

## Pemurnian Parsial dan Kritisasi Papain dari Getah *Carica papaya*

Dwi Putri Mashfufatur Rohmah, Sofijan Hadi, Afaf Baktir\*

Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Airlangga

\*email: afaf-b@fst.unair.ac.id

Received 29 November 2019

Accepted 31 December 2019

### Abstract

This research has done partial purification by fractionation and optimization crystallization of papain from *Carica papaya* latex with the addition of ammonium sulphate. The enhancement of purification factor was determined by its specific activity. The fractionation results show that papain fraction of *Carica papaya* can be obtained by adding 40-80% saturated ammonium sulphate, with the highest specific activity, i.e. 2,0819 U/ $\mu$ g and the factor purification increase of 6,27 fold than papain extract. Meanwhile, the highest total activity, i.e. 10,7780 U of papain crystals can be obtained by presipitant agent addition of ammonium sulphate in the level / concentration 80% saturated at 15 °C. Microscopically papain crystals profile in this condition have cube and tetragonal shape.

**Keywords:** *Crystallization, fractionation, ammonium sulphate, papain*

### Pendahuluan

Dewasa ini, enzim memiliki peran besar dalam pengaplikasiannya di bidang agrikultural maupun bidang industri. Enzim digunakan sebagai alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimia dalam bidang industri. Hal ini dikarenakan sifatnya yang efisien, selektif, *predictable*, dan ramah lingkungan. Bahkan dalam beberapa aplikasinya, enzim dinyatakan lebih ekonomis dibandingkan katalis kimia karena dapat digunakan secara berulang selama aktivitasnya masih ada (Sutandi, 2003; Zufahair dkk., 2014). Salah satu enzim yang mendominasi pasar dunia sebesar 60% adalah protease. Enzim ini biasanya ditemukan dalam buah-buahan tropis maupun subtropis, seperti papaya, kiwi, dan nanas (Malek dkk., 2016; Zufahair dkk., 2014).

Indonesia merupakan salah satu negara beriklim tropis dengan sebaran pertumbuhan papaya hampir di seluruh wilayah. Produksi papaya di Indonesia mencapai 840,112 ton menurut pantauan terakhir oleh Kementerian Pertanian

Indonesia pada tahun 2014. Hal tersebut menunjukkan adanya potensi yang besar untuk produksi enzim protease di Indonesia dengan sumber daya yang mendukung.

Protease dibedakan sesuai jenis gugus fungsi pada sisi aktifnya, salah satunya yaitu gugus tiol-sistein. Protease dengan jenis gugus fungsi tersebut termasuk protease sistein. Protease sistein ini juga dikenal sebagai protease tiol yang memiliki peran utama (primer) dalam degradasi dan pemecahan protein. pepaya (Latin: *Carica papaya*) telah diketahui menjadi sumber utama protease sistein dari penelitian yang dilakukan oleh Malek dkk. (2016).

Getah pada daging buah papaya muda, daun, dan kulitnya kaya akan enzim yang dikenal sebagai papain. Getah *Carica papaya* terdiri dari campuran endopeptidase sistein seperti papain, endopeptidase III papaya, endopeptidase IV papaya, caricain, kemopapain A dan B, serta proteinase IV papaya yang menyusun lebih dari 80% fraksi enzim yang

dipertimbangkan menjadi bahan komersil dengan nilai tertinggi, mengingat kegunaannya dalam berbagai aplikasi di industri. Di antara enzim tersebut, papain menjadi sumber utama data empiris dari super-famili protease sistein dengan karakterisasi paling luas terkait data kinetiknya dan struktur enzimnya (Malek dkk., 2016).

Papain merupakan protein globular dengan rantai tunggal dan 3 jembatan disulfida serta gugus sulfhidril pada sisi aktifnya (Patel, 2016). Papain memiliki berat molekul 23.406 Da dan terdiri dari 212 asam amino (Gunde dan Amnerkar, 2016). Sifat yang sangat menarik dari papain adalah kestabilannya ketika terpapar suhu yang tinggi, pelarut organik, dan reagen-reagen yang dapat menyebabkan denaturasi pada enzim lain (Llerena-Suster dkk., 2012).

Pemurnian papain telah berhasil dicapai secara konvensional dengan metode presipitasi. Presipitasi dapat dilakukan dengan *salting out* menggunakan garam ammonium sulfat. *Salting out* merupakan penggaraman protein sehingga terjadi agregasi karena efek hidrofobik yang kuat dan terstabilkan. Molekul air disekitar residu hidrofobik protein akan dipindahkan ke permukaan, sehingga residu-residu hidrofobik dapat berinteraksi satu sama lain membentuk agregat (Scopes, 2013).

Enzim dalam bentuk kristal memiliki ketahanan yang jauh lebih baik terhadap pengaruh lingkungan (suhu, pH, pengaruh oksidasi, dan lain-lain) sehingga perlakuan dan penyimpanannya akan lebih mudah serta bertahan lebih lama. Kristalisasi setiap molekul maupun campuran senyawa kimia, termasuk protein terdiri dari dua tahap yang berbeda namun tidak dapat dipisahkan, yaitu nukleasi dan pertumbuhan. Nukleasi merupakan proses pembentukan inti kristal dimana keadaan molekul yang semula tidak teratur menjadi tertata. Adapun, pertumbuhan kristal terjadi setelah nukleasi dengan pembentukan agregat-

agregat tertata menjadi molekul yang lebih besar (McPherson dan Gavira, 2014).

Nukleasi dan pertumbuhan kristal sangat tergantung dengan keadaan supersaturasi larutan induk (*mother liquor*) pembentuk kristal. Supersaturasi merupakan keadaan tidak seimbang dimana beberapa jumlah molekul/ protein melebihi batas kelarutan, namun masih dalam fasa cair. Keseimbangan dapat dicapai kembali dengan pembentukan dan pertumbuhan fasa solid (padat) sebagai kristal, karena batas kejenuhan tercapai (McPherson dan Gavira, 2014).

Metode pemurnian dan kristalisasi protein pada umumnya dilakukan secara bertahap (tidak sinambung). Adapun kristal yang dihasilkan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi serta didapatkan dalam jumlah sangat kecil. Sedangkan, enzim yang dibutuhkan industri adalah kristal dalam jumlah besar dengan tingkat kemurnian parsial.

Suatu metode kristalisasi dikembangkan untuk meningkatkan kemurnian dan kestabilan suatu enzim. *Crystallizer* Sinambung didesain khusus untuk kristalisasi dan pemurnian parsial protein enzim dan protein lain secara sinambung dengan sistem filtrasi. Proses kristalisasi sinambung menggunakan *Crystallizer* Sinambung ini dapat diaplikasikan untuk pemurnian parsial dan kristalisasi sediaan enzim atau protein lain, dengan penambahan ammonium sulfat atau agen presipitan lain yang sesuai dalam kadar hasil percobaan optimasi (Paten, *unpublished*).

## Metode Penelitian

### Alat dan bahan

Getah *Carica papaya* dari buah papaya muda (berumur 2,5–3 bulan) yang tumbuh di wilayah Mulyorejo, Surabaya, yang dilarutkan dalam akuades dingin dengan rasio 1:1 dan diaduk selama 1 jam. Larutan getah ini disentrifuga selama 20 menit dengan kecepatan 9.000 rpm dan

suhu 4°C sehingga didapat supernatan yang merupakan ekstrak papain (Malle dkk., 2015; Malek dkk., 2016).

#### *Fraksinasi ammonium sulfat*

Ekstrak papain ditambahkan ammonium sulfat secara bertahap sesuai dengan tingkat kejenuhan dan diikuti dengan inkubasi dalam es selama minimal 2 jam, kemudian disentrifuga dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit. Presipitat yang didapat dari setiap sentrifugasi tersebut dilarutkan kembali dalam buffer yang mengandung 0,2 M fosfat, pH 6 hingga tepat larut. Langkah-langkah tersebut dilakukan untuk ammonium sulfat dengan kejenuhan 40% dan 40- 80%. Adapun presipitat yang telah dilarutkan tersebut didialisis dengan buffer fosfat 0,05 M pH 6 sehingga dapat dilakukan uji selanjutnya (Purwanto, 2016).

#### *Penentuan kadar protein*

Kadar protein dalam sampel selama pemurnian ditentukan menggunakan metode Bradford dengan kurva standar larutan BSA 1 mg/mL (Purwanto, 2016). Sampel enzim sebanyak 20 µL ditambahkan akuades hingga 600 µL dan larutan Bradford 500µL, lalu didiamkan selama 5 menit, pada suhu ruang. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 595 nm (Rosenberg, 2005).

#### *Penentuan aktivitas protease*

Penentuan aktivitas protease dilakukan menggunakan kurva standar dari larutan induk tirosin 100 µg/ mL dalam HCl 0,2 N. Suatu campuran reaksi uji terdiri dari substrat kasein 1% sebanyak 400 µL dan ekstrak enzim sebanyak 20 µL, lalu ditambahkan buffer fosfat 0,05 M pH 6 hingga volume 900 µL. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 mL TCA 5%. Campuran

disentrifuga dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm. Pengukuran ini juga dilakukan terhadap blanko tanpa adanya ekstrak enzim. Aktivitas protease diukur berdasarkan kadar tirosin yang terbaca (Purwanto, 2016).

$$\text{Aktivitas protease (U/mL)} = \frac{\text{konsentrasi tirosin} \times V \text{larutan uji}}{Mr \text{ tirosin} \times \text{waktu inkubasi} \times V \text{enzim}}$$

#### *Optimasi kristalisasi fraksi papain*

Fraksi dengan aktivitas spesifik terbaik, dikristalisasi dengan penambahan ammonium sulfat. Kadar ammonium sulfat untuk kristalisasi dioptimasi berdasarkan data kadar ammonium sulfat pada saat fraksinasi papain, yaitu dengan tingkat kejenuhan 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 70%, dan 80%. Kristalisasi ini dilakukan dengan inkubasi pada suhu 5, 15, 25, dan 30 °C hingga terbentuk kristal papain secara perlahan. Kristal papain yang terbentuk dipisahkan dengan supernatannya, kemudian diamati secara makroskopis dan mikroskopis serta diuji aktivitas proteasenya.

#### *SDS-PAGE*

SDS-PAGE pada penelitian ini bertujuan untuk membandingkan papain sebelum dan sesudah dimurnikan secara parsial melalui pita papain pada gel. Pita papain ditentukan berat molekulnya berdasarkan pembanding marker. SDS-PAGE dilakukan menggunakan akrilamida 12% (Purwanto, 2016). Sampel disiapkan dalam *loading buffer* tris/ gliserol/ β-merkaptotanol, kemudian diletakkan dalam air mendidih selama 10 menit dan dielektroforesis dengan 100 V selama 60 menit. Pewarnaan gel menggunakan *Coomasie-Blue R-250*.

#### **Hasil dan Pembahasan**

### *Preparasi ekstrak papain dari getah*

#### *Carica papaya*

Getah *Carica papaya* diperoleh dari penyayatan kulit buah papaya muda yang berumur 2,5-3 bulan. Menurut penelitian Malek dkk. (2016), semakin hijau (muda) buah papaya, akan diperoleh papain yang semakin banyak karena jumlah pati dan gula pada buah masih rendah pada 11 minggu (2,5-3bulan) pertama. Penyayatan dilakukan pada pagi hari untuk menghindari reaksi fotosintesis dan polusi udara yang mungkin terjadi. Empat buah pepaya muda dari pohon yang sama menghasilkan getah sebanyak 25,6916 g. Getah dikumpulkan dalam sebuah wadah plastik bertutup dan disimpan dalam *freezer* sampai digunakan untuk menghindari reaksi yang dapat menurunkan aktivitas enzim.

Papain merupakan protein globular sehingga dapat dilarutkan dalam air dengan mudah. Digunakan akuades dingin sebagai pelarut untuk menjaga kualitas papain selama proses ekstraksi. Larutan getah ini disentrifuga selama 20 menit dengan kecepatan 9.000 rpm dengan suhu 4 °C. Presipitat merupakan komponen yang tidak digunakan, sedangkan supernatan merupakan ekstrak papain. Diperoleh ekstrak papain sebanyak 31 mL.

#### *Fraksinasi papain dari getah Carica papaya*

Fraksinasi bertujuan memisahkan sebagian besar senyawa pengotor, baik protein maupun bukan protein dari protein target. Fraksi papain diperoleh dari ekstrak papain sebanyak 31 mL dengan penambahan ammonium sulfat secara bertahap dengan tingkat kejenuhan 40% dan 40-80%.

Berdasarkan hasil uji aktivitas spesifik protease sebagaimana pada Tabel 3.1, dapat disimpulkan bahwa aktivitas

spesifik paling tinggi terdapat pada fraksi papain 40-80% dengan faktor kemurnian meningkat 6,86 kali dari ekstrak papain.

Fraksi 0-40% menunjukkan aktivitas protease yang jauh lebih rendah dibanding fraksi 40-80%. Namun aktivitas spesifik fraksi 0-40% sangat rendah. Hal ini menunjukkan pada fraksi 0-40% mengandung banyak protein pengotor. Adapun aktivitas spesifik pada supernatan hampir mendekati nol. Sehingga, dapat ditarik kesimpulan bahwa papain terdapat pada fraksi 40-80%.

#### *Optimasi Kristalisasi Fraksi Papain*

Pengamatan secara makroskopis dilakukan melalui pengamatan pembentukan presipitat pada masing-masing tabung. Data hasil pengamatan disajikan pada Tabel 3.2.

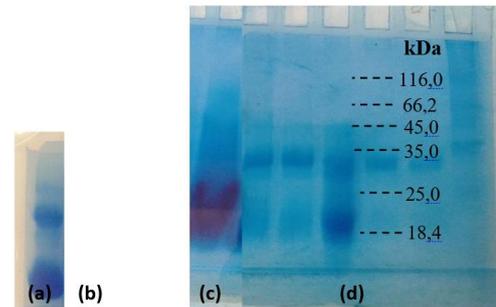
Pengamatan secara mikroskopis pada keseluruhan tabung yang memiliki presipitat menunjukkan kristal kubus dan tetragonal. Selain dilakukan terhadap sampel, pengamatan ini dilakukan terhadap blanko yang mengandung ammonium sulfat sebagai perbandingan bentuk kristal. Adapun kristal ammonium sulfat pada kondisi kristalisasi ini cenderung berbentuk bulat (Gambar 3.1).

Aktivitas protease masing-masing kristal yang diperoleh dengan menggunakan presipitan ammonium sulfat 55-70% cukup rendah, dan aktivitas protease yang tertinggal di supernatan cukup tinggi. Hal ini berhubungan dengan ketidaksempurnaan kristalisasi yang menggunakan presipitan ammonium sulfat 55-70%. Adapun presipitan ammonium sulfat 80% pada suhu 15 °C menghasilkan kristal dengan aktivitas protease paling tinggi. Presipitan ammonium sulfat 80% pada suhu 30 °C menghasilkan kristal maupun supernatan dengan aktivitas protease lebih rendah, diduga berkaitan dengan kestabilan enzim terhadap suhu (Tabel 3.3).

### SDS-PAGE

Sampel yang diuji menggunakan SDS-PAGE meliputi ekstrak papain, fraksi papain (fraksi 40-80%) dengan berbagai pengenceran dan volume, serta kristal papain yang dihasilkan dari presipitan ammonium sulfat 80% pada suhu 15 °C. Adapun gel yang digunakan dalam SDS-PAGE ini adalah 12% akrilamida, yang dapat memisahkan protein dengan berat molekul ~15 kDa hingga ~120 kDa.

SDS-PAGE pada percobaan ini menunjukkan adanya pemurnian ekstrak papain secara parsial melalui berkurangnya pita-pita yang tampak pada gel dari Gambar 3.2 (b) menjadi Gambar 3.2 (c). Adapun pita pada kristal papain (Gambar 3.2 (a)) tampak tebal dibandingkan dengan pita fraksi papain (fraksi 40-80%). Hal ini dikarenakan kristal papain yang lebih pekat serta volume yang dimasukkan ke dalam sumur gel lebih banyak dari pada fraksi papain (fraksi 40-80%).



Gambar 3.2 (a) Kristal Papain (b) Ekstrak Papain (c) Fraksi Papain dengan berbagai Pengenceran dan Volume (d) Marker Protein

Pita papain ditentukan berat molekulnya berdasarkan perbandingan marker dan perhitungan  $R_f$  melalui kurva standart.  $R_f$  merupakan perbandingan jarak migrasi pita dengan jarak migrasi *loading buffer*. Berdasarkan penentuan berat molekulnya, diketahui bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini memiliki kandungan papain dengan berat molekul ~23 kDa.

Tabel 3.1 Data Hasil Fraksinasi Papain dari Getah *Carica papaya*

Sampel	Aktivitas Protease (U/mL)	Volume (mL)	Aktivitas Total (U)	Kadar Protein Total ( $\mu$ g)	Aktivitas Spesifik (U/ $\mu$ g)	Faktor Ke-murnian
Ekstrak papain	237,1351	31	7.351,1881	22.151,9321	0,3318	1,00
Fraksi 0-40%	2,7123	1,2	3,2547	5,9375	0,5482	1,65
Fraksi 40-80%	382,7962	31,9	12.246,4175	5.882,3690	2,0819	6,27
Supernatan	0,0584	113,1	6,5983	139,0788	0,0475	0,14

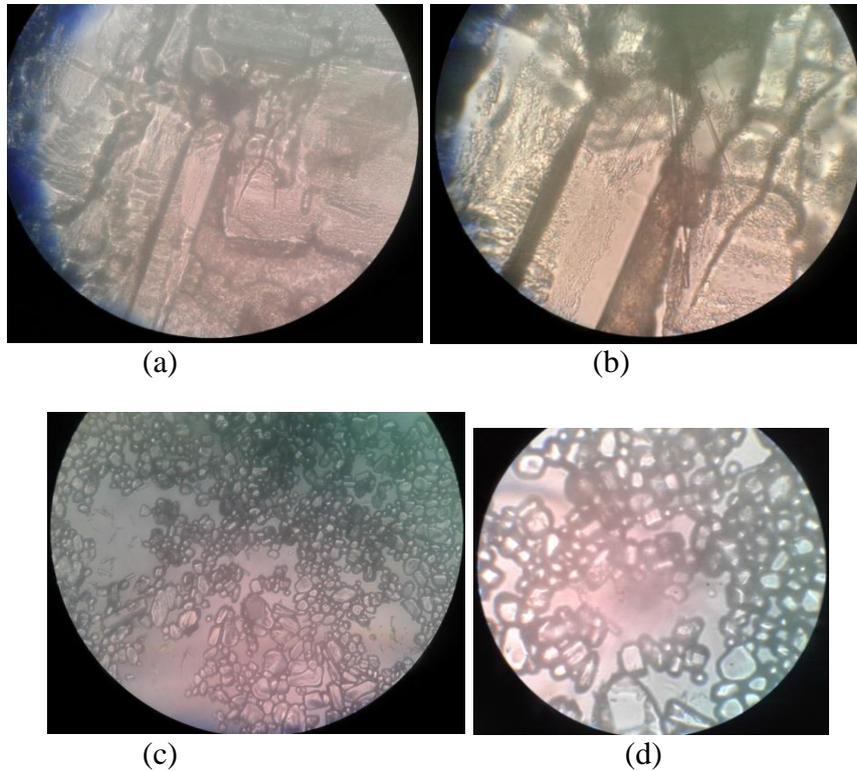
Tabel 3.2 Hasil Pengamatan Makroskopis Pembentukan Presipitat Fraksi Papain

Kondisi	Hasil Pengamatan pada Hari ke-
---------	--------------------------------

Suhu (°C)	Ammonium Sulfat (%)	1-3	4-6	5-8	9-12	13-15	16-18
5	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
	55	-	-	++	++	++	++
	60	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	70	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
15	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	+++	-
	55	-	-	++++	++++	++++	++++
	60	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	70	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	80	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
25	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
<b>Kondisi</b>		<b>Hasil Pengamatan pada Hari ke-</b>					
Suhu (°C)	Ammonium Sulfat (%)	1-3	4-6	5-8	9-12	13-15	16-18
25	55	-	-	-	-	-	-
	60	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	70	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

30	80	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
----	----	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Keterangan: + : terbentuk larutan koloidal atau suspensi atau presipitat  
- : larutan bening



Gambar 4.2 (a) Kristal Papain Perbesaran 400x (b) Kristal Papain Perbesaran 1.000x (c) Kristal Ammonium Sulfat Perbesaran 400x (d) Kristal Ammonium Sulfat Perbesaran 1.000x

Tabel 3.3 Hasil Optimasi Kristalisasi Fraksi Papain

Kondisi		Sampel	Aktivitas Protease (U/mL)	Volume** (mL)	Aktivitas Total (U)
Suhu (°C)	Ammonium Sulfat (%)				
5	55	Kristal	3,3988	0,13	0,4418
		Supernatan	4,3132	0,32	1,3802
	60	Kristal	2,1412	0,20	0,4282
		Supernatan	3,2074	0,85	2,7263
	70	Kristal	4,3429	0,30	1,3802
		Supernatan	4,5145	0,80	3,6116
15	55	Kristal	4,7060	0,27	1,2706

		Supernatan	3,8379	0,30	1,1514
	60	Kristal	4,2868	0,20	0,8574
		Supernatan	_*	_*	_*
	70	Kristal	4,1680	0,23	0,9586
		Supernatan	_*	_*	_*
	80	Kristal	71,8535	0,15	10,7780
		Supernatan	0,5139	0,12	0,0642
25	60	Kristal	_*	_*	_*
		Supernatan	4,5079	0,13	0,5860
	70	Kristal	2,8047	0,30	0,8414
		Supernatan	_*	_*	_*
30	80	Kristal	51,0580	0,15	7,6587
		Supernatan	0,0518	0,12	0,0064

\*Beberapa data tidak didapatkan karena keterbatasan sampel

\*\* Volume larutan enzim hasil pelarutan kristal

### Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa fraksi papain pada proses fraksinasi getah *Carica papaya* adalah fraksi 40-80% ammonium sulfat dengan peningkatan faktor kemurnian 6,27 kali lebih besar daripada ekstrak papain. Selain itu, kristalisasi papain dapat dihasilkan secara optimum dengan penambahan presipitan ammonium sulfat 80% jenuh pada suhu 15 °C. Adapun kristal papain dari fraksi 40-80% yang diperoleh berbentuk kubus dan tetragonal.

### Daftar Pustaka

Baktir, A., 2018, *Prototipe dan Penggunaan Kristalizer Protein untuk Kristalisasi dan Pemurnian Parsial Protein/ Enzim secara Sinambung*, Paten, Unpublished, Indonesia

Metode fraksinasi untuk mendapatkan kristal papain dengan tingkat kemurnian parsial dari getah *Carica papaya* dapat diaplikasikan dalam *Crystallizer Sinambung* dengan kadar ammonium sulfat sesuai hasil percobaan optimasi pada penelitian ini. Selanjutnya, penelitian ini dapat dikembangkan dan diterapkan untuk enzim-enzim lain yang potensial sebagai alternatif pemenuhan kebutuhan enzim di Indonesia.

Gunde, M.C., dan Amnerkar, N.D., 2016, Nutritional, Medicinal and Pharmacological Properties of Papaya (*Carica papaya* linn.): A Review, *JIPBS*, **3**, 162-169

Kementerian Pertanian, 2015, *Statistik Produksi Hortikultura Tahun*

- 2014, Direktorat Jenderal Hortikultura, Kementerian Pertanian, Indonesia
- dari Daun Pepaya (*Carica papaya* l.), *Molekul*, **9**, 44-55
- Llerena-Suster, C.R., Jose, C., Collins, S.E., Briand, L.E., dan Morcelle, S.R., 2012, Investigation of the Structure and Proteolytic Activity of Papain Miscible Organic Media, *Process Biochemistry*, **47**, 47-56
- Malek, K., Norazan, M., Ramaness, P., Othman, N.Z., Malek, R., Aziz, R., Aladdin, dan A., El-Enshasy, H., 2016, Cysteine Protease from *Carica papaya*: An important enzyme group of many industrial applications, *IOSR-JPBS*, **11**, 11-16
- McPherson, A., dan Gavira, J. A., 2014, Introduction to Protein Crystallization, *Acta Cryst.*, **F70**, 2-20
- Sutandi, C., 2003, *Analisis Potensi Enzim Protease Lokal*, Skripsi, IPB, Indonesia
- Patel, T., 2016, Papain Enzyme: A Digestive Aid, *Int. J. Clin. and Biomed. Res.*, **2**, 52-53
- Zusfahair, Ningsih, D.R., dan Habibah, F.N., 2014, Karakterisasi Papain dari Daun Pepaya (*Carica papaya* l.), *Molekul*, **9**, 44-55
- Purwanto, M.G.M., 2016, The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification of Papain Ekstrak papain Extract, *Procedia Chemistry*, **18**, 127-131
- Scopes, R. K., 2013, *Protein Purification: Principles and Practice*, 2<sup>nd</sup> Edition, Springer Science & Business Media, USA
- Sutandi, C., 2003, *Analisis Potensi Enzim Protease Lokal*, Skripsi, IPB, Indonesia
- Zusfahair, Ningsih, D.R., dan Habibah, F.N., 2014, Karakterisasi Papain