

**PENENTUAN KONSENTRASI OPTIMUM ION LOGAM MANGAN
(Mn²⁺) SEBAGAI KOFAKTOR TERHADAP AKTIVITAS PROTEOLITIK
ENZIM PROTEASE DARI CAIRAN RUMEN SAPI (*Bos taurus* L.)**

Skripsi

**Untuk melengkapi syarat-syarat guna memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**Disusun Oleh:
Wahyu Zikra Tullah
1204015439**





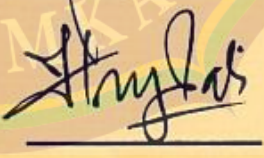



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA
2017**

Skripsi dengan judul

**PENENTUAN KONSENTRASI OPTIMUM ION LOGAM MANGAN
(Mn²⁺) SEBAGAI KOFAKTOR TERHADAP AKTIVITAS PROTEOLITIK
ENZIM PROTEASE DARI CAIRAN RUMEN SAPI (*Bos taurus* L.)**

Telah disusun dan dipertahankan di hadapan penguji oleh:
Wahyu Zikra Tullah, NIM 1204015439

	TandaTangan	Tanggal
<u>Ketua</u> Wakil Dekan I Drs. Inding Gusmayadi, M.Si., Apt.		<u>20-3-17</u>
<u>Penguji I</u> Hanifah Rahmi, S.Si., M.Biomed.		<u>11/3/17</u>
<u>Penguji II</u> Dra. Fatimah Nisma, M.Si.		<u>17/3/17</u>
<u>Pembimbing I</u> Dr. H. Priyo Wahyudi, M.Si.		<u>11/3/17</u>
<u>Pembimbing II</u> Hariyanti, M.Si., Apt.		<u>17/3/17</u>
<u>Mengetahui :</u>		
<u>Ketua Program Studi Farmasi</u> Kori Yati, M.Farm., Apt.		<u>18/3/17</u>

Dinyatakan Lulus pada tanggal : **18 Februari 2017**

ABSTRAK

PENENTUAN KONSENTRASI OPTIMUM ION LOGAM MANGAN (Mn^{2+}) SEBAGAI KOFAKTOR TERHADAP AKTIVITAS PROTEOLITIK ENZIM PROTEASE DARI CAIRAN RUMEN SAPI (*Bos taurus* L.)

**Wahyu Zikra Tullah
1204015439**

Cairan rumen sapi diketahui mengandung berbagai enzim. Salah satu enzim yang terdapat pada cairan rumen sapi adalah enzim protease. Enzim protease adalah enzim yang dapat menguraikan protein menjadi asam-asam amino. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah kofaktor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum ion logam Mangan (Mn^{2+}) sebagai kofaktor terhadap aktivitas proteolitik enzim protease dari cairan rumen sapi (*Bos taurus* L.). Penelitian ini menggunakan cairan rumen sapi lokal dari rumah potong hewan di Tambun, Kabupaten Bekasi. Pemisahan enzim dilakukan dengan penambahan amonium sulfat pada kejenuhan 60%. Penentuan optimasi konsentrasi ion logam Mangan (Mn^{2+}) menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan percobaan *one factor*. Penentuan aktivitas protease diukur dengan metode Nakanishi. Pengukuran kadar protein menggunakan metode Bradford. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi optimum ion logam Mangan (Mn^{2+}) adalah 4,96 mM menghasilkan aktivitas proteolitik enzim protease dari cairan rumen sapi sebesar 2,2425 U/ml.

Kata Kunci: rumen sapi, enzim protease, kofaktor, aktivitas proteolitik.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan kehendak-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan dan menyusun skripsi ini dengan judul **“PENENTUAN KONSENTRASI OPTIMUM ION LOGAM MANGAN (Mn^{2+}) SEBAGAI KOFAKTOR TERHADAP AKTIVITAS PROTEOLITIK ENZIM PROTEASE DARI CAIRAN RUMEN SAPI (*Bos taurus L.*)”**.

Tujuan penulisan skripsi ini adalah untuk memenuhi tugas akhir sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka, Jakarta.

Penulis menyadari bahwa selama penyusunan skripsi ini banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak, untuk itu pada kesempatan ini penulis sampaikan ucapan terima kasih kepada:

- 1) Allah SWT yang sebesar-besarnya, kepada seorang ayah (Syahmuil) dan ibu (Yenti Susanti) yang luar biasa tidak pernah henti memberikan doa dan dukungan baik berupa moril maupun materil serta adik-adikku tersayang (Ahmat Fadly Robbi, Fauzan Alamsyah, Nurul Aisyah, Nurul Fauziyah) yang selalu memberikan dukungan yang tiada henti.
- 2) Bapak Dr. Hadi Sunaryo, M.Si., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
- 3) Bapak Drs. Inding Gusmayadi, M.Si., Apt., selaku Wakil Dekan I FFS Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
- 4) Ibu Dra. Sri Nevi Gantini, M.Si., selaku Wakil Dekan II FFS UHAMKA.
- 5) Ibu Ari Widayanti, M.Farm., Apt., selaku Wakil Dekan III FFS UHAMKA.
- 6) Ibu Kori Yati, M.Farm., Apt., selaku Ketua Program Studi Farmasi, FFS Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
- 7) Bapak Dr. Priyo Wahyudi, M.Si., selaku pembimbing I dan Ibu Hariyanti M.Si. Apt selaku pembimbing II yang selalu membimbing dan memberikan dorongan dan semangat, memberikan saran dan motivasi, serta pengorbanan waktu, tenaga, dan pikiran saat penulisan skripsi ini.
- 8) Sahabat penelitian rumen yaitu Wahyu Kharisman Erwansyah S.Farm, Nurul Ramadhaniarti S.Farm, Rizky Septiani S.Farm, dan Lia Triastuti S.Farm yang sudah banyak membantu dalam penelitian ini.
- 9) Yulianindra Khalishah S.Farm yang selalu setia mendampingi dan memberi dukungan hingga saat ini.
- 10) Sahabat-sahabatku tercinta Asri Indah Lestari S.Farm, Azkaa Zuhdiyah S.Farm, Banu Pradipta, Cut Alvia Ulva S.Farm, Dewi Tika S.Farm, Galang Ardian Wibisana, Mochamad Prasetyo Hardadi, Yulia Tri Utami S.Farm yang selalu memberikan dukungan serta doanya kepada penulis.
- 11) Sahabat Apotek Quality Asep, Aqma, Ayu, Eka Tanimura, Halimah, Hasan, Nur Azizah, Priyanti, Puti, Rangga, Fadil, Reza Pahlevi yang selalu memberi dukungan dan semangat kepada penulis.
- 12) Sahabat Dirgantara Whisnu Yudha Anggara, Adi Dirgantara, Pandi Apriyandi S.T, Rangga, Dani darmawan, Fachri, dan Edi yang selalu memberi dukungan kepada penulis.

- 13) Sahabat Pemuda Masjid Syifauttaqwa Mohamad Haris Setianto, Jerry Andrea Alvin S.Farm, Aditya Surachman S.Farm, Dedi Suryadi, Novi Fitriani S.Farm, Novalia Rohma S.Farm, Trisno Saputra, Lissa Anggraini S.Farm yang selalu memberi dukungan dan doa kepada penulis.
- 14) Teman-teman kelas N yaitu Bayu Asri Pratama dan Muhammad Arif Ridwan yang selalu memberi dukungan kepada penulis.
- 15) Teman-teman sanguinis yaitu Khorisman Ade, Kawirian Suhendri, Ilham Ristian, Fajar Ade S.Farm, Cipto S.Farm, Fahmi, Wisnu, dan Rifqi yang selalu memberi dukungan.
- 16) Teman-teman Keluarga Gini Amat yaitu Oka S.Farm, Fauziah S.Farm, Ajrina, Jenny, dan Isna yang selalu memberi dukungan kepada penulis.
- 17) Sahabat Alumni SMPN 6 Bekasi yaitu Erica Wulandari dan Yuan Maulana yang selalu memberi dukungan kepada penulis.
- 18) Teman-teman Alumni Farmasi DITKESAD angkatan 41 yang selalu memberi dukungan kepada penulis.
- 19) Dosen dan staff karyawan UHAMKA serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu-persatu.
- 20) Teman-teman Farmasi UHAMKA angkatan 2012 yang selalu memberi dukungan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan ini masih memiliki banyak kekurangan karena keterbatasan ilmu dan kemampuan penulis. Untuk itu saran dan kritik dari pembaca sangat penulis harapkan. Akhir kata, semoga skripsi ini bisa bermanfaat bagi penulis sendiri pada khususnya dan bagi pembaca pada umumnya.

Jakarta, Februari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan Penelitian	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Rumen	4
B. Enzim	5
C. Faktor yang mempengaruhi Aktivitas Enzim	6
D. Struktur Protein	8
E. Enzim Protease	10
F. Kofaktor	12
G. Mangan	12
H. Metode Penentuan Kadar Protein	13
I. Metode Pengukuran Aktivitas Enzim	14
J. Optimasi Menggunakan Pendekatan <i>Respon Surface Methodology (RSM)</i>	15
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	17
A. Tempat dan Waktu Penelitian	17
B. Metode Penelitian	17
C. Prosedur Penelitian	17
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	23
A. Preparasi Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	23
B. Pengujian Kadar Protein Enzim dari Cairan Rumen Sapi	23
C. Aktivitas Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi dengan Penambahan $MnCl_2$	24
D. Analisis Respon Pemilihan RSM	26
E. Hasil Optimasi $MnCl_2$ Sebagai Kofaktor Terhadap Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	32
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	34
A. SIMPULAN	34
B. SARAN	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rentang dan Level Variabel Bebas pada Optimasi Kofaktor (Design-Expert 7.1.5)	18
Tabel 2. Rancangan Percobaan Berdasarkan <i>one factor</i>	19
Tabel 3. Hasil Uji Kadar Protein Enzim dari Cairan Rumen Sapi	24
Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi dengan Penambahan Ion Logam Mangan (Mn^{2+})	25
Tabel 5. Hasil Respon Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi dengan Penambahan Ion Logam Mangan (Mn^{2+})	27
Tabel 6. Pemilihan Model Berdasarkan Uraian Jumlah Kuadrat dari Urutan Model pada Respon Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	28
Tabel 7. Pemilihan Model Berdasarkan Pengujian Ketidaktepatan Model pada Respon Aktivitas Proteolitik Protease dari Cairan Rumen Sapi	29
Tabel 8. Pemilihan Model Berdasarkan Ringkasan Model Secara Statistik pada Respon Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	29
Tabel 9. Uji ANOVA dari Model Untuk Respon Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	30
Tabel 10. Penyesuaian Model Untuk Respon Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	31
Tabel 11. Penyesuaian R-kuadrat Model Untuk Respon Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	31
Tabel 12. Konsentrasi Optimum yang disarankan RSM dan Prediksi Aktivitas Proteolitik Enzim Protease	32
Tabel 13. Ringkasan Hasil Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dan Kadar Protein Protease dari Cairan Rumen Sapi didasarkan Pada Optimasi Rancangan Percobaan, Prediksi Numerik, dan Validasi Model	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Pengaruh Suhu pada Kecepatan Reaksi Enzimatik	6
Gambar 2. Pengaruh pH Kecepatan Reaksi Enzimatik	7
Gambar 3. Pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Kecepatan Reaksi Enzimatik	7
Gambar 4. Konsentrasi Substrat Terhadap Kecepatan Reaksi Enzimatik	8
Gambar 5. Pengaruh Variabel Ion Logam Mn^{2+} Terhadap Respon Aktivitas Proteolitik Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi (<i>Bos taurus</i> L.)	31



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1.	Alur Kerja Penentuan Aktivitas Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	38
Lampiran 2.	Alur Pemisahan Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	39
Lampiran 3.	Alur Penentuan Panjang Gelombang Maksimum <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	40
Lampiran 4.	Alur Penentuan Kurva Standard <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	41
Lampiran 5.	Alur Uji Kadar Protein Enzim dari Rumen Sapi	42
Lampiran 6.	Alur Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin	43
Lampiran 7.	Alur Penentuan Kurva Standard Tirosin	44
Lampiran 8.	Alur Penentuan Aktivitas Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi dengan Penambahan Logam $MnCl_2$	45
Lampiran 9.	Hasil Penentuan Panjang Gelombang Maksimum <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	46
Lampiran 10.	Hasil Penentuan Kurva Standard <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	47
Lampiran 11.	Hasil Penentuan Panjang Gelombang Tirosin	48
Lampiran 12.	Hasil Penentuan Kurva Standard Tirosin	49
Lampiran 13.	Perhitungan Kurva Standard <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	50
Lampiran 14.	Hasil Penentuan Kadar Protein Enzim λ 595 nm	51
Lampiran 15.	Perhitungan Kurva Standard Tirosin	52
Lampiran 16.	Hasil Pengujian Aktivitas Proteolitik Enzim Protease Pada λ 275 nm dengan Penambahan Logam $MnCl_2$	53
Lampiran 17.	Perhitungan Aktivitas Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	55
Lampiran 18	Perhitungan Penimbangan Logam $MnCl_2$	56
Lampiran 19.	Alat-alat yang digunakan	57
Lampiran 20.	Bahan-bahan yang digunakan	58
Lampiran 21.	Hasil Preparasi Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	59
Lampiran 22.	Hasil Uji Kadar Protein Enzim dari Cairan Rumen Sapi	60
Lampiran 23.	Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease dari Cairan Rumen Sapi	61

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sapi-sapi yang ada di dunia ini umumnya berasal dari tiga nenek moyang yang disebut *Bos taurus*, *Bos indicus*, dan *Bos bibos*. Bangsa-bangsa sapi yang diturunkan dari *Bos taurus* ini menyebar ke berbagai belahan dunia seperti Amerika, Australia dan Selandia Baru. Keturunan *Bos taurus* telah banyak ditenakkan dan dikembangkan menjadi bangsa-bangsa sapi antara lain *Aberdeen Angus*, *Hereford*, *Simmental*, *Limousin*, *Charolais* dan lain-lain (Saparto 2004). Usaha sapi ternak di Indonesia sampai saat ini masih mementingkan produktivitas ternak dan belum mempertimbangkan aspek lingkungan. Salah satu upaya untuk mengatasi pencemaran limbah ternak adalah pengelolaan limbah ternak yang sesuai. Salah satu limbah yang dimanfaatkan adalah rumen (Sarwanto 2004).

Rumen adalah salah satu bagian lambung ternak ruminasia yang berisi bahan pakan berupa rumput atau hijauan lainnya dan pakan konsentrat. Telah diketahui bahwa cairan rumen sapi mengandung enzim. Aplikasi penggunaan enzim pada industri masih menghadapi beberapa kendala. Salah satu kendala yang perlu dicari solusinya, yaitu ketersediaan enzim yang masih harus diimpor serta penanganan dan penyimpanan enzim. Industri enzim saat ini menemukan alternatif sumber enzim dengan memanfaatkan pengolahan limbah. Salah satunya berasal dari limbah ternak yaitu rumen sapi. Enzim yang terdapat pada cairan rumen adalah enzim selulase, amilase, protease, fitase dan pendegradasi toksin tumbuhan spesifik (Lee *et al.* 2002).

Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk proses katalisis reaksi yang berlangsung di dalamnya (Martoharsono 1998). Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein menjadi oligopeptida atau asam-asam amino. Protease hewan yang paling dikenal adalah tripsin, kimotripsin, pepsin dan renin. Enzim-enzim ini bekerja mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan air pada ikatan spesifik dengan substrat, sehingga juga dapat digolongkan sebagai enzim hidrolase (Toha 2011). Salah satu jenis enzim yang aplikasinya sangat luas adalah enzim protease karena memiliki nilai ekonomi yang tinggi dalam bidang industri, dan pada proses

pengolahan limbah industri. Pada proses aplikasinya enzim protease dipengaruhi beberapa faktor (Yusriah dan Kuswytasari 2013).

Faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, senyawa inhibitor dan aktivator, pH serta temperatur lingkungan (Martoharsono 1998). Enzim bekerja sebagai katalis dengan cara menurunkan energi aktivasi, sehingga laju reaksi meningkat (Poedjiadi dan Supriyanti 2009). Senyawa kofaktor atau ion logam berpotensi meningkatkan aktivitas kerja suatu enzim yang disebut sebagai aktivator enzim, sedangkan ion logam yang menghambat aktivitas enzim disebut inhibitor enzim (Sumardjo 2006). Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , atau Mg^{2+} atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Toha 2011).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa cairan rumen sapi hidup kaya akan selulase, amilase, protease, dan xilanase. Cairan rumen sapi hidup yang diberi makan ransum berbasis hay alfalfa mengandung protease sebesar $84.8 \pm 2,52$ IU/l (Lee *et al.* 2002). Aktivitas enzim tersebut cukup tinggi. Ion logam yang berperan sebagai aktivator enzim protease antara lain Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , β -merkaptioethanol. Enzim protease cairan rumen sapi ion logam Mn^{2+} bersifat sebagai aktivator sedangkan Ca^{2+} mempunyai pengaruh kecil terhadap aktivitas enzim protease. Ion logam yang memberi efek peningkatan aktivitas enzim paling tinggi yaitu mencapai 45,07% pada uji penambahan logam Mn^{2+} (Budiansyah dkk. 2012).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui karakter enzim protease dari rumen sapi. Karakter enzim protease tersebut meliputi uji kofaktor ion logam Mangan (Mn^{2+}) dalam berbagai konsentrasi untuk melihat konsentrasi optimum yang menghasilkan aktivitas tertinggi dari penambahan ion logam Mangan (Mn^{2+}), aktivitas enzim, dan kadar protein enzim. Aktivitas enzim protease diuji dengan menggunakan metode Nakanishi menggunakan kasein sebagai substrat (Kosim dan Putra 2009). Penentuan berbagai konsentrasi dari logam yang akan diuji menggunakan pendekatan *Response Surface Metodologi* (RSM), sedangkan penentuan kadar protein enzim protease menggunakan metode Bradford dengan membandingkan

sampel dengan protein standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Bintang 2010).

B. Permasalahan Penelitian

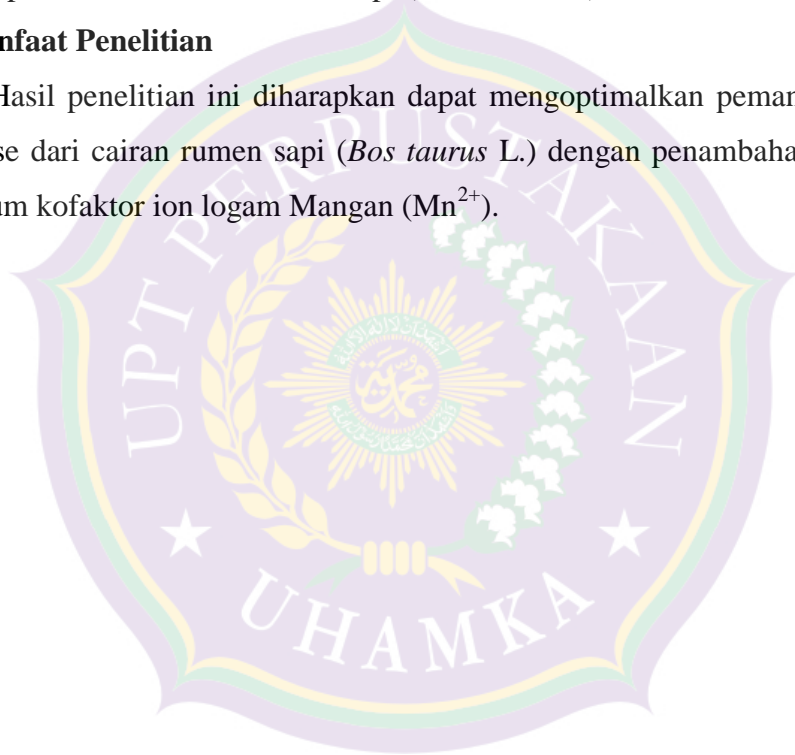
Permasalahan dalam penelitian ini adalah berapakah konsentrasi optimum ion logam Mangan (Mn^{2+}) sebagai kofaktor terhadap aktivitas proteolitik enzim protease dari cairan rumen sapi (*Bos taurus* L.)?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum ion logam Mangan (Mn^{2+}) sebagai kofaktor terhadap aktivitas proteolitik enzim protease yang diperoleh dari cairan rumen sapi (*Bos taurus* L.).

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengoptimalkan pemanfaatan enzim protease dari cairan rumen sapi (*Bos taurus* L.) dengan penambahan konsentrasi optimum kofaktor ion logam Mangan (Mn^{2+}).



DAFTAR PUSTAKA

- Arora SP. 1995. *Pencernaan Mikrobial pada Ruminansia*. Diterjemahkan oleh: Srigandoro B, Murwani R. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hlm. 6.
- Bakti CP. 2012. Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus sp.* BPPT CC RK2 dengan variasi pH dan Suhu dengan Menggunakan *Response Surface Methodology*. *Skripsi*. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Jakarta. Hlm. 14.
- Bintang M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Penerbit Erlangga. Jakarta. Hlm. 33.
- Budiansyah A, Resmi, Nahrowi, Wirjayawan. 2011. Hidrolisis Zat Makanan Pakan Oleh Enzim Cairan Rumen Sapi Asal Rumah Potong Hewan. *Agrinak*. **1**(1): 17-24.
- Budiansyah A. 2012. Karakteristik Enzim Protease Cairan Rumen Sapi Asal Rumah Potong Hewan. *Agrinak*. **2**(1): 22-28.
- Das KC, Whenseng Q. 2012. Isolation and Characterization of Superior Rumen Bacteria of Cattle (*Bos taurus*) and Potential application in Animal Feedstuff. *Open Journal of Animal Science*. **2**(4): 224-228.
- Grober U. 2013. *Mikronutrien*. Terjemahan: Amalia H. Hadinata. Kedokteran EGC. Jakarta. Hlm. 127.
- Hartini, Eko. 2012. Efektivitas Cascade Aerator dan Bubble Aerator Dalam Menurunkan Kadar Mangan Air Sumur Gali. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. **8**(1): 44-52.
- Held P. 2003. Peptide and Amino Acids Quantification Using UV Fluorescence in Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader. *Application Note Biotek*: Hlm. 1-8.
- Lee SS, Kim CH, Ha JK, Moon YH, Choi NJ, Cheng KJ. 2002. Distribution and Activities of Hydrolytic Enzymes in the Rumen Compartments of Hereford bulls fed alfalfa based diet. *Asian-Australas Journal Animal Science*. **15**(12): 1725-1731.
- Kosim M, Putra SR. 2009. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. *Prosiding Skripsi*. FMIPA ITS. Surabaya. Hlm. 1-7.
- Lehninger AL. 2010. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Diterjemahkan oleh: Thenawidjaja M. Erlangga. Jakarta. Hlm. 262.
- Martoharsono S. 1998. *Biokimia Jilid 1*. UGM Press. Yogyakarta. Hlm 81, 101.

- Montgomery DC. 2001. *Design And Analysis Of Experiments*. 5th Edition. John Wiley & Sons Inc. New York. Hlm. 427.
- Muslim G, Sihombing JE, Fauziah S, Abrar A, Fariani A. 2014. Aktivitas Proporsi Berbagai Cairan Rumen dalam Mengatasi Tannin dengan Tehnik *In Vitro*. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*. **3**(1): 25.
- Novita C. 2015. Titik Kardinal Suhu Untuk Aktivitas Proteolitik Enzim Protease Rumen Sapi (*Bos taurus* L.). *Skripsi*. Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka. Jakarta. Hlm 19.
- Nuryanti, Salimy DH. 2008. Metode Permukaan Respon dan Aplikasinya Pada Optimasi Eksperimen Kimia. *Lokakarya Komputasi Sains dan Teknologi*. Semarang. Hlm. 374-376.
- Poedjiadi A, Supriyanti FMT. 2009. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. Hlm. 140, 176.
- Prijanti AR. 2001. *Biokimia Eksperimen Laboratorium*. Widya Medika. Jakarta. Hlm. 50.
- Sadikin M. 2002. *Biokimia Enzim*. Widya Medika. Jakarta. Hlm. 29, 47.
- Saparto. 2004. Studi Kranimetri Sapi Jawa dan Beberapa Bangsa Sapi Potong di Indonesia. *Tesis*. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang. Hlm.1.
- Sarah, Putra SR, Putro HS. 2009. Isolasi α -Amilase Termotabil dari Bakteri Termofilik (*Bacillus stearothermophilus*). *Prosiding Kimia FMIPA*. Fakultas MIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. Hlm. 1-4.
- Sarwanto D. 2004. Model Pencemaran Limbah Peternakan Sapi Perah Rakyat Pada Beberapa Kondisi Fisik Alami dan Sosial Ekonomi (Studi Kasus di Provinsi Jawa Tengah). *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hlm 2.
- Sinaga E. 2012. *Biokimia Dasar*. ISFI Penerbitan. Jakarta. Hlm 109, 147.
- Sumardjo D. 2009. *Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Kedokteran EGC. Jakarta. Hlm. 389.
- Toha AHA. 2011. *Ensiklopedia Biokimia dan Biologi Molekuler*. Kedokteran EGC. Jakarta. Hlm. 238, 476, 525, 664.
- Winarno FG. 2008. *Kimia Pangan Gizi*. Edisi Ketiga. M-Brio Press. Bogor. Hlm. 184.

- Wirahadikusumah M. 2001. *Biokimia Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung. Hlm. 44.
- Yusriah, Kuswytasari ND. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium sp.* Jurusan Biologi. ITS. Surabaya. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. **2**(1): 48-50.
- Zuraida, Jusadi, Utomo. 2013. Efektivitas Penambahan Cairan Rumen Domba Terhadap Penurunan Serat Kasar Bungkil Kelapa sebagai Bahan Baku Pakan Ikan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. **1**(2): 117-126.

