

NOTE

IMMOBILIZATION OF PAPAIN ON CHITOSAN

Imobilisasi Papain Pada Kitosan

Sari Edi Cahyaningrum^{1,*}, Narsito², Sri Juari Santoso² and Rudiana Agustini¹¹ Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Surabaya State University, Jl. Ketintang, Surabaya 60231² Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Gadjah Mada University, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

Received 6 June 2008; Accepted 5 August 2008

ABSTRACT

In this study, papain was immobilized on chitosan with Mg(II) crosslinked agent. Studies on free and immobilized papain systems for determination of optimum pH, optimum temperature, thermal stability and reusability were carried out. The results showed that free papain had optimum pH 6.5 and optimum temperature 55 °C while the immobile papain had optimum pH 8 and optimum temperature 80 °C. The thermal stability of the immobilized papain, relative to that of the free papain, was markedly increased. The immobilized papain can be reused for at least six times.

Keywords: papain, immobilization, chitosan

PENDAHULUAN

Enzim banyak dimanfaatkan pada industri makanan, minuman, susu, kosmetik, farmasi, kertas, kulit dan detergen. Pada industri yang menggunakan enzim tersebut, 59% enzim yang digunakan adalah protease [1], salah satunya adalah papain. Kemampuan enzim untuk mengkatalisis suatu reaksi kimia dapat digambarkan melalui aktivitasnya. Laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim secara tidak langsung berhubungan dengan aktivitas enzim. Faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim dan substrat, temperatur, pH, dan inhibitor. Faktor-faktor tersebut mempunyai dua pengaruh terhadap enzim yaitu pada struktur dan aktivitasnya.

Enzim imobil adalah enzim yang secara fisik ditempatkan pada suatu tempat atau ruang tertentu sedemikian rupa sehingga aktivitas katalitiknya tetap ada dan dapat digunakan berulang kali [2]. Imobilisasi enzim dapat mencegah difusi enzim dalam produk sehingga memungkinkan untuk memperoleh enzim tersebut kembali setelah proses reaksi selesai. Enzim imobil dapat dipakai berulang kali, stabilitasnya dapat dipertahankan karena enzim tidak terkontaminasi produk dan produk yang diperoleh tidak dikotori enzim [3]. Proses imobilisasi enzim tidak boleh mengubah struktur tiga dimensi enzim. Bila salah satu residu asam amino di pusat aktif enzim berubah maka dapat menyebabkan penurunan aktivitas katalitik enzim. Jadi imobilisasi enzim harus dilakukan dengan sangat hati-hati dan pada kondisi yang terkendali [3].

Kitosan merupakan hasil deasetilasi kitin, sedangkan kitin dapat diisolasi dari serangga dan

jamur, kerangka dan cangkang hewan golongan *Artropoda*, *Molusca*, *Nematoda*, dan *Crustacea*. Kitosan mempunyai beberapa sifat yang menguntungkan antara lain *hydrophilicity*, *biocompatibility*, *biodegradability*, sifat anti bakteri dan mempunyai afinitas yang besar terhadap enzim [4]. Kitosan merupakan polimer alam yang dapat berikatan secara *crosslink* apabila ditambahkan *crosslinked agent* misalnya glutaraldehid, glioksal atau kation Cu(II) [5].

Proses imobilisasi enzim dengan kitosan yang telah mengalami *crosslinked* disebut sebagai imobilisasi tipe pengikatan *carrier-crosslinked*. Afaq mengimobilisasi papain dengan sheparose dengan menggunakan Cu(II) dan Co(II) sebagai *crosslinked agent* [4]. Jianmin menggunakan *crosslinked agent* Ni(II), Zn(II) dan Cu(II) pada imobilisasi tripsin dengan matriks kitosan-silika [6]. Pada penelitian ini *crosslinked agent* yang digunakan adalah Mg(II). Mg(II) dipilih karena Mg(II) merupakan kation logam yang berukuran kecil bila dibanding dengan Co(II), Ni(II), Cu(II), dan Zn(II). Proses imobilisasi menggunakan matriks kitosan dengan *crosslinked agent* Mg(II) diharapkan menghasilkan ikatan yang tidak terlalu kovalen, sehingga penurunan aktivitas papain karena proses imobilisasi tidak terlalu besar.

METODE PENELITIAN

Bahan

Kitosan diisolasi dari cangkang udang windu dengan metode Hong-Meyers [7]. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini berkualitas analitik

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-31-8298761
Email address : muhacahya@yahoo.co.id

(analytical grade) produksi Merck meliputi: (1) pereaksi untuk imobilisasi papain pada matriks kitosan-Mg: $MgCl_2$, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$. (2) pereaksi untuk penentuan aktivitas papain meliputi: asam sitrat, Na-sitrat, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, Na_2CO_3 , BSA (Bovin Serum Albumin), coomasie blue G-250, asam posphat, tirosin, TCA (trikloroasetat), Folin Ciaocalteou dan kasein. (3) papain produksi Sigma Chemical Co.(St.Louis, MO, USA) dan (4) air bebas mineral.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: (1) peralatan gelas seperti labu takar, tabung reaksi, gelas pengaduk, pipet volume, corong gelas. (2) peralatan analisis seperti Spektrofotometer UV-vis Lamda bio 20, Perkin Elmer. (3) peralatan penunjang seperti: shaker berpenangas, tabung sentrifus, sentrifus merk Fischer scientific dengan kecepatan maksimum 3500 rpm, botol film, pH-meter merk Orion model 710A, kertas saring Whatman 42, dan neraca analitik Mettler AE200.

Prosedur Kerja

Imobilisasi Papain pada Kitosan

Penentuan pH optimum. Sebanyak 100 mg matriks kitosan-Mg diinteraksikan dengan 5 mL larutan papain 20 mg/mL. pH larutan papain dibuat bervariasi antara 5-9 menggunakan bufer fosfat. Interaksi tersebut dilakukan selama 12 jam. Setelah interaksi selesai kemudian sampel disaring. Jumlah papain yang tidak terimobilisasi pada filtrat ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis pada $\lambda = 595$ nm.

Penentuan waktu imobilisasi. Sebanyak 100 mg matriks kitosan-Mg diinteraksikan dengan 5 mL larutan papain 20 mg/mL. pH larutan papain adalah pH optimum yang dihasilkan pada percobaan sebelumnya, sedangkan waktu interaksi divariasi antara 3-18 jam. Setelah interaksi selesai sampel tersebut kemudian disaring. Jumlah papain yang tidak terimobilisasi pada filtrat ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis pada $\lambda = 595$ nm.

Penentuan kapasitas imobilisasi. Sebanyak 100 mg matriks kitosan-Mg diinteraksikan dengan 5 mL larutan papain yang divariasi konsentrasinya antara 5-40 mg/mL, pH papain yang digunakan adalah pH optimum yang dihasilkan pada percobaan penentuan pH imobilisasi. Waktu imobilisasi adalah waktu ketimbangan yang telah diperoleh pada percobaan penentuan waktu imobilisasi. Setelah imobilisasi selesai sampel tersebut kemudian disaring. Jumlah papain yang tidak terimobilisasi pada filtrat ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis pada $\lambda = 595$ nm. Endapan yang dihasilkan merupakan papain imobil.

Papain imobil ini selanjutnya ditentukan aktivitas enzimatisnya.

Uji Aktivitas Papain

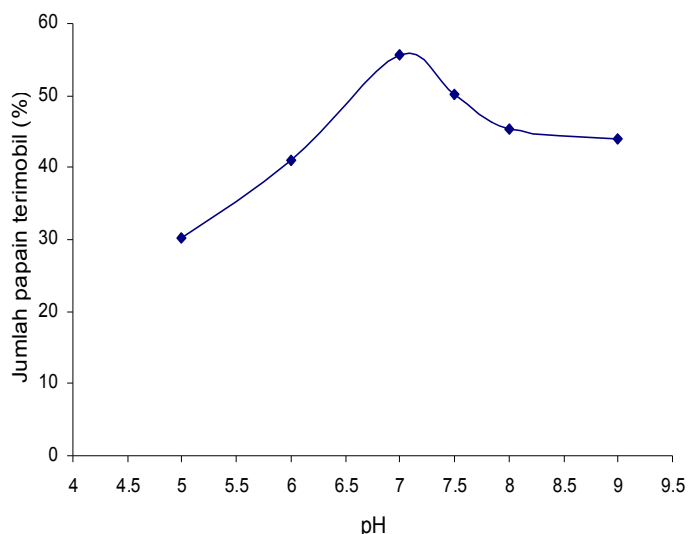
Pada penelitian ini yang ditentukan adalah aktivitas papain bebas dan aktivitas papain imobil. Hasil yang diperoleh kemudian dibandingkan. Cara penentuan aktivitas papain bebas adalah sebagai berikut: sebanyak 0,5 mL kasein 10 mg/mL dimasukkan tabung reaksi, ditambah dengan 2,5 mL bufer pospat yang pHnya bervariasi antara 4-9. Pada tabung lain dimasukkan 0,25 mL papain bebas. Kedua tabung reaksi tersebut, dipreinkubasi pada temperatur 55 °C selama 10 menit. Setelah preinkubasi papain bebas dimasukkan dalam tabung yang berisi bufer dan kasein, kemudian diinkubasi pada temperatur 55 °C selama 10 menit. Setelah 10 menit, reaksi enzimatik dihentikan dengan cara ditambah 1 mL TCA 10%, kemudian sampel tersebut didinginkan pada temperatur 4 °C selama 10 menit. Langkah berikutnya, sampel disentrifuse pada 3000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya dipisahkan antara filtrat dan endapan yang dihasilkan. Langkah berikutnya, sebanyak 1 mL filtrat dimasukkan tabung reaksi, ditambah 1 mL air bebas mineral, 4 mL Na_2CO_3 dan 1 mL reagen Folin Ciaocalteou kemudian didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-vis pada $\lambda = 650$ nm. Pada pembuatan blangko, larutan enzim diganti air bebas mineral.

Penentuan aktivitas papain selain dilakukan pada pH yang bervariasi, juga dilakukan pada temperatur yang divariasi untuk menentukan temperatur optimum. Pada penentuan temperatur optimum, temperatur inkubasi divariasi antara 40-90 °C. Uji stabilitas termal ditentukan dengan cara papain bebas dipaparkan pada temperatur optimum selama waktu tertentu. Setelah dipaparkan selama waktu tertentu, papain bebas diuji aktivitas enzimatisnya pada kondisi optimumnya. Hal yang sama dilakukan terhadap papain imobil. Uji kemampuan penggunaan ulang pada reaksi enzimatik hanya dilakukan pada papain imobil. Papain bebas tidak ditentukan kemampuan penggunaan ulang karena papain bebas hanya dapat digunakan satu kali.

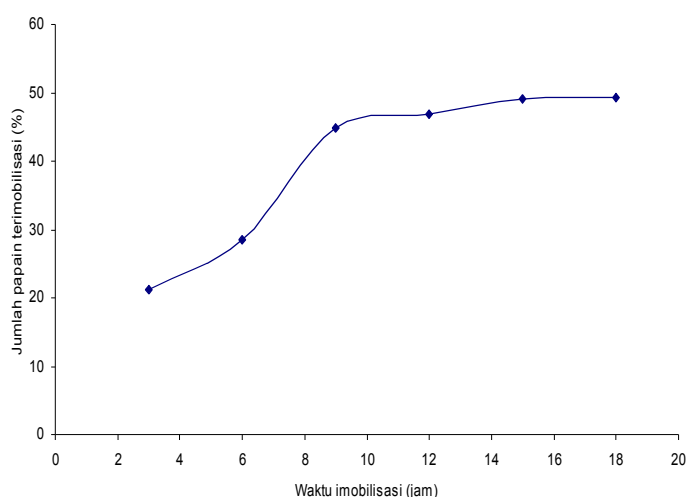
HASIL DAN PEMBAHASAN

Imobilisasi Papain pada Kitosan

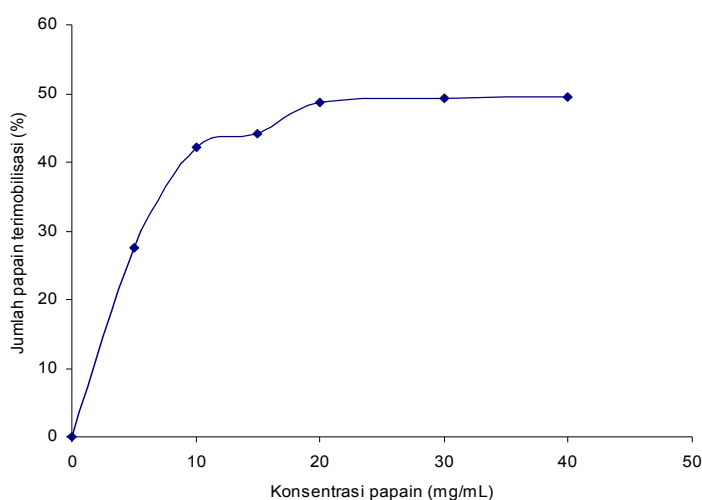
Pengaruh pH terhadap proses imobilisasi papain pada matriks kitosan-Mg pada penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan pH optimum proses imobilisasi papain pada matriks kitosan-Mg. Data yang diperoleh disajikan pada Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan bahwa pH sangat berpengaruh pada proses imobilisasi papain pada matriks kitosan-Mg, terlihat bahwa kenaikan pH papain dari 5-7 meningkat



Gambar 1. Pengaruh pH pada imobilisasi papain oleh kitosan-Mg



Gambar 2. Pengaruh waktu terhadap imobilisasi papain pada kitosan-Mg



Gambar 3. Pengaruh [papain] terhadap imobilisasi papain pada kitosan-Mg

kan jumlah papain yang terimobil dan mencapai keadaan optimum pada pH 7 dengan jumlah papain terimobil sebanyak 55,56%, kemudian pada pH 7,5-9 jumlah papain yang terimobilisasi makin menurun. Beberapa argumentasi dapat digunakan untuk menjelaskan hal tersebut :

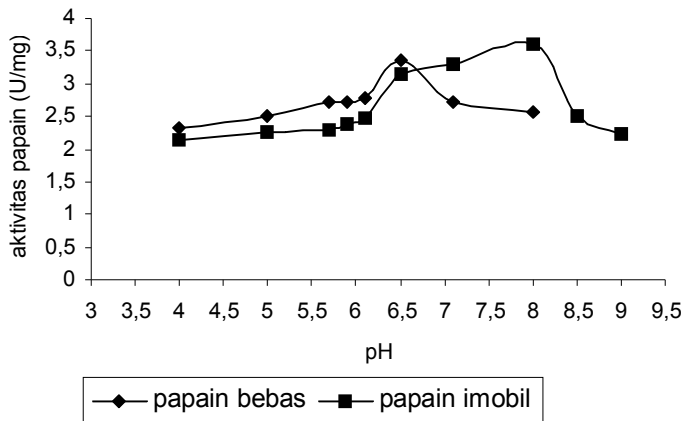
1. Pada pH 5-7, papain berada dalam keadaan HOOC-C-C-NH_3^+ sehingga interaksi secara pertukaran ion antara papain dengan matriks kitosan-Mg. Hal tersebut menyebabkan dalam waktu singkat jumlah papain yang terimobilisasi banyak.
2. Pada pH 7, sekitar pH isoelektrik, papain berada dalam keadaan *switer ion* sehingga interaksi ezim papain dengan matriks dapat terjadi secara maksimal.
3. Pada pH di atas 7, papain berada dalam keadaan $^-\text{OOC-C-C-NH}_2$, interaksi yang terjadi antara papain dengan matriks kitosan-Mg adalah interaksi pembentukan ikatan kovalen, sehingga meskipun jumlah papain yang terimobilisasi lebih rendah dibanding pada pH 7, tetapi jumlahnya masih lebih besar dibanding pada pH di bawah 7.

Data yang ditampilkan pada Gambar 2 menunjukkan bahwa waktu mempunyai pengaruh yang besar pada proses imobilisasi papain pada matriks kitosan-Mg. Pada waktu 3-9 jam jumlah papain yang terimobil bertambah seiring kenaikan waktu imobilisasi. Setelah 9 jam jumlah papain yang terimobil relatif konstan atau terjadi kenaikan yang tidak signifikan sampai waktu imobil 15 jam. Pada keadaan tersebut dapat dikatakan bahwa mulai jam ke-9 situs aktif matriks telah jenuh oleh papain dan mencapai kesetimbangan imobilisasi.

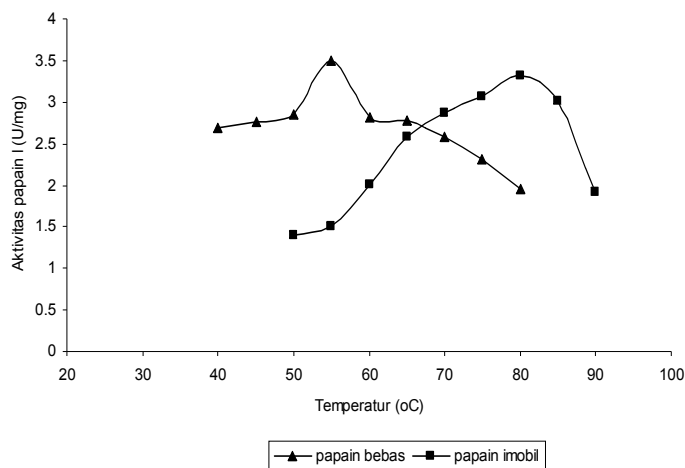
Gambar 3 menunjukkan bahwa pada konsentrasi awal sampai 20 mg/mL jumlah papain yang terimobil bertambah seiring kenaikan konsentrasi papain. Pada konsentrasi di atas 20 mg/mL jumlah papain yang terimobil relatif konstan atau terjadi kenaikan yang tidak signifikan. Pada keadaan tersebut dapat dikatakan bahwa mulai konsentrasi 20 mg/mL situs aktif matriks telah jenuh oleh papain dan mencapai kesetimbangan imobilisasi. Kitosan yang dimodifikasi dengan *crooslink*, kemampuannya sebagai matriks pada proses imobilisasi enzim lebih baik bila dibandingkan dengan kitosan yang tidak dimodifikasi [8,9].

Aktivitas papain

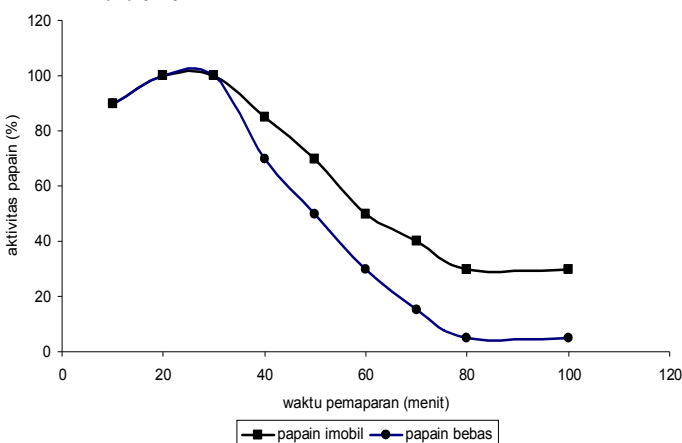
Pada penelitian ini papain yang telah diimobilisasi diuji kualitasnya dengan cara diuji aktivitas enzimatisnya. Hasil uji aktivitas ini juga bertujuan untuk mempelajari aktivitas proteolitik papain setelah diimobilisasi pada matriks kitosan-Mg dibandingkan dengan aktivitas proteolitik papain yang tidak diimobilisasi. Gambar 4 menunjukkan aktivitas papain bebas pada pH 4 sangat rendah, kemudian terjadi



Gambar 4. pH optimum aktivitas papain bebas (♦) ; papain imobil (■)



Gambar 5. Temperatur optimum papain (▲) papain bebas; (■) papain imobil



Gambar 6. Stabilitas termal papain bebas (temperatur 55 °C) dan papain imobil (temperatur 80 °C)

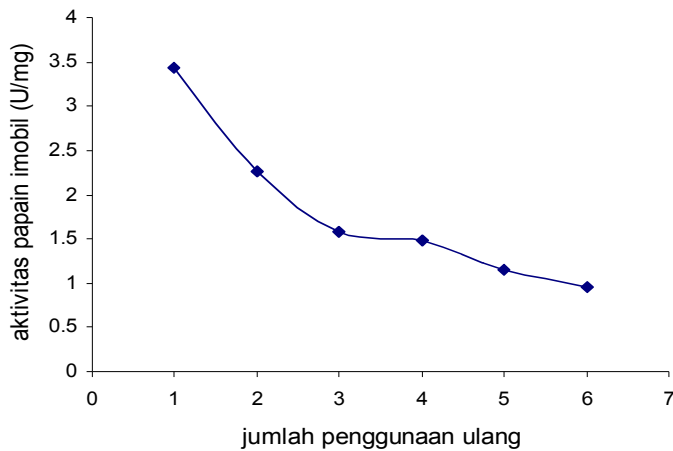
peningkatan sampai pH 6,5. Pada pH 6,5 aktivitas papain bebas mencapai keadaan optimum dimana pada kondisi ini aktivitas papain bebas mencapai maksimum yaitu 3,33 U/mg. Pada pH 7 sampai pH 9 aktivitasnya menurun. Berdasarkan data di atas maka dapat

dijelaskan bahwa, perubahan pH akan mempengaruhi konformasi enzim, daya katalitik dan efisiensi pengikatan enzim-substrat. Gambar 4 juga menunjukkan bahwa papain imobil mempunyai pH optimum 8, karena pada pH 8 aktivitas papain imobil mempunyai nilai tertinggi. Pada pH di atas 8 terjadi penurunan aktivitas dimana semakin jauh dari pH optimum nilai aktivitas papain imobil makin kecil. Penelitian Afaq [4] menunjukkan bahwa papain yang diimmobilisasi dengan sepharose mempunyai pH optimum 7,5 dan temperatur optimum 75 °C.

Pada Gambar 5 terlihat bahwa aktivitas papain bebas mengalami kenaikan seiring dengan kenaikan temperatur dari 40-55 °C. Pada temperatur di atas 55 °C aktivitas papain mengalami penurunan. Aktivitas maksimum terjadi pada temperatur 55 °C dengan aktivitas sebesar 3,33 U/mg, sehingga temperatur maksimum papain adalah 55 °C. Hal tersebut menunjukkan bahwa laju reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh temperatur. Peningkatan temperatur sampai temperatur optimum akan meningkatkan laju reaksi enzimatik, tetapi peningkatan temperatur di atas temperatur maksimum akan menurunkan laju reaksi enzimatik. Data pada Gambar 5 menunjukkan bahwa uji aktivitas pada papain imobil mempunyai temperatur optimum 80 °C, sedangkan papain bebas 55 °C. Hal tersebut menunjukkan bahwa matriks kitosan-Mg mampu melindungi papain terhadap panas sehingga papain mampu bertahan pada temperatur yang tinggi. Aktivitas spesifik papain imobil tidak berbeda secara signifikan dibanding aktivitas papain bebas tersebut diperkirakan karena Mg(II) merupakan aktivator papain sehingga meningkatkan aktivitas papain sebagai biokatalis.

Hasil uji stabilitas termal papain bebas dan imobil ditunjukkan pada Gambar 6. Berdasarkan Gambar tersebut dapat diketahui papain bebas pada temperatur optimumnya yaitu temperatur 55 °C hanya dapat bertahan sampai dengan pemanasan selama 70 menit dengan aktivitasnya tinggal 15%. Penurunan aktivitas mulai terjadi pada pemanasan selama 40 menit sampai 70 menit dimana aktivitas tinggal -70%. Gambar 6 juga menunjukkan bahwa papain imobil pada temperatur optimumnya yaitu temperatur 80 °C mampu bertahan sampai dengan pemanasan selama 80 menit dan jumlah aktivitas yang tersisa relatif konstan sampai pemanasan selama 100 menit. Penurunan aktivitas mulai terjadi pada waktu inkubasi 40 menit sampai 80 menit dimana aktivitas tinggal 35%-80%. Bila dibandingkan dengan papain bebas maka ezim papain imobil relatif lebih baik stabilitas termalnya.

Papain imobil dapat digunakan berulang kali sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 7. Gambar tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak penggunaan ulang aktivitasnya makin menurun. Papain imobil mampu digunakan sebanyak 6 kali dan pada penggunaan ke 6 aktivitas katalitiknya masih 25-



Gambar 7. Penggunaan ulang papain imobil

30%. Papain bebas hanya dapat dipakai satu kali, karena papain bebas akan tercampur dengan produk reaksi sehingga harus dilakukan proses perusakan untuk memisahkan papain dari produk reaksi. Pada aplikasinya hal tersebut sangat tidak ekonomis mengingat papain mahal harganya. Hasil penelitian Yagar [5] mengimobilisasi fosfatase asam dengan matriks pendukung kitosan-glutaraldehyd, hasilnya menunjukkan fosfatase asam mengalami penurunan aktifitas 15%, mampu digunakan ulang sebanyak 8 kali. Afaq mengimobilisasi papain dengan sheparose mampu digunakan 12 kali [4]. Jianmin mengimobilisasi tripsin pada kitosan-silika dengan *crosslinked agent* Cu(II), enzim tripsin imobil mampu digunakan 12 kali [6].

KESIMPULAN

Papain imobil yang dihasilkan mempunyai pH optimum 8, temperatur optimum papain imobil 80 °C, sedangkan papain bebas mempunyai pH optimum 6,5 dan suhu optimum 55 °C. Papain imobil mempunyai stabilitas termal yang lebih baik dibanding papain bebas. Papain imobil mampu digunakan 6 kali sedangkan papain bebas hanya mampu dipakai satu kali.

DAFTAR PUSTAKA

1. Godfrey, T., and Reichet, J., 1986, *Industrial Enzymology, The Application of Enzyme in Industry*, Great Britain, Stockton Press.
2. Bradford, M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
3. Chibata, I., 1978, *Immobilized Enzymes Research and Development*, John and Wiley and Sons, New York.
4. Afaq, S., 2001, *Electronic J. Biotechnology*, Catolica de Velparaaiso Chile, 6, 234-237.
5. Yagar, Y., 2002, *J. Process Biochem.*, 31, 287-289.
6. Jianmin, J., 2006, *Biological Macromolecular*, 39, 185-191.
7. Hong-Meyers, S.P., 1989, *J. Agric. Food. Chem.*, 37, 580-583.
8. Taboada, L., Cabrera, G., and Cardenas, G., 2002, *J. Chil. Chem. Soc.*, 48, 1-15
9. Tien, C.L., Millette, M., Mateescu, M.A., and Lacroix, M., 2004, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 39, 347-354