

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.1.1 Alat

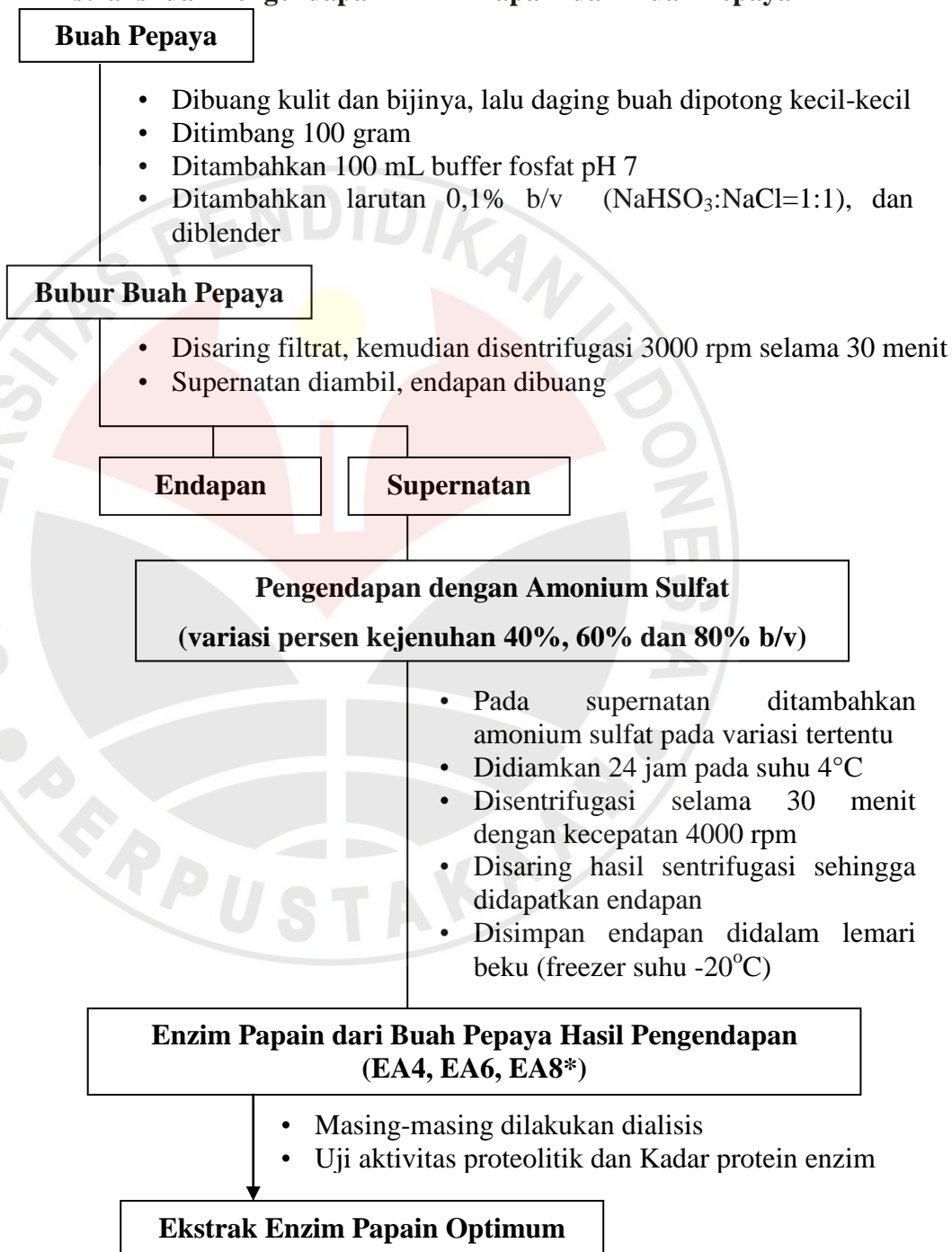
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: *waterbath*, set alat sentrifugasi, oven dan autoclav, inkubator, pemanas listrik plus magnetic stirer, blender, neraca analitik, pH meter, termometer, Spektrofotometer UV-VIS, wadah media *Panthotenate broth*, pisau dan wadah, spatula, botol semprot, dan peralatan gelas seperti: pipet volume, gelas kimia, gelas ukur, kaca arloji, batang pengaduk, labu ukur, dan tabung reaksi.

3.1.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini, yaitu: Buah Pepaya (*Carica papaya* L.), NaHSO₃, NaCl, (NH₄)₂SO₄, CuSO₄·5H₂O, KNa-Tartrat, Albumin, Kasein, TCA, Larutan buffer fosfat pH 7 dan 6, Natrium asetat, Na₂CO₃, Pereaksi Folin-Ciocalteu, Tirosin, BaCl₂, Kantung selofan, Aquades, NaOH, HCl, EDTA, Susu skim, Glukosa, Ekstrak ragi, Bakteri *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesentroides*, dan *Lactococcus lactis*.

3.2 Bagan Alir Penelitian

3.2.1 Ekstraksi dan Pengendapan Enzim Papain dari Buah Pepaya



Gambar 3.1 Bagan Proses Ekstraksi dan Pengendapan Enzim Papain dari Buah Pepaya menggunakan Amonium Sulfat pada Variasi Persen Kejenuhan b/v

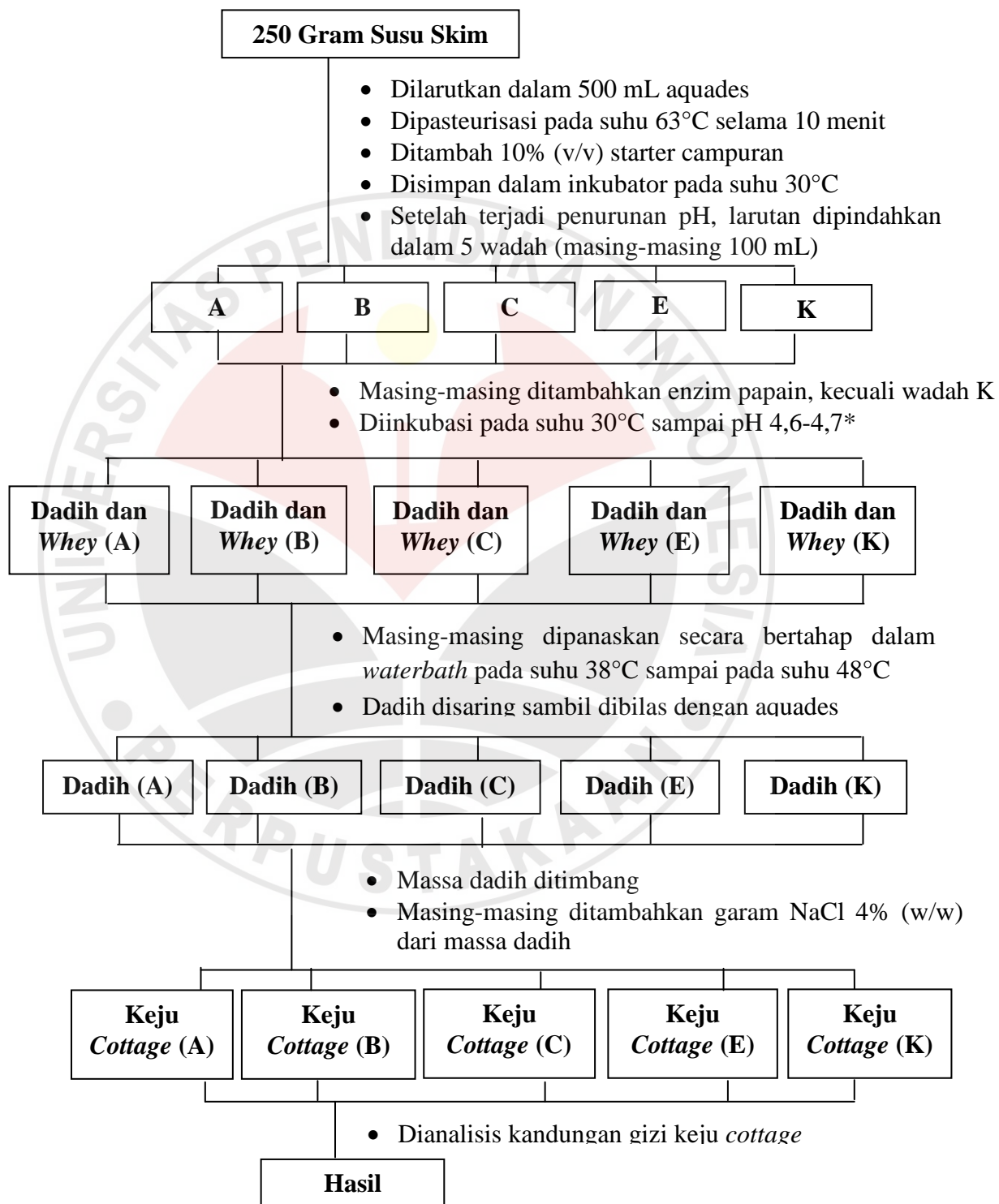
Ket: EA4: Pengendapan Enzim dengan Amonium Sulfat persen kejenuhan 40% b/v
EA6: Pengendapan Enzim dengan Amonium Sulfat persen kejenuhan 60% b/v
EA8: Pengendapan Enzim dengan Amonium Sulfat persen kejenuhan 80% b/v

Ranika Adytia Putri, 2012

Kajian Penggunaan Amonium Sulfat Pada Pengendapan Enzim Peotease (Papain) Dari Buah Pepaya Sebagai Koagulan Dalam Produksi Keju *Cottage*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

3.2.2 Produksi Keju *Cottage* (Nunik Sane, 2011)



Gambar 3.2 Bagan Produksi Keju *Cottage* pada Variasi Jenis dan Konsentrasi Papain

Ket: A: Penambahan papain hasil pengendapan (konsentrasi 150 ppm)
 B: Penambahan papain hasil pengendapan (konsentrasi 250 ppm)
 C: Penambahan papain hasil pengendapan (konsentrasi 350 ppm)
 E: Penambahan papain tanpa pengendapan
 K: Kontrol tanpa penambahan papain (0 ppm)

3.3 Metode Penelitian

Tahapan kegiatan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tahap ekstraksi dan pengendapan enzim protease (papain) dari buah pepaya menggunakan amonium sulfat
2. Tahap pengujian aktivitas enzim dan konsentrasi protein enzim protease (papain) dari buah pepaya
3. Tahap preparasi starter bakteri (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, dan *Leuconostoc mesentroides*)
4. Tahap produksi keju *cottage*

3.3.1 Ekstraksi dan Pengendapan Enzim Protease (Papain) dari Buah Pepaya Menggunakan Amonium Sulfat

Papain merupakan enzim proteolitik yang dapat diperoleh dari buah pepaya. Mula-mula, buah pepaya dipisahkan dari kulit dan bijinya, kemudian dilakukan pengirisan kecil-kecil. Selanjutnya ditambahkan buffer fosfat pH 7,0 yang bertujuan untuk mempertahankan bentuk aktif papain sehingga masih dapat memiliki aktivitas yang baik. Larutan 0,1% b/v (NaHSO₃:NaCl=1:1) ditambahkan untuk mencegah berubah warna menjadi coklat dan terhindar dari bakteri pembusuk. Setelah itu diblender hingga menjadi bubur halus.

Bubur buah pepaya yang dihasilkan diambil filtratnya dengan penyaringan. Kemudian dilakukan disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh diberi perlakuan dengan

penambahan amonium sulfat pada variasi persen kejenuhan tertentu untuk mendapatkan endapan enzim papain dari buah pepaya (Lampiran IV).

Setelah itu, supernatan didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C hingga terbentuk endapan. Endapan diambil melalui sentrifugasi dan disimpan pada lemari beku (*freezer*) suhu -20°C.

Selanjutnya, endapan enzim yang diperoleh dari hasil pengendapan amonium sulfat dilakukan dialisis. Endapan enzim dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7, lalu dimasukkan kedalam kantung selofan yang sebelumnya telah dipreparasi (Lampiran III), diikat dan direndam dalam buffer pH 6, diaduk dengan menggunakan stirrer selama 8 jam pada suhu 4°C pada 4 jam pertama, setiap jam larutan dialisis diganti. Larutan dialisis diuji dengan BaCl₂ untuk memastikan garam, sulfat dan pengotor-pengotor lainnya telah keluar dari larutan enzim. Setelah enzim sedikitnya bebas dari pengotor, kemudian dilakukan pengujian aktivitas dan kadar protein enzim protease (papain).

3.3.2 Pengujian Aktivitas Enzim dan Konsentrasi Protein Enzim Protease (Papain) dari Buah Pepaya

Berdasarkan *Sigma's Non-specific Protease Activity Assay* (2008), pengujian aktivitas proteolitik enzim dilakukan dengan mencampur 3 mL kasein 1,5% dan 2 mL larutan enzim. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C dan dishaker selama 10 menit. Larutan TCA ditambahkan sebanyak 5 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan dishaker selama 30 menit. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan

yang diperoleh diambil 2 mL lalu ditambahkan 5 mL Na_2CO_3 dan 0,5 mL pereaksi folin. Diinkubasi larutan pada suhu 37°C dan dishaker selama 30 menit. Kemudian diukur nilai serapannya pada panjang gelombang 739 nm. Sebelumnya kurva standar dibuat dengan konsentrasi tirosin berturut-turut 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm. Blanko dibuat dengan cara sama seperti di atas, hanya saja larutan enzim ditambahkan setelah kasein dan larutan TCA dicampurkan.

Pengukuran aktivitas proteolitik enzim dilakukan dengan mengubah nilai serapan menjadi konsentrasi tirosin ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dengan kurva standar tirosin. Aktivitas proteolitik enzim dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas proteolitik} = [\text{tirosin}] \times v / (p \times q) \times fp$$

Keterangan:

- [tirosin] = konsentrasi tirosin yang terbentuk ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
- v = volume total sampel pada tiap tabung (mL)
- q = waktu inkubasi (menit)
- p = volume enzim (mL)
- fp = faktor pengenceran

Untuk pengujian kadar protein enzim menggunakan metode Lowry. Metode ini mengkombinasikan pereaksi biuret dengan pereaksi lain (Folin-Ciocalteu phenol) yang bereaksi dengan residu tirosin dan triptofan dalam protein. Reaksi antara Cu^{2+} dengan ikatan peptida dan reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin yang merupakan residu protein akan menghasilkan warna biru (Sudarmadji, dkk. 1997). Tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan Reagen pembentukan kompleks

Reagen pembentukan kompleks dibuat dengan cara terlebih dahulu membuat tiga jenis larutan. Larutan A yaitu 2% Na_2CO_3 dan 0,02% Kalium Natrium tartrat dalam larutan NaOH 0,1 N. Larutan B yaitu 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Campurkan 50 mL larutan A dengan 1 mL larutan B menjadi larutan C (reagen assay/pembentuk). Pereaksi Folin-Ciocalteu (tersedia secara komersil), dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1:1. Larutan protein standar 1000 mg/L berupa larutan albumin.

2. Pembuatan kurva standar

Protein standar dalam berbagai volum dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan aquades hingga konsentrasi berturut-turut 0, 100, 250, 400, 550, 700 ppm dan dicampurkan dengan pereaksi larutan C. Didiamkan 10 – 15 menit pada suhu kamar. Ditambahkan pereaksi Folin-Ciocalteu ke dalam masing-masing tabung reaksi dan kocok merata, dibiarkan hingga warna biru terbentuk. Diukur absorbansinya pada 749 nm dan dibuat kurva standar.

3. Penetapan sampel

Sampel yang diambil dari masing-masing perlakuan sebanyak 1 mL ditambahkan 5 mL larutan C (reagen pembentukan kompleks). Dibiarkan larutan selama 10 menit pada suhu kamar. Tambahkan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu, lalu dikocok hingga homogen, dibiarkan selama 30 – 60 menit (jangan sampai lebih dari 60 menit). Kemudian dibaca absorbansi pada 749 nm.

Enzim papain dari buah pepaya hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada variasi persen kejenuhan tertentu ditentukan aktivitas protease dan kadar proteinnya. Setelah didapat enzim papain dengan aktivitas spesifik tertinggi, kemudian diuji aplikasinya dalam pembuatan keju *cottage* dilihat dari waktu koagulasi dan massa keju yang dihasilkan. Analisis kandungan gizi meliputi kadar air, protein, lemak dan kalsium dilakukan pada hasil keju *cottage* yang optimum.

3.3.3 Preparasi Bakteri Starter

Tahapan yang dilakukan dalam penumbuhan bakteri starter ini adalah menyiapkan media *panthotenate broth* sebagai media penumbuhan bakteri. Media *panthotenate broth* dibuat dengan cara menimbang 5 gram glukosa, 5 gram natrium asetat dan 20 gram ekstrak ragi, kemudian dilarutkan dalam 1L aquades. Campuran ini dipanaskan sambil diaduk dengan stirrer selama 15 menit setelah mendidih. Kemudian media tersebut didinginkan, lalu dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer steril dan ditutup dengan kapas yang dibalut kain kasa. Langkah terakhir adalah sterilisasi media menggunakan autoklap dengan tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C selama 15 menit.

Tahap selanjutnya adalah penumbuhan bakteri starter. Starter yang digunakan adalah starter campuran 3 bakteri yaitu starter *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesentroides*, dan *Lactococcus lactis* dengan perbandingan 3:1:2. Masing-masing bakteri dinokulasi dalam 225 mL, 75 mL dan 150 mL *panthotenate broth* steril secara berurutan. Diinkubasi pada suhu

30°C selama 6 jam untuk bakteri *Streptococcus thermophilus*, 4 jam untuk bakteri *Lactococcus lactis*, dan 8 jam untuk bakteri *Leuconostoc mesentroides*. Selanjutnya, bakteri-bakteri tersebut dicampurkan menjadi satu.

3.3.4 Produksi Keju *Cottage*

Pembuatan keju *cottage* dilakukan berdasarkan prosedur penelitian sebelumnya dari Nunik Sane (2011) yaitu dengan melarutkan 250 gram susu skim dalam 500 mL aquades, dipasteurisasi pada suhu 63°C selama 10 menit. Dilakukan penambahan 10% (v/v) starter campuran, disimpan dalam inkubator pada suhu 30°C. Setelah terjadi penurunan pH, larutan dipindahkan ke dalam 5 wadah (masing-masing 100 mL). Larutan enzim papain hasil pengendapan optimum ditambahkan kedalam masing-masing 3 wadah dengan konsentrasi berturut-turut 150 (A); 250 (B); dan 350 (C) ppm, wadah berikutnya ditambahkan ekstrak kasar tanpa pengendapan 215 ppm (E), dan satu wadah sisa tanpa penambahan enzim papain (K) sebagai kontrol.

Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 30°C sampai pH 4,6 – 4,7 dan dicatat lamanya waktu hingga tercapai pH tersebut (waktu koagulasi). Dadih dan *whey* yang dihasilkan dipisahkan dengan pemanasan bertahap dalam *waterbath* pada suhu 38°C sampai suhu 48°C, kemudian campuran disaring dan dibilas dengan aquades. Setelah diperoleh dadih, kemudian ditambahkan garam NaCl 4% (w/w) dari massa dadih, hingga terbentuklah keju *cottage*. Keju *cottage* terbaik yang dihasilkan ditentukan analisis kandungan gizinya meliputi kadar air, protein, lemak dan kalsium.