

PENGARUH PENAMBAHAN AMMONIUM SULFAT $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ DAN WAKTU PERENDAMAN BUFFER FOSFAT TERHADAP PEROLEHAN *CRUDE* PAPAIN DARI DAUN PEPAYA (*CARICA PAPAYA, L*)

Mitha Alviyulita*, Pinta Rizki Mala Hasibuan, Farida Hanum
Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sumatera Utara
Jl. Almamater Kampus USU Medan, 20155 Indonesia
*Email : chanameh@yahoo.com

Abstrak

Daun pepaya merupakan salah satu hasil tanaman yang kaya manfaat. Daun pepaya mengandung enzim papain yang merupakan enzim protease yang sangat bermanfaat bagi industri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh tingkat kejenuhan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan perendaman buffer fosfat terhadap rendemen protease kasar daun pepaya. Penelitian ini memvariasikan waktu perendaman buffer fosfat pada waktu 0, 12, 24, dan 36 jam dan tingkat kejenuhan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada konsentrasi 40, 50, 60, 70, 80, dan 90 %. Analisis aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV untuk mengukur panjang gelombang dan nilai absorbansinya. Hasil penelitian aktivitas protease yang terbaik diperoleh pada perendaman buffer fosfat selama 36 jam dengan konsentrasi ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% yaitu 132,98% unit/ml. Rendemen dan kadar air terbaik diperoleh pada perendaman 36 jam pada konsentrasi 90% masing – masing sebesar 37,62% dan 65,70%.

Kata kunci : pepaya, ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, buffer fosfat, enzim papain, aktivitas protease

Abstract

Papaya leaves is a plant that rich in benefits. Papaya leaves contains papain enzyme which is a protease enzyme that very helpful for the industry. This study aims to determine the effect of the saturation level of ammonium sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and immersion time with phosphate buffer to get yield of protease from crude papaya. In this study varied immersion time with phosphate buffer is 0, 12, 24, and 36 hours and the saturation level of ammonium sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is 40, 50, 60, 70, 80, and 90 %. Analysis of protease activity was performed using UV spectrophotometer to measure the wavelength and absorbance values. The highest value of the protease activation (132,98% unit/ml) was obtained during 36 h of immersion time in phosphate buffer with 60% concentration of ammonium sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The results found on 36 h of immersion time in 90% of ammonium sulphate concentration were the highest for rendement and water content value of 37,62 and 65,70%, respectively.

Keywords : papaya, ammonium sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, phosphate buffer, enzyme papain, activity of protease

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara tropis dengan kekayaan flora yang berlimpah. Salah satu tanaman tropis yang banyak dijumpai di Indonesia adalah tanaman pepaya (*Carica papaya L*) [8]. Semua bagian daripada pepaya dapat digunakan [12].

Selain buah, bagian tanaman pepaya lainnya dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan mulai sebagai bahan makanan dan minuman, obat tradisional, pakan ternak, industri penyamakan kulit, kosmetik, dan sebagainya. Bahkan bijinya pun dapat diolah lebih lanjut menjadi minyak dan tepung [10].

Papain merupakan enzim proteolitik, yaitu enzim yang dapat mengurai dan memecah protein [10]. Papain digunakan untuk pengempukan daging, bahan penjernih pada industri minuman bir, industri tekstil, industri penyamakan kulit, industri farmasi, alat-alat kecantikan (kosmetik) dan lain lain. Papain biasa diperdagangkan dalam bentuk serbuk putih kekuningan dan harus disimpan dibawah temperatur 4 °C [4].

Pengambilan enzim papain dari getah pepaya akan mengakibatkan penurunan kualitas pada buah segarnya. Maka dari itu papain yang diambil dari tanaman pepaya berupa daunnya sehingga tidak mengalami kerusakan pada tanaman pepaya itu sendiri dan dapat meningkatkan nilai tambah tanaman pepaya. Enzim papain diperoleh dari hasil ekstraksi. Semakin tinggi enzim proteasenya maka papain yang dihasilkan semakin baik. Enzim ini dapat diekstrak dan kemudian proses, pengendapannya dapat dilakukan dengan penambahan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ammonium sulfat) [11].

Garam amonium sulfat sering digunakan untuk salting out protein enzim. Karena kelarutannya sangat tinggi, tidak beracun untuk kebanyakan enzim, murah dan pada beberapa kasus memberikan efek menstabilkan enzim [6].

Pada penelitian ini, daun pepaya akan diteliti sebagai bahan baku pembuatan *crude* papain. Yang

menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh waktu perendaman buffer fosfat dan konsentrasi terhadap perolehan *crude* papain.

Teori

Tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) ini berasal dari kawasan sekitar Meksiko dan Costa Rica. Dewasa ini tanaman pepaya telah menyebar keseluruh dunia termasuk Indonesia [1]. Daun pepaya merupakan salah satu komponen obat herbal yang telah digunakan oleh nenek moyang kita sejak dahulu kala. Di era modern, dimana teknologi mampu mengurai sisi ilmiah, diketemukan fakta pembeda mengenai daun pepaya. Selain enzim papain pepaya juga mengandung alkaloid karpaina, pseudo karpaina, glikosid, karposid, dan saponin [7]. Kompleksnya senyawa ini menjadikan khasiat daun pepaya juga ikut beragam. Untuk mendapatkan manfaat tersebut, daun pepaya biasanya diolah. Khusus untuk ekstrak daun pepaya, banyak diistimewakan sebab bisa digunakan dari dalam maupun luar dan tak hanya untuk kesehatan manusia saja tetapi untuk pertanian, perikanan dan lain-lain [5].

Enzim papain adalah enzim yang terdapat pada getah pepaya merupakan jenis enzim proteolitik yaitu enzim yang mengkatalisa reaksi pemecahan rantai polipeptida pada protein dengan cara menghidrolisa ikatan peptidanya menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti dipeptida dan asam amino. Kualitas aktivitas proteolitik yang baik ada pada bagian buah, batang dan daun [17].

Ekstraksi enzim dapat dilakukan dengan prinsip bahwa protein enzim dapat diendapkan dengan penambahan aseton, etanol, sodium sulfat atau ammonium sulfat. Sifat ini digunakan sebagai prinsip dari isolasi enzim. Enzim ini dapat diekstrak dan kemudian proses pengendapannya dapat dilakukan dengan penambahan garam (NH₄)₂ SO₄ (ammonium sulfat) [11].

Ekstraksi enzim dapat dilakukan dengan prinsip bahwa protein enzim dapat diendapkan dengan penambahan aseton, etanol, sodium sulfat atau ammonium sulfat. Sifat ini digunakan sebagai prinsip dari isolasi enzim. Enzim ini dapat diekstrak dan kemudian proses pengendapannya dapat dilakukan dengan penambahan garam (NH₄)₂ SO₄ (ammonium sulfat) [11].

Metodologi Penelitian

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini daun pepaya. Bahan kimia yang digunakan adalah aquadest, buffer fosfat, ammonium sulfat, kasein, asam trikloroasetat (TCA), dan reagen ninhidrin.

Peralatan utama yang akan digunakan adalah blender, *magnetic stirrer*, timbangan elektrik, alat

alat gelas, *incubator*, kertas saring whatman No. 4, sentrifius, dan spektrofotometer.

Ekstrak Papain

100 gram daun pepaya ditimbang dan diblender dengan 200 ml buffer fosfat pH 7. Campuran kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring whatman No. 4, hasil residunya dibuang dan filtratnya ditambahkan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 40, 50, 60, 70, 80 dan 90%. Setelah itu filtrat distirer selama 20 menit pada temperatur 4°C sampai tercampur rata. Kemudian disentrifius dengan kecepatan 8000 rpm selama 7 menit pada temperatur 4°C. Endapan yang terbentuk dilarutkan dengan 0,5 ml larutan 0,05 buffer fosfat pH 7 dan didiamkan selama 0, 12, 24, dan 36 jam.

Uji Aktivitas Protease

Kualitas papain sangat ditentukan oleh kekuatan atau kemampuan papain untuk memecah protein. Kemampuan papain ini disebut aktivitas proteolitik (*Proteolytic activity*) yang sering dinyatakan dengan satuan unit [12].

Ekstrak papain sebanyak 0,1 ml dilarutkan dengan 0,1 ml larutan buffer fosfat pH 7 dan dipreinkubasi pada temperature 37°C selama 5 menit dan ditambahkan dengan substrat (2% kasein dalam 0,05 M buffer fosfat pH 7) sebanyak 0,1 ml. kemudian diinkubasi selama 10 menit pada temperatur 37°C. Kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,2 ml asam trikloroasetat (TCA) 0,4 M serta disentrifius pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. 0,2 ml filtrat yang dihasilkan dipreinkubasi selama 50 menit. Setelah itu 1 ml reagen ninhidrin. Lalu absorbansi dapat diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 274,80 nm. Sehingga aktivitas protease dapat dihitung dengan menggunakan Persamaan :

$$\text{Aktivitas protease} = \frac{\text{tirosin} \times v}{(p \times q) \times Fp} \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

- tirosin : konsentrasi tirosin yang terbentuk
- v : volume total sampel pada tiap tabung
- q : waktu inkubasi
- p : jumlah enzim (mL)
- Fp : faktor pengenceran

Analisa Rendemen

Penghitungan rendemen dilakukan dengan menimbang *crude* protease kering kemudian dibandingkan dengan berat sampel dikalikan 100%. Penghitungan rendemen dapat menggunakan rumus sebagai berikut [1]:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{A}{B} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

- A : berat *crude* papain (gram)
- B : berat sampel daun pepaya (gram)

Hasil dan Pembahasan

Ekstrak Crude Papain dari Daun Pepaya (*Carica Papaya, L.*)

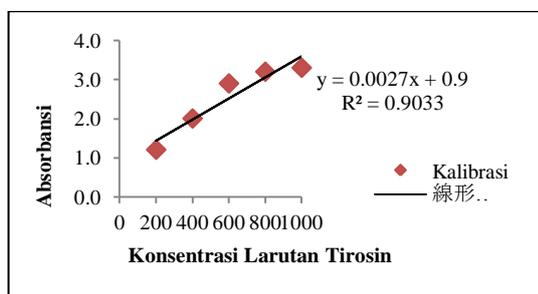
Ekstrak *crude* papain merupakan hasil dari sentrifugasi yang diperoleh dari filtrat daun pepaya. Hasil sentrifugasi yang diperoleh berupa *sludge* berwarna hijau pekat. Filtrat diperoleh dari daun pepaya yang dihaluskan dengan penambahan *buffer fosfat* dan disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan ditambahkan *ammonium sulfat* dengan konsentrasi 40% sampai 90% kemudian distirer selama 20 menit sampai *ammonium sulfat* tercampur semua pada suhu 4°C. Pemilihan temperatur 4°C dilakukan untuk mencegah kerusakan enzim [9]. Garam *ammonium sulfat* sering digunakan untuk *salting out* protein enzim, karena kelarutannya sangat tinggi dan pada beberapa kasus memberikan efek menstabilkan enzim [6].

Kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh dipisahkan dengan menggunakan kertas saring dan direndam dengan larutan *buffer fosfat* 0.05 M pH 7 sebanyak 0,5 ml selama sesuai perlakuan (0 jam, 12 jam, 24 jam, dan 36 jam). Perendaman dilakukan untuk memisahkan protein enzim dari ion logam, ion logam dan molekul-molekul kecil, sehingga dapat memurnikan protein enzim [19].

Pembuatan Kurva Standar LarutanTirosin

Panjang gelombang maksimum 274,80 nm yang dihasilkan digunakan untuk membuat kurva larutan standar tirosin. Kemudian, kurva standar tirosin dibuat dengan cara mengukur absorbansi larutan.

Dari data absorbansi larutan tirosin pada berbagai konsentrasi dibuat kurva larutan standar tirosin antara konsentrasi larutan tirosin terhadap absorbansi berdasarkan hukum *Lambert Beer*. Grafik konsentrasi larutan tirosin terhadap absorbansi dapat dilihat pada Gambar 1.



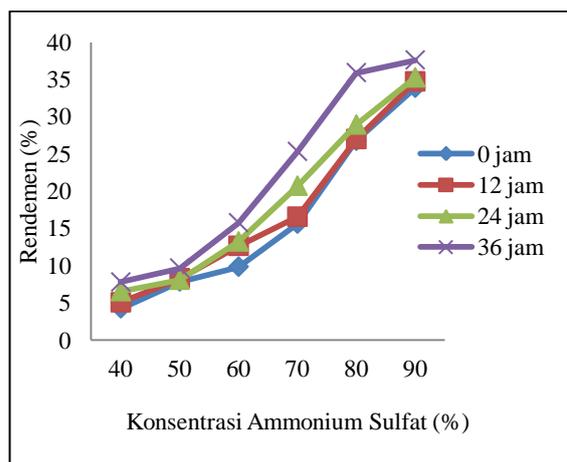
Gambar 1. Kurva kalibrasi Larutan Tirosin

Berdasarkan data dan perhitungan didapatkan persamaan regresi linier larutan standar tirosin adalah $y = 0,0027x + 0,9$ dengan nilai $R^2 = 0,9033$. Harga R yang diperoleh mendekati 1, maka dapat disimpulkan bahwa nilai koefisien korelasi layak

artinya titik-titik pada kurva kalibrasi mendekati kemiringannya.

Analisa Rendemen

Analisa rendemen dilakukan dengan cara menimbang ekstrak papain yang dihasilkan dan membandingkan dengan berat sampel daun pepaya. Rendemen yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 2.



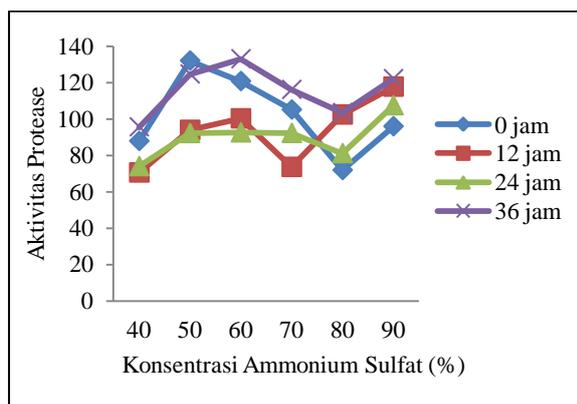
Gambar 2. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Ammonium Sulfat dan Waktu Perendaman Buffer Fosfat terhadap Rendemen yang dihasilkan

Berdasarkan Gambar 2 dilihat bahwa rendemen yang dihasilkan semakin meningkat seiring penambahan konsentrasi yang dilakukan. Namun untuk perendaman tidak terjadi pengaruh yang besar terhadapnya. Kondisi optimum yang terjadi terlihat pada penambahan konsentrasi ammonium sulfat 90% pada perendaman 36 jam sebesar 18,81%. Seidman and Mowery [13], menyatakan bahwa ketika garam ammonium sulphat ditambahkan pada larutan protein enzim, maka sebagian besar molekul air akan berikatan dengan ion garam yang selanjutnya akan menurunkan jumlah air yang tersedia untuk berikatan dengan protein, sehingga protein akan mengendap. Selanjutnya menurut Wang [15], *crude* protease hasil presipitasi dengan ammonium sulphat masih merupakan fraksi campuran yang terdiri dari fraksi protein enzim dan protein non enzim.

Jika ditinjau dari pengaruh waktu perendaman buffer fosfat, tidak terjadi perubahan yang signifikan. Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa rendemen yang dihasilkan semakin meningkat seiring penambahan waktu perendaman buffer fosfat yang dilakukan. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu reaksi enzimatik maka semakin banyak produk yang terbentuk, yang juga berarti aktivitasnya semakin besar [2].

Pengaruh Penambahan Konsentrasi Ammonium Sulfat (NH₄)₂SO₄ dan Waktu Perendaman Buffer Fosfat terhadap Aktivitas Protease

Aktivitas protease diperoleh dengan cara menghitung hasil absorbansi yang diperoleh dari hasil analisa spektrofotometer sampel dengan menggunakan kurva standar tirosin yang telah ditetapkan sebelumnya kemudian dilakukan perhitungan aktivitas proteasenya.



Gambar 3. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Ammonium Sulfat dan Waktu Penambahan Perendaman Buffer Fosfat terhadap Aktivitas Protease

Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa aktivitas protease cenderung meningkat seiring bertambahnya konsentrasi. Akan tetapi pada konsentrasi tertentu aktivitas protease menurun, kemudian meningkat kembali apabila konsentrasi ammonium sulfat ditambahkan terus-menerus. Aktivitas protease yang terbaik diperoleh pada konsentrasi ammonium sulfat 60% pada perendaman 36 jam sebesar 132,98 (unit/ml). Kemudian ketika konsentrasi ammonium sulfat ditambahkan menjadi 70%, aktivitas protease menurun menjadi 116,13 (unit/ml).

Penambahan amonium sulfat menyebabkan protein mengendap dan aktivitas enzim menjadi meningkat karena menurunnya jumlah kontaminan yang menghalangi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat [16].

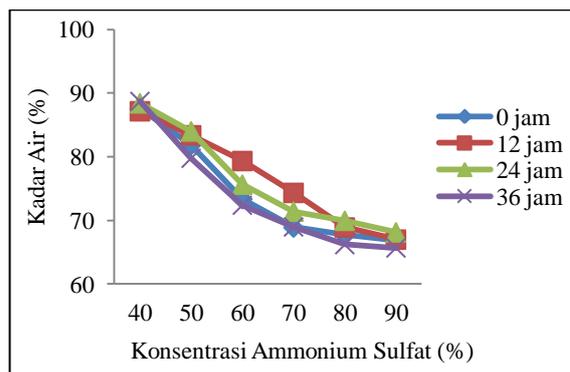
Menurut Aulanni'am [3], penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein-protein enzim akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap.

Sedangkan untuk hasil perendaman yang dilakukan, perendaman yang terbaik terlihat waktu perendaman 36 jam, karena Semakin lama waktu reaksi enzimatik maka semakin banyak produk yang

terbentuk, yang juga berarti aktivitasnya semakin besar [2].

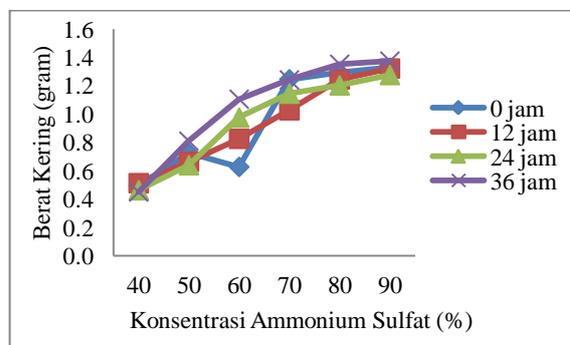
Analisa Kadar Air

Kadar air merupakan salah satu parameter uji yang penting. Kadar air memerankan peranan penting dalam menentukan umur simpan. Selain itu pada proses pembuatan tepung papain menurut Supiyatna [14], kadar air tepung papain jangan sampai lebih dari 9%.



Gambar 4. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Ammonium Sulfat dan Waktu Perendaman Buffer Fosfat terhadap Kadar Air yang dihasilkan

Dari Gambar 4 dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi ammonium sulfat yang diberikan maka kadar airnya semakin menurun. Kadar air yang terbaik terjadi pada perendaman 36 jam pada konsentrasi ammonium sulfat 90% yaitu sebesar 65,69%. Hal ini disebabkan oleh ion-ion garam yang memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Kadar air bebas yang rendah menghambat difusi enzim atau substrat, akibatnya hidrolisis hanya terjadi pada bagian substrat yang langsung berhubungan dengan enzim [18].



Gambar 5. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Ammonium Sulfat dan Waktu Perendaman Buffer Fosfat terhadap Berat Kering yang dihasilkan

Dari Gambar 5 dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi ammonium sulfat yang diberikan maka berat kering yang dihasilkan semakin meningkat. Berat kering maksimum yang diperoleh terjadi pada perendaman 36 jam pada konsentrasi ammonium sulfat 90% yaitu sebesar 1,37 gram.

Hasil percobaan yang dilakukan belum mencapai berat kering yang diinginkan yaitu sebesar > 9%. Hal ini disebabkan karena sampel yang dianalisa kadar airnya berupa sludge. Banyak kandungan air pada sludge karena sludge yang dihasilkan belum dilakukan proses tahapan pengeringan menjadi tepung papain. Pembuatan papain hingga menjadi tepung perlu dilakukan proses lanjutan yaitu freeze drying.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Pengaruh perendaman buffer fosfat dan konsentrasi ammonium sulfat (NH₄)₂SO₄ terhadap aktivitas protease tertinggi pada konsentrasi ammonium sulfat 60% pada perendaman 36 jam sebesar 132,98 (unit/ml).

Daftar Pustaka

- [1] Ashari S, Hortikultura Aspek Budidaya, Edisi Revisi, UI Press, Jakarta, 2006.
- [2] Askurrahman, Tesis, Isolasi Karakterisasi Linamarase Hasil Isolasi Dari Umbi Singkong (Manihot Esculenta Craintz), Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo, 2010.
- [3] Aulanni'am, Protein dan Analisisnya, Citra Mentari Group, Malang, 2005.
- [4] Fitriani V, 2006. Getah Sejuta Manfaat, PT. Trubus Swadaya. Edisi April, Jakarta, 2006.
- [5] Konradlew, Khasiat Daun Pepaya. <http://khasiatdaunpepaya.blogspot.com>, 2013, diakses tanggal 4 Mei 2013.
- [6] Lee J. M, Biochemical Engineering, Prentice Hall Inc, New Jersey, 1992.
- [7] Muchlisah F, Tanaman Obat Keluarga (TOGA), Penebar Swadaya, Jakarta, 2004.
- [8] Mulyaningrum dan Sri Redjeki Hesti, Isolasi, Karakterisasi, dan Amobilisasi Enzim Papain dari Getah Pepaya. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Diponegoro, 1999.
- [9] Noviyanti dkk, Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansakng (Pycnarrhena cauliflora Diels), JKK, tahun 2012, volume 1 (1), halaman 31-34, 2012.
- [10] Rahmadani, Kajian Pemanfaatan Enzim Papain dari Getah Pepaya (Carica papaya L.) untuk Melunakkan Daging. Universitas Negeri Medan, 2012.
- [11] Rahman A, Teknologi Fermentasi. Penerbit Arcan. Jakarta, 1992.
- [12] Sani, Panambahan Natrium, Bisulfit pada Kualitas Enzim Papain dari Getah Pepaya Secara MCU, Unesa University Press, Hal 1-41, 2008.
- [13] Seidman, L. and Mowery, J, Salting out Ammonium Sulfate Precipitation, The Biotechnology Project, Illinois State University, 2006.
- [14] Supiyatna, Manfaat Getah Pepaya. <http://halalguide.info>, 2007, diakses tanggal 05 Mei 2014.
- [15] Wang, N. S, Enzyme Purification by Salt (Ammonium Sulfate) Precipitation, Department of Chemical Engineering, University of Maryland, 2006.
- [16] Wardani, Agustin Kristina dan Nindita, Lia Oriana, Jurnal Teknologi Pertanian Vol 13 No. 3, 149 – 156, 2012.
- [17] Winarno, F. G, Enzim Pangan, Edisi dua, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 1973.
- [18] Winarno, F. G, Enzim Pangan, Penerbit Gramedia, Jakarta, 1983.
- [19] Witono dkk, Pemurnian Parsial Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (Calotropis gigantea) menggunakan Ammonium Sulphat, Jurnal Teknologi Pertanian, Vol. 7 No. 1 (April 2006) 20-26, 2006.