Jurnal Kimia Andalas, ISSN : 0853-8018
Vol. 2, No. 1, 1995 (39-45)

PENGARUH JENIS SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS PROTEOLITIK ENZIM PAPAIN AMOBIL

Zaharasmi Kahar

Laboratorium Kimia, FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Aktivitas proteolitik enzim papain amobil dalam menghidrolisis albumin, kasein dan gelatin sebagai substrat ditentukan secara spektofotometri pada panjang gelombang serapan maksimum 650 nm dengan memakai metoda Anson. Hasil penelitian memperlihatkan terjadi perbedaan kondisi optimum kerja enzim terhadap masing-masing substrat seperti waktu inkubasi, pH, dan konsentrasi substrat . Aktivitas proteolitik enzim papain amobil ternyata lebih tinggi terhadap substrat albumin, dari pada kasein dan gelatin.

ABSTRACT

The proteolytic activities of immobilized papain enzyme in hydrolyzing albumine, casein and gelatine as substrats were determined by spectrophotometry at τ_{max} 650 nm following Anson method. The result showed that there were the differences in optimum condition of enzyme on each substrate, i.e. incubation, pH, and in concentration of substrate. The proteolytic activity of immobilized papain enzyme on albumine substrate was apparently higher than that on casein and on gelatine as well.

PENDAHULUAN

Papain dengan nomer kode sistimatik EC.3.4.4.10 adalah enzim protease, dan merupakan katalis pada reaksi hidrolisis suatu substrat protein. Seperti enzim umumnya, enzim papain mempunyai efisiensi katalitik dan spesifitas yang tinggi dalam jenis reaksi maupun substratnya sehingga sangat efektif dipakai pada enzim pangan (Winarno, 1986).

Pengamobilisasian enzim papain merupakan salah satu cara peningkatan operasional pemanfaatan enzim, yang dapat dilakukan dengan memakai bermacam metoda. Metoda yang sangat sederhana adalah melalui penjebakan ke dalam matrik polimer poliakrilamida (Kawashima, 1974). Metoda ini tidak merusak enzim, secara relatif fungsi katalitik dan struktur tiga dimensi bahagian aktif molekul enzim tidak mengalami gangguan (Chibata, 1978), bahkan kadangkala terjadi peningkatan kestabilan enzim (Smith J.H, 1990). Saat ini pengunaan enzim amobil berkembang dengan pesat baik dalam industri pangan maupun untuk percobaan-percobaan di laboratorium.

Untuk memanfaatkan daya guna enzim amobil secara tepat dan selektif maka perlu pengetahuan mengenai sifat kerja enzim ini dengan substrat-substratnya sehingga dapat digunakan dengan memberikan hasil yang maksimal.

Pada penelitian ini dipakai substrat yang mempunyai struktur yang berbeda sebagai percobaan yaitu albumin, kasein dan gelatin. Seberapa jauh daya katalitik enzim papain amobil dipengaruhi oleh jenis substratnya diamati dari perubahan aktivitas maksimum enzim tersebut dalam menghidrolisis masing-masing substrat pada kondisi optimumnya.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Enzim papain hasil ekstraksi dari getah buah pepaya muda (*Carica papaya*), kasein, albumin, gelatin, tirosin, bufer fosfat, sistein 0,06 M, EDTA 0,01 M, larutan campuran TCA 0,11 M dengan natrium asetat 0,37 M dan asam asetat 0,66 M, amonium persulfat 1%, tetra metil etil diamina (TEMED) 5%, reagen folin, glukosa 50%, pati terlarut 2%.

Metoda

Pembuatan enzim papain amobil

Enzim papain amobil dibuat melalui teknik penjebakan dengan menjaring enzim kedalam matrik polimer poliakrilamida pada komposisi akrilamida 0,600 g dan bis-akrilamida 0,032 g dengan cara sebagai berikut: 1 ml ekstrak enzim papain dan 0,5 ml buffer fosfat pH 7 ditambahkan kedalam campuran akrilamida 0,600 g dan bis-akrilamida 0,032 g, kemudian tambahkan 1 ml sistein 0,06 M, 2 ml pati terlarut 2 % dan 1 ml glukosa 50%, diaduk sampai homogen. Untuk mendapatkan bentuk polimer ditambahkan 1 ml TEMED 5% sebagai katalisator dan 0,5 ml amonium persulfat 1% sebagai inisiator. Larutan diaduk sampai homogen dan dibiarkan membeku sehingga sempurna membentuk gel. Gel ini kemudian dipotong kecil-kecil, dicuci dengan buffer fosfat pH 7 dan diuji aktifitasnya sebagai enzim papain amobil.

Penentuan aktivitas enzim papain amobil

Aktivitas enzim papain amobil ditentukan dengan metoda Spektrofotometri pada panjang gelombang serapan maksimum 650 nm dengan memakai tirosin sebagai standar. 1 unit enzim dihitung melalui metoda Anson yang dinyatakan sebagai sejumlah enzim yang dapat membebaskan 1 mikro mol tirosin per menit. Cara penentuan aktivitas enzim papain amobil adalah sebagai berikut: 10 ml larutan substrat dan 4 ml buffer fosfat pH tertentu, 0,5 ml EDTA 0,01 M dicampur dan prainkubasi selama 10 menit pada suhu tertentu. Setelah itu tambahkan 1 ml enzim papain amobil inkubasi dilanjutkan selama waktu tertentu. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 10 ml larutan campuran TCA dan diamkam dalam air es selama 30 menit, kemudian disaring untuk memisahkan gel papain amobil dari filtratnya. Filtrat diukur serapannya melalui metoda Anson dengan memakai tirosin sebagai larutan standar. Untuk blanko, enzim diinaktifkan dengan campuran larutan TCA, kemudian ditambahkan 4 ml buffer, 0,5 ml EDTA 0,01 M dan terakhir baru ditambahkan larutan substrat.

Penentuan kondisi optimun enzim papain amobil

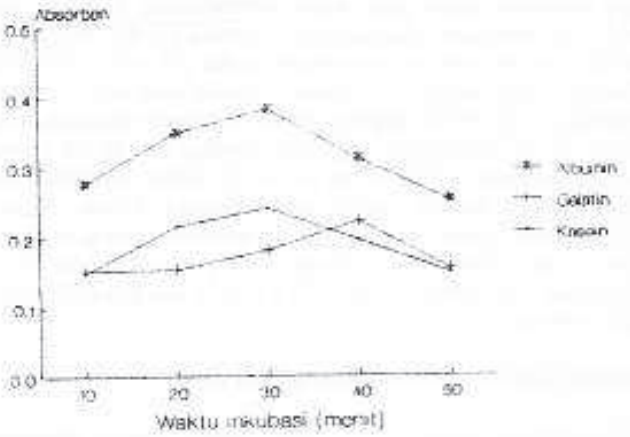
Kondisi optimum enzim papain amobil untuk substrat albumin, kasein, dan gelatin ditentukan terhadap waktu inkubasi, pH, suhu, dan konsentrasi substrat . Waktu inkubasi diteliti antara 10 - 50 menit, pH 5,6 - 8, suhu 55 - 75 °C, dan konsentrasi substrat 1,5 - 3,5 % untuk kasein dan gelatin, 0,25 - 1,50 % untuk albumin. Pada setiap perlakuan untuk menginaktifkan enzim dipakai campuran larutan TCA 0,11 M dengan natrium asetat 0,37 M dan asam asetat 0,66 M.

HASIL DAN PEMBAHASAN

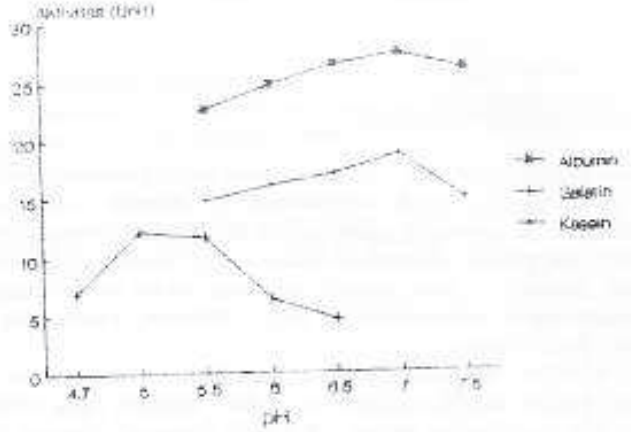
Enzim papain diekstraksi dari getah buah pepaya muda dan dijebak kedalam gel poliakrilamida untuk menjadikannya kebentuk enzim papain amobil. Keefektifan daya katalitik enzim papain amobil dalam menghidrolisis albumin, kasein, dan gelatin diamati terhadap tinggi rendahnya aktivitas proteolitik enzim tersebut pada kondisi optimum reaksi enzimatiknya. Penelitian terhadap waktu inkubasi enzim dengan albumin, kasein, dan gelatin dapat dilihat pada Gambar 1.

Perbedaan struktur gelatin dengan albumin dan kasein menyebabkan enzim papain amobil memerlukan waktu inkubasi yang lebih lama untuk bekerja menghidrolisis gelatin (40 menit) daripada albumin dan kasein (30 menit). Gelatin adalah protein yang berbentuk serabut sedangkan albumin dan kasein berbentuk globular sama dengan bentuk enzim, sehingga kecendrungan albumin dan kasein berinteraksi dengan enzim lebih cepat bila dibandingkan dengan gelatin. Dilain pihak albumin mempunyai BM yang lebih kecil dan

kelarutan yang lebih besar dari kasein sehingga lebih banyak masuk kedalam pori poliakrilamida untuk bereaksi dengan enzim papain amobil. Keadaan ini dapat dilihat dari Gambar 1 absorbsivitasnya lebih tinggi dari kasein.



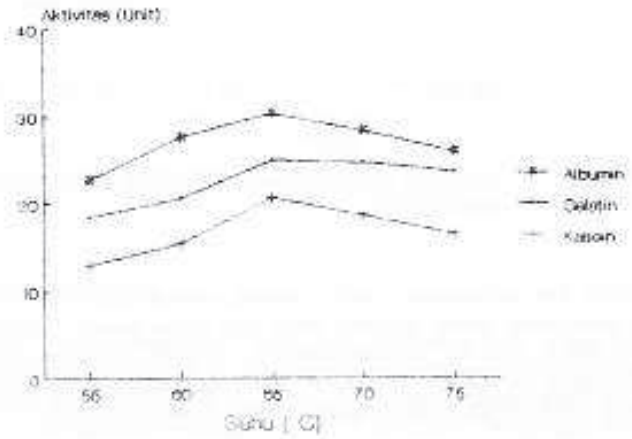
Gambar 1. Hubungan antara absorban dengan waktu inkubasi enzim papain amobil pada pH 7 dan suhu 37°C



Gambar 2. Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim papain amobil dengan waktu inkubasi 40 menit untuk gelatin,30 menit untuk albumin dan kasein, suhu 37 °C.

Enzim bersifat amfolitik, dengan substrat yang berbeda strukturnya, mengakibatkan adaptasi ionisasi kompleks enzim substrat terhadap lingkungan juga berbeda (Winarno, 1986). Hal ini mengakibatkan terjadi perbedaan pH kerja enzim terhadap kasein & albumin dan gelatin dimana pH optimum dengan kasein dan albumin 7 sedangkan dengan gelatin 5.

Penentuan suhu optimum untuk aktivitas proteolitik enzim papain dilakukan pada waktu inkubasi dan pH yang diperoleh pada percobaan di atas.

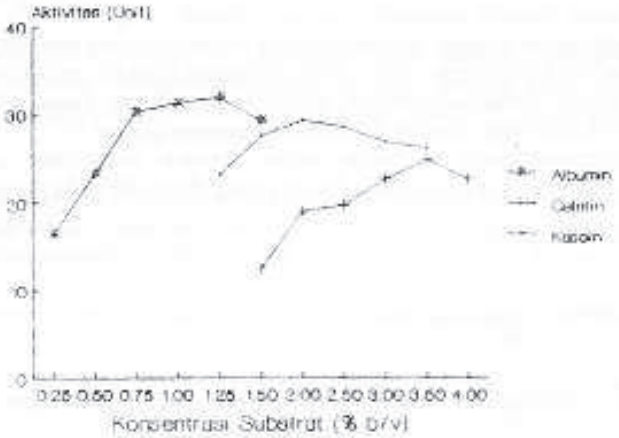


Gambar 3. Hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim papain amobil.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa suhu optimum enzim papain amobil untuk ketiga substrat sama yaitu 65 °C. Perbedaan hanya pada tinggi rendahnya nilai aktivitas enzim tersebut, dimana terjadi peningkatan daya katalitik bila kelarutan substrat lebih besar sedangkan viskositas dan BM substrat makin kecil,

Percobaan selanjutnya untuk penentuan konsentrasi optimum dari ketiga jenis substrat yang dikatalisis oleh enzim papain amobil dilakukan pada waktu inkubasi, pH, dan suhu optimum yang telah diperoleh dari percobaan di atas.

Dari Gambar 4 dapat dilihat, aktivitas optimum enzim papain amobil dengan substrat albumin 32,03 unit yang terjadi pada konsentrasi albumin 1,25 %, untuk kasein aktivitas optimumnya 29,33 unit pada konsentrasi kasein 2 %, sedangkan untuk gelatin aktivitas optimum 25,00 unit pada konsentrasi gelatin 3,5%. Albumin BM nya kecil dan sangat mudah larut didalam air daripada kasein dan gelatin sehingga kecendrungannya ber-antaraksi dengan enzim didalam gel lebih banyak. Ini dapat dilihat albumin hanya memerlukan konsentrasi yang kecil untuk mendapatkan aktifitas enzim yang tinggi, dan berikutnya untuk kasein dan gelatin.



Gambar 4. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas enzim papain amobil.

Harga Km enzim untuk masing-masing substrat ditentukan dengan kurva Lineweaver-Burk, untuk albumin harga Km enzim papain amobil adalah 1,8. 10^{-4} M , kasein 2,3 . 10^{-4} M, dan gelatin 4,3 . 10^{-4} M. Perbedaan harga Km ini menunjukkan perbedaan keefektifan enzim terhadap masing-masing substrat. Albumin lebih efektif dibandingkan dengan substrat yang lain.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa reaksi enzimatik enzim papain amobil dengan albumin, kasein dan gelatin sebagai substrat terjadi pada waktu inkubasi, dan pH yang berbeda, tetapi suhu sama. Untuk albumin dan kasein, masa inkubasi enzim 30 menit, pH 7, dan suhu 65 °C, dan untuk gelatin masa inkubasi 40 menit, pH 5, dan suhu 65 °C. Aktivitas optimum enzim papain amobil terhadap albumin adalah 32,02 unit, untuk kasein 29,33 unit, dan gelatin 25,00 unit.

Keefektifan daya proteolitik dari enzim papain amobil terhadap albumin sebagai substrat lebih besar daripada kasein dan gelatin, dimana harga Km enzim terhadap substrat albumin, kasein dan gelatin adalah $1{,}8.10^{-4}$, $2{,}3.10^{-4}$ dan $4{,}3.10^{-3}$ M.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chibata. I., *Immobilized Enzymes*, Research and Development Kodensha LTD, Tokyo, 1978, 5 - 93.

2. Kawashima, K and Umeda K., *Immobilization of Enzymes by Radio polymeryzation of Acrylamide* , Biotechnology and Bio Enginering, Vol. 16, 1974, 609 - 621.

3. Smith J E., *Prinsip Bioteknologi* , PT Gramedia, Jakarta, 1990, hal 130 - 165.

4. Supardi, W., *Amobilisasi dan Efeknya Terhadap pH Optimum Papain*, Seminar Nasional Kongres Luar Biasa Perhibi, Padang, 1986.

5. Winarno F. G., *Enzim Pangan*, PT Gramedia, Jakarta, 1986.