

## Proses Pemurnian Enzim Papain Metode Salting out: *Literatur Review*

Lusy Occktaviani<sup>1</sup>, Dian Safitri<sup>2</sup>, Muhamad Ari Ismail<sup>3</sup>, Wilna Iznillah<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Ilmu Pangan Halal, [lusyoccktaviani04@gmail.com](mailto:lusyoccktaviani04@gmail.com)

<sup>2</sup>Fakultas Ilmu Pangan Halal, [diansft615@gmail.com](mailto:diansft615@gmail.com)

<sup>3</sup>Fakultas Ilmu Pangan Halal, [ariismailmuhamad@gmail.com](mailto:ariismailmuhamad@gmail.com)

<sup>4</sup>Fakultas Ilmu Pangan Halal, [wilna.iznillah@unida.ac.id](mailto:wilna.iznillah@unida.ac.id)

---

---

### ABSTRAK

Enzim pepaya pertama kali dinamai pada akhir abad ke-19 oleh Wurtz dan Bouchut, yang berhasil memurnikan sebagian komponen dari getah pepaya dan mengidentifikasinya sebagai salah satu konstituen utama dalam lateks buah pepaya tropis. Aktivitas papain dilaporkan lebih tinggi apabila diekstraksi dari buah pepaya yang berwarna hijau atau masih muda. Salah satu metode yang digunakan untuk kristalisasi papain adalah metode salting out. Kajian ini bertujuan untuk membandingkan hasil-hasil penelitian terdahulu terkait kristalisasi enzim papain menggunakan metode *salting out* berdasarkan berbagai parameter proses. Proses kristalisasi papain diantaranya yaitu proses isolasi papain diawali dengan pengolahan getah pepaya untuk memperoleh ekstrak kasar enzim. Ekstrak tersebut selanjutnya dimurnikan menggunakan metode salting out melalui penambahan ammonium sulfat secara bertahap sehingga diperoleh beberapa fraksi protein berdasarkan tingkat kejenuhan. Setiap fraksi dipisahkan dengan sentrifugasi dan dilarutkan kembali dalam buffer yang sesuai, kemudian dianalisis untuk menentukan fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi. Fraksi terpilih selanjutnya digunakan dalam proses kristalisasi papain dengan variasi tingkat kejenuhan ammonium sulfat dan kondisi suhu hingga terbentuk kristal enzim, yang kemudian dikarakterisasi berdasarkan aktivitas proteasenya. Hasil kristalisasi menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi yaitu pada fraksi 40-80%, 60-80%, dan 80%.

**Kata Kunci:** Aktivitas spesifik, Fraksinasi, Kristalisasi enzim, papain, salting out

### PENDAHULUAN

Enzim pepaya pertama kali dinamai pada akhir abad ke-19 oleh Wurtz dan Bouchut, yang berhasil memurnikan sebagian komponen dari getah pepaya dan mengidentifikasinya sebagai salah satu konstituen utama dalam lateks buah pepaya tropis. Secara umum, papain diperoleh melalui proses penyadapan dengan membuat sayatan pada epikarp buah pepaya yang masih mentah, kemudian lateks yang keluar dikumpulkan dan dikeringkan. Aktivitas papain dilaporkan lebih tinggi apabila diekstraksi dari buah pepaya yang berwarna hijau atau masih muda. Papain termasuk

ke dalam superfamili papain dan memiliki sifat proteolitik intrinsik yang berperan penting dalam berbagai proses biologis pada organisme hidup (Babalola *et al.*, 2023).

Secara kimia, papain memiliki gugus aktif sulfhidril ( $-SH$ ) yang berperan dalam aktivitas katalitiknya, sehingga memiliki kapabilitas menghidrolisis ikatan peptida, terutama pada residu asam amino lisin dan glisin. Secara Fisik, Aktivitas enzim ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, dengan suhu optimum berada pada kisaran 50-65 °C dan pH ideal antara 5-7 (Soleha *et al.*, 2018). Selain itu, papain menunjukkan kestabilan yang baik pada larutan dengan pH sekitar 5,0 serta memiliki aktivitas katalitik yang relatif tinggi dan ketahanan terhadap suhu panas dibandingkan dengan beberapa enzim lainnya. Sifat tersebut berkaitan dengan karakter papain sebagai enzim proteolitik yang berasal dari buah pepaya, yang berfungsi dalam pemecahan protein menjadi peptida dan asam amino (Nurhaerani *et al.*, 2022).

Papain merupakan enzim proteolitik yang berasal dari tumbuhan dan banyak digunakan dalam berbagai bidang seperti pada industri roti, proses pelunakan daging, defibrinasi luka, penghilangan gum pada sutera dan wol, serta pengobatan edema (Malle *et al.*, 2015). Protein utama yang bertanggung jawab atas keempukan daging adalah protein miofibril dan protein ikat, itulah sebabnya papain digunakan untuk meningkatkan keempukan daging. Papain merupakan bahan yang umum digunakan dalam industri pembuatan bir dan pengolahan daging. Papain memiliki aplikasi dalam penyamakan kulit dan bulu karena memastikan pewarnaan kulit yang seragam dan juga berperan sebagai zat penjernih dalam industri makanan (Channamade *et al.*, 2021).

Kristalisasi adalah proses pembentukan zat padat berbentuk kristal yang berasal dari larutan induk homogen. Proses ini tergolong sebagai metode pemisahan antara fase padat dan cair yang memiliki peran penting dalam berbagai bidang industri, karena mampu menghasilkan produk dengan tingkat kemurnian sangat tinggi, bahkan mendekati sempurna (Khairunisa *et al.*, 2019). Salting out merupakan proses penggaraman protein yang menyebabkan terjadinya agregasi akibat penguatan dan

stabilisasi interaksi hidrofobik. Pada kondisi ini, molekul air yang semula mengelilingi residu hidrofobik protein berpindah ke fase pelarut, Dengan demikian, residu-residu hidrofobik dapat saling berinteraksi dan membentuk agregat protein. Enzim yang berada dalam bentuk kristalin umumnya menunjukkan kestabilan yang lebih tinggi terhadap berbagai pengaruh lingkungan, seperti perubahan suhu, pH, dan proses oksidatif, sehingga lebih mudah ditangani dan disimpan serta memiliki stabilitas dan masa simpan yang lebih panjang (Rohmah et al., 2019).

*Salting out* merupakan proses penambahan garam pada protein yang memicu terjadinya penggumpalan akibat meningkatnya interaksi hidrofobik. Pada kondisi ini, molekul air yang sebelumnya mengelilingi bagian hidrofobik protein akan beralih ke permukaan, sehingga residu-residu hidrofobik dapat saling berinteraksi (Rohmah, et al., 2019).

## **METODE PENELITIAN**

Pada tahap isolasi papain, getah yang diperoleh dari proses penyadapan dicampurkan dengan larutan natrium bisulfit 0,7% dengan volume empat kali lebih besar dibandingkan volume getah. Campuran kemudian dihomogenkan hingga menghasilkan emulsi berwarna putih menyerupai susu dengan tekstur relatif kental. Emulsi tersebut selanjutnya diratakan pada cawan petri dan dikeringkan di dalam oven pada kisaran suhu 50–60 °C (Malle et al., 2015).

Getah pepaya yang telah dikumpulkan terlebih dahulu dihaluskan menggunakan mortar, kemudian ditimbang. Sampel kemudian dilarutkan dengan penambahan 50 mL akuades dan disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, supernatan dipisahkan dari endapan melalui proses dekantasi. Supernatan yang diperoleh kemudian dilakukan proses pengendapan dengan penambahan kristal ammonium sulfat. Protein hasil pengendapan dipisahkan menjadi empat fraksi, yaitu fraksi dengan tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60%, dan 80%. Untuk memperoleh fraksi dengan tingkat kejenuhan 20%, sebanyak 5,3 g ammonium

sulfat yang sudah dihaluskan ditambahkan ke dalam supernatan, kemudian dilarutkan dan diaduk secara perlahan menggunakan magnetic stirrer di dalam kondisi suhu rendah. Campuran kemudian dipisahkan dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, selanjutnya supernatan dipisahkan dari endapan yang terbentuk (Malle *et al.*, 2015). Endapan yang diperoleh selanjutnya dilarutkan kembali menggunakan larutan Tris-HCl 50 mM pH 7,0 dengan volume sekecil mungkin. Larutan hasil pelarutan ini merupakan fraksi amonium sulfat dengan derajat kejenuhan 20%. Sedangkan berdasarkan Rohmah *et al.*, (2019), Ekstrak papain diberi perlakuan penambahan amonium sulfat secara bertahap sesuai tingkat kejenuhan yang ditetapkan, kemudian diinkubasi dalam kondisi es selama sedikitnya 2 jam. Setelah proses inkubasi, sampel dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 15 menit. Hasil endapan pada setiap tahap sentrifugasi selanjutnya dilarutkan dengan buffer fosfat 0,2 M dengan pH 6 sampai seluruh endapan terlarut sempurna. Prosedur tersebut diterapkan pada fraksinasi amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40% serta 40–80%.

Fraksi yang menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi selanjutnya dikristalkan melalui penambahan ammonium sulfat. Konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan dalam proses kristalisasi ditentukan berdasarkan hasil fraksinasi papain sebelumnya, dengan variasi tingkat kejenuhan sebesar 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 70%, dan 80%. Proses kristalisasi diaplikasikan dengan menginkubasi larutan pada suhu 5, 15, 25, dan 30 °C sampai kristal papain terbentuk secara bertahap. Kristal yang dihasilkan kemudian dipisahkan dari supernatan, selanjutnya diamati secara makroskopik dan mikroskopik, serta dianalisis aktivitas proteasenya (Rohmah *et al.*, 2019).

Menurut Budiharjo *et al* (2017), Enzim dalam bentuk ekstrak kasar dimurnikan melalui proses fraksinasi menggunakan ammonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan, yaitu 0–20%, 20–40%, 40–60%, 60–80%, dan 80–100%. Endapan yang terbentuk pada setiap fraksi dipisahkan melalui sentrifugasi bertahap, diawali dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit, kemudian dilanjutkan

dengan sentrifugasi berikutnya pada kecepatan 14.000 rpm. Endapan hasil sentrifugasi selanjutnya dilarutkan kembali menggunakan buffer fosfat 0,05 M dengan pH 8,0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian enzim papain penting untuk mendapatkan enzim yang lebih murni dan tetap aktif, sehingga bisa digunakan dalam penelitian atau industri. Salah satu cara yang umum dipakai adalah fraksinasi dengan ammonium sulfat melalui metode *salting out*, yaitu memisahkan protein berdasarkan kelarutannya pada tingkat kejenuhan garam yang berbeda. Keberhasilan pemurnian biasanya dilihat dari peningkatan aktivitas spesifik enzim, yang menandakan pengurangan zat pengotor. Pembahasan berikut akan menyoroti pengaruh tingkat kejenuhan ammonium sulfat terhadap aktivitas papain dan bentuk presipitat yang terbentuk, serta membandingkan hasil penelitian Malle *et al.* (2015), Rohmah *et al.* (2019), dan Budiharjo *et al.* (2017).

No	Nama Penulis	Tingkat Kejenuhan	Aktivitas Spesifik Tertinggi
1.	Malle <i>et al.</i> , 2015	20%, 40%, 60%, 80%	10,57975 x 10 <sup>5</sup> U/g pada fraksi 80%
2.	Rohmah <i>et al.</i> , 2019	20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 70%, dan 80%	2,0819 U/μg pada fraksi 40-80%
3.	Budiharjo <i>et al.</i> , 2017	0–20%, 20–40%, 40–60%, 60–80%, dan 80–100%.	58,537 U/mg pada fraksi 40-80%

Berdasarkan hasil penelitian malle *et al.*, (2015) bahwa hasil pemurnian papain, Papain kering (ekstrak kasar) yang diperoleh terlebih dahulu dilarutkan dalam buffer Tris-HCl 50 mM dengan pH 7,0 guna menjaga kestabilan aktivitas enzim papain. Larutan enzim tersebut selanjutnya mengalami proses pengendapan menggunakan

ammonium sulfat untuk menghasilkan fraksi dengan tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60%, dan 80%. Hasil proses pemurnian menghasilkan empat fraksi enzim, yaitu fraksi dengan tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60%, dan 80%. Setiap fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitas enzimatisnya menggunakan kasein sebagai substrat guna mengetahui aktivitas pada masing-masing fraksi. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi dengan kejenuhan 80% memiliki aktivitas spesifik tertinggi, yaitu sebesar  $10,57975 \times 10^5$  U/g. Sedangkan berdasarkan hasil penelitian Rohmah et al., (2019), Proses Fraksinasi dilakukan sebagai tahap pemurnian awal untuk memisahkan papain dari berbagai senyawa pengganggu, baik berupa protein lain maupun komponen non-protein Papain difraksinasi dari ekstrak berjumlah 31 mL dengan penambahan amonium sulfat secara bertahap pada derajat kejenuhan 40%, kemudian dilanjutkan hingga mencapai rentang kejenuhan 40–80%.

Pengujian aktivitas spesifik pada protease, dapat disimpulkan bahwa fraksi papain dengan tingkat kejenuhan 40–80% menunjukkan nilai aktivitas spesifik tertinggi, yaitu sebesar 2,0819 U/ $\mu$ g, dengan peningkatan faktor kemurnian mencapai 6,86 kali dibandingkan dengan ekstrak papain awal. Hasil pengamatan mikroskopik menghasilkan presipitat menunjukkan adanya kristal dengan morfologi kubus dan tetragonal. Sementara itu, kristal ammonium sulfat yang terbentuk pada kondisi kristalisasi tersebut umumnya memperlihatkan bentuk yang cenderung membulat.

Berdasarkan hasil penelitian Budiharjo *et al* (2017), Proses fraksinasi menggunakan amonium sulfat dilakukan pada tingkat kejenuhan bertahap, yaitu 0–20%, 20–40%, 40–60%, 60–80%, dan 80–100%. Setiap tahapan fraksinasi disertai dengan pengujian aktivitas protease pada fraksi yang dihasilkan untuk menentukan fraksi yang paling optimal. Hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik paling tinggi diperoleh pada fraksi 4, dengan nilai sebesar 58,537 U/mg.

Garam netral berperan dalam memengaruhi tingkat kelarutan protein di dalam larutan. Pada kadar garam yang rendah, kelarutan protein cenderung meningkat, suatu kondisi yang dikenal sebagai *salting-in*. Besarnya efek ini dipengaruhi oleh

kekuatan ionik, yaitu kombinasi antara konsentrasi garam dan muatan listrik kation serta anionnya. Mekanisme *salting-in* terjadi karena gugus rantai samping protein yang sebelumnya tidak bermuatan mengalami perubahan menjadi bermuatan (Malle *et al.*, 2015).

Sebaliknya, peningkatan kekuatan ionik secara berkelanjutan akan menyebabkan penurunan kelarutan protein. Pada kondisi ini, protein mengalami pengendapan yang disebut *salting-out*. Fenomena *salting-out* terjadi akibat konsentrasi garam yang tinggi yang menarik molekul air dari permukaan protein, sehingga lapisan hidrasi protein menipis dan protein mengalami pengendapan.

Proses *salting-in* dan *salting-out* banyak dimanfaatkan sebagai teknik pemisahan protein dari campuran kompleks. Hal ini disebabkan oleh perbedaan karakteristik setiap protein dalam merespons perubahan konsentrasi garam netral. Melalui metode *salting out*, protein dapat mengalami pengendapan secara selektif dan umumnya masih mempertahankan struktur alaminya (Malle *et al.*, 2015).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil kajian berbagai penelitian, teknik salting out dengan amonium sulfat dinilai efektif dalam proses pemurnian enzim papain karena dapat meningkatkan aktivitas spesifik sekaligus kemurnian enzim tanpa menyebabkan penurunan aktivitasnya. Fraksi papain pada tingkat kejenuhan tinggi, terutama antara 40–80% hingga 80%, menghasilkan nilai aktivitas spesifik paling optimal. Mekanisme *salting-in* dan *salting-out* memiliki peranan penting dalam proses pemisahan protein, sehingga metode ini layak digunakan sebagai tahap awal pemurnian papain baik untuk kepentingan penelitian maupun aplikasi di bidang industri.

## REFERENSI

- Babalola, B. A., Akinwande, A. I., Gboyega, A. E., & Otunba, A. A. (2023). Extraction, purification and characterization of papain cysteine-proteases from the leaves of *Carica Papaya*. *Scientific African*, 19.
- Budiharjo, R., Sarjono, P. R., & Asy'ari, M. (2017). Pengaruh Konsentrasi NaCl Terhadap Aktivitas Spesifik Protease Ekstraseluler dan Pertumbuhan Bakteri Halofilik Isolat Bittern Tambak Garam Madura. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 20(3), 142-145.
- Channamade, C., Raju, J. M., Vijayaprakash, S. B., Bora, R., & Shekhar, N. R. (2021). Promise Approach on Chemical Stability Enhancement of Papain by Encapsulation System: A Review. *Journal of Young Pharmacists*, 13.
- Khairunisa, L. F., Widyasanti, A., & Nurjanah, S. (2019). Kajian Pengaruh Kecepatan Pengadukan Terhadap Rendemen dan Mutu Kristal Patchouli Alcohol dengan Metode Cooling Crystalization. *Jurnal Keteknikaan Pertanian Tropis dan Biosistem*, 7(1), 55-66.
- Malle, D., Telussa, I., & Lasamahu, A. A. (2015). Isolation and Characterization of Papain from the latex of Papaya (*Carica Papaya* L). *Ind. J. Chem. Res*, 2, 182-189.
- Nurhaerani, Hartati, & Azmin, N. (2022). Pengaruh Penambahan Buah Pepaya (*Carica papaya*) Terhadap Tekstur Dan Rasa Pada Tempe Kedelai Pada Tempe Kedelai. *JUSTER: Jurnal Sains dan Terapan*, 1(1).
- Rohmah, D. P., Hadi, S., & Baktir, A. (2019). Pemurnian Parsial dan Kritisasi Papain dari Getah *Carica papaya*. *Jurnal Kimia Riset*, 4(2).
- Soleha, M., Maligan, J. M., & Yunianta. (2018). Pengaruh Penambahan Enzim Papain Terhadap Karakteristik Fisik, Kimia, dan Organoleptik Susu Kedelai. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 6 (3), 18-29.