

PEMURNIAN DAN PENCIRIAN PROTEASE DARI EKSTRAK JAMUR MERANG

SOLIHATI



DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2006

Halaman ini adalah hak cipta milik IPB University. Untuk lebih jelasnya, silakan kunjungi website kami di www.ipb.ac.id.
1. Dilarang mengutip, menyalin, atau memperbanyak isi dokumen ini tanpa izin tertulis dari IPB University.
2. Dilarang menggunakan isi dokumen ini untuk tujuan komersial tanpa izin tertulis dari IPB University.

PEMURNIAN DAN PENCIRIAN PROTEASE DARI EKSTRAK JAMUR MERANG

SOLIHATI

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains pada
Departemen Kimia

DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2006

Visi Cipta Jauh Lebih Unggul dan Lebih
1. Ombak mengigit sebagian atau seluruh karya kita, itu cukup menakutkan dan merupakan sumber :
a. Perbaikan harga untuk kegiatan penelitian, penelitian, penelitian kerja ilmiah, penelitian kerja atau proyek atau masalah
b. Mengetahui tidak menentu pada penelitian yang baik IPB University
2. Ombak mengigit dan menentang karya kita, itu dapat menjadi ancaman bagi IPB University

ABSTRAK

SOLIHATI. Pemurnian dan Pencirian Protease dari Ekstrak Jamur Merang Dibimbing oleh IRMA H SUPARTO dan YANTI.

Enzim protease dari jamur merang (*Volvariella volvaceae*) yang terdapat di Indonesia memiliki aktivitas fibrinolitik. Penelitian ini bertujuan memurnikan dan mencirikan protease dari ekstrak jamur merang. Ekstrak enzim jamur merang dimurnikan dengan presipitasi amonium sulfat kejenuhan 75%, dialisis (*cut off* 10 KD), dan kromatografi penukar ion DEAE Sepharose. Pemurnian menghasilkan satu fraksi enzim aktif. Aktivitas spesifik fraksi aktif adalah 0.383 U/mg, dengan tingkat kemurnian 2.681 kali dibandingkan dengan ekstrak enzim kasar. Hasil analisis SDS-PAGE memperlihatkan fraksi aktif protease terdiri atas dua pita protein (15.8 dan 12.9 KD). Aktivitas optimum protease dicapai pada suhu 50°C dan pH 7. Uji zimogram memperlihatkan bahwa protease mampu menghidrolisis substrat kasein dan fibrinogen dengan konsentrasi 0.01% (b/v). Aktivitas enzim protease menurun dengan penambahan ion Fe³⁺. Protease ekstrak kasar dihambat spesifik oleh inhibitor fenilmetilsulfonyl fluorida dan *N-p*-tosil-L-lisinklorometil keton sehingga digolongkan ke dalam kelompok protease serin.

ABSTRACT

SOLIHATI. Purification and Characterization of Protease from Extract of Straw Mushroom. Under the direction of IRMA H SUPARTO and YANTI.

An Indonesian straw mushroom believed to have protease which has fibrinolytic activity. Therefore, the purpose of this research was to study the purification and characterization of protease from crude extract of straw mushroom (*Volvariella volvaceae*). The extracted straw mushroom went through several steps of purification using ammonium sulfate 75% saturation, dialyzed (*cut-off* 10 KD), and ion-exchange chromatographed using DEAE Sepharose. The result of the study showed one active fraction of enzyme. The specific activity of this fraction was 0.383 U/mg, compared to the crude extract it has 2.681 fold higher purification. The enzyme revealed two protein bands at active fraction (15.8 and 12.9 KD) by SDS-PAGE. Its optimum activity was achieved at pH 7 and temperature 50°C. The Protease effectively hydrolyzed casein and fibrinogen at 0.01% concentration by zymogram. The protease enzyme activity decreased by the addition of ion Fe³⁺ 5 mM. This enzyme was inhibited strongly by phenylmethylsulphonyl fluoride and *N-p*-tosyl-L-lysinechloromethyl keton. Therefore, this enzyme that was purified from straw mushroom can be classified as serine protease.

Judul : Pemurnian dan Pencirian Protease dari Ekstrak Jamur Merang.
 Nama : Solihati
 NIM : G01400020

Menyetujui:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

dr. Irma H Suparto, M.S.
 NIP 131606776

Yanti, M.Si.
 NIP 120041094

Mengetahui:

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
 Institut Pertanian Bogor

Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, M.Si.
 NIP 131473999

Tanggal lulus:

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan karya ilmiah ini. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Teknologi Enzim, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Atma Jaya, Jakarta. Penelitian ini berlangsung selama enam bulan yaitu dari Juli 2005 sampai dengan Januari 2006, dengan judul Pemurnian dan Pencirian Protease dari Ekstrak Jamur Merang (*Volvariella volvaceae*).

Terima kasih penulis ucapkan kepada dr Irma H Suparto, M.S dan Yanti, M.Si selaku pembimbing yang telah memberikan waktu, bimbingan, saran, dan pengarahan kepada penulis dalam menyelesaikan karya ilmiah ini. Ungkapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada keluarga tercinta yang telah memberikan doa serta kasih sayangnya dalam membantu penulis menyelesaikan tugas ini. Penelitian ini juga tidak lepas dari bantuan beberapa pihak, oleh karena itu penghargaan penulis sampaikan kepada mas Yudi (Laboratorium Biokimia dan Teknologi Enzim Atma Jaya), dan rekan-rekan seperjuangan dalam penelitian ini. Terima kasih penulis ucapkan kepada mas Hery atas bantuannya selama ini.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat.

Bogor, Maret 2006

Solihati

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
PENDAHULUAN	
TINJAUAN PUSTAKA	
Jamur Merang (<i>Volvariella volvaceae</i>)	1
Protease Fibrinolitik	2
Pemurnian Enzim	3
SDS-PAGE dan Zimografi.....	3
Kromatografi Kolom	4
BAHAN DAN METODE	
Alat dan Bahan	4
Metode Penelitian	4
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Hasil Pemurnian Enzim	6
Hasil Pencirian Enzim	7
Penentuan suhu optimum	7
Penentuan pH optimum.....	8
Pengaruh inhibitor	9
Pengaruh ion logam	9
Penentuan bobot molekul	10
Hasil zimografi berbagai substrat protein	10
SIMPULAN DAN SARAN	
Simpulan	11
Saran.....	11
DAFTAR PUSTAKA	11
LAMPIRAN	13



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1 Diagram alir penelitian	14
2 Diagram alir pembuatan ekstrak kasar jamur merang	15
3 Prosedur pembuatan pereaksi kimia	16
4 Data pengaruh suhu, pH, waktu, inhibitor, dan ion logam terhadap aktivitas protease dari ekstrak kasar jamur merang.....	18
5 Data pengaruh suhu, pH, waktu, inhibitor, dan ion logam terhadap aktivitas protease dialisat jamur merang	19
6 Contoh perhitungan aktivitas enzim (U/ml) dan aktivitas spesifik	20
7 Pembuatan kurva stand ar Bradford	21
8 Pembuatan kurva standar SDS -PAGE.....	22
9 Ringkasan tahap pemurnian enzim protease dari jamur merang	23

PENDAHULUAN

Jamur dikenal sebagai makanan sehat yang rendah kalori, tinggi kandungan protein, kitin, zat besi, seng, serat, asam amino esensial, vitamin, dan mineral. Selain kegunaannya sebagai komoditi pangan, beberapa jamur pangan diketahui mengandung senyawa-senyawa yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit degeneratif. Tudung jamur merang mengandung senyawa polisakarida yaitu lentinan yang bersifat sebagai imunomodulator yang dapat digunakan sebagai obat antikanker dan antitumor, selain itu dalam ilmu pengobatan tradisional Cina jamur merang juga dipercaya mampu melancarkan peredaran darah dalam tubuh sehingga dapat bermanfaat untuk melawan serangan penyakit jantung. Sehubungan dengan khasiatnya tersebut, maka jamur diduga mengandung komponen enzim protease tertentu yang dapat membantu proses penguraian darah kental atau beku, yaitu protease fibrinolitik (Nature's Impact 1998).

Umumnya sumber enzim fibrinolitik berasal dari manusia (plasmin, urokinase), hewan (lumbrokinase, desmoteplase), tanaman (natokinase), dan mikroorganisme/bakteri (streptokinase, stapilokinase). Pada abad ke-20, pengetahuan mengenai enzim mengalami kemajuan yang sangat pesat. Enzim disintesis dalam sel, dapat mempercepat suatu reaksi termodinamika sedemikian rupa sehingga kecepatan reaksi dapat berjalan sesuai dengan proses biokimia yang dibutuhkan untuk mengatur kehidupan (Girindra 1993).

Saat ini bidang yang menggunakan jasa enzim sebagai katalis sangatlah luas, yaitu mulai dari industri pembuatan keju, sirup, bir, sari buah, gula pasir, asam amino, kertas, detergen dan masih banyak lagi. Salah satu jenis enzim yang banyak digunakan pada proses industri makanan, minuman, farmasi, dan detergen adalah protease (Kusumangtyas 2000).

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kerja enzim adalah suhu. Enzim apabila dipanaskan pada suhu yang semakin meningkat secara ekuivalen maka aktivitas enzim akan meningkat sampai dengan suhu optimumnya, sehingga menyebabkan terjadinya kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi antara enzim dan substrat, sehingga memperbesar peluang keduanya untuk bereaksi. Pada suhu tinggi, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga sisi reaktifnya tidak lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim (Suhartono 1989). Pemanasan merupakan salah satu tahap

pemurnian, selain itu juga dapat dilakukan presipitasi dengan penambahan garam amonium sulfat.

Berdasarkan penjelasan di atas maka penelitian dengan mencari suhu optimum enzim pada ekstrak kasar protease dari jamur merang diharapkan dapat memberikan informasi ciri dari enzim tersebut yang antara lain pengaruh suhu, pH, inhibitor, ion logam, juga analisis SDS-PAGE, dan zimografi.

Penelitian ini bertujuan memurnikan dan mencirikan protease dari ekstrak jamur merang. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Teknologi Enzim, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya, Jakarta yang berlangsung selama 6 bulan, yaitu dari Juli 2005 sampai dengan Januari 2006.

TINJAUAN PUSTAKA

Jamur Merang

Jamur merang merupakan jamur bersifat saprofit yang dapat dimakan dan sudah dibudidayakan secara meluas baik di daerah tropis maupun subtropis di Asia, meliputi Hongkong, Taiwan, Thailand, Indonesia, Malaysia, dan Philipina (Chang 1991).

Jamur merang memiliki nama latin *Volvariella volvaceae*. Jamur ini merupakan organisme heterotrop yang mengambil zat organik dari tanaman atau bahan lain untuk keperluan hidupnya. Tubuh jamur merang berwarna coklat gelap sampai hitam dengan bentuk seperti telur. Tubuh jamur ini dilapisi sebuah selaput yang dinamakan selubung atau kulit jamur. Ciri-ciri lainnya adalah tudungnya berwarna abu-abu coklat berbentuk bulat cembung dengan diameter sekitar 5-10 cm, batang dari tubuh buahnya dapat mencapai 4,5-14 cm, berwarna putih sampai coklat dan bagian bawahnya sedikit membesar. Di bawah tudung terdapat bilah-bilah (lamella) yang merupakan tempat pembentukan spora-spora untuk berkembang biak (Gunawan 1992).

Klasifikasi jamur merang (Moore-Landecker 1982):

kingdom	: Mycetae
divisi	: Amastigomycotina
subdivisi	: Basidiomycotina
kelas	: Hymenomycetes
ordo	: Agaricales
famili	: Agaricaceae
genus	: <i>Volvariella</i>
spesies	: <i>Volvariella volvaceae</i>

Kandungan nilai gizi jamur merang ditunjukkan pada tabel 1. Asam amino essensial yang terdapat pada jamur ada 10 jenis dari 20 asam amino yang dikenal yaitu lisin, metionin, triptofan, treonin, valin, leusin, isoleusin, histidin, arginin, dan fenilalanin. Jamur kaya akan vitamin diantaranya B1 (tiamin) dan B2 (riboflavin).

Tabel 1. Komposisi kimia jamur merang*
Komposisi kimia kandungan 100 g jamur

Protein (%)	30.1
Lemak (%)	6.4
Karbohidrat (%)	50.9
Serat (%)	11.9
Kadar abu (%)	12.6
Energi (kal)	338

*Crisan dan Sands (1978)

Jamur merang merupakan sumber dari beberapa macam enzim terutama tripsin yang berperan penting untuk membantu proses pencernaan. Jamur merang juga dapat dijadikan sebagai makanan pelindung karena kandungan vitamin B-kompleks yang lengkap termasuk riboflavin serta memiliki asam amino essensial yang cukup lengkap. Kandungan asam amino pada jamur merang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan asam amino essensial jamur merang*

Asam amino	Kandungan (mg/g protein)
Leusin	3.5
Isoleusin	5.5
Valin	6.8
Histidin	2.1
Triptofan	1.1
Lisin	4.3
fenilalanin	4.9
Threonin	4.2
Arginin	4.1
Metionin	0.9

*Chang ST (1991)

Protease Fibrinolitik

Enzim protease adalah enzim proteolitik yang merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein. Berdasarkan reaksi yang dikatalisisnya, enzim ini tergolong hidrolase, karena mengkatalis pemecahan substrat dengan pertolongan air. Ditinjau dari segi produk yang dihasilkan, protease memiliki dua sisi pengertian yaitu proteinase dan peptidase. Proteinase mengkatalis pemecahan molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar seperti

polipeptida-polipeptida, sedangkan peptidase mengkatalis pemecahan polipeptida menjadi asam amino (Suhartono 1992).

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok protease yang dapat mendegradasi benang-benang fibrin. Benang-benang fibrin adalah jaringan yang mengelilingi sel-sel darah merah, hal ini yang disebut penggumpalan darah. Enzim fibrinolitik akan mendegradasi gumpalan-gumpalan yang ada pada saluran darah sehingga aliran darah menjadi normal kembali. Di dalam tubuh, enzim fibrinolitik atau plasmin diproduksi oleh sel endotel dalam saluran pankreas. Plasmin dalam aliran darah terdapat dalam bentuk tidak aktif/zimogen (plasminogen). Kegagalan mendegradasi gumpalan darah ditemukan pada penyakit trombosis. Seiring dengan pertambahan usia dan pola konsumsi pangan yang tidak seimbang, maka produksi plasmin alami oleh tubuh semakin berkurang sehingga kerja sistem fibrinolitik dalam tubuh akan terganggu. Bila hal ini berlangsung terus menerus secara berkala maka akan memicu timbulnya penyakit trombosis yang akhirnya mengarah pada berbagai penyakit degeneratif seperti stroke, hipertensi, dan diabetes. Umumnya sumber enzim fibrinolitik berasal dari manusia (plasmin, urokinase), tanaman (natokinase), dan mikroorganisme/bakteri (streptokinase, stapilokinase) (Suhartono 1992).

Penyakit trombosis menyebabkan penggumpalan darah di otak (*cerabral stroke*) maupun di jantung (*myocardial infaction*) dapat menyebabkan cacat bahkan kematian. Serat fibrinogen adalah komponen protein utama di dalam darah beku (gumpalan darah). Gumpalan darah ini dapat dihancurkan oleh enzim fibrinolitik (Nurachman 2001). Pada manusia, reaksi penguraian serat-serat fibrin terjadi melalui kerja enzim plasmin. Plasmin terdapat di dalam aliran darah dalam bentuk tidak aktif/zimogen (plasminogen). Kegagalan mendegradasi gumpalan darah ditemukan pada penyakit trombosis. Penggunaan enzim-enzim trombolitik dalam medis adalah metode efektif yang dipakai dalam terapi penyakit trombosis. Berbagai macam obat anti trombosis yang telah beredar dipasaran saat ini memiliki harga yang sangat mahal dan memiliki keterbatasan dalam spesifikasinya. Oleh karena itu, banyak usaha untuk mengembangkan penemuan baru obat anti beku darah yang dinilai memiliki keefektifan lebih baik dan efek samping lebih rendah yang berasal dari tumbuhan (berbagai jenis jamur) maupun makanan hasil fermentasi (tauco, natto dan lain-lain).

Pemurnian Enzim

Menurut Scopes (1987) pemurnian enzim dilakukan dengan tujuan memisahkan protein enzim dari protein jenis lain dan kontaminan sehingga menghasilkan aktivitas spesifik yang tinggi. Secara umum, pemurnian enzim dibagi dalam tiga tahap, yaitu ekstraksi, pemekatan dan fraksinasi. Pemilihan tahapan pemurnian enzim secara tepat sangat berpengaruh terhadap kriteria enzim murni yang dihasilkan. Enzim yang murni dapat digunakan untuk keperluan medis, farmasi atau penelitian biokimia karena spesifikasinya yang tinggi (Lehninger 1993).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, produk, adanya senyawa inhibitor dan aktivator, pH, suhu, kekuatan ion, dan jenis pelarut yang terdapat pada lingkungan (Suhartono 1989). Oleh karena itu penentuan sifat-sifat dari enzim yang dihasilkan perlu dilakukan.

Ekstraksi enzim bertujuan untuk memisahkan enzim dari sumbernya. Proses ekstraksi bergantung pada sumber dan lokasi enzim. Berbagai metode ekstraksi enzim intraseluler yang umum dilakukan diantaranya homogenisasi, penambahan detergen, dan pengeringan (Palmer 1991). Ekstraksi protease dilakukan dengan cara homogenisasi sehingga diperoleh ekstrak kasar jamur.

Pemekatan enzim dilakukan untuk memisahkan konsentrasi protein dari komponen biomolekul lainnya (karbohidrat, lipid, dan asam nukleat). Berbagai metode pemekatan yang biasa digunakan dalam pemurnian enzim adalah presipitasi dengan garam, pelarut organik, dialisis, ultrafiltrasi, dan liofilisasi (Scopes 1989).

Pemekatan enzim protease dapat dilakukan dengan garam amonium sulfat atau pelarut organik (aseton, etanol) (Harris 1989). Sisa garam dari presipitasi enzim dihilangkan dengan cara dialisis menggunakan kantung selofan dan ultrafiltrasi, sehingga konsentrasi enzim bebas garam dapat dimurnikan lebih lanjut melalui fraksinasi enzim.

Fraksinasi merupakan tahap akhir dalam pemurnian enzim yang bertujuan untuk memisahkan enzim dari protein non enzim lainnya. Metode fraksinasi umum untuk pemurnian enzim, meliputi kromatografi kolom dan elektroforesis.

SDS -PAGE dan Zimografi

Elektroforesis adalah suatu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi suatu campuran berdasarkan atas pergerakan partikel koloid

yang bermuatan, di bawah pengaruh medan listrik. Cara elektroforesis telah digunakan untuk analisis virus, asam nukleat, enzim dan molekul organik dengan berat molekul rendah seperti asam amino. Beberapa jenis elektroforesis yang dikenal antara lain elektroforesis kertas, elektroforesis selulosa asetat atau selulosa nitrat, dan elektroforesis gel. Elektroforesis yang digunakan dalam pemisahan protein dan asam nukleat adalah elektroforesis gel, sedangkan jenis elektroforesis lainnya bermanfaat dalam pemisahan molekul yang lebih kecil (Scopes 1987).

Bentuk elektroforesis gel dapat berupa kolom atau lempengan (slab). Beberapa jenis gel dapat dimanfaatkan, yaitu gel pati, gel agarosa dan gel poliakrilamida. Prinsip analisis SDS-PAGE yaitu pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul. Pada SDS-PAGE ini semua ikatan disulfida yang ada pada protein direduksi oleh β -merkaptotanol. Senyawa SDS yang ditambahkan berfungsi untuk memutuskan ikatan di antara sub unit penyusun protein dan membuat keseluruhan protein diselubungi muatan negatif, sehingga pergerakan protein hanya dipengaruhi oleh ukurannya.

Teknik zimografi bertujuan untuk pengukuran aktivitas spesifik enzim dan konsentrasi protein dapat memberikan informasi akan perkembangan dalam pemurnian dan keutuhan enzim. Akan tetapi data tersebut tidak selalu menunjukkan keadaan katalitik enzim subjek karena kontaminan, isozim, maupun enzim hidrolitik lain. Untuk menghilangkan kekurangan tersebut diusahakan penampakan aktivitas enzim secara in situ setelah elektroforesis melalui reaksi spesifik enzim-substrat. Mekanisme kerja zimografi sama dengan SDS-PAGE, hanya saja pada gel pemisah ditambahkan suatu substrat protein (kasein, fibrinogen, atau gelatin) yang akan berpolimerisasi dengan akrilamida. Setelah pemisahan elektroforesis, substrat akan didegradasi oleh enzim yang telah direnaturasi kembali pada kondisi reaksi optimumnya (suhu dan pH tertentu) selama waktu tertentu.

Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah metode pemisahan dalam dua atau lebih zat berdasarkan perbedaan distribusi dari tiap-tiap zat antara dua fase, salah satu fase dibuat diam yang dinamakan fase stasioner dan fase lainnya yang disebut fase mobil yang bergerak di antara celah-celah

atau pada permukaan stasioner. Fase diam dapat berupa padatan atau cairan dan fase mobil dapat berupa cairan atau gas. Dalam bentuk pemisahan dan pemurnian dikenal lima macam kromatografi yaitu kromatografi kertas, kromatografi gas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, kromatografi cair kinerja tinggi yang dapat dipakai masing-masing atau merupakan gabungan dari beberapa kromatografi (Mitra 2003).

Kromatografi kolom merupakan metode yang umum digunakan pada pemurnian enzim. Analisis kemurnian dengan kromatografi penukar ion berdasarkan sifat amfoter dari protein yaitu memiliki muatan positif dan muatan negatif dengan total muatan tergantung dari pH lingkungan. Pemilihan kolom penukar ion berdasarkan titik isoelektrik dan stabilitas pH dari molekul protein tersebut. Pada nilai pH di atas titik isoelektrik maka molekul akan memiliki muatan negatif sehingga kolom yang digunakan adalah *anion exchange* (penukar anion), sedangkan jika di bawah titik isoelektrik maka molekul akan bermuatan positif sehingga digunakan kolom *cation exchange* (penukar kation) (Roe 2001).

Gugus fungsi penukar anion atau kation dibedakan sebagai gugus lemah atau kuat berdasarkan pengaruh pH pada muatan gugus fungsinya. Penukar anion lemah yang biasa digunakan yaitu dietilaminoetil (DEAE).

Prinsip dasar kromatografi penukar ion adalah memisahkan biomolekul berdasarkan muatan ioniknya. Biomolekul dibuat bermuatan agar terikat pada media dalam kekuatan ion yang rendah. Biomolekul dilepaskan dari media dengan menggunakan gradien garam. Biomolekul dengan muatan ion paling kecil akan keluar dielusi lebih dahulu dibandingkan dengan biomolekul dengan muatan ion lebih besar. Semakin besar muatan ion maka diperlukan larutan garam NaCl dengan konsentrasi semakin besar pula.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain spektrofotometer UV/VIS (optima), sentrifugasi mikro berpendingin (Beckmann), inkubator, pH meter (Orion), perangkat elektroferesis (Bio Rad), lemari es, perangkat kromatografi kolom (Amersham Bioscience), neraca analitik (Fisher), *stirrer* dan *vortex*, tabung eppendorf, pipet mikro (Bio Rad) dan tip, aluminium foil, oven, rak tabung, dan alat-alat kaca lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah jamur merang dari pasar swalayan Giant di Jakarta, kasein Hammersten (Merck), pereaksi Bradford, standar L-tirosin (Merck), *Bovine Serum Albumin* (BSA) Fraction V (Merck), amonium sulfat, bufer universal pH 7, asam trikloroasetat (TCA), pereaksi Folin Cioccalteau, NaCl, bufer tris-HCl pH 7, larutan Na_2CO_3 , etilenadamina tetraasetat (EDTA), gliserol 50% (v/v), polietilena glikol (PEG), inhibitor fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), *Soybean trypsin inhibitor* (STI), *N-p*-tosil-L-lisinklorometil keton (TLCK), pereaksi elektroforesis (akrilamida, bis-akrilamida, amonium persulfat 10% (b/v), N,N,N',N'-tetraetilmetilenadamina (TEMED), *bromphenol blue*, *Coomassie Brilliant Blue R-250*, sodium dodesil sulfat (SDS), triton X-100 2,5% (v/v), standar marker *low molecular weight* (LMW), sampel protein (fibrinogen, gelatin, albumin), bufer sampel, dan matriks DEAE.

Metode Penelitian

Produksi ekstrak enzim kasar

Jamur merang dicuci dengan air kran mengalir, lalu dipotong kecil-kecil. Sebanyak 50 g jamur diekstrak dalam 150 ml bufer universal 50 mM pH 7 lalu dihomogenkan selama 5 menit. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 16002x g dan suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh sebagai ekstrak enzim kasar.

Analisis aktivitas protease

Aktivitas protease diukur secara kuantitatif dengan modifikasi metode Bergmeyer (1983) dengan menggunakan substrat kasein Hammarsten (2% b/v). Ada tiga perlakuan analisis yang dilakukan, yaitu perlakuan pada sampel, sebanyak 50 µl larutan enzim ditambahkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 250 µl bufer universal 50 mM pH 7 dan 250 µl kasein 2% b/v sebagai substrat. Perlakuan pada blanko dan standar, larutan enzim digantikan dengan akuades dan tirosin 5 mM masing-masing sebanyak 50 µl.

Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit (suhu dan waktu inkubasi optimum enzim). Sebanyak 500 µl TCA 0,1 M ditambahkan untuk menghentikan reaksi hidrolisis. Pada sampel ditambahkan 50 µl akuades, sedangkan pada blanko dan standar ditambahkan 50 µl larutan enzim. Larutan diinkubasi kembali pada 37°C selama 10 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada

kecepatan 28448x g selama 10 menit untuk memisahkan asam-asam amino yang tidak mengendap.

Sebanyak 375 μ l supernatan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1250 μ l Na_2CO_3 0,4 M dan 250 μ l pereaksi Folin Ciocalteau kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit untuk optimasi pewarnaan. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 578 nm. Contoh perhitungan aktivitas enzim terdapat pada lampiran 6.

Pengukuran konsentrasi protein (Bradford 1976)

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) Sebanyak 100 μ l larutan enzim ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml akuades dan 1 ml pereaksi Bradford. Perlakuan pada blanko, larutan enzim diganti dengan akuades. Larutan tersebut dihomogenkan kemudian didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm.

Standar protein yang digunakan adalah BSA. Pada kurva standar protein, digunakan BSA dengan kisaran konsentrasi 0 sampai 250 μ g/ml. Konsentrasi protein larutan enzim ditentukan berdasarkan persamaan garis linear hubungan antara konsentrasi standar protein dengan absorbansi.

Pemurnian protease

Presipitasi. Ekstrak enzim kasar diendapkan dengan amonium sulfat. Untuk menentukan konsentrasi garam yang optimal dilakukan pengujian aktivitas enzim hasil pengendapan oleh garam mulai dari 30% sampai 80% (b/v). Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit lalu disentrifugasi pada kecepatan 16002x g dan suhu 4°C selama 10 menit. Pelet disuspensikan dalam bufer universal 50 mM pH 7 dan didialisis dalam bufer universal 50 mM pH 7 dengan menggunakan kantung dialisis (*cut-off* 10 KD).

Dialisis. Untuk keperluan dialisis, potongan kantung dialisis dipanaskan selama 10 menit (dua kali). Salah satu ujung kantung diikat dan enzim hasil presipitasi dimasukkan. Kantung kemudian dimasukkan ke dalam larutan bufer universal pH 7 bervolume 100 kali volume filtrat. Sambil diagitasi perlahan, dialisis dilakukan dalam ruangan dingin dengan penggantian larutan bufer setiap 2 jam sebanyak 2 kali. Setelah dialisis, untuk lebih

memekatkan, kantung diletakkan di atas serbuk PEG sebanyak 100 g selama 15 menit.

Kromatografi kolom. Sistem kromatografi disiapkan yaitu pompa peristaltik, fraksi kolektor, dan kolom DEAE. *Syringe* atau tabung pemompa diisi dengan bufer tris-Cl 50 mM pH 7 sampai pH di dalam kolom menunjukkan pH 7. Adaptor dinyalakan sehingga kolom terhubung dengan tabung pemompa. Kolom dicuci dengan 10 ml bufer tris-Cl pada laju alir 3,0 ml/menit. Sebanyak 5 ml NaCl 1 M dialirkan ke dalam kolom. Keseimbangan akhir dicapai dengan mengalirkan 10 ml bufer Tris-Cl pH 7. Fraksi kolektor diatur berdasarkan jumlah tetes dengan volume fraksi 1 ml dan laju alir 3,0 ml/menit. Sebanyak 1 ml dialisis diinjeksikan ke dalam kolom. Kolom dicuci dengan 5 ml bufer tris-Cl pH 7, kemudian dielus dengan 5 ml NaCl 0,5 M dan 1 M diikuti 5 ml bufer tris-Cl pH 7. Eluat yang dihasilkan diuji kadar protein dan aktivitas enzim yang tinggi dipilih untuk uji karakterisasi selanjutnya.

Pencirian protease kasar dan murni

Pencirian ekstrak enzim kasar dan dialisis sebagai berikut:

Penentuan suhu optimum aktivitas enzim.

Enzim direaksikan pada pH optimumnya dengan variasi suhu yang diujikan adalah 27°C, 37°C, 50°C, 60°C, dan 80°C. Aktivitas tertinggi menunjukkan suhu optimum enzim.

Penentuan pH optimum aktivitas enzim.

Bufer universal dan substrat kasein untuk reaksi diatur pada nilai pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, dan 12. Pengujian aktivitas dilakukan pada suhu yang konstan (37°C). Aktivitas tertinggi menunjukkan pH optimum enzim.

Pengaruh inhibitor. Pengaruh aktivitas protease terhadap penambahan inhibitor berupa EDTA 0,01 mM; PMSF 0,01 mM; TLCK 0,1 mM; dan STI 0,01 mg/ml ditentukan dengan cara inkubasi 100 μ l enzim dan 100 μ l larutan inhibitor selama satu jam pada suhu ruang, lalu aktivitas residunya dianalisis secara kuantitatif.

Pengaruh ion logam. Pengaruh aktivitas protease terhadap penambahan ion logam dilakukan dengan inkubasi 100 μ l enzim dan 100 μ l larutan ion logam dengan konsentrasi 5 mM selama satu jam pada suhu ruang kemudian diuji aktivitasnya secara kuantitatif. Logam yang digunakan antara lain KCl, NaCl, MgCl_2 , ZnCl_2 , dan FeCl_3 .

Analisis SDS-PAGE dan Zimografi

Elektroforesis gel poliakrilamida yang dikombinasikan dengan suatu detergen SDS digunakan untuk memisahkan dan meneliti jumlah dan ukuran (bobot molekul) rantai protein dan rantai sub unit protein. Sementara zimografi merupakan salah satu teknik elektroforesis yang bertujuan mendeteksi aktivitas enzim proteolitik secara langsung.

Tahapan kerja yang dilakukan dalam analisis SDS-PAGE dan zimografi meliputi: preparasi gel pemisah dan penahan, preparasi sampel dan loading, pewarnaan gel, dan pelunturan warna.

Penyiapan gel pemisah dan penahan.

Pembuatan gel pemisah 12% dan gel penahan 4% untuk SDS-PAGE dan zimografi dilakukan dengan komposisi yang tertera pada tabel berikut:

Tabel 3 Komposisi gel pemisah dan gel penahan untuk SDS-PAGE dan zimografi

Pereaksi	Gel pemisah 12% (ml)		Gel penahan 4% (ml)
	SDS-PAGE	Zimografi	
Larutan A	2.00	2.00	0.67
Larutan B	1.25	1.25	-
Larutan C	-	-	1.25
Kasein 1% / Fibrinogen 1%	-	1.50	-
Akuades	1.75	0.25	3.00
Ammonium persulfat	0.10	0.10	0.05
TEMED*	0.01	0.01	0.005
Total	5.00	5.00	5.00

Preparasi sampel dan loading Khusus SDS-PAGE, 20 μ l sampel ditambahkan dengan 5 μ l bufer sampel yang mengandung β -merkaptotanol, lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sementara pada zimografi sampel dilarutkan dalam bufer sampel yang tidak mengandung β -merkaptotanol, dan tidak memerlukan perlakuan pemanasan. Tiap sampel dimasukkan ke dalam sumur gel dengan volume 10 μ l, sedangkan volume marker LMW yang digunakan sebanyak 5 μ l.

Pewarnaan dan pelunturan warna. Gel dijalankan pada tegangan 100 V selama 1,5 jam dalam bufer elektroforesis. Pada SDS-PAGE, setelah elektroforesis, gel langsung diwarnai

dengan menggunakan larutan pewarna (coomassie brilliant blue) selama 15 menit. Pelunturan warna pada gel dilakukan dengan larutan peluntur berulang kali sampai diperoleh pita protein biru dengan latar gel bening. Sementara pada zimografi, setelah elektroforesis, gel didenaturasi terlebih dahulu dalam larutan triton-x 2,5% v/v sambil digoyang selama satu jam. Kemudian gel dididigesti dalam 50 mM buffer universal pH 7 dan suhu 50 °C (kondisi suhu dan pH optimum enzim) selama 30 menit. Gel diwarnai dengan larutan pewarna selama 15 menit. Pelunturan warna gel dilakukan dengan larutan peluntur berulang kali sampai diperoleh pita enzim proteolitik putih dengan latar gel biru.

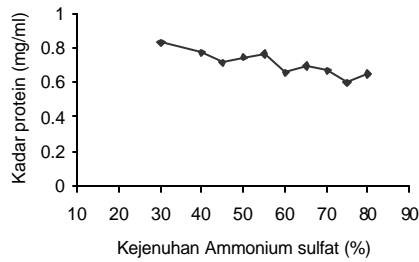
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian Enzim

Ekstrak enzim kasar dari jamur merang diperoleh dengan melakukan ekstraksi menggunakan buffer universal 50 mM pH 7, aktivitas enzim yang diperoleh sebesar 0.189 U/ml. Pada ekstrak kasar tersebut masih terdapat bahan-bahan non enzim seperti lipid, karbohidrat dan lain-lain, sehingga diperlukan tahap pemurnian selanjutnya. Tahap pemurnian selanjutnya dilakukan melalui metode pengendapan (presipitasi). Menurut Harris (1989) pengendapan terjadi oleh perubahan pH atau kekuatan ion serta adanya penambahan pelarut organik ataupun senyawa-senyawa lainnya sehingga molekul protein terkumpul. Pada penelitian ini pengendapan terjadi oleh adanya peningkatan kekuatan ion dengan penambahan garam amonium sulfat.

Presipitasi ekstrak enzim kasar dengan garam amonium sulfat, diuji pada berbagai konsentrasi kejenuhan amonium sulfat 30% sampai 80% (b/v) (Gambar 1). Konsentrasi yang dipilih adalah yang memberikan kadar protein terendah pada supernatan dengan asumsi protein telah terendapkan secara maksimal pada endapan/pelet.

Hasil dari presipitasi disebut presipitat. Aktivitas yang dihasilkan setelah melalui pengendapan oleh 75% amonium sulfat adalah 0,279 U/ml dengan aktivitas spesifik 0,184 U/mg yang berarti terjadi peningkatan kemurnian 1,28 kali dari aktivitas ekstrak kasar 0,189 U/ml dengan aktivitas spesifik 0,143 U/mg.



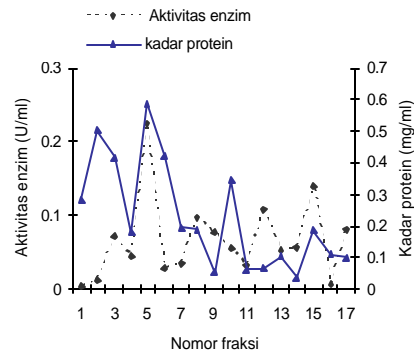
Gambar 1 Pengaruh konsentrasi amonium sulfat terhadap kadar protein pada supernatan ekstrak enzim kasar.

Dialisis merupakan tahap selanjutnya yang dilakukan untuk menghilangkan molekul garam amonium sulfat dan ion-ion pengganggu lainnya. Ion-ion pengganggu tersebut dapat mempengaruhi kestabilan molekul protein enzim selama penyimpanan. Dialisis merupakan metode yang paling dikenal untuk menghilangkan molekul pengganggu berukuran kecil (<10 KD) dan menahan molekul berukuran besar (>10 KD) (Copeland 1994).

Mekanisme yang terjadi selama dialisis adalah difusi dan osmosis. Pada awal proses dialisis, konsentrasi garam di dalam kantung dialisis yang lebih tinggi daripada di luar menyebabkan air masuk ke dalam kantung. Garam akan keluar dari kantung dialisis sampai tercapai kondisi keseimbangan yaitu konsentrasi garam di luar dan di dalam sama.

Scopes (1987) mengemukakan bahwa semua garam dan ion pengganggu yang terdapat di dalam larutan tidak dapat dihilangkan dengan satu kali dialisis saja. Oleh karena itu untuk mencapai konsentrasi garam dalam solut yang sangat rendah maka dilakukan penggantian bufer. Cara ini akan dapat dicapai kondisi keseimbangan hingga 90% dalam waktu 2 sampai 3 jam.

Hasil dialisis memberikan peningkatan aktivitas menjadi 0,308 U/ml dengan aktivitas spesifik 0,202 U/mg atau 1,41 kali lebih murni dari ekstrak kasar. Pada tahap dialisis larutan enzim mengalami pengenceran oleh larutan bufer sebagai pengganti garam di dalam kantung dialisis, sehingga konsentrasi protein menjadi menurun. Hal itu disebabkan karena selama dialisis selain mengeluarkan molekul garam juga terjadi pertukaran bufer.



Gambar 2 Fraksi protease dari jamur merang dengan kolom penukar anion DEAE- Sepharose

Hasil dialisis atau yang disebut dialisat kemudian diinjeksikan ke dalam kolom penukar anion DEAE-Sepharose *fast flow* pada laju alir 3,0 ml/ menit. Matriks *stream line* DEAE memiliki gugus dietil aminoetil yang bermuatan positif sehingga matriks ini berlaku sebagai penukar anion yang akan mengikat protein-protein bermuatan negatif berdasarkan densitas muatannya selama fraksinasi. Matriks DEAE ini merupakan fase diam sedangkan fase gerak adalah bufer tris-Cl yang akan melepaskan protein. Satu fraksi enzim muncul setelah dielusi dengan NaCl 0,5M dan 1M. Fraksi yang aktif adalah fraksi 5 dengan nilai aktivitas 0,225 U/ml (0,383 U/mg) atau 2,68 kali lebih murni dibanding ekstrak kasar. Data pemurnian enzim dapat dilihat pada lampiran 8.

Pencirian enzim

Pencirian enzim diuji secara kuantitatif dengan metode Bergmeyer (1983) yang meliputi pengaruh suhu, pengaruh pH, inhibitor, ion logam serta SDS-PAGE untuk menentukan bobot molekul dari pita protein enzim dan secara kualitatif dengan menggunakan analisis zimografi.

Penentuan Suhu Optimum

Menurut Felix (1998), terdapat beberapa parameter penting yang dapat dihitung berdasarkan aktivitas dan total protein enzim. Parameter tersebut adalah aktivitas spesifik, total aktivitas, dan presentase *yield*. Aktivitas spesifik adalah besarnya aktivitas enzim per miligram protein. Total aktivitas adalah besarnya aktivitas spesifik dikalikan total kandungan protein. Presentase *yield* adalah

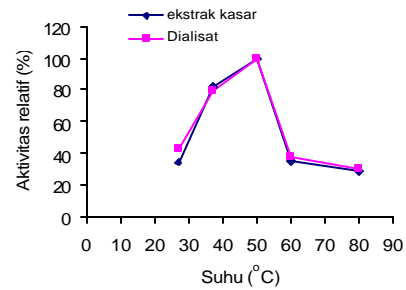
perbandingan total aktivitas tahap tertentu dengan tahap sebelumnya.

penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara mereaksikan enzim dengan substrat kasein pada berbagai suhu. Pada penelitian ini suhu yang digunakan adalah 27°C, 37°C, 50°C, 60°C dan 80°C. Untuk mengurangi atau menekan kemungkinan gangguan sisa peptida yang terbentuk selama degradasi substrat protein (kasein) maka setelah reaksi enzimatik ditambahkan senyawa pengendapan protein atau peptida yaitu TCA.

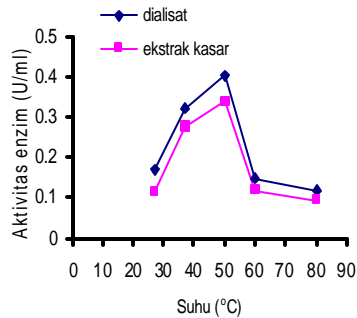
Penambahan TCA ini sekaligus akan menginaktivkan enzim protease. Asam-asam amino tirosin dan triptofan yang larut dalam TCA akan bereaksi dengan reagen folin menghasilkan warna biru. Warna yang tampak diukur absorbansinya pada daerah sinar tampak 578 nm. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi. Pada umumnya semakin tinggi suhu maka laju reaksi kimia akan semakin cepat.

Aktivitas protease jamur merang mencapai suhu optimum pada 50°C dalam 50 mM bufer universal pH 7 (Gambar 3). Suhu di bawah 50°C menunjukkan peningkatan aktivitas enzim protease sampai mencapai suhu optimum terjadinya peningkatan suhu disebabkan karena adanya peningkatan energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi, serta rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk berinteraksi (Suhartono 1992).

Sedangkan pada suhu di atas 50°C terjadi penurunan aktivitas enzim protease sampai 70% yang ditandai dengan aktivitas relatif yang diperoleh hanya 30 sampai 40% (Gambar 3). Hal ini disebabkan karena terjadi proses denaturasi yang dapat mempengaruhi sifat katalitik pada sisi aktif enzim sehingga konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan berkurang. Pada kondisi ini substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan untuk berikatan dengan sisi aktif enzim. Sebagai pembandingan protease nabati papain memiliki suhu optimum 60 sampai 75°C, bromelin pada 50°C dan Fisin pada 60°C (Suhartono 1989).



Gambar 3 Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas relatif crude dan dialisat.



Gambar 4 Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas ekstrak enzim kasar dan dialisat.

Penentuan pH optimum

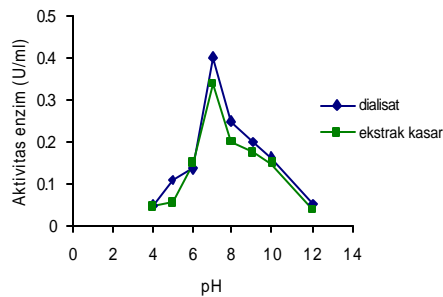
pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Hal ini akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah.

Penentuan pH optimum dilakukan pada ekstrak kasar dan dialisat. Dalam penelitian ini digunakan bufer universal yang memiliki kisaran pH 4-12. Pada gambar 5 dapat dilihat bahwa aktivitas optimum enzim protease dalam ekstrak kasar maupun dialisat terjadi pada pH 7 yaitu sebesar 0,339 U/ml untuk ekstrak kasar dan 0,401 U/ml untuk dialisat.

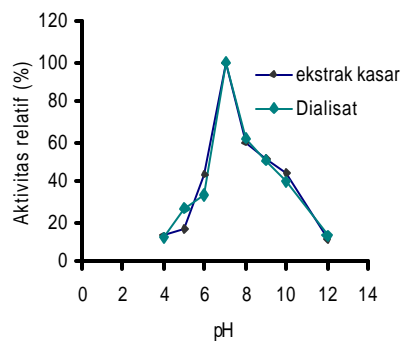
Pada pH di atas pH optimum dapat menyebabkan proses denaturasi yang menyebabkan penurunan aktivitas. Sebagai pembandingan enzim protease nabati papain memiliki kisaran pH 4,5 sampai 7, bromelin dan fisin, pada pH 5 sampai 8 (Suhartono 1989).

Perubahan pH pada skala deviasi kecil menyebabkan turunnya aktivitas enzim sehubungan dengan perubahan ionisasi gugus-gugus fungsionalnya karena enzim merupakan protein yang tersusun atas asam amino yang dapat mengalami ionisasi dan melepaskan

proton atau ion hidrogen pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lainnya. Sebaliknya, pada skala deviasi yang besar, perubahan pH akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi sehubungan dengan adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga struktur tiga dimensi enzim (felix 1998).



Gambar 5 Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak enzim kasar dan dialisat.



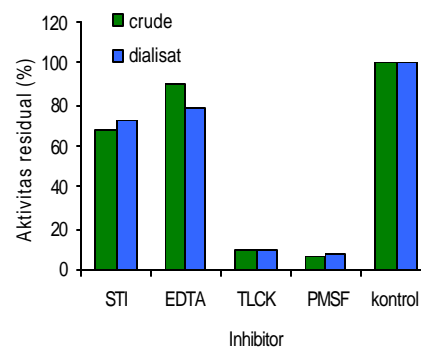
Gambar 6 Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas relatif ekstrak enzim kasar dan dialisat.

Pengaruh inhibitor

Enzim sangat peka terhadap senyawa yang diikatnya. Aktivitas enzim dapat dihambat oleh senyawa inhibitor. Berdasarkan gambar 7 dapat diketahui bahwa senyawa PMSF menghambat aktivitas protease dalam ekstrak kasar maupun dialisat dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0,033 U/ml (aktivitas residu 6,33%). Begitu juga dengan inhibitor TLCK yang menghambat aktivitas protease dengan nilai residu sebesar 9,98%. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka aktivitas enzim dihambat oleh inhibitor TLCK dan PMSF sampai 90% sehingga protease jamur merang tergolong pada protease serin. Kim et al 2005 telah

mempublikasikan bahwa SBTI, LBTI, TLCK dan PMSF merupakan inhibitor protease serin.

Senyawa STI dan EDTA tidak terlalu mempengaruhi aktivitas protease. Hal ini dapat dilihat dari gambar 7 bahwa aktivitas protease yang dihasilkan masih cukup tinggi yaitu sebesar 90,6% untuk EDTA dan 68,14% untuk STI pada ekstrak kasar sedangkan pada dialisat besarnya masing-masing 78,48% dan 72,13%. Senyawa EDTA mampu mengkelat ion logam baik yang dibutuhkan atau tidak dibutuhkan oleh enzim. Bila suatu ion logam dikelat oleh EDTA maka akan terjadi perubahan konformasi sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Ikatan inhibitor atau aktivator dengan enzim dapat mengubah kemampuan enzim untuk mengikat substrat sehingga mengubah daya katalis enzim. Hal ini disebabkan karena struktur enzim sudah mengalami perubahan fisik dan kimiawi sehingga aktivitas hayatinya pun berubah (Suhartono 1989).



Gambar 7 Kurva pengaruh inhibitor terhadap aktivitas residual ekstrak enzim kasar (crude) dan dialisat.

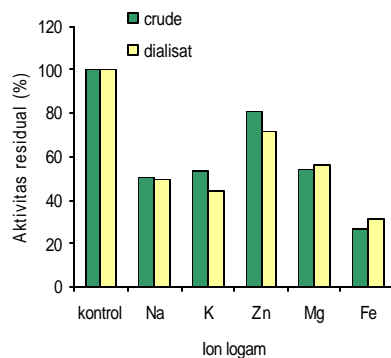
Pengaruh ion logam

Beberapa ion logam dapat memberikan pengaruh positif maupun negatif terhadap aktivitas protease. Hal ini menunjukkan bahwa enzim berinteraksi dengan ion logam baik sebagai aktivator yang dapat meningkatkan aktivitasnya maupun sebagai inhibitor yang dapat menurunkan aktivitasnya

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa protease jenis serin pada jamur merang dihambat aktivitasnya oleh logam berat seperti Fe^{3+} , dengan nilai aktivitas residual 27,05% (ekstrak kasar) dan 31,57% (dialisat). Sedangkan untuk logam-logam lain tidak banyak mempengaruhi aktivitas enzim, hal ini dapat dilihat pada gambar 8 Penambahan Zn^{2+} menaikkan aktivitas enzim pada ekstrak kasar dan dialisat dengan nilai aktivitas residual

sebesar 80,67% (ekstrak kasar) dan 72,06% (dialisat). Penambahan ion logam lain seperti logam monovalen Na^+ dan K^+ menurunkan aktivitas enzim dengan kisaran 45-55% pada ekstrak kasar maupun dialisat. Penamahan ion logam divalen Mg^{2+} menghasilkan aktivitas residual sebesar 54,11% (ekstrak kasar) dan 56,27% .

Dari hasil yang diperoleh diketahui bahwa logam trivalen seperti Fe^{3+} dapat menghambat aktivitas protease sehingga logam-logam tersebut harus dihindari terhadap enzim protease.



Gambar 8 Kurva pengaruh ion logam terhadap aktivitas residual ekstrak enzim kasar (crude) dan dialisat.

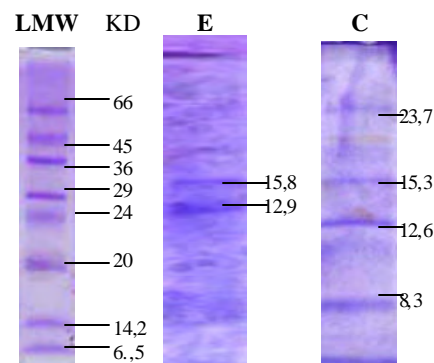
Penentuan bobot molekul enzim

Penentuan bobot molekul dari masing masing pita protein pada ekstrak kasar maupun eluat dari jamur merang dapat digunakan metode elektroforesis SDS-PAGE. Dari hasil yang didapatkan pada analisis SDS-PAGE terdapat pita protein dari enzim protease ekstrak kasar yang berjumlah empat pita dengan kisaran berat molekul 8 sampai 24 KD dengan bobot molekul masing-masing 23,7; 15,3; 12,6; dan 8,3 KD. Fraksi eluat menghasilkan dua pita protein dengan bobot molekul 15,8 KD dan 12,9 KD. Pembuatan kurva standar SDS-PAGE dapat dilihat pada lampiran 7, marker yang digunakan adalah LMW dengan bobot molekul 6,5; 14,2; 20; 24; 29; 36; 45; dan 66 KD.

Gel akrilamida diperoleh dengan cara polimerisasi akrilamida dengan adanya sejumlah *cross-linking agent* metilena bis-akrilamida dan amonium persulfat sebagai katalisator. SDS akan mendenaturasi dan menyelimuti protein enzim sehingga bermuatan negatif dan akan bergerak ke elektroda positif. Air akan mengeluarkan sisa SDS sekaligus membilas permukaan gel pemisah dari

akrilamida yang tidak terpolimerisasi. Sebelum pengisian ke dalam sumur gel, sampel enzim dan marker LMW dipanaskan pada suhu 100°C dengan tujuan agar protein terpecah atau terpotong menjadi peptida dan asam amino kemudian dilarutkan dalam bufer yang mengandung gliserol sebagai pemberat dan β -merkaptotanol sebagai pemutus ikatan disulfida protein

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *coomasie brilliant blue* yang memiliki sensitivitas yang tinggi yaitu dapat mewarnai protein dengan konsentrasi $0,5 \text{ mg/cm}^2$ (Scopes 1987). Kelebihan warna dihilangkan dengan merendam gel dalam larutan peluntur sampai diperoleh pita biru dengan latar gel putih. Bobot molekul pita protein diperoleh dengan memasukkan nilai Rf eluat maupun ekstrak kasar ke dalam persamaan kurva standar yang terdapat pada lampiran 7.



Gambar 9 Analisis SDS-PAGE ekstrak enzim kasar (C), Fraksi eluat (E) dan marker LMW.

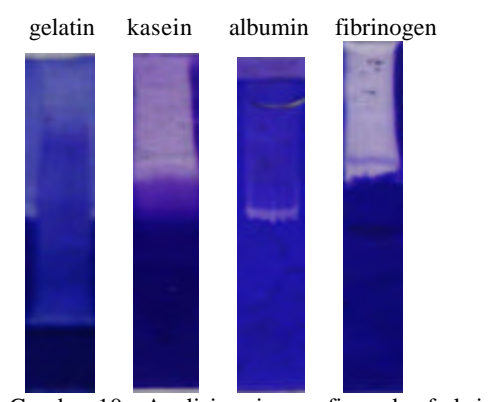
Zimografi

Pada analisis zimografi dilakukan untuk mengetahui aktivitas proteolitik (substrat kasein), aktivitas fibrinolitik (substrat fibrin), gelatin, dan albumin. Substrat tersebut akan didegradasi oleh enzim protease dengan ditandai adanya pita bening berlatar belakang biru (kebalikan dari hasil analisis SDS-PAGE).

Analisis zimografi merupakan analisis kualitatif karena hanya dilihat dari ada atau tidaknya pita yang dihasilkan dari hasil degradasi substrat. Analisis ini dilakukan dengan penambahan substrat pada gel pemisah. Substrat yang ditambahkan harus spesifik dengan enzim yang akan dianalisis. Sampel yang digunakan tidak mengalami pemanasan terlebih dahulu. Setelah proses elektroforesis

gel terlebih dahulu direnaturasi dalam triton X-100 2,5% (v/v) untuk mengembalikan keadaan awal enzim. Setelah itu gel mengalami proses digesti dengan menggunakan bufer universal 50 mM pH 7 pada suhu 50°C agar proses hidrolisis berlangsung lebih cepat dibandingkan pada suhu normal (37°C) (Yanti 2003).

Hasil analisis zimogram diperoleh bahwa spesifitas substrat kasein dan fibrin lebih tinggi dibandingkan albumin dan gelatin, yang ditandai dengan intensitas warna pita protein yang dihasilkan. Pita protein pada albumin dan gelatin tidak menghasilkan pita protein yang jelas (terang). Hal ini menandakan bahwa protease pada jamur merang lebih lebih menghidrolisis kasein dan fibrin dibandingkan albumin dan gelatin.



Gambar 10 Analisis zimografi pada fraksi eluat dengan substrat gelatin, kasein, albumin dan fibrinogen

Simpulan dan Saran

Simpulan

Karakteristik enzim protease yang berasal dari jamur merang memiliki aktivitas optimum pada suhu 50 °C, pH 7 dengan waktu inkubasi 10 menit. Enzim protease ini termasuk jenis serin karena dihambat oleh PMSF dan TLCK. Aktivitas enzim dihambat oleh adanya ion Fe³⁺. Pemurnian enzim dengan kromatografi kolom menghasilkan satu buah fraksi yaitu fraksi 5 yang dapat meningkatkan aktivitas enzim sebesar 2,68 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar.

Enzim protease memiliki aktivitas kaseinolitik dan fibrinolitik yang ditandai dengan munculnya pita putih dengan latar gel biru pada analisis zimografi. Dari analisis SDS-PAGE diperoleh empat pita protein dengan bobot molekul untuk ekstrak kasar yaitu 23,7;

15,3; 12,6; dan 8,3 KD, sedangkan untuk fraksi eluat memiliki dua pita protein dengan bobot molekul 15,8 dan 12,9 KD.

Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan pemurnian lebih lanjut yaitu filtrasi gel dan studi biokimia lebih lanjut untuk memperoleh komposisi asam amino.

DAFTAR PUSTAKA

Bergmeyer HU, Grass M. 1983. *Method of Enzymatic Analysis*. Ed ke-2. Weinheim: Verlag Chemie.

Beynon R, Bond JS, editor. 2001. *Proteolytic Enzymes: A Pratical Approach*. Ed ke-2. New York: Oxford Univ Pr.

Bradford MM. 1976 A Rapid and Sensitive Method for Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-binding *Anal Biochem* 72: 234-254.

Chang ST. 1991. *Cultivation of Volvariella volvaceae*. New York: Academic Press.

Copeland RA. 1994. *Methods of Protein Analysis: A Partical Guide to Laboratory Protocols*. London: Chapman Hall. Hlm 59-62.

Crisan EV, Sands A. 1978. *Nutrition Value*. New York: Academic Pr.

Felix F. 1998. *Characterization of Protein*. New Jersey : Human Press Pafra.

Girindra A. 1993. *Biokimia 1*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama. Hlm 91-113.

Gunawan AW. 1992. *Budidaya Jamur*. Bogor: IPB PAU Ilmu Hayat.

Harris ELU, Angal S. 1989. *Protein Purification Methods*. New York: Oxford Univ Pr.

Ingold CT. 1971. *The Biology of Fungi*. London: Hutchinson Educational.

Kusumangtyas RW. 2000. Produksi enzim protease dari *Bacillus megaterium* DSM

1. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 2. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 3. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 4. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 5. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 6. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 7. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 8. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 9. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.
 10. Melakukan penelitian mengenai enzim protease yang dihasilkan oleh jamur merang dan mengidentifikasi jenisnya.

319 dan MS 916 dengan media limbah cair tahu [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

bersifat fibrinolitik [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Lehninger A. 1993. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Thenawijaya M, Penerjemah: Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Principles of Biochemistry*.

Mitra S. 2003. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons.

Moore-Landecker E. 1982. *Fundamental of The Fungi*. New Jersey: Prentice Hall.

Nature's Impact. 1998. Benefits of Straw Mushroom: Lowers cholesterol and combats HIV. <http://www.Healthcastle.com>

Nurachman A. 1993. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Thenawidjaya M, penerjemah Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari *Principles of Biochemistry*.

Nurachman Z. 2001. Obat stroke dan jantung akibat trombosis dari cacing tanah. Seminar on-air Bioteknologi untuk Indonesia Abad 21. Jakarta: Sinergy forum-PPI Tokyo Institute of Technology [1-14 Februari 2001].

Palmer T. 1991. *Understanding Enzymes*. Ed ke-3. New York: Ellis Horwood. hlm 301-305

Roe Simon. 2001. *Protein Purification Technique A pratical Approach*. Ed ke-2. New York: Oxford Univ Pr.

Scopes RK. 1987. *Protein Purification Principles and Practice*. Ed ke-2. New York: Springer-Verlag.

Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: IPB PAU Bioteknologi.

Suhartono MT. 1992. *Protease*. Bogor: IPB PAU Bioteknologi.

Suhardiman P. 1986. *Jamur merang dan Champignon*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Winarno FG. 1983. *Enzim Pangan*. Jakarta Gramedia.

Yanti. 2003. Pemurnian dan Karakterisasi Cacing Tanah *Lumbricus rubellus* yang

LAMPIRAN

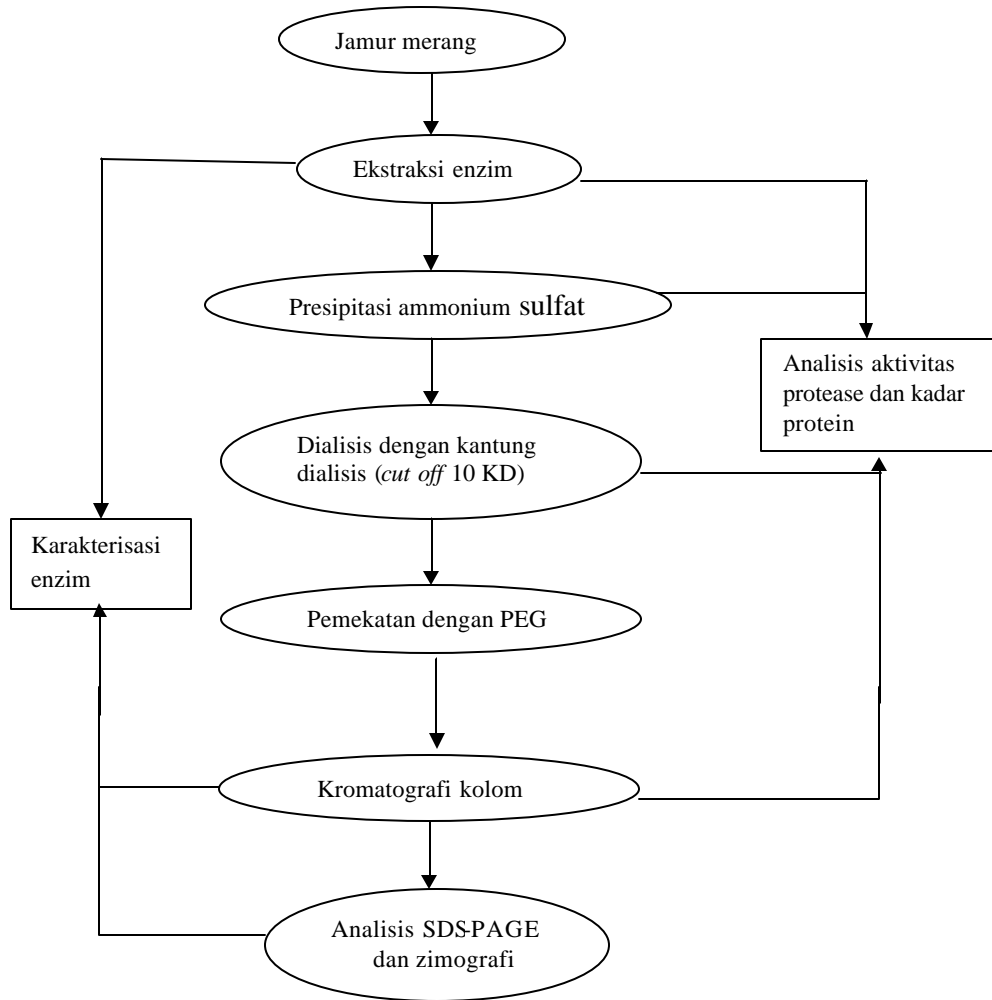
oMies cipta milik IPB University

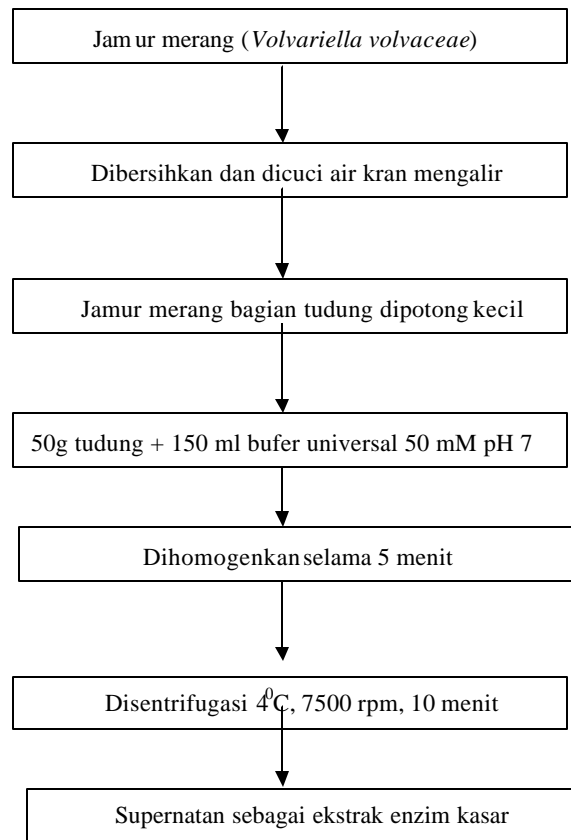
IPB University



Maka Cipta Jendrali, Undang-undang
1. Di dalam lingkungan sebagian atau seluruh karya atau tenaga penciptaannya dan merupakan sumber :
a. Pergerakan tenaga artistik kepengembangan, penemuan, penemuan karya ilmiah, penemuan kejuruan, penemuan teknik atau program atau masalah
b. Penemuan tidak merupakan kepengembangan yang wajar IPB University
2. Di dalam lingkungan dan merupakan karya atau tenaga atau dalam lingkup kepengembangan atau IPB University

Lampiran 1 Diagram alir penelitian



Lampiran 2 Diagram alir pembuatan ekstrak kasar jamur merang

Lampiran 3 Prosedur pembuatan pereaksi kimia

Pereaksi untuk analisis aktivitas enzim dan kadar protein

- Kasein Hammarsten 2% b/v
Sebanyak 1g kasein dilarutkan dalam 50 mM bufer universal pH 7 sambil diaduk dan dipanaskan (50-60°C) agar mudah larut, kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- Tirosin 5 mM
Sebanyak 0,091 g tirosin dilarutkan dalam akuades sambil diaduk kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- TCA 0,1 M
Sebanyak 1,634 g TCA dilarutkan dalam akuades sambil diaduk, kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- Na₂CO₃ 0,4 M
Sebanyak 4,2404 g Na₂CO₃ dilarutkan dalam akuades sambil diaduk, kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- Pereaksi Folin-Ciocealteau (1:2)
Sebanyak 25 ml pereaksi Folin-Ciocealteau diencerkan dengan 50 ml akuades dan diaduk hingga homogen.
- Pereaksi Bradford
Stok larutan Bradford dibuat dengan cara melarutkan 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 dalam 50 ml etanol 95% v/v dan 100 ml asam fosfat 85% v/v, lalu ditera dengan akuades hingga volume 200 ml. Larutan kerja Bradford dibuat dengan cara mengencerkan 10 ml larutan stok Bradford dengan akuades hingga volume total 100 ml.

Pereaksi untuk analisis SDS-PAGE dan Zimografi

- Larutan A (30% b/v akrilamida; 0,8% b/v bis - akrilamida)
Sebanyak 29,2 g akrilamida dan 0,8 g bis- akrilamida dilarutkan dalam 100 ml akuades dan diaduk hingga homogen.
- Larutan B (buffer gel pemisah, Tris-HCl 2M pH 8,8)
Sebanyak 75 ml buffer Tris-HCl 2 M pH 8,8 dan 4 ml larutan SDS 10% b/v ditambahkan dengan akuades hingga volume total 100 ml.
- Larutan C (bufer gel penahan, Tris-HCl 1M pH 6,8)
Sebanyak 50 ml bufer Tris-HCl 1 M pH 6,8 dan 4 ml SDS 10% b/v ditambahkan dengan akuades hingga volume total 100 ml.
- Amonium persulfat 10% (b/v)
Sebanyak 0,1 g amonium persulfat dilarutkan dalam satu ml akuades.
- Bufer elektroforesis
Sebanyak 1,803 g Tris, 8,648 g glisin dan 0,6 g SDS dilarutkan dalam 600 ml akuades, lalu ditera hingga pH 8,3 dengan HCl 1 M.

- **Bufe sampel**

Komposisi bufer sampel untuk SDS-PAGE terdiri atas 0,3 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8 dan 2,5 ml gliserol 50% (v/v), 1,0 ml SDS 10% (b/v), 0,25 ml 2-merkaptetanol, 0,5 ml bromfenol blue 1% (b/v), dan 0,45 ml akuabides dengan volume total 5 ml. Sementara komposisi bufer sampel untuk zimografi terdiri atas 0,5 g SDS, 1 ml gliserol 50% (V?V), 1 ml bromfenol blue, 0,625 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8, dan 2,375 ml akuabides dengan volume total 5,0 ml.

- **Larutan pewarna**

Sebanyak 0,5 g *Coomassie Brilliant Blue R-250* dilarutkan dalam campuran 225 ml metanol, 50 ml asan asetat glasial, dan 225 akuades dengan volume total 500 ml.

- **Larutan peluntur**

Komposisi larutan peluntur terdiri dari 50 ml metanol, 50 ml asam asetat glasial, dan 400 ml akuades dengan volume total 500 ml.

- **Triton X-100 2,5% v/v**

Sebanyak 2,5 ml larutan triton X-100 dilarutkan dengan akuades hingga volume total 100 ml.

Larutan berbagai bufer

Larutan kerja bufer 50 mM dibuat dengan cara mengencerkan 25 ml larutan stok 0.2 M dengan akuades hingga volume total 100 ml.

Bufe Universal

Larutan A : Asam sitrat (6.008 g) + KH_2PO_4 (3.895 g) + H_3PO_3 (1.769 g) + asam dietilbarbiturat (5.266 g) dilarutkan ke dalam 1 L akuades

Larutan B : 0.2 N NaOH

100 ml larutan A + X ml larutan B

X (ml)	pH
6.4	3.0
15.5	4.0
27.1	5.0
38.9	6.0
50.6	7.0
63.7	8.0
72.7	9.0
80.8	10.0
86.0	11.0
99.6	12.0

Lampiran 4 Data pengaruh suhu, pH, waktu, inhibitor, dan ion logam terhadap aktivitas protease dari ekstrak kasar jamur merang

Pengaruh suhu

Suhu (°C)	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
27	0,329	0,230	0,741	0,116	34,22
37	0,487	0,267	0,745	0,276	81,42
50	0,415	0,231	0,556	0,339	100,00
60	0,370	0,283	0,725	0,118	34,80
80	0,370	0,300	0,740	0,095	28,02

Pengaruh pH

pH	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
4	0,275	0,242	0,690	0,044	12,98
5	0,269	0,218	0,770	0,055	16,22
6	0,398	0,261	0,818	0,148	43,66
7	0,415	0,231	0,556	0,339	100,00
8	0,434	0,231	0,835	0,201	59,29
9	0,424	0,259	0,833	0,172	50,74
10	0,410	0,262	0,855	0,150	44,25
12	0,124	0,105	0,404	0,038	11,21

Pengaruh waktu

Waktu	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
5	0,177	0,165	0,495	0,021	6,19
10	0,415	0,231	0,556	0,339	100,00
15	0,300	0,165	0,439	0,296	87,31
20	0,319	0,162	0,561	0,236	69,61
30	0,180	0,165	0,257	0,097	28,61

Pengaruh inhibitor

Inhibitor	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
STI	0,447	0,172	0,637	0,355	68,14
EDTA	0,453	0,121	0,543	0,472	90,60
TLCK	0,142	0,103	0,557	0,052	9,98
PMSF	0,135	0,160	0,591	0,033	6,33
Kontrol	0,292	0,160	0,312	0,521	100,00

Pengaruh ion logam

Ion logam	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
Na ⁺	0,926	0,616	2,374	0,105	50,72
K ⁺	0,772	0,441	2,226	0,111	53,62
Zn ²⁺	0,245	0,150	0,491	0,167	80,67
Mg ²⁺	1,206	0,979	2,194	0,112	54,11
Fe ³⁺	0,589	0,447	1,952	0,056	27,05
Kontrol	0,752	0,618	1,006	0,207	100,00

Lampiran 5 Data pengaruh suhu, pH, waktu, inhibitor, dan ion logam terhadap aktivitas protease dari dialisat jamur merang

Pengaruh suhu

Suhu (°C)	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
27	0,514	0,384	0,835	0,171	42,64
37	0,429	0,240	0,594	0,320	79,80
50	0,377	0,184	0,473	0,401	100,00
60	0,415	0,310	0,729	0,150	37,41
80	0,419	0,350	0,696	0,119	29,67

Pengaruh pH

pH	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
4	0,445	0,410	0,832	0,049	12,22
5	0,485	0,383	0,954	0,107	26,68
6	0,532	0,412	0,951	0,134	33,42
7	0,377	0,184	0,473	0,401	100,00
8	0,498	0,393	0,648	0,247	61,59
9	0,491	0,253	0,964	0,201	50,12
10	0,483	0,322	0,918	0,162	40,39
12	0,425	0,380	0,895	0,052	12,96

Pengaruh waktu

Waktu	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
5	0,520	0,320	0,872	0,217	54,11
10	0,377	0,184	0,473	0,401	100,00
15	0,487	0,267	0,745	0,276	68,82
20	0,531	0,291	0,826	0,269	67,08
30	0,546	0,380	0,761	0,261	65,08

Pengaruh inhibitor

Inhibitor	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
STI	0,406	0,173	0,514	0,409	72,13
EDTA	0,501	0,181	0,603	0,445	78,48
TLCK	0,151	0,111	0,529	0,057	10,05
PMSF	0,121	0,153	0,543	0,045	7,94
Kontrol	0,711	0,382	0,730	0,567	100,00

Pengaruh ion logam

Ion logam	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residual (%)
Na ⁺	0,224	0,148	0,519	0,123	49,79
K ⁺	0,240	0,176	0,528	0,110	44,53
Zn ²⁺	0,262	0,164	0,495	0,178	72,06
Mg ²⁺	0,231	0,151	0,495	0,139	56,27
Fe ³⁺	0,247	0,192	0,614	0,078	31,57
Kontrol	0,498	0,393	0,648	0,247	100,00

Lampiran 6 Contoh perhitungan aktivitas enzim (U/ml) dan aktivitas enzim spesifik (mg/ml)

Perhitungan aktivitas enzim (U/ml)

$$\text{Aktivitas protease (U/ml)} = \frac{A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko}}}{A_{\text{standar}} - A_{\text{blanko}}} \times \frac{\text{faktor pengenceran}}{\text{waktu inkubasi}}$$

Contoh perhitungan pada suhu 50 °C selama 10 menit (ekstrak protease kasar)

$$\text{Aktivitas protease (U/ml)} = \frac{0,415 - 0,231}{0,556 - 0,231} \times \frac{6}{10} = 0,339 \text{ U/ml}$$

Perhitungan kadar protein :
Persamaan dari kurva standar

$$y = 0,641x + 0,1228 \qquad X = [\text{BSA}] \text{ mg/ml}$$

Y= Absorbansi

Contoh perhitungan kadar protein ekstrak protease kasar dengan nilai absorbansi 0.189 nm

$$y = 0,641x + 0,1228$$
$$0,189 = 0,641x + 0,1228$$
$$0,189 - 0,1228 = 0,641x$$
$$x = 0,103 \text{ mg/ml}$$

[protein] = 0,103 mg/ml

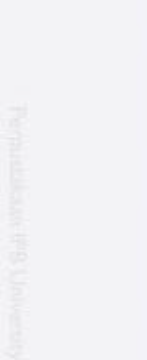
Perhitungan aktivitas spesifik (U/mg)
Aktivitas enzim spesifik (U/mg) = $\frac{\text{aktivitas enzim (U/ml)}}{[\text{protein}] \text{ (mg/ml)}}$

Contoh perhitungan pada suhu 50°C selama 10 menit (ekstrak protease kasar)

$$\text{Aktivitas enzim spesifik (U/mg)} = \frac{\text{aktivitas enzim (U/ml)}}{[\text{protein}] \text{ (mg/ml)}}$$
$$= \frac{0,339 \text{ U/ml}}{0,103 \text{ mg/ml}}$$
$$= 3,29$$

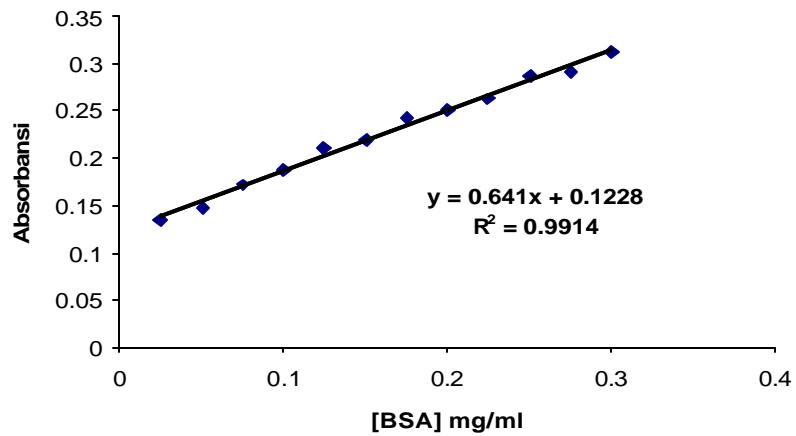


1. Menjaga lingkungan, melindungi sumber daya alam, dan melestarikan keanekaragaman hayati.
 2. Mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi yang inovatif, kreatif, dan berwawasan lingkungan.
 3. Mengembangkan sumber daya manusia yang berkualitas, berprestasi, dan berkeadilan.
 4. Mengembangkan budaya kerja yang inovatif, kreatif, dan berkeadilan.
 5. Mengembangkan budaya kerja yang inovatif, kreatif, dan berkeadilan.



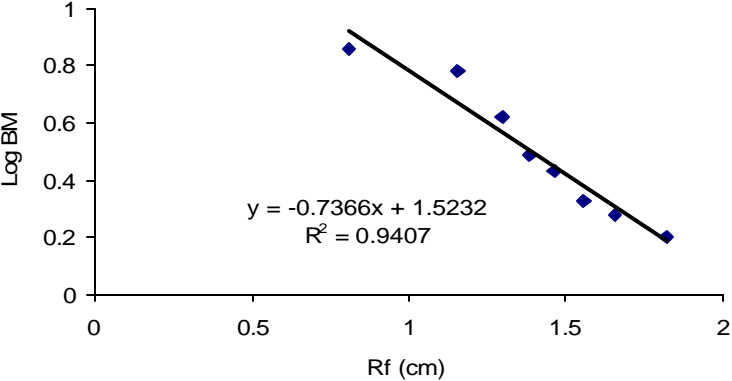
Lampiran 7 Kurva standar Bradford

[BSA] μ /ml	Absorbansi
0,025	0,135
0,050	0,147
0,750	0,172
0,100	0,189
0,125	0,211
0,150	0,220
0,175	0,243
0,200	0,251
0,225	0,262
0,250	0,288
0,275	0,292
0,300	0,313



Lampiran 7 Kurva standar SDS -PAGE

pita	Rf (cm)	BM (kDa)	Log BM
1	0,2000	66	1,8195
2	0,2727	45	1,6532
3	0,3273	36	1,5563
4	0,4364	29	1,4624
5	0,4909	24	1,3802
6	0,6182	20	1,3010
7	0,7818	14,2	1,1523
8	0,8545	6,5	0,8129



Lampiran 8 Data pemurnian enzim protease dari jamurmerang

Tahapan	Volume (ml)	A _{sampel} (nm)	A _{blanko} (nm)	A _{standar} (nm)	Aktivitas enzim (U/ml)	A _{protein} (nm)	[protein] mg/ml	Aktivitas spesifik (U/mg)	Tingkat kemurnian (kali)
Crude	200	0,268	0,164	0,495	0,189	0,971	1,324	0,143	1,000
Presipitat 75%	15	0,487	0,267	0,740	0,279	1,092	1,512	0,184	1,286
Dialisat	8	0,300	0,165	0,428	0,308	1,102	1,527	0,202	1,413
Eluat fraksi 5	1	0,319	0,162	0,581	0,225	0,581	0,587	0,383	2,681