

EKSTRAKSI DAN PURIFIKASI PROTEASE SULFHIDRIL BATANG KAMBOJA (*Plumeria obtusa*) SEBAGAI RENNEN KEJU LUNAK

EXTRACTION AND PURIFICATION OF SULFHIDRIL PROTEASE FROM CAMBODIA STEM (*Plumeria obtusa*) AS A SOFT CHEESE RENNEN

Trias Ayu Laksanawati, Muhammad Habbib Khirzin, Kiky Mey Shinta

INFO ARTIKEL

Submit: 15-7-2022
Perbaikan: 7-10-2022
Diterima: 9-10-2022

Keywords:

Plumeria obtusa,
sulfhydryl protease,
enzyme extraction,
enzyme purification, soft
cheese curd

ABSTRACT

This study aims to determine the optimal pH and temperature values for the sulfhydryl protease enzyme from Cambodian stems *Plumeria obtusa*, obtain pure protease enzymes through the purification process and determine the yield of curd obtained from the use of sulfhydryl protease enzymes in the soft cheese-making process. The variables used are the independent variables pH (7, 7.5, 8, 8.5 and 9), and temperature (50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C and 75°C). The research began with the extraction of the crude extract of the sulfhydryl protease enzyme from the *Plumeria obtusa* frangipani stems, characterization of the optimal pH and temperature of the crude extract of the enzyme. Data were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) and then continued with Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT). Analysis of the data used to compare the yield of soft cheese curd using t-test data analysis. The best temperature for the activity of the sulfhydryl protease enzyme from *Plumeria obtusa* frangipani stems was 55°C and pH was 7.5. The results of the final purification of dialysis using ammonium sulfate gradually. The result showed that the sulfhydryl protease enzyme from the Cambodia stem *Plumeria obtusa* had a specific activity of 1.7765×10^{-3} mol/μml, which was 1.0730 times purer than the initial extract. The use of the sulfhydryl protease enzyme from the stems of frangipani *Plumeria obtusa* as a coagulant in soft cheese making produced 19.880% curd, greater than the use of animal rennet.

1. PENDAHULUAN

Tanaman kamboja (*Plumeria* sp.) merupakan salah satu jenis tanaman hias yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat. Salah satu jenis tanaman kamboja yang banyak ditemukan di sekitar pemukiman masyarakat yaitu kamboja *Plumeria obtusa* yang sering ditanam di area pemakaman umum. Tanaman kamboja mempunyai banyak khasiat yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat, salah satunya sebagai antioksidan dikarenakan memiliki kandungan etanol serta memiliki banyak kandungan fitokimia lainnya (Farooque et al., 2012). Pemanfaatan tanaman kamboja di masyarakat selain sebagai tanaman hias adalah penggunaan ekstrak bunga kamboja sebagai bahan pembuatan parfum dan batang kamboja sebagai

obat luka. Pemanfaatan kamboja sebagai obat luka kemungkinan disebabkan adanya protease di dalamnya, karena enzim protease dapat dimanfaatkan sebagai agen autolitik *debridement* untuk penanganan luka yang baik (Yuswanto, 2015). Penelitian mengenai aktivitas enzim pada tanaman kamboja telah dilakukan oleh Chanda et al. (2011) dengan melakukan isolasi enzim protease dari tanaman kamboja *Plumeria rubra* yang diberi nama plumerin.

Protease merupakan enzim yang memiliki aktivitas proteolisis yang mampu memecah protein (Rosalina Suhito, 2017). Enzim protease pada tanaman kamboja merupakan enzim protease sulfhidril yang memiliki residu sulfhidril pada sisi aktifnya, memiliki pH optimal 7,5 - 8 dan suhu optimal 55°C (Chanda et al., 2011). Enzim protease pada industri pangan berperan dalam proses degradasi protein seperti pada proses pengolahan keju, roti, hidrolisat protein dan pengempukan daging secara tradisional (Ratnayani et al., 2018).

Trias Ayu Laksanawati, Muhammad Habbib Khirzin, Kiky Mey Shinta
Dosen Teknologi Pengolahan Hasil Ternak, Politeknik Negeri
Banyuwangi
Mahasiswa Teknologi Pengolahan Hasil Ternak, Politeknik Negeri
Banyuwangi
Email: trias@poliwangi.ac.id

Keju merupakan produk pangan olahan dari susu yang bernilai gizi tinggi karena kandungan proteinnya. Keju pada umumnya dibuat dari susu sapi yang diendapkan menggunakan enzim rennet sebagai koagulan, dimana enzim rennet yang digunakan berasal dari lambung anak sapi (Adrian et al., 2015). Penggunaan enzim rennet dari lambung anak sapi sudah jarang digunakan dan jarang diproduksi lagi sehingga menyebabkan harganya mahal. Adanya permasalahan tersebut, maka peneliti mulai berusaha menemukan enzim-enzim penggumpal susu yang sering disebut *microbial* rennet dan *vegetable* rennet (Wang et al., 2006).

Enzim protease dari batang kamboja dapat digunakan sebagai koagulan dalam pembuatan keju karena enzim protease dapat memecah kasein (protein susu) sehingga protein yang terdapat dalam susu menggumpal. Pemanfaatan batang kamboja sebagai sumber enzim protease dapat meningkatkan nilai jual batang kamboja dan mengurangi ketergantungan penggunaan rennet hewani dalam pembuatan keju.

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pH, pengaruh dari inhibitor dan prekursor (Risnawati, 2013). Karakteristik enzim protease dalam menghidrolisis protein menjadi asam aminonya untuk mencapai aktivitas maksimum, perlu dilihat kondisi optimum yang dapat mempengaruhi aktivitas kerja enzim. Berdasarkan latar belakang permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk isolasi dan karakterisasi pH serta suhu optimum dari ekstrak kasar protease sulfhidril dari batang kamboja (*Plumeria obtusa*). Hal ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum enzim bekerja maksimal. Penelitian ini dilakukan dengan pemurnian enzim protease sulfhidril untuk mendapatkan enzim yang lebih murni dari ekstrak kasarnya. Proses purifikasi dilakukan dengan pengendapan enzim secara bertahap menggunakan garam amonium sulfat serta dialisis untuk meningkatkan kemurniannya.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu batang kamboja yang didapatkan dari area pemakaman umum di daerah Kecamatan Rogojampi Kabupaten Banyuwangi, kasein (bovine milk, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), *trichloroacetic acid* (TCA for analysis, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Tris-HCL, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , amonium sulfat (Merck

KGaA, Darmstadt, Germany), etanol 96% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), kain saring, dialysis tube, BSA (bovine serum albumin), susu sapi dan rennet hewani komersial untuk pembanding. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu *centrifuge*, *magnetic stirrer*, *micropipette*, *colonial flask*, *vortex*, termometer, *waterbath shaker*, spektrofotometer UV-VIS, dan peralatan gelas lainnya.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel bebas yaitu pH (7, 7.5, 8, 8.5 dan 9), dan suhu (50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C dan 75°C). Parameter yang diukur pada setiap tahap pemurnian adalah aktivitas enzim. Setiap sampel dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali ulangan sehingga secara keseluruhan terdapat 90 sampel percobaan.

Ekstraksi Protease Sulfhidril (*Crude Extract*) Batang Kamboja (*Plumeria obtusa*)

Ekstraksi enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* dilakukan dengan proses perendaman 100 gram batang kamboja dalam 100 ml etanol 96% (1:1). Batang kamboja yang telah direndam dengan etanol selama 30 menit kemudian dicuci bersih dan ditiriskan. Setelah itu, batang kamboja dihaluskan dengan blender dan disaring menggunakan kain saring serta diambil ekstraknya. Ekstraksi enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* dilakukan dengan menggunakan *buffer phosphate* 0,1 M pH 7 dengan perbandingan 1:1. Filtrat yang diperoleh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C (Zohdi dan Amid., 2013). Supernatan yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu 4°C di dalam lemari pendingin untuk tahapan purifikasi berikutnya.

Pengukuran Aktivitas Enzim dengan Metode *Cassein Assay*

Aktivitas enzim dapat ditentukan dengan menggunakan kasein sebagai substrat pada suhu dan pH tertentu. Kasein dilarutkan dengan *buffer phosphate*, kemudian larutan kasein 400 µl direaksikan dengan 200 µl larutan ekstrak protease sulfhidril dari hasil ekstraksi batang kamboja pada tahap sebelumnya, kemudian ditambahkan 700 µl larutan *buffer phosphate* pH optimum 0,01M dan diinkubasi selama 30 menit. Inkubasi dihentikan dengan penambahan TCA 1,2 M sebanyak 500 µl, sehingga enzim dan sisa substrat terdenaturasi, kecuali produk hasil hidrolisis yang berupa asam amino (salah satunya

yaitu tirosin). Tirosin yang larut dalam campuran reaksi tersebut selanjutnya dipisahkan dari enzim dan sisa substrat dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. supernatan diambil dan diukur dengan spektrofotometer dengan menggunakan kuvet kuarsa pada panjang gelombang 275 nm, kemudian dapat dilakukan perhitungan aktivitas enzim berdasarkan berat tirosin (protein) yang diperoleh (Cutler, 2004). Penentuan kadar protein bisa didapatkan dengan membuat kurva standar protein BSA (bovine serum albumin). BSA sering digunakan sebagai standar untuk pengukuran kadar protein terlarut dengan menggunakan metode *Bradford*.

$$\begin{aligned}\text{Aktivitas per ml} &= \frac{M \times V \text{ larutan uji}}{Mr \text{ tirosin} \times t \times V \text{ enzim}} \\ \text{Aktivitas total} &= \text{aktivitas per ml} \times V \text{ sampel} \\ \text{Aktivitas spesifik} &= \frac{\text{aktivitas per ml}}{\text{total protein}} \\ \text{Yield (\%)} &= \frac{\text{aktivitas total}}{\text{aktivitas total awal}} \times 100\% \\ \text{Purification factor} &= \frac{\text{aktivitas spesifik}}{\text{aktivitas spesifik awal}}\end{aligned}$$

Keterangan:

Aktivitas per ml : μmol produk tirosin per ml yang terbentuk tiap menit
M : berat tirosin per ml
Mr tirosin : berat molekul tirosin
t : waktu inkubasi
V enzim : volume ekstrak enzim protease

Penentuan pH dan Suhu Terbaik Ekstrak Enzim Protease Sulfhidril

Pada reaksi aktivitas enzim dilakukan pengujian pH terbaik pada ekstrak kasar protease sulfhidril dengan perlakuan variasi *buffer phosphate* konsentrasi 0,01 M pada pH 7, 7.5, 8, 8.5 dan 9, dengan rincian: NaH_2PO_4 untuk *buffer phosphate* pH 7, Tris-HCl untuk *buffer* pH 8-9 (Zohdi dan Amid, 2013). Aktivitas enzim dilakukan pengujian suhu terbaik pada ekstrak kasar protease sulfhidril dengan perlakuan variasi suhu pada 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C (Zohdi dan Amid, 2013). Penentuan suhu terbaik dan pH terbaik dari protease sulfhidril dilakukan pada proses pembuatan ekstrak kasar enzim protease sulfhidril untuk mendapatkan suhu dan pH terbaik enzim.

Presipitasi Menggunakan Amonium Sulfat

Larutan hasil ekstraksi kasar enzim protease sulfhidril diendapkan secara bertahap pada suhu ruang dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60% dan 80%. Padatan amonium sulfat yang diperlukan ditimbang, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam ekstrak enzim hingga larut dengan proses pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Hasil pengendapan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit pada suhu ruang. Supernatan yang didapat diambil dan digunakan untuk pengendapan selanjutnya, sedangkan peletnya dilarutkan dengan *buffer* pH optimum untuk uji aktivitas, penambahan amonium sulfat dilakukan secara bertahap hingga mencapai 80%.

Dialisis

Tahapan ini menggunakan membran dialisis berupa tabung selofan. Hasil pengendapan dengan *purification factor* dan *yield* terbaik dimasukkan ke dalam tabung selofan, dimana satu ujungnya diikat terlebih dahulu. Selanjutnya tabung dialisis yang sudah diisi dengan sampel diikat sampai rapat kedua ujungnya lalu dimasukkan ke dalam *buffer phosphate* pH optimum 0,01 M dan didiamkan selama semalam serta diaduk secara perlahan dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang dan dilakukan penggantian *buffer* secara berkala setiap 24 jam. Enzim hasil proses analisis dilakukan uji pemurnian enzim, aktivitas enzim spesifik dan *purification factor*.

Pembuatan Keju Lunak Menggunakan Protease Sulfhidril Sebagai Koagulan

Keju dibuat menggunakan susu segar yang dipasteurisasi selama 15 menit dengan menggunakan suhu 75°C. Suhu diturunkan hingga suhu optimum enzim protease sulfhidril dapat bekerja optimum yaitu pada suhu 55° dengan menggunakan air dingin. Protease sulfhidril ditambahkan sebanyak 0,5%. Penambahan enzim rennet sebanyak 0,5% juga dilakukan sebagai kontrol pembanding. Masing-masing enzim ditambahkan ke dalam susu segar selama 60 menit. Proses selanjutnya adalah pemisahan *curd* dan *whey* keju dan dilakukan perhitungan rendemen yang diperoleh (Adrian *et al.*, 2015).

$$\text{Rendemen(\%)} = \frac{\text{berat curd}}{\text{berat susu awal}} \times 100\%$$

Analisis Data

Data aktivitas enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* yang diperoleh dianalisis menggunakan *Analysis of variance*

(ANOVA) dengan selang kepercayaan 95%. Apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Analisa data yang digunakan untuk membandingkan hasil rendemen *curd* yang dihasilkan dari penggunaan enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* sebagai koagulan dan rennet hewani komersial dalam pembuatan keju menggunakan analisa data *t-test* dengan aplikasi SPSS untuk mengetahui nilai perbedaan kedua sampel.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Suhu dan pH Terbaik Enzim Protease Sulfhidril dari Batang Kamboja *Plumeria obtusa*

Proses karakterisasi suhu dan pH bertujuan untuk menentukan suhu dan pH terbaik enzim protease sulfhidril yang digunakan dalam uji aktivitas, sehingga dihasilkan nilai aktivitas yang tinggi. Suhu dan pH terbaik ditentukan dari nilai aktivitas tertinggi yang dihasilkan. Hasil uji analisa sidik ragam (ANOVA) karakterisasi aktivitas enzim berdasarkan pH dan suhu menunjukkan bahwa interaksi perlakuan suhu dan pH berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap nilai aktivitas enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa*. Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa perlakuan T2P2 berpengaruh nyata terhadap semua perlakuan, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan T3P2 dan T5P2. Hasil uji DMRT menunjukkan aktivitas tertinggi enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* ditunjukkan pada perlakuan T2P2 dengan aktivitas enzim terbesar 0,400 U/ml, dan nilai aktivitas terendah pada perlakuan T7P5 sebesar 0,174 U/ml.

Tabel 1. Aktivitas enzim protease sulfhidril berdasarkan suhu dan pH (U/ml)

Suhu °C	7 (P1)	7,5 (P2)	pH 8 (P3)	8,5 (P4)	9 (P5)
50	0,339 ±	0,373 ±	0,345 ±	0,225 ±	0,206 ±
(T1)	0,026 ^{efgh}	0,002 ^{bcd}	0,004 ^{efgh}	0,004 ^{qrs}	0,004 st
55	0,335 ±	0,400 ±	0,285 ±	0,271 ±	0,183 ±
(T2)	0,001 ^{fighi}	0,009 ^a	0,003 ^{lmn}	0,001 ^{no}	0,001 ^{tu}
60	0,314 ±	0,382 ±	0,331 ±	0,233 ±	0,226 ±
(T3)	0,002 ^{ijk}	0,001 ^{abc}	0,028 ^{ghi}	0,002 ^{qr}	0,002 ^{qrs}
65	0,346 ±	0,355 ±	0,296 ±	0,264 ±	0,192 ±
(T4)	0,003 ^{efgh}	0,002 ^{defg}	0,002 ^{klm}	0,002 ^{nop}	0,001 ^{tu}
70	0,322 ±	0,395 ±	0,265 ±	0,244 ±	0,217 ±
(T5)	0,003 ^{hij}	0,003 ^{ab}	0,003 ^{nop}	0,009 ^{pq}	0,001 ^{rs}
75	0,362 ±	0,360 ±	0,299 ±	0,222 ±	0,204 ±
(T6)	0,003 ^{cde}	0,005 ^{cdef}	0,005 ^{kl}	0,008 ^{qrs}	0,003 st

Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Chanda *et al.* (2011), yang menyebutkan bahwa enzim protease dari tanaman kamboja memiliki pH optimal sekitar 7,5 - 8 dengan suhu optimal 55°C. Sejalan dengan pendapat Yusriah dan Kuswyatari

(2013), pH optimal merupakan kondisi dimana pH tersebut mempunyai sisi aktif yang sesuai dengan substrat kasein sehingga mampu meningkatkan aktivitas enzim. Bertambahnya suhu sampai dengan suhu optimum menyebabkan terjadinya kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak enzim dan substrat. Energi tersebut menaikkan benturan antara molekul-molekul sehingga memperbesar peluang keduanya untuk bereaksi membentuk kompleks enzim substrat yang lebih stabil dan produk yang terbentuk juga akan semakin banyak sehingga aktivitas enzim bertambah (Mulyani, 2010). Penurunan aktivitas enzim tersebut dikarenakan kenaikan suhu yang semakin besar, menyebabkan jumlah enzim yang terdenaturasi semakin banyak sehingga semakin sedikit enzim yang dapat berikatan dengan substrat pada sisi aktifnya (Mulyani, 2010). Menurut Poedjiadi dan Supriyanti (2006) peningkatan suhu pada reaksi enzim mempunyai dua pengaruh yaitu peningkatan suhu dapat meningkatkan laju reaksi atau peningkatan suhu dapat meningkatkan laju inaktivasi enzim. Semua enzim bekerja dalam rentang suhu tertentu pada tiap jenis organisme. Secara umum setiap peningkatan suhu sebesar 10°C diatas suhu minimum menyebabkan aktivitas enzim meningkat sebanyak dua kali lipat hingga mencapai kondisi optimum, namun laju inaktivasi akan meningkat 64 kali lipat. Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan muatan pada molekul enzim sehingga dapat mempengaruhi aktivitas enzim, baik dari perubahan struktur maupun perubahan muatan. Selain itu, pH tinggi ataupun rendah dapat menyebabkan terjadinya denaturasi dan hal tersebut mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Istia'nah *et al.*, 2020). Perubahan pH yang tidak sesuai menyebabkan daerah katalik dan konformasi enzim berubah, perubahan pH juga menyebabkan denaturasi enzim dan turunnya aktivitas enzim karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH (Meryandini *et al.*, 2009). Kenaikan suhu dan pH melebihi titik optimum menyebabkan semakin besar deformasi struktur tiga dimensi enzim dan substrat sulit untuk berikatan secara tepat pada situs aktif molekul enzim. Hal tersebut mengakibatkan aktivitas enzim turun karena tidak terbentuk kompleks enzim substrat, sehingga konsentrasi produk rendah.

Pengendapan Enzim Menggunakan Amonium Sulfat

Aktivitas tertinggi enzim protease sulfhidril terdapat pada pengendapan 60% dengan nilai

aktivitas total sebesar 0.4389 U/ml, *purification factor* sebesar 1.0066 dan *yield* 40,97, hal ini disebabkan pengendapan enzim protease sulfhidril paling sempurna ada pada konsentrasi amonium sulfat 60%. Pengendapan 80% menunjukkan penurunan aktivitas enzim protease sulfhidril, hal ini disebabkan karena enzim telah jenuh dengan amonium sulfat atau garam amonium sulfat ikut terikat pada protein sehingga menyebabkan nilai aktivitas enzim turun (Rohishoh, 2012).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan Bahri *et al.* (2012) melakukan karakterisasi enzim dari kecambah biji jagung menggunakan garam ammonium sulfat dengan konsentrasi 55% jenuh untuk menghasilkan aktivitas enzim tertinggi.

Ekstrak kasar enzim protease sulfhidril yang dihasilkan pada tahapan ini berubah menjadi enzim semi murni, hal tersebut dapat dilihat dari nilai aktivitas total atau jumlah unit enzim per milligram protein yang terus naik dari pengendapan 20% hingga 60%. Jumlah nilai *yield* menunjukkan persentase jumlah kenaikan aktivitas total enzim pada setiap tahap pengendapan amonium sulfat dimana terus meningkat seiring dengan proses pengendapan. Aktivitas spesifik atau aktivitas spesifik ekstrak per milligram protein mengalami kenaikan dengan nilai tertinggi pada pengendapan 60% dengan *purification factor* atau kenaikan nilai pemurnian enzim yang juga meningkat dari ekstrak kasarnya.

Pemurnian Dialisis Enzim Protease Sulfhidril

Berdasarkan hasil uji pemurnian enzim dengan dialisis, diperoleh aktivitas spesifik enzim sebesar $1,7765 \times 10^{-3}$ U/ml, *yield* 54,9650% dan *purification factor* sebesar 1,0730. Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa aktivitas total enzim naik seiring dengan proses pemurnian dari tahap awal ekstrak kasar, pengendapan dengan ammonium sulfat mampu menaikkan aktivitas enzim sebesar 0,1474 U/ml dari aktivitas ekstrak awal. Proses dialisis menaikkan nilai aktivitas dari hasil pengendapan menggunakan ammonium sulfat sebesar 0,0396 U/ml.

Aktivitas enzim dari awal ekstrak kasar hingga proses dialisis mengalami kenaikan aktivitas sebesar 0,1872 U/ml, hal ini menandakan bahwa enzim yang dihasilkan mengalami pemurnian dengan nilai aktivitas yang lebih tinggi (Rohishoh, 2012). Hasil ini didukung oleh penelitian Wardani *et al.* (2012) yang telah melakukan isolasi enzim protease dari *whey* tahu menggunakan metode dialisis untuk menghilangkan residu garam ammonium sulfat

maupun molekul non protein lainnya yang dapat mengganggu sisi aktif protease dalam mengikat substrat dan mempengaruhi aktivitas enzim protease sehingga harus dihilangkan untuk meningkatkan aktivitas enzim.

Tabel 2. Pemurnian ekstrak kasar enzim protease sulfhidril dengan pengendapan ammonium sulfat

Tahap	Volume	Protein	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas spesifik (µg/ml)	Yield (%)	Purifikasi factor
Awal	10	64,69	0,11	0,001655	100	10
Pengendapan 60%	0,6	153,73	0,25	0,001656	39,61	1,006
Dialisis	0,5	163,06	0,29	0,0017765 ±0,00025	54,96	1,073

Menurut Naiola *et al.* (2007) metode dialisis dengan membran dialisis dengan *molecular weight cut off* 12kDa dapat memisahkan protein enzim yang merupakan makromolekul tetap tertahan di dalam membran sedangkan senyawa-senyawa lain yang memiliki berat molekul kurang dari 12 kDa keluar melalui membran semipermeabel.

Aplikasi Enzim pada Produk Keju

Enzim protease sulfhidril berpengaruh sangat nyata ($P < 0,05$) dalam mengkoagulasi (*curd*) dibandingkan dengan enzim rennet komersial (Tabel 3). Hal ini diduga disebabkan karena enzim protease sulfhidril memiliki aktivitas yang tinggi setelah melalui tahap-tahap pemurnian (Qoryna, 2019).

Tabel 3. Uji beda (T) *curd* hasil pengendapan enzim rennet hewani komersial dengan Enzim protease sulfhidril batang kamboja

Hasil endapan	Rata-rata rendemen			Keterangan
	Rennet hewani komersial (0,5 ml)	Enzim protease sulfhidril (0,5 ml)	Hasil signifikansi Uji beda (t)	
<i>Curd</i> (%)	12,87±3,38	19,99±1,49	0,03	Signifikan (nyata)

Penelitian sebelumnya telah dilakukan Witono (2013) yang melakukan ekstraksi enzim protease dari tanaman biduri dan penerapannya pada pembuatan keju yang menghasilkan rendemen *curd* sebanyak 4,4% dengan menggunakan 0,3% enzim protease ekstrak tanaman biduri. Enzim protease sulfhidril dapat menggumpalkan susu menjadi *curd* dengan memecah struktur tersier *kappa-casein* atau protein susu. Pemecahan ini menyebabkan terjadinya koagulasi (Adrianto *et al.*, 2020).

4. KESIMPULAN

Aktivitas enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* dipengaruhi oleh interaksi antara suhu dan pH enzim. Suhu untuk aktivitas tertinggi enzim protease sulfhidril batang kamboja *Plumeria obtusa* ada pada kondisi suhu 55°C dan pH 7.5, serta menghasilkan aktivitas tertinggi sebesar 0,40 U/ml. Metode pemurnian dengan menggunakan pengendapan amonium sulfat 60% dan dialisis pada enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* menghasilkan nilai *purification factor* sebesar 1,073 dan *yield* sebesar 0,043%. Hasil pengaplikasian enzim protease sulfhidril dari batang kamboja *Plumeria obtusa* sebagai koagulan dalam pembuatan keju menghasilkan *curd* sebesar 19,880% dari perlakuan kontrol menggunakan enzim rennet hewani komersial.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Akademik Pendidikan Tinggi Vokasi, Direktorat Jenderal Pendidikan Vokasi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi yang telah mendanai penelitian ini pada tahun 2022.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrian, M. T., Fathimah, A. N., Nabela, F. L. 2015. Exploration of Fruit Noni (*Morinda citrifolia* L.) for The Production of The Enzyme Protease and its Potential as Substitute for Rennet In Cheese Industry 3(3): 1136–1144.
- Adrianto, R., Wiraputra, D., Jyoti, M. D., Andaningrum, A. Z. 2020. Soft Chesse Yield, Flavor, Taste, Overall Texture Made of Cow's Milk Added Rennet and Lactid Acid Bacteria Yoghurt Biokul. Jurnal Agritechno 13(2): 120–126.
- Bahri, S., Mirzan, M., Hasan, M. 2012. Karakterisasi Enzim Amilase dari Kecambah Biji Jagung Ketan (*Zea mays ceratina* L.). Jurnal Natural Science 1 (1): 132–143.
- Chanda, I., Basu, S. K., Dutta, S. K., Das, S. R. C. 2011. A protease isolated from the latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 1. Purification and characterization Tropical Journal of Pharmaceutical Research 10(6): 705–711.
- Cutler, P. 2004. Protein Purification Protocols (Google eBook). Protein Purification Protocols 59: 484.
- Farooque, A. M., Mazumder, A., Shambhawe, S., Mazumder, R. 2012. Review on *Plumeria acuminata*. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry 2(2): 467–469.
- Fathimah, A. N., Wardani, A. K. 2014. Ekstraksi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). Jurnal Teknologi Pertanian 15(3):191–200.
- Istia'nah, D., Utami, U., Barizi, A. 2020. Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya 2(1): 11–17.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunatri, T.C., Rachmania, N., Satria, I. 2009 Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. Makara Sains 13(1): 33–38.
- Mulyani, N. S. 2010. Penentuan Temperatur dan pH Optimum pada Uji Aktivitas Xilase Hasil Isolasi dari *Aspergillus niger* dengan Menggunakan Media Pertumbuhan Sekam Padi. Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia. Semarang: UNDIP
- Naiola, E., Widhyastuti, N. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp. Berkala Penelitian Hayati 13(1): 51–56.
- Poedjiadi, A., Supriyanti, T. 2006. Dasar-dasar Biokimia. Universitas Indonesia (UI-Press).
- Qoryna, K. 2019. Karakteristik Fisik dan Komposisi Kimia Keju dari Susu Kambing Etawa dengan Koagulan Rennet Nabati (Enzim Papain) Berbentuk Tablet. Skripsi. Program Studi Peternakan. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara.
- Ratnayani, K., Nazib, M., Sibarani, J., Laksmiwati, A. A. I. M. 2018. Aktivitas Protease pada Getah Bagian Batang dari Tiga Jenis Spesies Tanaman Kamboja (*Plumeria* L.). Jurnal Kimia 12 (2) : 147–151.
- Risnawati, M. 2013. Pengaruh Penambahan Ion Logam Ca²⁺ terhadap Aktivitas Enzim Papain (The Addition Effect of the Metal Ions Ca²⁺ on the Papain Activities). UNESA Journal of Chemistry 2(1): 76–83.
- Rohishoh, N. 2012. Produksi dan pemurnian enzim glukosa oksidase dari. Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Airlangga. 978–979.
- Rosalina, S. I. 2017. Ekstraksi, Purifikasi dan Karakterisasi Alkaline Protease dari Limbah Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*). Skripsi. Program Studi Biologi. Fakultas Teknobiologi. Universitas Surabaya.
- Sari, N. A., Sustiyah, A., Legowo, A. M. 2014. Total Bahan Padat, Kadar Protein, dan Nilai Kesukaan Keju Mozarella dari Kombinasi Susu Kerbau dan Susu Sapi. Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan 3(4): 152–156.
- Sriwahyuni, L., Rosahdi, T. D., Supriadin, A. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Amilase dari Biji Durian (*Durio sp.*). Al Kimiya 2(10): 18–23.
- Wang, S. L., Lin, T. Y., Yen, Y. H., Liao, H. F., Chen, Y. J. 2006. Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes for The Production of *Bacillus subtilis* W-118 Chitinase. Carbohydrate Research 341(15): 2507–2515.
- Wardani, A. K., Nindita, L. O. 2012. Purification and Characterization of Protease from Protease-producing Bacteria Isolated from Tofu Whey. Jurnal Teknologi Pertanian 13(3): 149–156.
- Witono, Y. 2013. Enzim Biduri Agen Aktif Potensial Untuk Proses Pangan. Pustaka Radja. Jember.
- Yusriah, Kuswyatari, N. D. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. Sains dan Seni Pomits 2(1): 48–50.
- Yuswanto, T. J. A. 2015. Ekstrak Getah Pepaya sebagai Autolitik Debridement Luka Kronis. Jurnal Ners 10(77): 296–300.
- Zohdi, N. K., Amid, M. 2013. Optimization of Extraction of Novel Pectinase Enzyme Discovered in Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Peel. Molecules 18(11): 14366–14380.