



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

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(S K R I P S I)**

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

**Oleh :
Soffahmi Prathama Susanti
011710101080**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2005**

Dosen Pembimbing :

Yuli Witono, S.TP., MP. (DPU)

Ir. Wiwik Siti Windrati, MP. (DPA I)

Ir. Hj. Siti Hartanti, MS. (DPA II)

MOTTO:

✽ *Jadikanlah sabar dan sholat sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah bersama orang-orang yang sabar.*

(Q.S. Al Baqarah :153)

✽ *Sesungguhnya disamping kesukaran ada kemudahan, maka apabila engkau telah selesai dari suatu urusan segera kerjakanlah urusan yang lain dengan sungguh-sungguh dan hanya kepada Allah kamu berharap.*

(Q.S. Al Insyirah :6-8)

Soffahmi Prathama Susanti (011710101080) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, "Karakterisasi Enzim Protease dari getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*) hasil ekstraksi menggunakan Amonium sulfat", dibimbing oleh Yuli Witono, S. TP., MP dan Ir. Wiwik Siti Windarti, MP.

RINGKASAN

Enzim protease merupakan enzim penghidrolisis protein, yaitu enzim yang memutus ikatan peptida pada rantai protein sehingga dihasilkan asam amino atau peptida berantai pendek. Enzim protease memiliki peranan penting dalam industri pangan, seperti pembuatan keju, penjernihan bir, pengempuk daging, pembuatan roti dan sebagainya. Setiap tahunnya kebutuhan enzim protease terus meningkat sehingga diperlukan sumber penghasil protease baru dari jaringan hidup seperti : mikroorganisme, hewan maupun tanaman. Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan jenis tumbuhan dataran pantai yang memiliki aktivitas proteolitik pada getahnya, selain tanaman pepaya, nanas dan *ficus sp.* Tanaman biduri dapat diharapkan sebagai alternatif sumber protease baru.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sifat atau karakter enzim protease biduri, sehingga hasil yang diperoleh dapat dijadikan sebagai acuan untuk produksi dan aplikasi enzim protease dalam industri. Karakter yang diamati meliputi suhu optimum enzim, pH optimum enzim, daya tahan enzim terhadap panas (termostabilitas enzim), laju reaksi enzim dan perbandingan konsentrasi substrat terhadap enzim, serta penentuan nilai derajat hidrolisis (DH) substrat oleh enzim protease biduri. Hasil pengamatan dianalisa secara deskriptif untuk menentukan hasil terbaik pada aktivitas enzim serta aktivitas spesifik tertinggi. Analisa aktivitas enzim dilakukan dengan metode lowry dengan substrat kasein, sedangkan pada penentuan derajat hidrolisis (DH) digunakan metode Tri Nitro Benzen Sulfonat (TNBS).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimum enzim protease biduri adalah 55°C dengan aktivitas enzim sebesar 0.077 unit aktivitas/mg protein enzim. pH optimum enzim adalah pH 7 dengan aktivitas sebesar 0.091 unit aktivitas/mg protein enzim, sedangkan daya tahan enzim terhadap panas dapat bertahan pada suhu 60°C dan di atas suhu 80°C enzim mengalami inaktivasi. Kecepatan maksimum enzim protease biduri sebesar 18.867 mg/ml/min dengan perbandingan enzim : substrat sebesar 1235.795 : 1. Nilai derajat hidrolisis pada berbagai substrat sebesar 12.72, 2.94, 3.297, 3.187 masing-masing untuk substrat kasein, isolat koro pedang, daging sapi dan ikan segar.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
MOTTO.....	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
DOSEN PEMBIMBING.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
RINGKASAN.....	xvi
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Biduri.....	4
2.2 Enzim.....	5
2.3 Enzim Protease.....	8
2.4 Sumber-sumber Enzim Protease.....	10
2.5 Manfaat Enzim Protease.....	12
2.6 Ekstraksi Enzim Protease.....	13
2.7 Ekstraksi Enzim Protease Tanaman Biduri.....	14

2.8 Purifikasi Enzim Protease	15
2.9 Purifikasi Enzim Protease Tanaman Biduri	16
2.10 Karakterisasi Enzim dan Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	16
2.10.1 Karakterisasi Enzim	16
2.10.2 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim....	17
2.10.2.1 Pengaruh Suhu	17
2.10.2.2 Pengaruh pH.....	18
2.10.2.3 Konsentrasi Enzim dan Substrat.....	19
2.10.2.4 Termostabilitas (daya tahan enzim terhadap panas).....	19
2.11 Kinetika Enzim	20
2.12 Derajat Hidrolisis	24
2.13 Aktivitas Enzim Protease	25
III. METODOLOGI PENELITIAN	27
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	27
3.2.1 Bahan Penelitian.....	27
3.2.2 Alat Penelitian	27
3.3 Rancangan Penelitian	28
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	29
3.4.1 Ekstraksi Enzim Protease Biduri.....	29
3.4.2 Purifikasi Enzim Protease Biduri.....	29
3.4.3 Karakterisasi Enzim Protease Biduri.....	30
a. Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease Biduri.....	30
b. Penentuan pH Optimum Enzim Protease Biduri.....	31
c. Pengujian Termostabilitas Enzim Protease Biduri	31
d. Penentuan Laju Reaksi Enzim Protease Biduri	32

e. Penentuan Derajat Hidrolisis Enzim Protease Biduri..	32
3.5 Parameter Pengamatan	33
3.6 Prosedur Pengamatan Parameter	36
3.6.1 Pengamatan Kadar Protein Ekstrak Enzim Protease	36
3.6.2 Pengujian Aktivitas Protease.....	36
3.6.3 Pengujian Laju Reaksi Enzim Protease	38
3.6.4 Pengujian Derajat Hidrolisis Enzim Protease dengan Metode Trinitro Benzen Sulfonat.....	39
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Suhu Optimum Enzim Protease Biduri	40
4.2 pH Optimum Enzim Protease BiduriSephadex G-100	42
4.3 Termostabilitas Enzim Protease Biduri Terhadap Suhu Tinggi	44
4.4 Laju Reaksi Enzim Protease Biduri.....	45
4.5 Derajat Hidrolisis Berbagai Substrat Oleh Enzim Protease Biduri.....	50
V. KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1 Kesimpulan	54
5.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbandingan Enzim dan Substrat Pada Reaksi Enzimatis Oleh Enzim Protamex	49
2. Derajat Hidrolisis Berbagai Jenis Substrat Yang dihidrolisis Oleh Enzim Protease Biduri	51
3. Nilai Derajat Hidrolisis (DH) Enzim Protamex TM dan Enzim Papain	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi Katalisa Protease dalam Menghidrolisa Ikatan Peptida Protein.....	10
2. Kurva Michaelis Menten.....	23
3. Kurva Lineweaver-Burk Untuk Menentukan K_m dan V_{max}	23
4. Reaksi TNBS Dengan Golongan Asam Amino.....	25
5. Diagram Alir Ekstraksi Enzim Protease Biduri	34
6. Diagram Alir Purifikasi Enzim Protease Biduri dengan Kromatografi Gel Filtrasi Sephadex G-25.....	35
7. Kurva Suhu Optimum Enzim Protease Biduri	40
8. Kurva pH Opimum Enzim Protease Biduri	42
9. Kurva Termostabilitas Enzim Protease Biduri.....	44
10. Pengaruh Konsentrasi Substrat Kasein Terhadap kecepatan Awal Hidrolisis Enzimatis Protease Biduri.....	47
11. Plot Dari Data Tentang Konsentrasi Substrat Dan Kecepatan Awal Reaksi Dengan Menggunakan Metode Lineweaver - Burk.....	48
12. Derajat Hidrolisis (DH) Berbagai Substrat Oleh Enzim Protease Biduri.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Reagensia.....	59
2. Nilai Konstanta α , β , dan H total Pada Berbagai Bahan Pangan Berprotein.....	63
3. Data dan Kurva BSA Standar.....	64
4. Data dan Kurva Tirosin Standar.....	65
5. Data dan Kurva H Total Glycine Standar.....	66
6. Data dan Kurva H Glycine Standar.....	67
7. Data Hasil Perhitungan Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease Biduri.....	68
8. Data Hasil Perhitungan Penentuan pH Optimum Enzim Protease Biduri.....	70
9. Data Hasil Perhitungan Pengujian Termostabilitas Enzim Protease Biduri.....	72
10. Data Hasil Perhitungan Penentuan Laju Reaksi Enzim Protease Biduri.....	74
11. Data Hasil Perhitungan Penentuan Derajat Hidrolisis Berbagai Substrat Oleh Enzim Protease Biduri.....	77
12. Tanaman Biduri (<i>Calotropis gigantea</i>).....	78

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim protease merupakan enzim penghidrolisa protein yang banyak digunakan dalam bidang industri, seperti pembuatan keju, penjernih bir, pembuatan roti, pengempuk daging hidrolisat protein dan lain sebagainya. Pemakaian enzim protease meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 1983, penjualan enzim protease mencapai 40% dari total penjualan enzim dunia (Word, 1983), pada tahun 1995 meningkat 60% dari total pemakaian enzim dunia yang bernilai lebih dari 2 milyar dollar AS (Suhartono *et al.*, 1995). Sedangkan pada tahun 2004, 70% pasar enzim dunia dikuasai oleh enzim protease (mediaindo.co.id, 2004).

Ketersediaan enzim protease di dunia belum mencukupi kebutuhan, sementara pemakaian enzim protease bagi industri pangan cenderung meningkat, oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease lain yang dapat mencukupi kebutuhan akan enzim tersebut. Beberapa jenis tanaman yang selama ini banyak dikenal sebagai sumber enzim protease, antara lain pepaya menghasilkan papain, nanas menghasilkan bromelin, famili ficus menghasilkan fisin. Tanaman biduri juga merupakan salah satu contoh tanaman yang dapat menghasilkan enzim protease. Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan jenis tanaman semak liar dengan ketinggian 0,5 - 3 m yang tumbuh di daerah kering dengan periode kering yang lama, termasuk di Indonesia (Stenis, 1992).

Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman bergetah, dari seluruh bagian tanaman ini akan mengalir getah pada tempat yang dilukai atau dipotong. Getahnya berwarna putih, kental dan agak lengket. Sebagian masyarakat pada beberapa daerah di Indonesia memanfaatkan tanaman ini untuk keperluan tertentu mulai dari akar, batang, kulit, biji, daun, sampai bunganya (Stenis, 1992). Masyarakat tertentu menggunakan

getah tanaman biduri untuk menghilangkan gatal pada anak-anak terutama akibat cacar, digunakan untuk menyembuhkan penyakit kudis dengan cara menumbuk daun biduri yang dicampur dengan kapur sirih, membantu menanggalkan gigi dengan mengoleskan pada bagian yang sakit, serta masih banyak kegunaan lainnya.

Terkait dengan berbagai manfaat yang dikandung oleh tanaman biduri tersebut, maka kemudian dilakukan penelitian pada tanaman biduri. Hasil penelitian yang terhadap tanaman dengan genus yang sama dengan tanaman biduri yaitu *Calotropis procera* dapat digunakan sebagai sumber enzim protease (Eskin, 1990). Menurut paradigma *Chemotaksonomy*, tanaman dari genus yang sama memiliki kemiripan dalam komposisi kimianya (Ray, 1989). Di samping itu, hasil penelitian sebelumnya telah menunjukkan adanya aktivitas protease dari hasil ekstraksi getah tanaman biduri (Witono, 2000). Pada penelitian selanjutnya, juga telah dilakukan ekstraksi enzim protease dari getah biduri serta purifikasi (pemurnian) enzim tersebut sehingga mudah digunakan. Namun, sifat dan fungsi dari enzim protease biduri belum diketahui, maka perlu dilakukan karakterisasi enzim protease biduri. Sebelum enzim protease biduri diproduksi dalam skala besar dan dimanfaatkan untuk berbagai kebutuhan, perlu diketahui sifat-sifat enzim tersebut sehingga enzim dapat dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan dalam industri pangan. Karakterisasi dari enzim protease biduri ini meliputi suhu optimum enzim, pH optimum enzim, kinetika enzim, termostabilitas enzim, derajat hidrolisis (DH), substrat spesifik, jenis protease, serta pola pemecahan substrat. Dengan mengetahui sifat dari enzim tersebut, maka dapat digunakan sebagai dasar atau acuan untuk tahap selanjutnya yaitu pada tahap aplikasi produk.