

EKSTRAKSI ENSIM PROTEASE DARI
TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*) DENGAN
PELARUT ETHANOL

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**



Diajukan Untuk Memenuhi Persyaratan
Menyelesaikan Studi Strata I Pada
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

Ahmad Nafi'

NIM : 971710101009

Asal:	Halaman	Klass
Terima Tgl	01 FEB 2002	576.119
No. Induk	0258	NAF
KLASIR / PENYALIN:		e

e.18

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER

2002

Diterima Oleh :

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan pada :

Hari : Rabu

Tanggal : 16 Januari 2002

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Tim Penguji

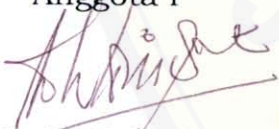
Ketua



Dr. Ir. Achmad Subagio, M. Agr.

NIP. 131 975 306

Anggota I



Ir. Wiwik Siti Windrati, MP.

NIP. 130 787 732

Anggota II



Yuli Witono, S.TP. MP

NIP. 132 206 028

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian



Ir. Hj. Siti Hartanti, MS

NIP. 130 350 763

MOTTO

2 S

SUKSES SHOLIH

Ingatlah

**“JANGAN KAU BERHARAP DAPAT
MENIKMATI INDAHNYA FAJAR,
KALAU KAU TIDAK SUKSES MELALUI
MALAM”**

KUNCINYA

**“WAHAI ORANG-ORANG YANG BERIMAN
BERTAQWALAH KAMU KEPADA ALLAH
DAN BERKUMPULAH KAMU SEKALIAN
BERSAMA ORANG-ORANG SODIQUIN.”
(QS, ATTUBAH: 1 19)**

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah Robbil Aalamiin.....berkat rahmat dan taufiq-Nya, akhirnya karya tulis ini dapat terselesaikan. Limpahan rahmat ta'dzim dan rahmat salam semoga tetap terlimpahkan atas junjungan dan kekasihku Nabi Akhiruzaman.

Dengan segenap rasa cinta yang tulus kupersembahkan skripsi ini untuk:

Bapak Almaghfurlah (Alm) KH. Achmad Munawir dan Ibu Ny. Umi Sa'diyah atas ridlo kasih sayang, doa dan dukungannya yang selalu kurasakan tanpa mengenal batas ruang dan waktu.

Saudara-saudaraku Mbak Hanif, Mbak Yusroh, Mas Ali, Mbak Dah, atas supportnya yang tiada henti sehingga aku bisa menyelesaikan studi.

Keponakanku tersayang, Ulfa, Sofi, Bila, Malik, Nafis, semoga kalian menjadi Ahlil 'ilmi wa ahlit tuqo.

Keluarga Besar Mbah H. Mahfudz Syamsuri, (Mbah Ny. H. Zainab Mahfudz Lek Wahib, H. Jalil, H. Shobich, Lek Qodir, Om Liem, dll) bersama istri yang telah memberikan bantuan baik moril maupun materiil selama aku kuliah.

Seseorang yang akan menjadi partner setiakku dalam melaksanakan tugas suciku di dunia ini. Kita taklukkan dunia dengan cinta. Dan..... Semoga cintaku padamu tidak mengalahkan cintaku pada Pencipta dan Junjunganku

Keluarga Besar HMI Cabang Jember Komisariat Teknologi Pertanian, Semoga tetap jaya dengan semangat "Yakin Usaha Sampai".

Rekan-rekan seperjuangan di BEM, DEMA, HMJ, dan UKM Fakultas Teknologi Pertanian, semoga idealisme kita akan menjadi kenyataan

Almamater yang kubanggakan

Spesial thanks to :

Sang Sutradara Agung lan Utusanipun, atas limpahan Nur-Nya yang selalu kurasakan, kesediaan-Nya menata kehidupanku secara langsung dan menjadi sandaran vertikalku di dunia kini dan akhirat nanti. No Reserve

KH. Syaqui HS., KH. Farij 'Azmi AS. Dan Gus Nur Faqih 'Arsyi, atas Wejangan dan 'Ulumuddin yang kurasakan sangat besar manfaatnya bagiku dalam mengarungi bahtera kehidupan nan luas ini.

Dulur-dulur sak Jati Mulyo atas motivasi dan doa yang telah diberikan

Crew Biduri: Ernada, Muflik, Luci A, Triyanto. Kerjasama kita akhirnya membuahkan hasil, lho

Sahabat-sahabatku sing seneng kumpul dalam DzikirulGhofiliin: Warda, Dadang, Riris, Erna, Desy, Zidni, Endri, Kukuh, Alif, Iin dll. Semoga apa yang kita amalkan menjai sebab kita selamat dunia-akhirat.

Bolo-bolo G-7: Zidni, Narto, Luci A, Dian, Fazni, dan Nurhayati, semoga persahabatan kita akan abadi

Warga Komteta : Adi, Zidni, Eko, Anam, dan Izmaul, kenangan bersama kalian adalah proses yang tak terlupakan

Rekan-rekan yang sudah bersedia membantuku di BEM FTP periode 2000/2001: Budi, Ito', Iwan, Lucy , Triaji , Ima, Deviana, Dwi Ari, Anam, Faizal dll. Ingatlah pada setiap masalah pasti tersimpan hikmah.

Rekan-rekan DEMA: Yuli, Dian, Kenik, Dadang, ingat wakil rakyat itu kumpulan orang hebat bukan kumpulan orang orang cari selamat

Mas Dodik, Mas Dwi, Mbak Ani atas bantuan yang telah diberikan

Teman-temanku di TP'97: Nurul, Belgis, Ila, Pipit, Nungki, Sholeh, Desy, Agus, dan yang lainnya (tidak bisa kusebut satu persatu). Yang telah memberikan nuansa persaudaraan dan keakraban

Dosen Pembimbing :

Dr. Ir. Achmad Subagio, M. Agr. (DPU)

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

Yuli Witono, S.TP. MP. (DPA II)

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT. Tuhan semesta alam. Atas segala karunia dan rahmat yang telah diberikan sehingga penulisan karya ilmiah tertulis yang berjudul “Ekstraksi Ensim Protease dari Tanaman Biduri (*Callotropis gigantea*) dengan Pelarut Ethanol” dapat terselesaikan dengan baik.

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

Dalam proses penyelesaian skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dan fasilitas dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Ir. Hj. Siti Hartanti, MS. Selaku dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan pendidikan S1;
2. Bapak Ir. Susijahadi, MS. Selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember atas ijin penelitian yang diberikan;
3. Bapak Dr.Ir. Achmad Subagio, M.Agr., selaku Dosen pembimbing utama yang telah bersedia membimbing dan memberikan saran dalam proses penyelesaian karya tulis ini;
4. Ibu Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P., selaku Dosen pembimbing anggota satu yang telah memberikan masukan dan saran demi kesempurnaan karya tulis ini;

5. Bapak Yuli Witono, S.Tp. MP., selaku dosen pembimbing anggota dua yang telah memberikan masukan dan saran demi kesempurnaan karya tulis ini;
6. Dr.Ir Maryanto, M.Eng., selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberikan dorongan kepada penulis selama kuliah;
7. Bapak-bapak dan Ibu-ibu dosen yang telah memberikan tambahan ilmu pengetahuan kepada penulis;
8. Segenap teknisi laboratorium di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian (terutama mbak Sari dan mbak Ketut) yang dengan sabar telah membantu dan mendampingi penulis selama penelitian;
9. Segenap karyawan Fakultas Teknologi Pertanian yang telah memberikan pelayanan kepada penulis dengan baik;
10. Segenap pihak yang telah memberikan bantuan baik langsung maupun tidak langsung sejak awal hingga akhir penulisan.

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

Jember, Januari 2002

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
MOTTO	iii
PERSEMBAHAN	iv
DOSEN PEMBIMBING	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
RINGKASAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biduri	4
2.2 Ensim Protease	5
2.3 Sumber-sumber Ensim Protease	6
2.4 Manfaat Ensim Protease	7
2.5 Ekstraksi Ensim Protease	8
2.6 Ekstraksi Ensim Protease dari Tanaman Biduri	10
2.7 Aktivitas Ensim Protease	12

III. METODOLOGI PENELITIAN	14
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	14
3.2.1 Bahan	14
3.2.2 Alat.....	14
3.3 Metode Penelitian	14
3.3.1 Rancangan Penelitian dan Analisa Data	14
3.3.2 Parameter Pengamatan	16
3.3.3 Prosedur Kerja	17
3.3.4 Prosedur Pengamatan Parameter	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Penelitian Tahap I.....	22
4.1.1 Rendemen.....	22
4.1.2 Aktivitas	24
4.1.3 Kadar Protein.....	25
4.1.4 Total Aktivitas.....	28
4.2 Penelitian Tahap II.....	29
4.2.1 Rendemen.....	29
4.2.2 Aktivitas	31
4.2.3 Total Aktivitas.....	32
V. KESIMPULAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi Katalisa Protease dalam menghidrolisa Ikatan Peptida Protein	5
2. Prosedur Kerja Penelitian Tahap I	17
3. Prosedur Kerja Penelitian Tahap II	18
4. Rendemen Ensim Protease Pada Masing-masing Bagian Tanaman Biduri	23
5. Aktivitas Ensim Protease Pada Masing-masing Bagian Tanaman Biduri	24
6. Kadar Protein Ensim Protease Pada Masing-masing Bagian Tanaman Biduri	26
7. Total Aktivitas Ensim Protease Pada Masing-masing Bagian Tanaman Biduri	28
8. Rendemen Ensim Protease Getah Biduri Pada Semua Perlakuan.....	29
9. Aktivitas Ensim Protease Getah Biduri Pada Semua Perlakuan.....	31
10. Total Aktivitas Ensim Protease Getah Biduri Pada Semua Perlakuan	32
11. Grafik Kurva Standard Analisa Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Rata-rata Rendemen Ensim Protease Bagian Tanaman Biduri (%)	39
2. Rata-rata Aktivitas Ensim Protease Bagian Tanaman Biduri (unit / mg ensim)	39
3. Rata-rata Kadar Protein Ensim Protease Bagian Tanaman Biduri (%).....	40
4. Rata-rata Total Aktivitas Ensim Protease Bagian Tanaman Biduri (unit ensim / gr bahan).....	40
5. Rata-rata Rendemen Ensim Protease Getah Biduri (%)	40
6. Rata-rata Aktivitas Ensim Protease Getah Biduri (unit / mg ensim)	41
7. Rata-rata Total Aktivitas Ensim Protease Getah Biduri (unit ensim / gr bahan).....	41
8. Kurva Standard Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Metode Lowry	42

Ahmad Nafi (971710101009) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian” **Ekstraksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*)**”, dibimbing oleh **Dr. Ir. Ahcmad Subagio, M.Agr., Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P., dan Yuli Witono, S.Tp., M.P.**

RINGKASAN

Enzim protease biduri merupakan salah satu enzim protease tanaman yang mempunyai aktivitas proteolitik tinggi. Beberapa jenis tanaman selama ini telah banyak dikenal sebagai sumber enzim protease, seperti pepaya menghasilkan papain, nanas menghasilkan bromelin, famili ficus menghasilkan fisin. Namun demikian untuk memproduksi enzim protease dari jaringan tanaman masih menghadapi banyak kendala sementara ketersediaan enzim protease belum mencukupi kebutuhan, oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease yang lain.

Penelitian ini bertujuan untuk mencari sumber enzim protease dari tanaman yang baru dan menentukan metode ekstraksi yang baik. Sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber enzim protease dengan aktivitas dan rendemen yang tinggi. Enzim protease biduri ini aman dan efektif untuk diaplikasikan pada industri pangan, seperti pengempukan daging dan pembuatan keju.

Penelitian dilaksanakan dalam dua tahap. Tahap pertama dilakukan dengan mengekstrak enzim protease dari bagian tanaman biduri yang berbeda yaitu: getah, batang muda, dan daun. Hasil pengamatan dianalisa secara deskriptif menggunakan histogram untuk menentukan rendemen enzim terbanyak, dengan aktivitas dan total aktivitas tertinggi. Hasil penelitian tahap satu dijadikan dasar ekstraksi pada penelitian tahap kedua. Penelitian tahap dua dilaksanakan dengan perlakuan perbedaan konsentrasi yaitu 1:1, 1:2, dan 1:3 dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil pengamatan dianalisa secara deskriptif menggunakan histogram untuk menentukan rendemen terbanyak, dengan aktivitas dan total aktivitas tertinggi. Analisa aktivitas enzim protease biduri dilakukan dengan **metode lowry** dengan substrat kasein.

Hasil penelitian tahap satu menunjukkan bahwa getah merupakan bagian tanaman biduri yang dapat menghasilkan enzim protease paling optimal ditinjau dari rendemen sebesar 1,17%, aktivitas sebesar 0,144 unit aktivitas/mg enzim, dan total aktivitas sebesar $1,85 \cdot 10^{-3}$ unit enzim/gr bahan, serta kadar protein sebesar 5,072 %. Sedangkan pada penelitian tahap dua

menunjukkan bahwa konsentrasi optimum pelarut ethanol terdapat pada perlakuan E3 yaitu perbandingan sampel dengan pelarut 1:3 dengan rendemen sebesar 0,502 %, aktivitas sebesar 0,080 unit aktivitas/mg ensim, dan total aktivitas sebesar $3,91 \cdot 10^{-4}$ unit ensim/gr bahan. Selanjutnya disarankan untuk aplikasi ensim digunakan metode ekstraksi dengan perbandingan sampel dengan pelarut 1:3.



sama memiliki kemiripan dalam komposisi kimianya (Ray, 1989). Oleh karena itu diduga biduri dapat digunakan sebagai sumber enzim protease. Hasil penelitian sebelumnya telah menunjukkan adanya aktifitas enzim protease dari hasil ekstraksi getah tanaman biduri (Witono, 2000). Ekstraksi enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan dengan pelarut-pelarut organik seperti etanol (Robyt and White, 1987). Ethanol merupakan pelarut organik yang murah, praktis, mudah di dapat, tidak beracun (aman), dan mudah untuk digunakan pada penelitian dan proses ekstraksi enzim protease dari tanaman biduri.

1.2. Perumusan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini yang pertama adalah pada bagian tanaman biduri meliputi getah, batang dan daun, manakah yang dapat menghasilkan enzim protease optimum ditinjau dari rendemen, aktivitas dan total aktivitasnya. Permasalahan kedua berapa konsentrasi pelarut ethanol yang optimum untuk mengekstrak enzim protease tanaman biduri dengan rendemen terbanyak, aktivitas dan total aktivitas tertinggi.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan bagian tanaman biduri diantara getah, batang muda dan daun yang dapat menghasilkan enzim protease optimum ditinjau dari rendemen, aktivitas dan total aktivitasnya.
2. Mendapatkan konsentrasi pelarut ethanol yang optimum sehingga diperoleh enzim protease tanaman biduri yang mempunyai rendemen, aktivitas dan total aktivitas tertinggi.

1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Menambah alternatif sumber enzim protease
2. Informasi tentang cara ekstraksi enzim protease yang optimum dari tanaman biduri
3. Mendayagunakan tanaman biduri yang selama ini masih dianggap sebagai gulma.





II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biduri (*Calotropis gigantea*)

Biduri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman lahan kering yang banyak ditemukan pada lahan-lahan kosong dengan periode kering yang lama. Biduri sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan, bahkan pada beberapa daerah dianggap sebagai gulma (Stenis, 1992).

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

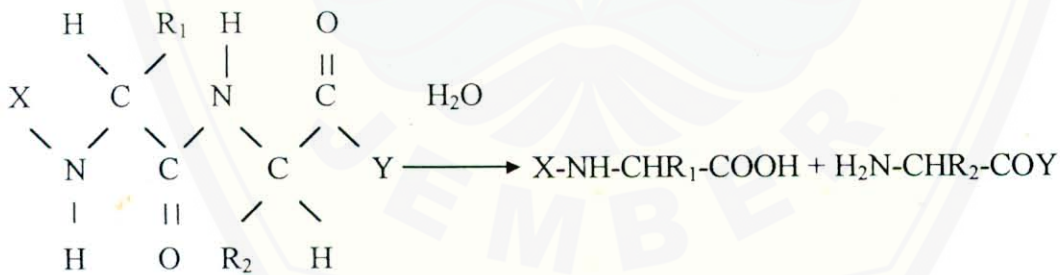
- Devisio : Spermatophyta
- Klas : Dicotyledoneae
- Sub Klas : Monochlamydae
- Ordo : Euphorbiales
- Famili : Euphorbiaceae
- Genus : *Calotropis*
- Species : *Calotropis gigantea*

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. Beberapa tetes getah biduri dapat mengentalkan susu sapi. Dalam ilmu kedokteran, cairan getah ini mempunyai kegunaan, seperti menstimulir pematangan bisul, untuk menanggalkan gigi geraham, bahkan di beberapa daerah telah digunakan untuk menyembuhkan luka (Heyne, 1987). Getah dari sejenis tanaman biduri yakni *Calotropis procera* telah berhasil digunakan untuk pembuatan keju (Eskin, 1990). Hasil penelitian Witono (2000) menunjukkan bahwa getah tanaman biduri dapat digunakan sebagai sumber enzim protease.

2.2. Enzim Protease

Hampir semua enzim protease merupakan protein sederhana yang tersusun oleh asam amino, tanpa adanya gugus prostetis atau senyawa non protein yang lain. Sebagian enzim ini tidak memerlukan ion aktivator, namun demikian beberapa golongan 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 yang relatif sederhana (Suhartono, 1992).

Reaksi katalisa protease secara umum adalah menghidrolisa ikatan peptida protein seperti pada Gambar 1. Namun demikian berbagai jenis enzim protease mempunyai spesifitas hidrolisa yang berbeda-beda. Beberapa enzim protease mempunyai syarat khusus untuk aktivitas proteasenya. Semakin spesifik suatu enzim, semakin sedikit jumlah ikatan peptida yang mampu dihidrolisa (Whitaker, 1994).



X = rantai peptida sebelumnya

Y = rantai peptida sesudahnya

Gambar 1. Reaksi katalisa protease dalam menghidrolisa ikatan peptida protein.

Enzim protease dibagi menjadi dua golongan besar, yaitu ekstra seluler dan intraseluler. Enzim protease yang bersifat

ekstraseluler adalah enzim yang menghidrolisa substrat polimer protein berukuran besar menjadi kecil sehingga dapat dimanfaatkan oleh sel yang menghasilkan (Kaneda *et al.*, 1997). Sedang 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 (Loffer, 1986).

Dilihat dari letak pemecahan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase menguraikan protein dari ujung rantai sehingga dihasilkan satu asam amino dan sisa peptida. Pada tingkat lanjut, enzim ini akan menghasilkan sejumlah asam amino.

Golongan endopeptidase menguraikan ikatan peptida pada bagian dalam rantai protein, sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida. Oleh karena itu, kebanyakan endopeptidase hanya akan menghasilkan asam amino dalam jumlah terbatas (Suhartono, 1992)

2.3. Sumber-sumber Enzim Protease

Enzim protease dapat diproduksi dari jaringan-jaringan hidup meliputi mikroorganisme, hewan maupun tanaman. Enzim-enzim yang diproduksi dari jaringan hewan relatif mahal dan ketersediaannya tergantung pada permintaan hewan-hewan sumber enzim tersebut di pasaran, mengingat enzim diekstrak dari hewan-hewan yang sudah mati. Dalam beberapa hal enzim protease yang diproduksi dari mikroorganisme lebih menguntungkan (Loffler, 1986).

Meskipun mikroba dikenal luas sebagai sumber enzim protease, namun untuk tujuan-tujuan khusus misalnya

pengempuk daging, enzim protease dari tanaman masih mempunyai peranan yang sangat besar yang belum sepenuhnya dapat digantikan oleh enzim mikroba. Enzim protease dari tanaman yang paling utama adalah papain dari pepaya, bromelin dari nanas dan fisin dari tanaman ficus. Beberapa tanaman lain juga sudah diketahui sebagai sumber enzim protease, yaitu famili kacang-kacangan (*Arachis hypogaeae* L.) memproduksi protease pada bijinya. Labu (*Curcubita peo*) memproduksi protease pada bagian bunganya. Buah semangka (*Cucurmis melo*) dilaporkan mengandung protease serta jahe (Suhartono, 1992, Thompson, Wolf, and Allem, 1973).

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

2.4. Manfaat Enzim Protease

Nobuzo (1988) menambahkan bahwa enzim protease mempunyai peran yang penting dalam industri pangan. Enam puluh persen dari total produksi enzim yang digunakan untuk pengolahan pangan, enzim protease merupakan salah satu enzim terbesar penggunaannya selain amilase dan glukoamilase.

Peranan enzim protease di bidang industri pangan yang telah banyak dikenal antara lain untuk pembuatan roti, pembuatan keju, industri bir dan sebagai pengempuk daging. Pemanfaatan dalam industri roti disebabkan enzim protease dapat mengubah sifat viskoelastis adonan dengan menghidrolisa ikatan peptida pada protein gluten. Enzim protease juga menghidrolisa protein adonan roti yang membebaskan asam amino yang bereaksi dengan gula selama pemanggangan roti sehingga menimbulkan aroma dan warna yang diinginkan (Eskin, 1990; Collar, Mascaros and De Barber, 1992).

2.5 Ekstraksi Enzim Protease

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

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

Hasil ekstraksi enzim merupakan isolat dengan kadar yang masih rendah. Pemurnian akan dapat meningkatkan kadar enzim dari ekstrak kasar enzim tersebut. Pemurnian enzim dapat

dilakukan dengan metode pengendapan baik dengan pelarut-pelarut organik seperti etanol dan aseton maupun metode *salting out* dengan menggunakan garam amonium sulfat (Robyt and White, 1987)

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

Ekstraksi enzim protease biduri menggunakan pelarut organik yaitu etanol 96% dengan perbandingan 1:1. Etanol dapat mengendapkan protein karena seperti dinyatakan oleh Wiseman (1985) penambahan pelarut organik ke dalam larutan protein akan mengurangi kelarutan protein dalam air dengan cara menurunkan konstanta dielektrik medium, sehingga molekul-molekul protein lebih cenderung berinteraksi dengan molekul protein yang lain dibanding dengan air, keadaan ini terus berlanjut sampai dicapai titik tertentu di mana protein mengendap. Menurut Darwis dan Sukara (1990) Untuk satu bagian getah pepaya dibutuhkan satu sampai dua bagian etanol murni.

2.6 Ekstraksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri

Sebagai enzim ekstraseluler enzim protease biduri sama dengan enzim papain yang menurut Suhartono (1992) bersumber dari getah tanaman pepaya baik yang berada di daun, batang maupun buah. Namun secara praktis, getah dari buah pepaya lebih mudah dipanen. Untuk memperoleh getahnya, buah pepaya dilukai dan getah yang keluar disadap. Getah yang menetes ditampung, dikumpulkan dan dikeringkan. Penorehan buah dapat dilakukan mulai pangkal sampai ujung. Produksi lateks dipengaruhi oleh banyaknya torehan sadapan, interval waktu penyadapan, dalamnya torehan, umur buah, waktu penyadapan dan frekuensi penyadapan.

Witono (2000) melaporkan bahwa untuk mengisolasi enzim protease getah biduri dilakukan dengan memotong tanaman biduri pada bagian atas (pucuknya), getahnya ditampung, disimpan atau dibawa dalam kondisi dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).

Secara umum metode memurnikan enzim tidak berbeda dengan protein. Beberapa tahap yang dilakukan dalam pemurnian enzim antara lain ekstraksi, pemisahan enzim (pengendapan protein), penyaringan sentrifugasi, dialysis, dan pengeringan. Pengendapan protein didasarkan atas perbedaan kelarutan. Biasanya digunakan garam amonium sulfat karena garam ini sangat larut dalam air, tidak beracun dan mudah didapat serta dapat menstabilkan enzim. Garam amonium sulfat biasanya ditambahkan dalam bentuk padatan supaya volume larutan tidak menjadi lebih besar. Untuk menyempurnakan proses pengendapan protein, filtrat enzim yang ditambahi amonium sulfat dapat disimpan lebih lama pada suhu 4°C agar semua protein teragregasi secara sempurna. Protein endapan juga dapat diperoleh dengan menggunakan pelarut organik seperti alkohol

(methanol, etanol, propanol), dietil eter dan aseton. Witono (2000) melaporkan bahwa ekstraksi menggunakan etanol dengan konsentrasi 1:1 menghasilkan rendemen 0,27% sedang dengan konsentrasi 1:2 menghasilkan rendemen enzim protease yang lebih tinggi yaitu sebesar 0,66%.

Suhartono (1991) menyatakan bahwa salah satu metode untuk mengisolasi getah pepaya adalah getah pepaya dicampur air, disaring, kemudian di dalamnya ditambahkan alkohol.

Pengeringan getah pepaya dapat dilakukan menggunakan oven vakum, lemari pengering dan penjemuran. Lemari pengering merupakan alat pengering buatan yang umum digunakan dalam pengeringan getah pepaya. Pengeringan getah pepaya dengan menggunakan pengering kabinet ini memiliki beberapa keuntungan antara lain suhunya dapat diatur, biaya tidak mahal, aktivitas enzim dapat dipertahankan selama penyimpanan lebih dari 8 bulan dan warna produk yang dihasilkan putih. Kelemahannya adalah terjadinya penurunan aktivitas papain karena tekanan selama proses tidak dapat diatur.

Getah pepaya yang dikeringkan dengan menggunakan oven vakum mempunyai keuntungan yaitu daya simpan produk dapat mencapai 20 bulan dengan aktivitas protease cukup tinggi karena tekanan di dalam alat ini dapat diatur. Namun biaya penggunaannya mahal sehingga oven vakum biasanya digunakan untuk mengeringkan papain murni.

2.7 Aktivitas Enzim Protease

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

Pengujian aktivitas protease juga dapat dilakukan pada suhu 55°C antara lain pengujian aktivitas protease yang diisolasi dari udang (Jiang *et al.*, 1991), protease buah melon (Noda, Koyanagi and Kamiya, 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), aktivitas enzim protease papain (Sanogo, Paquet and Linden, 1990), sedangkan Molina and Toldra (1992) menguji aktivitas protease mikroba yang diekstraksi dari *cured ham* dilakukan pada suhu 30°C .

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

Menurut Malik and Singh (1986) Aktivitas spesifik enzim protease dapat dinyatakan dalam unit aktivitas per miligram enzim. Hasil ekstraksi enzim protease dengan aktivitasnya dapat dinyatakan dengan total aktivitas, yakni jumlah unit aktivitas enzim yang di dapat dari satu gram tanaman.



III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Mutu Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, mulai bulan Juni – Agustus 2001.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah getah, daun dan batang muda dari tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang didapat di daerah Watu Ulo Ambulu Jember. Bahan kimia yang digunakan berspesifikasi pro analisis (pa) dengan merk (jerman), meliputi : aseton, etanol, monoksosil sodium fosfat, dibasik sodium fosfat, tirosin standar, trikloroasetat, HCl, kasein, reagen lowry dan bahan kimia lain untuk pengujian aktivitas ensim protease.

3.2.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : centrifuge Yenaco model YC-1180T dan tabungnya, freeze drying Snijder Scientific tipe 2040 (Belanda), spectronic 21D Melton Roy dan kuvetnya pisau stainless steel, pH meter Jen Way tipe 3320 (Jerman), pengaduk magnetik, lemari pendingin, kertas saring, waterbath dan alat-alat lain yang terkait.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Penelitian dilakukan dalam 2 tahap. Tahap I dilakukan untuk menentukan bagian tanaman biduri yang menghasilkan ensim protease biduri yang optimum ditinjau dari rendemen,

aktivitas dan total aktivitasnya. Tahap II dilakukan guna menentukan konsentrasi pelarut untuk ekstraksi enzim protease dari tanaman biduri yang optimum sehingga diperoleh rendemen terbanyak, aktivitas dan total aktivitas tertinggi. Selengkapnya tahapan-tahapan penelitian dan rancangannya dapat dilihat di bawah ini :

❖ **Penelitian Tahap I**

Penelitian tahap I dilakukan dengan mengekstrak enzim protease dari tiga bagian tanaman biduri yang berbeda yaitu: getah, batang muda, dan daun. Hasil pengamatan dianalisa secara deskriptif (Suryabrata, 1989) dengan menggunakan histogram untuk menentukan rendemen terbanyak, aktivitas dan total aktivitas tertinggi. Hasil penelitian tahap I ini dijadikan dasar untuk ekstraksi penelitian tahap berikutnya.

❖ **Penelitian tahap II**

Penelitian tahap dua dilakukan dengan mengekstrak bagian tanaman biduri sesuai dengan hasil penelitian tahap satu dengan 3 perlakuan perbedaan konsentrasi pelarut etanol 95% dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil pengamatan dianalisa secara deskriptif (suryabrata, 1989) Ketiga perlakuan masing-masing adalah:

E_1 = ekstraksi dengan perbandingan sample dan pelarut 1:1

E_2 = ekstraksi dengan perbandingan sample dan pelarut 1:2

E_3 = ekstraksi dengan perbandingan sample dan pelarut 1:3

Dari ketiganya kemudian dipilih 1 konsentrasi optimum untuk proses ekstraksi yang paling sesuai untuk enzim protease dari tanaman biduri (dilihat dari rendemen, aktivitas dan total aktivitasnya).

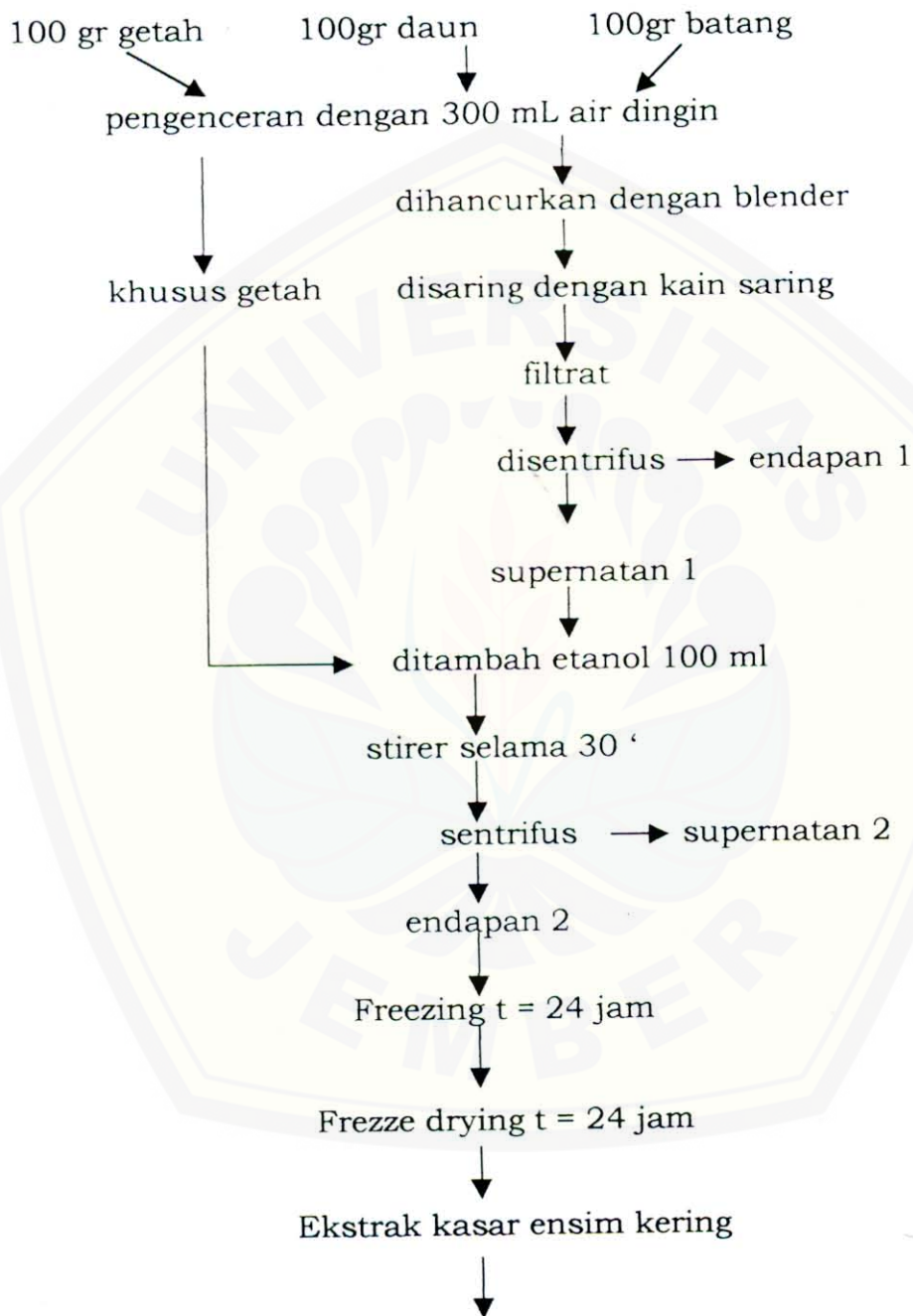
3.3. 2 Parameter Pengamatan

- ❖ Pada penelitian tahap I parameter yang diamati adalah kadar protein terlarut ekstrak enzim rendemen, aktivitas dan total aktivitas enzimnya.
- ❖ Demikian juga pada penelitian tahap II parameter yang diamati adalah rendemen enzim, aktivitas, dan total aktivitasnya.



3.3.3 Prosedur Kerja

❖ Prosedur Kerja Penelitian Tahap I



Dianalisa kadar protein, rendemen, aktivitas dan total aktivitas enzimnya

Gambar 2. Prosedur penelitian tahap I

❖ **Prosedur Kerja Penelitian tahap II**



Dianalisa kadar protein, rendemen, aktifitas dan total aktivitas ensimnya

Gambar 3. Prosedur penelitian tahap II

3.3.4 Prosedur Pengamatan parameter

❖ Pengamatan kadar protein ekstrak enzim protease

Pengamatan kadar protein enzim protease dilakukan menggunakan metode lowry (Walker, 1994). Pengamatan dilakukan dengan menimbang 0,1 gr ekstrak enzim kering. Kemudian dilakukan proses destruksi protein untuk mendapatkan protein terlarut menggunakan 0,1 mL NaOH 2N pada suhu 100°C selama 15 menit lalu didinginkan dengan air dingin. Protein terlarut yang dihasilkan lalu direaksikan dengan 1 mL reagen mix dan didiamkan selama 10 menit. Menambahkan 0,1 mL reagen folin agar terjadi reaksi pewarnaan sehingga dapat diamati dengan spektrofotometer tampak dan dibiarkan selama 30 menit. menambahkan Aquades sampai volume 5 mL kemudian tera absorbannya pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar untuk dihitung kadar proteinnya.

❖ Pengamatan rendemen Protease

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

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

Dimana A: berat sample

 B: berat ekstrak enzim kering

❖ **Pengujian Aktivitas Protease (Leewit and Pornsuksawang, 1980) dan metode lowry (John M. Walker, 1994)**

Pengujian aktivitas enzim protease menggunakan substrat kasein pada pH optimal, dilakukan dengan menimbang 0,05 gr kasein dalam tabung sentrifus lalu dicampur dengan 0,01 enzim kering. Kemudian memasukkan 3 mL buffer pH 7 pada suhu 55°C pada tabung tersebut lalu diinkubasikan pada suhu 55°C dalam waterbath selama 10 menit. Menambahkan TCA 1mL lalu sentrifus dengan kecepatan 4500 rpm, selama 6 menit. filtrat yang dihasilkan diambil 1 mL lalu ditambah dengan 1 mL reagen mix dan dibiarkan selama 10 menit. Menambahkan 0,1 mL reagen folin dan dibiarkan selama 30 menit. Menambahkan Aquades sampai volume 5 mL kemudian tera absorbannya pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada standar untuk dihitung aktivitas hidrolisis enzimnya.

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

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

Dimana [C] : kenaikan konsentrasi protein terlarut (mg/ml)

t : waktu hidrolisis (menit)

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{unit}}{\text{mg.ensim}}$$

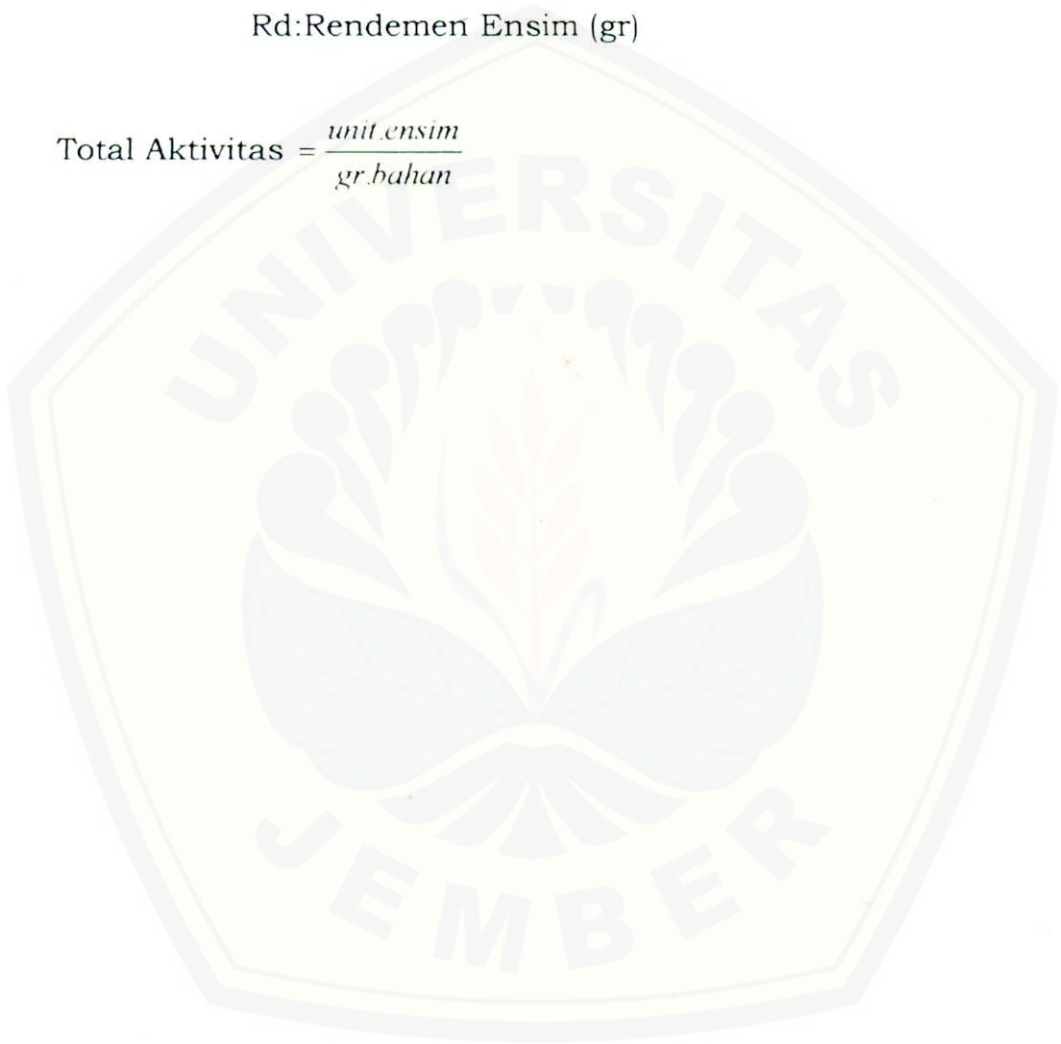
Total aktivitas dinyatakan sebagai jumlah unit enzim yang didapat dari satu gram bagian tanaman.

$$1 \text{ unit enzim} = Ac \times Rd$$

Dimana Ac : Aktifitas spesifik (unit/mg enzim)

Rd : Rendemen Enzim (gr)

$$\text{Total Aktivitas} = \frac{\text{unit enzim}}{\text{gr bahan}}$$



IV. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Berdasar hasil penelitian mengenai ekstraksi enzim protease biduri dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Bagian tanaman biduri yang menghasilkan enzim protease tertinggi yaitu getah dengan rendemen sebesar 1,17%, aktivitas sebesar 0,144 unit/mg enzim, dan total aktivitas sebesar $1,85 \cdot 10^{-3}$ unit enzim/gr bahan, serta kadar protein sebesar 5,072 %..
2. Konsentrasi optimum pelarut ethanol terdapat pada perlakuan E3 yaitu pada perbandingan sampel dengan pelarut 1:3 dengan rendemen sebesar 0,502%, aktivitas sebesar 0,080 unit/mg enzim, dan total aktivitas sebesar $3,91 \cdot 10^{-4}$ unit enzim/gr bahan.

4.2 Saran

1. Dengan melihat manfaat dari enzim protease biduri yang sangat besar maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk aplikasi enzim protease biduri pada proses pengolahan produk-produk pangan, seperti pengempukan daging dan pembuatan keju, dipakai dengan menggunakan enzim yang diekstraksi dari getah biduri dengan pelarut ethanol perbandingan 1 : 3.
2. perlu dikaji lebih lanjut untuk ekstraksi dan aplikasi enzim menggunakan pelarut organik lain seperti aseton atau garam ammonium sulfat.

3. Perlu dikaji lebih lanjut untuk cara menghilangkan komponen gum dari ekstrak enzim protease getah biduri.
4. Perlu dikaji lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik enzim protease biduri, dan kemungkinan penerapan bioteknologi untuk produksi enzim protease biduri menggunakan mikroba.



DAFTAR PUSTAKA

- Abe , H., Asakura, T., Watanabe, H. and Arai, S. (1997) **Oryzasin as an Aspartic Proteinase Occuring in Rice Seeds: Purification, Characterization and Application to Milk Clotting.** *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4), 1070-1075.
- Apriyantono, A., Fardiaz, D., Puspitasari, N.L., Sedarnawati, Budiyanto, S. (1989) **Analisis Pangan.** P.A.U. Pangan dan Gizi. I.P.B. Bogor.
- Chang, R. (1981) **Physical Chemistry, With Applications to Biological System.** 2nd ed. London.
- Chinas, F.A.I. and Canales, A.L.M. (1986) **Proteolytic Enzyme from Cnidoscopus chayamansa "chaya".** *J. Food Sci.*, 61 (1), 142-144.
- Collar, C., Mascaros, A.F. and De Barber, C.B. (1992) **Amino Acid Metabolism by Yeast and Lactic Bacteria During Bread Dough Fermentation.** *J. Food Sci.*, 57 (6), 1423-1427.
- Darwis, A.A. dan Sukara, E. (1990) **Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim.** P.A.U. Bioteknologi. I.P.B. Bogor.
- Demand, J.W. (1997). **Kimia Makanan,** Institut Teknologi Bandung Press. Bandung
- Eskin, N.A.M. (1990) **Biochemistry of Food.** Second Edition. Academic Press. Inc. New York.
- Fernandez, M.M., Clark, D.S., Blanch, H.W. (1991) **Papain Kinetics in The Presence of a Water-Miscible Organic Solvent,** *J. Biotech-Bioeng.*, 37 (10), 967-972.
- Fox, P.F. (1991) **Food Enzymology.** Elsevier Applied Science. New York.
- Jiang, S.T., Moody, M.W. and Chen, H.C. (1991) **Purification and Characterization of Protease from Digestive Tract of Grass Shrimp.** *J. Food Sci.*, 56 (2), 322-326.

- 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.
- Leewit, S. and Pornsuksawang (1988) **Protease from Bacteria in Soybean Whey.** *Proc. Food Science and Technology in Industrial Development. Vol. I.* (Ed Manepoon). pp. 751-754. Thailand.
- Loffler, A. (1986) **Proteolytic Enzymes : Sources and Applications.** *J. Food Tech.*, 40, 63-70.
- Malik C.P, and Singh M.B., M.B. 1986. **Plant Enzymology and Histoenzymology.** Kalyani Publisher. New Delhi
- Nobuzo, T. (1988) **Recent Topics on Enzyme Utilization for Food in Japan.** *Proc. Food Science and Technology in Industrial Development. Vol. I.* (Ed Manepoon). pp. 126-137. Thailand.
- Noda, K., Koyanagi, M. and Kamiya, C. (1994) **Purification and Characterization of an Endoprotease from Melon Fruit.** *J. Food Sci.*, 59 (3), 585-587.
- Palmer, T. (1991) **Understanding Enzymes.** Third Edition. Ellis Haward. New York.
- Rahayu, K. (1988) **Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim.** P.A.U. Pangan dan Gizi. U.G.M. Yogyakarta.
- Ray, J. (1989) **Plant Sysematiks.** Mc Graw Hill Publisher. Toronto. New York.
- Robynt, J.F. and White, B.S. (1987) **Biochemical Technic Theory and Practical.** Kluwer Academic Publisher. New York.
- Salisbury and Ross. (1995). **Fisiologi Tumbuhan Jilid 2.** Gramedia . Jakarta
- Sanogo, T., Paquet, D. and Linden, G. (1990) **Proteolysis of α_{s1} - casein by Papain in a Complex Enviroment Influence of Ionic Strength on The Reaction Product.** *J. Food Sci.*, 55 (3), 796-800.

- Scott, R. (1986) **Cheesmaking Practice**. Elsevier Applied Science Publisher. New York.
- Sousa, M.S. and Malcata, F.X. (1997) **Comparison of Plant and Animal Rennet in Therm of Microbiological, Chemical and Proteolysis Characteristic of Ovine Cheese**. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1), 74-81.
- Stenis, T. (1992) **Flora**. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Sukardi (1991) **Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Liberty. Yogyakarta.
- Suhartono, M.T. (1992) **Protease**. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Suhartono, M.T., Lestariono, L.N. dan Tanoyo, T. (1995) **Study on Protease from *Aspergillus oryzae* Isolated from Soy Sauce Processing in Indonesia**. *J. Indonesian Trop. Agric.*, 6 (2), 21-25.
- Tavasolian, B. and Shabbah, F. (1979) **Extraction and Partial Purification of Milk Coagulating Enzyme from *Cartamus tinctorius* Seed**. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (1), 190-191.
- Thompson, E.H., Wolf, I.D. and Allem, C.E. (1973) **Ginger Rhizome : A New Source of Proteolytic Enzyme**, *J. Food Sci.*, 38, 652-655.
- Tjitrosoepomo, G. (1994). **Takonomi Tumbuhan spermatophyta**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Whitaker, J.R. (1994) **Principle of Enzymology for The Food Science**. Second Edition. Marcel Decker. New York.
- Wiseman, A. (1985) **Enzyme Industrial Applications**. John Wiley and Sons. New York.
- Witono, Y. (2000) **Ekstraksi dan karakterisasi Ensim Protease Dari Tanaman Biduri (*Calotropis Gigantea Dryand*)**. Tesis Pasca Sarjana Universitas Brawijaya . Malang
- Word, O.P. (1983) **Properties of Microbial Proteinase. In Microbial Enzyme and Biotechnology**. (Ed Forgety). pp. 56-102. Appl. Publ. London.

Lampiran 1. Rata-rata Rendemen Enzim Protease Bagian Tanaman Biduri (%)

Rendemen enzim protease bagian tanaman biduri					
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
Daun	1,543	1,851	2,156	5,55	1,85
Batang	0,639	0,486	0,477	1,60	0,53
Getah	0,994	0,902	1,608	3,51	1,17

Lampiran 2. Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Protease Bagian Tanaman Biduri (unit/mg enzim)

Aktivitas enzim protease bagian tanaman biduri					
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
Daun	0.031	0.023	0.046	0.100	0.033
Batang	0.040	0.040	0.039	0.119	0.040
Getah	0.080	0.131	0.222	0.433	0.144

Lampiran 3. Rata-rata Kadar Protein Ensim Protease Bagian Tanaman Biduri (%)

Kadar protein enzim protease bagian tanaman biduri				
Sampel	Ulangan		Jumlah	Rata-rata
	1	2		
Daun	9.873	14.82	24.693	12.347
Batang	11.451	15.216	26.667	13.334
getah	4.23	5.913	10.143	5.072

Lampiran 4. Rata-rata Total Aktivitas Ensim Protease Bagian Tanaman Biduri (unit enzim/gr bahan)

Total Aktivitas enzim protease bagian tanaman biduri					
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
Daun	4.81E-04	4.20E-04	9.99E-04	1.90E-03	6.33E-04
Batang	2.50E-04	1.93E-04	1.88E-04	6.31E-04	2.10E-04
Getah	7.96E-04	1.18E-03	3.57E-03	5.54E-03	1.85E-03

Lampiran 5. Rata-rata Rendemen Ensim Protease Getah Biduri (%)

Rendemen enzim protease getah biduri					
Sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
E1	0.1604	0.1804	0.1664	0.507	0.169
E2	0.1652	0.3560	0.3190	0.840	0.280
E3	0.2447	0.6120	0.6500	1.507	0.502

Lampiran 6. Rata-rata Aktivitas Spesifik Ensim Protease Getah Biduri (unit/mg ensim)

Aktivitas ensim protease getah biduri					
Sampel	Ulangan			Jumla h	Rata- rata
	1	2	3		
E1	0.1826	0.1418	0.1334	0.458	0.153
E2	0.1042	0.0922	0.1256	0.322	0.105
E3	0.089	0.062	0.0884	0.239	0.080

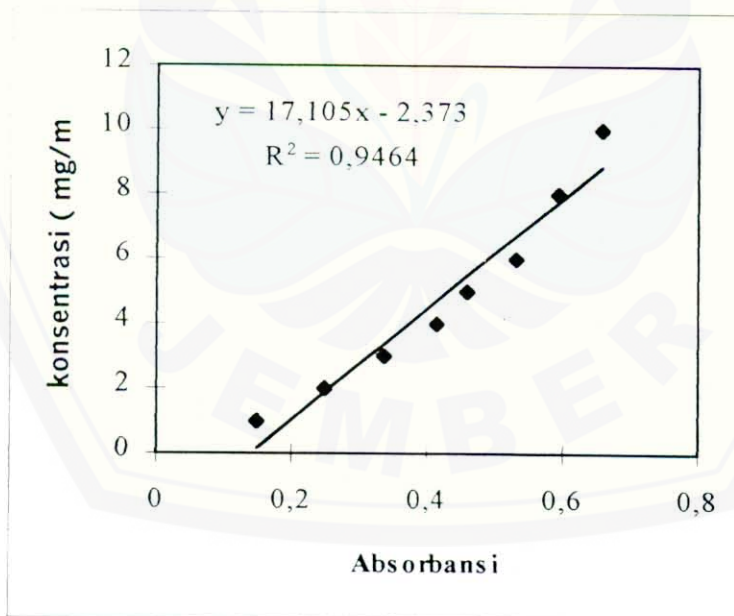
Lampiran 7. Rata-rata Total Aktivitas Ensim Protease Getah Biduri (unit ensim/gr bahan)

Total aktivitas ensim protease getah biduri					
sampel	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
E1	2.93E-04	2.56E-04	2.22E-04	7.71E-04	2.57E-04
E2	1.72E-04	3.28E-04	4.01E-04	9.01E-04	3.00E-04
E2	2.18E-04	3.79E-04	5.75E-04	1.17E-03	3.91E-04

Lampiran 8. Kurva Standar Analisa Kadar Protein dengan Metode Lowry

Data absorbansi larutan standar analisa kadar protin terlarut dengan metode lowry adalah sebagai berikut:

Blanko =	0,025	
Konsentrasi (Y)	Absorbansi (X)	(X-0,025)
1	0,173	0,148
2	0,275	0,25
3	0,361	0,336
4	0,44	0,415
5	0,485	0,46
6	0,556	0,531
8	0,618	0,593
10	0,682	0,657
10 mg/ml		



Gambar 11. Grafik Kurva Standar Analisa Kadar Protein dengan Metode Lowry