

**DEKLOROFILASI EKSTRAK PROTEASE
DARI TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*) DENGAN ABSORBAN CELITE**

**(DECHLOROPHYLLATION OF CRUDE PROTEASE
FROM BIDURI (*Calotropis gigantea*) BY CELITE ABSORBANCE)**

Yuli Witono

Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Alamat Koresponden Penulis Pertama: FTP-UNEJ; Jl. Kalimantan I-Kampus Tegal Boto, Jember
Kode Pos: 68121, HP: 081336700946; email: ylwitono@yahoo.com

ABSTRACT

'Biduri' plant is a wild bush in tropical countries which is one of potential protease source. However, protease extracted from leaf and stamp top of biduri is still green in color due to contain a protein bounding-chlorophyll. It would be problem if it is used for some food. The research objective is to study a dechlorophyllation technique in order to obtain protease with low chlorophyll content but high specific activity. The results showed that the best dechlorophyllation method of biduri protease could be eluted by celite absorbance. The first step elution was obtained 16 ml filtrate of biduri protease with low chlorophyll. Consist to the result above also decreased protein content, with loading capacity was 1.067 gram biduri/gram celite or 0.015 μg chlorophyll/gram celite. However in the second step elution, after biduri filtrate has been freezed for 12 hours was obtained the dechlorophylated biduri protease was higher in loading volume. Resulting in increased of loading capacity to be 2.13 gram biduri/gram celite or 0.004 μg chlorophyll/gram celite. The chlorophyll decreased to about < 44 % of chlorophyll from the first step elution, even the specific activity increased 286% compared with the first step elution.

Key words: dechlorophyllation, celite absorbance, protease, biduri plant

PENGANTAR

Ketersediaan enzim protease belum mencukupi kebutuhan, sementara pemakaian protease bagi industri pangan cenderung meningkat. Pada tahun 1983 penjualan enzim protease mencapai 40 % dari total penjualan enzim dunia (Word, 1983), tahun 1995 meningkat sampai 60 % dari total pemakaian enzim dunia (Suhartono dkk., 1995). Bahkan pada tahun 1998 mencapai 70 % dari total pemakaian enzim untuk pangan (Rao *et al.*, 1998).

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

Oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease yang lain. Salah satunya adalah biduri (*Calotropis gigantea*) yang merupakan jenis tumbuhan semak liar di daerah tropis termasuk Indonesia. Menurut Van Stenis (1992) tanaman ini banyak tumbuh pada lahan kering dan sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan, bahkan pada beberapa daerah dianggap sebagai gulma.

Getah tanaman biduri dapat digunakan sebagai sumber enzim protease (Witono, 2002a; Witono, 2002b). Telah berhasil dikembangkan teknik produksi protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri, yakni dari daun dan pucuk batang biduri (Witono dkk, 2006). Teknik ini diketahui jauh lebih mudah dibanding ekstraksi dari getah, juga tidak terlalu beresiko terhadap penurunan aktivitas enzimnya selama produksi. Akan tetapi hasil dari teknik ini berupa *crude protease* yang berwarna hijau karena masih terkontaminasi dengan pigmen klorofil yang terikat pada protein enzim, sehingga akan bermasalah apabila diaplikasikan pada jenis produk pangan tertentu. Maka perlu dikembangkan teknik deklorofilasi dalam produksi protease yang diekstrak secara langsung

dari tanaman biduri. Penelitian ini bertujuan untuk menelaah teknik deklorofilasi agar didapat *crude protease* dengan minimal atau bebas klorofil yang memiliki aktivitas spesifik tinggi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang dan daun tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang di dapat dari pantai Watu Ulo kecamatan Ambulu kabupaten Jember. Daun beserta batang biduri yang telah dipotong dari induknya langsung dimasukkan dalam wadah tertutup yang telah berisi es batu. Bahan kimia yang digunakan berspesifikasi *pure analysis* sebagian besar dari *Merck* (Jerman) di antaranya ialah *celite absorbance*.

Sedangkan peralatan yang digunakan meliputi: sentrifuga Medifriger, sentrifuga Yenaco model YC-1180 (Jepang), Spectronic 21D Melton Roy, Spectrometer Geaesys 10 UV Scanning, Refrigerator, *Freeze drier* (Snijders Scientific), pH meter Jen Way tipe 3320 (Jerman), pengaduk magnet Stuart Scientific, vorteks thermolyne type 16700 Mixer, lemari pendingin Ger®, penangas air GFL 1083, kolom kromatografi, neraca analitik Ohaus dan pemanas listrik Gerhardt.

Cara Kerja

Penelitian dilakukan secara bertahap yang meliputi: **Tahap I:** penelitian pendahuluan; yakni mencari *dechlorophylation agent* yang paling sesuai dalam menurunkan kadar klorofil *crude protease* biduri. **Tahap II:** mengetahui profil elusi dari *dechloropylation agent* terpilih dan menentukan titik elusi sampai didapat protease biduri dengan kandungan klorofil minimal yang memiliki aktivitas spesifik protease tinggi. **Tahap III:** mengembangkan teknik deklorofilasi melalui pretreatment preparat pada suhu rendah. Analisa data dilakukan secara diskriptif (Suryabrata, 1994), ditabulasi dan diploting dalam bentuk grafik dan histogram.

Penelitian pendahuluan

Deklorofilasi dilakukan melalui kolom kromatografi menggunakan gel filtrasi CM Sephadex C-50, arang aktif dan *celite absorbance*. Filtrat dari ekstrak tanaman biduri dielusikan dalam kolom-kolom tersebut dalam jumlah terbatas, lalu diamati warna eluen dan aktivitas enzimnya. Selanjutnya dicuci kembali *dechlorophylation agent*-nya untuk ditelaah kemungkinan dapat dipakai kembali. Kemudian ditentukan *dechlorophylation agent* yang paling sesuai yang dapat menghasilkan eluen protease biduri yang jernih, memiliki aktivitas enzim, lebih mudah dicuci dan dapat dipakai ulang.

Penentuan profil elusi sampel melalui *celite absorbance* dan titik elusinya (Deklorofilasi Tahap 1)

Filtrat dari tanaman biduri dielusikan dalam kolom kromatografi yang berisi 5 gram *celite* (sebagaimana dipilih dari hasil penelitian pendahuluan). Eluen ditampung setiap 2 ml pada tabung reaksi. Elusi dihentikan sampai didapat eluen yang berwarna kehijauan. Sesuai hasil penelitian pendahuluan, elusi dihentikan sampai fraksi tabung 2 ml ke-15. Setiap fraksi diamati kadar klorofil, kadar protein dan aktivitas enzimnya. Selanjutnya ditentukan titik elusi dan kapasitas loading sehingga didapat eluen dengan minimal klorofil dan minimal protein tetapi memiliki aktivitas enzim yang tinggi.

Deklorofilasi melalui pretreatment preparat pada suhu rendah (*freezing*) (Deklorofilasi Tahap 2)

Sebelum dielusi pada kolom kromatografi yang berisi *celite*, preparat dibekukan terlebih dahulu selama semalam (± 12 jam), kemudian dilelehkan dan disentrifuga pada suhu dingin. Supernatan dielusikan pada kolom kromatografi yang berisi 5 gram *absorban celite* sampai didapat eluen yang berwarna kehijauan. Eluen ditampung setiap 4 ml pada tabung reaksi dan elusi dihentikan sampai tabung kesepuluh (didapat 40 ml eluen). Selanjutnya dipelajari profil elusinya, dengan mengamati perubahan kadar klorofil, kadar protein dan aktivitas enzimnya, serta dihitung kapasitas *loading* setiap kolom.

Pembandingan profil elusi preparat pasca *Freezing* dengan preparat pra-*freezing*

Mengekstrak 100 gram tanaman biduri dengan 300 ml buffer phospat 0.05 pH 7 yang mengandung 0.07% natrium metabisulfit, lalu disentrifus. Selanjutnya preparat dari supernatan biduri dijadikan 2 bagian. Preparat bagian pertama langsung dielusikan ke dalam kolom kromatografi yang berisi 5 gram celite sampai diperoleh 16 eluen terdeklorofilasi, lalu diamati kadar klorofil, kadar protein dan aktivitas enzimnya. Preparat bagian kedua difreezing semalam (\pm 12 jam) lalu dithawing pada suhu 4°C. Selanjutnya dielusi ke dalam kolom kromatografi yang berisi 5 gram celite sampai diperoleh 32 ml eluen terdeklorofilasi, diamati kadar klorofil, kadar protein dan aktivitas enzimnya. Profil kedua eluen diploting dalam histogram dan dibandingkan secara diskriptif.

Analisa kadar klorofil

Analisa kadar klorofil dilakukan menurut metode Gilpin (2001). Sebanyak 0.5 ml eluen ditampung dalam tabung sentrifuga, ditera sampai volumenya menjadi 5 ml lalu diaduk. Diamati absorbannya melalui spektrofotometer pada panjang gelombang 665 dan 750 nm. Selanjutnya eluen diasidifikasi dengan menambahkan 4 tetes HCl 1 M, lalu diaduk dan disentrifuga. Supernatan yang diperoleh diamati kembali absorbannya pada panjang gelombang 665 dan 750 nm. Adapun rumus perhitungan kadar klorofil dalam ekstrak adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar klorofil } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{26.7 \times (665_b - 665_a)}{L}$$

Keterangan:

665_b = absorban 665 nm pra asidifikasi - absorban 750 pra asidifikasi

665_a = absorban 665 nm pasca asidifikasi - absorban 750 pasca asidifikasi

L = panjang kuvet (3 cm)

Analisa kadar protein

Analisa kadar protein dilakukan menurut metode Lowry dalam Walker (2002). Mengambil sampel eluen sebanyak 0.125 ml untuk masing-masing fraksi, lalu dilakukan

hidrolisis protein untuk mendapatkan protein terlarut dengan menggunakan 0.1 ml NaOH 2N dan dipanaskan pada suhu 100° C selama 10 menit lalu didinginkan. Direaksikan dengan 2.5 ml reagen mix-lowry dan didiamkan selama 10 menit. Ditambahkan 0.25 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Ditera dengan aquades sampai volume 5 ml kemudian dibaca absorbannya dengan spektrophotometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar untuk dihitung kadar proteinnya.

Pengujian aktivitas protease

Pengujian aktivitas protease dilakukan menurut Stoknes and Rustad (1995) dan Walker (1994). Menimbang 0.01 gram soluble casein dalam tabung sentrifus lalu dicampur dengan 3 ml buffer phospat pH 7. Kemudian dilakukan pra inkubasi pada suhu 37°C selama 4 menit. Menambahkan sampel eluen protease biduri sebesar 0.5 ml, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Pada akhir inkubasi reaksi hidrolisis dihentikan dengan menambahkan 1 ml larutan TCA 15%. Sebagai kontrol (tanpa inkubasi), reaksi hidrolisis dilakukan pada waktu 0 menit, yakni penambahan 1 ml larutan TCA 15% dilakukan sebelum penambahan protease. Lalu ditera sampai volumenya menjadi 5 ml, disentrifus pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan diamati absorbannya pada spektrophotometer UV dengan panjang gelombang 280 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar tirosin untuk dihitung aktivitas hidrolisisnya.

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

$$1 \text{ unit aktivitas} = \frac{[C]}{t} \times \frac{1000}{181.19}$$

Keterangan

[C] = konsentrasi protein terlarut (μmol tirosin/ml)

t = waktu hidrolisis (menit)

181.19 = berat molekul tirosin

1 unit = 1 μmol tirosin yang di bebaskan dari substrat oleh setiap mg enzim pada suhu 55°C per menit.

Volume Loading dan Kapasitas Loading

Volume loading merupakan jumlah filtrat biduri yang yang terdeklorofilasi setiap gram *dechlorophylation agent* dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Volume loading} = \frac{\text{Volume Ekstrak terdeklorofilasi (ml)}}{\text{Berat Dechlorophylation Agent (g)}}$$

Kapasitas *loading* adalah kemampuan setiap *dechlorophylation agent* dalam menurunkan kadar klorofil dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kapasitas loading} = \frac{[\text{Chlor}^{\text{A}}] - [\text{Chlor}^{\text{B}}] / V}{W}$$

Keterangan:

$[\text{Chlor}^{\text{A}}]$ = Kadar klorofil filtrat awal ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)

$[\text{Chlor}^{\text{B}}]$ = Kadar klorofil filtrat terdeklorofilasi ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)

V = Total volume filtrat terdeklorofilasi (ml)

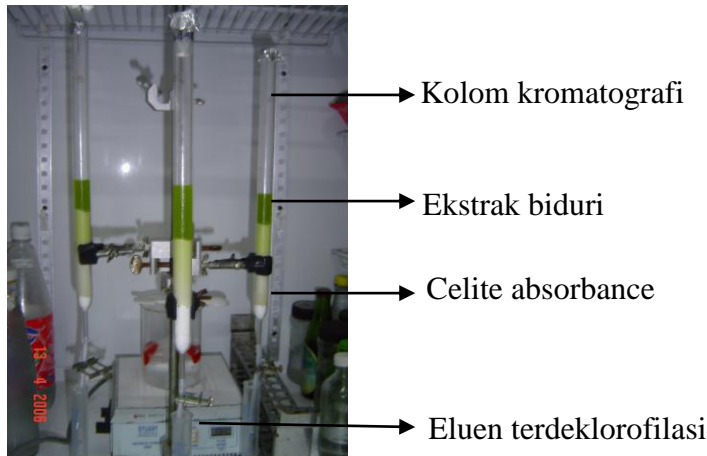
W = Berat *dechlorophylation agent* (g)

HASIL

Penelitian pendahuluan

Gel filtrasi CM Sephadex C-50, arang aktif maupun absorban celite memiliki kemampuan menurunkan kadar klorofil filtrat tanaman biduri, sebagaimana ditunjukkan dengan dihasilkannya warna yang lebih jernih pada fraksi-fraksi eluen awal. Akan tetapi CM Sephadex C-50 disamping harganya relatif lebih mahal dibanding celite, juga nilai *reuse*-nya menurun untuk deklorofilasi crude protease biduri, karena treatment pencucian jauh lebih sulit dibanding celite. Sedang eluen dari arang aktif masih mengandung sedikit butir-butir arang

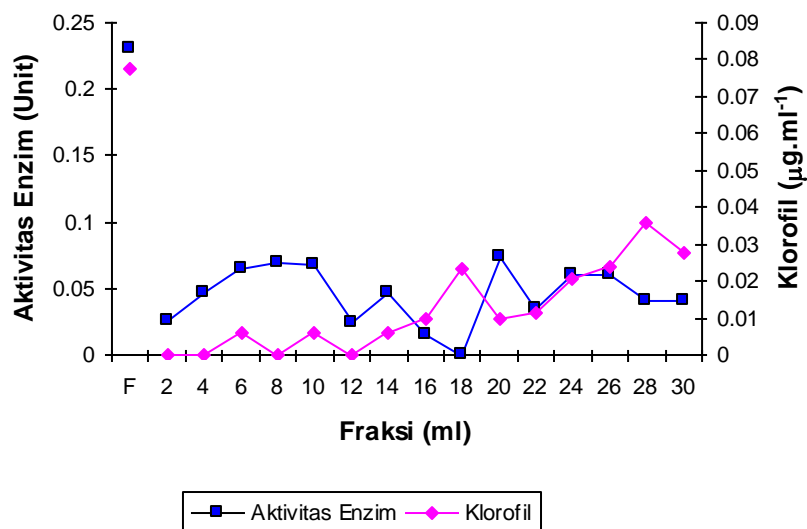
yang mengambang dalam eluen. Untuk itu selanjutnya dipilih deklorofilasi menggunakan *celite absorbance*, karena disamping harganya jauh lebih murah, juga preparasi dan pencuciannya lebih muda. Bahkan setelah dipakai ulang, kapasitas loadingnya tidak menurun. Adapun proses deklorofilasi melalui kolom *celite absorbance* sebagaimana tertera pada Gambar 1.



Gambar 1. Foto proses deklorofilasi ekstrak protease tanaman biduri

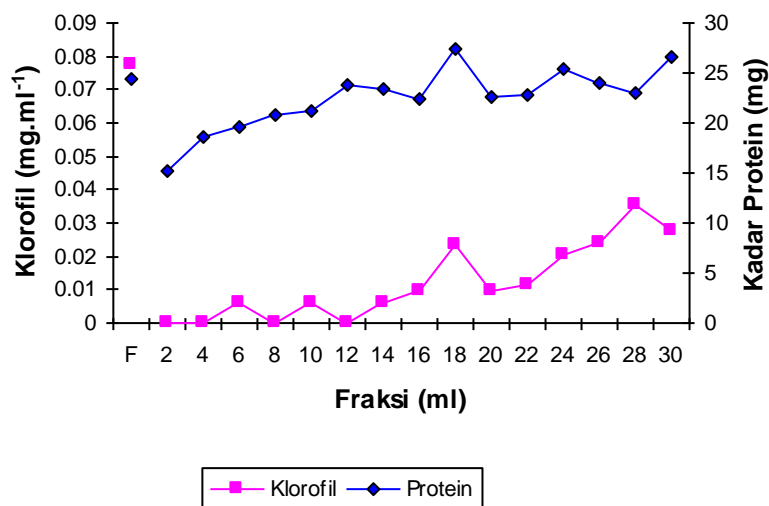
Profil elusi protease tanaman biduri terdeklorofilasi pada *Celite Absorbance*

Profil elusi protease dari ekstrak tanaman biduri yang terdeklorofilasi pada *celite absorbance* tertera pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 2. Profil perubahan kadar klorofil dan aktivitas enzim eluen dari ekstrak tanaman biduri

Gambar 2 menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar klorofil yang sangat tajam selama elusi melalui kolom celite dibanding filtrat awal (F) yang belum dielusi, bahkan terdapat beberapa fraksi yang sudah tidak menunjukkan adanya klorofil. Akan tetapi eluen dengan minimal klorofil didapat sampai fraksi tabung 2 ml ke-8 (fraksi 16 ml), selanjutnya menunjukkan adanya kenaikan klorofil yang cukup signifikan walaupun demikian kenaikan kadar klorofil sampai fraksi tabung 2 ml ke-15 masih jauh lebih rendah dari pada filtrat yang belum dielusikan. Seiring dengan penurunan kadar klorofil, nampaknya juga diikuti dengan penurunan aktivitas enzim. Namun demikian fraksi dengan minimal klorofil juga menunjukkan adanya aktivitas protease yang cukup tinggi.



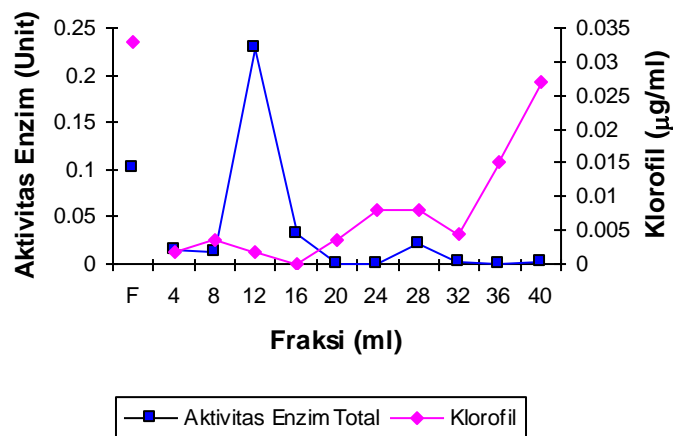
Gambar 3. Profil perubahan kadar klorofil dan kadar protein eluen dari ekstrak tanaman biduri

Gambar 3 menunjukkan bahwa seiring dengan penurunan kadar klorofil sampai fraksi tabung 2 ml ke-8 (fraksi 16 ml) ternyata juga diikuti dengan penurunan kadar protein terlarut eluen dari ekstrak tanaman biduri yang sangat signifikan. Peningkatan kadar klorofil setelah fraksi 16 ml juga menunjukkan peningkatan kadar protein eluen dari ekstrak tanaman biduri. Fraksi tabung 2 ml ke-1 sampai ke-8 dengan minimal klorofil dan minimal protein (Gambar 2 dan Gambar 3) ternyata didapat aktivitas enzim yang tersebar pada semua fraksi. Hal ini berarti selama elusi selain terjadi penurunan klorofil juga terjadi penurunan protein non enzim

yang cukup baik. Untuk itu akhir elusi ditentukan pada fraksi tabung 2 ml ke-8 atau pada 16 ml eluen. Selanjutnya dapat ditentukan volume loading sebesar 3.2 ml filtrat per gram celite atau sebesar 1.067 gram biduri setiap gram celite, dengan kapasitas loading absorban celite dalam menurunkan konsentrasi klorofil ekstrak tanaman biduri adalah sebesar 0.015 μg chlorophyll/gram celite.

Profil elusi protease tanaman biduri terdeklorofilasi pada celite absorbance pasca freezing

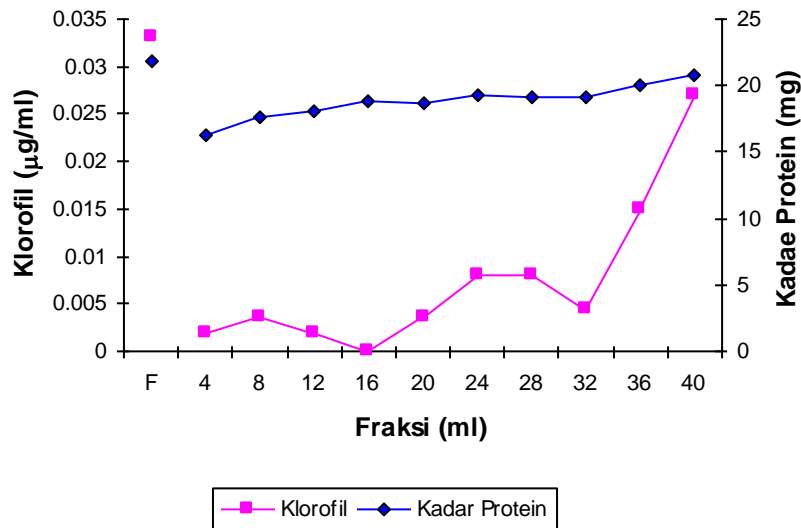
Profil elusi protease dari ekstrak tanaman biduri terdeklorofilasi pada absorban celite pasca freezing tertera pada Gambar 4 dan Gambar 5.



Gambar 4. Profil perubahan kadar klorofil dan aktivitas enzim eluen dari ekstrak tanaman biduri pasca freezing

Gambar 4 menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar klorofil yang sangat tajam selama elusi melalui kolom kromatografi dengan absorban celite dibanding filtrat awal (F) yang belum dielusi, bahkan terdapat fraksi yang sudah tidak menunjukkan adanya klorofil (fraksi 16 ml). Akan tetapi eluen dengan minimal klorofil didapat sampai fraksi tabung 4 ml ke-8 (fraksi 32 ml), selanjutnya menunjukkan adanya kenaikan klorofil yang sangat signifikan. Seiring dengan penurunan kadar klorofil, nampaknya juga diikuti dengan penurunan aktivitas enzim. Namun demikian fraksi dengan minimal klorofil masih

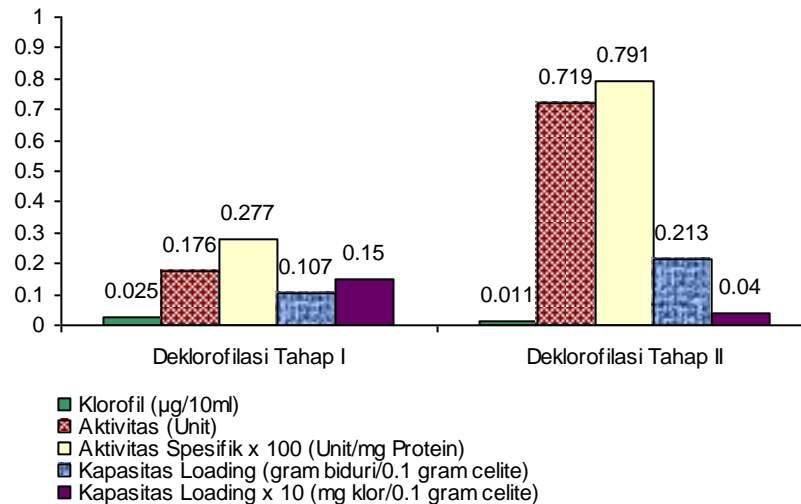
menunjukkan adanya aktivitas protease. Gambar 4 juga menunjukkan bahwa protein enzim paling banyak terelusi pada fraksi-fraksi awal terutama pada fraksi 12 ml dimana kadar klorofilnya juga relatif rendah.



Gambar 5. Profil perubahan kadar klorofil dan kadar protein eluen protease dari ekstrak tanaman biduri pasca freezing

Gambar 5 menunjukkan bahwa seiring dengan penurunan kadar klorofil sampai fraksi 32 ml ternyata kadar protein terlarut eluen dari ekstrak tanaman biduri pasca freezing juga relatif rendah. Peningkatan kadar klorofil diatas fraksi 32 ml, juga menunjukkan peningkatan kadar protein eluen dari ekstrak tanaman biduri pasca freezing. Fraksi tabung 4 ml ke-1 sampai ke-8 dengan minimal klorofil dan minimal protein (Gambar 4 dan Gambar 5) ternyata didapat aktivitas enzim yang relatif lebih tinggi dari pada fraksi-fraksi akhir. Untuk itu akhir elusi ditentukan pada fraksi tabung 4 ml ke-8 atau pada 32 ml eluen. Dalam hal ini volume loading sebesar 6.4 ml filtrat setiap gram celite atau 2.13 gram biduri setiap gram celite, dengan kapasitas loading absorban celite dalam menurunkan konsentrasi klorofil ekstrak tanaman biduri pasca freezing adalah sebesar 0.004 μg chlorophyll/gram celite.

Gambar 6 merupakan perbandingan perubahan klorofil, protein maupun aktivitas enzim protease dari tanaman biduri pada elusi pertama (pra *freezing*) dengan elusi kedua (pasca *freezing*).



Gambar 6. Histogram perbandingan profil eluen protease dari ekstrak tanaman biduri terdeklorofilasi pra-freezing dan pasca freezing

Gambar 6 menunjukkan bahwa hasil elusi tahap pertama didapat eluen terdeklorofilasi sebanyak 16 ml atau kapasitas loadingnya sebesar 1.07 gram biduri per gram celite. Akan tetapi setelah ekstrak tanaman biduri dibekukan selama 12 jam didapat eluen biduri terdeklorofilasi yang lebih banyak yakni sebesar 32 ml dengan volume loading sebesar 2.13 gram biduri per gram celite. Sehingga terjadi peningkatan sebesar 2 kali volume cara deklorofilasi tahap pertama, yakni terjadi penurunan kadar klorofil menjadi di bawah 44 % kadar klorofil crude protease biduri elusi tahap pertama. Terlebih bila dibandingkan dengan kadar klorofil filtrat awal sebelum dideklorofilasi, terjadi penurunan sampai di bawah 1.5 %-nya, bahkan terjadi peningkatan aktivitas spesifik sebesar 286 % dibanding cara deklorofilasi tahap pertama. Akan tetapi Gambar 6 menunjukkan bahwa kapasitas loading dari celite dalam menjerap klorofil terjadi penurunan dari 0.015 μg chlorophyll/gram celite (pada elusi tahap pertama) menjadi sebesar 0.004 μg chlorophyll/gram celite (pada elusi tahap kedua).

PEMBAHASAN

Elusi melalui kolom dengan absorban celite sampai fraksi 16 ml filtrat (deklorofilasi tahap 1), dihasilkan *crude protease* biduri dengan minimal klorofil. Seiring dengan penurunan klorofil juga terjadi penurunan kadar protein. Hal ini karena celite bersifat menjerap klorofil dan molekul protein serta klorofil yang terikat dengan molekul protein. Sebagaimana dilaporkan oleh Jumpatong *et al.* (2006) bahwa dalam proses isolasi komponen produk alam dari tanaman berupa matiks organik yang tersusun atas karbohidrat, tanin, pigmen dan lain-lain yang umumnya harus dihilangkan dari *crude* ekstrak. Witono dkk. (2006) menambahkan, bahwa enzim protease yang diekstrak secara langsung dari bagian tanaman (daun dan pucuk batang) biduri masih mengandung pigmen klorofil yang terikat bersama protein enzim. Menurut Sharpe (2005) celite berperan sebagai filtrasi yang mampu menghilangkan protein dan berbagai impuritas termasuk klorofil dari suatu produk organik.

Elusi setelah fraksi 16 ml filtrat (deklorofilasi tahap 1) terjadi peningkatan klorofil yang cukup signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa celite memiliki kapasitas loading tertentu dalam menjerap klorofil, yakni sebesar 0.015 μg chlorophyll/gram celite. Seiring dengan peningkatan kadar klorofil, juga diikuti dengan peningkatan kadar protein pada elusi setelah fraksi 16 ml filtrate.

Dibandingkan dengan deklorofilasi tahap 1, filtrat tanaman biduri yang dibekukan selama 12 jam (deklorofilasi tahap 2) didapat eluen biduri terdeklorofilasi yang lebih banyak, yakni sebesar 32 ml atau terjadi peningkatan sebesar 2 kali volume cara tahap pertama, dengan penurunan kadar klorofil menjadi di bawah 44 % kadar klorofil *crude protease* biduri elusi tahap pertama (*pra freezing*), bahkan terjadi peningkatan aktivitas spesifik sebesar 286 % dibanding cara tahap pertama. Hal ini diduga selama pembekuan selain terjadi penurunan klorofil, juga terjadi presipitasi protein non enzim yang lebih besar dan perlakuan tersebut tidak menyebabkan penurunan aktivitas proteolitik dari enzim biduri. Terbukti dengan

aktivitas spesifik protease yang paling tinggi pada fraksi-fraksi awal (Gambar tidak ditunjukkan). Sehingga treatment freezing dan elusi dalam absorbansi celite sangat memungkinkan untuk dijadikan sebagai salah satu alternatif proses purifikasi suatu crude protease dari ekstrak tanaman.

Walaupun demikian, perlakuan freezing selain mempresipitasi protein non enzim juga klorofil yang terikat (*bounding*) dengan protein non enzim, namun sangat sulit menurunkan klorofil yang *bounding* dengan protein enzim atau karena diduga terdapat klorofil yang terikat secara kuat dengan protein enzim, sehingga masih sulit dijerap secara keseluruhan oleh celite. Sebagaimana dibuktikan dengan menurunnya kapasitas loading celite dalam menjerap klorofil dari 0.015 µg chlorophyll/gram celite (pada elusi tahap pertama) menjadi sebesar 0.004 µg chlorophyll/gram celite (pada elusi tahap kedua).

Selanjutnya dapat direkomendasikan, bahwa untuk memproduksi enzim protease yang diekstrak secara langsung dari tanaman biduri dapat dilakukan dengan teknik deklorofilasi, yakni elusi filtrat melalui kolom dengan *celite absorbance* pasca pembekuan preparat. Deklorofilasi melalui *celite absorbance* lebih baik bila dibandingkan dengan menggunakan arang aktif dan lebih murah bila dibanding menggunakan resin sephadex, bahkan diduga lebih mudah dibanding menggunakan teknik elektrokoagulasi dan lebih aman dibanding menggunakan pelarut kimia. Selanjutnya perlu ditelaah aplikasi protease terdeklorofilasi pada proses pangan yang sesuai.

KEPUSTAKAAN

- Gilpin L., 2001. *Methods for Analysis of Benthic Photosynthetic pigment, School of Life Sciences*, Napier University, Edinburg, 1-3.
- Jumpatong K., Phutdhawong W, dan Buddhasukh D., 2006. Dechlorophyllation by Electrocoagulation. *Molecules*. 11: 156-162.

- Rao MB., Tanksale AM., Ghatge MS. dan Desphande VV., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease, *American Society for Microbiology*, 62 (3): 597-607.
- Sharpe AN., 2005. *Membrane Filtration and Useful info Re spread-filters and Replicators*. Filtaflex, Ontario, 1-5.
- Stoknes I dan Rustad T., 1995. Proteolytic Activity in Muscle from Atlantic salmon (*Salmo salar*), *J. Food Sci.*, 60 (4): 711-714.
- Suhartono MT., Lestari LN. dan Tanoyo T., 1995. *Study on Protease from Aspergillus oryzae Isolated from Soy Sauce Processing in Indonesia*. *J. Indonesia Trop. Agric.*, 6 (2): 21-25.
- Suryabrata S, 1994. *Metodologi Penelitian*. Raja Grafindo Persada. Jakarta, 9-57.
- Van Stenis, 1992. *Flora*. Pradnya Paramita. Jakarta, 255-326.
- Walker JM., 2002. *The Protein Protocols Handbook*. Second Edition. Humana Press. New Jersey, 3-10.
- Witono Y, 2002a. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri. *J. Teknologi Hasil Pertanian*, 1(1): 1- 14.
- Witono Y, 2002b. Pemanfaatan Enzim Protease dari Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan. *J. Sains dan Teknologi*, 1(1): 32 - 37.
- Witono Y, Subagio A, Susanto T dan Widjanarko SB., 2006. Telaah Teknik Produksi Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia*, Yogyakarta.
- Word OP., 1983. *Properties of Microbial Protease*. In *Microbial Enzyme and Biotechnology*. (Ed Forgety). Appl. Publ. London, 56-102.