

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAIN FROM THE LATEX OF PAPAYA
(*Carica papaya* L)

Isolasi dan Karakterisasi Papain dari Buah Pepaya (*Carica Papaya* L) Jenis Daun Kipas

Dominggus Malle^{1,*}, Ivonne Telussa², Astrid A. Lasamahu²

¹Faculty of Agriculture Pattimura University, Kampus Poka, Jl. Ir. M. Putuhena, Ambon 97134

²Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Pattimura University, Kampus Poka, Jl. Ir. M. Putuhena, Ambon 97134

*E-mail: d.malle@faperta.unpatti.ac.id

Received: October 2014 Published: January 2015

ABSTRACT

The papain enzyme was isolated from the latex of papaya and it was purified by ammonium sulfate fractionation and dialysis methods. Determination of papain enzyme activity showed that the highest activity was found in the 80% fraction with a specific activity of 10.5797×10^5 U/g. Papain concentration after Bradford method was 53 mg/mL. Molecular mass of papain was detected to be 21.6 kDa after SDS-PAGE analysis. Characterization of papain showed that the optimum activity of papain was found at pH 8.0 with a specific activity of 14.07031×10 U/g, and at temperature 60 °C with a specific activity of 14.39755×10 U/g.

Keywords: Isolation, Characterization, Papain, Papaya

PENDAHULUAN

Buah pepaya merupakan buah tropis yang enak rasanya dan banyak mengandung zat nutrisi yang dibutuhkan oleh tubuh. Buah pepaya umumnya mengandung air dan karbohidrat, rendah kalori dan kaya akan vitamin dan mineral khususnya vitamin A dan C serta mineral kalium (K) (da Silva dkk., 2007). Selain sebagai penghasil buah, tanaman pepaya juga memiliki banyak khasiat. Hampir semua bagian tanaman pepaya dapat dimanfaatkan, mulai dari akar, batang, daun, kuntum bunga, kulit pohon, sampai getahnya.

Batang, daun, dan buah pepaya mengandung getah berwarna putih yang mengandung enzim pemecah protein atau proteolitik yang biasa disebut *papain* (Kalie, 2002). Papain [EC. 3.4.22.2] adalah satu dari enzim proteolitik asal tanaman yang secara intensif digunakan dalam proses pembuatan roti, pengempukan daging, pelembutan kulit, "defibrinating" luka, pelepasan gum pada sutera dan wool serta untuk pengobatan penyakit edema (Virdi, 2009).

Papain banyak digunakan dalam berbagai proses industri, sehingga prospek ekonomis papain tampaknya semakin cerah (Kalie, 2002). Oleh karena itu eksplorasi penelitian dan pemanfaatan papain terus dilakukan. Kahar (1995) melakukan penelitian tentang pengaruh jenis substrat terhadap aktivitas proteolitik enzim papain amobil.

Pemanfaatan papain untuk penghilangan lapisan kapur pada teripang pasir telah dilakukan oleh Sudrajat (2002). Penggunaan enzim papain sebanyak 4% mampu menghilangkan lapisan kapur pada tubuh teripang dan tidak menyebabkan lapisan kulit hitam pada punggung teripang rusak.

Sebagai enzim proteolitik, papain diharapkan memiliki aktivitas yang tinggi dan tahan terhadap lingkungan yang ekstrim seperti suhu yang tinggi dan pH yang rendah. Untuk mendapatkan papain dengan aktivitas yang tinggi, berbagai upaya dilakukan termasuk pendekatan bioteknologi rekayasa genetika pepaya. Selain itu usaha-usaha untuk mendapatkan sumber-sumber baru penghasil

papain terus dilakukan. Hingga saat ini isolasi papain lebih banyak berasal dari jenis pepaya berdaun jari, padahal ada beberapa jenis pepaya seperti pepaya daun kipas yang mungkin dapat digunakan sebagai sumber papain. Kajian ilmiah papain dari pepaya daun kipas masih sangat terbatas. Oleh karena itu suatu kajian ilmiah papain dari pepaya jenis daun kipas sangat diperlukan.

METODOLOGI

Bahan

Getah pepaya, Akuades/Akuabides, Natrium bisulfit 0,7% (E. Merck), Amonium sulfat kristal (E. Merck), BaCl₂ 1% (E. Merck), Buffer Tris-HCl, Sistein, Tirozin, Asam trikloro asetat (TCA) 5% (E. Merck), Bovine Serum Albumin (BSA) (Wako, Jepang), Pereaksi Bradford, APS (Ammonium persulfate) 10% (Bio Basic Inc), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) (Bio Basic Inc), Akrilamida 30% (Bio Basic Inc), bis-akrilamida 0,8% (Bio Basic Inc), Bufer Tris-Glisin 10x (Fermentas), SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) (Bio Basic Inc), Gliserol 50% (E. Merck), Bromphenol blue 0,1% (Wako, Jepang), Coomassie Brilliant Blue R-250 (E. Merck), Protein Marker (Fermentas), Metanol (E. Merck), Asam asetat (E. Merck), Membran dialisis (MCO : 14000) (Wako, Jepang).

Alat

Hot plate (Cimarec 2), *Magnetic stirrer* (Cimarec 2), Mikropipet (Eppendorf Research), Oven (Shell Lab), pH meter (Metler Toledo), Sentrifuge (Labofuge 200-HEREAUS), Seperangkat alat gelas (Pyrex), Seperangkat alat gelas (Pyrex), Seperangkat peralatan SDS – PAGE (Cole-Palmer), Spektrofotometer UV-VIS (APEL PD-303 UV), Timbangan analitik (OHAUS AdventureTM Pro).

Prosedur Kerja

Persiapan Sampel

Penyadapan getah dilakukan pada buah pepaya yang berumur 2,5 - 3 bulan. Kulit buah ditoreh sedalam ± 1 – 2 mm dari atas ke bawah. Dari torehan akan menetes getah buah. Tetesan getah ditampung dalam wadah.

Isolasi Papain

Getah yang diperoleh dicampur dengan larutan natrium bisulfit 0,7% sebanyak empat kali jumlah getah, kemudian diaduk hingga merata sampai terbentuk emulsi berwarna putih susu yang agak kental. Kemudian emulsi dituangkan merata dalam cawan petri, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50 – 60 °C.

Pemurnian Enzim Papain

Fraksinasi ammonium sulfat

Getah papaya yang telah diperoleh dihaluskan dengan menggunakan mortar dan ditimbang. Kemudian dilarutkan dalam 50 mL akuades dan disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm lalu diambil supernatan dengan cara dekantasi.

Supernatan yang diperoleh kemudian diendapkan menggunakan kristal ammonium sulfat.

Protein dibagi menjadi 4 fraksi, yaitu fraksi 20%, 40%, 60%, dan 80%. Penentuan jumlah kristal ammonium sulfat yang dibutuhkan untuk setiap fraksi didasarkan pada tabel fraksinasi ammonium sulfat.

Untuk menghasilkan fraksi 20%, digunakan 5,3 g ammonium sulfat yang telah dihaluskan dan dilarutkan dalam supernatan di dalam ruang dingin lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* secara perlahan. Selanjutnya campuran diendapkan dengan cara disentrifuge pada 4000 rpm selama 15 menit, kemudian supernatan dipisahkan dari endapannya. Endapan dilarutkan dengan Tris-HCl 50 mM pH 7,0 dengan volume sesedikit mungkin. Larutan ini merupakan fraksi ammonium sulfat 20%. Supernatan kemudian ditambah dengan 5,65 g ammonium sulfat untuk memperoleh fraksi 40%. Campuran lalu diendapkan dengan cara disentrifuge pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit kemudian supernatan dipisahkan dari endapannya.

Endapan dilarutkan dengan Tris-HCl 50 mM pH 7,0 dengan volume sesedikit mungkin. Larutan ini merupakan fraksi ammonium sulfat 40%. Supernatannya kembali ditambahkan 6 g ammonium sulfat untuk memperoleh fraksi 60%. Campuran lalu diendapkan dengan cara disentrifuge pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit kemudian dipisahkan antara supernatan dan endapannya. Endapan dilarutkan dalam Tris-HCl 50 mM pH 7,0 dengan volume sesedikit

mungkin. Larutan ini merupakan fraksi ammonium sulfat 60%.

Supernatannya kembali ditambah 6,45 g amonium sulfat untuk memperoleh fraksi 80%. Campuran lalu diendapkan dengan cara disentrifuge pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit kemudian dipisahkan antara supernatan dan endapannya. Dilarutkan dalam Tris-HCl 50 mM pH 7,0 dengan volume sesedikit mungkin. Larutan ini merupakan fraksi ammonium sulfat 80%.

Dialisis

Dialisis dilakukan dengan memasukkan fraksi-fraksi enzim ke dalam kantong selofan. Kemudian enzim dalam plastik selofan ini direndam dalam *buffer* Tris-HCl 50 mM. Untuk mengetahui masih adanya garam ammonium sulfat dalam larutan enzim, dilakukan uji kualitatif ammonium sulfat yaitu dengan menambahkan larutan BaCl₂ 1% (b/v) ke dalam cuplikan *buffer* Tris-HCl.

Uji Aktivitas

Uji aktivitas dilakukan menggunakan kasein 1% sebagai substrat. Dengan menentukan nilai At, Ab, As dan As₀. Dipipet 5 mL kasein (yang terdiri dari 12 mM sistein dalam 0,05 M *buffer* Tris-HCl pH 7,0), kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,1 mL enzim murni (tiap fraksi), kemudian diinkubasi selama 1 menit, kemudian ditambahkan lagi 5 mL TCA 5%, dikocok dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya campuran disentrifuge pada 4000 rpm selama 15 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 280 nm (A_t). Untuk memperoleh nilai Ab, 0,1 mL enzim dari tiap fraksi ditambahkan dengan 5 mL TCA 5% dan 5 mL kasein, dikocok dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Kemudian disentrifuge pada 4000 rpm selama 15 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 280 nm (Ab).

Untuk As digunakan larutan standar tirosin 1 mM, sedangkan untuk As₀ digunakan larutan HCl 0,1 M, diukur absorbansinya pada 280 nm untuk memperoleh nilai As dan As₀. Satu unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menaikkan satu absorbansi dengan ekuivalen dengan 1 µg tirosin per menit sesuai dengan prosedur yang digunakan.

Uji Protein

Penetapan serapan maksimum larutan bovin serum albumin

Ditimbang dengan teliti 10 mg bovine serum albumin dan dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 10 mL hingga tanda batas. Ke dalam tabung reaksi pipet sebanyak 1 mL larutan bovin serum albumin 1000 µg/mL. Kemudian ditambahkan 0,5 mL pereaksi Bradford, dikocok dengan segera dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya dibaca serapannya pada panjang gelombang 400 sampai 600 nm hingga diperoleh serapan maksimum.

Penentuan kurva baku larutan bovin serum albumin

Dipipet larutan bovin serum albumin 1000 µg/mL ke dalam masing-masing labu takar 10 mL, dengan konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 ppm. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dari masing-masing labu dipipet sebanyak 0,1 mL. Kemudian ditambahkan pereaksi Bradford masing-masing 5 mL, dikocok dengan segera dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum dari tahap sebelumnya.

Penentuan kadar protein enzim papain

Sebanyak 0,1 mL ekstrak enzim ditambahkan dengan 5 mL pereaksi Bradford dan dibiarkan pada suhu ruang selama 10 - 60 menit. Absorbansi larutan sampel protein dibaca pada panjang gelombang maksimum. Dengan persamaan matematik dari kurva standar protein, akan didapatkan kadar protein terlarut yang terkandung dalam enzim.

Karakterisasi Papain

Penentuan pH optimum

Uji aktivitas untuk penentuan pH optimum dilakukan menggunakan kasein 1% sebagai substrat. Dengan menentukan nilai At dan Ab. Dipipet 5 mL kasein dengan variasi pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 dan 9,0, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,1 mL enzim murni (fraksi dengan aktivitas tertinggi), kemudian diinkubasi selama 1 menit, kemudian ditambahkan lagi 5 mL TCA 5%, dikocok dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya

campuran disentrifuge pada 4000 rpm selama 15 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 280 nm (At).

Untuk memperoleh nilai Ab, 0,1 mL enzim ditambahkan dengan 5 mL TCA 5% dan 5 mL kasein (variasi pH), dikocok dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian disentrifuge pada 4000 rpm selama 15 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 280 nm (Ab).

Penentuan suhu optimum

Uji aktivitas untuk penentuan suhu optimum dilakukan menggunakan kasein 1% dengan pH optimum enzim (hasil penentuan pH optimum). Dengan menentukan nilai At dan Ab, dengan memvariasikan suhu inkubasi yaitu, 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80 dan 85°C.

Perkiraan Massa Molekul Papain (Metode SDS-PAGE)

Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan gel pemisah 15% poliakrilamida dan gel penahan 5% poliakrilamida. Cetakkan gel berupa dua lempeng kaca dihipitkan dan diantaranya diletakkan pemisah (*spacer*) pada bagian tepi, lalu dijepit dengan klip dan diberdirikan di atas lempeng kaca. Larutan gel pemisah (*separating gel*) dimasukkan ke dalam lempeng kaca. Setelah gel tersebut mengeras kemudian dimasukkan gel penahan (*stacking gel*) ke atasnya. Sisir pencetak sumur segera dimasukkan ke bagian gel penahan sebelum gel mengeras.

Lempeng kaca yang berisi gel yang sudah mengeras dimasukkan ke dalam alat elektroforesis dan diikuti dengan larutan buffer elektroforesis. Protein (20 µL) disuspensikan dengan buffer sampel (5 µL) dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Setelah dingin larutan protein dimasukkan ke dalam gel poliakrilamid sebanyak 15 µL. Sebagai standar protein digunakan standar protein dari Fermentas yang dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 5 µL. Kemudian sampel dan standar protein dilarikan dalam gel elektroforesis selama 70 menit pada tegangan 150 V, 400 A. Setelah elektroforesis gel diwarnai dengan larutan CBB R-250 1% selama 2 – 3 jam. Gel hasil pewarnaan kemudian direndam di dalam larutan penghilang warna (metanol dan asam asetat) untuk menghilangkan kelebihan warna. Pita protein yang terpisah

kemudian diukur jarak migrasinya dan dibandingkan dengan jarak protein standar.

Tabel 1. Komposisi gel elektroforesis

	Gel Penahan 5%	Gel Pemisah 15%
Larutan A	0,5 mL	2,0 mL
Larutan B	-	0,38 mL
Larutan C	1,3 mL	-
Akuabides	2,1 mL	1,6 mL
APS 10 % (b/v)	30 µL	50µL
TEMED	3 µL	2 µL

Keterangan :

Larutan A: akrilamida 30% (b/v) (29,2 g dalam 100 mL akuades) bis-akrilamida 0,8% (b/v) (0,8 g dalam 100 mL akuades).

Larutan B: 75 mL buffer Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) 21 mL akuabides.

Larutan C: 50 mL buffer Tris-HCl 0,5 M (pH 6,81) 46 mL akuabides.

Tabel 2. Komposisi buffer elektroforesis dan buffer sumpel

Buffer elektroforesis	Buffer sampel
3,0 g Tris-base	1,0 g SDS
14,4 g glisin	2,0 mL gliserol 50% (v/v)
1,0 g SDS	2,0 mL bromphenol blue 0,1% (v/v)
Akuades sampai 1000 mL	1,5 mL Tris-HCl 1 M (pH 6,8)
-	Akuades sampai 10 mL

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Papain

Getah pepaya disadap dari buah pepaya jenis daun kipas yang berumur 2,5 – 3 bulan dengan kedalaman torehan \pm 1 – 2 mm. Penyadapan dilakukan sebanyak empat kali dengan selang waktu selama empat hari dan diperoleh getah basah sebanyak 126,4 g.

Getah yang diperoleh dicampurkan dengan natrium bisulfit 0,7%, dimana penggunaan senyawa sulfit dimaksudkan sebagai pelarut bahan kimia dan untuk menekan terjadinya kerusakan akibat proses isolasi, sedangkan penggunaan air sebagai pelarut sulfit dimaksudkan untuk mengencerkan getah. Campuran hasil pengadukan membentuk emulsi berwarna putih susu yang agak kental yang kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C sampai getah mengering. Sampel yang telah kering, dihaluskan menggunakan mortar dan

diperoleh papain kering dengan ciri-ciri berwarna putih kekuningan dan baunya seperti bau larutan sulfit (Gambar 1).



Gambar 1. Papain Kasar

Pemurnian Papain

Papain kering (*crude extract*) yang telah diperoleh dilarutkan dengan larutan buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,0 dengan tujuan mempertahankan kestabilan enzim papain. Enzim yang telah dilarutkan diendapkan dengan ammonium sulfat untuk fraksi 20%, 40%, 60% dan 80%.

Garam netral dapat berpengaruh terhadap kelarutan protein. Pada konsentrasi rendah, garam dapat menaikkan kelarutan protein dalam air, suatu peristiwa yang dikenal sebagai *salting-in*. Pengaruh garam netral terhadap kelarutan protein merupakan fungsi dari kekuatan ioniknya, yaitu suatu ukuran konsentrasi dan jumlah muatan listrik sumbangan kation dan anion dari garam. Efek *salting-in* disebabkan oleh kecenderungan perubahan gugus rantai samping protein yang tidak terdisosiasi untuk mengion. Tetapi bila kekuatan ion meningkat, kelarutan protein akan menurun. Pada kekuatan ionik yang tinggi, protein akan mengendap, yang dikenal dengan efek *salting-out*. Efek *salting-out* disebabkan pada konsentrasi yang tinggi, garam dapat menghidrasi air dari permukaan molekul protein sehingga protein terendapkan. Efek *salting-in* dan *salting-out* merupakan cara yang penting untuk memisahkan protein dari campurannya. Hal ini disebabkan protein yang berbeda menunjukkan respon yang berbeda terhadap konsentrasi garam netral. Protein yang diendapkan melalui proses presipitasi *salting-out* akan tetap berada dalam konformasi alaminya (Sindumarta, 1999).

Proses fraksinasi bertujuan untuk memekatkan atau menjenuhkan larutan sehingga diperoleh larutan pekat yang mengandung endapan protein. Penambahan amonium sulfat dalam proses fraksinasi dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk di atas *magnetic stirrer* dengan kecepatan konstan. Hal ini bertujuan untuk mencegah terbentuknya busa pada permukaan supernatan. Terbentuknya busa dapat mendenaturasi protein sebab busa dapat menurunkan tegangan permukaan sehingga merusak struktur alami protein.

Dalam membebaskan protein dalam larutan dari partikel-partikel pengganggu lainnya dilakukan proses dialisis. Dalam proses ini digunakan membran dialisis semipermeabel untuk menahan molekul-molekul protein, sedangkan molekul yang lebih kecil seperti garam dan air dapat melewati membran tersebut (Sindumarta, 1999). Pada penelitian, membran semipermeabel yang digunakan adalah selofan. Buffer perlu diganti pada saat mencapai kesetimbangan konsentrasi antara bagian dalam dan bagian luar. Dengan pergantian buffer, proses difusi akan terus berlanjut. Untuk mengetahui larutan protein bebas dari garam, maka larutan buffer diluar membran dianalisis dengan ditetesi larutan BaCl₂ 1%. Apabila larutan protein masih mengandung amonium sulfat, maka di dalam larutan buffer akan terbentuk endapan barium sulfat yang berwarna putih.

Dari proses pemurnian diperoleh 4 fraksi enzim, yakni fraksi 20%, 40%, 60%, dan fraksi 80%. Fraksi-fraksi ini kemudian diuji aktivitasnya menggunakan kasein sebagai substrat untuk mengetahui aktivitas tiap fraksi. Hasil uji aktivitas tiap fraksi ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas fraksional

Fraksi	Aktivitas spesifik (x10 ⁵) (U/g)
20%	0,63184
40%	0,17041
60%	1,77755
80%	10,57975

Berdasarkan data hasil uji aktivitas fraksional pada Tabel 3, diketahui bahwa fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi adalah fraksi 80%. Hal ini menunjukkan bahwa pada fraksi 80% terdapat enzim papain dengan jumlah terbanyak diantara fraksi-fraksi lainnya, maka untuk uji protein dan karakterisasi digunakan fraksi 80%.

Uji Protein

Uji protein pada penelitian ini menggunakan metode Bradford, uji ini didasarkan pada pengamatan bahwa absorbansi maksimum untuk larutan pewarna asam Coomassie Brilliant Blue G-250 bergeser dari 465 nm ke 595 nm, ketika mengikat protein maka terjadi perubahan warna (Bradford, 1976). Panjang gelombang yang digunakan yaitu 595 nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum. Hal ini dikarenakan pada panjang gelombang 595 nm absorbansi sebanding dengan pewarna yang terikat pada protein. Oleh karena itu, kadar protein pun menjadi sebanding dengan absorbansi jika diukur menggunakan kurva standar. Dari persamaan garis yang diperoleh dari kurva standar, dilakukan penentuan kadar protein papain dari fraksi 80% dan hasil yang diperoleh yaitu kadar protein papain sebesar 53 mg/mL.

Karakterisasi Papain

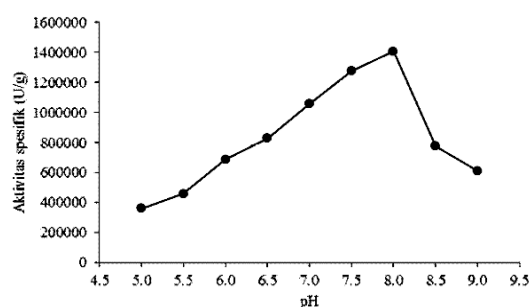
Penentuan pH optimum

pH optimum enzim adalah pH pada saat aktivitas enzim mencapai nilai tertinggi. Hasil penelitian aktivitas papain pada berbagai variasi pH disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji penentuan pH optimum papain

pH	Aktivitas spesifik ($\times 10^5$) (U/g)
5,0	3,59964
5,5	4,58136
6,0	6,87103
6,5	8,28907
7,0	10,57975
7,5	12,76135
8,0	14,07031
8,5	7,74367
9,0	6,10747

Pada kurva penentuan pH optimum ini terlihat bahwa aktivitas enzim mengalami kenaikan pada pH 5,0 hingga 8,0, kemudian turun pada pH 8,5 hingga 9,0. Grafik tersebut menunjukkan bahwa nilai aktivitas tertinggi dicapai pada pH 8,0 yaitu sebesar $14,07031 \times 10^5$ U/g, sehingga pH 8,0 merupakan pH optimum untuk papain murni yang diisolasi dari getah buah pepaya jenis daun kipas.



Gambar 2. Kurva pH optimum enzim papain dari getah pepaya jenis daun kipas

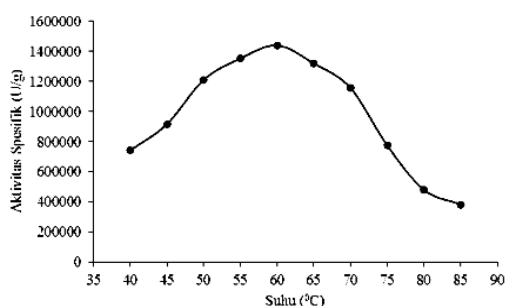
Nilai pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Enzim merupakan protein yang tersusun atas residu-residu asam amino. Perubahan pH menyebabkan perubahan muatan pada residu-residu asam amino, terutama yang menyusun pusat aktif enzim. Hal ini sangat berpengaruh terhadap konformasi enzim, daya katalitik dan efisiensi pengikatan enzim-substrat (Wirahadikusumah, 1981).

Aktivitas papain mencapai nilai tertinggi pada pH 8,0. 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 (Stryer, 1988). 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 8,0 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 dikarakterisasi pada pH 5,0 dan pH 9,0, aktivitas enzim tersebut sangat kecil karena terjadi perubahan pada konformasi struktur tersier akibat dari adanya protonasi pada asam amino tertentu.

Penentuan suhu optimum

Suhu optimum adalah suhu pada saat aktivitas enzim mencapai nilai tertinggi. Untuk menentukan suhu optimum papain, pH substrat dikondisikan ke pH 8,0 yang merupakan pH optimum dengan menambahkan buffer Tris-HCl pH 8,0. Hasil uji aktivitas papain pada berbagai variasi suhu disajikan pada Gambar 3.



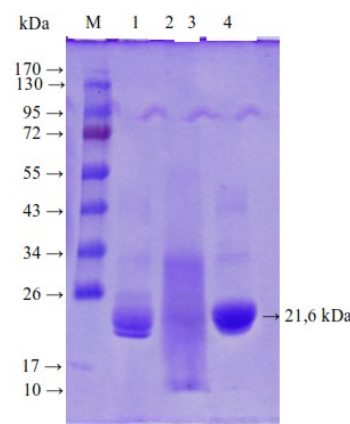
Gambar 3. Kurva suhu optimum enzim papain dari getah pepaya jenis daun kipas

Pada Gambar 3, terlihat bahwa aktivitas papain mengalami kenaikan seiring dengan peningkatan suhu dari 40 °C sampai 60 °C. Aktivitas maksimum dicapai pada suhu 60 °C yaitu sebesar $14,39755 \times 10^5$ U/g. Dengan demikian, suhu 60 °C merupakan suhu optimum bagi enzim papain.

Pemanasan di atas suhu 60 °C menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim yang mengarah pada perubahan destruktif (denaturasi). Ikatan-ikatan non-kovalen yang mempertahankan struktur sekunder dan tersier enzim terputus, sehingga terjadi kerusakan pada molekul enzim (Sadikin, 2002). Kerusakan inilah yang mengakibatkan turunnya aktivitas enzim, seperti terlihat pada Gambar 3, dimana pada suhu 65 – 85 °C papain mengalami penurunan aktivitas.

Perkiraan Massa Molekul Papain (Metode SDS-PAGE)

Pemurnian enzim papain yang dilakukan menunjukkan hasil yang baik. Hasil ini didukung oleh data hasil analisis SDS-PAGE seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil SDS-PAGE ; M= Marker ; 1= Fraksi 20% ; 2= Fraksi 40% ; 3= Fraksi 60% ; 4= Fraksi 80%

Hasil SDS-PAGE menunjukkan adanya pita pada tiap-tiap fraksi. Fraksi 20% terdapat 4 pita, sedangkan fraksi 40%, 60% dan 80% terdapat masing-masing 3 pita. Hasil perhitungan berat molekul tiap-tiap fraksi disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil perhitungan berat molekul sampel

	Berat Molekul (kDa)			
	Fraksi 20%	Fraksi 40%	Fraksi 60%	Fraksi 80%
Pita ke-1	32,0	30,8	30,8	47,3
Pita ke-2	23,4	20,0	20,0	32,0
Pita ke-3	20,0	11,6	11,6	21,6
Pita ke-4	17,8			

Seperti yang dikemukakan oleh Hasanah (2005) bahwa papain mempunyai massa molekul 21.000 Dalton. Hasil analisa dengan SDS-PAGE untuk fraksi 20%, 40%, 60% dan 80%, menunjukkan adanya enzim papain pada fraksi 80%, pada pita ke-3 dengan jarak migrasi 5,3 cm, dengan hasil perhitungan menunjukkan berat molekul sebesar 21,6 kDa.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Enzim papain dapat diisolasi dari pepaya jenis daun kipas, dengan hasil pemurnian menunjukkan aktivitas enzim papain tertinggi

yaitu fraksi 80% dengan aktivitas spesifik sebesar $10,5797 \times 10^5$ U/g.

2. Aktivitas enzim papain dari pepaya jenis daun kipas memiliki pH optimum 8,0 dan suhu optimum 60°C, dengan kadar protein yang diperoleh dari fraksi 80% adalah 53 mg/mL dengan massa molekul dari hasil analisa SDS – PAGE adalah 21,6 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford, M. M., 1976, *A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Protein Utilization, The Principle of Protein-dye Binding*, *Anal. Biochem*, 72:248-254.
- Da Silva, J. A. T., Z. Rashid, D. T. Nhut, D. Sivakumar, A. Gera, M. T. Souza Jr., dan P. F. Tennant. 2007, *Papaya (Carica papaya L.) Biology and Biotechnology, Tree and Forest Science and Biotechnology* 1 (1): 47-73.
- Kahar, Z., 1995, *Pengaruh Jenis Substrat terhadap Aktivitas Proteolitik Enzim Papain Amobil*, Laboratorium Kimia Universitas Andalas.
- Kalie, M. Baga, 2002, *Bertanam Pepaya*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Sadikin, M., 2002, *Biokimia Enzim*, terbitan ke 1, Widya Medika, Jakarta.
- Sindumarta, H., dan Natalia, D., 1999, *Catatan Kuliah Biokimia 1 : Struktur dan Katalir*, Jurusan Kimia MIPA, ITB, Bandung, Hal 101.
- Sudrajat, Y., 2002, *Teknik Penghilangan Lapisan Kapur pada Teripang Pasir Menggunakan Enzim Papain*, *Buletin Teknik Pertanian* Vol. 7 Nomor 2.
- Virdi, M. S. 2009. *Papain from Papaya*. Science Tech Entrepreneur.
- Wirahadikusumah, M., 1981, *Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat*, terbitan ke 2, ITB, Bandung.
- Stryer, L., 1988, *Biochemistry*, 3rd ed., W. H. Freeman and Company, New York.