

# SPESIFITAS DAN STABILITAS ENZIM PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*)

Yuli Witono

Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember  
Jl. Kalimantan I Jember (68121); Email: ylwitono@yahoo.com

## ABSTRAK

Pemakaian enzim protease bagi industri pangan cenderung meningkat, sementara ketersediaannya belum mencukupi kebutuhan, oleh karena itu perlu dicari sumber enzim protease yang lain. Salah satu bahan yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber enzim protease adalah tanaman biduri. Biduri merupakan jenis tumbuhan semak liar tropis termasuk di Indonesia yang populasinya cukup melimpah, tumbuh pada lahan kering dan areal sekitar pantai. Tanaman tersebut hingga saat ini belum dimanfaatkan secara optimal. Penelitian ini merupakan studi lanjut dari karakterisasi parsial protease biduri sebagai dasar untuk keperluan aplikasinya lebih lanjut. Hasil isolasi diuji spesifitasnya dalam menghidrolisis substrat berikut stabilitasnya pada berbagai reagen spesifik.

Berdasarkan sifat kimia sisi aktifnya, protease biduri termasuk dalam jenis sulfidril (*cysteine protease*). Aktivitasnya stabil pada larutan garam dan deterjen, namun menurun pada larutan berkapur dan berlogam. Protease biduri mampu menghidrolisis substrat kasein, isolat protein kedelai, isolat protein koro, myofibril ikan dan gelatin. Sedangkan berdasarkan pola pemecahan substratnya, protease biduri diindikasikan termasuk dalam kelompok eksopeptidase. Sehingga potensial untuk proses pembuatan hidrolisat protein (*specific flavor enhancer*).

*Kata kunci: biduri, cysteine protease, derajat hidrolisis, eksopeptidase.*

## PENDAHULUAN

Protease sejauh ini merupakan enzim yang paling penting peranannya dalam industri pangan di antara enzim lainnya. Enzim ini digunakan dalam produksi flavor, pembuatan keju, pembuatan bir dingin, pengempukan daging, dan modifikasi senyawa protein dari sereal dalam pembuatan roti dan industri sereal (Whittaker, 1994).

Pemakaian enzim protease meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 1983, penjualan 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. Protease dari tanaman biasanya terdapat pada tanaman tropis. Enzim ini ditemukan pada papaya (*Carica papaya*), nanas (*Anana sativa*), ficus (*Ficus carica*, *Ficus glabrata*), artichokes (*Cynera cardunculus*), dan kedelai (*Soya hispidus*). Semuanya berada dalam satu golongan enzim. Jus dari beberapa spesies *agave* juga memiliki kemampuan proteolitik yang kuat (Uhlig, 1998).

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 meter yang tumbuh di daerah kering dengan periode kering yang lama, termasuk di Indonesia. Biduri 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, biji,

kulit, daun, sampai bunganya (Stenis, 1992). Masyarakat menggunakan getah tanaman biduri untuk menghilangkan gatal pada anak-anak terutama akibat cacar, menyembuhkan penyakit kudis, membantu menanggalkan gigi, dan masih banyak kegunaan lainnya.

Terkait dengan berbagai manfaat yang dikandung oleh tanaman biduri tersebut, maka serangkaian penelitian enzim dari tanaman biduri telah dilakukan. Hasil penelitian sebelumnya telah menunjukkan adanya aktivitas protease dari hasil ekstraksi getah tanaman biduri (Witono, 2002). Pada penelitian selanjutnya, juga telah dilakukan ekstraksi enzim protease dari getah biduri serta purifikasi (pemurnian) enzim tersebut sehingga mudah digunakan (Witono dkk, 2004; Witono dkk, 2007). Karakterisasi sebagian juga telah dilakukan dengan mengamati suhu optimum, pH optimum, kinetika, termostabilitas dan derajat hidrolisa enzim. Karakteristik yang belum diketahui adalah jenis protease, aktivator dan inhibitor enzim, stabilitas pada detergen serta pola pemecahan substrat (eksopeptidase atau endopeptidase).

Sebelum enzim protease biduri diproduksi dan dimanfaatkan secara luas, perlu diketahui terlebih dahulu karakter spesifik yang dimiliki enzim tersebut. Dengan diketahui karakter enzim, maka dapat dijadikan acuan atau dasar untuk produksi enzim lebih lanjut serta penggunaan enzim dalam pengolahan pangan. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan: (1) jenis protease biduri, beserta pengaruh beberapa aktivator dan inhibitor terhadap aktivitasnya, (2) derajat hidrolisis enzim protease biduri terhadap beberapa substrat berprotein, (3) stabilitas enzim protease biduri terhadap deterjen, dan (4) pola pemecahan substrat oleh protease biduri (eksoprotease atau endoprotease).

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah getah, daun dan batang atas tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang didapat dari pantai Watu Ulo-Ambulu Kabupaten Jember dan Grati Pasuruan-Jawa Timur. Getah disadap pada pagi hari (jam 04.00-09.00 WIB) dengan cara melukai atau memotong pucuk batang tanaman biduri, lalu dibawa pada kondisi dingin dalam termos yang telah diisi es batu. Bahan kimia yang digunakan berspesifikasi *pure analysis* sebagian besar dari *Merck* Jerman. Diantaranya adalah ammonium sulfat, buffer fosfat pH 7 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M), buffer fosfat 4% pH 8,2 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M dan 4%), tirosin standar, BSA standar, *soluble caseine*, larutan NaOH 2 N, larutan TCA 15%, reagen Mix-Lowry ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , asam tartar dan  $\text{CuSO}_4$  1%), reagen follin, HCl 1 N, *coomassie blue*, reagen TNBS, resin (sephadex G-25, sephadex G-100, DEAE cellulose, CM sephadex C-50 dan celite absorbance), TFA, reagen inhibitor/aktivator spesifik (sistein, PMSF, EDTA, merkaptoethanol,  $\text{MgCl}_2$ , NaCl,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ , KCl masing-masing 1 mM dan 5 mM), aquades dan aquabides. Juga digunakan deterjen merk *Surf* (Indonesia).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: centrifuge (Medifriger), centrifuge (Yenaco model YC-1180, Jepang), selopan, freeze dryer (Snijder Scientific tipe 2040, Belanda), spektrofotometer (Prim Secomam, Jerman), Spectrometer (Geaesy 10 UV Scanning, US), pH meter (Jen Way tipe 3320, Jerman), magnetik stirer (Stuart Scientific), vortex (Thermolyne tipe 16700 Mixer), lemari pendingin (Gea®, Jepang), Frezeer, waterbath (GFL 1083), neraca analitik (Ohaus), pemanas listrik (Gerhardt), penangas air (Cimerec 2), elektroforesis (Bio-Rad), spatula, blender (Fisher General Sci., Singapura), microcentrifuge tube 1,5 ml natural, *blue pettor tip* (Fisherbrand), *color reader* (Minolta CR-10, Jepang), *vacuum oven* (Lab-Line), eksikator (Nalgene®), pisau stainless steel, *glass wool*, *glass ware* (Pyrex®, Jepang), botol film, kolom kromatografi, capillary tube, *viscometer* Oswald dan ayakan 80 mesh.

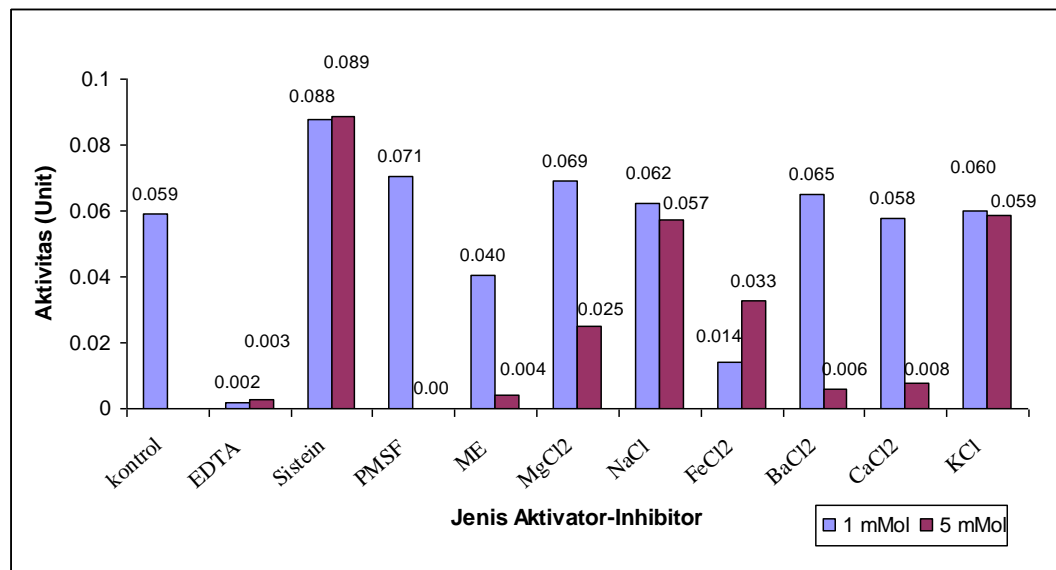
## Metode

Isolat enzim yang dihasilkan dari proses di atas selanjutnya ditentukan spesifitas dan stabilitasnya secara cermat. Beberapa parameter dipilih dengan seksama yang merujuk pada sifat-sifat khas enzim protease pada umumnya, meliputi: (1) jenis proteasenya; berdasarkan sifat kimia sisi aktifnya apakah termasuk dalam protease serin, sulfidril, serin atau protease asam, yang diamati menggunakan reagen pengaktif dan penghambat aktivitasnya (Adinarayana *et al*, 2003 dengan modifikasi); (2) stabilitas protease pada beberapa reagen inhibitor dan aktivator spesifik; (3) derajat hidrolisis protease biduri pada berbagai substrat protein diuji dengan metode TNBS; dan (4) pola pemecahan substrat (endopeptidase/eksopeptidase); yang di uji dari hasil reaksi enzimatik menggunakan metode SDS-PAGE dan TLC. Aktivitas protease biduri diamati menurut Stoknes and Rustad (1995) dan Walker (1994) dengan modifikasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Jenis Protease serta Pengaruh Reagen Inhibitor dan Aktivator terhadap Aktivitasnya

Hasil identifikasi berikut pengaruh berbagai inhibitor dan aktivator terhadap aktivitas protease biduri sebagaimana tertera pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Pengaruh Inhibitor dan Aktivator terhadap Aktivitas Protease Biduri

Gambar 1 menunjukkan adanya peningkatan aktivitas protease dengan penambahan sistein baik 1 mM maupun 5 mM, juga terjadi penurunan aktivitas dengan penambahan  $\beta$ -merkaptotanol. Gambar 5.10 menunjukkan bahwa protease biduri berdasarkan sifat kimia sisi aktifnya termasuk dalam jenis sulfidril (*cysteine protease*). Hal ini memperkuat dugaan dari hasil penelitian sebelumnya (Witono, 2002) bahwa protease biduri juga aktif dengan penambahan aktivator spesifik lainnya yakni HCN. Rao *et al.* (1998) menyatakan bahwa protease sulfidril akan meningkat aktivitasnya bila ditambah reagen sistein. Suhartono, dkk. (1995) melaporkan bahwa penambahan HCN juga dapat meningkatkan aktivitas protease sulfidril. Sementara itu, Adinarayana *et al.* (2003) dalam percobaannya menggunakan merkaptotanol yang disebut sebagai penghambat enzim protease sistein.

Protease sulfidril (*cysteine protease*) sangat tergantung dengan adanya gugus sulfidril (sistein) pada sisi aktifnya. Mekanisme proteolitik *cysteine protease* diawali dengan terbentuknya formasi kompleks *non-covalent Michaelis*, dimana gugus sulfhidril akan menyerang langsung atom C pada ikatan peptida. Selanjutnya terbentuk *intermediate tetrahedral* pertama, yakni terjadinya ikatan antara sulfidril dengan atom C yang diserang

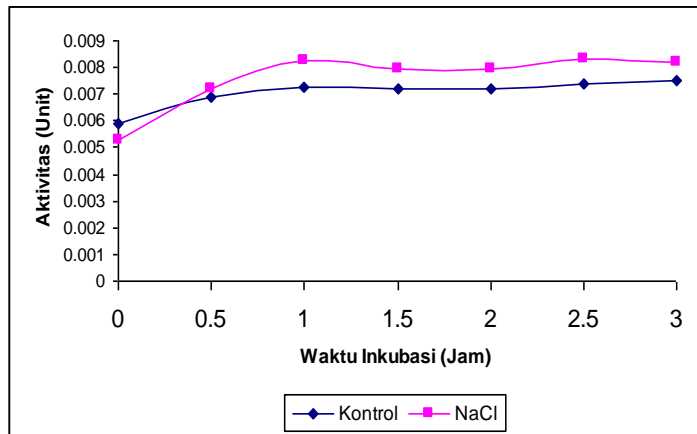
tersebut. Ikatan peptida pada *intermediate tetrahedral* pertama ini masih tersambung, selanjutnya terjadi proses asilasi sehingga akan terbentuk asil antara enzim dan protein dari substrat, dimana ikatan peptida sudah terlepas. Bagian atom C bersifat *nukleus* (bermuatan positif), maka selanjutnya akan terjadi serangan nukleofilik dengan kehadiran air. Hasil serangan tersebut akan menjadi *intermediate tetrahedral* kedua, dimana peptida masih terikat, sedang posisi peptida kedua diisi oleh gugus OH dari air. Kemudian terjadi perilisan sehingga terbentuk gugus karboksil bebas baru (Otto and Schirmeister, 1997).

Hasil identifikasi jenis protease sebagaimana tertera pada Gambar 1, telah mengungkap adanya beberapa fenomena yang menarik bagi jenis protease sistein (sulfidril) dari tanaman biduri yang selanjutnya dapat diuraikan pada pembahasan berikut. Fenomena-fenomena tersebut tentunya akan semakin menambah informasi ilmiah yang terkait dengan karakteristik protease jenis sulfidril khususnya yang berasal dari tanaman biduri.

Gambar 1 menunjukkan bahwa aktivitas protease biduri menurun tajam dengan perlakuan EDTA (*ethylene diamine tetra acetic acid*) 1 mM dan bahkan inaktif pada konsentrasi EDTA 5 mM, padahal menurut Suhartono, dkk. (1995), EDTA merupakan penghambat spesifik bagi jenis protease logam. Adapun mekanisme penghambatan EDTA pada protease sistein dari tanaman biduri ini dapat dijelaskan dengan hipotesa berikut: (1) mengikuti mekanisme umum penghambatan suatu protease sistein (Rzychon *et al.*, 2004), yakni menghalangi interaksi protease dengan substrat, di antaranya dengan cara: (i) memblokir interaksi non-kovalen rantai samping pusat aktif enzim, (ii) mendistorsi interaksi kovalen pusat aktif dengan substrat, (iii) memblokir secara parsial pusat aktif enzim sehingga mengganggu interaksi non-kovalen dengan substrat; dan (2) protease sistein dari biduri berdasarkan hasil penelitian (Gambar 1) membutuhkan stabiliser dari jenis logam ringan tertentu dengan konsentrasi yang rendah, seperti  $MgCl_2$  1 mM. Adanya EDTA akan mengikat logam tersebut sehingga akan menurunkan aktivitasnya. Menurut Murata (1975), secara umum EDTA mampu mengkelat logam bervalensi 2 dengan membentuk kompleks EDTA-Logam. EDTA juga dapat mengikat ion kalsium membentuk kompleks EDTA- $Ca^+$ . Sementara itu, hasil penelitian pada Gambar 5.10 menunjukkan bahwa senyawa berkalsium pada konsentrasi rendah (1 mM) juga dapat menstabilkan aktivitas enzim biduri.

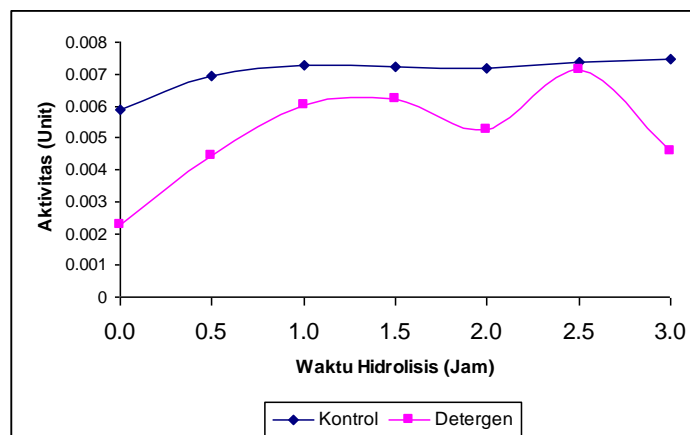
PMSF yang diketahui sebagai penghambat spesifik protease serin hanya mampu menghambat aktivitas protease biduri secara parsial yakni pada level konsentrasi 5 mM. Protease biduri ternyata juga menunjukkan penurunan aktivitas pada senyawa metal seperti  $FeCl_2$  baik pada level 1 mM maupun 5 mM, sedang dengan  $MgCl_2$  dihambat aktivitasnya pada level konsentrasi 5 mM. Juga aktivitasnya cenderung menurun pada senyawa-senyawa berkapur seperti  $CaCl_2$  dan  $BaCl_2$  konsentrasi 5 mM, tetapi pada konsentrasi 1 mM cenderung stabil.

Fenomena menarik juga terdapat pada Gambar 1, yakni bahwa aktivitas protease biduri stabil pada senyawa garam seperti NaCl maupun KCl baik konsentrasi 1 mM maupun 5 mM. Bahkan setelah diuji lebih lanjut (Gambar 2) semakin memperkuat fenomena di atas, yakni inkubasi sampai 3 jam pada larutan garam menunjukkan aktivitas yang stabil. Hal ini sesuai dengan fakta bahwa salah satu habitat tanaman biduri sebagai sumber protease berada di area dekat pantai, sehingga stabilitas pada larutan garam diduga sesuai dengan sifat *native* dari protease biduri.



**Gambar 2.** Stabilitas Protease Biduri pada Larutan Garam (NaCl)

Hasil ini dapat dijadikan salah satu rekomendasi, bahwa untuk penanganan atau penyimpanan protease biduri selain dalam bentuk *dried powder*, juga memungkinkan disimpan dalam bentuk cairan dengan menambahkan larutan garam sebagai stabilisator.

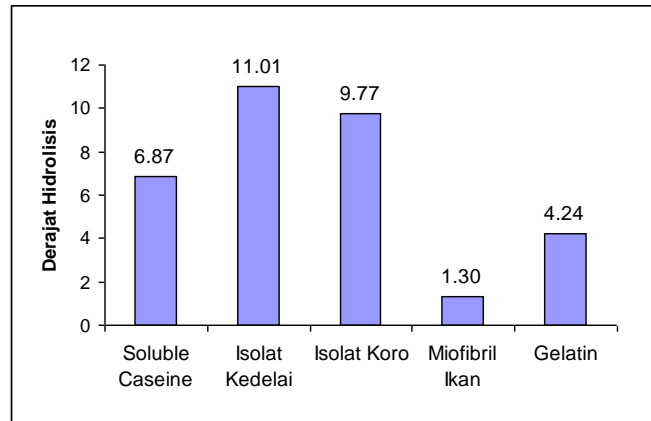


**Gambar 3.** Stabilitas Protease Biduri pada Larutan Deterjen

Fenomena menarik berikutnya sebagaimana ditunjukkan oleh Gambar 3, yakni protease biduri relatif stabil sampai 3 jam inkubasi pada larutan deterjen, meskipun tingkat stabilitasnya masih di bawah kontrol (protease biduri tanpa penambahan deterjen). Hal ini mengindikasikan bahwa protease biduri memiliki potensi untuk digunakan sebagai salah satu campuran bahan aktif pada pembuatan deterjen.

#### **Derajat Hidrolisis Protease Biduri**

Histogram derajat hidrolisis protease biduri pada berbagai substrat protein (*soluble caseine*, isolat protein kedelai, isolat protein koro, miofibril ikan dan gelatin) sebagaimana tertera pada Gambar 4.



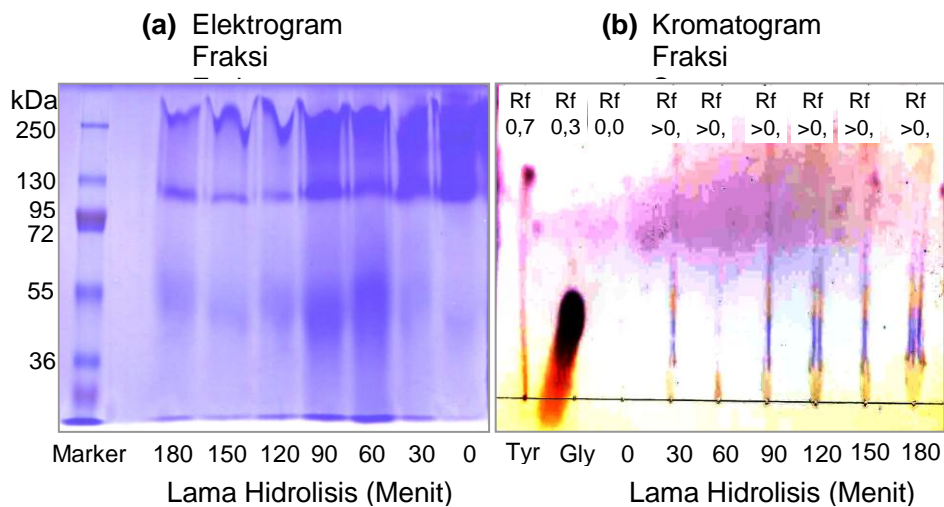
**Gambar 4.** Derajat Hidrolisis Protease Biduri pada berbagai Substrat Protein

Gambar 4 menunjukkan bahwa protease biduri mampu menghidrolisis berbagai jenis substrat sampel yang meliputi: *soluble caseine*, isolat protein kedelai, isolat protein koro, miofibril ikan dan gelatin dengan derajat hidrolisis yang bervariasi. Pada konsentrasi dan lama inkubasi yang sama, dihasilkan derajat hidrolisis protease biduri yang berbeda-beda. Perbedaan derajat hidrolisis protease biduri tersebut lebih disebabkan oleh perbedaan jumlah ikatan peptida atau besarnya molekul dari protein substrat. Menurut Nielsen (2001) jumlah total ikatan peptida dari masing-masing substrat tidak sama, sehingga akan berpengaruh terhadap derajat hidrolisis suatu enzim dalam memecah substrat.

Perbedaan derajat hidrolisis diduga juga dipengaruhi oleh spesifitas protease dalam menghidrolisis substrat. Sebagaimana dinyatakan oleh Fox (1991), bahwa spesifitas enzim protease berbeda-beda dalam menghidrolisa ikatan peptida dalam molekul protein. Whitaker (1994) menambahkan beberapa enzim protease mempunyai syarat khusus untuk aktivitas proteolitiknya. Semakin spesifik suatu enzim, semakin sedikit jumlah ikatan peptida yang mampu dihidrolisa.

#### Pola Pemecahan Substrat

Hasil SDS-PAGE dan TLC pola pemecahan substrat dari enzim protease biduri sebagaimana tertera pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Hasil SDS-PAGE (a) dan TLC (b) Pola Pemecahan Substrat Bovine Serume Albumin dari Enzim Protease Biduri

Gambar 5a merupakan elektrogram dari fraksi endapan yakni fraksi protein dari substrat yang belum terhidrolisis oleh protease biduri, sedangkan Gambar 5b merupakan

kromatogram dari fraksi supernatan, yakni fraksi protein dari hidrolisat atau protein yang terhidrolisis oleh protease biduri. Menurut Kaneda *et al.* (1997), berdasarkan pola pemecahan substratnya, enzim protease digolongkan dalam dua jenis yakni: (1) endopeptidase, merupakan protease yang memotong ikatan peptida di tengah; dan (2) eksopeptidase, merupakan protease yang memecah ikatan peptida pada terminal (ujung) dari protein. Hasil hidrolisis dari endopeptidase merupakan fragmen peptida dan peptida, sedangkan hasil hidrolisis dari golongan eksopeptidase berupa fragmen peptida dan asam-asam amino. Menurut Fox (1991) dan Anderson, Sze and Sathe (1995), hasil reaksi suatu enzim dapat diidentifikasi dengan substrat yang dihidrolisis maupun produk hasil hidrolisisnya.

Penentuan golongan peptidase dari biduri ini didekati dengan dua metode, yakni metode elektroforesis (SDS-PAGE) dari fraksi endapan yang belum terhidrolisis, dan untuk memperkuat dugaan maka hidrolisat (supernatan) dari fraksi yang terhidrolisis dideteksi menggunakan TLC. Hasil hidrolisis selama 0 sampai 180 menit dengan interval 30 menit (Gambar 5a) menunjukkan adanya perbedaan intensitas warna *band-band* (pita protein) dari produk hasil hidrolisis pada elektrogram, semakin lama waktu hidrolisis sampai 180 menit, menunjukkan intensitas band yang semakin tipis. Sebagaimana diketahui, bahwa band-band pada elektrogram tersebut merupakan protein yang berasal dari fraksi endapan atau fraksi dari substrat yang belum terhidrolisis oleh protease biduri. Bila hasil identifikasi dengan SDS-PAGE menghasilkan band-band atau pita-pita protein ganda seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi, maka mengindikasikan suatu golongan endopeptidase, tetapi sebaliknya bila identifikasi dengan SDS-PAGE menghasilkan pita-pita yang semakin tipis seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi, maka mengindikasikan suatu golongan eksopeptidase. Oleh karena itu, berdasarkan pola pemecahan substratnya dari hasil penelitian Gambar 5a, mengindikasikan bahwa enzim protease biduri merupakan enzim eksopeptidase. Jenis eksopeptidase memecah polipeptida pada ujung protein, sehingga dihasilkan peptida rantai panjang dan asam-asam amino. Waktu inkubasi yang semakin lama berakibat peptida rantai panjang akan semakin pendek atau pengujian melalui SDS-PAGE akan menunjukkan band-band yang semakin tipis atau menghasilkan pita-pita baru dengan BM yang lebih rendah.

Terbentuknya asam-asam amino hasil hidrolisis dari fraksi supernatan (hidrolisat) juga diperkuat oleh hasil elusi melalui TLC (Gambar 5b) yang menunjukkan jarak elusi yang semakin panjang (menjauh) dari gerakan elusi asam amino standar satu (glisin) maupun gerakan asam amino standar lainnya (tirosin). Hal ini berarti hasil hidrolisis dari protease biduri berupa asam-asam amino. Menurut Loffler (1986) enzim eksopeptidase merupakan enzim yang memecah asam amino terminal dari salah satu ujung protein dengan cara menghidrolisis ikatan peptidanya, sehingga hasil hidrolisis dari enzim biduri berupa peptida dan asam-asam amino.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan sifat kimia dari sisi aktifnya, protease biduri termasuk dalam jenis sulfidril (*cysteine protease*) yang memiliki stabilitas pada larutan garam dan deterjen. Protease biduri mampu menghidrolisis berbagai jenis substrat (kasein, isolat protein kedelai, isolat protein koro, miofibril ikan dan gelatin) dengan derajat hidrolisis yang bervariasi. Berdasarkan pola pemecahan substratnya, protease biduri terindikasi dalam eksopeptidase yang sangat potensial untuk pembuatan hidrolisat protein dan memperbaiki flavor produk pangan tertentu. Berdasarkan spesifitas tersebut, maka protease dapat diaplikasikan sebagai agen aktif pada proses pembuatan flavor enhancer dan berpotensi digunakan sebagai bahan campuran aktif pada deterjen.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (DP2M) DIKTI yang telah mensupport kegiatan penelitian ini melalui Program Hibah Kompetensi Batch II T.A. 2009.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., Ellaiah, P. and Prasad, D.S., 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11, *AAPS PharmSciTech*, 4 (4), 1-9.
- Anderson, E., Sze, K.W.C. and Sathe, S.K., 1995. New Colorimetric Method for the Detection and Quantitation of Proteolytic Enzyme Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (6), 1530-1534.
- Fox, P.F., 1991. *Food Enzymology*. Elsevier Applied Science. New York.
- [http://www.mediaindo.co.id/newsprint.asp?Id=2004090705809&Jenis=c&cat\\_name=Opini](http://www.mediaindo.co.id/newsprint.asp?Id=2004090705809&Jenis=c&cat_name=Opini).  
Diakses 12 April 2005
- 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.
- Loffler, A., 1986. Proteolytic Enzymes: Sources and Applications. *J. Food Tech.*, 40, 63-70.
- Nielsen, P.M., 2001. *Food Proteins and Their Applications*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Otto, H.H. and Schirmeister, T., 1997. Cysteine Proteases and Their Inhibitors, *Chemical Reviews*, 97 (1), 133-171.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Desphande, V.V., 1998, *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease*, American Society for Microbiology.
- Rzychon, M., Chmiel, D. and Stec-Niemczyk, J., 2004. Modes of Inhibition of Cysteine Proteases. *Acta Biochimica Polonica*, 51 (4): 861-873.
- Stenis, T. (1992) *Flora*. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Stoknes, I. and Rustad, T., 1995. Proteolytic Activity in Muscle from Atlantic salmon (*Salmo salar*), *J. Food Sci.*, 60 (4), 711-714.
- Suhartono, M.T., Lestario, 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.
- Walker, J. M., 1994. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press. New Jersey.
- Whitaker, J.R., 1994. *Principle of Enzymology for the Food Science*. Second Edition. Marcel Decker. New York.
- Witono, Y. (2002): Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*). *J. Teknologi Hasil Pertanian*. 1(1): 1-14.
- Witono, Y., Subagio, A., Windrati, W.S., Hartanti, S. dan Praptiningsih, J. (2004): Protease dari Getah Biduri, *Prosiding Seminar Nasional*, Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia, Jakarta.
- Witono, Y., Aulanni'am, Subagio, A. and Widjanarko, S.B. (2007): Purification and Parsial Characterization of Protease from Biduri (*Calotropis gigantea*), *Journal of Food Technology & Industry-PATPI-IPB*, 18 (1), 1-9.
- Word, O.P., 1983. *Properties of Microbial Proteinase*. In *Microbial Enzyme and Biotechnology*. (Ed Forgety). pp. 56-102. Appl. Publ. London.