

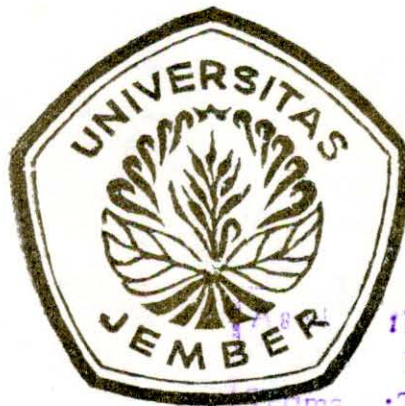


Milik UPT Perpustakaan
UNIVERSITAS JEMBER

STUDI HIDROLISIS PROTEIN IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*)
OLEH ENZIM PAPAIN KASAR DARI BUAH PEPAYA MENTAH
(*Carica papaya*) BERDASARKAN VARIASI WAKTU INKUBASI

S K R I P S I

Diajukan Untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains
Jurusan Kimia Pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember



Hadiah

Pembelian

: Tgl. 25 SEP 2003

Klass

547.75

WAR

mk

S

Oleh :

Drima Dyah Kusuma Wardhani

981810301092

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER

2003

MOTTO ✓

Allah menguji hamba-Nya dengan musibah sebagaimana seseorang menguji kemurnian emas dengan api. Jika yang terlihat emas murni, itulah orang yang dilindungi Allah dari keragu-raguan (syubhat). Jika mutunya kurang dari itu, itulah orang yang bimbang dan ragu. Dan jika yang terlihat seperti emas hitam, itulah orang yang benar-benar ditimpa fitnah atau musibah (HR Ath Thabrani)

Runtuhnya fungsi akal kebanyakan disebabkan oleh tuntutan kerakusan (pepatah)

... Hanyalah orang-orang yang berakal saja yang dapat mengambil pelajaran, (yaitu) orang-orang yang memenuhi janji Allah dan tidak merusak perjanjian, dan orang-orang yang menghubungkan apa-apa yang Allah perintahkan supaya dihubungkan, dan mereka takut pada Tuhannya dan takut kepada hisab yang buruk (Ar Ra'd 19-21)

Kehidupan adalah harapan, dan orang yang kehilangan harapan kehilangan kehidupan (pepatah)

PERSEMBAHAN

Skripsi ini kupersembahkan untuk

1. Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang
2. Bapak Sutjipto dan Ibu Sri Utami Budiningsih yang selalu berdoa, memberikan dorongan semangat dan dukungan dalam setiap langkahku.
3. Adikku tersayang (Mita) yang selalu membantu dan mendoakan.
4. Rekan-rekan tim Protease (Dian, Yulia, M' Yuni, dan M' Lutfi) untuk dukungannya.
5. Rekan-rekan satu kost'an yang selalu mendukung dan memberi semangat (M' Kristin, M' Wiwik, Verda, Nanik, Lia)
6. Rekan-rekan angkatan 98 yang selalu bersama dalam suka dan duka
7. Almamater tercinta.

DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil kerja atau penelitian mulai bulan November 2002 sampai bulan Februari 2003 di laboratorium biologi molekuler dan laboratorium biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Bersama ini, saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi lain.

Jember, Juli 2003

Prima Dyah Kusuma Wardhani

ABSTRAK

“Studi Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Oleh Enzim Papain Kasar dari Buah Pepaya Mentah (*Carica papaya*) Berdasarkan Variasi Waktu Inkubasi”, Prima Dyah Kusuma Wardhani , 981810301092, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Jember.

Studi hidrolisis protein daging ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) oleh enzim papain kasar dari buah pepaya mentah (*Carica papaya*) terhadap variasi waktu inkubasi telah dilakukan. Ikan lemuru merupakan salah satu jenis ikan yang kurang diminati masyarakat karena mudah busuk. Penanggulangan masalah ini dapat dilakukan dengan pengolahan lebih lanjut menjadi kecap ikan menggunakan enzim proteolitik misalnya enzim papain. Enzim papain kasar diperoleh dari ekstraksi buah pepaya mentah menggunakan blender yang dilanjutkan dengan proses fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat. Fraksinasi enzim papain dilakukan 3 tahap yaitu 0-40%, 40-80% dan 80-100%. Tahap uji aktivitas enzim papain berdasarkan hidrolisis protein kasein. Salah satu hidrolisis protein pada kasein adalah tirosin yang diukur pada daerah panjang gelombang 578 nm, diperoleh pada fraksi 0-40% sebesar 0,0605 unit, fraksi 40-80% diperoleh sebesar 0,285 unit, dan fraksi 80-100% diperoleh sebesar 0,274 unit. Aktivitas terbesar dipergunakan untuk proses hidrolisis ikan lemuru dengan waktu inkubasi yang bervariasi yaitu 0, 3, 5 dan 7 hari. Hasil hidrolisis kadar protein terlarutnya dengan metode titrasi formol dan pita-pita protein dengan metode elektroforesis. Persen protein terlarut dari hasil hidrolisis diperoleh yaitu: 0 hari (6,57 %), 3 hari (6,659%), 5 hari (6,85%), dan 7 hari (6,66%). Semakin lama waktu inkubasi semakin meningkat hasil hidrolisis daging ikan lemuru. Hal ini ditandai dengan semakin besarnya kadar protein terlarut dan pita-pita protein tersebut ukurannya menjadi lebih kecil, terlihat dengan penampakan pita-pita protein yang jaraknya semakin jauh dari garis awal.

Kata kunci : enzim papain kasar, protein, hidrolisis, elektroforesis

PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam pada :

Hari : **SABTU**

Tanggal : **13 SEP 2003**

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji

Ketua



drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP. 131 459 744

Sekretaris



A. A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si
NIP. 132 162 523

Anggota 1



Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D
NIP. 131 592 358

Anggota 2



Bambang Piluharto, S.Si, M.Si
NIP. 132 164 055

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember




M. Sumadi, M. S
NIP. 130 368 784

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Yang Maha Kuasa, karena berkat dan rahmat-Nya penulis skripsi dengan judul "**Studi Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella longisepp*) oleh Enzim Papain Kasar dari Buah Pepaya Mentah (*Carica papaya*) Berdasarkan Variasi Lama Inkubasi**" dapat terselesaikan dengan baik. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Bapak Ir. Sumadi, MS selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Jember.
2. Ibu drh. Wuryanti Handayani M. Si. Selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Jember.
3. Ibu drh. Wuryanti Handayani M. Si. dan Ibu Anak Agung Istri Ratnadewi S.Si, M.Si, selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan bantuan dan pengarahan sejak penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Bapak Drs. Achmad Sjaifullah M.Sc, Ph.D dan Bapak Bambang Piluharto, S.Si, M. Si. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan petunjuk dan saran.
5. Bapak Ir. Neran M. Kes selaku Kepala Laboratorium Biokimia dan Bapak Bambang Sugiharto Ph. D selaku Kepala Laboratorium Biologi Molekuler beserta staff atas bantuan yang diberikan selama melakukan penelitian.
6. Ayah, ibu dan adikku yang telah memberikan bantuan baik material maupun spiritual, juga atas kasih sayang, doa dan semangat yang diberikan.
7. Rekan-rekan seperjuangan angkatan 98 khususnya TIM Protease, rekan-rekan dilaboratorium biokimia dan organik doa dan semangat yang diberikan.
8. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung membantu pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember, Juni 2003

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN MOTTO	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN DEKLARASI.....	iv
HALAMAN ABSTRAK.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
HALAMAN KATA PENGANTAR.....	vii
HALAMAN DAFTAR ISI.....	viii
HALAMAN DAFTAR TABEL.....	xi
HALAMAN DAFTAR GAMBAR.....	xii
HALAMAN DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
HALAMAN DAFTAR SINGKATAN.....	xiv

I.	PENDAHULUAN	
	1.1 Latar Belakang	1
	1.2 Rumusan Masalah	2
	1.3 Tujuan Penelitian	2
	1.4 Manfaat Penelitian	3
II.	TINJAUAN PUSTAKA	
	2.1 Protein	4
	2.1.1 Pengertian Protein.....	4
	2.1.2 Struktur Protein.....	4
	2.1.3 Denaturasi Protein.....	5
	2.2 Ikan Lemuru	6
	2.3 Enzim	8
	2.3.1 Pengertian Enzim	8
	2.3.2 Sifat-sifat Enzim.....	9
	2.3.2 Pemurnian Enzim.....	9

2.3.3	Aktivitas Enzim.....	10
2.4	Enzim Papain	12
2.4.1	Sumber Enzim Papain.....	12
2.4.2	Sifat Enzim Papain.....	14
2.5	Hidrolisis Protein	17
2.5.1	Penentuan Kadar Protein Terlarut.....	18
2.5.2	Pemisahan Protein.....	19
III.	METODE PENELITIAN	
3.1	Tempat dan Waktu.....	22
3.2	Alat dan Bahan.....	22
3.2.1	Alat.....	22
3.2.2	Bahan.....	22
3.3	Prosedur Penelitian	22
3.3.1	Ekstraksi Enzim Papain dari Buah Pepaya	22
3.3.2	Penentuan Unit Aktivitas Enzim Papain Kasar.....	24
3.3.3	Hidrolisis Ikan Lemuru oleh Enzim Papain Kasar.....	25
a.	Penentuan Pita-Pita Protein Ikan Lemuru dengan Metode Elektroforegram	26
b.	Penentuan Protein Terlarut dengan Metode Titration Formol.....	27
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Ekstrak Enzim Papain Kasar.....	28
4.2	Aktivitas Enzim Papain Kasar	29
4.3	Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Ikan Lemuru dengan Metode Titration Formol	31
4.4	Elektroforegram Hasil Hidrolisis Protein Ikan Lemuru oleh Enzim Papain Kasar	33

V.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan	37
5.2	Saran	37
	DAFTAR PUSTAKA	38
	LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

	URAIAN	HAL.
Tabel 1.	Komposisi kimia ikan lemuru tiap 100 gram	7
Tabel 2.	Komposisi asam amino protein ikan	8
Tabel 3.	Komposisi Kimia Buah Pepaya per 100 Gram	13
Tabel 4.	Komposisi Komponen Enzim Protease	14
Tabel 5.	Komposisi Asam Amino Papain	15
Tabel 6.	Komposisi larutan dalam penentuan aktivitas enzim papain kasar	24
Tabel 7.	Data Rendemen dari Berbagai Fraksinasi	28
Tabel 8.	Aktivitas Enzim Papain Kasar dari Tiap Fraksi	30
Tabel 9.	%Nitrogen Terlarut Berdasarkan Lama Inkubasi per 100 Gram Ekstrak Ikan Lemuru	32
Tabel 10.	Elektroforegram <i>band-band</i> Protein dari Hasil Hidrolisis Protein oleh Enzim Papain Kasar	35
Tabel 11.	Data Unit Aktivitas Enzim Papain Kasar dari Buah Pepaya Mentah	46
Tabel 12.	Data Volume NaOH dan Penentuan Kadar Protein Terlarut per 10 Gram Ikan Lemuru	49
Tabel 13.	Data standart deviasi dari nilai absorbansi penentuan aktivitas enzim	53
Tabel 14.	Teknik pengendapan oleh ammonium sulfat	55

DAFTAR GAMBAR

	URAIAN	HAL.
Gambar 1.	Struktur Asam amino di sekitar Gugus Aktif	15
Gambar 2.	Struktur Primer Papain	16
Gambar 3.	Kinetika Reaksi dari Enzim Papain Terhadap Substrat	16
Gambar 4.	Struktur Kutub Ganda Asam Amino dalam Air	18
Gambar 5.	Mekanisme Reaksi dari Kesetimbangan Asam Basa pada Titration Formol	18
Gambar 6.	Mekanisme Reaksi Protein dengan Formaldehida pada Titration Formol	19
Gambar 7.	Prinsip Kerja dari Elektroforesis	20
Gambar 8.	Diagram Alir dari Pelaksanaan Penelitian	23
Gambar 9.	Grafik hubungan % protein terlarut terhadap variasi lama inkubasi	32
Gambar 10.	Elektroforegram <i>band-band</i> protein ikan lemuru terhadap variasi lama inkubasi.	34
Gambar 11.	Elektroforegram waktu inkubasi 0 hari	51
Gambar 12.	Elektroforegram waktu inkubasi 3 hari	51
Gambar 13.	Elektroforegram waktu inkubasi 5 hari	52
Gambar 14.	Elektroforegram waktu inkubasi 7 hari	52

DAFTAR LAMPIRAN

	URAIAN	HAL.
Lampiran 1.	Preparasi larutan	43
Lampiran 2.	Data absorbansi dalam penentuan unit aktivitas enzim papain kasar	46
Lampiran 3.	Perhitungan Aktivitas Enzim Papain	48
Lampiran 4.	Data volume NaOH dalam penentuan % protein terlarut ikan lemuru hasil hidrolisis	49
Lampiran 5.	Perhitungan % Protein Terlarut	50
Lampiran 6.	Daftar gambar elektroforegram	51
Lampiran 7.	Standart deviasi data absorbansi penentuan aktivitas enzim	53
Lampiran 8.	Perhitungan standart deviasi-data absorbansi penentuan Aktivitas enzim	54
Lampiran 9.	Konsentrasi akhir ammonium sulfat: penjumlahan pada 0°C	55

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

cm	= sentimeter
mL	= mili Liter
kDa	= kilo Dalton
SDS-PAGE	= Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamid Gel Elektroforesis
SDS	= Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	= N, N, N', N'-tetrametilene diamine
CBB	= Coomasie Brilliant Blue
APS	= Ammonium Persulfate
Stacking gel	= Gel Atas
Separating gel	= Gel Bawah



1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara tropis yang terdiri dari kepulauan dan lautan, yang mempunyai potensi besar dibidang perikanan. Potensi perikanan di Indonesia sebesar 6,6 juta ton pertahun, sedangkan yang dimanfaatkan masih 1,4 juta ton pertahun (Anonim dalam Unus,1991). Produksi ikan yang paling banyak dimanfaatkan dari ikan jenis lemuru (*Sardinella longiceps*) yaitu sebesar 620 ton pertahun (Anonim, 1992).

Ikan sebagai salah satu sumber protein hewani yang sangat tinggi, memiliki senyawa-senyawa yang sangat potensial bagi tubuh manusia. Unsur-unsur organik daging ikan adalah 75% Oksigen, 10% Hidrogen, 95% Karbon, dan 25% Nitrogen. Unsur-unsur itu membentuk protein (sekitar 20%), lemak (0,2-24%), sedikit karbohidrat, vitamin dan garam-garam mineral (Irawan, 1995).

Ikan merupakan protein hewani dalam makanan sehari-hari masyarakat Indonesia, misalnya ikan lemuru yang murah dan mudah didapat. Namun ikan lemuru sebagai bahan makanan mempunyai kelemahan yaitu cepat rusak atau busuk. Saat ini usaha untuk meningkatkan harga jual ikan lemuru dapat dilakukan dengan cara yaitu pengasinan, pemindangan, kecap ikan dan lain-lain (Suhartono, 1992).

Secara tradisional kecap dibuat dengan cara fermentasi yaitu menggunakan mikroba untuk memfermentasikan kedelai. Pada saat ini telah banyak dibuat dengan cara tanpa fermentasi yaitu dengan bantuan enzim (Kuncoro, 1979).

Enzim yang dipergunakan adalah enzim yang bersifat proteolitik yang mampu menghidrolisa molekul protein besar menjadi yang lebih kecil dan sederhana. Papain merupakan salah satu dari sekian banyak enzim proteolitik yang berasal dari buah pepaya. Sebagai enzim proteolitik, papain mampu memecah molekul-molekul protein menjadi molekl-molekul protein yang lebih kecil. Enzim papain terdapat pada buah pepaya yaitu pada getah dan daging buahnya (Indrawaty, 1983). Pada proses pematangan daging buah pepaya kadar

gulanya meningkat disebabkan oleh metabolisme dari polisakarida pada dinding sel (Kalie, 1983).

Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini akan dilakukan ekstraksi enzim papain kasar dari daging buah pepaya muda, selanjutnya dilakukan uji aktivitas ekstrak enzim papain kasar dari daging buah pepaya muda terhadap substrat kasein, dan menentukan bagaimana pengaruh ekstrak enzim papain kasar terhadap hidrolisis protein ikan lemuru.

1.1 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah cara ekstraksi enzim papain kasar dari buah pepaya mentah?
2. Bagaimanakah aktivitas enzim papain kasar dari buah pepaya mentah terhadap kasein ?
3. Bagaimanakah hasil hidrolisis protein ikan lemuru berdasarkan waktu inkubasi dengan menggunakan metode titrasi formol ?
4. Bagaimanakah hasil hidrolisis protein ikan lemuru berdasarkan waktu inkubasi dengan menggunakan *elektroforesis gel polyacrilamide Sodium Dedosil Sulfal* (SDS-PAGE) ?

1.2 Tujuan penelitian

1. Mempelajari ekstraksi enzim papain kasar dari buah pepaya mentah.
2. Menentukan aktivitas enzim papain kasar dari buah pepaya mentah terhadap kasein.
3. Menentukan persen nitrogen terlarut hasil hidrolisis protein ikan lemuru berdasarkan waktu inkubasi dengan menggunakan metode titrasi formol.
4. Menentukan pita-pita protein hasil hidrolisis protein ikan lemuru berdasarkan waktu inkubasi menggunakan *electrophoresis gel polyacrilamide Sodium Dedosil Sulfat*.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

Memberikan tambahan informasi bahwa enzim papain kasar yang didapat dari buah pepaya mentah dari hasil ekstraksi pada penelitian ini dapat bekerja pada protein ikan lemuru, sehingga adanya kemungkinan pemanfaatan buah pepaya mentah sebagai enzim proteolitik dalam pembuatan kecap ikan.



2.1 Protein

2.1.1 Protein

Protein merupakan suatu polipeptida yang mempunyai bobot molekul yang sangat bervariasi, dari 5000 kDa hingga lebih dari satu juta kDa. Sifat kelarutan protein ada dua yaitu mudah larut dalam air dan sukar larut dalam air. Rambut dan kuku merupakan suatu protein yang tidak larut dalam air dan tidak mudah bereaksi, sedangkan protein yang terdapat dalam bagian putih telur mudah larut dalam air dan mudah bereaksi. Protein adalah suatu zat makanan yang sangat penting bagi tubuh manusia yaitu sebagai zat pembangun, bahan bakar, dan zat pengatur. Sebagai bahan pembangun, protein merupakan bahan pembentuk jaringan-jaringan baru yang selalu terjadi dalam tubuh, terutama pada masa pertumbuhan. Protein ikut juga mengatur berbagai proses tubuh, baik langsung maupun tidak langsung dengan membentuk zat-zat pengatur proses dalam tubuh, seperti enzim, hormon, antibodi, dan lain-lain (Winarno, 1986; Poedjadi, 1994).

2.1.2 Struktur Protein

Menurut Poedjadi (1994) protein berdasarkan strukturnya dibedakan sebagai berikut:

a. Struktur primer

Menunjukkan jumlah, jenis dan urutan asam amino dalam molekul protein. Ikatan yang terbentuk antar asam amino ialah ikatan peptida.

b. Struktur sekunder

Merupakan struktur yang terjadi akibat adanya beberapa ikatan antara gugus R pada molekul asam amino yang membentuk protein. Beberapa jenis ikatan tersebut misalnya :

- 1) Ikatan elektrostatik
- 2) Ikatan hidrogen
- 3) Interaksi hidrofop

- 4) Interaksi dipol-dipol
- 5) Ikatan disulfida yaitu suatu ikatan kovalen

c. Struktur tersier

Menunjukkan kecenderungan polipeptida membentuk lipatan atau gulungan dan dengan demikian membentuk struktur lebih kompleks

d. Struktur kuartener

Menunjukkan derajat persekutuan unit-unit protein. Sebagian besar protein globular terdiri atas beberapa rantai polipeptida terpisah. Rantai polipeptida ini berinteraksi membentuk persekutuan.

Molekul protein tersusun dari satuan-satuan dasar kimia yaitu asam amino. Dalam molekul protein, asam amino ini saling berhubungan dengan suatu ikatan yang disebut ikatan peptida (- CONH -). Satu molekul protein dapat terdiri dari 12 sampai 18 macam asam amino dan dapat mencapai jumlah ratusan asam amino (Suhardjo dan Kusharto, 1992).

2.1.3 Denaturasi Protein

Denaturasi protein dapat dilakukan dengan cara fisik dan kimiawi. Cara fisik dapat dilakukan menggunakan sinar ultraviolet, blender, dan sentrifugasi sedang cara kimiawi dapat dilakukan dengan penambahan bahan kimia yaitu asam, basa, alkohol dan garam alkali (Anglemier dan Montgomery, 1976).

Bila susunan ruang atau rantai polipeptida suatu molekul protein berubah, maka dikatakan protein ini terdenaturasi. Salah satunya yaitu protein globular yang mudah mengalami denaturasi. Ikatan-ikatan yang membentuk konfigurasi molekul tersebut rusak, maka molekul akan mengembang (Winarno, 1986).

Ada dua macam denaturasi, yaitu pengembangan rantai peptida dan pemecahan protein menjadi unit yang lebih kecil tanpa disertai pengembangan molekul. Pada tahap pertama terjadi pada rantai polipeptida, sedangkan tahap kedua terjadi pada bagian-bagian molekul yang tergabung dalam ikatan sekunder. Ikatan-ikatan yang dipengaruhi oleh proses denaturasi ini adalah ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, ikatan ionik, dan ikatan intramolekuler (Winarno, 1986).

Pemekaran atau pengembangan molekul protein yang terdenaturasi akan membuka gugus reaktif yang ada pada rantai polipeptida. Proses selanjutnya terjadi pengikatan kembali pada gugus reaktif yang sama atau berdekatan. Unit ikatan yang terbentuk cukup banyak sehingga protein tidak lagi terdispersi sebagai suatu koloid, maka protein tersebut mengalami koagulasi. Apabila ikatan-ikatan antara gugus-gugus reaktif protein tersebut menahan seluruh cairan, sehingga terbentuk gel. Sedangkan bila cairan terpisah dari protein yang terkoagulasi tersebut, maka protein akan mengendap (Winarno, 1986).

Protein yang terdenaturasi berkurang kelarutannya. Lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik berbalik keluar, sedangkan bagian luar yang bersifat hidrofil terlipat ke dalam. Pelipatan atau pembalikan terjadi khususnya bila larutan protein telah mendekati pH isoelektrik dan akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap (Winarno, 1986).

Molekul protein akan dapat mengendap (koagulasi) oleh karena denaturasi, namun denaturasi belum tentu mengakibatkan koagulasi (Nur dkk., 1981).

2.2 Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*)

Ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) tergolong ikan kecil, harganya cukup murah dan merupakan jenis yang tersebar dari Filipina belahan timur melalui Indonesia hingga pantai timur Afrika (Burhanudin dan Prasmo, 1982). Sebagian besar ikan tangkapan para nelayan adalah ikan lemuru (*Sardinella longiceps*), misalnya di Muncar, Banyuwangi berhasil menangkap ikan tersebut sebanyak 9,387 ton atau sekitar 90 persen.

Sistematika ikan lemuru menurut Blecker dalam Bahri (1990) adalah :

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Subkelas	: Teleostei
Ordo	: Malacoptergie
Subordo	: Clupeidae

Family : Clupeidae
 Genus : Sardinella
 Species : *Sardinella longiceps*.

Komposisi ikan lemuru sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis kelamin, spesies, umur dan habitatnya (Peterson dalam Santoso, 1997)

Ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) merupakan pemakan zooplankton atau fitoplankton mempunyai gizi yang cukup baik. Adapun komposisi kimia dan gizi ikan lemuru terdapat ada tabel berikut:

Tabel 1. Komposisi Kimia Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) per 100 gram Bahan.

Komponen	Ikan Lemuru
Kalori (kal)	112
Protein (gram)	20
Lemak (gram)	3
Karbohidrat (gram)	0
Kalsium (miligram)	(20)
Fosfor (miligram)	(100)
Besi (miligram)	(1)
Vitamin A (SI)	(100)
Vitamin B ₁ (miligram)	(0,05)
Vitamin C (miligram)	0
Air (gram)	76

Sumber Anonim (1992)

Komposisi kimia ikan lemuru dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti: spesies, jenis kelamin, musim, habitatnya (Moeljanto, 1992). Secara umum produk hasil perikanan mengandung komposisi kimia : air 80 persen, protein 16-22 persen, lemak 0,6-10 persen, karbohidrat kurang dari 0,1 persen dan abu 1,2-1,7 persen (Syarief dan Irawati, 1986).

Kandungan protein produk ikan satu setengah kali lebih tinggi dari pada hewan daging lainnya. Adapun komposisi asam amino ikan lemuru dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2 Komposisi Asam Amino dari Protein Ikan

Asam amino	Jumlah dari total protein ikan (%)
Arginin	0,2
Histidin	2,5
Isoleusin	8,5
Lisin	9
Metionin	3,7
Sistein	1,0
Fenilalanin	4,7
Tirosin	5,9
Trionin	5,1
Triptofan	1,5
Valin	7,1

Sumber: Parakkasi (1980)

2.3 Enzim

2.3.1 Pengertian Enzim

Enzim adalah protein yang mempunyai aktivitas katalitik. Aktivitas katalitik enzim bergantung pada jenis strukturnya sebagai protein yaitu, struktur primer, sekunder, dan tersier protein enzim sangat mempengaruhi aktivitas katalitiknya. Enzim merupakan gabungan antara protein murni atau protein dengan gugusan-gugusan kimiawi lainnya, dimana molekul protein enzim mempunyai BM kurang lebih 10.000 – 1 juta (Lehninger, 1990).

Enzim mempunyai struktur tiga dimensi tertentu yang mampu mengkatalis reaksi biologik (aktivitas biokatalitik). Enzim menaikkan laju reaksi, karena adanya enzim maka reaksi yang terjadi akan mempunyai energi aktivasi lebih rendah dari reaksi biasanya (Arbianto, 1996). Berdasarkan reaksi yang dikatalisis enzim digolongkan dalam 6 kelas yaitu oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase (Lehninger, 1990).

2.3.2 Sifat-sifat Enzim

Semua enzim yang telah dikenal berupa protein dan disintesis dalam sel, serupa dengan cara sintesis protein yang lain. Nampaknya fungsi enzim sebagai katalisator terjadi oleh tersedianya sisi aktif (*active site*) yang menerima molekul

dari senyawa yang bereaksi. Menurut Gaman dan Sherington (1994) sifat-sifat enzim dapat digolongkan sebagai berikut:

1. Spesifisitas

Aktivitas enzim sangat spesifik. Pada umumnya enzim tertentu hanya akan mengkatalis satu reaksi, sebagai contoh laktase menghidrolisis gula laktosa tetapi tidak berperan terhadap disakarida yang lain.

2. Pengaruh suhu

Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh suhu. Untuk enzim hewan suhu optimal antara 35°C dan 40°C , yaitu suhu tubuh. Pada suhu di atas dan di bawah optimalnya, aktivitas enzim berkurang. Di atas suhu 50°C enzim secara bertahap menjadi inaktif karena protein terdenaturasi. Pada 100°C semua enzim rusak sedangkan pada suhu yang sangat rendah, enzim tidak benar-benar rusak namun aktivitasnya sangat banyak berkurang.

3. Pengaruh pH

Masing-masing reaksi yang dikatalis oleh enzim paling cepat terjadi pada pH tertentu. Untuk kebanyakan enzim, pH optimal adalah sekitar pH 7 (netral) dan jika medium menjadi asam/ sangat alkalis, enzim mengalami inaktif. Namun beberapa enzim hanya beroperasi dalam keadaan asam/alkalis, sebagai contoh pepsin yaitu enzim yang dikeluarkan ke lambung dan enzim tersebut hanya berfungsi dalam kondisi asam dengan pH optimum 2.

2.3.3 Pemurnian Enzim

Metode pemurnian meliputi pemecahan sel, fraksinasi, dialisis, kromatografi kolom dan lain-lain. Pemecahan sel menggunakan blender dan disentrifugasi untuk memisahkan bahan-bahan yang tidak larut seperti dinding sel. Buffer yang digunakan biasanya buffer fosfat 0,1 M – 0,5 M pada pH 7,5 untuk melindungi enzim dari asam yang dikeluarkan oleh vakuola.

Fraksinasi merupakan tahap awal pemurnian yang didasarkan pada peristiwa *salting out*. Menurut Matthew and Van Holde (1990) bahwa daya larut protein sangat dipengaruhi oleh konsentrasi garam dalam larutan. Pada kuat ionik garam yang tinggi, maka kelarutan protein dalam pelarut akan turun, karena penurunan

aktivitas pelarut akibat interaksi antar protein lebih tinggi daripada interaksi protein dengan pelarut sehingga protein akan mengendap. Peristiwa tersebut dikenal *salting out*. Secara umum pengendapan protein menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ karena memiliki daya larut tinggi menghasilkan kuat ionik yang tinggi (Voet, 1994). Penambahan ammonium sulfat menyebabkan interaksi air dengan ion garam sehingga menurunkan jumlah air dalam larutan. Pengendapan protein berdasarkan perbedaan hidrofobisitas protein, protein yang lebih bersifat hidrofob maka konsentrasi garam yang diperlukan lebih rendah daripada protein yang bersifat hidrofil. Protein yang bersifat hidrofob berada di bagian dalam struktur protein dan protein yang bersifat hidrofil berada di bagian luar struktur protein.

2.3.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

1. Konsentrasi Enzim

Semua jenis enzim yang berkerja pada suhu, waktu reaksi, pH, dan konsentrasi substrat yang tepat, maka pengaruh konsentrasi enzim menunjukkan hubungan linear hingga mencapai batas tertentu dimana semua substrat telah bereaksi dengan enzim. Jika jumlah substrat sangat terbatas maka kecepatan reaksi maksimum suatu jumlah enzim tidak dapat dicapai sebelum ditambahkan kembali substrat kedalam sistem reaksinya (Tranggono, 1990).

2. Temperatur

Pada umumnya kecepatan reaksi enzimatik akan meningkat pada suhu tertentu. Tiap 10°C kecepatan reaksinya naik dua kali. Namun semakin tinggi suhu mengakibatkan denaturasi enzim. Setiap enzim memiliki suhu optimum, diatas dan dibawah suhu tersebut aktivitas enzim berkurang (Indrawaty, 1983).

3. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya, tergantung pada konsentrasi substrat. Semakin tinggi konsentrasi substrat, kecepatan reaksinya semakin tinggi. Sampai batas tertentu kecepatan reaksi akan konstan dengan naiknya konsentrasi substrat (pada konsentrasi enzim tetap). Hal ini karena pengikatan enzim terhadap substrat sudah mencapai maksimum (Reed, 1996). Kecepatan reaksi tidak lagi

tergantung konsentrasi substrat bila kecepatan maksimum telah tercapai (Tranggono, 1990).

4. pH

Enzim juga mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran pH yang disebut pH optimum (Lehninger, 1990). Diluar kisaran pH optimum enzim bersifat inaktif, karena konformasinya berubah bahkan terdenaturasi bila pH terlalu asam atau terlalu basa (Murray *et.al*, 1997).

5. Aktivator dan Inhibitor

Beberapa enzim ada yang tidak bekerja tanpa adanya aktivator. Aktivator diperlukan oleh enzim dalam reaksi katalitiknya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Senyawa aktivator tersebut dapat berupa koenzim, dan ion logam. Bagi papain senyawa pereduksi juga merupakan aktivator.

Sedangkan inhibitor merupakan suatu senyawa atau metabolik yang menghambat reaksi enzimatik. Senyawa ini disebut kompetitif inhibitor apabila mampu berkompetisi dengan substrat dan disebut non kompetitif apabila tidak mampu bereaksi dengan lokasi aktif enzim tetapi mengubah konformasi protein sehingga tidak aktif (Winarno, 1986).

2.4 Enzim Papain

2.4.1 Sumber Enzim Papain

Papain adalah suatu enzim pemecah protein, yang terdapat dalam getah pepaya, baik yang berada di daun, batang maupun buah. Tanaman pepaya telah lama berkembang dan ditanam di Indonesia. Menurut Rukmana, 1995 tanaman pepaya memiliki taksonomi sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisi	: Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
Sub divisi	: Angiosperma (biji berkeping dua)
Kelas	: Dicotyledonae (biji berkeping dua)
Ordo	: Caricales
Famili	: Caricaceae

Spesies : *Carica papaya* L

Pada dasarnya pepaya digolongkan menjadi 2 jenis yaitu :

1. Pepaya semangka yang memiliki ciri-ciri daging buah tebal, berwarna merah dan citarasanya manis.
2. Pepaya burung yang memiliki ciri-ciri daging buah berwarna kuning, harum dan citaranya manis.

Di luar negeri pengembangan pepaya diarahkan untuk memproduksi getahnya yang disebut papain. Hampir semua susunan tanaman pepaya memiliki daya dan hasil guna bagi kehidupan manusia. Tanaman ini layak disebut "Multiguna" yakni sebagai bahan makanan dan minuman, obat tradisional, pakan ternak, industri penyamakan kulit, pelunak daging dan bahan kecantikan (kosmetika). Salah satu kegunaan dari pepaya yaitu getahnya, yang sifatnya dapat melunakkan daging, ini disebabkan oleh papain yang terkandung dalam getah pepaya. Papain dapat juga diambil dari buahnya yang masih muda (Rukmana, 1995; Soesenno, 1985).

Tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) merupakan buah yang populer. Nilai gizinya cukup tinggi, mengandung banyak pro vitamin A dan vitamin C, mineral, Kalsium, Fosfor, dan Besi. Secara keseluruhan dapat dilihat perbedaan komposisi kimia dari buah matang dan mentah dari buah pepaya pada tabel 3.

Pada proses pematangan jika terjadi peningkatan jumlah karoten dan xantofil, dan akibat metabolisme dari polisakarida pada dinding sel menyebabkan kadar gulanya meningkat (Kalie, 1983).

Tabel 3 Komposisi Kimia Buah Pepaya per 100 Gram

Komposisi	Buah matang	Buah mentah
Energi (kalori)	46	26
Air (gram)	86,7	92,3
Protein (gram)	0,5	2,1
Karbohidrat (gram)	12,2	4,9
Vitamin A (I.U)	65	50
Vitamin B (mg)	0,04	0,02
Vitamin C (mg)	78	19
Kalsium (mg)	23	50
Besi (mg)	1,7	0,4
Fosfor (mg)	12	16

Sumber: Kalien (1983)

Protease nabati yang paling utama adalah papain dari pepaya sumber yang telah diketahui nanas sebagai penghasil bromelin dari tanaman ara (*Ficus carica*) sebagai penghasil fisin. Namun sampai saat ini hanya papain, bromelin, dan fisin yang diproduksi secara besar-besaran (Suhartono, 1992).

Selain komposisi kimia (tabel 3), buah pepaya juga mengandung enzim papain dan khimopapain, yang keduanya dapat juga mencerna protein sehingga daging lebih empuk dan dapat menjedalkan air susu (Rismunandar, 1980).

Selama penggantungan daging, protease yang secara alami terdapat dalam daging, membongkar jaringan ikat kemudian membuat daging menjadi lunak. Sebelum dimasak kadang-kadang daging diperlakukan dengan pelunak buatan. Pelunak ini mengandung enzim pemecah protein seperti misalnya papain yang didapatkan dari tanaman pepaya (Gamman dan Sherington, 1994).

Sumber enzim papain adalah getah tanaman pepaya baik yang berada di daun, batang maupun buah. Namun secara praktis, getah dari buah pepaya lebih mudah dipanen. Getah pepaya mengandung sedikitnya tiga jenis enzim yaitu papain (10 persen), khimopapain (45 persen), lisozim (20 persen). Bahkan komponen paling aktif dari getah pepaya adalah khimopapain, yaitu enzim yang memperlihatkan kemampuan menggumpalkan susu dan mengempukkan daging. Adapun karakteristik lain dari ketiga jenis enzim protease dapat dilihat dari tabel 4.

Tabel 4 Sifat Ketiga Komponen Enzim Proteasae

Enzim	Berat Molekul (kDa)	Titik Isoelektrik
Papain	2	8,75
Khimopapain	36	10,10
Lisozim	25	10,50

Sumber: Suhartono (1992)

2.4.2 Sifat Enzim Papain

Enzim papain adalah enzim proteolitik yang dihasilkan dari getah pepaya yang memiliki residu sulfhidril pada lokasi aktifnya, aktif dalam ikatan peptida dibagian dalam dari polimer asam amino. Diaktifasi oleh senyawa pereduksi dan dinaktifasi oleh senyawa oksidator, aktifitas optimum terjadi pada pH 5-7 atau

temperatur 50⁰C-60⁰C serta akan menurun drastis pada pH dibawah 3,0 atau diatas pH 11,0 (Savitri, 1985).

Papain memiliki sejumlah gugus tirosin dan triptofan dengan sifat mengion yang agak rumit. Sejumlah 13 dan 19 residu tirosin dapat dititrasi pada pH 8,5 sampai 12 dengan pK 9,8. Empat gugus tirosin lain akan mengion pada pH 12 sampai 13, sedangkan sisanya pada pH 14. Adapun kandungan asam amino dari papain dapat dilihat pada tabel 5.

Papain memiliki berat molekul sekitar 23000 kDa tersusun atas 121 asam amino dengan tiga ikatan disulfida. Papain memiliki dua gugus aktif yaitu Sistein 25 dan Histidin 158 . pH optimum kerja papain berkisar dari 6 sampai 8. Pada pH 2 sampai 10 papain masih bersifat stabil. Pada suhu 5-60⁰C keaktifan papain dapat dipertahankan (Suhartono, 1992).

Menurut Winarno (1986) berdasarkan sifat-sifat kimia dan lokasi aktifnya papain termasuk enzim protease sulfhidril. Protease sulfhidril adalah enzim yang mempunyai residu sulfhidril (-SH) pada lokasi aktifnya. Urutan asam amino di sekitar gugus aktif SH dari beberapa protease sulfhidril dapat dilihat pada gambar 1 berikut :

Papain	: Pro - Val - Lys - Asn - Gln - Ser - Cys - Ser - Cys - Cys - Trp
Fisin	: Pro - Ile - Arg - Gln - Gln - Gly - Gln - Cys - Gly - Ser - Cys - Trp
Bromelin	: Asn - Gln - Asp - Pro - Cys - Gly - Ala - Cys - Trp

Gambar 1. Struktur komposisi asam amino di sekitar gugus aktif SH dari protease tiol (Muchtadi, 1992).

Struktur primer papain dapat dilihat pada gambar 2 berikut:

NH₂- Ile- Pro- Glu- Tyr- Val- Asp- Trp- Arg- Gln- Lys- Gly- Ala- Val- Thr- Pro- Val- Lys- Asn- Gln- Gly- Ser- Cys- Gly- Ser- Cys- Trp- Ala- Phe- Ser- Ala- Val- Val- Thr- Ile- Glu- Gly- Ile- Ile- Lys- Ile- Arg- Thr- Gly- Asn- Leu- Asn- Gln- Try- Ser- Glu- Glu- Glu- Leu- Leu- Asp- Asp- Arg- Arg- Ser- Tyr- Gly- Cys- Asn- Gly- Gly- Tyr- Pro- Trp- Ser- Ala- Leu- Gln- Leu- Val- Ala- Gln- Tyr- Gly- Ile- His- Tyr- Arg- Asn- Thr- Pro- Tyr- Tyr- Glu- Gly- Val- Gln- Arg- Tyr- Cys- Arg- Ser- Arg- Glu- Lys- Gly- Pro- Tyr- Ala- Ala- Lys- Tyr- Asp- Gly- Val- Arg- Gln- Val- Gln- Pro- Tyr- Asn- Gln- Gly- Gly- Ala- Leu- Leu- Tyr-

Ser- Ile- Ala- Asn- Gln- Pro- Val- Ser- Val- Val- Leu- Gln- Ala- Ala- Gly- Lys- Asp- Phe- Gln- Leu- Tyr- Arg- Gly- Gly- Ile- Phe- Val- Gly- Pro- Cys- Gly- Asn- Lys- Val- Asp- His- Ala- Val- Ala- Ala- Val- Gly- Tyr- Asn- Pro- Gly- Tyr- Leu- Ile- Lys- Asn- Ser- Trp- Gly- Thr- Gly- Trp- Gly- Glu- Asn- Gly- Tyr- Ile- Arg- Ile- Lys- Gly- Thr- Gly- Asn- Ser- Tyr- Gly- Val- Cys- Gly- Leu- Tyr- Thr- Ser- Ser- Phe- Tyr- Pro- Val- Lys- Asp-COOH

Gambar 2. Struktur primer papain (Suhartono, 1992)

Tabel 5. Komposisi Asam Amino Papain

Asam Amino	Jumlah	Persen Relatif
Lisin	10	4,8
Histidin	2	0,97
Arginin	12	5,86
Aspartat	6	2,98
Aspargin	13	6,34
Glutamat	8	3,88
Glutamin	12	5,86
Trenin	8	3,88
Serin	13	6,34
Prolin	10	4,88
Glisin	28	13,58
Alanin	14	6,58
Valin	18	8,94
Isoleusin	12	5,86
Leusin	11	5,36
Tirosin	12	5,86
Fenilalanin	4	1,93
Triptofan	5	2,44
Sistein	1	0,48
Sistin	6	2,93

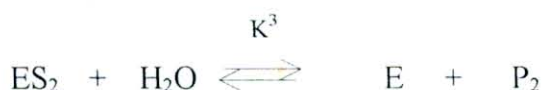
Protease sulfhidril, aktif oleh zat pereduksi dan tak aktif jika terdapat zat pengoksidasi. Aktivitas papain meningkat dengan penambahan senyawa pereduksi seperti pengkelat (EDTA), dan sulfit. Aktivitas katalitik papain menurun bila direaksikan dengan senyawa pengganggu gugus tiol, yaitu oksidaor, senyawa disulfida, ion logam berat dan senyawa pengalkil (Suhartono, 1992).

Kinetika reaksi enzim papain terhadap substrat adalah sebagai berikut

Tahap I Asilasi



Tahap II Deasilasi



Gambar 3. Gambar kinetika reaksi dari enzim papain terhadap substrat

Substrat S diikat secara dapat balik pada enzim E membentuk kompleks enzim substrat non kovalen, ES (komplek Michaelis Menten). Tahap pertama asilasi ini membentuk kompleks enzim asil ES_1 dan produk pertama P_1 . Pada kompleks pertama enzim asil, gugus asil terikat pada sisi aktif gugus tiol melalui ikatan tioester. Selanjutnya terjadi dengan adanya senyawa nukleofilik yang bergabung dengan enzim asil menghasilkan produk P_2 , dan adanya enzim dibebaskan kembali. Tahap ini disebut deasilasi. Enzim papain tidak efektif dalam menghidrolisis senyawa turunan (ester dan amida) dari reaksi asam karboksilat dan asam amino (Suhartono, 1992).

Reaksi katalisa protease secara umum adalah menghidrolisa ikatan peptida protein. 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).

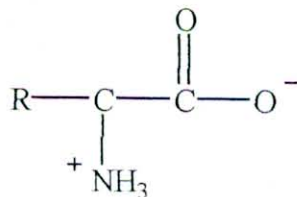
Berdasarkan letak pemecahan enzim protease digolongkan menjadi eksopeptidase dan endopeptidase (Kaneda *et al.*, 1997). Istilah eksopeptidase digunakan untuk enzim yang memecah asam amino terminal dari salah satu ujung protein dengan cara menghidrolisis ikatan peptidanya. Enzim eksopeptidase masih dibagi menjadi dua tipe yaitu karboksipeptidase yang dalam realsinya memecah

ujung protein yang mempunyai gugus karbonil bebas, dan aminopeptidase yang memulai reaksi dari ujung yang lain dan dikenal pula dengan istilah eksopeptidase (Loffler, 1986; Kaneda *et al.*, 1997).

Enzim endopeptidase menurut Loffter (1986) adalah enzim yang menyerang ikatan peptida yang terdapat pada protein bagian dalam. Spesifitas golongan endopeptidase adalah lebih kompleks. Protesae jenis tripsin menghidrolisa ikatan peptida pada asam amino lisin dan arginin, sedangkan khimotripsin memcah ikatan peptida pada sisi asam amino hidrofobik.

2.5 Hidrolisis Protein

Hidrolisis terjadi pada saat adanya penambahan alkali pada protein sehingga dapat menyebabkan ikatan peptida pada polimer protein terhidrolisis. Sehingga menghasilkan monomer – monomer asam amino dan ada sebagian gugus amino yang berubah menjadi amonia. Akibat hidrolisis tersebut jumlah gugus amino berkurang (Achmad, 1994). Asam amino tidak larut dalam eter, sedangkan dalam air menampakkan struktur kutub ganda sebagai gambar 4.



Gambar 4. Struktur Kutub Ganda Asam Amino dalam Air (Martoharsono, 1994).

Parameter terjadinya hidrolisis protein dapat dilihat dari besarnya kandungan protein terlarut. Salah satu analisis protein terlarut dapat dilakukan dengan metode titrasi formol. Selain itu juga dapat diketahui dari berat molekul proteinnya dengan memisahkan protein tersebut melalui metode elektrofotesis.

2.5.1 Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein, khususnya kadar protein terlarut dapat dilakukan dengan menggunakan metode titrasi formol. Prinsip dasar dari titrasi formol

adalah reaksi kesetimbangan asam basa. Hasil yang diperoleh pada titrasi formol yaitu turunan metil-ol. Menurut Fessenden dan Fessenden (1997) bahwa pada saat basa ditambahkan, ion yang terprotonisasi sempurna diubah menjadi ion dipolar yang netral.

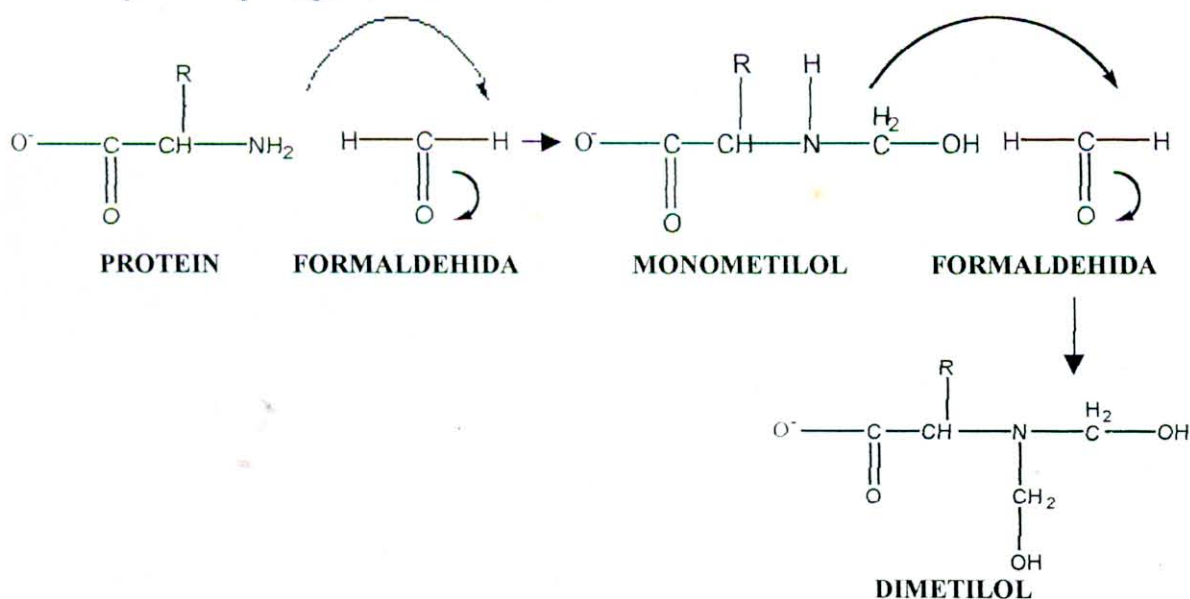


Semakin banyak ditambahkan basa, semua bentuk kation diubah menjadi anion.



Gambar 5. Mekanisme reaksi dari kesetimbangan asam basa pada titrasi formol

Mekanisme reaksi protein dengan formaldehida pada titrasi formol dapat dijelaskan pada gambar dibawah ini :

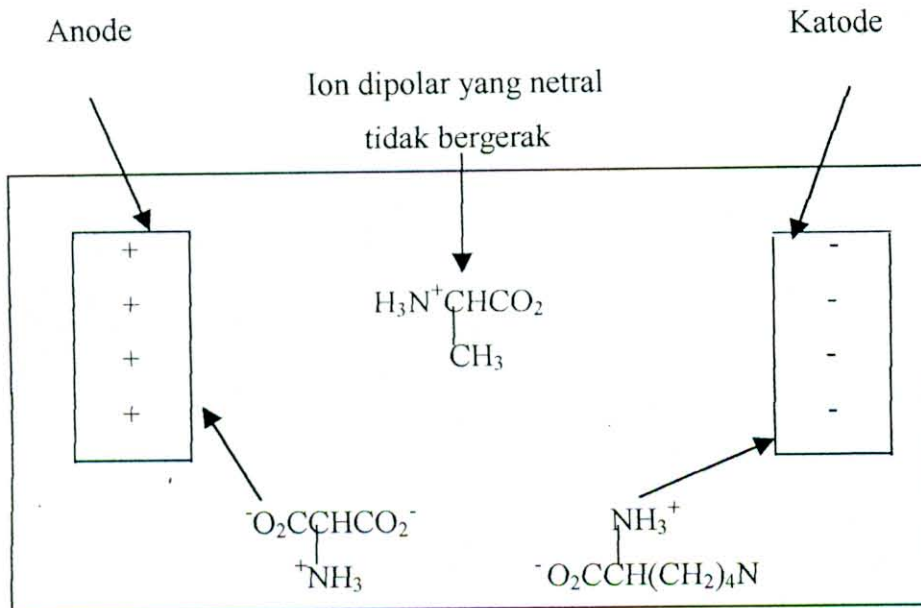


Gambar 6. Mekanisme reaksi protein dengan formaldehyde pada titrasi formol (Sorensen, 1987)

2.5.2 Elektroforesis

Protein mempunyai muatan netto positif atau negatif yang mencerminkan campuran asam amino bermuatan yang dikandungnya. Jika sebuah larutan yang mengandung molekul protein mengalami suatu medan listrik, protein itu akan bermigrasi dengan laju yang bergantung pada muatan, ukuran, serta

bentuknya. Teknik ini yang disebut elektroforesis. Elektroforesis merupakan salah satu metode yang digunakan untuk pemisahan protein atau enzim yang berada dalam suatu campuran. Sebagai ilustrasi, prinsip kerja elektroforesis tersebut dapat digambarkan dalam gambar berikut:



Gambar 7. Elektroforesis merupakan proses pemisahan partikel bermuatan dan yang netral dengan cara menarik partikel-partikel tersebut oleh elektrode dalam larutan (Fessenden dan Fessenden, 1997)

Tahun 1960-an gel elektroforesis SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) telah mengawali dalam analisa protein. Metode ini menggunakan gel poliakrilamida dengan struktur yang saling silang (*cross linking*) yang dapat dilalui oleh protein-protein. Gel elektroforesis SDS PAGE digunakan untuk menentukan sub unit protein. Gel tersebut biasanya disiapkan langsung sebelum digunakan dengan cara polimerisasi dari monomer-monomernya. Ukuran pori gel dapat diatur dengan variasi konsentrasi agen *cross-linking* sehingga cukup kecil untuk menghambat migrasi molekul-molekul protein yang diminati. Konsentrasi *cross linking* yang tinggi mengakibatkan ukuran pori kecil sehingga dapat digunakan untuk menganalisa protein yang memiliki berat molekul yang kecil, sedangkan konsentrasi *cross linking* yang rendah mengakibatkan ukuran pori menjadi besar sehingga dapat digunakan untuk

menganalisa protein yang memiliki berat molekul yang besar. Ikatan *cross linking* pada gel polimerisasi terbentuk dari monomer-monomer akrilamida dan N, N'-methylene bis akrilamida. Proses polimerisasi disertai dengan penambahan *Ammonium Persulfate* sebagai inisiator dan N, N, N', N'-tetrametilene diamine (TEMED) sebagai katalis (Baker, 1995). Protein-protein dicampur dengan semacam deterjen yang bermuatan sangat negatif, yaitu Natrium Dodesil Sulfat (SDS). Natrium Dodesil Sulfat berfungsi menguraikan struktur sekunder, tersier, dan kuartener melalui pengikatan SDS-protein pada bagian hidrofobik molekul-molekul protein, sehingga molekul-molekul itu menjadi rantai polipeptida yang linier. Merkaptotanol ditambahkan sebagai agen pereduksi untuk mereduksi semua ikatan disulfida supaya semua unsur polipeptida dalam molekul-molekul yang memiliki banyak sub unit itu dapat dianalisis.

Protein-protein yang berukuran sama cenderung menunjukkan perilaku yang serupa karena:

1. Struktur yang semula telah dijadikan tidak terlipat lagi oleh SDS sehingga semua mempunyai bentuk yang sama.
2. Masing-masing mengikat SDS dalam jumlah yang sama sehingga karena itu mempunyai muatan positif yang sama pula. Protein-protein lebih besar, dengan muatan yang juga lebih besar akan mengalami gaya listrik yang lebih besar sekaligus gaya tarik yang lebih besar pula. Dalam larutan yang bebas, kedua efek itu akan saling menghilangkan, tetapi dalam jalinan gel poliakrilamida, yang bertindak sebagai penyaring molekul protein-protein besar dimana mengalami hambatan yang jauh lebih besar dibanding protein-protein kecil. Akibatnya, dalam suatu campuran yang kompleks protein-protein saling terpisah membentuk pita-pita yang tersusun menurut berat molekul setiap protein.

Protein-protein yang besar dengan mudah dapat dideteksi melalui pewarnaan gel dengan zat pewarna biru Coomasien, misalnya, sedangkan protein-protein kecil dideteksi melalui perlakuan dengan zat pewarna perak (Alberts, 1994). Keistimewaan SDS-PAGE menurut Boyer (1993) adalah:

1. Kekuatan pemisahan tinggi untuk ukuran protein dan asam nukleat yang kecil da sedang (kira-kira sampai 1.10^6 Da).

2. Dimungkinkan untuk sampel dengan ukuran besar.
3. Interaksi minimal migrasi molekul dengan matrik.
4. Kestabilan fisik matrik.



BAB. III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia jurusan Kimia Universitas Jember, sejak bulan Agustus sampai Januari 2003.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan meliputi blender, pipet volume, pipet *Mohr*, pipet tetes, tabung reaksi, gelas kaca, labu ukur dan labu erlenmeyer, neraca analitis, pipet mikro, pH meter, sentrifugasi dingin, perangkat keras elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE), kain kassa, *freezer*.

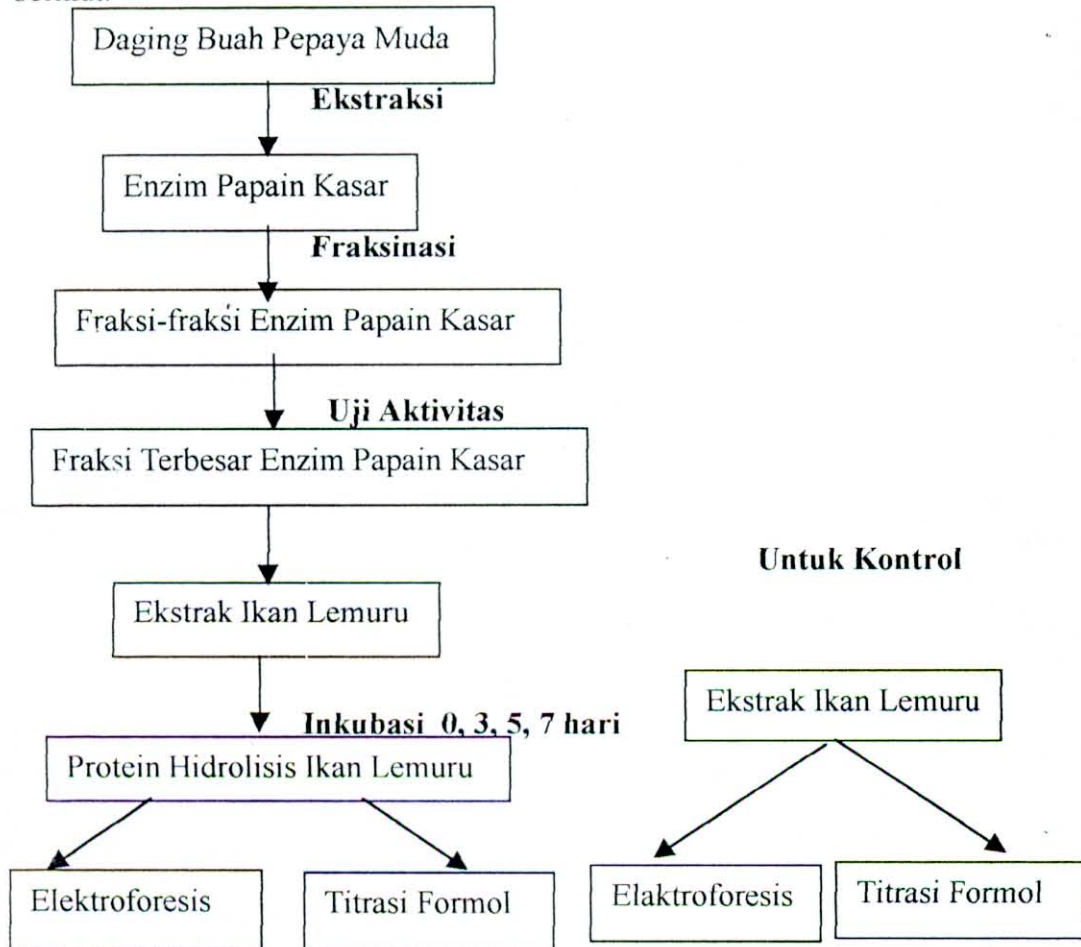
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah buah pepaya mentah, sedangkan bahan-bahan bersifat kimiawi adalah NaH_2PO_4 (Natrium dihidrogen fosfat), Na_2HPO_4 (Natrium monohidrogen fosfat), Cl_3CCOOH (Asam Trikloroasetat), kasein, NaCl (Natrium Klorida), Na_2CO_3 (Natrium Karbonat), CaCl_2 (Kalsium Klorida), $\text{HOC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CHCOOH}$ (Tirosin), reagen Folin, Fenoftalein, HCOH (Formaldehida), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonium Sulfat), $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Kalium oksalat), $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (asam oksalat), NaOH (Natrium Hidroksida) dan bahan-bahan untuk elektroforesis adalah CH_3OH (metil alkohol), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Amonium persulfat), $\text{CH}_2\text{CHCONHCH}_2\text{NHCOCH}_2$ (N,N,N',N'-tetrametilendiamin), buffer Tris HCl, CH_3COOH (Asam asetat), $\text{HOCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ (gliserol), *Coomasie Brilliant Blue*, $\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (merkaptotetanol), $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^{\ominus}$ (*Sodium Dodesil Sulfat*), dan aquadest.

3.3 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Langkah-langkah pelaksanaan penelitian secara garis besar dicantumkan dalam diagram alir pada gambar 8.

Secara garis besar penelitian dilaksanakan sesuai dengan diagram alir berikut:



Gambar 8. Daigram alir dari pelaksanaan peneiitian.

3.3.1 Ekstraksi dan Fraksinasi Enzim Papain Kasar dari Daging Buah Pepaya Mentah (Praptiningsih yang dimodifikasi Deutscher, 1990)

1. Tahap awal ekstraksi

Sebanyak 100 gram buah pepaya mentah tanpa kulit dipotong kecil-kecil ditambah 100 mL buffer fosfat pH 7,0-kemudian diblender dan dilanjutkan dengan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C sehingga dihasilkan supernatan dan endapan. Supernatan yang dihasilkan disebut ekstrak enzim papain kasar yang selanjutnya difraksinasi.

2. Tahap fraksinasi

Volume supernatan yang dihasilkan tersebut diukur untuk menentukan jumlah ammonium sulfat yang akan digunakan untuk mengendapkan protein. Jumlah ammonium sulfat ditambahkan secara bertahap yaitu fraksi 0-40%, fraksi 40-80% dan 80-100%. Untuk 1 liter supernatan, jumlah ammonium sulfat yang diperlukan yaitu 226 gram untuk fraksi 0-40%; 258 gram untuk fraksi 40-80% dan 139 gram untuk fraksi 80-100% (sesuai lampiran 9). Sebelum ditambahkan ammonium sulfat untuk fraksi 0-40%, supernatan diletakkan dalam gelas kimia dan disekitarnya diberi es batu untuk menjaga suhu tetap dingin. Ammonium sulfat dilarutkan pada supernatan sedikit demi sedikit dengan menggunakan pengaduk magnetik. Hasil yang diperoleh kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7500 rpm selama 15 menit sehingga menghasilkan endapan dan supernatan. Endapan yang dihasilkan kemudian ditimbang dan selanjutnya ditambahkan 50 mL buffer fosfat pH 7. Supernatan yang diperoleh diperlakukan dengan cara yang sama untuk fraksi 40-80% dan fraksi 80-100%.

3.3.2 Penentuan Aktivitas Enzim Papain Kasar (Hasnan, 1991)

Dalam uji' aktivitas enzim papain kasar dalam substrat kasein, penentuan besarnya aktivitas enzim papain kasar hasil fraksinasi dilakukan dengan cara mencampur bahan-bahan sebagaimana tertera dalam tabel 6 berikut:

Tabel 6. Komposisi larutan dalam penentuan aktivitas enzim papain kasar

Bahan	Blanko (mL)	Standar (mL)	Sampel (mL)
Buffer fosfat (pH 7)	1,0	1,0	1,0
Substrat kasein (20 mg/mL)	1,0	1,0	1,0
Enzim dalam CaCl ₂ (2 mM)	-	-	0,2
Tirosin standar	-	0,2	-
Aquades	0,2	-	-

Setelah dicampurkan, larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Terhadap masing-masing larutan ditambahkan 2,0 mL larutan TCA 0,1 M. Untuk blanko dan standar masing-masing ditambahkan 0,2 mL enzim dalam CaCl₂ 2

mM, sedangkan pada sampel ditambahkan 0,2 mL larutan CaCl_2 2mM. Kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah 10 menit campuran disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan masing-masing diambil 1,5 mL, ditambahkan dengan 5,0 mL larutan Na_2CO_3 0,4 M, dan juga pereaksi folin sebanyak 1,0 mL. Masing-masing campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang 578 nm.

$$U = \frac{(A_{\text{Sampel}} - A_{\text{Blanko}})}{(A_{\text{Standar}} - A_{\text{Blanko}})} \times \left(\frac{1}{T} \right) \times fp$$

Keterangan: U = unit aktivitas

A_{blanko} = absorbansi blanko

A_{sampel} = absorbansi sampel

A_{standar} = absorbansi standar

fp = faktor pengencer

T = waktu

3.3.3 Hidrolisis Ikan Lemuru oleh Enzim Papain Kasar (Anwar dkk, 1994 dan Suprihno, 2002).

Sebanyak 100 gram ikan lemuru ditambahkan 200 mL aquades kemudian diblender dan diambil sebanyak 10 gram kemudian ditambahkan enzim papain kasar (yang memiliki unit aktivitas tertinggi dari hasil pengukuran) dengan perbandingan 1:2 berat ikan lemuru tetapi untuk perlakuan kontrol, sampel tidak ditambahkan enzim papain kasar. Selanjutnya ditambahkan NaCl 20% dari berat ikan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan lama inkubasi 0 hari, 3 hari, 5 hari, 7 hari. Setelah inkubasi, sampel dipanaskan selama 3 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan disaring. Filtrat dari hasil tersebut (ekstrak ikan) digunakan untuk penentuan kadar protein terlarut dengan titrasi formol dan pita-pita protein dengan metode elektroforesis.

a. Penentuan Pita-Pita Protein Hasil Hidrolisis Ikan Lemuru dengan Metode Elektroforesis (Sambrook yang dimodifikasi Ratnadewi, 2000)

1) Preparasi alat

Glass plate, spacer, dan sisir dicuci dengan aquades, bilas dengan aquades dan dikeringkan. *Glass plate* dan spacer dipasang, kemudian diisi air dan didiamkan beberapa menit untuk melihat adanya kebocoran atau tidak.

2) Pembuatan gel elektroforesis SDS-PAGE

Pembuatan *separating gel* (gel bawah) 12% pH 8.8 dengan cara mencampurkan 0,665 mL akrylamida (30% stock); 1,25 mL *Tris HCl* 0,5 M pH 8,8; 50 μ L 10% (w/v) Natrium Dodesil Sulfat; 3,05 ml aquades steril dalam labu ukur 25 mL. Kemudian ditambahkan 25 μ L 10% Ammonium Persulfat dan 5 μ L *Tetraetilmetilene diamine* (TEMED) diaduk dan dimasukkan kedalam *glass plate* yang sebelumnya telah dirangkai dan ditambahkan aquades. Polimerisasi gel terjadi antara 30-40 menit sampai tanda batas antara gel dan larutan atasnya (aquades). Ketika polimerisasi selesai, aquades dibuang. Pembuatan *stacking gel* 4% pH 6,8 dengan mencampurkan 4,0 mL akrylamida (30% stock); 2,5 mL *Tris HCl* 0,5 M pH 6,8; 100 μ L 10% (w/v) Natrium Dodesil Sulfat; 3,35 ml Aquades steril dalam labu ukur 25 mL. Kemudian ditambahkan 50 μ L 10% Ammonium Persulfat dan 5 μ L *Tetraetilmetilene diamine* (TEMED) diaduk dan dimasukkan kedalam *glass plate* yaitu diatas *separating gel*. Polimerisasi gel terjadi antara 30-40 menit sampai tanda batas antara gel dan larutan atasnya (aquades). Ketika polimerisasi selesai, aquades dibuang.

3) Preparasi sampel

Sebanyak 18 μ L sampel ditambah 5 μ L buffer sample dipanaskan selama 3 menit pada air mendidih dan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 3 menit.

4) Perlakuan sampel

Sebanyak 20 μ L diinjeksikan kedalam sumur-sumur gel elektroforesis yang telah dipersiapkan. Gel mulai *dirunning* dengan memberikan tegangan 15 Volt. Elektroforesis dinyatakan selesai apabila warna biru *bromophenol blue* telah mencapai 0,5 cm dari bawah *resolving gel*

5) Pengecatan protein

Protein yang telah dipisahkan dengan elektroforesis divisualisasi menggunakan larutan pewarna *Coomassie Brilliant Blue G-250 (staining solution)*. Gel diangkat dari *glass plate* dan dimasukkan kedalam kotak plastik yang berisi larutan staining kemudian digoyang perlahan menggunakan *rotary rocker* hingga warna *Coomassie Brilliant Blue* dapat diikat oleh protein. Selanjutnya ditambahkan larutan destaining dilakukan berulang kali hingga gel tidak berwarna. Gel tersebut kemudian dikeringkan dengan alat pengering atau didiamkan diudara terbuka.

b. Penentuan Protein Terlarut Hasil Hidrolisis dengan Metode Titrasi Formol (Sudarmadji, 1988).

1) Menyiapkan larutan blanko

Sebanyak 1 mL aquades ditambahkan 0,02 mL K- oksalat jenuh (K- oksalat : air = 1 : 3), 0,05 mL fenolftalein 1%, 0,1 mL formaldehida 40% kemudian dititrasi dengan NaOH 0,1 N (V1) sampai warna merah jambu.

2) Menyiapkan larutan sampel

Sebanyak 0,5 mL sampel (hasil hidrolisis ikan lemuru) ditambahkan 0,02 mL K- oksalat jenuh (K-oksalat:air = 1:3), 0,05 mL fenolftalein 1%, kemudian dititrasi dengan NaOH 0,1 N (V2) sampai warna merah muda. Selanjutnya ditambahkan 0,1 mL formaldehida 40% dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N (V3) sampai warna merah muda. Kadar protein terlarut ditentukan dengan

$$\% N = \frac{V1.N1 - V3.N3}{\text{Berat sampel}} \times 14,008 \times 100\%$$

$$\% P = \% N \times \text{faktor konversi (6,25)}$$

Keterangan :

$V_1.N_1$ = volume NaOH titrasi 1

$V_3.N_3$ = volume NaOH titrasi 2

V. KESIMPULAN DAN SARAN



5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ekstraksi yang dilanjutkan dengan fraksinasi menghasilkan rendemen yaitu pada fraksi 0-40% diperoleh 0,417 gram, fraksi 40-80% diperoleh 0,531 gram dan fraksi 80-100% diperoleh 1,677 gram.
2. Aktivitas ekstrak kasar dari daging buah pepaya mentah sebesar 7,839 unit sedangkan masing-masing fraksi diperoleh yaitu: fraksi 0-40% sebesar 0,0605 unit, fraksi 40-80% sebesar 0,285 unit dan fraksi 80-100% sebesar 0,274 unit.
3. Persen Nitrogen terlarut hasil hidrolisis protein ikan lemuru oleh enzim papain kasar terhadap pengaruh waktu inkubasi diperoleh yaitu: pada 0 hari sebesar 1,050%, 3 hari sebesar 1,0636%, 5 hari sebesar 1,097% dan 7 hari sebesar 1,0646%.
4. Enzim papain kasar yang didapat dari hasil ekstraksi pada penelitian ini dapat bekerja pada protein ikan lemuru, sehingga protein terhidrolisis menjadi peptida-peptida terlihat dari pita-pita protein yang tampak semakin turun.

5.2 Saran

Perlunya penelitian lanjutan sebagai berikut:

1. Penelitian selanjutnya sebaiknya mempergunakan enzim papain murni
2. Aktivitas enzim papain yang dipakai sebaiknya merupakan aktivitas spesifik
3. Penentuan aktivitas enzim papain berdasarkan pengaruh suhu, pH, dan konsentrasi terhadap substrat kasein.
4. Ekstrak ikan lemuru sebaiknya diisolasi terlebih dahulu untuk memisahkan antara protein dengan lemak, karbohidrat, dan bahan-bahan lain sehingga pita-pita protein yang ditampilkan oleh gel elektroforesis hasil hidrolisis protein nampak jelas

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, H. 1994. *Kimia Larutan*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Albert, B. Denis B. dan Julian L. 1994. *Biologi Molekular sel*. Terjemahan Alex Tri Kartjono dari *Molecular Biology of The Cel*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Anglemer, A.F. and M.W. Montgomery. 1976. *Amino Acid Peptides and Protein*. New York: Elsevier Applied Science.
- Anonim. 1983. *Hasil Evaluasi Potensi Sumber Daya Hayati Perikanan Laut di Perairan Laut Indonesia dan Perairan ZEE*. Jakarta: Depdikbud Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Indonesia
- 1992. *Daftar Komposisi Bahan Makanan*. Jakarta: Bhrata.
- Anwar, C. Bambang, P. P Harno Dwi. dan W Tutik Dwi. 1994. *Pengantar Praktikum Kimia Organik*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press.
- Arbianto, P. 1996. *Biokimia Konsep-konsep Dasar*. Bandung: Depdikbud Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Proyek Pendidikan Tenaga Guru.
- Bahri, S. 1990. *Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain dan Garam dalam Pembuatan Kecap Ikan Lemuru (Sardinella longiceps)*. Fakultas Teknologi Pertanian. Jember: Universitas Jember.
- Baker, D. 1995. *Capillary Electroforesis*. Canada: John Wiley and Sons. Inc
- Boyer, R. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. California: Benjamin/Clumming Publishing Company Inc.
- Deutscher, M.P. 1990. *Method in Enzymology Guide to Protein Purification*. San Diego: Academic Press.
- Drenth, J. J.N Jansonius. R Koekoek. and B.G Wolthers. 1976. *Papain, X-ray Structure. The Enzyme 3*. 485-499
- Fessenden, R.J and J.S. Fessenden. 1997. *Dasar-Dasar Kimia Organik*. Terjemahan Sukmarimah Maun, Kamiati Anas, Tilda, S., Sally dari *Fundamental of Organic Chemistry* (1996). Jakarta: Binarupa Aksara.

- Gamman, P.M. and K.B Sherington. 1994. Ilmu Pangan: *Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi*. Terjemahan Murdijati Gardjito, Sri Naruki, Agnes Murdiati dan Sardjono dari *The Science of Food, An Introduction of Food Science, Nutrition and Microbiology*. Second Edition (1991). Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Godfrey, T. and Reicheld. 1986. *Industrial Enzymology The Application of Enzymes in Industry*. New York: Stockon Press.
- Hasnan, M. 1991. *Penggunaan Enzim Papain selama Proses Hidrolisis Kecap Ikan*. Skripsi. Jurusan TPG. FATETA. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Indrawaty. 1983. *Pembuatan Kecap Keong Sawah dengan menggunakan Enzim Bromelin*. Jakarta: Balai Pustaka.
- Irawan, A. 1995. *Pengawetan Ikan dan Hasil Perikanan*. Solo: Cv. Aneka.
- Kalie, M. 1993. *Kandungan Gizi Pepaya*. Jakarta: Erlangga.
- Kaneda. Makoro. Yanezawa and Hiro. 1997. "Purification and Same Properties of Protease from He Sarcocarp of Musk Melon Fruit". Dalam *Journal Bioscience Biotechnology Biochemistry*. New York: America Press Inc.
- Kolodziejska. Szie. Magdalena and S. Sikoski. 1994. "Proteolytic activity of Crude Enzyme Extraction of Quid Illex Argentinus Liver". Dalam *Journal Food Biochemistry*. United State of America: The Benyamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Kuncoro, S. 1979. *Bagaimana Membuat Kecap Secara Cepat*. Jakarta: Mekatronika.
- Lehninger, A. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Terjemahan Maggy Thenawidjaja dari *The Basic of Biochemistry*. Jakarta: Erlangga.
- Loffer, A. 1986. Proteolytic Enzyme: *Soueces and Aplication Food Technol.* 5. 2231-2234
- Lynn, K.G. 1983. *Definition of The Side Reactivity of The Ancestral Protease of The Papain Type Phytochemistry*. Wilmington: Champman & Hall.
- Maggy, T. S. 1992. *Protease*. Bandung: Depdikbud Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Gajah Mada.
- Martoharsono dan Rahayu. 1982. *Enzimologi*. Yogyakarta: Yayasan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada

- Mathews, C.K. and K.E. Van Holde. 1990. *Biochemistry*. United State of America: The Benyamin/ Cummings Publishing Company Inc.
- Moeljanto. 1992. *Pengalengan Ikan Penanganan Ikan Segar Pengawetan dan Pengolahan Hasil Pertanian*. Jakarta: Penebar swadaya.
- Muchtadi, D. 1992. *Enzim dalam Industri Pangan*. PAU Pangan dan Gizi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Murray, R.K. K. G Darryl. A.M Peter. and W.R Victor. 1997. *Biokimia Harper*. Terjemahan Andry Hartono dari *Biochemistry Harper*. Edition 24. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nur, M.A. M. Syachri dan K. Iskandarriyah. 1981. *Kimia Dasar II*. Jakarta: Erlangga.
- Parakkasi, A. 1980. *Ilmu Gizi dan Makanan Ternak*. Fakultas Pertanian. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Peterson, B. 1962. *Fish and Food*. New York: Academic Press Inc.
- Praptiningsih, Y. 1989. *Isolasi Dan Pemurnian Bromelin dari Bonggol Nanas*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press).
- Ratnadewi, A.A. 2001. *Studi Ekspresi Mutan Sup45 Hiperaktif Sup45 Hipersensitif Paramomisin dan Sensitif Temperatur Saccharomyces cerevisiae*. Bandung: Bidang Khusus Biokimia Program Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung.
- Reed, G. 1996. *Enzymes in Food Processing*. New York: Academic Press Inc.
- Rismunandar, P. 1980. *Protease*. Jakarta: Bina Wiraswasta.
- Rukmana, R. 1995. *Pepaya Budidaya dan Pasca Panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Saiful, B. 1990. *Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain dan Garam pada Pembuatan Kecap Ikan*. Skripsi. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Santoso, A. 1997. *Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain Perdagangan terhadap Rendemen Minyak Ikan Lemuru (Sardinella longiceps) pada Isolasi secara Enzim*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA. Malang: Universitas Brawijaya.

- Saripah, H. dan D Setiasih. 1980. *Dasar-dasar Pengawetan*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Sasangka, V.A.F. 1997. *Hidrolisis Enzimatis Ikan Lemuru (Sardinella longiceps) dengan Variasi Konsentrasi Bahan dan Lama Hidrolisis*. Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Pertanian. Jember: Universitas Jember.
- Savitri, S. 1985. *Pengaruh Penggunaan Papain dari Buah Pepaya Muda Terhadap Keempukan Daging Ayam Petelur*. Tesis. Jurusan Gizi dan Sumber Daya Keluarga. Bogor: Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Setyo, N. 1986. *Pengaruh Penambahan Air Suling dan Waktu Penundaan Pemberian Garam terhadap Aktivitas Enzim Papain pada Hidrolisis Ikan Lemuru (Sardinella longiceps)*. Tesis. Fakultas Pertanian. Malang: Universitas Brawijaya.
- Soeseno, S. 1985. *Buah untuk Karang Gigi*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Sorensen, S. P. L. 1987. "Sorensen Formol". Dalam *Jurnal Biochemistry*. <http://www.liv.ac.uk/chemistry/link/reaction.html-44k>.
- Stryer, L. 1995. *Biokimia*. Terjemahan Sadikin dari *Biochemistry*. Jakarta: IKAPI
- Sudarmadji, S. 1988. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Bogor: Departemen Penelitian Pangan Institut Pertanian Bogor.
- Suhardjodan C. dan M. Kusharto. 1992. *Prinsip-prinsip Gizi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Suhartono, T. M. 1992. *Protease*. PAU Pangan dan Gizi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Suprihno. 2002. *Pengaruh Berat Buah Nanas (Ananas comucus) dan Lama Inkubasi terhadap Kualitas Kecap Ikan yang dibuat secara Fermentasi*. Program Studi Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Jember: Universitas Jember.
- Syarief, R dan A. Irawati. 1986. *Pengetahuan Bahan Untuk Industri Pertanian*. Jakarta: PT. Meddiyatama Sarana Perkasa.
- Tranggono, K. 1990. *Hidrolisis Kasein oleh Enzim Bromelin Kasar dari Bonggol Nanas*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

- Unus. 1991. *Usaha Memperpanjang Daya Tahan Ikan Pindang Lemuru (Sardinella Longiceps)*. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Van Veen. 1965. *Fermented and Dried Seafood Product in South East Asia, in Fish and Food*. New York: Borgstromlogi Academic Press.
- Voet, K. A. 1994. *Experimental Biochemistry*. San Francisco: W. H Freeman and Company
- Winarno, F.G. 1980. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia.
- 1986. *Enzim Pangan*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Whitaker, J.R. 1994. *Principles of Enzymology for The Food Science*. Second Edition. New York: Marcel Decker.
- White, F.D and G. E. Delory. 1952. *A Course In Practical Biochemistry for Students of Medicine (Cameron and White)*. London: J&A. Churchill Ltd.
- Yokotsuka. 1960. *Aroma and Flavour of japanese Soy Sauce, in Advances in Food Research*. New York: Borgtromlogi Academic Press.

Lampiran 1. Preparasi Larutan

1. Buffer fosfat 0,2 M pH 7

Sebanyak 6,9 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_r=137,99$) dilarutkan dengan aquades sampai 250 mL.

Sebanyak 8,9 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_r=177,99$) dilarutkan dengan aquades sampai 250 mL. Untuk membuat buffer fosfat 0.2 M pH 7 maka larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ditambahkan pada larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sampai pH mencapai pH 7 pada pH meter.

2. Kasein 20 mg/mL pH 7

Sebanyak 0,2 gram kasein *Hammerstin* ditambahkan 5 mL larutan NaOH 0,1 N dan diletakkan pada penangas sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai kasein larut. Kemudian didinginkan dan ditambahkan larutan buffer fosfat 0,2 M pH 7 sampai 10 mL.

3. Larutan CaCl_2 2mM

Sebanyak 0,011 gram CaCl_2 ($M_r=111$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

4. Larutan Trikloro asetat 0,1 M

Sebanyak 0,818 gram Trikloro asetat ($M_r=163,5$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL.

5. Larutan Na_2CO_3 0,4 M

Sebanyak 2,12 gram Na_2CO_3 ($M_r=106$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

6. Larutan Folin (1:2)

Sebanyak 6 mL larutan folin cioulteau ditambahkan 2 mL aquades.

7. Larutan tirosin 5 mmol/L

Sebanyak 0,023 gram tirosin ($M_r=181$) ditambahkan dengan 12,5 mL larutan NaOH 0,1 N dan diletakkan pada penangas sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai larut. Kemudian didinginkan dan ditambahkan aquades sampai 25 mL

8. Larutan enzim dalam CaCl_2 (2:1)

Sebanyak 0,4 mL ditambahkan 0,2 mL CaCl_2 2 mM

9. Larutan Kalium oksalat jenuh (1:3)

Sebanyak 1 mL larutan Kalium oksalat jenuh ditambahkan 3 mL aquades

10. Larutan indikator phenolptalein 1% w/v

Sebanyak 0,5 gram phenolptalein dilarutkan dengan alkohol (etil alkohol) 70% sampai 50 mL

11. Larutan formaldehyde 40 % v/v

Sebanyak 20 mL larutan formaldehyde dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

12. Akrylamida/bis (30% T, 2.67% C) (Anonymous, Tanpa Tahun)

Sebanyak 29,2 gram akrylamida ditambahkan 0,8 gram N'N'-bis-methylene akrylamida dan dilarutkan dengan penambahan aquades steril sampai volume 100 mL

13. Tris HCL 1.5 M pH 8,8

Sebanyak 9,077 gram basa Tris dilarutkan aquades steril sampai 50 mL. Kemudian ditambahkan 6 N HCL sedikit demi sedikit sampai pH 8,8 dengan menggunakan alat pH meter.

14. Tris HCL 0.5 M pH 6,8

Sebanyak 3 gram basa Tris dilarutkan aquades steril sampai volume 50 mL. Kemudian ditambahkan 6 N HCL sedikit demi sedikit sampai pH 6,8 dengan menggunakan alat pH meter.

15. Natrium Dodesil Sulfat 10% w/v

Sebanyak 2,5 gram Natrium Dodesil Sulfat dilarutkan aquades steril sampai volume 25 mL

16. Buffer sampel

Sebanyak 1,9 mL aquades steril ditambahkan 0,5 mL *Tris HCl* pH 6,8; 0,4 mL glycerol ; 0,8 mL 10% (w/v) Natrium Dodesil Sulfat, 0,2 mL 2- merkaptoetanol, 0,2 mL 1% (w/v) *bromofenol blue*. Sampel dilarutkan dengan perbandingan 1 : 4 kemudian dipanaskan 95 °C selama 4 menit.

17. 5 X elektrode buffer

Sebanyak 1,5 gram Basa Tris ditambahkan 7,2 gram glisin, 0,5 gram Natrium Dodesil Sulfat dan aquades steril sampai 100 mL. Disimpan pada 4°C. Untuk satu elektroforesis run melarutkan 10 mL 5X stock dengan 40 mL aquades steril.

18. Larutan staining

Sebanyak 20 mL metanol 40 % v/v ditambahkan 7,5 mL larutan asam asetat 15 % v/v dan 0,05 gram *coomasie brilliant blue* 0,1 % w/v.

19. Larutan destaining

Sebanyak 5 ml metanol 10 % v/v ditambahkan 3,72 mL larutan asam asetat 7,5 % v/v.

Lampiran 2. Data Unit Aktivitas Enzim Papain Kasar dari Buah Pepaya

Mentah

Data absorbansi blanko, standart dan sampel pada hasil enzim papain kasar dicantumkan pada tabel 11 dibawah ini.

Tabel 11. Data absorbansi blanko, standart dan sampel tiap 50 mL larutan enzim papain kasar.

Fraksi	Blanko (Blk)	Standar (Std)	Sampel (Spl)	Std-Blk	Spl-Blk	Unit Aktv (rerata)
0-40%	0,024	0,439	A.0,027	0,417	$1,0 \times 10^{-3}$	0,0605
	0,026	0,445	0,026			
	0,025	0,444	0,025			
	0,025	0,443	0,026			
			B.0,040			
			0,037			
			0,041			
			0,039			
			C.0,035			
			0,035			
40-80%	0,024	0,461	A.0,033	0,439	$8,7 \times 10^{-3}$	0,216
	0,024	0,462	0,032			
	0,025	0,467	0,035			
	0,0243	0,463	0,0323			
			B.0,030			
			0,031			
			0,031			
			0,0323			
			C.0,032			
			0,033			
80-100%	0,026	0,431	A.0,031	0,408	$9,0 \times 10^{-3}$	0,207
	0,023	0,434	0,035			
	0,028	0,436	0,037			
	0,0257	0,4337	0,0347			
			B.0,029			
			0,034			
			0,035			
			0,0327			
			C.0,030			
			0,029			
		0,031				
		0,030	0,408	$4,3 \times 10^{-3}$		

Fraksi	Blanko (Blk)	Standar (Std)	Sampel (Spl)	Std-Blk	Spl-Blk	Unit Aktv (rerata)
	0,552	1,018	A.0,767			
	0,554	1,016	0,767			
	0,554	1,018	0,766			
	0,533	1,017	0,766	0,463	0,227	
			B.0,771			
			0,774			
			0,776			7,839
Ekstrak kasar			0,774	0,463	0,221	
			C.0,768			
			0,770			
			0,773			
			0,770	0,463	0,217	

Pengukuran unit aktivitas enzim papain kasar dengan rumus sebagai berikut :

$$Unit\ aktivitas = \frac{Abs.spl - Abs.blk}{Abs.std - Abs.blk} \times faktor\ pengenceran \times \frac{1}{waktu}$$

Keterangan : Faktor pengenceran 165 x

Waktu inkubasi 10 menit

Lampiran 3. Perhitungan Aktivitas Enzim Papain Kasar pada Tahap Fraksinasi

1. Fraksi 0 - 40%

$$a. \text{ Blanko} = \frac{0,025 + 0,024 + 0,026}{3} = 0,025$$

$$b. \text{ Standar} = \frac{0,439 + 0,445 + 0,444}{3} = 0,443$$

$$c. \text{ Sampel 1} = \frac{0,026 + 0,025 + 0,027}{3} = 0,026$$

$$\text{Sampel 2} = \frac{0,026 + 0,027 + 0,026}{3} = 0,0263$$

$$\text{Sampel 3} = \frac{0,025 + 0,027 + 0,030}{3} = 0,0273$$

$$d. \text{ Standart} - \text{Blanko} = 0,443 - 0,025 = 0,417$$

$$e. \text{ Sampel 1} - \text{Blanko} = 0,026 - 0,025 = 1,0 \times 10^{-3}$$

$$\text{Sampel 2} - \text{Blanko} = 0,039 - 0,027 = 1,3 \times 10^{-3}$$

$$\text{Sampel 3} - \text{Blanko} = 0,037 - 0,027 = 2,3 \times 10^{-3}$$

$$\bar{U} = \left(\frac{\text{Sampel} - \text{Blanko}}{\text{Standar} - \text{Blanko}} \right) \times \left(\frac{1}{10} \right) \times fp$$

$$U_1 = \left(\frac{0,026 - 0,025}{0,443 - 0,025} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = \left(\frac{1,0 \times 10^{-3}}{0,417} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = 0,039$$

$$U_2 = \left(\frac{0,0263 - 0,025}{0,443 - 0,025} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = \left(\frac{1,3 \times 10^{-3}}{0,417} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = 0,051$$

$$U_3 = \left(\frac{0,0273 - 0,025}{0,443 - 0,025} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = \left(\frac{2,3 \times 10^{-3}}{0,417} \right) \times \frac{1}{10} \times 165 = 0,091$$

$$f. \text{ Jadi hasil akhir rata-rata} = \frac{U_1 + U_2 + U_3}{3} \\ = \frac{(0,039) + (0,051) + (0,091)}{3} \\ = 0,0605$$

Ket : Perhitungan untuk fraksi 40-80%; 80-100%, dan ekstrak kasar menggunakan cara yang sama.

Lampiran 4. Data % Protein Terlarut dari Hasil Ikan Lemuru yang Terhidrolisis.

Data volume NaOH yang dihasilkan untuk penentuan kadar protein terlarut dari hasil ikan lemuru yang terhidrolisis dicantumkan dalam tabel 12.

Tabel 12. Data volume NaOH dan penentuan kadar protein terlarut untuk 10 gram ikan lemuru.

Nama	U ₁	U ₂	U ₃	rerata	%N	%P
Blanko	82	82,2	83	82,4		
Kontrol	6,3	6,7	8	7	1,056	6,6
Sampel 0 hari	7,8	7	7,5	7,43	1,050	6,57
Sampel 3 hari	6,6	7	5,8	6,47	1,064	6,659
Sampel 5 hari	3,9	4,3	4	4,07	1,097	6,86
Sampel 7 hari	6,5	6	6	6,4	1,065	6,66

Perhitungan kadar protein terlarut menggunakan rumus :

$$\% N = \frac{V_{blk} \cdot N_{blk} - V_{spl} \cdot N_{spl}}{\text{Berat sampel}} \times fp \times 14,008 \times 100\%$$

$$\% P = \% N \times \text{faktor konversi (6,25)}$$

Lampiran 5. Perhitungan % Protein Terlarut**1. Sampel 0 hari**

$$\begin{aligned} \text{a. } V_2N_2 - V_3N_3 &= (82,4 \times 0,1) - (7,4 \times 0,1) \\ &= 8,24 - 0,74 = 7,49 \text{ mmol} \end{aligned}$$

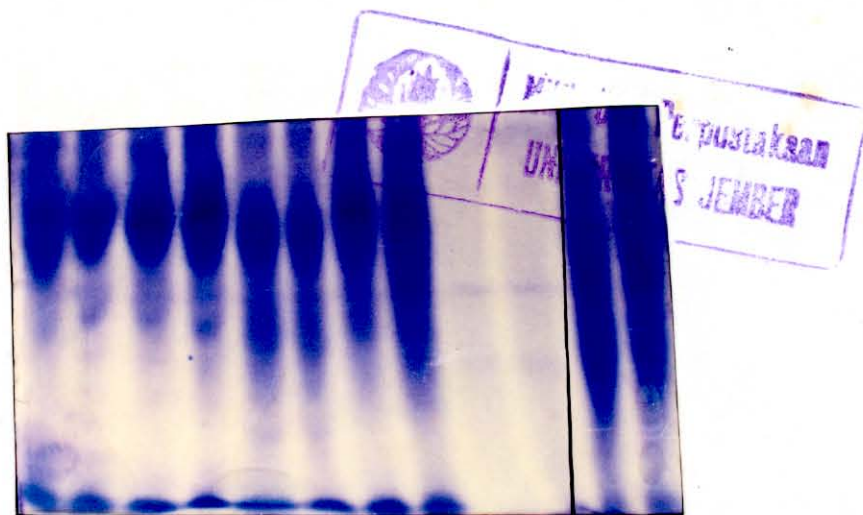
$$\begin{aligned} \text{b. } \text{gr} &= 7,49 \text{ mmol} \times 14,008 \\ &= 105,01 \text{ mg} \\ &= 0,1051 \text{ gr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. } \%N &= \frac{0,1051}{10} \times 100\% \\ &= 1,051 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{d. } \%P &= 1,051 \times 6,25 \\ &= 6,56 \% \end{aligned}$$

Ket : Untuk sampel 3, 5, 7, dan kontrol perhitungan menggunakan cara yang sama.

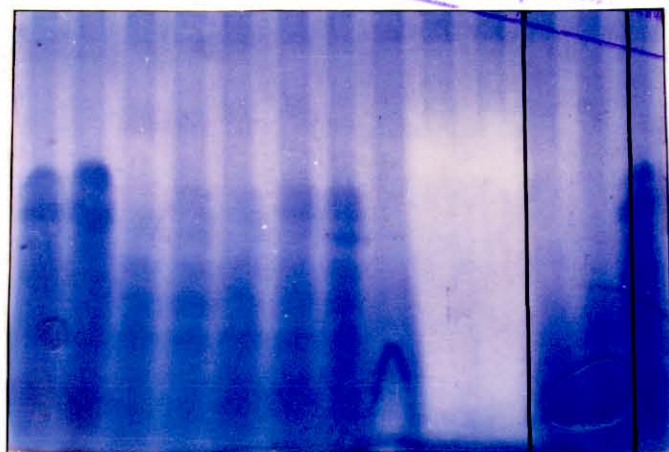
Lampiran 6. Daftar Gambar Elektroforegram



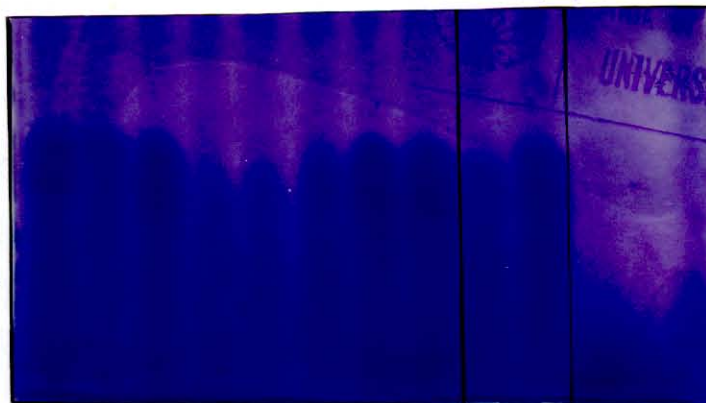
Gambar 11. Elektroforegram Protein Ikan Lemuru Terhidrolisis Enzim Papain Kasar pada Inkubasi 0 Hari



Gambar 12. Elektroforegram Protein Ikan Lemuru Terhidrolisis Enzim Papain Kasar pada Inkubasi 3 Hari



Gambar 13. Elektroforegram Protein Ikan Lemuru Terhidrolisis Enzim Papain Kasar pada Inkubasi 5 Hari



Gambar 14. Elektroforegram Protein Ikan Lemuru Terhidrolisis Enzim Papain Kasar pada Inkubasi 7 Hari

Lampiran 7. Standart Deviasi Data Absorbansi Penentuan Unit Aktivitas Enzim Papain Kasar

Pengukuran data dari sebuah eksperimen terkait dengan keakurasian dan kepresisian dari kerja instrumen Tingkat akurasi dapat ditentukan dengan melihat error dari beberapa ulangan pengukuran. Secara statistik ditunjukkan dengan Standart Deviasi. Data Standart Deviasi ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 13. Data Standart Deviasi Dari Absorbansi Blanko, Standart dan Sampel tiap 50 mL larutan enzim papain kasar.

Fraksi	Ket	Absorbansi			Rerata	Std.Dev
		Ul. 1	Ul. 2	Ul. 3		
0-40%	Blanko	0,024	0,026	0,025	0,025	0,001
	Standart	0,444	0,439	0,445	0,443	$3,24 \times 10^{-3}$
	Sampel 1	0,027	0,026	0,025	0,079	$5,56 \times 10^{-2}$
	Sampel 2	0,026	0,026	0,027	0,079	$5,56 \times 10^{-2}$
	Sampel 3	0,025	0,027	0,030	0,079	$5,56 \times 10^{-2}$
40-80%	Blanko	0,024	0,024	0,025	0,024	$7,07 \times 10^{-4}$
	Standart	0,461	0,467	0,462	0,463	$3,24 \times 10^{-3}$
	Sampel 1	0,033	0,032	0,035	0,096	$7,14 \times 10^{-2}$
	Sampel 2	0,031	0,031	0,224	0,096	$7,14 \times 10^{-2}$
	Sampel 3	0,032	0,033	0,031	0,096	$7,14 \times 10^{-2}$
80-100%	Blanko	0,028	0,026	0,023	0,026	$2,54 \times 10^{-3}$
	Standart	0,431	0,434	0,436	0,434	$2,52 \times 10^{-3}$
	Sampel 1	0,031	0,035	0,037	0,097	$6,49 \times 10^{-2}$
	Sampel 2	0,029	0,035	0,034	0,097	$6,49 \times 10^{-2}$
	Sampel 3	0,030	0,029	0,031	0,097	$6,49 \times 10^{-2}$
Ekstrak kasar	Blanko	0,552	0,554	0,554	0,553	$3,53 \times 10^{-4}$
	Standart	1,018	1,018	1,016	1,018	$3,53 \times 10^{-4}$
	Sampel 1	0,766	0,771	0,773	0,770	$3,53 \times 10^{-3}$
	Sampel 2	0,767	0,774	0,770	0,770	$3,53 \times 10^{-3}$
	Sampel 3	0,767	0,776	0,768	0,770	$3,53 \times 10^{-3}$

Lampiran 8. Perhitungan Standart Deviasi pada Tabel 12.

Perhitungan Standart deviasi menggunakan rumus :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}, \text{ dimana}$$

SD = Standart Deviasi

n = banyaknya pengulangan

x = nilai pengukuran

\bar{x} = rata-rata nilai pengukuran

1. Fraksi 0-40%

x blanko	x rata-rata	(x - x rata-rata)	(x - x rata-rata) ²
0,027	0,025	0,001	1.10 ⁻⁶
0,026	0,025	-0,001	1.10 ⁻⁶
0,025	0,025	0	0

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{2 \cdot 10^{-6}}{2}} = 0,001$$

x standart	x rata-rata	(x - x rata-rata)	(x - x rata-rata) ²
0,439	0,443	-0,004	1,6 x 10 ⁻⁴
0,445	0,443	0,002	4 x 10 ⁻⁶
0,444	0,443	0,001	1,0 x 10 ⁻⁵

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{2,1 \times 10^{-5}}{2}} = 3,24 \times 10^{-3}$$

Ket : Untuk masing-masing data lainnya menggunakan cara yang sama

Lampiran 9. Tabel Teknik Pengendapan oleh Ammonium Sulfat

Tabel 14. Teknik pengendapan oleh ammonium sulfat

Konsentrasi akhir ammonium sulfat: persen penjuenan pada 0°C

Kons. awal (%am Sulfat pada 0°C)	Persentase penjuenan pada 0°C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Ammonium sulfat (gram) untuk 1 liter larutan																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	679
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	45	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Sumber : dari "Data for biochemistry reseach "(R. M. C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, and K. M. Jones, eds.), 2 nd Ed. Oxford Univ. Press, London, 1969

