

EKSPLORASI BUAH MENKGUDU (*Morinda citrifolia L.*) UNTUK PRODUKSI ENZIM PROTEASE DAN POTENSINYA SEBAGAI BAHAN PENGGANTI RENNET PADA INDUSTRI KEJU

Exploration of Fruit Noni (*Morinda citrifolia L.*) for The Production of The Enzyme Protease and its Potential as Substitute for Rennet In Cheese Industry

Muhamad Tommy Adrian^{1*}, Azmy Nahdhiyati Fathimah^{1*}, Faula Libna Nabela^{1*}, Agustin Krisna Wardani¹

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, email: mhd Tommyadrian@yahoo.co.id

ABSTRAK

Keju merupakan produk susu yang bergizi tinggi karena kandungan proteinnya yang cukup tinggi. Pada umumnya keju dibuat dari susu sapi dengan proses penggumpalan menggunakan enzim rennet yang diperoleh dari lambung anak sapi yang harganya semakin hari semakin mahal karena sulit didapat. Penelitian ini dimaksudkan untuk dapat memanfaatkan enzim protease dari buah mengkudu sebagai pengganti enzim rennet pada proses pembuatan keju.

Proses pembuatannya dengan menggunakan cara ekstraksi mengkudu yang dihomogenisasi menggunakan blender dan ditambah stabilisator dengan Sembilan perlakuan. Perlakuan penambahan stabilisator terbaik didapatkan pada penambahan asam askorbat 0.30% dan EDTA 15 mM dengan aktivitas spesifik 1.67 U/mg. Enzim protease tersebut lalu dilakukan pemurnian sederhana dan karakterisasi. Tahapan kedua yaitu pembuatan keju dengan tiga perlakuan penambahan protease (0.02%, 0.04% dan 0.06%).

Karakteristik keju yang mendekati keju menggunakan rennet yaitu dengan penambahan protease mengkudu dengan konsentrasi 0.06%. Hasil yang didapatkan yaitu kadar air 51.77%; kadar protein 29.30 mg; kadar lemak 17.98% dan rendemen 10.86. Penelitian dilakukan di laboratorium menggunakan gelas beker sebagai tempat penggumpal susu dengan penambahan enzim protease dari buah mengkudu pada suhu serta konsentrasi enzim protease yang divariasikan sehingga diperoleh hasil yang terbaik.

Kata kunci: Buah Mengkudu, Enzim Protease, Keju, Rennet

ABSTRACT

Cheese is dairy products being nourishing high because the content of the proteins which is quite high. In general cheese are made from milk a cow with the process of coagulation using an enzyme rennet obtained from the stomach of a calf in which the price is getting expensive because it is difficult yet available. This research intended to take advantage of the fruit of an enzyme protease fruit noni as a substitute for an enzyme rennet to the process of making cheese.

Making process by using the way the extraction of fruit noni who been homogenized using a blender plus a stabilizer with nine treatment. Treatment the addition of a stabilizer best obtained on the addition of ascorbic acid 0.30 % and edta 15 mM with the activity specif 1.67U/mg. An enzyme of proteases ago was done the purification of the simple and characterization. The second stage of three treatment that is making cheese with the addition of protease (0.02 %, 0.04 % and 0.06 %).

Characteristic of cheese approximating cheese using rennet namely by the addition of protease fruit noni by concentration of the 0.06 %. The result obtained namely the water level 51.77 %; levels of a protein 29.30 mg; levels of fat 17.98 % and rendemen

10.86. Research is done in laboratories using glass beker as a place of coagulant milk by the addition of an enzyme protease from the fruit noni at a temperature and the concentration of an enzyme of proteases that varied in order to obtain the result of the best.

Keywords: Cheese, Enzyme Protease, Fruit Noni, Rennet

PENDAHULUAN

Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) termasuk tumbuhan keluarga kopi-kopian (*Rubiaceae*) yang berasal dari wilayah daratan Asia Tenggara dan kemudian menyebar hingga ke Indonesia. Mengkudu banyak terdapat di Indonesia dan dikenal dengan berbagai nama yaitu mengkudu, pace, kemudu, kudu (Jawa), cangkudu (Sunda), kodhuk (Madura), dan wengkudu (Bali). Produksi mengkudu di Indonesia meningkat setiap tahunnya. Berdasarkan data yang diperoleh menunjukkan bahwa produksi mengkudu pada tahun 2003 sebesar 1910 ton meningkat menjadi 14016 pada tahun 2007 [1]. Pemanfaatan mengkudu secara tradisional banyak dimanfaatkan oleh masyarakat diantaranya sebagai obat luka, sariawan, sakit gigi, rematik, sakit perut dan hipertensi. Pemanfaatan buah mengkudu ini masih sebatas pemanfaatannya sebagai obat saja. Manfaat mengkudu sejauh ini belum dikaitkan dengan kandungan enzim yang dikandungnya. Padahal, penggunaan mengkudu sebagai obat luka kemungkinan disebabkan oleh adanya aktivitas protease di dalamnya. Penggunaan buah dan daun mengkudu sebagai obat luka dan pengempuk daging diduga berkaitan dengan aktivitas protease.

Bahwa perdagangan protease mencapai 60% dari total penjualan enzim dunia yang mencapai hingga dua miliar USS dan berdasarkan data yang diperoleh [2]. Impor enzim Indonesia juga meningkat dari 124.1 juta USS pada tahun 2000 menjadi 127,4 juta USS pada tahun 2001 [3]. Freedonia Group Inc, juga memprediksi pasar enzim di dunia akan meningkat, yaitu pada tahun 2013 sekitar 7 milyar USS dengan peningkatan permintaan 6,30% per tahun [4]. Keju merupakan produk pangan olahan dari susu yang bernilai gizi tinggi karena kandungan proteinnya. Keju banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia, dilihat dari semakin banyaknya industri roti dan kue yang menambahkan keju sebagai salah satu bahan campurannya serta semakin banyaknya merk dan jenis keju yang beredar di pasaran. Semakin meningkatnya jumlah konsumen keju, maka pengembangan industri keju memiliki prospek yang cukup cerah. Hal ini penting dijajaki karena dapat mengurangi jumlah impor keju di Indonesia [5]. Pada umumnya, keju dibuat dari susu sapi yang diendapkan menggunakan koagulan berupa enzim rennet yang didapat dari lambung anak sapi. Menurunnya jumlah produksi enzim rennet dari lambung anak sapi mengakibatkan harga enzim tersebut mahal. Minimnya ketersediaan dan mahal nya harga enzim rennet tersebut merupakan kendala utama yang 2 dihadapi dalam pembuatan keju. Oleh karena itu, beberapa peneliti mulai berusaha menemukan enzim-enzim penggumpal susu yang sering disebut *microbial rennet* dan *vegetable rennet* [6]. Salah satu alternatif yang dapat dijajaki adalah penggunaan enzim protease dari buah mengkudu sebagai koagulan keju.

Penggunaan enzim protease dari buah mengkudu merupakan hal yang menguntungkan. Bagi industri keju, hal ini dapat mengurangi ketergantungan akan rennet dari lambung anak sapi sebagai koagulan keju. Alternatif penggunaan enzim protease dari mengkudu ini juga dapat meningkatkan nilai ekonomis dan pemanfaatan dari mengkudu tersebut yang selama ini hanya dianggap sebagai tanaman obat saja. Tingginya potensi perdagangan enzim protease di atas yang melatar belakangi dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan sifat fisik kimia dan organoleptik keju yang dibuat menggunakan koagulan berupa enzim protease buah mengkudu dengan keju cheddar yang dibuat menggunakan koagulan rennet anak sapi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan baku utama yang digunakan adalah mengkudu yang didapatkan dari desa sekitar, kota Malang. Susu segar dari daerah di Pujon, Malang. K_2HPO_4 , EDTA, asam askorbat, akuades, BaCl, amonium sulfat, HCL didapatkan dari toko bahan kimia Makmur Sejati, Malang. Kantong selofan didapatkan dari laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. K_2HPO_4 , Na_2CO_3 , buffer asetat, Tris, SDS, HCL, NaOH, bis-akrilamid, akrilamid, *bromofenol blue*, *2-mercaptoetanol*, *Coomasie brilliant blue*, etanol 95 %, akuades, reagen folin-ciaceulteu, Na-K-Tartarat, dan $CuSO_4$ yang didapatkan dari toko bahan kimia Makmur Sejati, Malang. Asam Trikloroasetat (TCA) dan kasein yang didapatkan dari toko bahan kimia Krida Tama Persada, Malang. Tirosin didapatkan dari laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang. *Bovine Serum Albumine* (BSA) didapatkan dari laboratorium mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Al-Maliki, Malang.

Alat

Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi enzim protease dari mengkudu dan susu ini antara lain timbangan digital (*Adventure Pro AV412/*), blender (*Signora*), gelas ukur (*Pyrex*), sentrifuse dingin (*Thermo Scientifis/ SL40*), pengaduk besi, kain saring, wadah plastik. Alat-alat yang digunakan untuk purifikasi dan karakterisasi enzim protease dari mengkudu antara lain timbangan analitik (*Pioneer*), *magnetic stirrer* (*Big Squid*), pH meter (*Cyberscan 510*), *beaker glass* (*Pyrex*), sentrifuse dingin (*Thermo Scientifis/ SL40*), inkubator (*Barnstead/101*), gelas ukur, baskom plastik, dan tabung reaksi.

Sedangkan peralatan yang digunakan untuk analisis antara lain timbangan analitik (*Pioneer*), glass ware (*Iwaki Pyrex*), inkubator (*Barnstead/101*), tabung Eppendorf, sentrifuse dingin (*Thermo Scientifis/ SL40*), seperangkat alat titrasi, desikator, stop watch, pH meter (*Cyberscan 510*), oven listrik (*Memmert*), spektrofotometer (*Jenwey*), elektroforesis, mikropipet (*Socorex*), blue tip, yellow tip, white tip, vortex (*VM-2000*), *magnetic stirrer* (*Big Squid*), bola hisap, hot plate, dan refrigerator.

Desain Penelitian

Analisis data hasil isolasi dan karakterisasi serta hasil pemurnian enzim berupa pembahasan secara deskriptif dan eksploratif dengan membandingkan berdasarkan literatur yang mendukung.

Tahapan Penelitian

Proses ekstraksi ekstrak kasar enzim protease dari mengkudu ini yaitu, mengkudu dipisahkan dengan tangkainya dan dicuci. Mengkudu ditimbang 100 gram dan dihomogenisasi menggunakan blender yang ditambah dengan 200 ml buffer kalium fosfat 100 mM pH 7 yang mengandung stabilisator (asam askorbat dan EDTA), dan didapatkan homogenat. Homogenat disaring melalui sepotong kain saring tipis dan didapatkan filtrat. Filtrat kemudian disentrifuse pada 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Kemudian diambil supernatannya dan diukur aktivitas proteolitiknya. Sebelum dilakukan proses karakterisasi perlu dilakukan pemurnian parsial enzim dengan tujuan memisahkan enzim dari komponen pengotor lain. Dilakukan penambahan 60% ammonium sulfat ke dalam 500 ml ekstrak kasar protease.

Penambahan tersebut disertai dengan pengadukan pada suhu rendah (4°C) agar enzim terhindar dari kerusakan. Suhu campuran dipertahankan 4°C dengan menambahkan es di sekeliling wadah. Campuran tersebut didiamkan semalam dalam lemari pendingin agar pengendapan protein enzim lebih maksimal. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatannya dibuang dan endapan merupakan enzim setengah murni. Penambahan 16 ml buffer fosfat 0.05 M pH 7 dilakukan agar enzim tetap stabil dan terhindar dari kerusakan. Fraksi endapan yang diperoleh disuspensikan dengan larutan buffer fosfat 0.05 M pH 7 sampai mencapai volume 16 ml, kemudian dimasukkan dalam kantong selofan.

Selanjutnya suspensi yang ada di dalam kantong selofan direndam dalam 400ml larutan buffer fosfat 0.025 M pH 7 dalam *beaker glass* 500 ml sambil menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C. Dialisis dilakukan selama semalam. Setelah 6 jam pertama larutan buffer perendam diganti dengan larutan buffer fosfat 0.025 M pH 7. Dialisis dilakukan sampai semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan cara diambil 5 ml buffer perendam dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1 ml larutan HCl 0.10 M dan ditambah 3 tetes larutan BaCl₂ 0.10 M. Apabila masih terbentuk endapan, dialisis dibiarkan berjalan semalam. Apabila tidak terbentuk endapan dialisis dihentikan. Enzim hasil dialisis diuji aktivitas, kadar protein, aktivitas spesifik dan karakter berat molekul. Pengujian bubuk kering enzim protease pada keju. Pengujian ini menggunakan 300 ml susu segar dalam gelas beker yang dipanaskan di atas kompor listrik, kemudian setelah suhu larutan mencapai suhu tertentu ditambahkan bubuk kering enzim protease dari buah mengkudu yang telah diekstrak dengan perlakuan masing-masing seperti di atas. Pemanasan dilanjutkan sampai suhu 100°C, larutan diaduk-aduk hingga terbentuk gumpalan. Pemanasan dan pengadukan dilakukan hingga terbentuk endapan sempurna, kemudian dipisahkan.

Uji organoleptik dilakukan terhadap sampel berdasarkan metode hedonik yaitu membandingkan tingkat kesukaan panelis terhadap setiap perlakuan. Uji organoleptik dilakukan terhadap aroma dan rasa dari keju. Penilaian uji organoleptik dinyatakan dengan angka, mulai dari angka 1 (sangat tidak menyukai), 2 (tidak menyukai), 3 (agak tidak menyukai), 4 (agak menyukai), 5 (menyukai), 6 (sangat menyukai).

Metode

Pengamatan dan analisis data dilakukan pada ekstrak enzim protease yang meliputi analisis aktivitas enzim dan kadar protein, sedangkan untuk keju cottage dilakukan analisis organoleptik meliputi bau, rasa, warna, dan tekstur. Data hasil uji organoleptik dianalisis menggunakan uji *Hedonic Scale Scoring*.

Prosedur Analisis

1. Analisis aktivitas proteolitik

Penentuan λ maksimum dan kurva standar tirosin. Menimbang 0.01 gram tirosin dan dilarutkan dalam aquades dalam beaker glass, lalu dipindahkan ke labu ukur 100 ml dan diencerkan sampai tanda batas. Larutan stok tirosin 100 mg/L dipipet berturut-turut 1,3,5,7 dan 9 ml, masing-masing diencerkan sampai 10 ml, sehingga menghasilkan konsentrasi 10,30,50,70,90 mg/L. Salah satu konsentrasi diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 270-280. Absorbansi tertinggi merupakan λ maksimum tirosin. Semua konsentrasi diukur absorbansinya pada λ maksimum yang diperoleh dari langkah 3. Dibuat kurva standar tirosin. Dicampur 2 ml larutan kasein 0.50 % dengan 0.50 ml larutan buffer fosfat pH 7 dan 1 ml enzim papain (1000 ppm) lalu didiamkan selama 10 menit suhu 37°C. Dihentikan reaksinya dengan menambahkan 2.50 ml TCA 5% lalu diinkubasi 30 menit pada suhu ruang. Larutan disentrifugasi 4000 rpm 20 menit. Diambil 1 ml filtrate dan diencerkan sampai 5 ml. Hasil pengenceran diukur absorbansinya dengan UV pada λ maksimum. Hasil absorbansi dikonversikan menjadi tirosin. Perhitungan aktivitas enzim :

$$\text{Unit Aktivitas enzim} = \frac{[\text{tirosin}]}{BM} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

v = volume total sampel percobaan tiap tabung reaksi (ml)

p = jumlah enzim (ml)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

2. Analisis Kadar Protein

Penetapan Serapan Maksimum Larutan Bovin Serum Albumin (BSA) Kedalam tabung reaksi dipipet sebanyak 2 mL larutan BSA 100 ppm. Ditambahkan 5 mL pereaksi C, segera dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0.50 mL pereaksi Folin Ciocalteau, vortex dan biarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya serapan dibaca pada panjang gelombang 600-800 nm, hingga diperoleh serapan maksimum. Penetapan Kurva Kalibrasi Larutan Bovin Serum Albumin (BSA) Kedalam 6 tabung reaksi dipipet larutan standar BSA 100 ppm, masing-masing 0.50 mL tabung A; 1 mL tabung B; 1.50 mL tabung C; 2 mL tabung D; 2.50 mL tabung E dan 3.00 mL tabung F. Kemudian ditambahkan masing-masing 5 mL pereaksi C, divortex lalu dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian larutan ditambahkan 0.50 mL pereaksi Folin Ciocalteau, divortex dan dibiarkan dalam suhu kamar hingga 30 menit. Selanjutnya dibaca absorbansi larutan tiap tabung reaksi pada panjang gelombang maksimum. Hal yang sama dilakukan pada blanko, blanko larutan BSA diganti dengan akuades (Silaban, 1999). Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry Sebanyak 2 mL supernatan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 5 mL reagen C, divortex dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Lalu ditambahkan 0.50 mL pereaksi Folin Ciocalteau, divortex dan dibiarkan dalam suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Dengan cara yang sama dilakukan pada blanko, blanko sampel diganti dengan akuades.

3. Uji organoleptik *hedonic scale*

Uji organoleptik yang dilakukan meliputi warna, aroma, tekstur, rasa, dan Daftar pertanyaan diajukan menurut cara *hedonic scale scoring*. Hasil dinyatakan dalam 7 pernyataan yaitu : angka 7 (sangat menyukai), 6 (menyukai), 5 (agak menyukai), 4 (netral / biasa), 3 (agak tidak menyukai), 2 (tidak menyukai) dan 1 (sangat tidak menyukai). Pernyataan nomor 4 tidak boleh dipilih karena definisi tidak jelas. Pengujian dilakukan dengan memberikan secara acak 6 sampel yang masing – masing telah diberi kode berbeda kepada 20 panelis. Panelis terdiri dari 5 orang ahli, 10 orang terbiasa mengkonsumsi keju dan sisanya biasa atau tidak terlalu sering mengkonsumsi keju. Selanjutnya panelis diminta untuk memberikan penilaian pada sampel sesuai perlakuan sesuai dengan skala hedonik yang disediakan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Ekstraksi Enzim Protease

Penelitian ini dimulai dari pengekstrasian enzim protease dari mengkudu. Sampel berupa mengkudu didapatkan dari sekitar kota Malang. Ekstraksi enzim protease dilakukan dengan mengekstrak filtrat dari mengkudu dan diukur aktivitas proteolitiknya, selain itu juga didalam prosesnya ditambahkan berbagai jenis dan konsentrasi stabilisator serta kombinasi dua jenis stabilisator yang berbeda. Penambahan ini berfungsi sebagai menjaga kestabilan enzim dan berperan sebagai pengatur aktivitas enzim. Ekstrak yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim dengan cara sebanyak 1 ml sampel dimasukkan tabung eppendorf kemudian ditambahkan 2 ml kasein dan 0.50 ml buffer. Didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit, diinkubasi pada suhu 37°C, selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan larutan TCA 2.50 ml. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 20 menit. Sampel yang telah disentrifugasi diambil 1 ml kemudian diencerkan sampai 5 ml untuk mendapatkan rata-rata aktivitas spesifik diukur dengan absorbansi 275 nm. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan tabel 1 didapatkan hasil rerata aktivitas spesifik tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan penambahan asam askorbat 0.30% dan EDTA 15 mM (A3E3) yaitu sebesar 1.67 U/mg. Hal ini diakibatkan oleh adanya penggabungan stabilisator asam askorbat dan EDTA dengan konsentrasi tertinggi. Fungsi dari asam askorbat dan EDTA yaitu sebagai antioksidan yang mengurangi jumlah oksigen yang dapat menginaktivasi enzim protease. Oleh karena itu semakin tinggi konsentrasi stabilisator yang ditambahkan maka semakin tinggi pula aktifitas spesifik yang ditunjukkan. Hal ini sesuai dengan literatur yang

menyatakan bahwa asam askorbat merupakan senyawa yang efektif untuk menghambat aktivitas PPO (polyphenoloxidase) yang mengakibatkan reaksi pencoklatan. Asam askorbat akan mengurangi O-kuinon yang mengakibatkan pencoklatan enzimatis melalui proses reaksi deaktivasi. Selanjutnya, asam askorbat akan mengurangi jumlah oksigen, asam askorbat yang teroksidasi jadi dehydroaskorbat dan mencegah aktivitas PPO. Sedangkan EDTA dapat membantu dalam mengikat setiap ion logam yang dapat menyerang sisi aktif enzim dan dapat menginaktivasi enzim protease [7]

Tabel 1. Ekstraksi Enzim Protease Mengkudu

Perlakuan Sampel	Rata-rata Aktivitas Spesifik (U/mg)
Kontrol	1.02
A1	1.28
A2	1.30
A3	1.35
E1	1.08
E2	1.27
E3	1.40
A1E1	1.38
A2E2	1.44
A3E3	1.67

2. Nilai Aktivitas Enzim Dan Kadar Protein Enzim Protease Mengkudu

Hasil penelitian yang ditunjukkan pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa supernatan enzim kasar sebanyak 40 ml mempunyai total aktivitas spesifik sebesar 1.67 U/ml dengan total kadar proteinnya sebesar 23.37 mg. Pada enzim kasar masih banyak mengandung senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu aktivitas enzim. Tingginya kadar protein pada enzim kasar protease dapat disebabkan adanya komponen protein non enzim yang terukur.

Tabel 2. Nilai Aktivitas Enzim dan Kadar Protein Enzim Protease Mengkudu

Tahap	Vol. Enzim	Total Protein (mg)	Total Aktivitas Spesifik (U/ml)	Tingkat kemurnian
Supernatan (Enzim kasar)	40	23.37	1.67	1
Presipitasi (amonium.sulfat)	2.61	18.40	2.11	1.27
Dialisis	7.10	9.58	3.18	1.90

Hasil dari pemurnian dengan amonium sulfat hanya diperoleh 2.61 ml enzim dengan total kadar protein yang semakin menurun yaitu sebesar 18.40 mg. Aktivitas spesifik dari enzim setelah diendapkan dengan amonium sulfat juga mengalami peningkatan sebesar 2.11 U/ml. Presipitasi dengan amonium sulfat adalah suatu metode menggunakan penambahan amonium sulfat atau mengubah kondisi lingkungan sehingga menyebabkan protein meninggalkan larutan dan membentuk partikel tidak larut dalam bentuk endapan [6].

Aktivitas enzimnya terjadi peningkatan karena menurunnya jumlah kontaminan yang menghalangi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat. Penambahan amonium sulfat menyebabkan protein mengendap dan memisahkan protein dari kontaminan (molekul non protein) dengan bantuan sentrifugasi dingin, penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian [8]. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein. Protein-protein enzim akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap. Proses ini dilakukan pada temperatur rendah (4°C) sehingga protein akan mengendap tanpa

terdenaturasi.

Penurunan kadar protein setelah proses pengendapan dengan amonium sulfat dapat disebabkan protein dengan berat molekul besar (enzim misalnya) akan mengendap terlebih dahulu daripada protein dengan berat molekul kecil sehingga diduga protein non enzim dengan berat molekul kecil akan berada pada supernatan dan akarterbuang pada saat dilakukan sentrifugasi. Faktor kadar dan kualitas dari amonium sulfat juga menentukan banyaknya protein yang mengendap.

Tabel 2 juga menunjukkan bahwa pemurnian dengan menggunakan amonium sulfat mampu meningkatkan aktivitas spesifik enzim sebesar 1.27 kali yaitu dari 1.67 unit/mg menjadi 2.11 unit/mg. Beberapa penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa metode pemurnian dengan menggunakan amonium sulfat dapat meningkatkan aktifitas spesifik protease. Penelitian Yandri dkk (2007) melaporkan bahwa aktifitas spesifik enzim protease dan *Bacillus subtilis* ITBCCB148 hasil pemurnian dengan amonium sulfat terjadi peningkatan jika dibandingkan dengan aktifitas spesifik enzim kasar sebesar 5 kali dari 0.25 U/mg menjadi 1.25 U/mg. Keberhasilan suatu tahap pemurnian ditandai dengan semakin meningkatnya aktivitas spesifik enzim setelah mengalami pemurnian [9].

3. Pembuatan Keju Cottage Dengan Enzim Protease Dari Mengkudu

Setelah didapatkan enzim protease hasil dialisis, tahapan selanjutnya yaitu dilakukan proses pembuatan keju cottage dengan menggunakan enzim protease dari buah mengkudu dengan berbagai jenis variasi dan konsentrasi enzim protease. Pembuatan keju cottage dilakukan dengan penambahan enzim protease konsentrasi 0.02% (M1); 0.04% (M2); dan 0.06% (M3) serta kontrol positif menggunakan enzim rennet dengan konsentrasi 0.02% (v/v). Setelah dihasilkan keju cottage, selanjutnya dilakukan analisis kandungan gizi pada keju cottage dari enzim protease mengkudu. Berikut data analisis keju cottage dari enzim protease mengkudu yang terdapat pada Table 3.

Tabel 3. Hasil Analisis Kandungan Gizi Protease Mengkudu

Pelakuan	Rendemen (%)	Kadar Protein (mg)	Kadar Lemak (%)	Kadar Air (%)
Kontrol	9.46	14.48	16.70	51.86
M1	8.99	18.27	15.43	48.14
M2	9.93	20.70	16.17	50.26
M3	10.86	26.30	17.98	51.77

Berdasarkan tabel 3 didapatkan hasil analisis komponen gizi terbaik yaitu pada perlakuan M3 (konsentrasi 0.06%) pada parameter rendemen 10.86%, kadar protein 26.30% dan kadar lemak 17.98%, sedangkan untuk kadar air menunjukkan nilai tertinggi pada kontrol yaitu sebesar 51.86%. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim protease yang ditambahkan maka kandungan gizi yang dihasilkan semakin tinggi pula disemua parameter kecuali pada parameter kadar air.

Nilai rendemen tertinggi yaitu pada perlakuan penambahan konsentrasi enzim protease 0.06% (M3). Hal tersebut diduga karena kemampuan enzim protease dalam menggumpalkan *kappa-kasein* sehingga menghasilkan rendemen yang lebih tinggi, dimana semakin banyak konsentrasi enzim protease yang ditambahkan maka semakin optimal proses penggumpalan yang terjadi sehingga rendemennya semakin tinggi. Tingginya kadar protein hasil analisis diakibatkan oleh metode pengukuran kadar protein yang digunakan yaitu metode kjedahl, cara pengukurannya yaitu mengukur kadar nitrogen total, sehingga bukan hanya protein dalam keju yang terukur melainkan kandungan protein yang berasal dari enzim protease pun akan ikut terukur. Selain itu juga karena keju cottage yang merupakan hasil koagulasi protein dalam bentuk dadih sehingga sebagian besar komponen dalam keju adalah protein [10].

Kadar lemak menunjukkan hasil yang semakin tinggi, hal ini diduga diakibatkan oleh bahan baku pembuatan keju berupa susu sapi murni. Hal ini berbeda dengan literatur yang

menyatakan bahwa pengaruh penambahan enzim protease mengakibatkan semakin menurunnya kadar lemak, karena pada literature menggunakan keju cottage dengan bahan baku susu skim yang memiliki kadar lemak yang rendah. Susu skim memiliki kadar lemak yang rendah karena hasil proses pembuatannya yaitu pemisahan antara krim dan skim dalam susu dengan sentrifugasi [10]. Krim memiliki berat jenis yang rendah karena banyak mengandung lemak. Sedangkan susu skim mempunyai berat jenis yang lebih tinggi karena banyak mengandung protein. Sehingga dalam sentrifugasi akan berada dibagian dalam.

Kadar air dari semua perlakuan menunjukkan hasil yang sudah sesuai dengan SNI. Namun keju cottage dengan kadar air terendah ditunjukkan oleh keju cottage dengan penambahan enzim protease 0.02%. Bila dilihat dari kadar air dari beberapa produk keju lainnya dapat diperkirakan bahwa keju cottage dengan penambahan konsentrasi enzim protease 0.02% memiliki ketahanan dan keawetan yang lebih baik. Hal ini sesuai dengan pernyataan yang menyatakan bahwa kadar air yang terkandung akan mempengaruhi terhadap ketahanan suatu bahan atau produk makanan [10]. Semakin sedikit kadar air yang terdapat dalam suatu makanan maka semakin tahan dan awet produk tersebut karena salah satu faktor pertumbuhan mikroorganisme adalah air yang terkandung dalam makanan tersebut.

4. Uji Organoleptik

Setelah dilakukan analisis fisik dan kimia pada keju cottage, kemudian dilakukan analisis organoleptik keju cottage dari enzim protease mengkudu dengan menggunakan metode hedonic oleh 20 panelis tak terlatih. Hasil penilaian dari panelis dapat dilihat pada Table 4.

Tabel 4. Parameter Organoleptik

Parameter	Perlakuan			
	Kontrol	M1	M2	M3
Bau	6	5.40	5.60	5.85
Rasa	5.95	5.55	5.80	5.60
Warna	5.95	5.30	5.70	5.55
Tekstur	5.80	5.45	5.65	5.70
Total	23.7	21.70	22.75	22.70
Ranking		3	1	2

Berdasarkan tabel 4 menunjukkan tingkat kesukaan panelis tertinggi pada keju cottage dengan penambahan konsentrasi enzim protease 0.04% (M2). Hal ini diakibatkan oleh rasa serta tekstur keju yang enak dan juga memiliki warna serta bau yang tidak begitu amis jika dibandingkan dengan keju cottage pada perlakuan M1 dan M3.

SIMPULAN

Perlakuan terbaik dengan menggunakan stabilisator enzim adalah A3E3 yaitu penambahan asam askorbat 0.30% dan EDTA 15 mM yang menghasilkan enzim protease mengkudu dengan aktivitas spesifik tertinggi 1.67 U/ml. Dimana enzim protease tersebut dilakukan pemurnian parsial dengan tingkat pengendapan ammonium sulfat 60% dan dihasilkan tingkat kemurnian 1.90. Keju yang diproduksi dengan menggunakan enzim protease mengkudu 0.06% (M3) menunjukkan kualitas kimia yang menyerupai keju kontrol (enzim rennet).

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Tunick, M. H., E. L. Malin, P. W. Smith, J. J. Shieh, B. C. Sullivan, K. L. Mackey and V.H. Holsinger. 1993. Proteolysis and Rheology of Low Fat and Full Fat Mozzarella Cheeses Prepared from Homogenized Milk. *J. Dairy Sci.* 76:3621–3628
- 2) Sutrisno. 2006. Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Xilanase dari *Aspergillus niger*. BSS 265 (1): 1-6
- 3) Suhartono MT . 1992. Protease. Bogor. Debdikbud. Dikti. PAU. IPB
- 4) Trenggono dan Sutardi. 1990. Biokimia dan Teknik Pasca Panen. PAU UGM.Yogyakarta
- 5) Tranggono dan Sutardi, 1990. Biokimia, Teknologi Pasca Panen dan Gizi. PAU Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- 6) Wang, S.L., T.Y. Lin, Y. H. Yen, H. F. Liaoc, Y. J. Chen. 2006. Bioconversion of Shellfish Protein Wastes for The Production of *Bacillus subtilis* W-118 Protease. *Carbohydrate Research*
- 7) Bergmeyer,H.V, dan M. Grassl. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. Vol II. Verleg chemi. Weinhein.;
- 8) Davidson, V.L., and Sittman, D., B., 1999. Biochemistry 4th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Mississippi.
- 9) Rochima E. 2009. Pemurnian dan Karakterisasi Protein Deasitilase Termotabil dari *Bacillus papandayan* Asal Kawah Kamojang Jawa Barat. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran. Jatinangor, Bandung
- 10) Sukarno, K. Takahashi, M. Hatano, D. Sakurai. Proteinase from the Live of Neon Flying Squid : *Purification and Properties*. Bull. Fac. Hokkaido University; 1995