

## DETERMINATION of OPTIMUM CONDITION of PAPAIN ENZYME FROM PAPAYA VAR JAVA (*Carica papaya*)

### Penentuan Kondisi Optimum Enzim Papain Dari Pepaya Burung Varietas Jawa (*Carica papaya*)

Aline Puspita Kusumadjaja\*, and Rita Puspa Dewi

Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences  
State University of Surabaya, Surabaya

Received 25 February 2005; Accepted 17 April 2005

#### ABSTRACT

A study to investigate the optimum condition of papain enzyme has been carried out. The condition that are investigated are pH and temperature, based on measurement of enzyme activity which is defined as mmole tyrosin that are released in reaction between papain enzyme and casein as substrat per minute. In this research, the papain enzyme was isolated from pepaya burung varietas Jawa. The enzyme was partially purified by precipitation method using 30% – 50% saturated acetone. The result showed that the optimum conditions of papain enzyme are in pH 6 with activity 2,606 U/mL, and temperature at 50 °C with activity 2,469 U/mL.

**Keywords** : *Papaya var Java, papain, optimum condition, enzymatic activity*

#### PENDAHULUAN

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalisator reaksi-reaksi kimia dalam sistem biologis. Enzim memiliki daya katalitik yang tinggi. Enzim mampu meningkatkan kecepatan reaksi hingga satu juta kali lebih cepat dibanding reaksi-reaksi tanpa enzim. Molekul enzim juga memiliki tingkat spesifisitas tertentu terhadap substrat dari reaksi yang dikatalisisnya [1].

Enzim tidak hanya mampu mengkatalisis reaksi-reaksi dalam sistem biologis, tetapi juga mampu mengkatalisis reaksi-reaksi di luar sistem biologis asalkan dipaparkan pada kondisi yang sesuai. Kemampuan enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi tergambar melalui aktivitasnya. Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan pengubahan satu mikromol substrat per menit pada keadaan pengukuran optimum [2]. Harga aktivitas enzim dipengaruhi beberapa faktor antara lain : pH, suhu, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat dan inhibitor [3]. Faktor-faktor ini dapat dikendalikan sedemikian rupa sehingga diperoleh aktivitas enzim yang maksimal.

Dewasa ini, pemanfaatan enzim dalam berbagai industri semakin meningkat. Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam industri adalah enzim papain. Beberapa industri yang memanfaatkan papain adalah industri farmasi,

kosmetik, tekstil, penyamakan kulit, pangan, dan lain-lain [4]. Keuntungan penggunaan papain dalam bidang industri antara lain : mudah didapat, tidak ada reaksi samping, tidak toksik, relatif tahan terhadap suhu, dan memiliki daya katalitik yang tinggi [5].

Enzim papain merupakan enzim proteolitik yang mampu menghidrolisis protein menjadi asam-asam amino atau peptida-peptida. Enzim ini terdiri dari 187 residu asam amino dan memiliki berat molekul 21.000 [6]. Enzim papain memiliki gugus fungsional sulfhidril dan mampu menghidrolisis ikatan peptida pada asam amino lisin dan glisin. Suhu optimum papain berkisar antara 50 °C – 65 °C, dan pH optimum antara 5 – 7 [7].

Enzim papain terdapat dalam tanaman pepaya. Pada penelitian ini enzim papain diisolasi dari getah buah pepaya burung varietas Jawa, yang berasal dari Sidoarjo. Tanaman pepaya burung di daerah Sidoarjo jumlahnya cukup banyak, tetapi keberadaannya kurang dimanfaatkan secara maksimal karena daging buahnya berwarna kuning dan rasanya masam. Pepaya ini tidak disukai untuk dikonsumsi. Dalam upaya meningkatkan pemanfaatan pepaya burung varietas Jawa ini, dilakukan penelitian mengenai enzim papain yang terkandung dalam buah pepaya tersebut,

Enzim yang sama, tetapi berasal dari sumber yang berbeda, dapat memiliki karakter yang

\* Corresponding author.  
Email address : aline\_k4@yahoo.com

berbeda. Papain yang berasal dari jenis buah pepaya yang berbeda dapat memiliki karakter yang berbeda [5]. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui karakter enzim papain yang terkandung dalam pepaya burung varietas Jawa, terutama yang terdapat di daerah Sidoarjo. Karakter enzim yang menjadi fokus penelitian adalah pH dan suhu optimum.

Papain hasil isolasi dari pepaya burung dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan aseton. Endapan enzim selanjutnya didialisis menggunakan membran selofan. Larutan enzim hasil dialisis di "freeze dried", dan kemudian ditentukan pH optimum dan suhu optimumnya.

Suhu optimum dan pH optimum merupakan suhu dan pH dimana aktivitas enzim mencapai nilai tertinggi. Pada harga pH yang sangat ekstrim dari pH optimum, baik pH asam atau pH basa, aktivitas enzim sangat rendah. Kecepatan reaksi enzimatik sangat lambat. Hal ini terjadi karena enzim mengalami denaturasi [2]. Demikian pula halnya dengan pengaruh suhu terhadap reaksi enzimatik. Pada suhu rendah reaksi enzimatik berlangsung lambat. Kenaikan suhu sampai suhu optimum akan mempercepat laju reaksi enzimatik karena dengan naiknya suhu energi kinetik juga meningkat. Peningkatan suhu di atas suhu optimum akan menurunkan kecepatan reaksi karena pada suhu yang terlalu tinggi enzim terdaturasi [8].

Pada penelitian ini penentuan pH optimum dan suhu optimum enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai variasi pH dan suhu. Aktivitas enzim papain diukur dengan menggunakan metode Walter [9]. Metode ini didasarkan pada kemampuan papain untuk menghidrolisis substrat kasein menjadi peptida-peptida dan asam amino tirosin. Tirosin yang terbentuk inilah yang dijadikan dasar dalam perhitungan aktivitas papain. Tirosin direaksikan dengan reagen Follin-ciocalteu sehingga menghasilkan senyawa kompleks berwarna biru yang memberikan harga absorbansi pada daerah sinar tampak [ $\lambda = 578 \text{ nm}$ ].

Penentuan pH dan suhu optimum bertujuan untuk menciptakan suatu lingkungan atau media buatan yang mendukung tercapainya aktivitas kerja enzim secara maksimal, sehingga pemanfaatan enzim secara komersial dapat berlangsung secara efisien dan efektif.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Pepaya burung varietas Jawa sebagai sumber enzim papain diperoleh di daerah Sidoarjo, kasein, tirosin, TCA, Follin ciocalteu, buffer sitrat pH 4,

buffer asetat pH 5, buffer fosfat pH 6,7,8, buffer borat-boraks pH 9.

### Alat

Spektrofotometer Spektronik-20, stirer, sentrifus, vortex, oven dan seperangkat peralatan gelas.

### Prosedur Kerja

#### **Isolasi Enzim Papain, Pengendapan Bertingkat dan Dialisis Ekstrak Kasar Papain**

Sebanyak 50 g getah buah pepaya dilarutkan dalam 500 mL 0,1 M larutan buffer fosfat pH 7. Campuran tersebut dibiarkan selama 2 jam pada suhu 4 °C, kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit. Filtrat yang diperoleh diendapkan dengan aseton 0-30% ; 30-50% ; 50-70%. Endapan selanjutnya didialisis menggunakan membran selofan dan buffer fosfat 0,1 M pH 7. Proses dialisis dilakukan selama 24 jam, dan pergantian larutan buffer dilakukan setiap 6 jam [10], kemudian dilakukan "freeze dried" pada larutan enzim hasil dialisis.

#### **Penentuan pH optimum**

Ke dalam 6 tabung reaksi masing-masing dimasukkan 0,1 mL larutan enzim konsentrasi 0,1 g/mL, 0,5 mL kasein konsentrasi 0,02 g/mL, dan 0,5 mL buffer 0,05 M dengan variasi pH 4, 5, 6, 7, 8, dan 9. Sistem dikocok hingga homogen dan diinkubasi dalam penangas air bersuhu 55 °C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA 0,1 M sebanyak 1 mL, vortex hingga homogen, dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Sebanyak 0,75 mL filtrat hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2,5 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,4 M dan 0,5 mL pereaksi Follin ciocalteu. Tabung divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Hasil diukur absorbansinya pada  $\lambda$  578 nm. Proses diulang sebanyak 4 kali. Cara kerja tersebut di atas diulangi untuk penentuan absorbansi larutan blanko dan larutan standar, hanya pada penentuan absorbansi blanko dan standar penambahan larutan enzim dilakukan setelah penambahan TCA [9].

#### **Penentuan suhu optimum**

Ke dalam 9 tabung reaksi masing-masing dimasukkan 0,1 mL larutan enzim konsentrasi 0,1 g/mL, 0,5 mL kasein konsentrasi 0,02 g/mL, dan 0,5 mL buffer 0,05 M pH optimum enzim. Setiap tabung dikocok hingga homogen dan diinkubasi dalam penangas air dengan variasi suhu 32 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70

°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA 0,1 M sebanyak 1 mL dan 0,1 mL enzim, divortex hingga homogen, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Filtrat hasil sentrifugasi sebanyak 0,75 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M dan 0,5 mL pereaksi Follin ciocalteu. Tabung divortex hingga homogen, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit, kemudian diukur absorbansinya pada  $\lambda$  578 nm. Masing-masing pengukuran dilakukan 4 kali pengulangan. Cara kerja tersebut di atas diulangi untuk penentuan absorbansi larutan blanko dan larutan standar tirosin, hanya pada penentuan absorbansi blanko dan standar penambahan larutan enzim dilakukan setelah penambahan TCA [9].

#### Analisa Data

Data yang dihasilkan berupa harga absorbansi larutan sampel, blanko dan standart. Aktivitas enzim papain dihitung dengan rumus [9] :

$$\text{Aktivitas} = \frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi blanko}}{\text{Absorbansi standar} - \text{Absorbansi blanko}} \times P \times T^{-1}$$

Keterangan : P = Faktor pengenceran, T = waktu inkubasi.

Data aktivitas yang diperoleh selanjutnya dianalisa secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi, Pengendapan Bertingkat, dan Dialisis Ekstrak Kasar Papain

Ekstrak kasar papain diisolasi dari getah buah pepaya burung varietas Jawa. Getah yang berasal dari buah pepaya lebih baik dibandingkan dengan getah yang berasal dari daun dan batang, karena dari buah getahnya cukup banyak dan daya enzimatisnya cukup tinggi. Getah ini diperoleh dengan cara menyadap buah pepaya di pohon. Pada saat melakukan penyadapan harus menghindari panas matahari, karena matahari akan mengakibatkan enzim terdenaturasi.

Langkah awal isolasi papain dari getah buah pepaya yaitu homogenisasi getah yang diperoleh dengan menambahkan pelarut buffer fosfat 0,1 M

pH 7. Selanjutnya untuk memisahkan pengotor-pengotor dari ekstrak kasar enzim, dilakukan sentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 4000 rpm. Filtrat yang diperoleh diendapkan menggunakan aseton dengan kejenuhan 0-30%, 30-50%, 50-70%. Aseton mengendapkan enzim dengan prinsip *salting out*. Penambahan aseton menyebabkan molekul air yang mengelilingi protein terlepas dan diikat oleh aseton, sehingga molekul protein mengendap [10].

Fraksi enzim yang diperoleh dari aseton dengan kejenuhan 0-30%, 30-50% dan 50-70%, masing-masing didialisis menggunakan membran selofan. Buffer pendialisis yang digunakan yaitu buffer fosfat 0,1 M pH 7. Dialisis dilakukan selama 24 jam dan setiap 6 jam sekali buffer pendialisis diganti.

Dialisis merupakan salah satu proses pemurnian molekul enzim dari pengotor-pengotornya. Dalam proses ini, digunakan membran selofan yang bersifat *semipermeabel*, yaitu membran yang dapat dilewati partikel-partikel kecil, seperti molekul aseton, tetapi menahan molekul enzim. Membran selofan yang berisi enzim dimasukkan ke dalam bejana yang berisi buffer fosfat 0,1 M pH 7. Partikel-partikel kecil, bersama dengan molekul air akan berdifusi ke luar membran, dan enzim yang tertinggal di dalam membran terbebas dari partikel-partikel kecil tersebut. Tujuan dari proses dialisis adalah menghilangkan sisa-sisa aseton dari molekul enzim. Guna mempercepat proses dialisis dapat dilakukan dengan mengalirkan buffer dalam kantong [11].

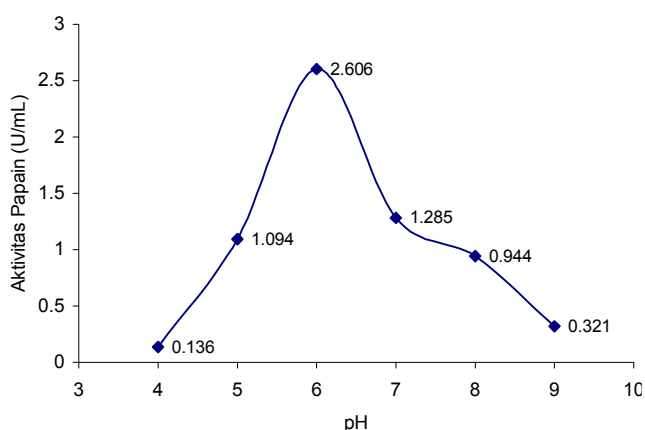
Enzim hasil dialisis, selanjutnya ditentukan aktivitasnya. Pada Tabel 1 terlihat bahwa fraksi enzim dengan kejenuhan aseton 30-50% memiliki aktivitas tertinggi dibandingkan fraksi enzim dengan kejenuhan aseton 0-30% dan 50-70%. Fraksi enzim yang diperoleh dengan kejenuhan aseton 30-50% kemudian ditentukan kondisi optimumnya, meliputi penentuan pH dan suhu optimum.

### Penentuan pH Optimum Ekstrak Kasar Papain Hasil Isolasi Dari Buah Pepaya Burung

pH optimum enzim adalah pH pada saat aktivitas enzim mencapai nilai tertinggi. Hasil analisis aktivitas papain pada berbagai variasi pH disajikan pada Gambar 1. Dari Gambar 1, terlihat bahwa aktivitas enzim mengalami kenaikan pada pH 4 hingga 6, kemudian turun pada pH 7 hingga 9. Grafik tersebut menunjukkan bahwa nilai aktivitas tertinggi dicapai pada pH 6, yaitu sebesar 2,696 U/mL dengan konsentrasi enzim 0,1 g/mL, sehingga pH 6 merupakan pH optimum untuk ekstrak kasar papain yang diisolasi dari getah buah pepaya burung.

**Tabel 1** Aktivitas enzim papain hasil fraksinasi dengan aseton

Persen kejenuhan aseton	Aktivitas papain (U/mL)
0-30	0,182
30-50	0,733
50-70	0,660



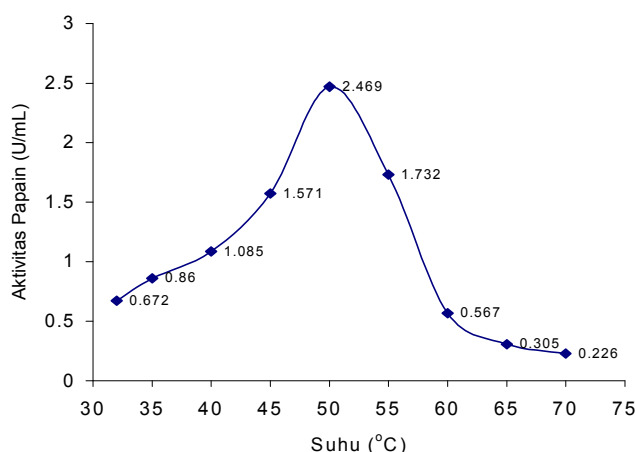
**Gambar 1** Grafik aktivitas enzim papain pada berbagai variasi pH

Nilai pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Enzim merupakan protein yang tersusun atas residu-residu asam amino. Perubahan pH menyebabkan perubahan muatan pada residu-residu asam amino, terutama yang menyusun pusat aktif enzim. Hal ini sangat berpengaruh terhadap konformasi enzim, daya katalitik dan efisiensi pengikatan enzim-substrat. [12].

Aktivitas papain mencapai nilai tertinggi pada pH 6. Pada pH optimum tersebut, enzim berada pada tingkat ionisasi yang paling sesuai untuk berikatan dengan substrat. Konformasi enzim dalam bentuk yang sangat stabil, sehingga efektifitas pengikatan enzim-substrat tinggi [1]. Perubahan pH di sekitar pH optimum menyebabkan berubahnya muatan residu-residu asam amino, terutama yang menyusun pusat aktif enzim, dan juga muatan residu-residu asam amino penyusun substrat [kasein]. Hal ini menyebabkan turunnya efektifitas pengikatan enzim-substrat, sehingga perubahan pH disekitar pH 6 menyebabkan turunnya aktivitas enzim. Perubahan pH yang terlalu jauh dari pH optimum menyebabkan enzim mengalami denaturasi, sehingga aktivitas yang dihasilkan sangat kecil. Hal ini terjadi ketika papain dipaparkan pada pH 4 dan pH 9, aktivitas enzim tersebut sangat kecil karena struktur sekunder dan tersiernya rusak.

#### Penentuan Suhu Optimum Ekstrak Kasar Papain Hasil Isolasi Dari Buah Pepaya Burung

Suhu optimum adalah suhu pada saat aktivitas enzim mencapai nilai tertinggi. Hasil analisis aktivitas papain pada berbagai variasi suhu disajikan pada Gambar 2. Pada Gambar 2, terlihat bahwa aktivitas papain mengalami kenaikan seiring dengan peningkatan suhu dari 32 °C hingga 50 °C. Aktivitas maksimum dicapai pada suhu 50 °C yaitu sebesar 2,469 u/mL. Suhu 50 °C, dengan demikian merupakan suhu optimum bagi enzim papain.



**Gambar 2** Grafik aktivitas enzim papain pada berbagai variasi suhu

Laju reaksi enzimatik sangat dipengaruhi suhu. Peningkatan suhu sampai suhu optimum akan meningkatkan laju reaksi [meningkatkan aktivitas enzim], tetapi peningkatan suhu di atas suhu optimum akan menurunkan laju reaksi enzimatik [3]. Pada penelitian yang telah dilakukan, peningkatan suhu dari 32 °C sampai dengan 50 °C meningkatkan aktivitas papain. Peningkatan enzim ini disebabkan pada suhu 32 °C – 50 °C terjadi peningkatan energi kinetik. Peningkatan energi kinetik mempercepat gerak vibrasi, translasi, serta rotasi enzim dan substrat, sehingga akan memperbesar peluang keduanya untuk saling berinteraksi [11]. Selain itu, kenaikan suhu sampai 50 °C juga menyebabkan berubahnya konformasi tiga dimensi enzim menuju ke konformasi yang lebih aktif secara katalitik. Hal ini terjadi karena ikatan-ikatan non kovalen pada struktur enzim, seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik dan ikatan hidrofilik akan putus. Pemutusan ikatan tersebut akan menstabilkan konformasi enzim yang paling sesuai untuk berikatan dengan substrat, sehingga enzim lebih aktif dalam mengkatalisis reaksi [1].

Kenaikan suhu di atas suhu 50 °C yang merupakan suhu optimum enzim papain, akan menurunkan aktivitas enzim. Pemanasan di atas suhu 50 °C menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim yang mengarah pada perubahan destruktif. Ikatan-ikatan kovalen yang mempertahankan struktur sekunder dan tersier enzim putus, sehingga terjadi kerusakan pada molekul enzim [3]. Kerusakan inilah yang mengakibatkan turunnya aktivitas enzim, seperti terlihat pada Gambar 2, dimana pada suhu 55 °C – 70 °C papain mengalami penurunan aktivitas.

#### KESIMPULAN

1. Enzim papain hasil pengendapan aseton dengan kejenuhan 30%-50% memiliki aktivitas terbesar dengan nilai 0,733 U/mL.

2. Nilai pH optimum papain adalah pH 6 dengan aktivitas 2,606 U/mL dan suhu optimum adalah 50 °C dengan aktivitas 2,469 U/mL.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Stryer, L., 1988, *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., W. H. Freeman and Company, New York
2. Lehninger, A.L., 1994, *Dasar-Dasar Biokimia*, (terj. M. Thenawijaya), Jilid 1, Erlangga, Jakarta
3. Sadikin, M., 2002, *Biokimia Enzim*, terbitan ke 1, Widya Medika, Jakarta
4. Winarno, F.G., 1986, *Enzim Pangan*, Jakarta, Gramedia
5. Aisyah, 2002, *Manfaat Getah Pepaya*, <http://www.bio/papain.html>
6. Darwis, A.A., dan Sukara, E., 1990, *Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor
7. Sumartha, I.G., 1990, *Oryza*, XIV, 25, 10
8. Murray, R.K., Ganner, D.K., Mayes, P.A., and Rodwell, V.W., 1997, *Biokimia Harper*, (terj. Andry Hartono), terbitan ke 24, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta
9. Bergmeyer, H.U., and Grassl, M., 1983, *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 2, Verlag Chemie, Weinheim
10. Bollag, D.M., Rozycki, M.D., and Edelstein, S.J., 1996, *Protein Methods*, 2<sup>nd</sup> ed., A John Wiley & Sons, Inc., New York
11. Cornely, K., Keravou, J., and Macvier, T., 1999, *J. Chem. Ed.*, 76, 5, 644
12. Wirahadikusumah, M., 1981, *Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat*, terbitan ke 2, ITB, Bandung