

PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PARSIAL ENZIM PROTEASE DARI GETAH TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*)

[Purification and Partial Characterization of Protease
from Biduri (*Calotropis gigantea*) Latex]

Yuli Witono¹⁾, Aulanni'am²⁾, Achmad Subagio¹⁾ dan Simon Bambang Widjanarko³⁾

¹⁾ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

²⁾ Staf Pengajar Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

³⁾ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang

Diterima 19 Oktober 2006 / Disetujui 11 Juni 2007

ABSTRACT

The main objectives of this research were to purify protease from 'biduri' (*Calotropis gigantea*) latex and its partial characterization in relation with this application in the food processing. Protease was extracted from biduri latex by using ammonium sulphate 35-80%, dialyzed and then purified subsequently through sephadex G-25 gel and CM sephadex C-50 cation exchanger. Biduri protease has specific activity of 59 unit/g in casein substrate. Optimum pH was 7 and temperature 55°C. Apparent K_m was 21.63 g/ml and reaction maximum velocity (V_{max}) being 18.9 mg/ml/min. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) analysis showed the apparent molecular weight of the protease was 25.2 kD. Moreover, the protease can be inactivated at 90°C for 10 min, or 60°C for 30 min.

Key words: biduri (*Calotropis gigantea*), protease, purification, characterization.

PENDAHULUAN

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

Di sisi yang lain, ketersediaan enzim protease belum mencukupi kebutuhan, sementara pemakaian protease bagi industri pangan cenderung meningkat 60-70% dari total pemakaian enzim untuk pangan (Rao et al., 1998; Adinarayana et al., 2003). Oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease yang lain. Salah satunya adalah biduri (*C. gigantea*) yang merupakan jenis tumbuhan semak liar di daerah tropis termasuk

Indonesia. Menurut Stenis (1992) tanaman ini banyak tumbuh pada lahan kering dan sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan bahkan pada beberapa daerah dianggap sebagai gulma. Bentuk tanaman biduri tertera pada Gambar 1.

Tanaman dalam satu genus dengan biduri, yaitu *Calotropis procera* dapat digunakan sebagai sumber enzim protease (Eskin, 1990). Peneliti lain yaitu Chinas and Canales (1986), melaporkan bahwa *C. procera* telah sukses digunakan sebagai sumber enzim protease untuk pembuatan keju. Menurut paradigma *Chemotaxonomy*, tanaman dari genus yang sama memiliki kemiripan dalam komposisi kimianya (Ray, 1989). Hasil penelitian penulis sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman biduri dapat digunakan sebagai sumber enzim protease, dan juga ekstrak kasar protease biduri mempunyai kemampuan untuk mengempukkan daging dan menggumpalkan susu, walau belum menghasilkan tingkat keempukan daging dan rendemen keju yang maksimal (Witono, 2002a; Witono, 2002b; Witono et al., 2002 dan Witono et al., 2003), hal ini karena belum diketahui karakteristik protease biduri secara pasti.



Gambar 1. Tanaman biduri (*Calotropis gigantea*)

Komponen-komponen non enzim yang terdapat dalam suatu *crude enzyme* sering mengganggu atau menghambat aktifitas enzim yang bersangkutan. Oleh karena itu *crude protease* yang telah diekstrak dari sumbernya perlu dipurifikasi. Di samping itu, untuk keperluan karakterisasi akan lebih baik apabila menggunakan enzim protease yang sudah terpurifikasi. Teknik purifikasi suatu enzim berbeda dengan enzim lainnya, tergantung dari sifat-sifat molekul protein yang terdapat pada enzim target. Purifikasi dapat dilakukan melalui beberapa cara atau tahapan, mulai dari presipitasi menggunakan garam ammonium sulfat, dialisis dengan selapan, sampai dielusi melalui kolom kromatografi yang berisi gel filtrasi maupun ion *exchanger* (Whitaker, 1994; Naz, 2002).

Nilai guna suatu enzim ditentukan oleh kemampuannya untuk dapat diaplikasikan dalam proses-proses pangan. Untuk itu karakterisasi sebagai dasar dalam aplikasi suatu enzim protease menjadi sangat diperlukan. Sejauh ini belum didapat informasi tentang karakteristik dari protease biduri. Penelitian ini bertujuan untuk: (1) mengisolasi enzim protease dari getah tanaman biduri hingga didapat protease yang relatif murni yang memiliki aktifitas spesifik tinggi; dan (2) karakterisasi parsial enzim protease dari getah tanaman biduri sebagai dasar penanganan dan pemanfaatannya lebih lanjut pada pengolahan pangan.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah getah dari pucuk batang tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang di dapat dari daerah Watu Ulo Ambulu Jember-Jawa Timur. Getah didapat 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 analytic* (PA) dari Merck Jerman gel sephadex G-25 dan Carboxymethyl Sephadex (CM) Sephadex C-50 Cation Exchanger.

Sedangkan alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: *centrifuge Medifriger*, *centrifuge* Yenaco model YC-1180 (Jepang), *freeze drying* Sniider Scientific tipe 2040 (Belanda), *spectronic* 21D Melton Roy, pH meter Jen Way tipe 3320 (Jerman), magnetik stirer Stuart Scientific, vortex Thermolyne tipe 16700 Mixer, lemari pendingin, *waterbath* GFL 1083, neraca analitik Ohaus dan pemanas listrik Gerhardt.

Ekstraksi enzim protease dari getah tanaman biduri (Noda et al., 1994 dengan modifikasi)

Ekstraksi enzim protease dari getah biduri; dilakukan secara *salting out* menggunakan garam ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 65%. Setelah dialisis dan dikeringkan, *crude protease* biduri diamati kadar protein terlarut (Walker, 1994), aktifitas proteolitik (Stoknes and Rustad, 1995; Walker, 1994) dan total aktifitasnya dihitung.

Purifikasi enzim protease biduri (Choi et al., 1999; Nafaji et al., 2005) dengan modifikasi

Enzim kering hasil purifikasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi G-25, kemudian dilanjutkan dengan kolom kromatografi penukar ion positif CM sephadex C-50. Purifikasi dimulai dengan melarutkan enzim kering hasil purifikasi gel filtrasi sephadex G-25 dengan 0,05 M buffer fosfat pada pH 7. Kemudian larutan enzim protease biduri tersebut dilewatkan pada kolom kromatografi penukar ion positif CM sephadex C-50. Kolom dielusi dengan menggunakan gradien NaCl pada konsentrasi antara 0 sampai 1 M. Eluen ditampung 5 ml pada tabung reaksi sebanyak 63 fraksi (5 ml/tabung). Setiap fraksi dianalisa protein dan aktifitas enzimnya. Fraksi yang mengandung aktifitas dikumpulkan, kemudian dibekukan selama 24 jam (sampai beku). Enzim beku tersebut di kering bekukan selama 3 hari, sampai didapat enzim kering. Pada setiap akhir tahapan diamati kadar protein terlarut (Walker, 1994), aktifitas proteolitik (Stoknes and Rustad, 1995; Walker, 1994) dan dihitung total aktifitasnya.

Karakterisasi parsial enzim protease biduri

Isolat enzim biduri murni yang dihasilkan dari proses diatas selanjutnya diamati sebagian sifat-sifatnya. Beberapa parameter dipilih dengan seksama yang merujuk pada sifat-sifat khas enzim protease pada umumnya, meliputi: berat molekul (BM) dengan metode gel electrophoresis yakni: SDS-PAGE (Bejosano and Corke, 1999), Km dan Vmax enzim protease biduri (Whitaker, 1994), penentuan pH dan suhu optimal (Asakura et al., 1997) serta termostabilitasnya (Stoknes and Rustad, 1995).

Penentuan BM protease biduri (Metode SDS-PAGE; Bejosano and Corke, 1999)

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) dari protein enzim hasil purifikasi yang memiliki aktifitas spesifik paling tinggi (dalam hal ini dari fraksi 35-40) dilaksanakan menggunakan suatu Mini-Protean II Electrophoresis System (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) berdasarkan petunjuk yang telah ada. Gel distaining dalam *Coomassie blue* R-250. Marker berat molekul diestimasi dari perbedaan fraksi yang terdeteksi. Marker yang digunakan dari Sigma (St Louis, MO, USA) yang meliputi bovine albumin dan carbonic anhydrase dengan berat mekul masing-masing 66 dan 29 kDa.

Penentuan nilai K_m dan V_{max} protease biduri

Penentuan nilai K_m dan V_{max} dihitung pada beberapa level substrat. Reaksi antara enzim dan substrat dilakukan pada suhu optimum enzim biduri pada range waktu 0 – 20 menit dengan selang waktu 2 menit. Adapun level substrat meliputi: substrat 0,02; 0,01; 0,0075; 0,005; dan 0,0025 g/ml.

Pengujian pengaruh suhu dan penentuan suhu optimal aktivitas protease biduri (Asakura et al., 1997)

Pengujian pengaruh suhu dan penentuan suhu optimal aktivitas enzim dilakukan pada range suhu 30-80°C dengan selang 5°C sehingga didapatkan 11 level perlakuan suhu. Diamati aktivitas enzim pada tiap level suhu dan dipilih suhu optimal (suhu yang menunjukkan aktivitas enzim protease terbesar).

Pengujian pengaruh pH dan penentuan pH optimal aktivitas protease biduri (Asakura et al., 1997)

Pengujian pengaruh pH dan penentuan pH optimal aktivitas enzim dilakukan pada range pH 5,0-9,0 dengan selang 1, sehingga didapatkan 5 level perlakuan pH. Selanjutnya diamati aktivitas enzim pada tiap level pH. Kemudian dipilih salah satu level pH yang menunjukkan aktivitas enzim tertinggi.

Pengujian termostabilitas protease biduri (Stoknes and Rustad, 1995)

Pengujian termostabilitas enzim dilakukan dengan memanaskan enzim sebelum direaksikan dengan substrat pada suhu 60°C, 80°C, dan 90°C selama 0, 10, 20, 30, 45 dan 60 menit. Kemudian masing-masing kombinasi suhu dan waktu diuji aktifitasnya

Analisa kadar protein terlarut (Walker, 1994)

Pengamatan dilakukan dengan mengambil sampel sebesar 0.001 gram sampel protease kering. Kemudian dilakukan hidrolisis protein untuk mendapatkan protein terlarut menggunakan 0.1 ml NaOH 2N pada suhu 100°C selama 10 menit lalu didinginkan. Protein terlarut yang dihasilkan lalu direaksikan dengan 2 ml reagen mix-Lowry dan didiamkan selama 10 menit. Menambahkan 0.25 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Ditera dengan aquades sampai volume 5 ml kemudian dibaca absorbannya dengan spektrometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar BSA untuk dihitung kadar proteinnya.

Pengujian aktifitas protease (Walker, 1994 dengan modifikasi)

Pengujian aktifitas enzim protease menggunakan substrat *soluble casein* pada pH 7. Menimbang 0.01 gram *soluble casein* dalam tabung sentrifuse lalu dicampur dengan 3 ml buffer phosphat pH 7, dan dilakukan pra inkubasi pada suhu 37°C selama 4 menit. Setelah inkubasi, ditambahkan sampel 0.005 gram protease kering ke dalam campuran, dan inkubasi pada suhu 55°C selama 20 menit. Pada akhir inkubasi reaksi hidrolisis dihentikan dengan menambahkan 1 ml larutan TCA 15%. Sebagai kontrol, dilakukan tanpa

inkubasi dan reaksi hidrolisis pada waktu 0 menit, dimana penambahan larutan TCA 15% dilakukan sebelum penambahan protease. Selanjutnya, disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diambil 1 ml lalu di tambahkan 2.5 ml mix-Lowry dan dibiarkan 10 menit. Kemudian ditambahkan 0.250 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Campuran ditera dengan aquades sampai volume 5 ml lalu dibaca absorbansinya menggunakan spektrometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar tirosin untuk dihitung aktifitasnya.

Aktifitas protease dinyatakan dalam unit aktifitas, dimana satu unit berarti peningkatan konsentrasi asam amino (μmol tirosin) pada setiap menit waktu inkubasi. Aktifitas spesifik enzim dinyatakan dalam unit aktivitas per miligram protein enzim. Perhitungan aktifitas spesifik enzim dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan

- [C] = konsentrasi asam amino (μmol tirosin/ml)
- t = waktu hidrolisis (menit)
- 181.19 = berat molekul tirosin
- 1 unit = 1 μmol tirosin yang di bebaskan dari substrat oleh setiap mg enzim pada suhu 55°C per menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Purifikasi protease dari getah biduri

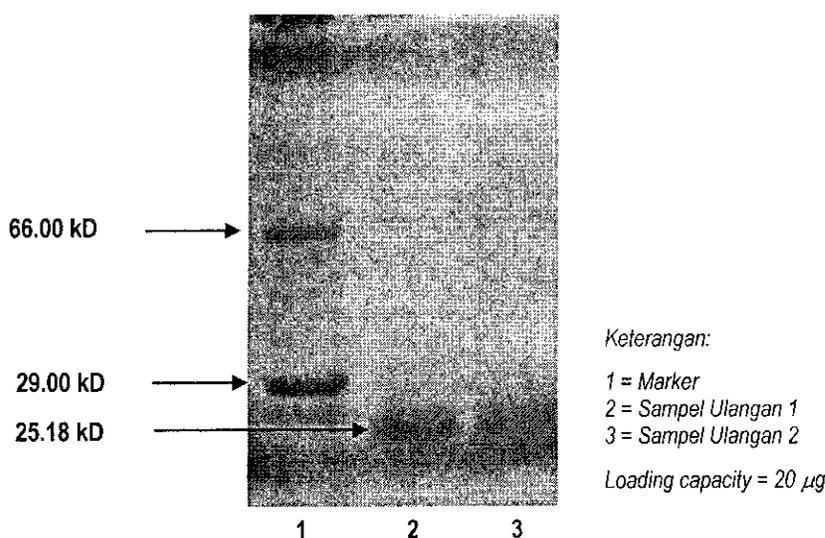
Hasil purifikasi protease getah biduri yang dilakukan melalui kolom Sephadex G-25 dilanjutkan dengan kolom CM Sephadex C-50 Cation Exchanger tertera pada Tabel 1.

Dibandingkan dengan *crude* protease hasil ekstraksi menggunakan ammonium sulphat, hasil purifikasi dengan sephadex G-25 menghasilkan protease dengan aktifitas spesifik yang sedikit lebih tinggi, yakni dari 0.0152 unit/mg menjadi 0.0182 unit/mg atau terjadi peningkatan sebesar 20.2%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan gel sephadex G-25 sebagian protein bukan protease target dan molekul-molekul non protein telah terjerap ke dalam resin tersebut. Purifikasi lanjutan menggunakan CM Sephadex C-50 meningkatkan aktivitas spesifik protease sebesar 291.5% (hampir 3 kali lipatnya). Pembuktian melalui uji elektroforesis ternyata menunjukkan ban tunggal (Gambar 2).

Tabel 1. Hasil purifikasi protease getah biduri melalui kolom kromatografi

| Langkah Purifikasi | Total Protein (mg) | Kadar Protein (%) | Aktifitas (unit) | Total Aktifitas (unit) | Aktifitas Spesifik (unit/mg) | Peningkatan Aktifitas Spesifik (%) |
|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Ammonium sulphat | 17.5536 | 34.5543 | 0.0666 | 0.2663 | 0.0152 | - |
| Sephadex G-25 | 15.4626 | 23.2171 | 0.0705 | 0.2818 | 0.0182 | 20.2 |
| CM Sephadex C-50 | 1.3553 | 1.6408 | 0.0252 | 0.0805 | 0.0594 | 291.5 |

1 unit = μmol tirosin yang di bebaskan dari soluble casein setiap menit



Gambar 2. SDS-PAGE hasil purifikasi melalui Gel Sephadex G-25 dilanjutkan dengan CM Sephadex C-50 Cation Exchanger

Gambar 2 menunjukkan bahwa setelah dipurifikasi dengan gel sephadex G-25 yang dilanjutkan dengan purifikasi dengan CM Sephadex C-50 Cation Exchanger menunjukkan hasil satu ban (pita) baik pada sampel ulangan 1 maupun ulangan 2. Sementara hasil purifikasi dengan Gel Sephadex G-25 (Gambar tidak diperlihatkan) masih menunjukkan adanya beberapa ban pada setiap kolom SDS-PAGE yang diduga fraksi protein bukan enzim. Hasil perhitungan berdasarkan SDS-PAGE (Gambar 2) menunjukkan bahwa berat molekul (BM) enzim protease getah tanaman biduri adalah sekitar 25.18 kD. Nilai ini hampir sama dengan BM ficin (25 kD) sedikit lebih tinggi dari pada BM papain (23 kD), tetapi lebih rendah dari BM pepsin (35 kD) (<http://www.piercenet.com/>). Hal ini menunjukkan bahwa protease yang bersumber dari tanaman memiliki berat molekul yang relatif sama. Profil elusi dari kolom kromatografi dengan gel sephadex G-25 dan CM Sephadex C-50 Cation Exchanger menggunakan gradien NaCl pada konsentrasi antara 0 sampai dengan 1 M tertera pada Gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan bahwa produk protease tersebar hampir merata pada semua fraksi (terutama

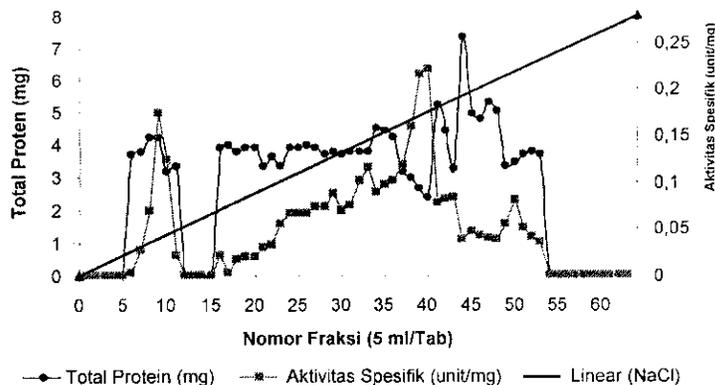
pada fraksi ke 5-10 dan 15-55). Tetapi fraksi aktif turun pada fraksi ke-9 dan paling besar turun pada tabung ke-40. Protein enzim diestimasi terelusi pada konsentrasi NaCl 0.55-0.65 M dengan total aktivitas sebesar 0.0805 dan aktifitas spesifik meningkat menjadi 0.0594 unit/mg. Elusi di atas fraksi ke-55 menunjukkan penurunan bahkan hampir tidak terdeteksi adanya protein maupun aktifitas proteasenya.

Suhu optimum

Kurva pengaruh suhu terhadap aktifitas protease biduri ditunjukkan pada Gambar 4.

Suhu optimum aktifitas protease biduri berkisar pada 55 °C. Sampai batas tertentu, semakin tinggi suhu maka aktifitas enzim akan semakin meningkat sampai suhu 55°C, kemudian aktifitasnya akan turun. Hal ini karena enzim adalah protein, maka semakin tinggi suhu mengakibatkan proses kerusakan protein enzim juga semakin meningkat. Menurut Arteaga and Nakai (1990), pada suhu tinggi di atas suhu optimal akan terjadi kerusakan protein enzim yang disebut denaturasi, sehingga terjadi penurunan aktivitas.

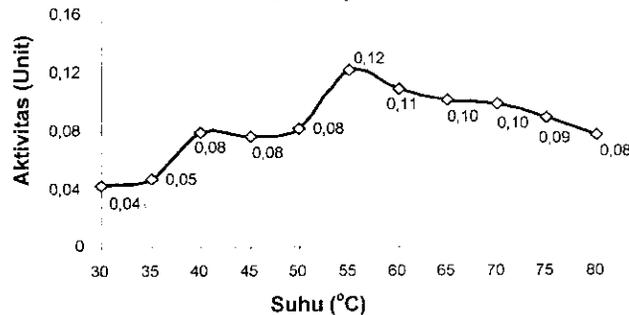
Profil Elusi Protease Biduri Hasil Purifikasi dengan Penukar Ion Positif CM Sephadex C-50



1 unit = 1µmol tirosin yang dibebaskan dari substrat soluble casein setiap menit

Gambar 3. Profil elusi dari fraksi protease melalui kolom kromatografi dengan Gel Sephadex G-25 yang dilanjutkan dengan CM Sephadex C-50.

Kurva Suhu Optimum



Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktifitas protease biduri

Enzim protease dari jaringan tanaman mempunyai suhu optimal yang berbeda-beda untuk aktivitasnya. Suhu optimal protease dari getah biduri adalah 55°C, sedangkan enzim protease yang diekstrak dari daun *Cnidoscylus chayamansa* adalah 40°C (Chinas and Canales, 1986) dan enzim protease biji padi adalah 50°C (Asakura et al., 1997). Suhu optimal protease dari papain, fisin maupun pepsin jauh lebih rendah yakni antara 20-37°C (<http://www.piercenet.com/>). Protease getah biduri dapat digunakan ke dalam aplikasi proses pangan yang menggunakan panas pada suhu 55°C.

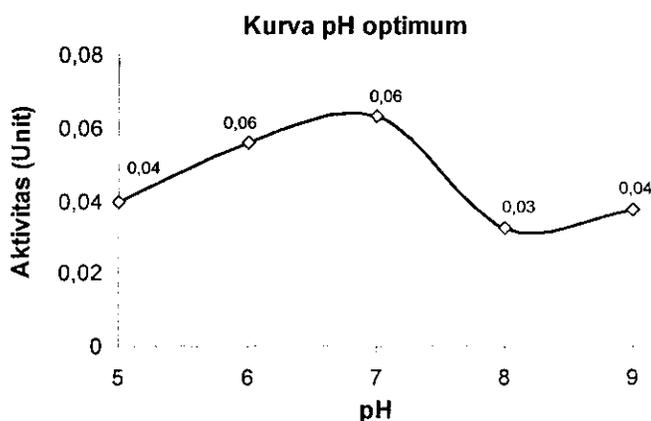
pH Optimum

pH sangat berpengaruh terhadap aktifitas protease biduri (Gambar 5). pH optimum aktifitas protease biduri berkisar 7. Semakin jauh dari pH optimal enzim semakin tidak stabil sehingga aktivitasnya semakin rendah. Hal ini karena enzim merupakan protein yang tersusun atas asam amino, pengaruh pH berhubungan dengan sifat asam basa yang dimiliki oleh protein. pH ekstrim dapat menyebabkan denaturasi protein enzim yang mengubah susunan ruang tiga dimensi molekul protein enzim. Menurut Naz (2002), perubahan keaktifan enzim akibat perubahan lingkungan menyebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim. Wong (1995) menambahkan, pH ekstrim berpengaruh terhadap struktur enzim dan muatan substrat. Kelebihan atau kekurangan ion H⁺ menyebabkan perubahan konformasi sisi aktif enzim, sehingga substrat tidak lagi berikatan dengan enzim, selanjutnya berakibat pula pada

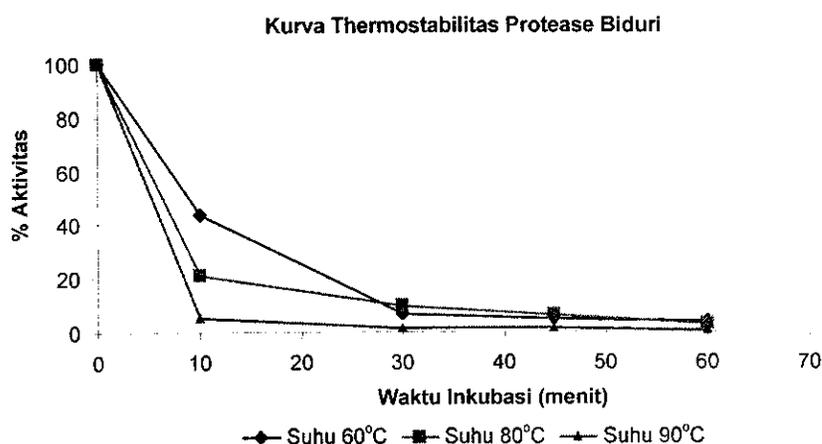
pembentukan produk. Tetapi pada Gambar 5 juga terlihat adanya peningkatan aktifitas protease biduri di atas pH 8. Hal ini menunjukkan bahwa protease biduri juga relatif stabil pada kondisi alkali. Diduga terkait dengan sifat natif dari protease tanaman biduri yang habitatnya pada daerah pantai.

Termostabilitas

Kurva stabilitas protease biduri terhadap panas ditunjukkan pada Gambar 6. Termostabilitas enzim berhubungan dengan daya tahan enzim terhadap panas atau suhu tinggi. Daya tahan terhadap panas ini digunakan sebagai acuan dalam inaktivasi enzim ketika digunakan untuk aplikasi produk pangan. Variasi suhu yang dilakukan pada penentuan daya tahan enzim protease biduri adalah suhu 60°C, 80°C, dan 90°C. Gambar 6 menunjukkan bahwa aktifitas enzim protease biduri akan semakin menurun seiring dengan lamanya inkubasi dan peningkatan suhu perlakuan. Pada suhu 60°C, masih terdapat aktifitas enzim hingga 10 menit pemanasan, bahkan melebihi waktu tersebut tampak aktifitas enzim yang cukup signifikan. Namun pada suhu 90°C terjadi penurunan aktifitas enzim yang cukup tajam jika dibandingkan dengan suhu sebelumnya, bahkan pada saat 10 menit pemanasan aktifitas enzim mendekati 0. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi inaktivasi enzim pada suhu 90°C.



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktifitas protease biduri



Gambar 6. Thermostabilitas protease biduri

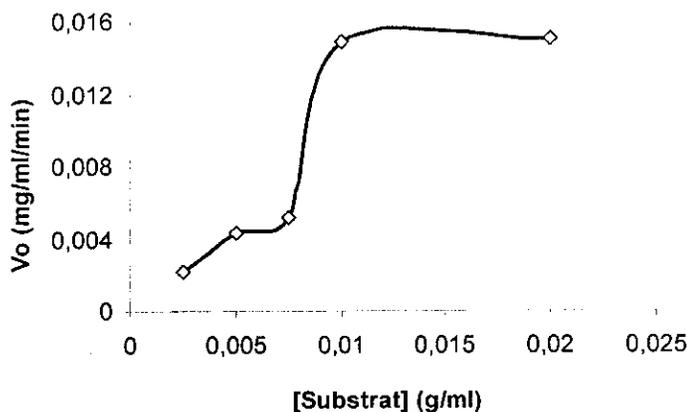
Protein enzim terdenaturasi dengan cepat pada suhu 90°C, sehingga aktifitas enzim tidak dapat dipertahankan. Akibatnya terjadi penurunan aktifitas enzim secara drastis jika dibandingkan dengan suhu 60°C dan 80°C. Apabila dilihat dari keadaan di atas, maka enzim protease biduri memiliki daya tahan yang cukup tinggi terhadap panas. Ini ditunjukkan ketika enzim dipanaskan pada suhu 60°C terdapat aktifitas enzim yang cukup signifikan. Menurut Naz (2002) thermostabilitas enzim protease umumnya berkisar pada suhu 50-60°C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu tersebut.

Daya tahan terhadap suhu tinggi yang dimiliki oleh protease biduri ini dapat mempermudah proses selanjutnya, terutama ketika enzim biduri diaplikasikan dalam industri pangan. Apabila dalam industri diharapkan proses pengolahan yang relatif cepat, maka inaktivasi enzim dapat dilakukan pada suhu tinggi (90°C). Namun, apabila diharapkan untuk proses pengolahan yang berjalan lambat, maka inaktivasi enzim dilakukan pada suhu yang lebih rendah (60 – 80 °C).

K_m dan V_{max} protease biduri

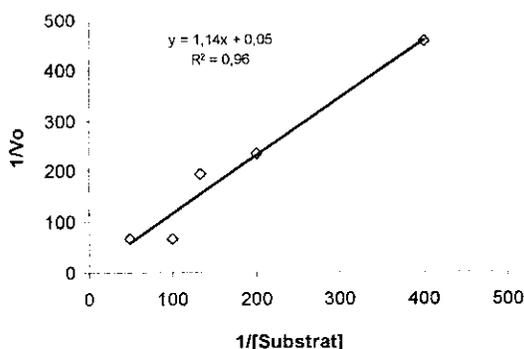
Penentuan laju reaksi enzim protease biduri, diawali dengan menghitung nilai Vo atau kecepatan awal enzim dalam memecah substrat. Vo dihitung dengan cara memplotkan kadar protein produk (P) terhadap waktu inkubasi dalam bentuk kurva, dengan absis adalah variasi waktu dan ordinat adalah mg protein. Nilai Vo ini ditentukan berdasarkan besarnya masing-masing substrat kasein yang digunakan. Kemudian ditentukan besar slope pada kurva tersebut, nilai slope yang dihasilkan merupakan nilai V awal enzim. Dari V awal berbagai konsentrasi substrat tersebut, hasil yang didapatkan kemudian diplotkan dalam bentuk kurva Michaelis-Menten. Setelah didapatkan kurva Michaelis-Menten, hasil yang didapatkan kemudian diplotkan dalam bentuk kurva Lineweaver-Burk untuk memperoleh nilai K_m dan V_{max}.

Pengaruh dari variasi substrat kasein terhadap kecepatan awal reaksi enzimatik protease biduri yang diukur dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Pengaruh konsentrasi substrat kasein terhadap kecepatan awal hidrolisis enzimatik protease biduri

Gambar 7 diketahui bahwa semakin tinggi substrat kasein maka semakin tinggi pula kecepatan reaksi enzim hingga mencapai kecepatan yang konstan. Untuk memperjelas hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan hidrolisis, maka dengan menggunakan metode Lineweaver-Burk, V_{max} dan K_m enzim dihitung (Whittaker, 1994). Data kecepatan awal dan konsentrasi substrat yang telah diplotkan dalam bentuk kurva Lineweaver-Burk dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Ploting data konsentrasi substrat dan kecepatan awal reaksi dengan menggunakan metode Lineweaver-Burk

Berdasarkan Gambar 8 tersebut dapat dihitung V_{max} dan K_m sebagai berikut:

$$\text{Intercept} = \frac{1}{V_{max}} \qquad \text{Slope} = \frac{K_m}{V_{max}}$$

$$y = 1.1462x + 0.053 \qquad V_{max} = 1/\text{intercept}$$

$$\text{Intercept} = 0.053 \qquad 1/0.053 = 18.8679 \text{ mg/ml/min}$$

$$\text{Slope} = 1.1462 \qquad K_m = \text{Slope} \times V_{max}$$

$$\qquad \qquad \qquad = 1.1462 \times 18.8679$$

$$\qquad \qquad \qquad = 21.6264$$

Dari perhitungan tersebut dapat diketahui bahwa nilai V_{max} yang diperoleh sebesar 18.87 mg/ml/min, sedangkan K_m sebesar 21.63 g/ml. Dengan diketahuinya nilai K_m dan V_{max} , maka dapat diketahui perbandingan substrat : enzim untuk mendapatkan kecepatan reaksi awal sebesar $V_{max}/2$ dengan cara sebagai berikut:

Jumlah enzim yang digunakan untuk reaksi enzimatik :

$$= \frac{\text{Jumlah enzim awal (gr)}}{\text{ml pengenceran}} \times \text{ml enzim yang diambil untuk hidrolisis substrat}$$

$$= \frac{0.07 \text{ gr}}{1 \text{ ml}} \times 0.0175 \text{ gr}$$

Jumlah perbandingan Enzim : Substrat untuk memperoleh kecepatan reaksi awal sebesar $V_{max}/2$ adalah sebesar :

$$= K_m : \text{gram enzim}$$

$$= K_m : 0.0175 = 21.62642 : 0.0175 = 1236 : 1$$

Dari hasil perhitungan di atas, maka diketahui bahwa untuk memperoleh kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ atau 9.434 mg/ml/min dapat digunakan enzim sebanyak 1 gram dan substrat sebesar 1235.795 gram untuk melakukan reaksi enzimatik. Estimasi kemampuan hidrolisis per gram protease biduri dalam menghidrolisa berbagai bahan berbasis protein untuk mendapatkan kecepatan reaksi $1/2 V_{max}$ -nya tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Estimasi kemampuan per gram protease biduri dalam menghidrolisa berbagai bahan berprotein (dengan asumsi kadar protein casein sebesar 90%)

| Bahan berprotein | Kadar Protein (%) | Kapasitas per gram protease |
|------------------|-------------------|-----------------------------|
| Kedelai | 34.1 | 3261 g (3.3 kg) |
| Daging ayam | 23.4 | 4762 g (4.8 kg) |
| Daging ikan | 18.3 | 6081 g (6.1 kg) |
| Daging sapi | 16.5 | 6742 g (6.7 kg) |
| Telur | 12.9 | 8474 g (8.5 kg) |
| Susu | 3.6 | 31035 g (31 kg) |

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil purifikasi dengan kolom gel sephadex G-25 dilanjutkan dengan CM Sephadex C-50 Cation Exchanger menunjukkan peningkatan aktifitas spesifik protease biduri yang sangat tinggi yakni sebesar 291,5% (hampir 3 kali lipatnya). Pembuktian melalui uji elektroforesis (SDS-PAGE) menunjukkan ban tunggal dengan berat molekul (BM) sekitar 25.18 kD. Protease dari getah biduri mempunyai pH optimum sekitar 7; suhu optimum sekitar 55°C dan termostabilitasnya pada suhu 90°C menurun sangat drastis selama 10 sampai 30 menit pemanasan. Protease getah biduri pada substrat kasein memiliki $V_{max} = 18,87 \text{ mg/ml/min}$ dan K_m sebesar 21,63 g/ml, sehingga jumlah perbandingan enzim : substrat untuk mendapatkan kecepatan awal sebesar $V_{max}/2$ adalah sebesar = 1 : 1236. Selanjutnya perlu ditentukan spesifitas protease biduri dalam memecah substrat

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.

Arteaga, G.E. and Nakai, S., 1990, Tetrathionate Protects Proteolytic Activity of Simulated Papaya

- Latex and Crude Papain. *J. Food Sci.*, 55 (6): 1728-1734.
- Asakura, T., Watanabe, H., Abe, H. and Arai, S., 1997**, Oryzasin as an Aspartic Proteinase Occuring in Rice Seeds: Purification, Characterization and Application to Milk Clotting. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4): 1070-1075.
- Bejosano, F.P. and Corke, H., 1999**, Properties of Protein Concentrates and Hydrolysates from *Amaranthus* and Buckwheat. *Ind. Crops & Products*, 10: 175-183.
- Chinas, F.A.I. and Canales, A.L.M., 1986**, Proteolytic Enzyme from *Cnidioscolus chayamansa* "Chaya". *J. Food Sci.*, 61 (1): 142-144.
- Choi, Y.J., Cho, Y.J. and Lanier, T.C., 1999**, Purification and Characterization of Proteinase from Atlantic Menhaden Muscle. *J. Food. Sci.*, 64 (5): 772-775.
- Eskin, N.A.M., 1990**, *Biochemistry of Food*. Second Edition. Academic Press. Inc. New York.
- http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=020407&WT.srch=1&WT.mc_id=go_Proteases_Proteases_brj&qclid=COmnsuv3oYYCFR_ISQodv0wt1w: Karakteristik Papain, Bromelin dan Ficin.
- Nafaji, M.F., Deobagkar, D. and Deobagkar, D., 2005**, Potential Application of Protease Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100, *Electronic J. of Biotech.*, 8 (2): 193-203.
- Naz, S., 2002**, *Enzymes and Food*, Oxford University Press, Pakistan.
- Noda, K., Koyanagi, M. and Kamiya, C., 1994**, Purification and Characterization of an Endoprotease from Melon Fruit. *J. Food Sci.*, 59 (3): 585-587.
- Ray, J. 1989**, *Plant Systematics*. Mc Graw Hill Publisher. Toronto. New York.
- 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.
- Stenis, T., 1992**, *Flora*. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Stoknes, I. and Rustad, T., 1995**, Proteolytic Activity in Mucle from Atlantic Salmon (*Salmo Solar*), *J. Food Sci.*, 60 (4): 711-714.
- Walker, J.M., 1994**, *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Whitaker, J.R., 1994**, *Principle of Enzymology for The Food Science*. Second Edition. Marcel Decker. New York.
- Witono, Y., 2002a**, Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri. *J. Teknologi Hasil Pertanian* 1(1): 1- 14.
- Witono, Y., 2002b**, Pemanfaatan Enzim Protease dari Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan. *J. Sains dan Teknologi*, 1(1): 32 - 37.
- Witono, Y., Subagio, A. dan Windrati, W.S., 2002**, Sifat-sifat Daging Olah Pasca Inkubasi dengan Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantean*), *Prosiding Seminar Nasional PATPI*, Malang.
- Witono, Y., Windrati, W.S. dan Subagio, A., 2003**, Studi Pembuatan Keju dengan Memanfaatkan Aktivitas Proteolitik dari Ekstrak Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), *Prosiding Seminar Nasional PATPI*, Yogyakarta.
- Wong, D.W.S., 1995**, *Food Enzymes: Structure and Mechanism*. Chapman & Hall. New York.