

## KARAKTERISASI PAPAIN DARI DAUN PEPAYA (*Carica Papaya L.*)

### CHARACTERIZATION OF PAPAIN FROM *Carica Papaya L.* LEAVES

**Zusfahair\*, Dian Riana Ningsih, Febrina Nur Habibah**

Program Studi Kimia Jurusan MIPA Fakultas Sains dan Teknik  
Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto  
Jl. Soeparno 62, Karangwangkal, Purwokerto Jawa Tengah 53123  
\*email: zusfahair@gmail.com

#### ABSTRAK

Enzim yang menempati urutan pertama dalam pemanfaatannya di bidang industri adalah protease. Protease dapat digunakan sebagai katalis untuk reaksi yang menggunakan pelarut organik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik ekstrak kasar papain dari daun pepaya (*Carica papaya L.*) yang meliputi suhu dan pH optimum, pengaruh EDTA dan ion-ion logam, serta kestabilannya dalam pelarut organik seperti metanol, aseton, dan toluena, serta potensinya sebagai katalis dalam pelarut organik.

Isolasi papain dari daun pepaya dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kasar papain. Ekstrak kasar papain selanjutnya dikarakterisasi suhu dan pH optimum, pengaruh EDTA dan ion-ion logam yang meliputi ion  $\text{Ca}^{2+}$ , ion  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , serta aktivitasnya dalam pelarut organik, seperti metanol, aseton, dan toluena.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar papain yang diisolasi dari daun pepaya kalifornia optimum pada suhu  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan pH 7, sedangkan papain daun pepaya bangkok optimum pada suhu  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan kisaran pH 7-8. Aktivitas enzim papain daun pepaya kalifornia dan bangkok meningkat dengan adanya ion  $\text{Zn}^{2+}$  dan menurun dengan adanya ion  $\text{Ca}^{2+}$ , ion  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  serta EDTA. Aktivitas papain daun pepaya kalifornia relatif stabil hingga jam ke-6 dengan penambahan pelarut metanol dan menurun setelah jam ke-3 dengan penambahan pelarut aseton dan toluena, sedangkan papain daun pepaya bangkok dengan penambahan pelarut metanol, aseton, ataupun toluena aktivitasnya hanya dapat stabil hingga jam ke-3. Papain dari daun pepaya kalifornia berpotensi digunakan sebagai biokatalis dalam pelarut metanol.

Kata kunci : papain, daun pepaya, karakterisasi

#### ABSTRACT

Protease is the most commonly used enzyme in industrial application. Protease can be used as catalysts for reaction that uses organic solvent. This research is aimed to determine the characteristics of the crude extract of papain from *Carica papaya L* leaf which includes temperature; optimum pH; effect of EDTA and metal ions; the stability in organic solvents such as methanol, acetone, and toluene, and the potential as a catalyst in organic solvents.

Isolation of papain from *Carica papaya L* leaf was conducted to obtain the crude extract of papain. Crude papain extract was further characterized to determine the optimum temperature and pH; effect of EDTA and metal ions addition including  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and its activity in organic solvents, such as methanol, acetone, and toluene.

Results of the identification showed that crude papain extract isolated from California variant leaf has the optimum temperature at 60 °C and pH 7, while papain of Bangkok variant has the optimum temperature at 50 °C and pH range of 7-8. Papain enzyme activity of California and Bangkok variant *Carica papaya* L leaf increased in the presence of Zn<sup>2+</sup> ion and decreased in the presence of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ions as well as EDTA. Papain activity of California *Carica papaya* L leaf was relatively stable until six hours of methanol addition and decreased after three hours of acetone and toluene. The activity of papain from Bangkok *Carica papaya* L can only be stable until three hours with the addition methanol, acetone, and toluene activity. Papain from California *Carica papaya* L leaf can potentially be used as a catalyst in methanol solvent.

Keywords : papain, *Carica papaya* L. leaf, characterization.

## PENDAHULUAN

Dewasa ini enzim telah dijadikan sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri. Protease merupakan salah satu enzim yang menguasai 60% total pemasaran enzim dunia yang banyak digunakan dalam bidang industri makanan, kulit, detergen, farmasi, tekstil, dan lain-lain (Kamelia, dkk., 2005).

Industri tekstil memanfaatkan enzim protease sebagai bahan penghilang *gum* pada serat sutera sehingga membuat sutera menjadi lebih lembut dan berkilau (Sasithorn dan Luepong, 2008). Protease juga banyak digunakan sebagai katalis untuk reaksi yang menggunakan pelarut organik. Ogino, *et al.*, (2001) melaporkan bahwa protease yang diisolasi dari *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 dalam reaksi sintesis peptida memiliki kestabilan yang baik dalam pelarut organik seperti dimetil sulfoxida, *N,N*-dimetilformamida, dan metanol. Beberapa reaksi sintesis peptida yang dikatalisis protease yaitu regioselektif, stereoselektif, serta rasemisasi bebas (*racemization free*). Enzim protease yang telah digunakan untuk sintesis peptida dengan keberadaan pelarut organik adalah  $\alpha$ -kimotripsin, papain, pepsin, subtilisin, termolisin, dan tripsin (Ogino dan Ishikawa, 2001).

Protease dapat diperoleh dari jaringan tumbuhan. Salah satu jenis tumbuhan yang mengandung enzim protease adalah pepaya (*Carica papaya* L.). Pepaya adalah tumbuhan penghasil enzim papain yang merupakan golongan enzim protease sulfhidril (Dongoran, 2004) dan termasuk golongan tiol protease eukariotik yang mempunyai sisi aktif sistein (Sadikin, 2002). Papain terkandung pada berbagai bagian tumbuhan pepaya, termasuk pada daunnya. Potensi papain dalam daun pepaya ini perlu dieksplorasi lebih lanjut karena Indonesia merupakan salah satu negara penghasil pepaya dengan produksi mencapai 200.000 ton per tahun. (Warsino, 2003).

Mengingat aplikasi protease yang beragam serta potensi yang besar dari papain yang terkandung dalam tanaman pepaya yang tumbuh subur di Indonesia, maka perlu dilakukan suatu eksplorasi terhadap karakteristik papain. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik ekstrak kasar papain dari daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang meliputi suhu dan pH optimum, pengaruh EDTA dan ion-ion logam, serta kestabilannya dalam pelarut organik seperti metanol, aseton, dan toluena, serta potensinya sebagai katalis dalam pelarut organik.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain peralatan yang umum di Laboratorium Biokimia, *shaker* inkubator merk Memmert, *water bath* merk Memmert sentrifuge Heraeus, oven merk Memmert, neraca analitik, pH meter, kain muslin, mortar, batang pengaduk, dan spektrofotometer UV-VIS Shimidzu UV-1601. Bahan yang digunakan adalah daun pepaya kalifornia yang muda di perkebunan pepaya belakang Jurusan Perikanan dan Kelautan Universitas Jenderal Soedirman dan di kebun pepaya daerah Madrani Grendeng untuk daun pepaya bangkok. Kasein 1%, TCA 5 % (b/v) (asam trikloro asetat 5%, natrium asetat 9 %, asam asetat 9%), tirosin (0-100 µg/mL), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M, Follin Ciocalteau 20%, buffer Na-Fosfat 0,1 M (pH 6,0-7,0), Buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0-9,0), buffer NaHCO<sub>3</sub>-NaOH 0,1 M (pH 10,0), larutan garam CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, dan CuCl<sub>2</sub>, EDTA, pelarut organik metanol, aseton, dan toluena.

### Prosedur Penelitian

#### Isolasi enzim papain (Darwis dan Sakara (1990) dalam Herdyastuti, 2006)

Daun pepaya kalifornia dan bangkok sebanyak 100 g masing-masing ditumbuk dengan mortar dalam keadaan dingin, kemudian diambil filtratnya dengan cara diperas dengan kain muslin dan ditambahkan 20 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7. Bagian-bagian yang tidak larut yang masih terdapat dalam filtrat dipisahkan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, diperoleh supernatan yang mengandung ekstrak kasar enzim papain.

#### Penentuan aktivitas enzim protease yang dimodifikasi (Najafi *et al.*, 2005)

Aktivitas protease diukur menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi. Sebanyak 0,5 mL substrat kasein 1% (b/v) dalam 50 mM buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 diprainskubasi pada suhu 35 °C selama 5 menit. Reaksi enzim dimulai dengan menambahkan 0,5 mL larutan enzim ke dalam substrat dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 mL larutan TCA 5 % (b/v) (asam trikloro asetat 5%, natrium asetat 9 %, asam asetat 9 %) dalam keadaan dingin kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm, 4 °C selama 15 menit. Peptida terlarut dalam supernatan hasil hidrolisis diambil 1 ml kemudian ditambahkan 2,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan 0,5 mL Follin Ciocalteau 20% dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 30 menit. Larutan kemudian dibaca secara spektrofotometri pada panjang gelombang 660 nm. Larutan kontrol dibuat dengan cara yang sama, tetapi larutan TCA 5 % (b/v) ditambahkan ke enzim setelah prainskubasi 5 menit. Larutan tirosin (0-100 µg/mL) digunakan sebagai standar untuk pengukuran aktivitas proteolitik. Satu unit aktivitas protease (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 µg tirosin/menit/mL larutan enzim dari substrat kasein pada kondisi pengujian tersebut.

Perhitungan: (1) µg tirosin/mL sampel  
(2) µg tirosin/mL kontrol

$$\text{Aktivitas} = \frac{(1) - (2)}{30 \text{ menit} \times \text{mL enzim}} \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan : 30 menit : lama waktu inkubasi

#### Penentuan suhu optimum enzim (Karadzic, *et. al.* (2004)

Penentuan pengaruh suhu terhadap aktivitas protease ditentukan pada varietas suhu yaitu 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 °C dengan larutan substrat

kasein 1% (b/v). Prosedur pengujian aktivitas protease pada berbagai suhu dilakukan dengan prosedur yang sama dengan pengukuran aktivitas protease menurut metode Kunitz yang dimodifikasi.

#### **Penentuan pH optimum enzim (Karadzic, et. al. (2004))**

Penentuan pH optimum ekstrak kasar enzim protease ditentukan pada kisaran pH 6-10, pada suhu optimumnya, dengan larutan substrat kasein dalam variasi buffer yang sesuai. Buffer yang digunakan yaitu buffer Na-Fosfat 0,1 M (pH 6,0), buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0-9,0), buffer NaHCO<sub>3</sub>-NaOH 0,1 M (pH 10,0). Prosedur penentuan aktivitas protease pada variasi pH dilakukan dengan prosedur yang sama dengan penentuan aktivitas protease menurut metode Kunitz yang dimodifikasi.

#### **Penentuan pengaruh EDTA dan ion logam (Kazan, et. al. (2005))**

Pengaruh ion logam dan EDTA terhadap aktivitas protease ditentukan dengan cara menambahkan ion logam ke dalam larutan sampel saat uji aktivitas pada suhu dan pH optimum. Larutan yang digunakan adalah EDTA dan ion logam. Ion logam yang digunakan adalah Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, dan Cu<sup>2+</sup> dalam larutan garam CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, dan CuCl<sub>2</sub>, dan EDTA dengan konsentrasi akhir 10<sup>-3</sup>M dalam campuran reaksi enzimatik, selanjutnya diuji aktivitasnya menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi.

#### **Penentuan stabilitas protease pada berbagai pelarut organik (Ogino, et al., 1995)**

Penentuan pengaruh pelarut terhadap aktivitas ekstrak kasar protease dilakukan dengan variasi pelarut metanol, aseton, dan toluena. Sebanyak 24 ml larutan ekstrak kasar enzim dan 8

ml pelarut organik diinkubasi pada suhu optimumnya menggunakan shaker inkubator dengan skala kecepatan 6, dalam variasi waktu dari jam ke-0 sampai jam ke-12 dengan interval setiap 3 jam. Kontrol negatif dilakukan dengan prosedur yang sama tetapi tanpa penambahan pelarut. Larutan tersebut kemudian diuji aktivitasnya menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi.

#### **Analisis Statistik**

Analisis data untuk setiap perlakuan dilakukan dengan ANOVA untuk membedakan adanya variasi pengulangan tiap perlakuan (n=2) dari masing-masing taraf perlakuan (suhu, pH, dan kestabilan dalam pelarut organik). Jika hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey b dengan tingkat kepercayaan 95%.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Isolasi Enzim Papain**

Sebanyak 100 gram daun pepaya segar ditimbang dan langsung ditumbuk dengan mortar yang sebelumnya telah didinginkan dalam *freezer*. Proses penumbukan ini dilakukan dalam keadaan dingin, dengan tujuan menjaga kestabilan enzim. Enzim merupakan protein yang dapat mengalami kerusakan pada suhu tinggi yang lebih dikenal dengan denaturasi. Denaturasi protein ini dapat mengurangi aktivitas enzim.

Daun pepaya yang telah ditumbuk dengan mortar kemudian diambil filtratnya dengan cara diperas dengan kain muslin. Filtrat yang diperoleh ditambahkan buffer fosfat 0,1 M pH 7 sebanyak 20 mL untuk menjaga kestabilan enzim, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C.

Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar papain.

### Penentuan Suhu Optimum

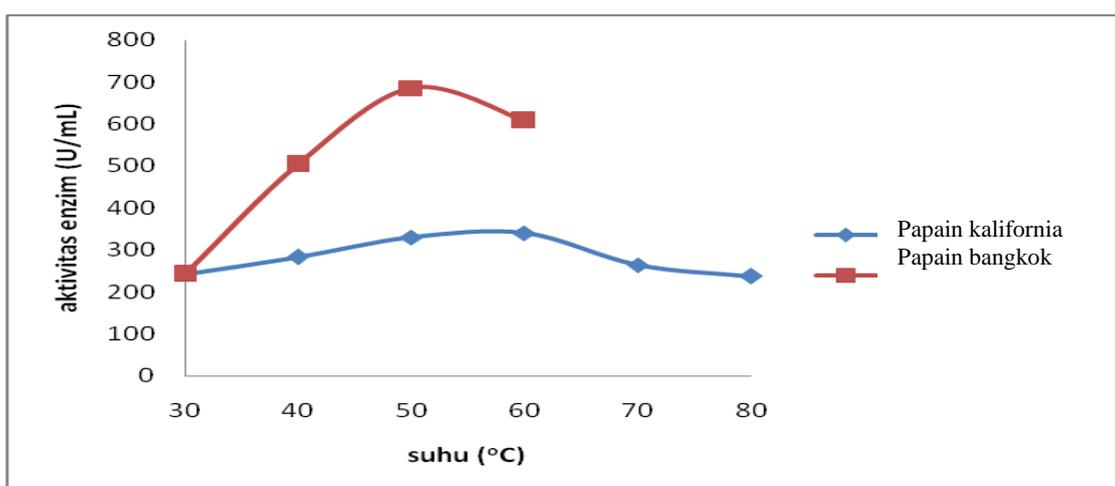
Penentuan suhu optimum dimaksudkan untuk mendapatkan suhu optimum enzim papain dari daun pepaya kalifornia dan bangkok, dimana pada suhu tersebut enzim dapat bekerja dengan aktivitas yang maksimum. Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas papain daun pepaya kalifornia dan bangkok dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Berdasarkan hasil penelitian seperti terlihat pada Gambar 1 dan didukung dengan analisis ANOVA (*Analysis of Variance*) diperoleh suhu optimum papain dari daun pepaya kalifornia 60 °C dengan aktivitas sebesar 340,359 U/mL dan 50 °C untuk daun pepaya bangkok dengan aktivitas sebesar 685,319 U/mL. Analisis ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas enzim pada suhu 60 °C untuk daun pepaya kalifornia dan 50 °C untuk daun pepaya bangkok berbeda nyata ( $\alpha=0,05$ ) terhadap aktivitas enzim pada suhu pengujian lain. Hal ini membuktikan bahwa enzim yang diisolasi dari sumber

yang berbeda dapat memiliki aktivitas yang berbeda pula.

Aktivitas enzim meningkat sebanding dengan kenaikan suhu hingga mencapai suhu optimumnya. Hal ini dikarenakan energi kinetik molekul-molekul enzim mengalami peningkatan sebelum mencapai optimum.

Peningkatan energi kinetik ini juga meningkatkan gerakan vibrasi, translasi, rotasi enzim dan substrat yang selanjutnya akan mengakibatkan peluang keduanya untuk bertumbukan dan berikatan semakin besar sehingga produk yang dihasilkan semakin meningkat (Suhartono, 1989). Poedjadi dan Supriyanti (1994) menyatakan bahwa kenaikan suhu melebihi suhu optimum enzim akan menyebabkan enzim mengalami kerusakan yang lebih dikenal dengan denaturasi. Denaturasi menyebabkan sisi aktif enzim terganggu dan konsentrasi efektif enzim yang bertumbukan dengan substrat juga berkurang. Hal ini menyebabkan penurunan kecepatan reaksi dan aktivitas enzim.



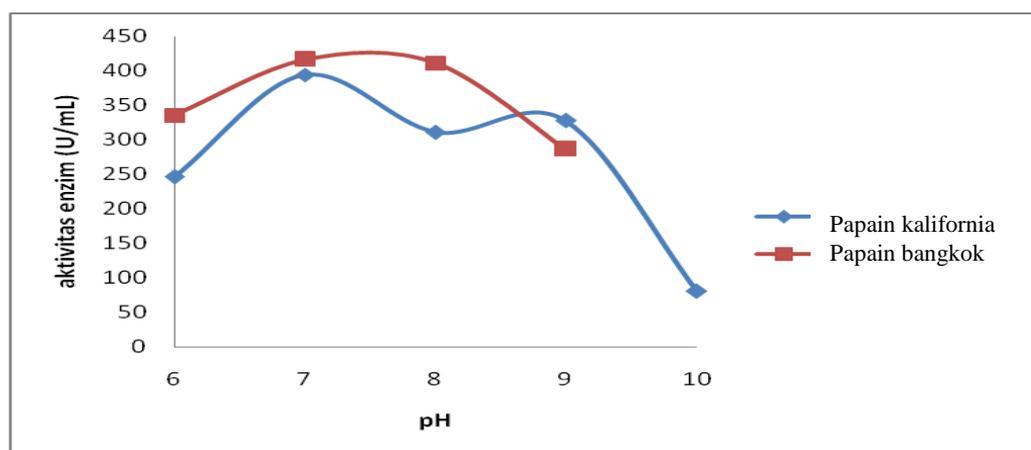
**Gambar 1.** Pengaruh suhu terhadap aktivitas papain dari daun pepaya kalifornia

### Penentuan pH Optimum

Enzim merupakan protein yang tersusun dari asam amino yang dapat terionisasi. Perubahan pH menyebabkan perubahan ionisasi rantai samping asam amino pada sisi aktif. Gugus rantai samping asam amino berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan mengubah substrat menjadi produk. Sisi aktif enzim akan berada pada kondisi paling baik pada pH optimumnya. Setiap enzim memiliki pH optimum yang khas yang akan memberikan aktivitas tertinggi dalam mempercepat reaksi biokimia yang spesifik. Penentuan pH optimum papain daun kalifornia dan bangkok dilakukan dengan menginkubasi papain pada suhu optimumnya menggunakan variasi pH substrat kasein 6, 7, 8, 9, dan 10. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas papain dari daun pepaya kalifornia dan bangkok dapat dilihat pada **Gambar 2**.

Ekstrak kasar papain yang diisolasi dari daun pepaya kalifornia berdasarkan Gambar 2 dan hasil analisis

ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas papain optimum pada pH 7 dengan nilai aktivitas 394,061 U/mL, serta menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan aktivitas papain pada pH 6, 8, 9, dan 10. Aktivitas papain kembali mengalami peningkatan pada pH 9, tetapi berdasarkan analisis ANOVA, nilai aktivitas pada pH 8 dan 9 tidak berbeda nyata. Keadaan ini menunjukkan bahwa papain yang diisolasi daun pepaya kalifornia termasuk isoenzim. Isoenzim merupakan kelompok enzim yang terdiri atas molekul-molekul aktif yang memiliki struktur kimia yang berbeda tetapi mengkatalisis reaksi yang sama (Farooq, *et al.*, (1999) dalam Sulistiyowati, dkk., 2009), sehingga setelah mencapai keadaan optimumnya, aktivitas papain tersebut mengalami peningkatan kembali pada pH 9 dan akhirnya turun pada pH 10 akibat terdenaturasi. Enzim protease (bromelin) dari daun nanas muda hasil penelitian Hadiati dan Sukmadjaja (2004) juga menunjukkan karakteristik isoenzim.



**Gambar 2.** Pengaruh pH terhadap aktivitas papain dari daun pepaya kalifornia dan Bangkok

Berdasarkan hasil penelitian seperti yang terlihat pada Gambar 2 dan hasil analisis ANOVA, menunjukkan bahwa aktivitas optimum papain daun pepaya bangkok berada pada kisaran pH 7-8 dengan nilai aktivitas 415,935 U/mL untuk pH 7 dan 411,541 U/mL untuk pH 8. Aktivitas papain pada pH 7 tidak berbeda nyata dengan aktivitas papain pada pH 8, sedangkan aktivitas papain pada pH 7 dan 8 berbeda nyata dengan aktivitas papain pada pH 6 dan 9. Gugus penerima dan pemberi proton yang penting pada sisi katalitik enzim pada pH optimum mempunyai struktur tiga dimensi yang paling sesuai dengan substrat sehingga dapat mengikat substrat dengan tepat, membentuk kompleks enzim-substrat dan menghasilkan produk secara maksimum (Nurhasanah dan Herasari, 2008).

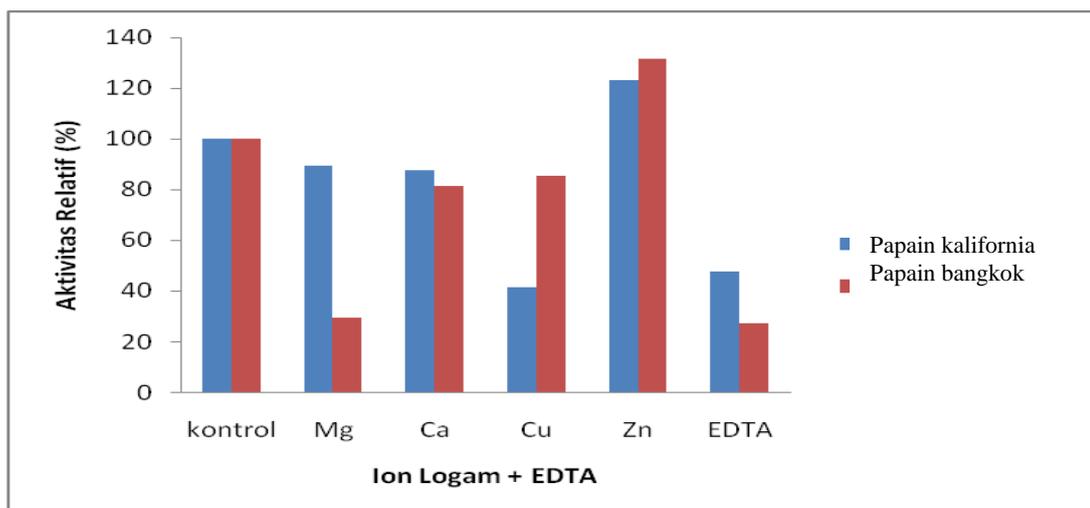
#### **Pengaruh Ion Logam dan EDTA**

Penentuan pengaruh ion logam dan EDTA dilakukan untuk mengetahui pengaruh ion logam dan EDTA terhadap enzim papain yang diisolasi dari daun pepaya kalifornia dan bangkok yang bertindak sebagai kofaktor atau inhibitor bagi aktivitas enzim. Widowati, dkk. (2001) menyatakan bahwa ion logam berperan dalam aktivitas katalitik dan stabilitas konformasi enzim. Ion-ion logam dapat mengaktifkan enzim oleh beberapa perubahan mekanis antara lain adanya bentuk ikatan kovalen koordinasi antara enzim dan ion logam sehingga substrat mampu berikatan dengan sisi aktif enzim secara spesifik, perubahan muatan permukaan pada protein enzim, mengganti ion-ion logam yang tidak efektif dari sisi aktif atau substrat, dan mengganti keseimbangan konformasi dari yang kurang aktif menjadi lebih aktif. Ion-ion logam yang digunakan pada penelitian ini adalah  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Cu}^{2+}$  dalam larutan garam  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , dan  $\text{CuCl}_2$  dengan

konsentrasi akhir  $10^{-3}\text{M}$  dalam campuran reaksi enzimatis.

Pengujian pengaruh ion logam ini dilakukan pada kondisi suhu dan pH optimum masing-masing enzim papain. Kurva pengaruh penambahan ion logam dan EDTA terhadap aktivitas enzim papain daun pepaya kalifornia dan bangkok dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan **Gambar 3**, penambahan EDTA menyebabkan penurunan aktivitas papain, baik pada daun pepaya kalifornia maupun bangkok, dengan nilai aktivitas relatif sebesar 47,706% untuk daun pepaya kalifornia dan 26,889% untuk daun pepaya bangkok. Adanya penurunan aktivitas ini menunjukkan bahwa papain yang diisolasi dari daun pepaya kalifornia dan bangkok tergolong metaloenzim. Aktivitas metaloenzim menurun dengan penambahan EDTA karena ion logam yang terdapat pada sisi katalitik enzim berikatan dengan EDTA sehingga mengubah struktur enzim dan enzim kehilangan sisi katalitiknya. Keberadaan EDTA menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks khelat antara EDTA dengan ion logam sehingga konformasi sisi katalitik enzim akan berubah. Perubahan ini dapat menurunkan aktivitas enzim terhadap substrat dan reaksi katalitik menjadi lambat (Kamelia, dkk., 2005).

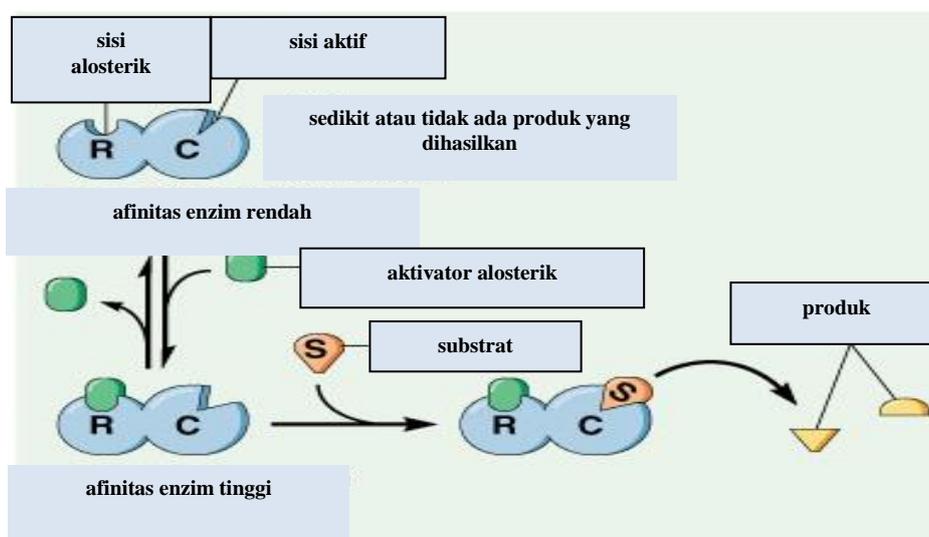
Hasil pengujian menunjukkan bahwa ion  $\text{Zn}^{2+}$  dapat meningkatkan aktivitas enzim papain, dengan nilai aktivitas relatif sebesar 123,200% untuk daun pepaya kalifornia dan 131,673% untuk daun pepaya bangkok, sedangkan ion  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Cu}^{2+}$  mampu menurunkan aktivitas enzim papain baik yang diisolasi dari daun pepaya kalifornia maupun bangkok. Hal ini menunjukkan bahwa ion  $\text{Zn}^{2+}$  bertindak sebagai kofaktor sedangkan ion  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Cu}^{2+}$  bertindak sebagai inhibitor bagi enzim papain dari daun pepaya kalifornia dan bangkok.



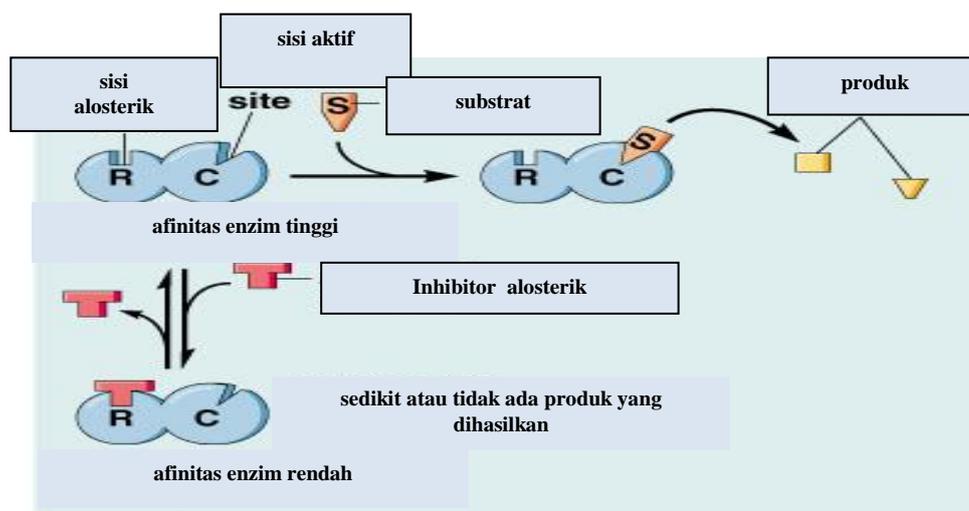
**Gambar 3.** Kurva pengaruh penambahan ion logam dan EDTA terhadap aktivitas papain dari daun pepaya kalifornia dan Bangkok

Kamelia, dkk. (2005) menyatakan bahwa peran  $Zn^{2+}$  dalam mengaktifasi reaksi hidrolisis protein didasarkan pada kemampuannya dalam membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan residu asam amino dari protease dan bersifat sebagai akseptor elektron sehingga mampu berinteraksi dengan basa yaitu gugus  $OH^-$  dari molekul air. Ion  $Zn^{2+}$  diduga akan mempolarisasi gugus karbonil substrat kasein dan memfasilitasi deprotonisasi molekul air sehingga mempermudah reaksi hidrolisis

substrat kasein. Kekuatan ikatan antara ion logam dengan enzim berbeda-beda. Logam bertindak sebagai aktivator jika ikatannya dengan enzim lemah, sehingga reaksinya bersifat *reversible* dan akan menghasilkan produk yang melimpah, begitu pula sebaliknya. Ikatan antara logam dengan enzim juga membuat konformasi enzim menjadi sangat tepat untuk berikatan dengan substrat sehingga aktivitas enzim sangat tinggi, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Ikatan antara enzim dengan logam sebagai aktivator (Anonim, 2003)



**Gambar 5.** Ikatan antara enzim dengan logam sebagai inhibitor (Anonim, 2003)

Senyawa inhibitor merupakan senyawa yang dapat mengubah kemampuan enzim dalam mengikat substrat sehingga menyebabkan perubahan daya katalisator enzim (Gambar 5). Perubahan ini disebabkan oleh ion logam  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Cu}^{2+}$  berikatan dengan sisi aktif enzim atau ion-ion tersebut menggantikan logam yang berada pada sisi aktif sehingga struktur enzim berubah sedemikian rupa. Perubahan ini mengakibatkan konformasi enzim menjadi tidak efektif dalam mengikat substrat dan akhirnya membuat aktivitas katalitiknya menurun. Ion  $\text{Mg}^{2+}$  dalam papain bangkok dan ion  $\text{Cu}^{2+}$  dalam papain kalifornia memiliki aktivitas yang sangat rendah diduga karena ikatan enzim dengan ion-ion tersebut mengakibatkan konformasi sisi aktif enzim menjadi sangat tidak sesuai untuk berikatan dengan substrat.

### Pengaruh Pelarut Organik

Penentuan pengaruh organik dilakukan dengan menginkubasi enzim dan pelarut organik dengan perbandingan 3:1 pada suhu dan pH optimumnya menggunakan *shaker* inkubator dengan kecepatan skala 6 selama 12 jam dan diuji aktivitasnya setiap 3 jam. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 6 untuk

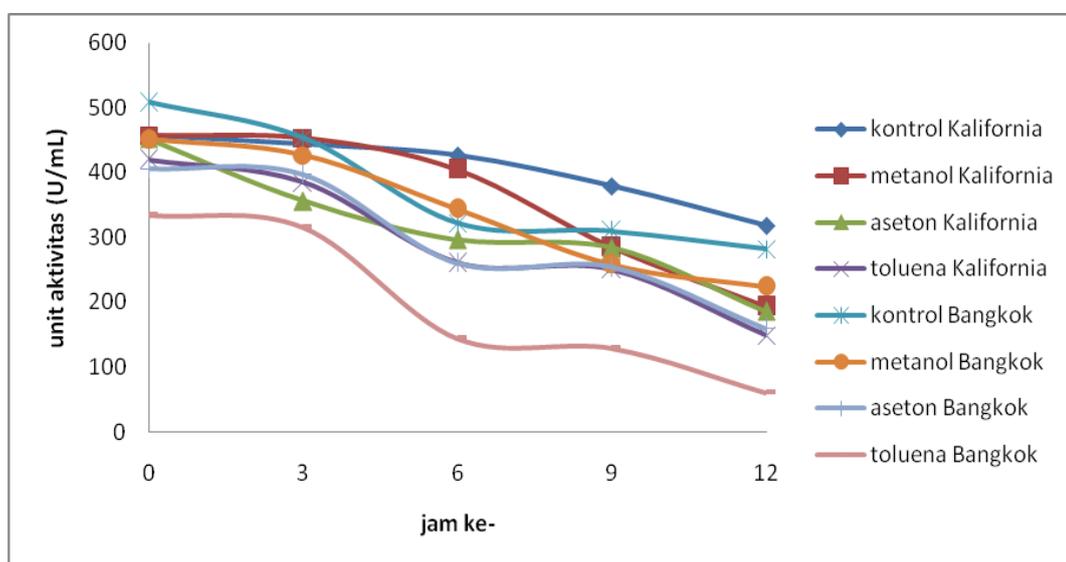
papain daun pepaya kalifornia dan bangkok.

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada **Gambar 6** dan analisis ANOVA, memperlihatkan bahwa aktivitas papain daun pepaya kalifornia tanpa penambahan pelarut organik (kontrol) menunjukkan kestabilan yang cukup baik dan baru mengalami penurunan yang signifikan pada jam ke-9. Aktivitas papain daun pepaya kalifornia dengan penambahan pelarut metanol relatif stabil hingga jam ke-6, sedangkan penambahan pelarut aseton dan toluena mengakibatkan aktivitas papain telah mengalami penurunan pada jam ke-3. Hasil tersebut berbeda dengan papain yang diisolasi dari daun pepaya bangkok. Aktivitas papain daun pepaya bangkok relatif tidak stabil dan telah mengalami penurunan setelah jam ke-3 untuk ketiga pelarut organik yang diujikan (metanol, aseton, toluena). Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang

diisolasi dari sumber yang berbeda dapat memiliki aktivitas yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat kepolaran dari pelarut organik mempengaruhi aktivitas enzim, dimana aktivitas enzim lebih besar pada pelarut yang bersifat polar (metanol) dibandingkan dengan pelarut yang semipolar (aseton) maupun non polar

(toluena). Pelarut organik yang bersifat polar dapat mensolvasi molekul-molekul air yang awalnya menyelubungi molekul papain. Hal ini karena molekul-molekul air dapat berikatan dengan molekul pelarut polar. Menurunnya aktivitas enzim dengan penambahan pelarut organik dapat disebabkan karena molekul pelarut organik mampu berikatan dengan sisi aktif enzim dan mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya dalam mengikat substrat untuk pembentukan produk. Tegangan

permukaan pelarut organik juga merusak struktur tersier enzim pada sistem dua fasa. Molekul air yang terdapat dalam molekul protein diserap oleh pelarut organik sehingga mengakibatkan polaritas medium yang mengelilingi molekul enzim menurun. Hal ini mengakibatkan bagian hidrofobik enzim mudah terurai sehingga menghasilkan suatu molekul yang tidak melipat dan terdenaturasi (Ogino dan Ishikawa, 2001).



**Gambar 6.** Kurva pengaruh pelarut organik terhadap aktivitas papain daun pepaya kalifornia dan Bangkok

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan :

1. Ekstrak kasar papain yang diisolasi dari daun pepaya kalifornia optimum pada suhu 60 °C dan pH 7, sedangkan papain daun pepaya bangkok optimum pada suhu 50 °C dan pada kisaran pH 7-8. Ion  $Zn^{2+}$  dapat meningkatkan aktivitas enzim papain daun pepaya kalifornia dan bangkok dan menurun dengan adanya ion  $Ca^{2+}$ , ion  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  serta EDTA. Aktivitas papain daun pepaya

kalifornia relatif stabil hingga jam ke-6 dengan penambahan pelarut metanol dan menurun setelah jam ke-3 dengan penambahan pelarut aseton dan toluena, sedangkan papain daun pepaya bangkok dengan penambahan pelarut metanol, aseton, ataupun toluena aktivitasnya hanya dapat stabil hingga jam ke-3.

2. Aktivitas papain dari daun pepaya kalifornia relatif stabil dengan penambahan pelarut metanol sehingga berpotensi digunakan sebagai biokatalis dalam pelarut metanol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2003, *Control of Metabolism*, Benjamin Cummings Publishing, Pearson Education, Inc., <http://lhs.lexingtonma.org/teacher/s/pohlman/06C-ControlOfMetabolism.pdf> (diakses 3 Agustus 2011).
- Dongoran, D. S., 2004, Pengaruh Aktivator Sistein dan Natrium Klorida terhadap Aktivitas Papain, *Jurnal Sains Kimia* Vol.8, No.1, 2004: 26-28.
- Hadiati, S. dan D. Sukmadjaja, 2004, Keragaman Pola Pita Beberapa Aksesori Nenas Berdasarkan Analisis Isozim, *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, Vol. 7, No.2 (62-70).
- Herdyastuti, N., 2006, Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin dari Batang Nanas (*Ananas comusus L.merr*), *Berk. Penel. Hayati* : 12 (75-77).
- Kamelia, R., M. Sindumarta, dan D. Natalia, 2005, *Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraselular Termotabil dari Bakteri stearothermophilus RPI*, Departemen Kimia ITB, Bandung.
- Karadzic, I., A. Masui. N. Fujiwara. 2004. Purification and Characterization of A Protease From *Pseudomonas aeruginosa* Grown In Cutiing Oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98 ( 3): 145-152.
- Kazan, D., A. K. Denizci, N. Mine, Ö. Kerimak, A. Erarslan. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J .Ind Microbiol Biotechnol*. 32(8): 335–344
- Najafi, M. F., D. Deobagkar, D. Deobagkar, 2005, Potential Application of Protease Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100, *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458, Vol.8, No.2.
- Nurhasanah dan D. Herasari, 2008, Pemurnian Enzim Lipase dari Bakteri Lokal dan Aplikasinya dalam Reaksi Esterifikasi, *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II* (17-18).
- Ogino, H., T. Uchiho, J. Yokoo, R. Kobayashi, R. Ichise, and H. Ishikawa, 2001, Role of Intermolecular Disulfide Bonds of the Organic Solvent-Stable PST-01 Protease in Its Organic Solvent Stability, *Applied and Environmetal Microbiology* Vol. 67, No.2 (942-947).
- Ogino, H. dan H. Ishikawa, 2001, Review Enzymes Which Are Stable in The Presence of Organic Solvents, *Journal of Bioengineering* Vol. 91, No.2 (109-116).
- Ogino, H., K. Yasui, T.Shiotani, T. Ishihara, dan H. Ishikawa, 1995, Organic Solvent-Tolerant Bacterium Which Secretes an Organic Solvent-Stable Proteolytic Enzyme, *Applied and Environmetal Microbiology*, Vol. 61, No. 12 (4258-4262).
- Poedjiadi, A. dan F. M. Supriyanti, 1994, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI, Jakarta.
- Sadikin, M., 2002, *Biokimia Enzim*, Widya Medika, Jakarta.
- Sasithorn, N. dan K. Luepong, 2008, Silk Degumming with Dried Latex of *Carica Papaya* Linn, *RMUTP Research Journal*, Vol. 2, No. 1.

Suhartono, M. T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, PAU Bioteknologi, Bogor.

Sulistiyowati, E., Sulistiyowati, S. Rustini, S. Sumartini, Abdurrakhman, 2009, Variasi Genetik Beberapa Spesies Kapas (*Gossypium sp.*) berdasarkan Keragaman Pola Pita Isozim, *Jurnal Littri* Vol 15 No. 4, (174 – 183).

Warsino, 2003, *Budidaya Pepaya*, Kanisius, Yogyakarta.

Widowati, S., L. Sukarno dan P. Raharto, 2001, *Studi Pengaruh Penambahan Mineral terhadap Aktivitas Protease dari Bacillus circulans 9b3*, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor.