

PEMURNIAN PARSIAL ENZIM PROTEASE DARI GETAH TANAMAN BIDURI (*Calotropis gigantea*) MENGGUNAKAN AMMONIUM SULPHAT

*The Use of Ammonium Sulphate for Partial Purification of Proteases Obtained from the Latex of Milkweed Plant (*Calotropis gigantea*)*

Yuli Witono¹, Aulanni'am², Achmad Subagio³ dan Simon Bambang
Widjanarko⁴

¹ Mahasiswa Program Doktor Ilmu Pertanian Universitas Brawijaya Malang, email:
ylwitono@yahoo.com

² Staf Pengajar Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

³ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

⁴ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

*The latex of milkweed plant (*Calotropis gigantea*) is known to have proteolytic activities. The research was conducted to evaluate the use of ammonium sulphate for partial purification of such enzymes. The phosphate buffer extract of the latex was first centrifuged to precipitate gum and non-proteinous matter. The supernatant was then treated with ammonium sulphate to achieve the respective degree of saturation, namely 35, 50, 65 and 80%. It showed that the use of ammonium sulphate at 65% degree of saturation was the optimum condition, and produced a partially purified enzyme with proteolytic activity which was not significantly different from that obtained from the use of the same salt at 80% degree of saturation. Nonetheless, the supernatant still showed a substantial degree of proteolytic activity, indicating that the latex contained a various types of proteases.*

*Key Word: Milkweed plant (*Calotropis gigantea*), protease, partial purification.*

PENDAHULUAN

Enzim protease berperan besar dalam proses-proses seluler akibat kemampuan proteolitiknya yang esensial. Protease banyak digunakan dalam bidang industri, seperti pembuatan keju, penjernih bir, pembuatan roti, pengempuk daging, pembuatan hidrolisat protein dan ekstraksi minyak. Pemakaian enzim protease meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 1983 penjualan enzim protease mencapai 40% dari total penjualan enzim dunia (Word, 1983), tahun 1995 meningkat sampai 60% dari total pemakaian enzim dunia yang bernilai lebih dari 2 milyar dollar AS (Suhartono dkk., 1995). Bahkan pada tahun 1998 sampai 70% dari total pemakaian enzim untuk pangan (Rao *et al.*, 1998).

Enzim protease dapat diproduksi dari jaringan-jaringan hidup yang meliputi:

mikroorganisme, hewan maupun tanaman antara lain getah pepaya, melon, daun chaya, biji padi dan lain-lain. Namun demikian untuk memproduksi enzim protease dari beberapa sumber tersebut masih menghadapi banyak kendala. Meskipun mikroba dikenal luas sebagai sumber enzim protease, namun untuk tujuan-tujuan tertentu, enzim protease dari tanaman masih mempunyai peranan yang sangat besar yang belum sepenuhnya dapat digantikan oleh enzim mikroba. Enzim yang diproduksi dari jaringan hewan relatif mahal dan ketersediaanya tergantung pada permintaan hewan-hewan sumber enzim tersebut di pasaran, mengingat enzim harus diekstrak dari hewan-hewan yang sudah mati. Sedangkan enzim protease yang diproduksi dari tanaman seperti papain dari getah pepaya, akan

mengakibatkan penurunan kualitas pada buah segarnya setelah disadap.

Di sisi yang lain, ketersediaan enzim protease belum mencukupi kebutuhan, sementara pemakaian protease bagi industri pangan cenderung meningkat, oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber enzim protease yang lain. Salah satunya adalah biduri (*C. gigantea*) yang merupakan jenis tumbuhan semak liar di daerah tropis termasuk Indonesia. Menurut Stenis (1992) tanaman ini banyak tumbuh pada lahan kering dan sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan bahkan pada beberapa daerah dianggap sebagai gulma.

Tanaman dalam satu genus dengan biduri, yaitu *Calotropis procera* dapat digunakan sebagai sumber enzim protease (Eskin, 1990). Peneliti lain yaitu Chinas and Canales (1986), melaporkan bahwa *Calotropis procera* telah sukses digunakan sebagai sumber enzim protease untuk pembuatan keju. Menurut paradigma *Chemotaksonomy*, tanaman dari genus yang sama memiliki kemiripan alam komposisi kimianya (Ray, 1989). Hasil penelitian penulis sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman biduri dapat digunakan sebagai sumber enzim protease, dan juga ekstrak kasar protease biduri mempunyai kemampuan untuk mengempukkan daging dan menggumpalkan susu, walau belum menghasilkan tingkat keempukan daging dan rendemen keju yang maksimal (Witono, 2002a; Witono, 2002b; Witono dkk., 2002 dan Witono, dkk., 2003).

Untuk memudahkan pengujian maupun aplikasi lebih lanjut, maka enzim protease harus diisolasi dari sumbernya. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstraksi protease dari getah tanaman biduri dengan pelarut organik (yakni etanol dan aseton) merupakan teknik ekstraksi yang relatif muda dan cepat, akan tetapi dihasilkan aktivitas protease yang relatif lebih rendah dibanding menggunakan ammonium sulphat, karena pelarut organik dapat memberikan efek denaturasi pada protein enzim. Garam amonium sulfat sering digunakan untuk *salting out* protein enzim. karena kelarutannya sangat tinggi, tidak beracun untuk kebanyakan enzim, murah

dan pada beberapa kasus memberikan efek menstabilkan enzim (Dixon and Webb, 1979 dalam Fox, 1991).

Penggunaan ammonium sulphat pada isolasi enzim telah dilaporkan oleh beberapa peneliti antara lain: Noda, Kayonagi and Kamiya (1994) menggunakan ammonium sulphat dengan kejenuhan 50% untuk isolasi enzim protease dari buah melon. Asakura *et al.* (1997) menggunakan ammonium sulphat kejenuhan 30-60% untuk mengekstrak dan memurnikan *oryzasin* dari biji padi. Tavasolian and Shabbah (1979) mengendapkan enzim dari biji *Cartamus tinctorius* dengan ammonium sulphat kejenuhan 50%. Akan tetapi belum diteliti berapa tingkat kejenuhan ammonium sulphat yang optimal untuk ekstraksi enzim protease dari getah tanaman biduri.

Penelitian ini bertujuan untuk: mengekstrak enzim protease dari getah tanaman biduri secara *salting out* menggunakan ammonium sulphat dan menentukan tingkat kejenuhan ammonium sulphat yang optimal sehingga didapat protease yang memiliki total aktifitas paling tinggi, yang selanjutnya akan dapat dijadikan dasar untuk eksplorasi protease biduri lebih lanjut.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah getah dari pucuk batang tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang di dapat dari daerah Watu Ulo Ambulu Jember. Getah didapat dengan cara melukai atau memotong pucuk batang tanaman biduri, lalu dibawa pada kondisi dingin dalam termos yang telah diisi es batu. Bahan kimia yang digunakan dalam analisa dengan kemurnian *pure analytic* (PA) dari Merck Jerman.

Sedangkan alat-alat yang digunakan meliputi: centrifuge Medifriger, centrifuge Yenaco model YC-1180 (Jepang), freeze dryer Snijder Scientific tipe 2040

(Belanda), spectronic 21D Melton Roy, pH meter Jen Way tipe 3320 (Jerman), magnetik stirer Stuart Scientific, vortex Thermolyne type 16700 Mixer, lemari pendingin Ger®, waterbath GFL 1083, neraca analitik Ohaus, pemanas listrik Gerhardt dan alat-alat lain yang terkait.

Rancangan Penelitian

Isolasi enzim protease dari getah biduri; dilakukan secara *salting out* (Noda *et al.*, 1994) menggunakan garam ammonium sulphat pada tingkat kejenuhan 35, 50, 65 dan 80% yang diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif (Suryabrata, 1994) yang meliputi parameter: rendemen (metode grafimetri; AOAC, 1997), kadar protein terlarut (metode Lowry; Walker, 1994), aktifitas protease (Stoknes and Rustad, 1995; Walker, 1994) dan total aktifitasnya dihitung.

Presipitasi dengan Ammonium Sulphat (Noda *et al.*, 1994 dengan modifikasi)

Preparat (filtrat getah) diperoleh dari getah tanaman biduri yang telah dihilangkan gum-nya. Getah biduri diencerkan dengan buffer fosfat 0.05 M pH 7 dengan perbandingan 1 gram getah biduri : 5 ml buffer fospat. Deguming dilakukan dengan sentrifus dingin suhu 4°C pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya supernatan getah di pisahkan dari endapannya yang sebagian besar mengandung gum dan komponen selain protein. Supernatan diamati aktifitas enzim dan kadar proteinnya.

Sampel supernatan ditambahkan garam ammonium sulphat pada tingkat kejenuhan sesuai perlakuan (35%; 50%; 65% dan 80%), lalu distirer sampai ammonium sulphat tercampur semua. Selanjutnya disentrifus dingin suhu 4°C pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dan endapan yang diperoleh dari sentrifus dingin didialisis dengan larutan buffer fosfat 0.05 M pH = 7 selama 3 x 24 jam pada membran selofan. Dialisis dilakukan untuk memisahkan protein enzim dari ion garam, ion logam dan molekul-molekul kecil, sehingga dapat memurnikan protein enzim.

Preparat hasil dialisis selanjutnya dikeringkan dengan freeze drying.

Penghitungan Rendemen (AOAC, 1997)

Penghitungan rendemen dilakukan dengan menimbang crude protease kering kemudian dibandingkan dengan berat sampel dikalikan 100%. Penghitungan rendeman dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat protease kering (gram)

B = berat sampel biduri (gram)

Analisa Kadar Protein terlarut (Metode Lowry, Walker., 1994)

Pengamatan kadar protein enzim protease dilakukan menggunakan metode Lowry (Walker, 1994). Pengamatan dilakukan dengan mengambil sampel sebesar 0.001 gram sampel protease kering. Kemudian dilakukan hidrolisis protein untuk mendapatkan protein terlarut menggunakan 0.1 ml NaOH 2N pada suhu 100°C selama 10 menit lalu didinginkan. Protein terlarut yang dihasilkan lalu direaksikan dengan 2 ml reagen mix-Lowry dan didiamkan selama 10 menit. Menambahkan 0.25 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Ditera dengan aquades sampai volume 5 ml kemudian dibaca absorbannya dengan spektrometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar BSA untuk dihitung kadar proteinnya.

Pengujian Aktifitas Protease (Metode Lowry; Walker, 1994)

Pengujian aktifitas enzim protease menggunakan substrat soluble casein pada pH 7. Menimbang 0.01 gram soluble casein dalam tabung sentrifuse lalu dicampur dengan 3 ml buffer fosfat pH 7. Kemudian dilakukan pra inkubasi pada suhu 37°C selama 4 menit. Ditambahkan sampel sebesar 0.250 ml untuk filtrat getah atau 0.005 gr untuk crude protease kering ke dalam campuran, kemudian

dilakukan inkubasi pada suhu 55°C selama 20 menit. Pada akhir inkubasi reaksi hidrolisis dihentikan dengan menambahkan 1 ml larutan TCA 15%. Sebagai kontrol tanpa inkubasi dan reaksi hidrolisis dilakukan pada waktu 0 menit, dimana penambahan larutan TCA 15% dilakukan sebelum penambahan protease. Disentrifus pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diambil 1 ml lalu di tambahkan 2,5 ml mix-Lowry dan dibiarkan 10 menit. Menambahkan 0,250 ml reagen follin dan dibiarkan selama 30 menit. Ditera dengan aquades sampai volume 5 ml dan dibaca absorbannya menggunakan spektrometer pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar tirosin untuk dihitung aktivitas hidrolisisnya.

Aktifitas protease dinyatakan dalam unit aktifitas, dimana satu unit berarti peningkatan konsentrasi protein terlarut sejumlah satu µmol pada setiap menit waktu inkubasi. Aktifitas spesifik enzim dinyatakan dalam unit aktivitas per miligram protein enzim. Perhitungan aktifitas spesifik enzim dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$1 \text{ unit aktifitas} = \frac{[C]}{t} \times \frac{1000}{181.19}$$

Keterangan

[C] = konsentrasi protein terlarut (µmol tirosin/ml)

t = waktu hidrolisis (menit)

181.19 = berat molekul tirosin

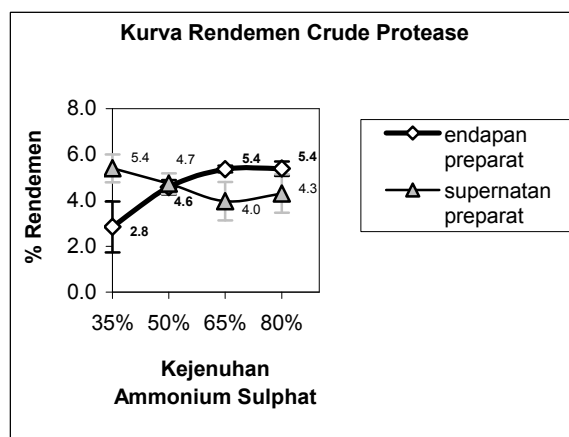
1 unit = 1 µmol tirosin yang di bebaskan dari substrat oleh setiap mg enzim pada suhu 37°C per menit

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Protease Kasar

Kurva pengaruh tingkat kejenuhan ammonium sulphat terhadap rendemen protease getah biduri sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1. Terlihat bahwa semakin tinggi tingkat kejenuhan ammonium sulphat yang digunakan untuk ekstraksi dari endapan preparat menghasilkan rendemen protease kasar biduri yang semakin tinggi sampai pada ammonium sulphat 65%, sedangkan pada ammonium sulphat 80% menunjukkan rendemen protease biduri

yang tidak berbeda dengan ammonium sulphat 65%. Hal ini berarti penambahan ammonium sulphat yang lebih tinggi dari 65% sudah tidak efektif lagi untuk ekstraksi protease dari getah biduri. Sedangkan rendemen protease dari supernatan preparat menunjukkan kecenderungan yang sebaliknya, yakni semakin tinggi tingkat kejenuhan ammonium sulphat yang digunakan semakin menurun crude proteasenya sampai ammonium sulphat 65% dan setelah itu cenderung konstan.

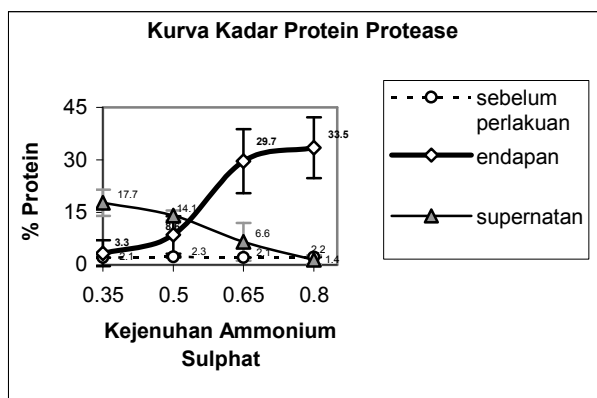


Gambar 1. Kurva Pengaruh Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulphat terhadap Rendemen Protease Kasar Getah Biduri.

Menurut Mathews and Holde (1990) garam ammonium sulphat dalam larutan akan mengion dan menurunkan interaksi protein dengan pelarut sehingga interaksi antar molekul protein lebih tinggi dan akhirnya mengendap. Ditambahkan oleh Tropp (1997) bahwa pada konsentrasi tinggi ion-ion garam akan berikatan dengan molekul air sehingga menurunkan interaksi molekul protein dengan pelarut (*salting-out*).

Kadar Protein Protease Kasar

Kurva pengaruh tingkat kejenuhan ammonium sulphat terhadap kadar protein protease kasar getah biduri tertera pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Pengaruh Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulphat terhadap Kadar Protein Protease Kasar Getah Biduri.

Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi kejenuhan ammonium sulphat yang digunakan untuk ekstraksi dari endapan preparat menghasilkan protease biduri dengan kadar protein yang semakin tinggi hingga ammonium sulphat 65% dan setelah itu cenderung konstan. Hal ini seiring dengan bertambahnya rendemen protease yang dihasilkan (Gambar 1), semakin banyak protease yang terekstrak juga diikuti oleh semakin banyaknya protein yang terikat di dalamnya.

Seidman and Mowery (2006) menyatakan bahwa ketika garam ammonium sulphat ditambahkan pada larutan protein enzim, maka sebagian besar molekul air akan berikatan dengan ion garam yang selanjutnya akan menurunkan jumlah air yang tersedia untuk berikatan dengan protein, sehingga protein akan mengendap. Selanjutnya menurut Wang (2004) crude protease hasil presipitasi dengan ammonium sulphat masih merupakan fraksi campuran yang terdiri dari fraksi protein enzim dan protein non enzim. Sebaliknya pada supernatan preparat getah hasil ekstraksi (Gambar 2) menunjukkan penurunan kadar protein crude protease dengan semakin tingginya kejenuhan ammonium sulphat yang digunakan. Hal ini berarti semakin banyak protein preparat yang terpresipitasi oleh ammonium sulphat.

Aktifitas Spesifik Protease Kasar

Kurva pengaruh tingkat kejenuhan ammonium sulphat terhadap aktifitas spesifik protease kasar getah biduri tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktifitas Spesifik Protease Kasar Getah Biduri Akibat Tingkat Kejenuhan Amonium Sulphat

Kejenuhan Ammonium Sulphat (%)	Aktifitas Spesifik (unit/mg)		
	Sampel	Fraksi Supernatan	Fraksi Endapan
35	72.18 ± 16.87	1.3 x 10 ⁴ ± 0.0018	1.5 x 10 ⁴ ± 0.0001
50	68.68 ± 8.58	1.2 x 10 ⁴ ± 0.0327	1.8 x 10 ⁴ ± 0.0034
65	79.47 ± 9.38	1.4 x 10 ⁴ ± 0.0036	1.0 x 10 ⁴ ± 0.0649
80	63.19 ± 2.42	0.7 x 10 ⁴ ± 0.0001	1.0 x 10 ⁴ ± 0.0032

Keterangan:

1 Unit = µmol tirosin yang di bebaskan dari soluble casein setiap menit

Tabel 1 menunjukkan bahwa aktifitas spesifik protease tertinggi dicapai pada ekstraksi dengan ammonium sulphat 50% yakni 1.8 x 10⁴ unit/mg, di atas tingkat kejenuhan ammonium sulphat 50% aktifitas spesifik protease biduri cenderung menurun, bahkan pada ammonium sulphat 65% aktifitas spesifiknya 1.0 x 10⁴ unit/mg yang berada di bawah fraksi supernatan (1.4 x 10⁴ unit/mg). Hal ini karena dengan semakin tingginya kadar protein pada protease yang dihasilkan, diduga produk yang terekstrak semakin banyak protein yang bukan enzim. Seidman and Mowery (2006) menyatakan bahwa aktifitas spesifik merupakan unit aktifitas protease dalam setiap milligram protein yang terkandung dalam enzim, yang sekaligus dapat mengindikasikan tingkat kemurnian suatu enzim. Bila didapat aktifitas spesifik

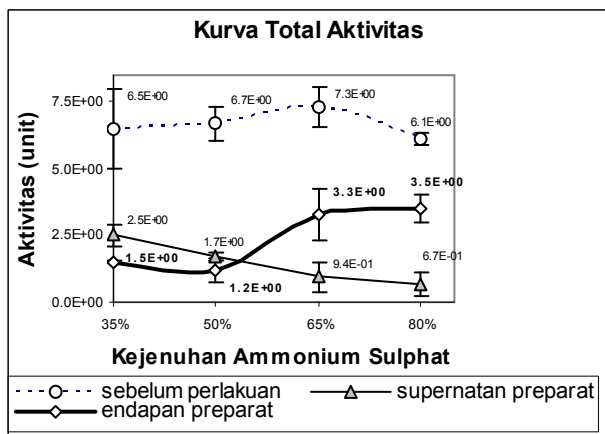
lebih rendah dari yang diharapkan, disebabkan oleh protein enzimnya terdenaturasi atau kadar protein non enzimnya yang jauh lebih tinggi.

Sedangkan pada fraksi supernatan preparat (Tabel 1) menunjukkan aktifitas spesifik protease biduri kasar yang cenderung meningkat sampai tingkat kejenuhan ammonium sulphat 65%, selanjutnya menurun. Hal ini berarti walau pada tingkat kejenuhan ammonium sulphat optimal, masih belum semua protein terekstrak. Sebagaimana dinyatakan oleh Wang (2006) bahwa ekstraksi dengan ammonium sulfat, disatu sisi dapat memberikan efek menstabilkan enzim, tetapi sangat jarang dapat menggaet mendekati 100% dari seluruh komponen protein yang terkandung dalam suatu bahan. Tabel 1 juga menunjukkan bahwa aktifitas spesifik pada preparat getah (sebelum presipitasi dengan ammonium sulphat) masih cenderung lebih tinggi dibanding ekstrak endapan dan supernatan dari preparat hasil presipitasi. Untuk itu, dapat dipertimbangkan sebagai bahan telaah dalam teknik produksi lanjut.

kecenderungan yang serupa, bahwa semakin tinggi tingkat kejenuhan ammonium sulphat yang digunakan untuk ekstraksi dari endapan preparat menghasilkan protease biduri dengan total aktivitas yang semakin tinggi hingga tingkat kejenuhan ammonium sulphat 65% dan setelah itu cenderung konstan. Sebaliknya pada supernatan preparat getah hasil ekstraksi menunjukkan penurunan total aktifitas crude protease dengan semakin tinggi tingkat kejenuhan ammonium sulphat yang digunakan. Karena total aktifitas merupakan hasil perkalian antara rendemen dan aktifitas protease, sehingga bila didapat salah satu parameter (rendemen atau aktifitas) yang semakin tinggi maka total aktifitasnya juga akan semakin besar. Witono (2002) diperkuat oleh Seidman and Mowery (2006) menyatakan bahwa total aktifitas menggambarkan banyaknya produk yang dihasilkan dari suatu proses isolasi enzim dan sering digunakan untuk menentukan treatment optimal dalam suatu produksi enzim.

Total Aktifitas Protease Kasar

Kurva pengaruh tingkat kejenuhan ammonium sulphat terhadap total aktifitas protease getah biduri pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva Total Aktifitas Protease Getah Biduri.

Seiring dengan peningkatan rendemen (Gambar 1) dan peningkatan unit aktifitas protease (Gambar tidak ditunjukkan), maka pada Gambar 3 juga menunjukkan

KESIMPULAN

Ekstraksi protease kasar getah biduri yang paling optimal adalah dengan ammonium sulphat 65% ditinjau dari parameter rendemen protease pada endapan preparat (5.4%) dan total aktifitas sebesar 3.5 unit, di atas tingkat kejenuhan ammonium sulphat 65% tidak terjadi peningkatan yang signifikan pada ketiga parameter tersebut. Oleh karena itu, protease kasar hasil ekstraksi dengan ammonium sulphat 65% selanjutnya dijadikan dasar untuk purifikasi maupun keperluan pengujian lebih lanjut. Sedangkan protease kasar dari fraksi supernatan maupun protease kasar dari preparat getah biduri yang dihasilkan tanpa perlakuan ammonium sulphat dan ternyata masih menunjukkan unit aktifitas, aktifitas spesifik maupun total aktifitas yang relatif tinggi selanjutnya dapat dipertimbangkan untuk keperluan telaah teknik produksi protease dari getah biduri.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC, 1997, Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist. 14th ed AOAC. Inc. Arlington. Virginia.
- Asakura, T., Watanabe, H. Abe, H., and Arai, S., 1997, Oryzasin as an Aspartic Proteinase Occuring in Rice Seeds: Purification, Characterization and Application to Milk Clotting. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4), 1070-1075.
- Chinas, F.A.I. and Canales, A.L.M., 1986, Proteolytic Enzyme from *Cnidocolus chayamansa* "Chaya". *J. Food Sci.*, 61 (1), 142-144.
- Eskin, N.A.M., 1990, Biochemistry of Food. Second Edition. Academic Press. Inc. New York.
- Fox, P.F., 1991, Food Enzymology. Elsevier Applied Science. New York.
- Mathews, C.K. and Van Holde, K.E., 1990, Biochemistry. The Benjamin/Company publishing Company Inc. United States of America.
- Noda, K., Koyanagi, M. and Kamiya, C., 1994, Purification and Characterization of an Endoprotease from Melon Fruit. *J. Food Sci.*, 59 (3), 585-587.
- Rao, M.B., Tansksale, A.M., Ghatge, M.S. and Desphande, V.V., 1998, Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, American Society for Microbiology.
- Ray, J., 1989, Plant Systematic. Mc Graw Hill Publisher. Toronto. New York.
- Seidman, L. and Mowery, J. (2006), Salting out: Ammonium Sulfate Precipitation, The Biotechnology Project, Illinois State University.
- Stenis, T., 1992, Flora. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Stoknes, I. and Rustad, T., 1995, Proteolytic Activity in Muscle from Atlantic Salmon (*Salmo Solar*), *J. Food Sci.*, 60 (4), 711-714.
- Suhartono, M. T., Lestariono, L.N. dan Tanoyo, T., 1995, Study on Protease from *Aspergillus oryzae* Isolated from Soy Sauce Processing in Indonesia. *J. Indonesia Trop. Agric.*, 6 (2), 21-25.
- Suryabrata, S. (1994): Metodologi Penelitian. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Tavasolian, B. and Shabbah, F., 1979, Extraction and Partial Purification of Milk Coagulating Enzyme from *Cartamus tinctorius* Seed. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (1), 190-191.
- Tropp, B.E., 1997, *Biochemistry: concept and application*, Brook/Cole Publishing Company, United States of America.
- Wang, N.S. (2006), Enzyme Purification by Salt (Ammonium Sulfate) Precipitation, Department of Chemical Engineering, University of Maryland.
- Walker, J.M., 1994, The Protein Protocols Handbook, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Witono, Y., 2002a, Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri. *J. Teknologi Hasil Pertanian* 1(1): 1- 14.
- Witono, Y., 2002b, Pemanfaatan Enzim Protease dari Tanaman Biduri untuk Pengolahan Makanan. *J. Sains dan Teknologi*, 1(1): 32 - 37.
- Witono, Y., Subagio, A. dan Windrati, W.S., 2002, Sifat-sifat Daging Olah Pasca Inkubasi dengan Enzim Protease dari Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), Prosiding Seminar Nasional PATPI, Malang.
- Witono, Y., Windrati, W.S. dan Subagio, A., 2003, Studi Pembuatan Keju dengan Memanfaatkan Aktivitas Proteolitik dari Ekstrak Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*), Prosiding Seminar Nasional PATPI, Yogyakarta.
- Word, O.P., 1983, Properties of Microbial Proteinase. In *Microbial Enzyme and Biotechnology*. (Ed Forgety). pp. 56-102. Appl. Publ. London.