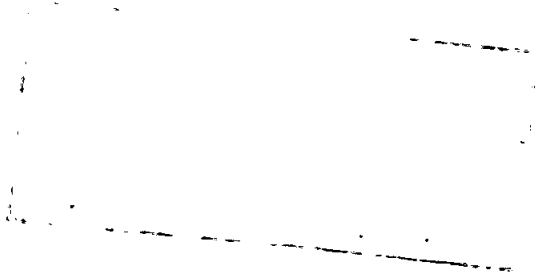




# PEMURNIAN DAN PENCIRIAN PROTEASE SERINA DARI EKSTRAK JAMUR SHIITAKE (*Lentinus edodes*)



SANTI MULYANI



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

## ABSTRAK

SANTI MULYANI. Pemurnian dan Pencirian Protease Serina dari Ekstrak Jamur Shiitake (*Lentinus edodes*). Dibimbing oleh DONDIN SAJUTHI dan YANTI.

Shiitake (*Lentinus edodes*) adalah jamur untuk kesehatan yang rendah kalori, tinggi kandungan protein, kitin, zat besi, zink, serat, asam amino esensial, vitamin, dan mineral. Jamur shiitake telah digunakan lebih dari dua ribu tahun sebagai makanan dan obat tradisional di Jepang. Penelitian ini bertujuan memurnikan dan mencirikan protease serina dari ekstrak jamur shiitake.

Ekstrak protease kasar diperoleh dengan cara ekstraksi jamur shiitake dalam 50 mM bufer universal pH 7. Ekstrak enzim dimurnikan dengan presipitasi amonium sulfat kejenuhan 70%, dialisis (*cut off* 10 kD), dan kromatografi penukar ion DEAE Sepharose. Pemurnian menghasilkan dua fraksi enzim aktif. Aktivitas spesifik tiap fraksi adalah 6,855 U/mg (fraksi 7) dan 10,098 U/mg (fraksi 19). Eluat DEAE memiliki tingkat kemurnian 1,89 dan 2,75 kali lebih tinggi terhadap ekstrak kasar dengan tingkat perolehan menurun hingga 0,4%. Hasil analisis SDS-PAGE 12% memperlihatkan fraksi protease terdiri atas 2 pita protein pada fraksi 7 (51 dan 47 kD) dan empat pita pada fraksi 19 (65, 51, 45, dan 37 kD). Aktivitas optimum protease dicapai pada suhu 50°C dan pH 7. Uji zimogram 10% memperlihatkan bahwa protease mampu menghidrolisis substrat kasein, fibrinogen, albumin, dan gelatin dengan konsentrasi 1% (b/v). Aktivitas enzim protease kasar meningkat dengan adanya penambahan ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Fe}^{3+}$  (5 mM). Protease ekstrak kasar dihambat spesifik oleh inhibitor fenilmetilsulfonilklorida, *N-p*-tosil-L-lisin klorometilketon, dan *soybean trypsin inhibitor* sehingga digolongkan ke dalam kelompok protease serina serupa tripsin.

## ABSTRACT

**SANTI MULYANI.** Purification and Characterization of a Serine Protease from an Extract of Shiitake Mushroom (*Lentimus edodes*). Under the direction of DONDIN SAJUTHI and YANTI.

Shiitake (*Lentimus edodes*) is healthful mushrooms which contains low calories, proteins, chitins, zinks, dietary fiber, essential amino acids, vitamins, and minerals. Shiitake has been used for over 2,000 years as a food and medicine in Japan. The purpose of the research was to study the purification and characterization of a serine protease from an extract of shiitake mushroom.

The crude enzyme was obtained after the mushroom was extracted with 50 mM buffer universal at pH 7,0. The extract of protease was purified using ammonium sulfate 70% saturation, dialyzed (cut-off 10 kD), and ion-exchange chromatographed using DEAE Sepharose. The process resulted two active fractions. The specific activity of the purified enzymes were 6,855 U/mg (fraction 6) and 10,098 U/mg (fraction 19). It was purified to 1,89 and 2,75 fold higher than that of the crude extract with a yield of 0,4%. The enzyme revealed to have two protein bands at fraction 6 (51 and 47 kD) and four protein bands at fraction 19 (65, 51, 45, and 37 kD). The optimum pH and temperature were 7 and 50°C, respectively. Protease effectively hydrolyzed casein, fibrinogen, albumin, and gelatin at 1% concentration by zymogram 10%. The protease enzyme activity increased by the addition of Na<sup>+</sup> dan Fe<sup>3+</sup> ions (5 mM). This enzyme was inhibited strongly by phenylmethylsulphonylfluoride, *N-p*-tosil-L-lisin klorometilketon, and soybean trypsin inhibitor, indicating that it is a trypsin-like serine protease.



# **PEMURNIAN DAN PENCIRIAN PROTEASE SERINA DARI EKSTRAK JAMUR SHIITAKE (*Lentinus edodes*)**

@HikmahIPB

IPB University

**SANTI MULYANI**

Skripsi  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Sains pada  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

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

Halaman ini adalah bagian dari dokumen yang telah diproses secara otomatis oleh sistem IPB University. Untuk informasi lebih lanjut, silakan kunjungi website IPB University di [www.ipb.ac.id](http://www.ipb.ac.id).  
Halaman ini adalah bagian dari dokumen yang telah diproses secara otomatis oleh sistem IPB University. Untuk informasi lebih lanjut, silakan kunjungi website IPB University di [www.ipb.ac.id](http://www.ipb.ac.id).



Judul : Pemurnian dan Pencirian Protease Serina dari Ekstrak Jamur Shiitake  
(*Lentimus edodes*)  
Nama : Santi Mulyani  
NIM : G44201021

@Hack you with IPB University

Menyetujui:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

**Prof. drh. Dondin Sajuthi, MST., Ph.D.**  
NIP 130536684

**Yanti, M.Si.**  
NIP 120041094

Mengetahui:

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Pertanian Bogor



**Yonny Koesmaryono, MS.**  
NIP 131473999

Tanggal Lulus:

## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya sehingga penelitian dengan judul "Pemurnian dan Pencirian Protease Serina dari Ekstrak Jamur Shiitake (*Lentinus edodes*)" dapat diselesaikan. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni sampai November 2005 di Laboratorium Biokimia, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Atma Jaya.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak Prof. drh. Dondin Sajuthi, MST., Ph.D. dan Ibu Yanti, M.Si. selaku pembimbing, serta dr. Irma H. Suparto, MS, yang telah banyak memberi bimbingan dan pengarahan dalam penyelesaian tugas akhir ini. Terima kasih kepada Fakultas Teknobiologi Atma Jaya yang telah memberi kesempatan untuk melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia. Penghargaan juga penulis sampaikan kepada Pak Yudi di Laboratorium Biokimia, Pak Bambang, Pak Nurdin, dan Pak Ridwan atas bantuannya selama penelitian. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada keluarga tercinta, bapak, ibu, serta seluruh keluarga atas dorongan semangat, perhatian, doa, dan kasih sayangnya. Terima kasih penulis ucapkan kepada rekan-rekan kerja di laboratorium atas kerja samanya, Tina, Epi, Aci, T'Suci, M'Efa, M'Frida, Leny, Wati, At-taufaul, D5, Sekar, Sri, rekan-rekan seperjuangan Ligan '38, *ikhwan* dan *akhwat* Al-Ghifari yang telah memberikan kekuatan *ukhuwah*, teman-teman kimia '38, serta Fusi '38, atas kebersamaan, dukungan, dan tali persaudaraannya.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat.

Bogor, Januari 2006

*Santi Mulyani*

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Tasikmalaya pada tanggal 17 Mei 1983 dari ayah Otoh Jumar, S.Pd. dan ibu Euis Cicih. Penulis merupakan putri pertama dari lima bersaudara.

Tahun 2001 penulis lulus dari SMU Negeri 2 Indihiang dan pada tahun yang sama lulus seleksi masuk IPB melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB. Penulis memilih Program Studi Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Pada tahun 2004 penulis melaksanakan Praktik Lapangan di Laboratorium Cipaku Perusahaan Daerah Air Minum Tirta Pakuan, Kota Bogor.

Selama mengikuti perkuliahan, penulis menjadi asisten di mata kuliah Pendidikan Agama Islam pada tahun ajaran 2003/2004 dan 2004/2005. Penulis juga aktif dalam kepengurusan Ikatan Mahasiswa Kimia FMIPA IPB sebagai staf Keluarga Islam Kimia periode 2002-2003 dan Wahana Islam Kimia pada periode 2003-2004, serta pengurus harian DKM Al-ghifari IPB 1426 H.



# DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
PENDAHULUAN.....	1
<b>TINJAUAN PUSTAKA</b>	
Jamur Shiitake ( <i>Lentinus edodes</i> ).....	1
Protease Jamur Shiitake.....	3
Pemurnian Enzim.....	3
SDS-PAGE dan Zimografi.....	4
Kromatografi Kolom.....	4
<b>BAHAN DAN METODE</b>	
Bahan dan Alat.....	5
Metode Penelitian.....	5
<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
Pemurnian protease shiitake.....	7
Karakterisasi protease shiitake.....	10
<b>SIMPULAN DAN SARAN</b>	
Simpulan.....	16
Saran.....	16
DAFTAR PUSTAKA.....	16
LAMPIRAN.....	18



## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
1 Jamur Shiitake.....	2
2 Pengaruh konsentrasi amonium sulfat terhadap kadar protein pada supernatan ekstrak shiitake .....	8
3 Fraksi protease shiitake dengan kolom penukar anion DEAE-Sepharose Fast Flow .....	9
4 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease kasar shiitake .....	10
5 Pengaruh pH terhadap aktivitas protease kasar shiitake .....	11
6 Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas protease kasar shiitake .....	11
7 Struktur kimia beberapa pereaksi yang digunakan dalam analisis SDS-PAGE.....	12
8 Analisis SDS-PAGE 12% pada protease kasar shiitake (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e <sub>7</sub> ), fraksi 19 (e <sub>19</sub> ), dan marker HMW (m).....	12
9 Pengaruh inhibitor EDTA 0,01 mM, PMSF 0,01 mM, TLCK 0,1 mM, dan STI 0,01 mg/ml terhadap aktivitas protease kasar dan dialisat shiitake .....	13
10 Pengaruh ion logam (5 mM) terhadap aktivitas protease kasar dan dialisat shiitake .....	14
11 Spesifitas substrat protein (1%) terhadap aktivitas protease kasar dan dialisat shiitake .....	14
12 Zimogram gelatin 10% terhadap protease kasar (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e <sub>7</sub> ), dan fraksi 19 (e <sub>19</sub> ).....	15
13 Zimogram kasein 10% terhadap protease kasar (c), presipitat (p), dialisat (d), dan fraksi 7 (e <sub>7</sub> ).....	15
14 Zimogram albumin 10% terhadap protease kasar (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e <sub>7</sub> ), dan fraksi 19 (e <sub>19</sub> ).....	15
15 Zimogram fibrinogen 10% terhadap protease kasar (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e <sub>7</sub> ), dan fraksi 19 (e <sub>19</sub> ).....	15

## DAFTAR TABEL

		<b>Halaman</b>
1	Analisa proksimat jamur shiitake .....	2
2	Kandungan asam amino jamur shiitake .....	2
3	Kandungan vitamin dan mineral jamur shiitake (mg/100 g bahan kering) .....	2
4	Komposisi gel pemisah dan gel penahan untuk SDS-PAGE dan zimografi .....	7
5	Hasil pemurnian enzim protease shiitake .....	9
6	Nilai bobot molekul protease shiitake hasil SDS-PAGE 12% .....	12
7	Data karakteristik protease shiitake .....	16

## DAFTAR LAMPIRAN

		<b>Halaman</b>
1	Diagram alir pemurnian protease shiitake .....	19
2	Jumlah amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam larutan untuk menghasilkan kejenuhan akhir yang diinginkan pada 0°C .....	20
3	Hasil penentuan aktivitas maksimum enzim protease kasar shiitake .....	21
4	Hasil pemurnian enzim protease shiitake .....	22
5	Hasil karakterisasi enzim protease shiitake .....	23
6	Kurva standar Bradford .....	25
7	Prosedur pembuatan pereaksi kimia .....	26

## PENDAHULUAN

Jamur pangan merupakan salah satu komoditas bahan makanan bergizi tinggi yang rendah kolesterol. Beberapa jamur pangan komersial antara lain: jamur merang (*Volvarela volvaceae*), jamur shiitake (*Lentinus edodes*), jamur shimeji (*Pleurotus sp.*), jamur champignon (*Agaricus bisporus*), jamur kuping hitam (*Auricularia polytricha*), jamur maitake (*Grifola frondosa*), jamur merah atau ling-zhi (*Ganoderma lucidum*), jamur hiratake (*Agrocybe aegerita*), jamur tauge atau enokitake (*Flammulina velutipes*), dan jamur kuping putih (*Tremella fusiformis*). Karena nilai jualnya yang ekonomis, saat ini kelompok jamur pangan tertentu seperti jamur shiitake, shimeji, champignon, merang, dan kuping sudah banyak dibudidayakan secara luas di negara Asia, khususnya Indonesia, Cina, Thailand, dan Malaysia.

Jamur merupakan salah satu makanan alternatif bagi para vegetarian. 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 komoditas pangan, beberapa jamur pangan diketahui mengandung senyawa bioaktif yang bisa menyembuhkan berbagai penyakit generatif. Di Cina, penggunaan jamur sebagai alternatif obat tradisional sudah dimulai sejak dua ribu tahun silam (Anonim 2000). Para ahli meyakini selain dapat merangsang sistem kekebalan, jamur juga mampu menaklukkan kanker serta kolesterol tinggi (Nature's Impact 1998).

Salah satu jamur yang terkenal di Jepang adalah shiitake (*L.edodes*). Jamur ini digunakan sebagai makanan dan obat tradisional di Jepang sejak dua ribu tahun yang lalu. Tudung jamur shiitake mengandung senyawa polisakarida yaitu lentinan yang bersifat sebagai imunomodulator sehingga dapat digunakan sebagai obat antikanker dan antitumor (Boock 2000). Campuran jamur shiitake dengan bahan umbi-umbian seperti wortel dan lobak yang diramu dalam bentuk sup dapat bermanfaat sebagai obat antikanker. Dalam ilmu pengobatan tradisional Cina, jamur shiitake juga dipercaya mampu melancarkan peredaran darah dalam tubuh sehingga bisa bermanfaat untuk melawan serangan penyakit jantung. Konsumsi jamur shiitake diyakini mampu menurunkan kekentalan darah dan menghindari penyumbatan pembuluh darah di otak. Sehubungan dengan khasiatnya tersebut,

maka jamur diduga mengandung komponen enzim protease tertentu yang bisa membantu proses penguraian darah kental atau beku, yaitu protease fibrinolitik. Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin atau fibrinogen (Nurachman 2001). Dalam tubuh, enzim fibrinolitik atau plasmin diproduksi oleh sel endotel dalam saluran pankreas. Seiring dengan penambahan usia dan juga pola konsumsi pangan yang tidak seimbang, maka produksi plasmin alami oleh tubuh akan semakin berkurang sehingga kerja sistem fibrinolitik dalam tubuh akan terganggu. Bila hal ini berlangsung terus secara berkala maka akan memicu timbulnya penyakit trombotosis yang akhirnya mengarah pada berbagai penyakit degeneratif seperti stroke, aterosklerosis, hipertensi, dan diabetes.

Umumnya sumber enzim fibrinolitik berasal dari manusia (plasmin dan urokinase), hewan (lumbrokinase dan desmoteplase), tanaman (natokinase dan papain), serta mikroorganisme atau bakteri (streptokinase dan stafilokinase). Sejauh ini informasi sumber protease fibrinolitik yang diekstrak dari jamur pangan masih terbatas sehingga diperlukan penelitian tentang kemungkinan adanya senyawa protein enzim khususnya protease.

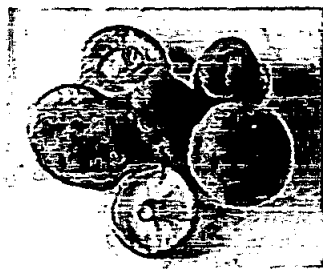
Penelitian ini bertujuan melakukan pemurnian dan pencirian enzim protease serina dari ekstrak jamur shiitake. Diharapkan data karakteristik enzim tersebut dapat dijadikan informasi dasar untuk pemanfaatan jamur pangan sebagai alternatif protein hewani yang kaya enzim untuk peningkatan kualitas kesehatan masyarakat, terutama pada kelompok usia lanjut.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Jamur Shiitake (*Lentinus edodes*)

Jamur shiitake merupakan salah satu jamur pangan yang telah dibudidayakan untuk kebutuhan konsumsi di seluruh dunia. Shiitake disebut juga jamur shii, hioko, donko, shiang-gu, shiang-ku, dan *chinese black mushroom*. Di Indonesia shiitake dikenal dengan nama jamur kayu cokelat atau jamur payung (Suhardiman 1998). Shiitake telah memiliki sejarah panjang sebagai jamur berkhasiat obat, dapat dimakan mentah atau disajikan sebagai bahan sayuran serta makanan olahan lainnya. Jamur shiitake memiliki nama latin *Lentinus edodes*.

Secara morfologi shiitake mempunyai batas tudung buah berbentuk tudung bulat atau seperti payung dengan warna tudung cokelat sampai cokelat gelap seperti terlihat pada Gambar 1. Lebar tudung bervariasi antara 2,5-9 cm dan memiliki selaput kutikula. Pada bagian bawah tudung terdapat lamela atau insang yang berisi spora. Tangkai atau batang berwarna putih atau berwarna sama seperti tudungnya dan sedikit agak keras. Panjang tangkai tudung 3-9 cm dan diameternya 0,5-1,5 cm (Suhardiman 1991).



Gambar 1 Jamur Shiitake.

Klasifikasi jamur shiitake (Ingold 1971):

- divisi : Thallophyta
- subdivisi : Eumyces
- kelas : Basidiomycetes
- ordo : Agaricales
- famili : Tricholomataceae
- genus : *Lentinula*
- spesies : *Lentinus edodes*

Komposisi utama nutrisi jamur terdiri dari protein, asam lemak tak jenuh, dan karbohidrat (Tabel 1). Tabel 2 memperlihatkan bahwa jamur mengandung 9 jenis asam amino essensial bagi tubuh yaitu lisin, metionin, triptofan, teronin, valin, leusin, isoleusin, histidin, dan fenilalanin. Karbohidrat jamur disimpan dalam bentuk glikogen dan kitin. Jamur kaya akan vitamin di antaranya B<sub>1</sub> (tiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), niasin dan biotin (Tabel 3). Selain itu, jamur mengandung berbagai jenis mineral di antaranya K, P, Fe, Ca, Mg, Mn, Zn, dan Cu (Medicinal Mushroom 2001).

Tabel 1 Analisis proksimat shiitake (FAO 1972)

Proksimat	Shiitake segar	Shiitake kering
Kadar air (%)	91,8	15,8
Protein (%)	13,4	10,3
Lemak (%)	4,9	1,9
Karbohidrat (%)	78,0	52,3
Kadar abu (%)	3,7	5,5

Tabel 2 Kandungan asam amino shiitake (FAO 1972)

Asam amino	Jamur shiitake
Isoleusina	218
Leusina	348
Lisina	174
Metionina	87
Sistina	-
Fenilalanina	261
Tirosina	174
Treonina	261
Triptofan	-
Valina	261
Arginina	348
Histidina	87
Alanina	305
Asam aspartat	392
Asam glutamat	1349
Glisina	218
Prolina	218
Serina	261
Total asam amino essensial	1748
Total asam amino	4962

Tabel 3 Kandungan vitamin dan mineral shiitake (mg/100 g bahan kering) (FAO 1972)

Kandungan vitamin dan mineral	Shiitake kering	Shiitake basah
Tiamin	0,4	7,8
Riboflavin	0,9	4,9
Niasin	11,9	54,9
Vitamin C	0	0
Kalsium	98	12
Fosfor	476	171
Besi	8,5	4,0
Natrium	61	19

Pada tahun 1969 para ilmuwan Institut Penelitian Nasional yang berpusat di Tokyo mengisolasi komponen polisakarida dari shiitake yang dinamakan lentinan (Nature's Impact 1998). Lentinan sudah diakui sejak lama sebagai zat antitumor dan antikanker serta dapat menurunkan kadar gula maupun kadar kolesterol dalam darah. Senyawa ini bekerja menghambat pertumbuhan tumor dengan sistem kekebalan sehingga tidak bersifat toksik terhadap manusia meskipun dalam dosis tinggi. Ekstraknya juga terbukti secara nyata dapat menghambat pertumbuhan virus flu. Pada tahun 1970 para peneliti di Jepang menemukan bahwa asam amino yang terkandung dalam jamur shiitake dapat membantu memproses kolesterol di dalam

hati (Nature's Impact 1998). Pada tahun 1980 ditemukan bahwa jamur shiitake ternyata sangat berkhasiat untuk mengobati penyakit hepatitis B karena kemampuannya memproduksi zat antibodi (Anonim 2000).

### Protease Jamur Shiitake

Kelompok protease atau proteinase bersifat kompleks baik dalam daya katalisisnya maupun sifat-sifat fisika kimianya. Golongan enzim ini diproduksi secara ekstraseluler maupun intraseluler, serta memainkan peran penting didalam proses-proses metabolisme sel dan regulasinya (Subartono 1992). Enzim protease merupakan golongan enzim yang termasuk kelas hidrolase, artinya mengkatalisis pemecahan biomolekul atau ikatan peptida pada protein dengan bantuan air. Protease terdiri dari proteinase dan peptidase. Proteinase mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen polipeptida dan asam amino, sementara peptidase mengkatalisis hidrolisis peptida menjadi asam amino.

Klasifikasi protease berdasarkan mekanisme kerjanya terdiri dari: (a) protease serina yang memiliki residu serina pada sisi aktifnya dan dihambat oleh diisopropil fluorofosfat (DFP) dan fenilmetil sulfonyl fluorida (PMSF), (b) protease sisteina yang memiliki gugus tiol (-SH) pada sisi aktifnya dan hanya akan aktif jika ada senyawa pereduksi seperti HCN/sisteina, (c) metaloprotease yang aktivitasnya tergantung dari kation divalen dan dihambat oleh senyawa pengkelat EDTA (etilena diamina tetra asetat), (d) protease asam aspartat yang memiliki residu asam aspartat pada situs aktifnya dan dihambat oleh DAN (diazasetil-DL-norleusin metil ester) (Rao *et al.* 1998).

Jamur shiitake mampu melancarkan peredaran darah dan digunakan sebagai obat tradisional Cina untuk melawan serangan penyakit jantung. Jamur ini mampu menurunkan kekentalan darah serta menghindari penyumbatan pembuluh darah di otak sehingga diduga mengandung komponen enzim protease tertentu yang bisa membantu proses penguraian darah kental atau beku, yaitu protease fibrinolitik. Penyakit trombotik disebabkan oleh penggumpalan darah di otak (*cerebral stroke*) maupun di jantung (*myocardial infarction*) dapat mengakibatkan cacat bahkan kematian. Serat fibrinogen adalah komponen protein utama di dalam darah beku (gumpalan darah). Gumpalan darah ini bisa dihancurkan oleh enzim-enzim

fibrinolitik. Pada mamusia, reaksi penguraian serat-serat fibrin terjadi melalui kerja enzim plasmin. Plasmin terdapat di aliran darah dalam bentuk tidak aktif atau zymogen dinamakan plasminogen. Kegagalan mendegradasi gumpalan darah ditemukan pada penyakit trombotik (Nurachman 2001). Penggunaan enzim-enzim fibrinolitik dalam medis adalah metode efektif yang dipakai dalam terapi penyakit trombotik secara oral.

### Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim bertujuan mengisolasi enzim murni dengan 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.

Ekstraksi enzim bertujuan memisahkan enzim dari sumbernya. Proses ekstraksi bergantung pada sumber dan lokasi enzim. Berbagai metode ekstraksi enzim intraseluler yang umum dilakukan di antaranya homogenisasi, sonikasi, *freeze-thawing*, penambahan detergen, lisosim, 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, polimer, dialisis, ultrafiltrasi, dan liofilisasi. Pemekatan enzim protease dilakukan dengan garam amonium sulfat karena memiliki solubilitas yang tinggi, tidak bersifat toksik, harganya murah, dan tidak mempengaruhi struktur protein (Roe 2001). Sementara presipitasi dengan pelarut organik cenderung mendenaturasi protein pada suhu agak tinggi, harganya mahal, dan mudah terbakar. Sisa garam dari presipitasi enzim dihilangkan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan sehingga konsentrasi enzim bebas garam dapat dimurnikan lebih lanjut melalui fraksinasi enzim.

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

kromatografi kolom bergantung pada sifat protein enzim yang ingin dipisahkan.

## Kromatografi Kolom

### SDS-PAGE dan Zimografi

Elektroforesis adalah suatu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi suatu campuran berdasarkan pergerakan partikel koloid yang bermuatan di bawah pengaruh medan listrik. Cara elektroforesis telah digunakan untuk analisis virus, asam nukleat, enzim, protein lain, dan molekul-molekul organik dengan bobot molekul rendah seperti asam amino. Di dalam larutannya, protein enzim akan bermuatan bergantung pada pH larutan dan titik isoelektrik enzim.

Keberhasilan elektroforesis dicapai dengan penggunaan medium yang mengurangi atau mencegah terjadinya konveksi dan tidak bereaksi dengan sampel atau menghambat pergerakan sebagai akibat terjadinya ikatan antara sampel dengan matriks. Dalam hal ini, poliakrilamida merupakan medium yang secara kimiawi bersifat inert. Gel poliakrilamida diperoleh dengan cara polimerisasi poliakrilamida dengan adanya sejumlah kecil *cross-linking agent* metilena bis-akrilamida dan amonium persulfat yang juga bertindak sebagai inisiator terutama dalam mengawali terjadinya polimerisasi.

Pengukuran aktivitas spesifik enzim dan konsentrasi protein dapat memberikan informasi akan perkembangan dalam pematangan dan ketahanan enzim. Akan tetapi data tersebut tidak selalu menunjukkan keadaan katalitik enzim subjek karena adanya kontaminan, isozim, dan enzim hidrolitik lain. Untuk menghilangkan kekurangan tersebut diusahakan penampakan aktivitas enzim secara *in situ* setelah elektroforesis melalui reaksi spesifik enzim-substrat yang dikenal sebagai teknik zimogram. Zimografi bertujuan menganalisis aktivitas proteolitik (Liota dan Stetter 1990).

Menurut Scopes (1987), teknik penentuan enzim subjek pada komponen hasil elektroforesis disebut sebagai teknik penandaan enzim spesifik (*specific enzyme staining*). Mekanisme kerja zimografi sama dengan SDS-PAGE namun pada gel pemisah ditambahkan suatu substrat protein (kasein, fibrinogen, albumin, dan gelatin) yang akan berkopolimerisasi 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 adalah suatu metode pemisahan yang dapat digunakan untuk memisahkan suatu komponen dari komponen lainnya atau memisahkan suatu komponen dari sekumpulan komponen lainnya. Metode kromatografi merupakan teknik yang efektif dan dapat digunakan untuk memisahkan komponen yang sulit dipisahkan dengan metode lain. Secara umum kromatografi didefinisikan sebagai suatu proses yang berdasarkan kepada distribusi (pembagian atau partisi) yang bersifat diferensial dari komponen sampel di antara dua fase. Salah satu fasa disebut fase diam atau stasioner yang bertugas menahan gerakan komponen sedangkan yang lainnya disebut fase mobil atau fase gerak yang bertugas menggerakkan komponen di antara fase stasioner.

Dalam bentuk pemisahan dan pemurnian protein dikenal empat macam kromatografi diantaranya kromatografi afinitas (*affinity chromatography*), kromatografi gel filtrasi (*gel filtration*), kromatografi pemutar ion (*ion exchange chromatography*), kromatografi interaksi hidrofobik (*hydrophobic interaction chromatography*) (Roe 2001). Kromatografi pemutar ion biasa digunakan untuk memastikan kemurnian dari produk akhir. Teknik ini sesuai untuk analisis karena memiliki resolusi yang tinggi dan waktu pemisahan yang lebih singkat. Analisis kemurnian dengan kromatografi pemutar ion berdasarkan sifat amfoter dari protein yaitu memiliki muatan positif dan muatan negatif dengan total muatan tergantung dari pH lingkungan. Pemilihan kolom *ion exchange* berdasarkan titik isolistrik (pI) dan stabilitas pH dari molekul protein tersebut. Pada nilai pH di atas pI maka molekul akan memiliki muatan negatif sehingga kolom yang sesuai untuk digunakan adalah pemutar anion. Apabila di bawah pI maka molekul bermuatan positif dan yang harus digunakan adalah kolom pemutar kation (Roe 2001).

Gugus fungsi pemutar anion atau kation dibedakan sebagai gugus lemah atau kuat berdasarkan pengaruh pH pada muatan gugus fungsinya. Pemutar anion lemah yang biasa digunakan adalah dietilaminoetil (DEAE). Prinsip dasar teknik pemutar 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.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah jamur shiitake dari pasar swalayan di Jakarta, kasein Hammersten (Merck), pereaksi Bradford, standar L-tirosin (Merck), *bovine serum albumin fraction V* (Merck), amonium sulfat teknis, bufer universal pH 3-12, *trichloro acetic acid* (TCA) 0,1 M, pereaksi Folin Ciocalteu (1:2), garam NaCl *step wise*, bufer tris-HCl pH 7, larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4 M, etilenadiaminetraasetat (EDTA), inhibitor fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF), N-p-tosil-L-lisin klorometilketon (TLCK), *soybean trypsin inhibitor* (STI), pereaksi elektroforesis (akrilamida, metilen bis-akrilamida, bromfenol biru, amonium persulfat, tetraetilmetilendiamina (TEMED), *coomassie brilliant blue R-250*, tris, dan *sodium dodecyl sulfate*), triton X-100 2,5% (v/v), standar marker *high molecular weight*, sampel protein (fibrinogen, gelatin, albumin), serta ion logam (KCl, NaCl, LiCl, CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, dan AlCl<sub>3</sub>).

Alat-alat yang dipakai antara lain spektrofotometer UV/VIS Optima, sentrifugasi mikro berpendingin Beckmann, inkubator Memmert, pH meter Orion, *deep-freezer*, kantung dialisis *cutt-off* 10 kD Sigma, kolom *weak anion exchanger DEAE Sepharose Fast Flow* Amersham Bioscience, perangkat sel elektroforesis Bio Rad, tabung eppendorf, mikro pipet Bio Rad beserta tipnya, neraca analitik Fisher Scientific, tabung mikro, dan alat-alat gelas lainnya.

### Metode Penelitian

#### Pembuatan ekstrak enzim kasar

Jamur pangan dicuci dengan air kran mengalir kemudian dipotong kecil-kecil. Jamur diekstrak dalam bufer universal 50 mM pH 7 lalu dihomogenkan selama 5 menit. Campuran tersebut disentrifusi pada kecepatan 4245 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) menggunakan substrat kasein Hammarsten 2% (b/v). Ada tiga perlakuan analisis yang dilakukan yaitu blanko, standar, dan sampel. Sebanyak 50 µl larutan enzim ditambahkan ke dalam tabung *eppendorf* yang berisi 250 µl 50 mM bufer universal pH 7 dan 250 µl kasein 2% (b/v) sebagai substrat. Perlakuan pada blanko dan standar, enzim digantikan dengan akuades dan tirosin 5 mM.

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 suhu 37°C selama 10 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 6384 g selama 10 menit untuk memisahkan asam-asam amino yang tidak mengendap.

Sebanyak 375 µl supernatan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1250 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M dan 250 µl pereaksi Folin Ciocalteu, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit untuk optimasi pewarnaan. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang 578 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu µmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran.

#### Analisis kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) berdasarkan pengikatan protein oleh senyawa pewarna *coomassie brilliant blue*. Sebanyak 100 µl 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. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm.

Standar protein yang digunakan adalah *bovine serum albumin fraction V* (BSA). Pada kurva standar protein, larutan enzim digantikan dengan BSA dengan kisaran konsentrasi 0-0,3 mg/ml. Konsentrasi protein larutan enzim ditentukan berdasarkan persamaan garis linear hubungan antara

konsentrasi standar protein dengan serapan larutan.

### Pemurnian protease

Ekstrak enzim kasar dipresipitasi dengan amonium sulfat. Konsentrasi garam yang optimal diperoleh dengan pengujian kadar protein hasil presipitasi pada kejenuhan 30-80% (b/v) (Lampiran 2). Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit lalu disentrifugasi pada kecepatan 4245 g dan suhu 4°C selama 10 menit. Pelet yang dihasilkan kemudian dilarutkan dalam 50 mM bufer universal pH 7 dan didialisis dalam bufer universal pH 7 (20 mM dan 50 mM) selama tiga kali menggunakan kantung dialisis nitroselulosa asetat (*cut-off* 10 kD) (25 mm x 16 mm) (Sigma-Aldrich) sambil diagitasi.

Dialisat dipekatan dengan teknik pengeringbekuan menggunakan polietilena glikol (PEG) dan diinjeksikan ke dalam kolom HiTrap IEX DEAE Sepharose *Fast Flow* (anion lemah). Sistem kromatografi disiapkan diantaranya pompa peristaltik, *fraction collector*, dan kolom *weak anion exchanger DEAE Sepharose Fast Flow*. Kolom diisi dengan *start bufer* yaitu larutan bufer Tris-Cl pH 7 konsentrasi 50 mM sampai pH di dalam kolom menunjukkan pH 7. Hal yang harus dihindari adalah masuknya udara ke dalam kolom. Kolom dicuci dengan 10 ml bufer Tris-Cl pada laju alir 3,0 ml/menit. Bufer elusi sebanyak 5 ml NaCl 1 M dialirkan kedalam kolom. Keseimbangan akhir dicapai dengan mengalirkan 10 ml bufer Tris-Cl pH 7. *Fraction collector* diatur berdasarkan jumlah tetes dengan volume fraksi 1 ml dan *flow rate* 3,0 ml/menit. Sebanyak 1 ml dialisat diinjeksikan ke dalam kolom. Kolom dicuci dengan 5 ml bufer Tris-Cl pH 7, kemudian dielusi dengan 5 ml NaCl 0,5 M dan 1 M diikuti 10 ml Bufer Tris-Cl pH 7. Semua fraksi yang dihasilkan ditampung kemudian diuji kadar protein dan aktivitas enzimnya. Eluat yang diperoleh sebagai protease murni diuji kualitatif dengan analisis SDS-PAGE dan zimografi. Lampiran 1 memperlihatkan diagram alir pemurnian protease dari shiitake.

### Pencirian protease kasar dan murni

Pencirian protease diuji secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri (Bergmeyer 1983) dan kualitatif dengan analisis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) dan

zimografi, yang meliputi penentuan bobot molekul, pengaruh suhu, pengaruh pH, pengaruh inhibitor, pengaruh ion logam, spesifitas substrat, dan uji kualitatif dengan SDS-PAGE dan zimografi.

**Penentuan bobot molekul.** Bobot molekul enzim ditentukan dengan analisis SDS-PAGE (modifikasi metode Laemmli 1970) dan zimografi (modifikasi Garnelli Piperno & Reich *et al.* 2001). Analisis menggunakan gel poliakrilamida 12% dan standar *high molekular weight* (HMW) yang terdiri dari protein standar miosin (205 kD),  $\beta$ -galaktosidase (116 kD), fosforilase b (97 kD), fruktosa-6-fosfat kinase (84 kD), *bovine serum albumin* (66 kD), glutamat dehidrogenase (55 kD), ovalbumin (45 kD), dan gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase (36 kD).

**Pengaruh suhu terhadap enzim.** Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada berbagai suhu (27, 30, 37, 45, 50, 55, 60, dan 65°C) dalam 50 mM bufer universal pH 7. Supernatan berupa filtrat enzim diuji aktivitasnya secara kuantitatif.

**Pengaruh pH terhadap enzim.** Optimasi pH enzim dilakukan pada suhu optimum dengan cara menganalisis aktivitas enzim pada berbagai pH (3-12). Supernatan berupa filtrat enzim diuji aktivitasnya secara kuantitatif.

**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 menginkubasi 100  $\mu$ l enzim dan 100  $\mu$ l larutan senyawa tersebut selama satu jam pada suhu ruang, lalu dianalisis aktivitas residunya secara kuantitatif.

**Pengaruh ion logam.** Pengaruh aktivitas protease terhadap penambahan ion logam dilakukan dengan inkubasi 100  $\mu$ l enzim dan 100  $\mu$ l larutan ion logam 5 mM selama satu jam pada suhu ruang kemudian diuji aktivitasnya secara kuantitatif. Logam yang digunakan antara lain KCl, NaCl, LiCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  dan  $\text{AlCl}_3$ .

**Spesifitas substrat.** Uji aktivitas protease pada suhu dan pH optimum dilakukan pada berbagai substrat protein (kasein, gelatin, albumin, dan fibrinogen) dengan konsentrasi 1% (b/v). Aktivitas enzim diuji secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan pengukuran serapan larutan pada panjang gelombang 578 nm.



## 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 subunit 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*, kondisi *running*, pewarnaan gel, dan pelunturan warna.

Preparasi gel pemisah dan penahan. Pembuatan gel pemisah 12% untuk SDS-PAGE dan 10% untuk zimografi, serta gel penahan 4% dilakukan dengan komposisi yang tertera pada Tabel 4.

Preparasi sampel dan *loading*. Khusus untuk SDS-PAGE, 20  $\mu$ l sampel ditambahkan dengan 5  $\mu$ l bufer sampel yang mengandung 2-merkaptotanol, lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 sampai 5 menit. Sementara pada zimografi sampel dilarutkan dalam bufer sampel yang tidak mengandung 2-merkaptotanol dan tidak memerlukan perlakuan pemanasan. Tiap sampel dimasukkan ke dalam sumur gel dengan kisaran volume 10-20  $\mu$ l, sedangkan volume standar marker HMW yang digunakan 5  $\mu$ l.

Kondisi *running*, 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 R-250* 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 didigesti dalam 50 mM bufer universal pH 7 dan suhu 50°C (kondisi suhu dan pH optimum enzim) selama 30 menit. Gel diwarnai dengan larutan pewarna selama 15 menit. Warna gel dihentikan menggunakan larutan peluntur berulang kali sampai diperoleh pita enzim proteolitik putih dengan latar gel biru. Gel dibilas dengan akuades kemudian dilakukan *packing* dan disimpan pada suhu 4°C.

Tabel 4 Komposisi gel pemisah dan gel penahan untuk SDS-PAGE dan zimografi

Pereaksi	Gel pemisah (ml)		Gel penahan 4% (ml)
	SDS-PAGE 12%	Zimografi 10%	
Larutan A	2,00	1,67	0,67
Larutan B	1,25	1,25	-
Larutan C	-	-	1,25
Kasein 1%	-	1,00	-
Akuades	1,75	1,08	3,00
Amonium persulfat	0,10	0,10	0,05
TEMED*	0,01	0,01	0,005
Total	5,00	5,00	5,00

\*TEMED=N,N,N',N'tetraetilmetilenadamina

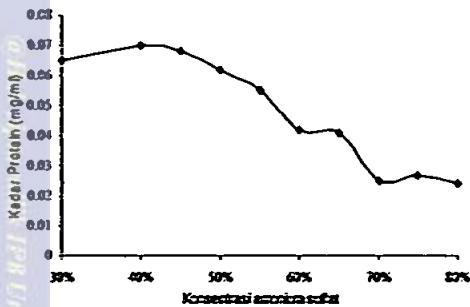
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemurnian Protease *L. edodes*

Ekstrak enzim protease kasar diendapkan dengan menambahkan garam amonium sulfat. Daya larut protein dapat berkurang bila dalam larutannya ditambahkan garam sehingga protein akan terpisah sebagai endapan. Garam dapat menstabilkan protein dari denaturasi, proteolisis maupun kontaminasi bakteri. Proses ini berdasarkan prinsip *salting out* yang meningkatkan kekuatan ion. Menurut Roe (2001) presipitasi atau pengendapan protein dapat terjadi oleh perubahan pH atau kekuatan ion, adanya penambahan pelarut organik atau senyawa lainnya sehingga molekul protein berkumpul. Garam ditambahkan dalam bentuk padatan agar perubahan volume tidak terlalu besar. Penambahan garam dilakukan sedikit demi sedikit pada suhu rendah dengan bantuan pengaduk *magnetic* pada kecepatan rendah untuk menghindari perubahan kelarutan maupun denaturasi protein. Presipitasi ekstrak enzim dengan amonium sulfat diuji pada konsentrasi kejenuhan amonium sulfat 30-90% (b/v).

Hasil presipitasi pada berbagai konsentrasi amonium sulfat diukur kandungan proteinnya dengan pengukuran serapan pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi yang dipilih adalah yang memberikan kadar protein terendah pada supernatan yaitu konsentrasi amonium sulfat 70% dengan nilai 0,025 mg/ml. Pada konsentrasi ini protein dianggap telah terendapkan pada pelet secara maksimum. Konsentrasi amonium sulfat 80%

memiliki nilai kadar protein yang lebih rendah namun tidak dipilih karena kadar garamnya terlalu tinggi. Endapan dipisahkan melalui sentrifugasi agar tidak mengkontaminasi enzim yang terkumpul kemudian dilarutkan dalam 50 mM bufer universal pH 7,0.



Gambar 2 Pengaruh konsentrasi amonium sulfat terhadap kadar protein pada supernatan ekstrak shiitake.

Nilai aktivitas spesifik protein pelet sebesar 3,268 U/mg dengan perolehan enzim sekitar 30%. Tingkat kemurnian enzim menjadi 0,9 kali setelah pengendapan 70% amonium sulfat dibandingkan ekstrak kasar enzim. Pemurunan kemurnian ini kemungkinan disebabkan konsentrat enzim masih mengandung garam dan molekul-molekul kecil seperti ion logam, inhibitor, dan peptida kecil lainnya sehingga nilai aktivitas spesifiknya menjadi kecil. Aktivitas spesifik enzim merupakan total aktivitas yang dimiliki enzim protease tiap miligram protein enzim. Perolehan sebenarnya merupakan rendemen dari aktivitas enzim protease. Hal ini bertujuan mengetahui sejauh mana pengaruh dari tiap tahapan isolasi enzim terhadap aktivitas enzim protease.

Pengaruh garam pada protein enzim dari hasil presipitasi dihilangkan dengan cara dialisis menggunakan kantung nitroselulosa asetat (*cut-off* 10 kD) dalam bufer universal pH 7 dengan konsentrasi 20 mM dan 50 mM. Metode dialisis ini dapat menghilangkan molekul-molekul pengganggu berukuran kecil dan menggantikannya dengan larutan bufer yang masuk ke dalam dialisat. Membran ini dapat menahan molekul berbobot molekul 10 kD dan meloloskan molekul yang berbobot molekul lebih kecil dari 10 kD. Perebusan kantung dialisis 10 kD sebelum digunakan bertujuan menghilangkan protein lain yang menempel. Selama proses dialisis akan terjadi difusi dan osmosis. Pada awal dialisis konsentrasi garam di dalam kantung lebih tinggi dari sekelilingnya sehingga larutan bufer akan masuk menggantikan garam yang

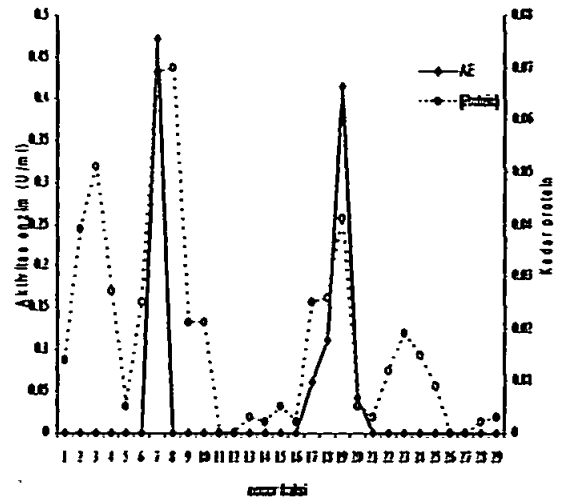
keluar sampai tercapai keseimbangan. Tahapan ini dilakukan beberapa kali dengan mengganti larutan bufer setiap 2 jam karena semua garam dan ion pengganggu tidak dapat dihilangkan hanya dengan sekali dialisis (Scopes 1987).

Dialisat dipekatkan untuk mengurangi volume larutan enzim sehingga diperoleh konsentrasi protein yang lebih tinggi. Protein dikonsentrasikan atau dipekatkan dengan penambahan polietilena glikol pada konsentrasi tinggi sehingga aktivitas air menurun. Polietilena glikol tidak bersifat toksik, murah, tidak mudah terbakar seperti beberapa pelarut organik, dan memiliki efek protektif terhadap protein. Penambahan polietilena glikol akan menarik molekul air sehingga protein akan tereksklusi dan bersatu membentuk gumpalan endapan. Pemurunan aktivitas total dan protein total terjadi setelah pemekatan menggunakan polietilena glikol. Hal ini mungkin disebabkan protein enzim ikut lolos dari tabung dialisis walaupun dalam jumlah kecil. Dialisis dan pemekatan enzim memberikan nilai aktivitas spesifik 9,612 U/mg sehingga tingkat kemurnian enzim menjadi 2,62 kali lebih murni dibanding ekstrak kasar dengan perolehan enzim sekitar 23%.

Dialisat diinjeksikan ke dalam kolom pemutar anion DEAE-Sepharose Fast Flow. Protein dielusi dengan NaCl 0,50 M dan 1 M dalam 50 mM bufer Tris-HCl pH 7. Kromatografi pemutar ion memanfaatkan perbedaan afinitas antara molekul bermuatan di dalam larutan dengan senyawa yang tidak reaktif yang bermuatan berlawanan sebagai pengisi kolom. Pengerjaan kromatografi pemutar ion didahului dengan mengelusi protein enzim menggunakan pH bufer awal. Protein diharapkan terikat kuat pada kolom dan protein lain akan dibiarkan terelusi lebih dahulu. Protein yang terikat pada kolom dilepaskan dengan cara mengubah pH bufer atau kekuatan ion pelarut. Matriks DEAE-Sepharose tersusun atas gel agarose 6% yang berikatan silang dan memiliki gugus dietilaminoetil yang bermuatan positif. Matriks ini berlaku sebagai pemutar anion yang akan mengikat protein-protein bermuatan positif secara kovalen berdasarkan densitas muatannya selama fraksinasi. Biomolekul dengan muatan ion paling kecil akan keluar lebih dahulu dielusi dibandingkan biomolekul dengan muatan ion lebih besar. Semakin besar muatan ion maka diperlukan larutan garam NaCl dengan konsentrasi yang semakin besar.

Kolom pemutar anion DEAE-Sepharose *Fast Flow* yang digunakan merupakan *prepacked* sehingga lebih menguntungkan untuk digunakan karena butiran-butiran gel dalam kolom telah tersusun dengan rapat dan stabil sehingga bila sampel dan bufer dialirkan akan terjadi pemisahan sesuai karakter yang dimiliki gel dalam kolom. Nilai hasil pemurnian dengan kromatografi kolom dipengaruhi oleh tepat tidaknya pemilihan teknik kolom yang digunakan yang meliputi pemilihan jenis bufer pencuci, jenis kolom anion, jenis eluen, dan laju alir yang digunakan. Menurut Cotler (2001) apabila kecepatan aliran yang digunakan terlalu cepat maka akan terjadi pemisahan yang tidak sempurna, seperti terjadinya pencampuran fraksi yang dibutuhkan dengan fraksi yang tidak dibutuhkan karena jarak keluarnya dari kolom yang terlalu dekat. Sementara laju aliran yang terlalu lambat bisa mengakibatkan terjadinya difusi dan pelebaran puncak.

Gambar 3 memperlihatkan bahwa fraksinasi menghasilkan dua fraksi enzim aktif (fraksi 7 dan 19). Fraksi 7 muncul setelah elusi oleh garam NaCl 0,5 M dan fraksi 19 muncul setelah elusi menggunakan NaCl 1 M. Eluat DEAE fraksi 7 dan 19 memiliki nilai aktivitas spesifik 6,855 U/mg dan 10,098 U/mg dengan tingkat kemurnian 1,89 dan 2,75 kali lebih tinggi terhadap ekstrak kasar. Perolehan enzim dari kedua fraksi tersebut menurun drastis dengan nilai sekitar 4%. Peningkatan kemurnian eluat dibanding ekstrak kasar membuktikan bahwa enzim protease shiitake berhasil dimurnikan dengan menggunakan kolom kromatografi pemutar anion DEAE. Data aktivitas enzim dari tiap tahap pemurnian protease shiitake dapat dilihat pada Tabel 5.



Gambar 3 Fraksi protease shiitake dengan kolom pemutar anion DEAE-Sepharose *Fast Flow* pada kondisi analisis: bufer elusi 50 mM Tris-HCl pH 7, NaCl 0,50 M dan 1 M, laju alir 3,0 ml/menit, dan volume elusi 1,0 ml/tabung.

Palmieri *et al.* (2001) memurnikan enzim protease serupa subtilisin dari *Pleurotus ostreatus* (PoSI) mendapatkan perolehan 95% dengan kemurnian 2,64 kali setelah presipitasi amonium sulfat dan perolehan 81% dengan kemurnian 33,6 kali setelah kolom DEAE Sepharose. Sementara Peng *et al.* (2002) memurnikan enzim fibrinolitik *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 subtilisin DFE yang diisolasi dari "douchi" makanan Cina tradisional dari fermentasi kacang-kacangan mendapatkan perolehan 90,2% dengan kemurnian 2,8 kali setelah presipitasi amonium sulfat dan perolehan 15,8% dengan kemurnian 7,9 kali setelah kolom DEAE.

Tabel 5 Hasil pemurnian enzim protease shiitake

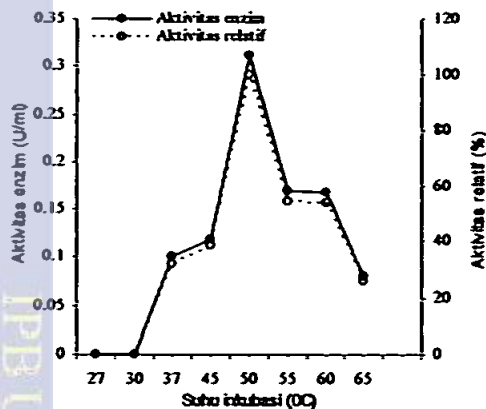
Tahap	Vol (ml)	AE (U/ml)	Total AE	[protein] (mg/ml)	Total Protein	Aspe (U/mg)	Perolehan (%)	Tingkat kemurnian
Ekstrak kasar	500	0,191	95,5	0,052	26	3,673	100	1
Presipitat 70 %	38	0,755	28,69	0,231	8,778	3,268	30,03	0,90
Dialisat + konsentrat	11,25	1,961	22,06	0,204	2,295	9,612	23,10	2,62
Eluat DEAE Sepharose fast flow								
• Fraksi 7	1,00	0,473	0,473	0,069	0,069	6,855	0,495	1,89
• Fraksi 19	1,00	0,414	0,414	0,041	0,041	10,098	0,434	2,75

## Pencirian Protease Shiitake

### Penentuan suhu dan pH optimum

Pengujian aktivitas protease dengan modifikasi metode Bergmeyer (1983) didasarkan pada reaksi hidrolisis substrat kasein oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino. Asam amino yang telah terbentuk dipisahkan dari substrat yang tersisa dengan mengendapkan protein kasein (atau polipeptida berukuran besar) menggunakan asam trikloroasetat (TCA). Asam amino yang terbentuk akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang tidak terhidrolisa akan mengendap. Protein yang tidak terhidrolisa tersebut akan dipisahkan dengan sentrifugasi. Asam amino yang telah diisolasi diwarnai dengan pereaksi folin-ciocalteu agar dapat dilakukan pembacaan pada daerah sinar tampak (diukur serapannya pada 578 nm) (Scopes 1987). Intensitas warna biru yang terbentuk akibat adanya reaksi folin dengan protein sebanding dengan konsentrasi kasein yang terhidrolisis.

Jamur shiitake memiliki aktivitas enzim protease yang lebih tinggi dibandingkan jamur champignon (*Agaricus bisporus*). Gambar 4 memperlihatkan bahwa aktivitas protease shiitake mencapai optimum pada suhu 50°C selama 10 menit dalam 50 mM bufer universal pH 7 dengan nilai sebesar 0,322 U/ml. Sementara suhu optimum enzim fibrinolitik yang diproduksi *Bacillus amyloliquefaciens* dari *douchi* dicapai pada suhu 48°C (Peng *et al.* 2002), *Ophiostoma piceae* pada suhu 40°C (Abraham & Breuil 1996), Chungkook-Jang pada suhu 70°C (Kim *et al.* 1996), dan *Armillaria mellea* dicapai pada suhu 33°C (Lee *et al.* 2005).



Gambar 4 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease shiitake.

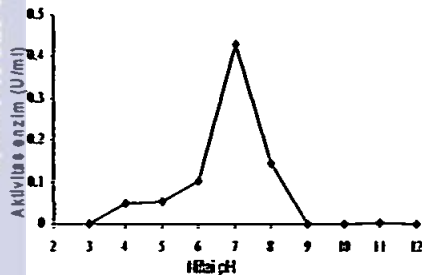
Peranan suhu dalam reaksi adalah mempercepat gerak termal molekul sehingga cukup untuk memasuki tahap transisi (Lehninger 1993). Umumnya semakin tinggi suhu maka laju reaksi kimia akan semakin cepat sehingga aktivitas enzim akan meningkat sampai dicapai suhu optimum. Gambar 4 memperlihatkan terjadinya peningkatan aktivitas enzim di bawah suhu optimum (50°C) karena adanya kenaikan energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi, serta rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk saling berinteraksi (Suhartono 1989). Menurut Murray *et al.* (1997) kecepatan reaksi mula-mula meningkat dengan naiknya suhu, hal ini disebabkan oleh peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi. Pada akhirnya energi kinetik enzim akan melampaui rintangan energi untuk memutuskan ikatan hidrogen dan hidrofobik yang lemah yang mempertahankan struktur sekunder-tersiernya. Pada Gambar 4 terlihat aktivitas enzim menurun pada suhu 65°C dengan sisa aktivitas sekitar 25%. Penurunan aktivitas terjadi karena enzim sebagai protein globular dapat terdenaturasi oleh suhu yang terlalu tinggi dan menyebabkan kehilangan aktivitasnya. Pengetahuan tentang suhu optimum dalam reaksi enzimatik diperlukan untuk menjaga enzim agar tetap dapat menjalankan aktivitas katalitik terbaik.

Aktivitas enzim sangat tergantung kepada pH. Dalam penentuan pH optimum digunakan bufer universal pH 3-12 agar enzim berada dalam kondisi lingkungan yang sama. Hasil pengamatan pengaruh pH terhadap aktivitas protease shiitake menunjukkan optimum pada pH 7 dengan nilai aktivitas enzim 0,430 U/ml seperti terlihat pada Gambar 5.

Gambar 5 memperlihatkan pada kisaran pH asam aktivitas enzim tidak berubah ekstrim bahkan cenderung tetap sama. Pada kisaran pH basa baru terlihat terjadinya perubahan aktivitas enzim secara ekstrim bahkan aktivitasnya menurun drastis hingga mencapai 0%. Perbedaan aktivitas katalitik enzim akibat dari perubahan pH disebabkan terjadinya perubahan muatan pada sisi rantai asam amino di permukaan enzim. Bila sisi aktif enzim tidak sama dengan substrat maka tidak terjadi reaksi. Pada pH optimum sisi aktif enzim sama dengan substrat sehingga aktivitas menjadi optimum dan diperoleh aktivitas paling tinggi.

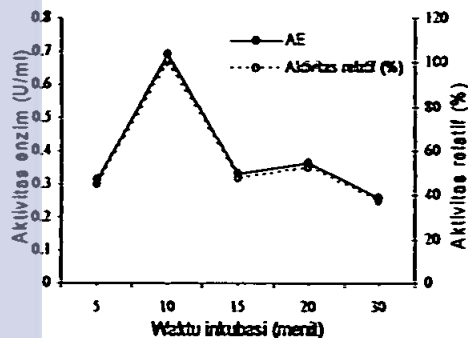
Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat pemberi dan

penerima proton yang penting pada sisi katalitik berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan (Lehninger 1993). Pada pH tertentu (ekstrim) dapat menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga kehilangan aktivitas katalitiknya. Hal ini disebabkan oleh: (a) situs atau gugus pengikat tidak lagi dapat mengakomodasi untuk berikatan dengan substrat, (b) sisi katalitiknya tidak lagi dapat berinteraksi dengan substrat secara baik mengakibatkan putusnya ikatan kimia, dan (c) adanya perubahan konformasi enzim (Brown 1976).



Gambar 5 Pengaruh pH terhadap aktivitas protease shiitake.

Enzim fibrinolitik yang diproduksi *Bacillus amyloliquefaciens* dari *douchi* mencapai aktivitas optimum pada pH 9 (Peng *et al.* 2002), *Ophiostoma piceae* pada pH 7-9 (Abraham & Breuil 1996), Chungkook-Jang pada pH 10,5 (Kim *et al.* 1996), dan *Armillaria mellea* dicapai pada pH 6,0 (Lee *et al.* 2005).



Gambar 6 Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas protease shiitake.

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Waktu inkubasi merupakan waktu yang diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Gambar 6 memperlihatkan bahwa semakin lama waktu inkubasi maka aktivitas enzim semakin tinggi. Hal ini disebabkan oleh semakin banyaknya enzim yang berikatan dengan substrat

sehingga produk yang dihasilkan semakin banyak. Waktu inkubasi optimum enzim protease adalah 10 menit. Pada waktu inkubasi di bawah 10 menit aktivitas relatif enzim hanya 45% karena waktu inkubasi yang singkat menyebabkan reaksi antara enzim dan substrat belum sempurna sehingga kompleks enzim-substrat yang terbentuk sedikit dan pada saat reaksi dihentikan menghasilkan produk yang sedikit. Aktivitas enzim memurun setelah aktivitas optimum dicapai bahkan pada waktu inkubasi 30 menit hanya menyisakan aktivitas sekitar 37%. Hal ini disebabkan enzim telah jemu oleh substrat, penambahan waktu inkubasi tidak sebanding dengan penambahan kompleks enzim-substrat yang terbentuk sehingga aktivitasnya memurun.

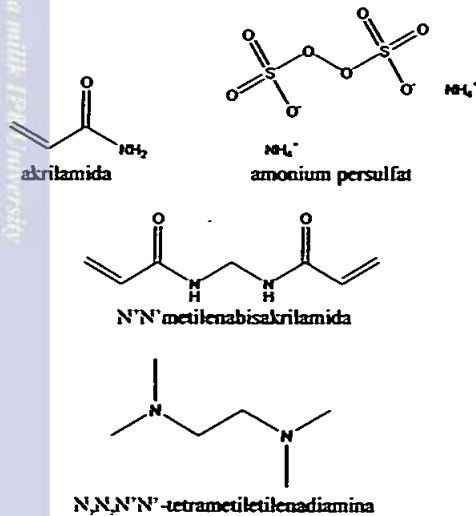
### Penentuan bobot molekul

Estimasi bobot molekul enzim ditentukan dengan teknik elektroforesis khususnya SDS-PAGE. Pengikatan SDS oleh protein akan menyebabkan muatan intrinsik rantai polipeptida tertutupi sehingga muatan total protein per unit menjadi konstan. Inilah yang menyebabkan pemisahan molekul protein bisa berdasarkan bobot molekul (Dunn 1989).

Penggunaan SDS yang merupakan deterjen anionik bertujuan memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisa. Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan bobot molekul protein tersebut. Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam bufer yang mengandung  $\beta$ -merkaptoetanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfida), gliserol, dan SDS. Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negatif dari anion yang terikat dan menyebabkan kompleks protein-SDS memiliki rasio muatan per bobot molekul yang konstan.

Keberhasilan elektroforesis dicapai dengan penggunaan medium yang dapat mencegah terjadinya konveksi dan tidak bereaksi dengan sampel atau menghambat pergerakan sebagai akibat terjadinya ikatan antara sampel dengan matriks. Poliakrilamida merupakan medium yang secara kimiawi bersifat *inert*. Gel poliakrilamida diperoleh dari hasil polimerisasi antara monomer akrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) yang dihubungkan oleh *cross linking*  $\text{N}'\text{N}'$ -metilena bisakrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Reaksi polimerisasi ini dikatalisis oleh  $\text{N},\text{N},\text{N}'\text{N}'$ -tetrametilendiamin (TEMED),

dengan amonium persulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) sebagai sumber radikal bebas yang akan menginisiasi pembentukan polimer. Pergerakan partikel di dalam media tergantung kepada ukuran partikel dan ukuran pori media penunjang. Ukuran pori gel ditentukan oleh konsentrasi gel poliakrilamida. Konsentrasi gel yang digunakan ada dua diantaranya gel penahan 4% (*stacking gel*) dan gel pemisah 12% (*separation gel*).

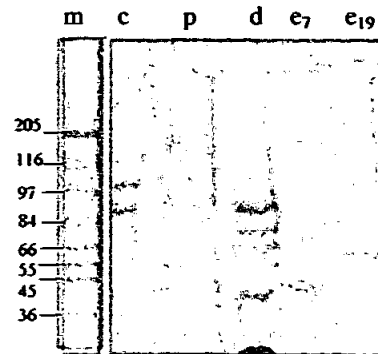


Gambar 7 Struktur kimia beberapa pereaksi yang digunakan dalam analisis SDS-PAGE.

Analisis hasil elektroforesis dilakukan dengan pewarnaan oleh larutan yang mengandung *coomasie brilliant blue* karena sangat sensitif dan mampu mendeteksi protein 0,2-0,5 µg. Protein akan berikatan dengan pewarna membentuk kompleks protein-pewarna. Kelebihan warna dihilangkan dengan merendam gel dalam larutan peluntur sehingga kelebihan warna yang tidak berikatan dengan protein akan larut dan pita-pita protein dapat dilihat sebagai pita berwarna biru dengan latar belakang gel bening. Bobot molekul protein diketahui dengan membandingkan dengan pita-pita protein standar.

Profil protease kasar shiitake yang diamati dengan SDS-PAGE 12% memperlihatkan jumlah pita protein sekitar tujuh pita dengan kisaran bobot molekul 45-156 kD. Gambar 7 memperlihatkan protease murni eluat DEAE memiliki jumlah pita protein dan ukuran molekul dari fraksi 7 sebanyak dua pita (51 dan 47 kD) dan fraksi 19 ada empat pita (65, 51, 45 dan 37 kD). Berkurangnya jumlah pita

protein protease murni dibanding ekstrak kasar menunjukkan bahwa enzim murni berhasil dipisahkan dengan fraksinasi kolom pertukaran ion (Tabel 6). Standar yang digunakan adalah marker HMW yang mengandung protein standar miosin (205 kD), *β-galaktosidase* (116 kD), fosforilase b (97 kD), fruktosa-6-fosfat kinase (84 kD), *bovine serum albumin* (66 kD), glutamat dehidrogenase (55 kD), ovalbumin (45 kD), dan gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase (36 kD).



Gambar 8 Analisis SDS-PAGE 12% pada protease kasar shiitake (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e<sub>7</sub>), fraksi 19 (e<sub>19</sub>), dan marker HMW (m).

Tabel 6 Nilai bobot molekul protease shiitake hasil SDS-PAGE 12%

	Ekstrak kasar	Presipitat	Dialisat	Fraksi 7	Fraksi 19
Jumlah pita	7	9	9	2	4
Bobot Molekul	156	124	118	51	65
	113	98	102	47	51
	94	86	94		45
	78	78	78		37
	65	68	68		
	54	62	59		
	45	51	49		
		45	43		
		37	36		

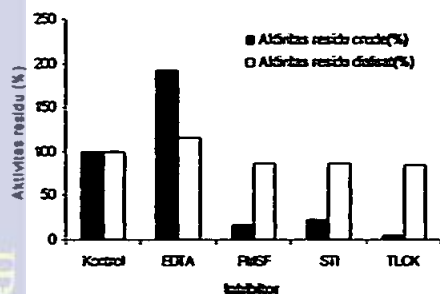
Berdasarkan hasil uji SDS-PAGE, protease fibrinolitik dari kultur miselia *Armillaria mellea* dilaporkan memiliki ukuran molekul 21 kD (Lee *et al.* 2005). Enzim fibrinolitik yang telah diproduksi *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 yang diisolasi dari *douchi* makanan Cina tradisional dari fermentasi kacang-kacangan memiliki bobot molekul 28 kD (Peng *et al.* 2002). Analisis SDS-PAGE pada protease serina dengan aktivitas fibrinolitik dari *dung beetles*

menghasilkan satu pita protein homogen dengan ukuran 24 kD (Ahn *et al.* 2005). Sementara enzim proteolitik dari *Pleurotus ostreatus* menghasilkan ukuran molekul 75 kD dengan SDS-PAGE dan 74 kD dengan kromatografi filtrasi gel (Palmieri *et al.* 2001). Enzim fibrinolitik yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. CK11-S yang diisolasi dari *Chungkook-Jang* saus Korea Tradisional dari fermentasi kacang memiliki ukuran molekul 28,2 kD (Kim *et al.* 1996).

### Pengaruh inhibitor

Ikatan inhibitor dengan enzim dapat mengubah kemampuan enzim dalam mengikat substrat sehingga mengubah daya katalisator enzim. Hal ini karena struktur enzim sudah mengalami perubahan fisik dan kimiawi sehingga aktivitas hayatinya pun berbeda (Suhartono 1989). Gambar 9 memperlihatkan penambahan EDTA 0,01 mM sebagai inhibitor protease logam meningkatkan aktivitas protease kasar hingga 192% dengan nilai aktivitas 0,619 U/ml. Penambahan PMSF 0,01 mM yang merupakan inhibitor protease serina mampu menghambat kuat aktivitas enzim protease kasar hingga 16% dengan nilai aktivitas 0,054 U/ml. Inhibitor STI 0,01 mg/ml dan TLCK 0,1 mM (inhibitor protease tripsin) juga menghambat kuat aktivitas enzim protease kasar dengan nilai aktivitas 0,073 U/ml dan 0,015 U/ml sehingga aktivitas residunya sekitar 22% dan 4%. Sementara penambahan EDTA 0,01 mM hanya sedikit meningkatkan aktivitas protease dialisat shiitake sekitar 116% dengan nilai aktivitas 0,209 U/ml. Penambahan PMSF, STI dan TLCK tidak menghambat aktivitas proteolitik dialisat dengan nilai aktivitas residu >80%.

Dengan demikian, enzim protease kasar shiitake digolongkan dalam kelompok protease serina serupa tripsin.



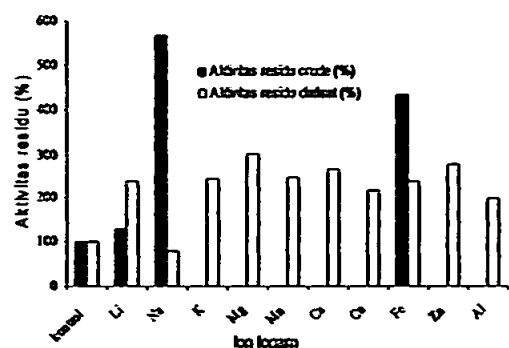
Gambar 9 Pengaruh inhibitor EDTA 0,01 Mm, PMSF 0,01 mM, TLCK 0,1 mM, dan STI 0,01 mg/ml terhadap aktivitas protease kasar dan dialisat shiitake.

Enzim fibrinolitik dari *Pleurotus ostreatus* termasuk jenis protease serina juga karena dihambat spesifik oleh inhibitor PMSF dan APMSF (Palmieri *et al.* 2001). PMSF merupakan inhibitor yang spesifik bagi protease serina seperti kimotripsin, tripsin dan trombin. Inhibitor PMSF akan bereaksi dengan gugus -OH dari serina dan menyebabkan terjadinya efek penghambatan yang tidak dapat balik (Palmer 1991).

### Pengaruh ion logam

Beberapa enzim memerlukan ion-ion tertentu untuk menjaga kestabilan aktivitas enzim. Ion-ion tersebut dapat bertindak sebagai inhibitor pada konsentrasi tertentu, tetapi dapat juga menjadi aktivator pada konsentrasi yang berbeda. Enzim yang memerlukan ion logam bagi aktivitasnya seringkali disebut metaloenzim. Ion logam esensial mungkin membentuk suatu kompleks dengan substrat dan sisi aktif enzim sehingga menggabungkan keduanya dalam bentuk aktif. Ion logam mungkin juga berfungsi sebagai senyawa penarik kuat elektron pada tahap tertentu dalam siklus katalitik (Lehninger 1993).

Gambar 10 memperlihatkan bahwa aktivitas protease kasar meningkat empat kali dengan keberadaan ion  $\text{Na}^+$  (0,136 U/ml) dan lima kali dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$  (0,104 U/ml). Ion monovalen  $\text{Li}^+$  pada konsentrasi 5 mM mampu meningkatkan aktivitas katalitik protease kasar shiitake 129%.



Gambar 10 Pengaruh ion logam (5 mM) terhadap aktivitas protease kasar dan dialisat shiitake.

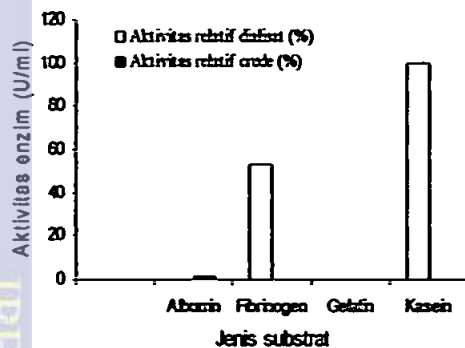
Gambar 10 memperlihatkan ion  $\text{Fe}^{3+}$  dapat meningkatkan aktivitas dibanding ion  $\text{Al}^{3+}$ , hal ini mungkin karena Fe merupakan golongan logam transisi. Penambahan ion tertentu pada protease kasar bisa saja tidak

memunjukkan peningkatan aktivitas seperti penambahan ion  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , dan  $Al^{3+}$  (5 mM). Hal ini terjadi karena kebutuhan ion tersebut sudah terpenuhi dari lingkungan enzim yang masih bersifat sebagai ekstrak kasar. Jika jumlahnya tidak sesuai dengan kebutuhan maka ion logam dapat bertindak seperti inhibitor. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada umumnya keberadaan ion-ion logam meningkatkan aktivitas katalitik dialisat (>190%), tetapi aktivitas dialisat memurun menjadi 0,314 U/ml (79%) dengan adanya ion  $Na^+$  5 mM.

### Spesifitas substrat protein

Penelitian terhadap spesifitas enzim menunjukkan bahwa molekul substrat harus memiliki dua ciri struktural yang jelas, yaitu (1) ikatan kimiawi spesifik yang dapat diserang oleh enzim dan (2) biasanya beberapa gugus fungsional lain (gugus pengikat) yang berikatan dengan enzim dan mengarahkan molekul substrat dengan tepat pada sisi aktif sehingga ikatan yang rapuh tapi tepat terletak pada posisi yang berhubungan dengan gugus katalitik enzim (Lehninger 1993).

Hasil pengujian spesifitas substrat memperlihatkan aktivitas enzim lebih tinggi pada substrat protein yang memiliki struktur globular (kasein dan fibrinogen) dibanding yang serat (gelatin). Enzim lebih sulit mendegradasi substrat protein yang berstruktur serat karena protein dengan struktur serat lebih banyak mengandung ikatan hidrogen maupun disulfida dibanding struktur globular. Pengaruh tingkat kelarutan substrat terhadap aktivitas enzim karena protease merupakan enzim hidrolase yang aktivitas katalitiknya membutuhkan air.



Gambar 11 Spesifitas substrat protein 1% (b/v) terhadap aktivitas protease kasar dan dialisat shiitake.

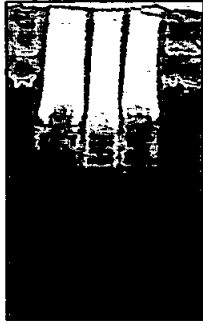
Pengujian spesifitas substrat terhadap ekstrak protease kasar pada Gambar 11 hanya dapat terdeteksi menggunakan substrat albumin dengan nilai aktivitas cukup kecil yaitu 0,011 U/ml. Pengukuran aktivitas spesifik enzim pada filtrat yang belum murni tidak dapat mewakili kondisi katalitik yang sebenarnya dari enzim tersebut karena adanya pengaruh kontaminan, isozim, dan enzim-enzim lain yang segolongan. Sementara aktivitas enzim pada dialisat dapat terdeteksi menggunakan substrat fibrinogen dan kasein dengan nilai 0,382 U/ml dan 0,719 U/ml. Pengujian spesifitas substrat merupakan analisis aktivitas enzim secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil pengujian metode ini didukung oleh analisis secara kualitatif menggunakan zimogram yang lebih sensitif dalam mendeteksi aktivitas enzim.

### Zimogram berbagai substrat protein

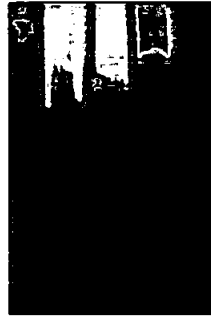
Penentuan aktivitas proteolitik dari pita protein hasil SDS-PAGE dilakukan menggunakan analisis zimogram dengan menambahkan substrat dalam komposisi gel pemisahannya. Substrat yang digunakan adalah kasein, gelatin, fibrinogen, dan albumin pada konsentrasi 1% (b/v) akan berkopolimerisasi dengan akrilamida. Setelah pemisahan elektroforesis, substrat tersebut akan didegradasi oleh enzim yang telah direnatursasi kembali pada kondisi reaksi optimum (suhu dan bufer optimum enzim) selama waktu tertentu. Teknik zimogram mendeteksi aktivitas enzim berdasarkan reaksi spesifik enzim dengan substrat secara *in situ* pada gel hasil elektroforesis. Menurut Scopes (1987) teknik ini merupakan teknik pewarnaan spesifik yaitu gel yang digunakan untuk elektroforesis sampel pada zimogram terbatas pada gel *nondenaturasi*, baik oleh SDS maupun urea, karena pada umumnya enzim akan kehilangan aktivitasnya jika terdenaturasi.

Enzim dipisahkan dalam gel denaturasi yaitu SDS dalam kondisi tidak tereduksi. Penambahan detergen Triton X-100 sebagai detergen *nonionik* akan melepaskan SDS dan mengakibatkan terjadinya renaturasi protein. Gel diwarnai menggunakan *coomassie brilliant blue* sehingga molekul protein yang memiliki aktivitas proteolitik akan memperlihatkan pita protein bening dengan latar belakang gel berwarna biru seperti terlihat pada Gambar 12-15.

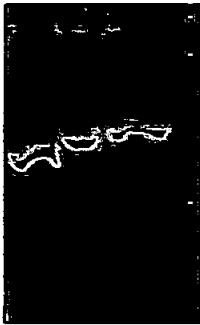


e<sub>7</sub> c p d e<sub>19</sub>

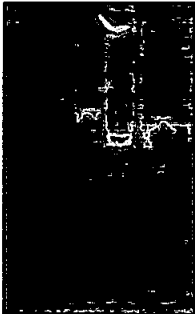
Gambar 12 Zimogram gelatin 10% terhadap protease kasar (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e<sub>7</sub>), dan fraksi 19 (e<sub>19</sub>).

c p d e<sub>7</sub> e<sub>19</sub>

Gambar 15 Zimogram fibrinogen 10% terhadap protease murni (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e<sub>7</sub>), dan fraksi 19 (e<sub>19</sub>).

e<sub>7</sub> d p c

Gambar 13 Zimogram kasein 10% terhadap protease kasar (c), presipitat (p), dialisat (d), dan fraksi 7 (e<sub>7</sub>).

e<sub>19</sub> e<sub>7</sub> d p c

Gambar 14 Zimogram albumin 10% terhadap protease murni (c), presipitat (p), dialisat (d), fraksi 7 (e<sub>7</sub>), dan fraksi 19 (e<sub>19</sub>).

Pengujian spesifitas substrat secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri pada ekstrak kasar hanya terdeteksi dengan substrat albumin (Gambar 11). Sementara pada Gambar 12-15 hasil zimogram terlihat adanya pita putih dengan latar gel berwarna biru pada semua substrat. Hal ini memperlihatkan bahwa ekstrak protease kasar shiitake dapat menghidrolisis keempat substrat dengan pita bening yang lebih tebal terbentuk pada substrat albumin dan gelatin. Zimogram kasein memperlihatkan bentuk pita yang lebih jelas dibanding substrat lainnya. Hal ini sesuai dengan pengujian secara kuantitatif bahwa aktivitas kasein lebih tinggi dibanding fibrinogen dengan nilai 0,719 U/ml.

Fibrinogen adalah protein penggumpal darah yang akan diubah menjadi fibrin dengan bantuan trombin. Kasein adalah protein berbentuk globular yang tersusun oleh 21 jenis asam amino. Kasein digolongkan sebagai protein penyimpanan dan merupakan protein utama dari susu. Albumin merupakan protein terlarut dan banyak terdapat pada serum (55,2%). Gelatin merupakan kolagen yang telah mengalami transformasi dari bentuk tidak larut menjadi campuran polipeptida yang dapat larut, karena telah mengalami hidrolisis beberapa ikatan kovalen oleh panas (Lehninger 1993). Enzim fibrinolitik dari kultur miselia *Armillaria mellea* telah berhasil diidentifikasi dengan analisis zimogram fibrin (Lee *et al.* 2005).

Tabel 7 Data karakteristik protease shiitake

Parameter	Ekstrak kasar	Dialisat	Ehbat
Fraksi enzim aktif	7 fraksi	9 fraksi	2 fraksi
BM (kD)	156, 113, 94, 78, 65, 54, 45	118, 102, 94, 78, 68, 59, 49, 43, 36	51, 47 (e7) 65, 51, 45, 37 (e19)
Suhu optimum	50 °C	-	-
pH optimum	7	-	-
Aktivator logam	Li, Na, Fe.	Li, K, Mg, Mn, Ca, Cu, Fe, Zn, Al	-
Inhibitor	Tahan EDTA, dihambat PMSF, STI dan TLCK	Tahan EDTA, dihambat PMSF, STI dan TLCK	-
Spesifitas substrat	Albumin* Gelatin, kasein, albumin**	Fibrinogen, kasein* Gelatin, kasein, albumin, fibrinogen**	-
Aktivitas fibrinolitik	Tidak	Ya	Ya (e7)
Jenis enzim	Serina serupa tripsin	Serina serupa tripsin	-

\*spektrofotometri \*\*zimografi

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Ekstrak kasar enzim protease shiitake memiliki aktivitas optimum pada suhu 50°C dengan waktu inkubasi 10 menit dan pH 7. Ehbat DEAE fraksi 7 dan 19 memiliki tingkat kemurnian 1,89 dan 2,75 kali lebih tinggi terhadap ekstrak kasar dengan tingkat perolehan menurun drastis hingga sekitar 0,4%. Peningkatan kemurnian dibanding ekstrak kasar enzim membuktikan bahwa enzim protease jamur shiitake berhasil dimurnikan dengan kolom DEAE Sepharose.

Hasil analisis SDS-PAGE memperlihatkan dua pita proteolitik pada fraksi ke-7 (51 dan 47 kD) serta empat pita pada fraksi ke-19 (65, 51, 45 dan 37 kD). Protease shiitake mampu menghidrolisis substrat kasein, fibrinogen, albumin dan gelatin dengan analisis zimogram. Aktivitas enzim protease kasar meningkat sekitar empat kali dengan adanya penambahan ion Na<sup>+</sup> dan lima kali dengan ion Fe<sup>3+</sup> (5 mM). Enzim protease kasar shiitake dihambat spesifik oleh inhibitor PMSF, TLCK dan STI sehingga digolongkan ke dalam kelompok protease serina serupa tripsin.

### Saran

Tahap pemurnian enzim yang telah dilakukan sebaiknya dilanjutkan dengan kromatografi gel filtrasi untuk mendapat kemurnian yang lebih tinggi. Perlu dilakukan pencarian biokimiawi enzim protease murni yang mendukung lainnya seperti pengujian stabilitas enzim terhadap suhu dan pH serta analisis asam amino.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham LD, Breuil C. 1996. Isolation and characterization of subtilisin-like serine proteinase secreted by the sap-staining fungus *Ophiostoma piceae*. *Enzyme Microb Technol* 18: 133-40.
- Ahn MY *et al.* 2005. Purification and characterization of a serine protease (CPM-2) with fibrinolytic activity from the Dung Beetles. *Arch Pharm Res* 28: 816-22.
- [Anonim]. 2000. Jamur Shiitake Sembuhkan Hepatitis B. <http://www.clickwok.com>
- Bergmeyer HU, Grassl M. 1983. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72: 234-254.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72: 234-254.
- Boock C. 2000. Herb Blurb: shiitake mushrooms. <http://www.Heartlink.com>.
- Brown WH. 1976. *Introduction to Organics and Biochemistry*. Boston: Willard Grand Press.
- Cotler P. 2001. Chromatography on The Basis of Size. Di dalam: Roe Sd, editor. *Protein Purification Techniques*. Ed ke-2. UK: Oxford Univ Pr.
- Dunn M.J. 1989. Electrophoretic analysis methods. Di dalam: Harris ELV, editor. *Protein Purification Methods*. New York: IRL Oxford Univ Pr.

- Granelli-Piperno A, Reich E. 1978. a study of protease and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J Exp Med* 148: 223-234.
- Gunawan AW. 1992. *Budi Daya Jamur*. Bogor: PAU Ilmu Hayat IPB.
- Ingold CT. 1971. *The Biology of Fungi*. London: Hutchinson Educational Ltd.
- Kim W *et al.* 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol* 2482-2488.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee SY *et al.* 2005. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. Protein Expr Purif. Korea: Departement of Biology Research Center for Industrial Accelerators, Dongshin Univ.
- Lehninger AL. 1993. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Thenawidjaja M, penerjemah. Jakarta: Erlangga.
- Liao C.H. dan D.E. McCallus. 1998. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. Di dalam: Jewell SN. *Purification and Characterization of a Novel Protease from Burkholderia Strain 2.2 N*. Virginia: Virginia Polytechnic.
- Liota LA, Stetler SWG. 1990. *Cancer Biology*. Chemicon International.
- Medicinal Mushroom. 2001. Mushroom and Health. <http://www.gmushrooms.com>.
- Murray *et al.* 1997. *Biokimia Harper*. Hartono A, penerjemah; Santoso AA, editor. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Ed ke-24. Terjemahan: *Harper's Biochemistry*.
- Nature's Impact. 1998. Benefits of Shiitake: Lowers cholesterol and combats HIV. <http://www.healthcastle.com>
- Nurachman Z. 2001. Obat Stroke dan Jantung akibat Trombosis dari Cacing Tanah. *Kompas*.
- Palmer T. 1991. *Understanding Enzymes*. Ed ke-3. New York: Ellis Horwood.
- Palmieri G *et al.* 2001. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 2754-2759.
- Peng Y *et al.* 2003. Purification and characterization of an fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from *douche*, a traditional Chinese soybean food. *Comp Biochem Physiol* 134:45-52.
- Rao *et al.* 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microb Mol Biol Rev* 62 (3): 597-635.
- Roe S. 2001. *Protein Purification Technique: A Practical Approach*. Ed ke-2. New York: Oxford Univ Pr.
- Scopes RK. 1987. *Protein Purification Principles and Practice*. Ed ke-2. New York: Springer-Verlag.
- Sinaga M. 1999. *Jamur Merang dan Budidayanya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Suhardiman P. 1991. *Jamur Kayu*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Suhardiman P. 1998. *Budidaya Jamur Shiitake*. Yogyakarta: Kanisius.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: PAU IPB.
- Suhartono MT. 1992. *Protease*. Bogor: PAU IPB.
- Wijaya J. 2001. Penentuan Kadar Air Keseimbangan dan Konstanta Pengerinan Jamur Shiitake (*Lentinus edodes*) dengan Metoda Dinamis [Skripsi]. Bogor: Program Sarjana Ilmu Pangan Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Yanti. 2003. Pemurnian dan Karakterisasi Protease Cacing Tanah *Lumbricus rubellus* yang Bersifat Fibrinolitik [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

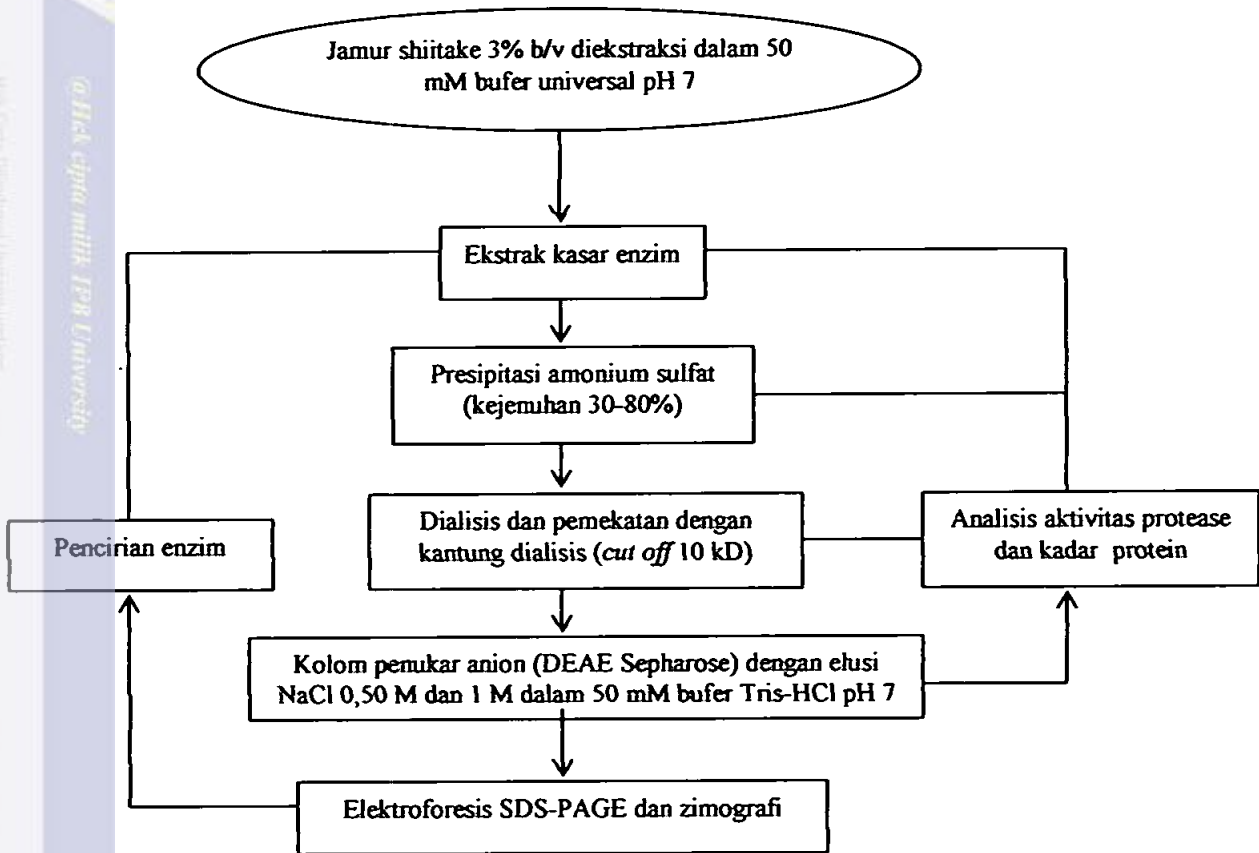


## LAMPIRAN

Maklumat tentang Undang-undang

- a. Objektif mengutip jabatan atau jabatan yang lain itu bagi melaksanakan dan menyediakan sumber :
- b. Pengutipan itu bagi kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan buku atau tulisan atau media;
- c. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University;
- d. Dianggap mengutamakan dan memperhatikan kelangkaan atau nilai-nilai karya tulis itu dalam rangka keperluan tugas dan IPB University.

## Lampiran 1 Diagram alir pemurnian protease shiitake



Lampiran 2 Jumlah amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam larutan untuk menghasilkan kejenuhan akhir yang diinginkan pada 0°C (Roe, 2001)

		Konsentrasi akhir amonium sulfat, % kejenuhan pada 0°C																
Konsentrasi awal amonium sulfat		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
		Jumlah amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam 100 ml larutan (g)																
0	10,7	13,6	16,6	19,7	22,9	26,2	29,5	33,1	36,6	40,4	44,2	48,3	52,3	56,7	61,1	65,9	7,07	
5	8,0	10,9	13,9	16,8	20,0	23,2	26,6	30,0	33,6	37,3	41,1	45,0	49,1	53,3	57,8	62,4	67,1	
10	5,4	8,2	11,1	14,1	17,1	20,3	23,6	27,0	30,5	34,2	37,9	41,8	45,8	50,0	54,5	58,9	63,6	
15	2,6	5,5	8,3	11,3	14,3	17,4	20,7	24,0	27,5	31,0	34,8	36,6	42,6	46,6	51,0	55,5	60,0	
20	0	2,7	5,6	8,4	11,5	14,5	17,7	21,0	24,4	28,0	31,6	35,4	39,2	43,3	47,6	51,9	56,6	
25		0	2,7	5,7	8,5	11,7	14,8	18,2	21,4	24,8	28,4	32,1	36,0	40,1	44,2	48,5	52,9	
30			0	2,8	5,7	8,7	11,9	15,0	18,4	21,7	25,3	28,9	32,8	36,7	40,8	45,1	49,5	
35				0	2,8	5,8	8,8	12,0	15,3	18,7	22,1	25,8	29,5	33,4	37,4	41,6	45,9	
40					0	2,9	5,9	9,0	12,2	15,5	19,0	22,5	26,2	30,0	34,0	38,1	42,4	
45						0	2,9	6,0	9,1	12,5	15,8	19,3	22,9	26,7	30,6	34,7	38,8	
50							0	3,0	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,3	27,2	31,2	35,3	
55								0	3,0	6,2	9,4	12,9	16,3	20,0	23,8	27,7	31,7	
60									0	3,1	6,3	9,6	13,1	16,6	20,4	24,2	28,3	
65										0	3,1	6,4	9,8	13,4	17,0	2,8	24,7	
70											0	3,2	6,6	10,0	13,6	17,3	21,2	
75												0	3,2	6,7	10,2	13,9	17,6	
80													0	3,3	6,8	10,4	14,1	
85														0	3,4	6,9	10,6	
90															0	3,4	7,1	
95																0	3,5	
100																	0	

### Lampiran 3 Hasil penentuan aktivitas enzim maksimum protease kasar shiitake

Aktivitas enzim dihitung berdasarkan persamaan berikut:

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

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/ml)}}{\text{Kadar protein (mg/ml)}}$$

#### Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease kasar

Waktu (menit)	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas relatif (%)
5	0,339	0,272	0,530	0,312	45,07
10	0,482	0,339	0,463	0,692	100,00
15	0,471	0,242	0,519	0,331	47,83
20	0,566	0,393	0,536	0,363	52,46
30	0,587	0,249	0,511	0,258	37,28

#### Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease kasar

pH	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)
3	0,252	0,371	0,714	0,000
4	0,359	0,296	1,048	0,050
5	0,482	0,435	0,969	0,053
6	0,391	0,282	0,916	0,103
7	0,535	0,356	0,606	0,430
8	0,442	0,282	0,945	0,145
9	0,363	0,370	0,806	0,000
10	0,470	0,489	1,150	0,000
11	0,360	0,358	0,830	0,002
12	0,240	0,311	0,800	0,000

#### Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease kasar

Suhu	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas relatif (%)
27 (°C)	0,361	0,393	0,979	0,000	0,00
30 (°C)	0,210	0,223	0,860	0,000	0,00
37 (°C)	0,479	0,421	0,771	0,100	32,05
45 (°C)	0,343	0,233	0,789	0,119	38,14
50 (°C)	0,339	0,272	0,530	0,312	100,00
55 (°C)	0,288	0,203	0,503	0,170	54,49
60 (°C)	0,493	0,359	0,837	0,168	53,85
65 (°C)	0,417	0,369	0,727	0,080	25,64



## Lampiran 4 Hasil pemurnian enzim protease shiitake

## Hasil presipitasi dengan amonium sulfat

[amonium sulfat]	Absorban	Kadar protein (mg/ml)
30 %	0,309	0,065
40 %	0,331	0,070
45 %	0,318	0,068
50 %	0,299	0,062
55 %	0,269	0,055
60 %	0,208	0,042
65 %	0,205	0,041
70 %	0,136	0,025
75 %	0,149	0,027
80 %	0,133	0,024

## Hasil analisis kromatografi kolom penukar anion

Fraksi ke-n	Absorban	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas enzim (U/ml)
1	0,090	0,014	0,000
2	0,199	0,039	0,000
3	0,248	0,051	0,000
4	0,144	0,027	0,000
5	0,047	0,005	0,000
6	0,136	0,025	0,000
7	0,327	0,069	0,473
8	0,333	0,070	0,000
9	0,117	0,021	0,000
10	0,119	0,021	0,000
11	0,013	0,000	0,000
12	0,000	0,000	0,000
13	0,040	0,003	0,000
14	0,037	0,002	0,000
15	0,052	0,005	0,000
16	0,034	0,002	0,000
17	0,136	0,025	0,062
18	0,142	0,026	0,112
19	0,206	0,041	0,414
20	0,052	0,005	0,042
21	0,042	0,003	0,000
22	0,077	0,012	0,000
23	0,112	0,019	0,000
24	0,092	0,015	0,000
25	0,068	0,009	0,000
26	0,019	0,000	0,000
27	0,022	0,000	0,000
28	0,038	0,002	0,000
29	0,043	0,003	0,000



## Lampiran 5 Hasil pencirian enzim protease shiitake

### Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim protease kasar

Ion logam	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residu (%)
KCl	0,281	0,330	0,664	0,000	0,00
NaCl	0,317	0,234	0,598	0,136	566,67
LiCl	0,256	0,233	0,674	0,031	129,17
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,350	0,379	0,577	0,000	0,00
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,325	0,327	0,720	0,000	0,00
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,303	0,375	0,706	0,000	0,00
MnCl <sub>2</sub>	0,260	0,265	0,674	0,000	0,00
ZnCl <sub>2</sub>	0,286	0,319	0,699	0,000	0,00
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,376	0,324	0,624	0,104	433,33
AlCl <sub>3</sub>	0,259	0,352	0,698	0,000	0,00
kontrol	0,366	0,357	0,582	0,024	100,00

### Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim protease dialisat

Ion logam	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas residu (%)
KCl	1,111	0,264	0,790	0,966	244,56
NaCl	0,360	0,107	0,591	0,314	79,49
LiCl	1,059	0,329	0,794	0,942	238,48
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,153	0,273	0,775	1,052	266,33
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,982	0,235	0,756	0,860	217,72
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,245	0,307	0,781	1,187	300,51
MnCl <sub>2</sub>	1,070	0,279	0,769	0,969	245,32
ZnCl <sub>2</sub>	1,243	0,300	0,817	1,094	276,96
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,087	0,328	0,811	0,943	238,73
AlCl <sub>3</sub>	1,013	0,288	0,847	0,778	196,96
dialisat	1,553	0,489	2,015	0,395	100,00

### Spesifitas substrat terhadap aktivitas enzim protease kasar

Substrat	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas Relatif (%)
Albumin	0,373	0,365	0,799	0,011	1,52
Fibrinogen	0,333	0,361	0,884	0,000	0,00
Gelatin	0,670	0,694	0,968	0,000	0,00
Kasein	0,900	1,224	0,877	0,000	0,00

### Spesifitas substrat terhadap aktivitas enzim protease dialisat

Substrat	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas Relatif (%)
Albumin	1,175	1,310	1,688	0,000	0,00
Fibrinogen	0,758	0,489	0,911	0,382	53,13
Gelatin	0,580	0,800	1,138	0,000	0,00
Kasein	0,987	0,467	0,901	0,719	100,00

### Pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim protease kasar

Inhibitor	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas relatif (%)
Kontrol	0,349	0,359	0,837	0,322	100,00
EDTA	0,373	0,328	0,764	0,619	192,24
PMSF	0,350	0,312	0,731	0,054	16,77
STI	0,368	0,310	0,784	0,073	22,67
TLCK	0,313	0,299	0,871	0,015	4,66

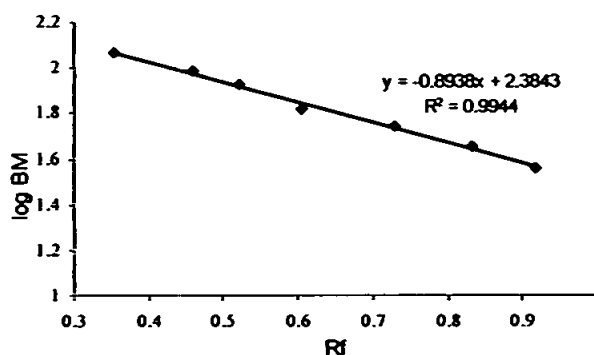
### Pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim protease dialisat

Inhibitor	A <sub>Sampel</sub>	A <sub>Blanko</sub>	A <sub>Standar</sub>	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas relatif (%)
kontrol	0,571	0,473	0,802	0,179	100,00
EDTA	0,508	0,358	0,789	0,209	116,76
PMSF	0,523	0,407	0,855	0,155	86,59
STI	0,501	0,359	0,882	0,154	86,03
TLCK	0,455	0,382	0,670	0,152	84,92

### Kurva standar penanda bobot molekul untuk SDS-PAGE

Rf pita ke-	BM (kD)	Log BM
0,167	205	0,312
0,354	116	2,064
0,458	97	1,987
0,521	84	1,924
0,604	66	1,819
0,729	55	1,740
0,833	45	1,653
0,917	36	1,556

### Kurva hubungan antara Rf dan log BM



Diperoleh persamaan  $Y = 2,3843 - 0,8938 x$ ; dengan  $R^2 = 0,9944$

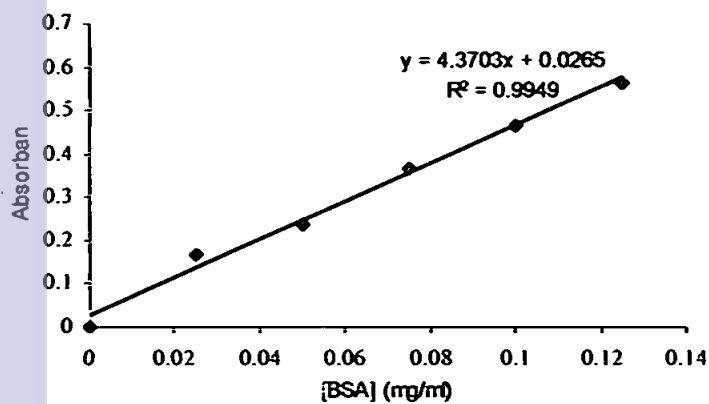


## Lampiran 6 Kurva standar Bradford

Nilai serapan hasil pengukuran

[BSA] (mg/ml)	Absorban
0,000	0,000
0,025	0,168
0,050	0,237
0,075	0,368
0,100	0,464
0,125	0,561
0,150	0,587
0,175	0,591
0,200	0,627
0,225	0,635
0,250	0,639
0,275	0,648
0,300	0,651

Diperoleh kurva standar BSA dengan persamaan  $Y=4,3703x+0,0265$ ;  $R^2=0,9949$



## Lampiran 7 Prosedur pembuatan pereaksi kimia

### Pereaksi untuk analisis aktivitas enzim dan kadar protein

- **Kasein Hammarsten 2% (b/v)**  
Sebanyak 1 g kasein dilarutkan dalam 50 mM bufer universal pH 7 (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk dan dipanaskan ( $\pm 50-60^{\circ}\text{C}$ ) supaya mudah larut, kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- **Tirosin 5 mM**  
Sebanyak 0,091 g tirosin dilarutkan dalam akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk, kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- **TCA 0,1 M**  
Sebanyak 1,634 g TCA dilarutkan dalam akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk, kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- **$\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,4 M**  
Sebanyak 4,2404 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk, kemudian ditera hingga volume total 100 ml.
- **Pereaksi Folin-Ciocalteu (1:2)**  
Sebanyak 25 ml pereaksi Folin-Ciocalteu diencerkan dengan 50 ml akuades dan diaduk hingga homogen.
- **Pereaksi Bradford**  
Stok larutan Bradford dibuat dengan cara melarutkan 0,1 g *Coomassie Brilliant Blue G-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 (bufer gel pemisah, Tris-HCL 2 M pH 8,8)**  
Sebanyak 75 ml bufer 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 1 M 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.
- **Bufer sampel**  
Komposisi bufer sampel untuk SDS-PAGE terdiri dari 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-merkaptotanol, 0,5 ml bromfenol blue 1% (b/v), dan 0,45 ml akuabides dengan volume total 5,0 ml. Sementara komposisi bufer sampel untuk zimografi terdiri dari 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 akuades 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 asam asetat glasial, dan 225 ml 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.

#### Bufer universal

Larutan A : asam sitrat (6,008 g) +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,895 g) +  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (1,769 g) + asam dietilbarbiturat (5,266 g) dilarutkan dalam 1 liter akuades

Larutan B : 0,2 N NaOH

Komposisi : 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