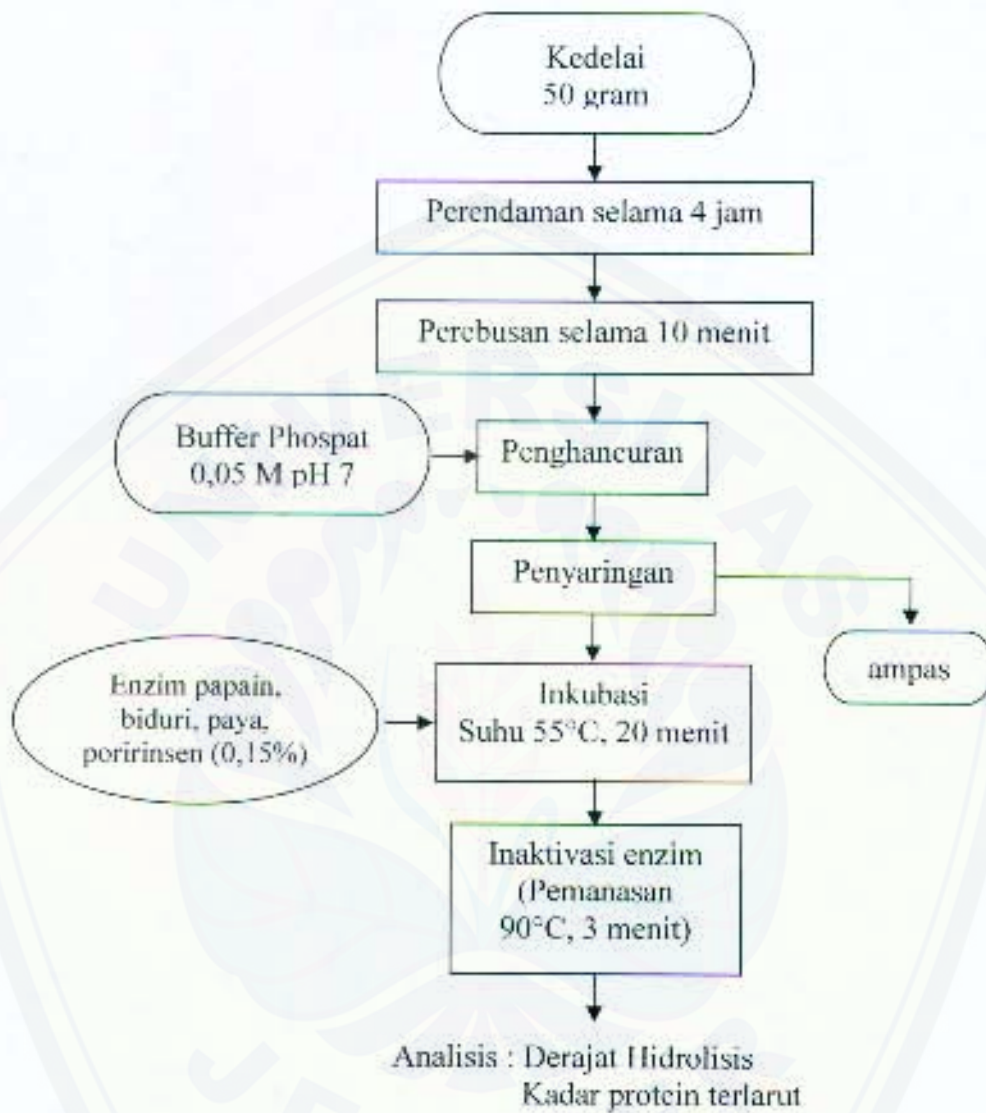


Gambar 3.1 Diagram Alir Pengujian Kinerja Enzim Protease pada Soluble Casein



Gambar 3.2 Diagram Alir Pengujian Kinerja Enzim Protease pada Substrat Daging





**Gambar 3.3** Diagram Alir Pengujian Kinerja Enzim Protease pada Substrat Kedelai

### 3.4 Prosedur Analisis

#### 3.4.1 Derajat Hidrolisis (Metode TNBS, Apriyantono, *et al.*1989)

Derajat hidrolisis ditentukan dengan konsentrasi asam amino. Sampel dihidrolisis dengan larutan buffer fosfat 4% (w/v) pH 8,2 dan larutan TNBS selama 2 jam pada suhu 40°C. Ditambahkan HCl 1 N dan ditera absorbansinya pada panjang gelombang 340 nm. Untuk menentukan besarnya Derajat Hidrolisis (DH), jumlah ikatan peptida yang dipecah per gram protein ( $h$ ) dapat diketahui dengan memadukan nilai konsentrasi protein yang diperoleh melalui metode TNBS dengan nilai konsentrasi protein yang diperoleh melalui metode lowry. Jumlah ikatan peptida per gram protein ( $h_{total}$ ) sebesar 7,8 (untuk kedelai), 8,2 (untuk kasein), dan 7,6 (untuk daging) (Nissen, 1979).

$$DII = \frac{h}{h_{total}} \times 100\%$$

Keterangan :  $h$  = Jumlah ikatan peptida yang dipecah per gram protein

$$h = (\text{Glysin-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ mcgv/gr protein}$$

$$\text{Glysin-NH}_2 = (\text{Protein}_{\text{TNBS}}) / ([\text{Protein}_{\text{LOWRY}}] \times 75 / 1000)$$

$$\alpha \text{ kedelai} = 0.970 \quad \alpha \text{ casein} = 1.039 \quad \alpha \text{ daging} = 1.00$$

$$\beta \text{ kedelai} = 0.342 \quad \beta \text{ casein} = 0.383 \quad \beta \text{ daging} = 0.40$$

$h_{total}$  = Jumlah total ikatan peptida per gram protein, yang besarnya 7,8 (kedelai), 8,2 (casein), 7,6 (daging)

#### 3.4.2 Kadar protein terlarut ( Metode Lowry, Walker., 1994)

Menimbang 1 gram sampel daging kemudian dihaluskan dan ditambah aquades 4 ml. Setelah diencerkan kemudian disentrifuge selama 6-10 menit. Supernatan sebanyak 0,125 ml ditambah 0,1 ml NaOH 2N dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan. Ditambahkan 2,5 ml reagen mix, vortex dan dibiarkan 10 menit. lalu ditambahkan 0,25 ml follin, vortex dan diamkan 30 menit. tambahkan aquadest hingga 5 ml (+2.025 ml aquades) dan ditera absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm.

### 3.4.3 Aktivitas Protease (Metode Lowry)

Pengujian aktivitas enzim protease menggunakan substrat soluble casein pada pH optimal, dilakukan dengan menimbang 0,01 gram soluble casein dalam tabung sentrifuge lalu dicampur dengan 0,05 M buffer phospat pH 7 dan dilakukan prainkubasi pada suhu 37°C dengan lama waktu 4 menit. Menambahkan enzim protease 0,05 gram, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 20 menit. Pada akhir inkubasi, reaksi hidrolisis dihentikan dengan penambahan larutan TCA 15% yang ditambahkan sebanyak 1 ml. Untuk kontrol tidak dilakukan inkubasi, tidak dihidrolisis, dan penambahan larutan TCA 15% dilakukan sebelum penambahan enzim protease. Kemudian disentrifuge pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh diambil 1 ml lalu ditambahkan 2,5 ml mix-lowry dan dibiarkan selama 10 menit. Ditambahkan 0,250 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Tambahkan aquadest sampai volumenya 5 ml dan dibaca absorbansinya dengan spektrometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standart tirosin untuk dihitung aktivitas hidrolisisnya.

Aktivitas protease dinyatakan dalam unit aktivitas. Satu unit berarti peningkatan konsentrasi protein terlarut sejumlah satu  $\mu\text{mol}$  pada setiap menit waktu inkubasi. Perhitungan aktivitas enzim dapat menggunakan rumus sebagai berikut :

$$1 \text{ unit aktivitas} = \frac{[C]}{t} \times \frac{1000}{181,19}$$

keterangan [C] = konsentrasi protein terlarut ( $\mu\text{mol}$  tirosin)

t = waktu hirolisis (menit)

181,19 = berat molekul tirosin

*1 unit : 1  $\mu\text{mol}$  tirosin yang dibebaskan dari substrat oleh setiap mg enzim pada suhu 37°C per menit.*

$$\text{Total Aktivitas} = \text{Aktivitas} \times \frac{\text{ml enzim}}{\text{ml yang di analisis}}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Total Aktivitas}}{\text{Total Protein}}$$

#### 3.4.4 Tekstur (Metode Rheotex)

Power dinyalakan, jarum penekan dipasang diatas tempat test. Kemudian menekan tombol distance dengan besaran 0,5 mm dan tekan juga tombol hold. Kemudian meletakkan daging yang telah ditiriskan tepat dibawah jarum rheotex, kemudian menempatkan ujung jarum sampai menyentuh permukaan daging. Kemudian menekan tombol start beberapa detik sampai terdengar bunyi tanda selesai, yang dilanjutkan dengan membaca angka yang ditunjukkan oleh jarum rheotex dengan satuan (g).

#### 3.4.5 Water Holding Capacity (WHC) (Subagio, dkk, 2003)

Menimbang tabung sentrifuge kering ditimbang (a gram). Kemudian menimbang 0,2 gram sampel plus tabung (b gram). Lalu ditambah 10 ml aquades lalu di vorteks hingga menyatu dan sentrifuge selama 7 menit. Bagian supernatan dibuang dan endapan yang tertinggal ditimbang (c gram).

$$\text{WHC} = \frac{c - b}{b - a} \times 100\%$$

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai perbandingan kinerja protease biduri dengan protease komersial, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Enzim biduri mampu menghidrolisis dan menghasilkan kandungan protein terlarut tertinggi kedua setelah enzim papain hampir pada semua substrat.
2. Aktivitas spesifik enzim biduri tertinggi yaitu sebesar 0,0402 unit/mg protein dibandingkan jenis enzim lain yang diteliti.
3. Enzim protease biduri mampu menghasilkan keempukan daging di bawah kemampuan papain dan paya namun di atas poririnsen, sedangkan water holding capacitynya ada di bawah enzim papain.

### 5.2 Saran

Untuk mengembangkan enzim protease biduri secara komersial perlu dilakukan uji spesifikasi yang lebih lengkap sehingga dapat menentukan jenis penggunaannya, juga perlu dilakukan perbandingan pada fraksi substrat yang sama dari berbagai bahan.



- [http://www.mediaindo.co.id/mewsprint.asp?Id:2004090705809&Jenis=c&cat\\_name=Opini](http://www.mediaindo.co.id/mewsprint.asp?Id:2004090705809&Jenis=c&cat_name=Opini). Diakses 12 April 2005
- Iwabuchi, S., and F. Yamauchi. 1987. Electrophoretic Analysis of Whey Protein Present an Soybean Globulin Fraction. *J Agric. Food Chem.*, 35: 205-209.
- Jiang, S.T., M.W. Moody and H.C.Chen. 1991. *Purification and Characterization of Protease from Digestive Tract of Grass Shrimp*. *J. Food Sci.*, 56 (2), 332-326.
- 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
- Kinsella, J.E. 1979. *Functional Properties of Soybean Protein*. *J Am. Oil Chem. Soc.* 56: 242-246
- Kolodziejska, Szie, Magdalena and S. Sikorski. (1994): Proteolytik Activity of Crude Enzyme Extracts of Scuid illex argentinus liver. *J. Food Biochem.*,18, 43-53.
- Kuntaraf, J., Kathleen, I.K. 1984. *Makanan Sehat*. Indonesia Publishing House. Bandung.
- Lawrie, R.A. 1995. *Ilmu Daging*. UI-Press. Jakarta.
- Leevit, S. And Pornsuksawang. 1988. *Protease from Bacteria in Soybean Whey*. *Proc. Food Science and Technology in Industrial Development*. Vol.1.(Ed Nabepoon).pp. 751-754. Thailand.
- Lehninger. 1997. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Terjemahan. Thenawidjaja M.Y. Erlangga. Surabaya.
- Löffler, A. 1986. Proteolytic Enzymes : Source and Applications. *J. Food Tech.*, 40, 63-70.
- Makfoeld, D 2002. *Kamus Istilah Pangan dan Nutrisi*. Kanisius. Yogyakarta,
- Muchtadi. 1992. *Enzim Dalam Industri Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktur Jendral Perguruan Tinggi Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Muhidin, D. 1999. *Agroindustri : Papain dan Pektin*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Muntaminah, M. 2002. *Sifat Daging Olah Pasca Inkubasi Dengan Proteasde Dari Tanaman Biduri*. Skripsi Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, Jember.
- Nissen, J.A. 1979. *Determination Of The Degree Of Hydrolysis Of Food Protein Hydrolysates By Trinitrobenzensulfonate Acid*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.27, 1256-1262

- Polgar, L. 1989. *Mechanisms of protease action*. Pgs. 43-76. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Prathama, S. 2005. Karakterisasi Enzim Protease Dari Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) Hasil Ekstraksi Menggunakan Amonium Sulfat. Sripsi Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, Jember.
- Rao, M.B., A.M. Tanksale., M.S. Ghatge, and V.V. Desphande. (1998): *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease*, American Society for Microbiology.
- Reed, G. 1975. *Enzymes In Food Processing*. Academic Press Inc. New York.
- Schwimmer, S. 1981. *Source Book of Food Enzymology*. The Avi Publishingm Company, Inc. Westport, Connecticut, U.S.A.
- Scout, R. 1986. *Cheesemaking Practice*. Elsevier Applied Science Publisher. New York.
- Smith, J.E. 1995. *Bioteknologi*. Terjemahan. Hartono, EGC, Jakarta
- Soedarmo, P. 1974. *Ilmu Gizi*. Dian Rakyat. Bogor.
- Soeparno. 1994. *Ilmu dan Teknologi Daging*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Stenis, T. (1992): *Flora*. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Sudarmadji, S., B. Haryono., dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Suhartono, M. T., L.N. Lestariono., dan T. Tanoyo. (1995): *Study on Protease from Aspergillus oryzae Isolated from Soy Sauce Processing in Indonesia*. *J. Indonesia Trop. Agric.*, 6 (2), 21-25
- Suhardi. 1989. *Kimia dan Teknologi Protein*. PAU. Pangan dan Gizi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Sumarno dan Hartono. 1983. *Kedelai dan Cara Bercocok Tanamnya*. Buletin Teknik Puslitbangtan. No.6 Jakarta.
- Suryaningsih, A. 2005. *Karakterisasi Hidrolisat Protein Dari Ikan Kuniran (Upeneus Sp) Menggunakan Enzim Papain*. Skripsi Universitas Jember. Jember.
- Susanto, T., dan B. Sareto. 1994. *Teknologi Pengolahan Hasil Pertanian*. Bina Ilmu. Surabaya.
- Thompson, E. H., I.D. Wolf., and C.E. Allem. (1973): *Ginger Rhizome: a New Source of Proteolytic Enzyme*. *J. Food Sci.*, 38, 652-655.

- Titania, B. (2001): *Papain untuk Pengolahan Daging Ternak*. Bandung.
- Utsumi, S., and J.E. Kinsella. 1985. Structure Function Relationships in Food Protein Sub Unit Interaction in Heat Induced Gelation of 7S, 11S and Soy Isolate Protein. *J Agric Food Chem.*, 33:297-302.
- Van der Ven, C. (2002): *Biochemical and Functional Characterisation of Casein and Whey Protein Hydrolysates*. Wageningen University, Netherland.
- Vielettaz, J. C. and D. Dobourdien. (1991): *Enzyme in Winemaking in Food Enzymology* (Ed.Fox), 1-63 Elsevier Applied Science, New York.
- Whittaker, J.R. 1994. *Principle og Enzymology for The Food Science*, Second Edition, Marcel Decker, New York.
- Winarno, F. G. 1993. *Pangan, Gizi, Teknologi Dan Konsumen*. Gramedia. Jakarta.
- \_\_\_\_\_. 1995. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.
- \_\_\_\_\_. 1984. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia. Jakarta
- Witono, Y. 2000. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Biduri (Calotropis gigantea Dryand)*, Thesis Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Witono, Y., A. Subagio., W.S. Windrati., dan M. Muntamimah. (2002): Sifat-sifat Daging Olah Pasca Inkubasi dengan Enzim Protease Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional - Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*, Malang.
- Wolf, T.K and J.C. Cowan 1977. *Soybean as a Food Source* sdidalam Graham. H.D. 1977. *Food Colloids*. The Avi Publishing. Co. Inc. Wesport, Connecticut.
- Wolke, R. 2003. *Kulo Einstein Jadi Koki*. Gramedia. Jakarta.
- Yamamoto, A. 1975. *Proteolytic Enzymes*. Academic Press, Inc., New York.
- Yu, M., and D. Damodaran. 1991. Kinectic of Destabilization of Soy Protein Foams. *J Agric. Food Chem.*, 39: 1563-1568.



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

1. Pembuatan stok larutan standart
  - a. Tirosin standart  
10 mg tirosin dilarutkan dalam 6ml HCl 0,1 N, setelah tirosin larut diencerkan dengan aquades sampai volumenya 10 ml.
  - b. Bovine Serum Albumin (BSA)  
10 mg Bovine Serum Albumin (BSA) dilarutkan dengan aquades sampai volumenya 10 ml.
2. Pembuatan Buffer Phospat 0,05 M
  - a.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M  
Menimbang 6,8995 gram  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dilarutkan sampai 1 liter aquades.
  - b.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05 M  
Menimbang 17,907 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dilarutkan sampai 1 liter aquades.
3. Pembuatan larutan TCA 15% ( $\frac{15}{100}$ )  
Menimbang 15 gram tri kloro asetat (TCA) dilarutkan dengan aquades sampai volume 100 ml.
4. Pembuatan reagen mix-lowry  
Menimbang 2 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam 100 ml aquades, setelah larut ditambahkan 1 ml  $\text{CuSO}_4$  1% dan 1 ml Na K Tartat 2%.
5. Pembuatan reagen follin  
Melarutkan 50 ml follin dalam aquades samapi volume 100 ml.
6. Pembuatan reagen Tri Nitro Benzen Sulfonat  
Melarutkan 200  $\mu\text{l}$  Reagen Tri Nitro Benzen Sulfonat dalam aquades sampai volume 10 ml.
7. Pembuatan NaOH 2 N  
Melarutkan 8 gram NaOH dalam aquades sampai volume 100 ml.

## 8. Pembuatan HCl 0,1 N

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

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

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

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

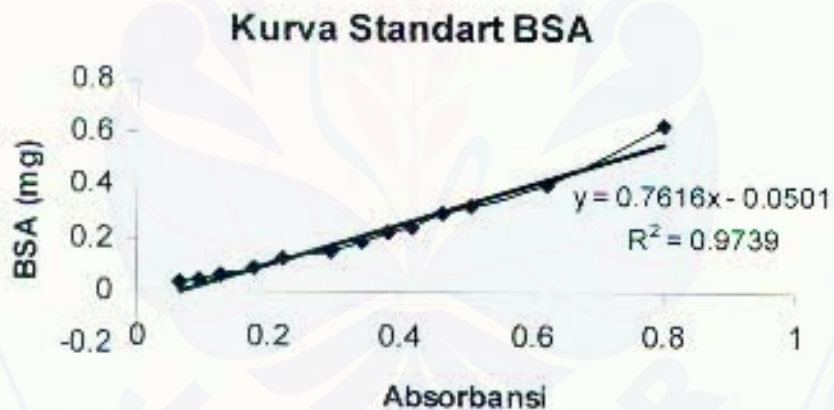
$$V_1 \cdot 12,003 = 100 \cdot 0,1$$

$$V_1 = 0,83$$

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

## Lampiran 2. Data dan Kurva BSA Standart

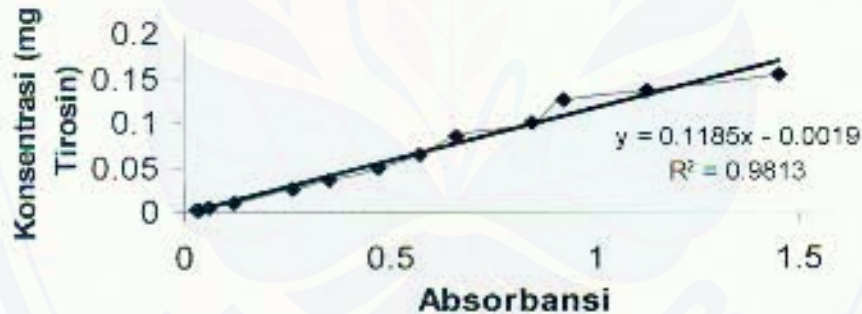
BSA ( $\mu$ l)	Absorbansi	BSA (mg)
30	0.065	0.03
45	0.096	0.045
60	0.127	0.06
90	0.178	0.09
120	0.221	0.12
150	0.295	0.15
190	0.341	0.19
220	0.38	0.22
240	0.418	0.24
300	0.465	0.3
320	0.508	0.32
400	0.623	0.4
625	0.802	0.625



## Lampiran 3. Data dan Kurva Tirosin Standart

tirosin ( $\mu$ l)	absorbansi	tirosin (mg)
1.5	0.028	0.0015
2	0.035	0.002
5	0.061	0.005
10	0.12	0.01
25	0.26	0.025
35	0.35	0.035
50	0.471	0.05
65	0.575	0.065
85	0.662	0.085
100	0.846	0.1
125	0.926	0.125
135	1.128	0.135
155	1.45	0.155

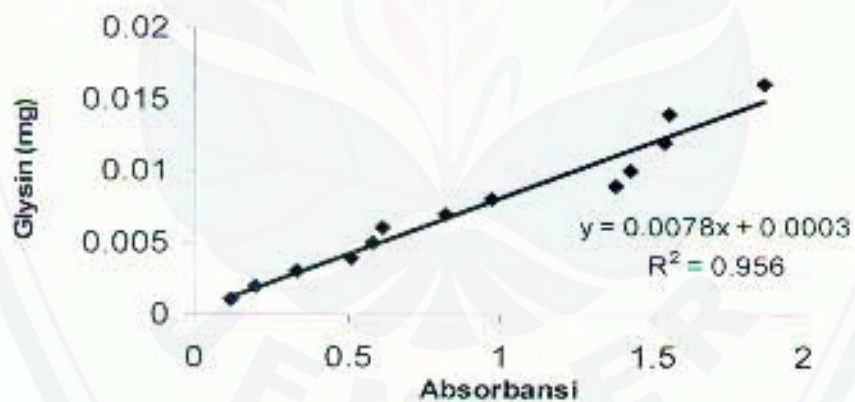
Kurva Standart Tirosin



## Lampiran 4. Data dan Kurva Glysine Standart (h)

glysin ( $\mu$ l)	absorbansi	glysin (mg)
10	0.119	0.001
20	0.202	0.002
30	0.336	0.003
40	0.51	0.004
50	0.585	0.005
60	0.617	0.006
70	0.825	0.007
80	0.972	0.008
90	1.386	0.009
100	1.43	0.01
120	1.543	0.012
140	1.558	0.014
160	1.872	0.016

Kurva standart Glysine



## Lampiran 5. Data Hasil Perhitungan Kadar Derajat Hidrolisis Pada Berbagai Substrat dan Jenis Enzim

## ➤ Daging

	absorbansi 3 kali ulangan			Rata2	mg protein	Protein (mg/ml)	DH
biduri	0.51	0.518	0.52	0.516	0.0043248	0.14416	1.249272
papain	1.02	1.02	1.113	1.051	0.0084978	0.28326	19.0945
paya	0.507	0.576	0.638	0.573667	0.0047746	0.159153333	1.463952
poririnsen	0.613	0.625	0.661	0.633	0.0052374	0.17458	2.29973

## ➤ Kedelai

sampel	absorbansi 3 kali ulangan			Rata2	mg protein	Protein (mg/ml)	DH (%)
biduri	0.428	0.453	0.464	0.448333	0.003797	0.126588667	5.448776
papain	0.942	1.12	1.302	1.121333	0.0090464	0.301548667	12.74339
paya	0.423	0.438	0.47	0.443667	0.0037606	0.125353333	8.311793
poririnsen	0.351	0.377	0.405	0.377667	0.0032458	0.108193333	7.444427

## ➤ Soluble Casein

sampel	absorbansi 3 kali ulangan			Rata2	mg protein	Protein (mg/ml)	DH (%)
biduri	0.881	0.882	0.891	0.884667	0.0072004	0.240013333	8.615385
papain	1.559	1.568	1.584	1.570333	0.0125486	0.418286667	16.67294
paya	0.043	0.054	0.084	0.060333	0	0	0
poririnsen	0.02	0.027	0.037	0.028	0	0	0

Lampiran 6. Data Hasil Perhitungan Kadar Protein Terlarut Pada Berbagai Substrat dan Jenis Enzim

## ➤ Daging

sampel	absorbansi 3 kali ulangan	Rerata	mg protein	Protein (mg/ml)
biduri	0.097	0.099	0.02428293	0.194263467
papain	0.396	0.407	0.25504773	2.040361867
paya	0.081	0.1	0.0230136	0.1841088
poririnsen	0.079	0.093	0.0169208	0.1353664

## ➤ Kedelai

sampel	absorbansi 3 kali ulangan	Rata2	mg protein	Protein (mg/ml)
biduri	0.419	0.43	0.2796728	2.2373824
papain	0.528	0.599	0.3847736	3.0781888
paya	0.325	0.33	0.21519067	1.721525333
poririnsen	0.318	0.344	0.19819707	1.593576533

## ➤ Soluble Casein

sampel	absorbansi 3 kali ulangan	Rata2	mg protein	Protein (mg/ml)
biduri	0.496	0.545	0.3581176	2.8849408
papain	0.539	0.576	0.38855067	3.082405333
paya	0.048	0.055	0	0
poririnsen	0.01	0.015	0	0

Lampiran 7. Data Hasil Perhitungan Aktivitas Pada Berbagai Jenis Enzim

➤ Aktivitas Spesifik (Unit/mg)

sampel	Rata2 Ti	Rata2 I	mg protein Ti	mg protein I	selisih (I-Ti)	Aktivitas (unit)	Aktivitas Spesifik (Unit/mg)
biduri	0.344333	0.93366667	0.0389035	0.1087395	0.069836	0.019271	0.040179772
papain	0.715667	1.125	0.0829065	0.1314125	0.048506	0.013385	0.009135905
paya	0.023667	0.10733333	0.0009045	0.010819	0.0099145	0.002736	0.004061756
porinsen	0.009667	0.01433333	0	0	0	0.000000	0

➤ Total Protein

sampel	absorbansi pada 3 kali ulangan	Rata2	mg protein	Total protein terlarut	Kadar total protein (%)
biduri	0.386	0.377	0.379	0.3806667	0.23981573
papain	1.052	1.017	1.014	1.0276667	0.73257093
paya	0.498	0.509	0.517	0.508	0.3367928
porinsen	0.029	0.027	0.019	0.025	0



**Lampiran 8. Data Hasil Pengamatan Tekstur Daging Pasca Inkubasi Pada Berbagai Jenis Enzim**

➤ **Nilai Tekstur Daging**

sampel	ulangan 1	ulangan 2	ulangan 3	Rerata						
biduri	380	390	373	356	354	370.11111				
papain	280	280	308	289	313	299	334	340	305.33333	
paya	346	348	367	352	345	368	321	307	338	343.55556
porinsen	413	429	431	437	414	413	430	428	372	418.55556

**Lampiran 9. Data Hasil Pengamatan WHC Daging Pasca Inkubasi Pada Berbagai Jenis Enzim**

➤ **Nilai WHC Daging**

sampel	WHC pada 3 kali ulangan			Rerata
biduri	27.8	28.22	27.41	27.81
papain	24.06	27.65	29.13	26.946667
paya	35.54	38.45	43.08	39.023333
porinsen	39.6	39.89	44.32	41.27

**Lampiran 10. Data Hasil Pengukuran pH Porinsen**

Ulangan	pH
1	5.02
2	4.94
3	4.99

