

REVIEW: IMOBILISASI ENZIM PAPAIN DENGAN SILIKA MESOPORI DAN KARAGENAN SEBAGAI BAHAN PENDUKUNG

IMMOBILIZATION OF PAPAIN ENZYME WITH SILICA MESOPOROUS AND CARRAGEENAN AS SUPPORT MATERIAL

Kuala Wirida Wening and Nuniek Herdyastuti*

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

Universitas Negeri Surabaya

Jl. Ketintang, Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

* Corresponding author, tel/fax : 08175112310, email: nuniekerdyastuti@unesa.ac.id

Abstrak. *Papain adalah enzim protease dari tanaman pepaya yang menghidrolisis protein menjadi asam amino. Papain memegang peranan penting di lingkungan industri sehingga umumnya papain diimobilisasi dalam bahan pendukung untuk memaksimalkan fungsinya. Review ini bertujuan membahas literatur terbaru mengenai imobilisasi enzim papain pada bahan pendukung silika mesopori dan imobilisasi enzim papain pada bahan pendukung karagenan. Metode yang digunakan adalah kajian literatur. Kajian dari data sekunder meliputi enzim papain dapat diimobilisasi menggunakan satu atau lebih teknik seperti adsorpsi, ikat silang, penjebakan, dan pengikatan kovalen. Interaksi elektrostatik menjadi gaya pendorong utama papain teradsorpsi ke dalam silika mesopori atau terjebak ke dalam gel karagenan. FTIR (Fourier-transform Infrared Spectroscopy), molecular docking, dan MD simulation (Molecular Dynamics) digunakan untuk menganalisis keberadaan papain di dalam bahan pendukung. Karakteristik papain seperti pH, suhu, aktivitas, dan pemakaian berulang akan berubah sebagai hasil dari proses imobilisasi.*

Kata kunci : *Enzim papain, imobilisasi enzim, silika mesopori, karagenan*

Abstract. *Papain is a protease enzyme obtained from papaya plant that able to hydrolysis protein into amino acid. Papain plays an important role in the industrial fields so generally papain immobilized on support material to maximize its function. This review is intended to describe the recent development of papain immobilized in silica mesoporous and papain immobilized in carrageenan. The method used was a literature review. The review of secondary data includes papain can be immobilized using one or more methods, like adsorption, cross-linking, entrapment, and covalent binding. Electrostatic interaction becomes the main driving force for papain adsorbed onto silica mesoporous or entrapped in carrageenan. FTIR (Fourier-transform Infrared Spectroscopy), molecular docking, and MD simulation (Molecular Dynamics) were used to analyze the presence of papain in the support material. The characteristics of the papain such as pH, temperature, activity, and repeated usage will change as a result of the immobilization process.*

Key words: *Papain enzyme, enzyme immobilization, silica mesoporous, carrageenan*

PENDAHULUAN

Enzim merupakan katalis yang dihasilkan oleh sel hidup dan banyak digunakan dalam proses metabolisme organisme hidup. Enzim bertindak sebagai katalis yang penting karena pada kondisi lingkungan yang tidak ekstrim enzim menunjukkan selektivitas, spesifisitas, dan laju reaksi yang tinggi sehingga berpotensi digunakan dalam berbagai bidang industri, mulai dari industri makanan sampai industri obat-obatan

[1–3]. Enzim memiliki peran yang berbeda-beda bergantung pada jenisnya. Enzim yang berperan dalam proses hidrolisis protein menjadi asam amino dengan jalan memutus ikatan peptida disebut enzim protease [4–6]. Hampir 43,85% enzim protease dapat diperoleh dari tumbuhan, salah satunya adalah enzim papain yang berasal dari buah pepaya [6]. Enzim papain dapat diaplikasikan diberbagai bidang, seperti bidang makanan, kesehatan, limbah, dan lain sebagainya.

Pada industri makanan umumnya papain digunakan untuk pengempukan daging, penjernihan sari buah dan bir, hidrolisat protein, serta dalam produksi keju. Pada industri kesehatan, papain berfungsi dalam perawatan luka ringan maupun luka bakar [7]. Saat ini enzim papain juga dipertimbangkan sebagai zat pengobatan kanker karena papain dapat memecah protein fibrin yang bertindak sebagai lapisan pelindung sel kanker [8].

Penggunaan enzim papain yang luas memerlukan stabilitas dan aktivitas enzim yang lebih stabil dan tinggi. Umumnya enzim memiliki berbagai batasan sehingga kurang efisien jika digunakan dalam skala besar. Batasan tersebut meliputi stabilitas termal yang rendah, jangkauan pH yang kecil, sensitif terhadap lingkungan proses, dan hilangnya aktivitas katalis setelah satu siklus pemakaian [9,10]. Hal tersebut mendorong para peneliti untuk menjaga kestabilan enzim dengan berbagai cara, salah satunya adalah imobilisasi enzim.

Imobilisasi enzim adalah cara yang tepat agar papain dapat digunakan dalam industri. Metode tersebut membuat reaksi menjadi lebih terkontrol, enzim dapat digunakan berulang kali, sebab papain mudah dipisahkan dari campuran reaksi. Selain itu, papain yang terimobilisasi menunjukkan kemampuan beradaptasi yang baik terhadap berbagai macam desain teknik [11]. Imobilisasi enzim juga meningkatkan sifat selektifitas, spesifisitas, penyimpanan dan stabilitas enzim terhadap agen pendenaturasi seperti: panas, pH ekstrim dan pelarut organik [12].

Imobilisasi menyebabkan enzim tidak dapat bergerak bebas karena terjadi interaksi fisik atau kimia dengan bahan pendukung. Jenis bahan pendukung untuk imobilisasi ada berbagai macam. Bahan-bahan tersebut harus dipilih dengan cermat sesuai dengan metode imobilisasi dan aplikasi enzim [13]. Hal ini dikarenakan karakteristik dari bahan pendukung mendapat peran yang penting dalam menentukan kinerja sistem imobilisasi. Bahan pendukung imobilisasi digolongkan dalam dua jenis yaitu organik dan anorganik. Polisakarida, protein, polistirene dan polimer lainnya termasuk dalam bahan pendukung organik sedangkan mineral alam seperti silika dan bentonit termasuk dalam pendukung anorganik [14].

Bahan anorganik yang akhir-akhir ini mendapat banyak perhatian untuk imobilisasi

enzim papain adalah silika mesopori. Silika mesopori menjadi bahan pendukung yang menjanjikan sebab silika mesopori memiliki luas permukaan besar, tidak larut dalam air, dan memiliki gugus fungsi yang memadai untuk pengikatan enzim pada permukaannya maupun untuk modifikasi lebih lanjut, serta tahan terhadap serangan mikroba karena bahan anorganik tidak berfungsi sebagai substrat tempat bakteri atau jamur tumbuh sehingga tidak mengganggu proses imobilisasi [15]. Namun, dalam lingkungan industri bahan organik juga tetap menjadi pilihan yang baik. Bahan organik yang dapat digunakan dalam imobilisasi papain salah satunya adalah karagenan. Penggunaan karagenan banyak ditemukan di industri farmasi dan kosmetik. Karagenan tergolong bahan yang tidak mahal dan dapat bertahan lama sehingga berpotensi sebagai bahan pendukung untuk imobilisasi biokatalis. Bahan pendukung yang dapat bertahan lama memiliki ketahanan terhadap lingkungan proses imobilisasi yang baik. Salah satu jenis karagenan yang populer sebagai bahan pendukung adalah κ -karagenan. Metode imobilisasi yang umum digunakan dengan bahan pendukung karagenan adalah metode penjebaran [16].

Artikel review ini bertujuan untuk membahas mengenai imobilisasi enzim papain dalam dua bahan pendukung yang berbeda, yaitu imobilisasi papain pada bahan pendukung anorganik berupa silika mesopori, dan imobilisasi papain pada bahan pendukung organik yaitu karagenan.

IMOBILISASI ENZIM

Imobilisasi enzim adalah teknologi dimana enzim dipasangkan ke dalam bahan pendukung sehingga menciptakan sistem imobilisasi yang heterogen [17]. Metode ini menempatkan enzim dalam wilayah ruang tertentu sehingga terbatas secara fisik dan dapat digunakan secara berkelanjutan [18]. Beberapa kelebihan dan kekurangan dari penggunaan imobilisasi ditunjukkan pada Tabel 1.

Pada dasarnya terdapat dua fungsi penting yang harus diperhatikan sebelum melakukan imobilisasi, pertama *non catalytic function* (NCF), yaitu imobilisasi enzim memberikan pemisahan yang mudah sehingga prosesnya dapat dikontrol dan enzim dapat digunakan kembali. Kedua adalah *catalytic function* (CF) yang berfungsi mengubah substrat menjadi produk [19]. Fungsi-fungsi tersebut

dapat tercapai apabila dilakukan pemilihan teknik dan bahan pendukung imobilisasi yang tepat.

Tabel 1. Manfaat dan Kerugian Imobilisasi

Manfaat Imobilisasi	Kerugian Imobilisasi	Sumber
Mencegah kontaminasi produk	Peningkatan biaya pada pemrosesan	[20]
Kemudahan pemisahan dari campuran reaksi dan penggunaan Kembali	Proses imobilisasi yang memakan waktu lebih banyak	[21]
Peningkatan stabilitas dalam kondisi lingkungan yang keras	Hilangnya aktivitas dan adanya keterbatasan difusi	[20, 21]

TEKNIK IMOBILISASI ENZIM

Enzim diimobilisasi dalam bahan pendukung menggunakan berbagai macam metode. Secara umum metode imobilisasi dibagi menjadi empat kelompok, yaitu metode adsorpsi, penjebakan, pengikatan kovalen dan ikat silang [22]. Pada beberapa kasus, dapat digunakan lebih dari satu metode imobilisasi untuk mendapatkan hasil terbaik.

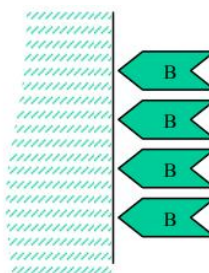
Adsorpsi

Adsorpsi merupakan metode imobilisasi enzim yang sangat sering digunakan dan termasuk metode yang cukup sederhana. Metode ini memungkinkan enzim teradsorpsi dalam bahan pendukung dengan membentuk ikatan yang berkekuatan lemah dan *reversible*. Ikatan yang terlibat merupakan ikatan hidrogen, gaya van der Waals, interaksi ionik, hidrofobik, dan terkadang melibatkan pengikatan afinitas. Ikatan tersebut mudah dipengaruhi oleh perubahan lingkungan seperti suhu, kekuatan ionik dan pH, sehingga menyebabkan ikatan tidak stabil dan dapat menyebabkan kebocoran serta berakibat pada rendahnya reproduktifitas [23]. Metode adsorpsi terlihat seperti Gambar 1.

Metode adsorpsi dinilai cukup menguntungkan karena tidak merubah struktur enzim sehingga aktivitasnya tetap terjaga dan situs aktif enzim terlindungi dari gangguan luar. Keberhasilan metode imobilisasi dipengaruhi oleh kondisi pada saat proses berlangsung, sebab tidak semua enzim dapat diimobilisasi dengan

semua bahan pendukung. Adanya gugus aktif spesifik pada bahan pendukung dapat membantu terjadinya interaksi antara bahan pendukung dengan enzim. Apabila tidak terdapat gugus aktif spesifik maka dapat ditambahkan agen perantara (*carrier modifier*) [10].

Bahan pendukung yang digunakan dalam metode adsorpsi beragam jenisnya. Pemilihan pendukung tersebut disesuaikan dengan enzim dan aplikasinya. Contoh bahan pendukung yang digunakan dalam metode ini adalah silika, emas, film sol-gel titania, zirkonia, gel alumina atau aluminium, zeolit, bentonit, kitosan, selulosa, dan lain sebagainya [10].



Gambar 1. Metode adsorpsi enzim pada bahan pendukung [23]

Penjebakan

Metode penjebakan adalah metode *irreversible* yang membuat enzim terjebak dalam jaringan polimer alam maupun sintesis. Metode ini dapat dilakukan dengan penjeratan serat (*fiber entrapping*), gel, atau mikroenkapsulasi [9] seperti pada Gambar 2. Mikroenkapsulasi sendiri merupakan metode dimana enzim dikelilingi oleh lapisan yang membentuk kapsul bola kecil dengan diameter antara beberapa mikrometer – millimeter [24].



Gambar 2. A. Metode penjebakan enzim dalam gel dan B. Mikroenkapsulasi [22]

Metode penjebakan memiliki kekurangan dan kelebihan. Keterbatasan transfer massa, muatan enzim yang kecil dan kemungkinan kebocoran menjadi kekurangan metode tersebut. Kebocoran cenderung terjadi karena ukuran pori bahan pendukung yang terlalu besar. Umumnya bahan pendukung yang digunakan adalah alginat,

kolagen, karagenan, gelatin, PVA, poliakrilamida, dan polimer lainnya. Namun, dibandingkan dengan metode adsorpsi fisik, metode penjerapan lebih baik dalam mencegah kebocoran [23,25]. Keuntungan metode ini adalah kemurnian yang tinggi, suhu pemrosesan yang rendah, biokompatibilitas, keseragaman, kemudahan pembuatan strategi dan kemudahan mengontrol morfologi serta jumlah enzim yang terperangkap [26]. Aktivitas enzim juga akan tetap terjaga karena tidak terjadi perubahan biologis [27].

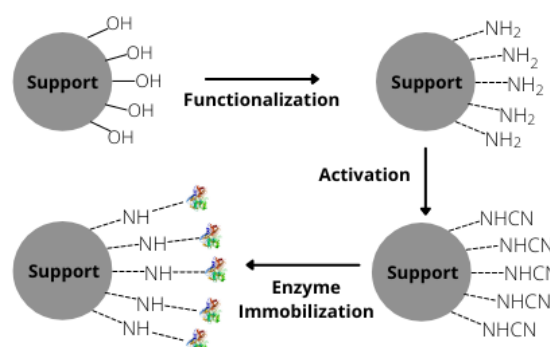
Pengikatan Kovalen

Metode pengikatan kovalen merupakan metode imobilisasi enzim yang paling banyak digunakan. Proses imobilisasi melibatkan interaksi enzim dengan bahan pendukung pada gugus fungsional yang tidak mengganggu aktivitas katalitik. Contohnya melalui rantai samping asam amino lisin, aspartat, sistein, dan residu asam glutamat, atau gugus fungsional lain yang tepat untuk pembentukan ikatan kovalen seperti gugus imidazole, karboksilik, fenolik dan indol [22,27]. Gugus fungsional ($-NH_2$, $-OH$, $-SH$, $COOH$) juga dapat ditambahkan pada bahan pendukung dengan metode fungsionalisasi [28].

Proses pengikatan kovalen terjadi melalui dua tahap, pertama yaitu tahap pengaktifan permukaan bahan pendukung yang melibatkan glutaraldehid atau karbodiimida sebagai senyawa penggabung. Tahap kedua adalah pengikatan kovalen enzim dengan bahan pendukung yang telah aktif bersama senyawa penggabung. Senyawa penggabung berfungsi sebagai jembatan antara permukaan pendukung dan enzim [28]. Mekanismenya ditunjukkan pada Gambar 3. Proses imobilisasi yang dirancang dengan benar akan menunjukkan hasil yang maksimal. Jika proses tidak diperhatikan, maka dapat berefek pada efisiensi katalitik. Sebagai contoh, ikatan kovalen enzim dengan bahan pendukung tidak boleh mempengaruhi asam amino yang berhubungan dengan situs aktif enzim karena dapat menyebabkan aktivitasnya berkurang [21].

Metode pengikatan kovalen lebih unggul karena memiliki ikatan kimia yang kuat. Ikatan tersebut dapat mencegah terjadinya kebocoran dan meningkatkan stabilitas enzim [21]. Bahan pendukung yang dapat digunakan dalam metode ini adalah bahan anorganik seperti CPG (*Controlled Pore Glass*), silika, titania, zirkonia,

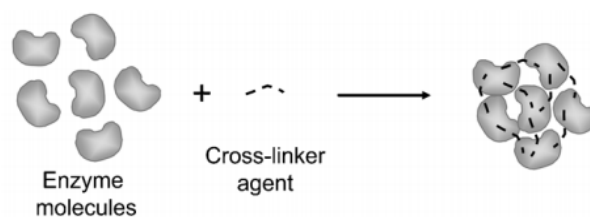
alumina, dan bahan organik seperti selulosa, atau polimer sintetik seperti nilon [27, 29].



Gambar 3. Proses pengikatan kovalen pada bahan pendukung anorganik. [29]

Ikatan Silang

Pengikatan silang merupakan metode dimana enzim (baik menggunakan bahan pendukung maupun tidak) diikat menjadi agregat makro besar yang tidak larut menggunakan agen bi atau multifungsi seperti pada Gambar 4. Agen ini bertindak sebagai penghubung antar molekul enzim sehingga menjadi agregat. Glutaraldehid oligomers atau bis-imidoesters merupakan salah satu contoh agen penghubung yang dapat digunakan, tetapi glutaraldehid dapat menyebabkan aktivitas enzim hilang dikarenakan adanya modifikasi dan perubahan konformasi enzim yang mungkin terjadi. Sebaliknya, stabilitas enzim meningkat dan kebocoran enzim dapat diminimalisir dengan adanya ikatan kimia yang kuat yaitu ikatan kovalen [28, 30].



Gambar 4. Metode ikat silang [31]

Pada metode ikat silang, terdapat dua pendekatan yaitu *Cross Linking Enzyme Crystal* (CLEC) dan *Cross Linking Enzyme Aggregate* (CLEA). CLEC diperoleh dengan pengikatan silang kovalen dari protein yang mengkristal. Teknik tersebut memerlukan enzim murni tanpa pengotor sehingga menjadi biokatalis yang tepat bagi banyak konfigurasi reaktor [31]. CLEC memiliki produktivitas volumetrik dan kemampuan katalis yang tinggi, mudah didaur

ulang dan mudah dikontrol ukuran partikelnya. CLEC menunjukkan stabilitas yang baik terhadap agen pendenaturasi (pelarut organik, panas, dan proteolisis) dibandingkan dengan enzim terlarut, tetapi proses tersebut cukup melelahkan dan memerlukan biaya tinggi. Perkembangan baru dari metode CLEC hadir dengan biaya yang lebih rendah dan tanpa menggunakan enzim murni, yaitu CLEA [32]. CLEA diperoleh melalui pengendapan dan agregasi dengan ikat silang yang dipicu oleh penambahan pelarut organik, garam, asam atau polimer non ionik [33]. CLEC dan CLEA menunjukkan aktivitas 10 sampai 1000 kali lebih besar dari biomolekul yang terikat pada bahan pendukung. Metode ini bermanfaat bagi enzim yang tidak dapat distabilkan dengan imobilisasi pada bahan pendukung, serta sesuai untuk proses yang memerlukan produktivitas tinggi [34].

BAHAN PENDUKUNG IMOBILISASI

Bahan yang digunakan untuk mengikat enzim dalam proses imobilisasi disebut pembawa (*carrier*) atau pendukung (*support*). Mempertimbangkan pendukung untuk imobilisasi sama pentingnya dengan mempertimbangkan metode imobilisasi, karena bahan pendukung juga menentukan keberhasilan imobilisasi. Bahan pendukung diharapkan memiliki stabilitas termal yang tinggi, sifat fisik dan kekuatan mekanik yang baik, tidak larut dalam larutan imobilisasi, tidak beracun, ramah lingkungan, harganya relatif murah serta tidak menyebabkan enzim terdenaturasi [15,23]. Pada bahan pendukung yang berpori, harus disesuaikan dengan ukuran molekul enzim. Diameter pori pendukung disarankan lebih besar sekitar 4-5 kali lipat dari diameter enzim sehingga terjadi pelapisan penuh pada permukaan bahan pendukung [35].

Bahan pendukung digolongkan dalam dua kelompok yaitu organik dan anorganik. Berbagai jenis bahan pendukung organik seperti biopolimer atau polimer sintetik telah banyak diteliti untuk imobilisasi enzim. Biopolimer memiliki keunggulan yaitu kondisi sintesis yang ringan, sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, biostabilitas dan biofungsionalitas yang baik, sedangkan polimer sintetik memiliki keunggulan dalam mengikat kuat enzim pada porusnya. Polimer sintetik merupakan resin penukar ion yang permukaannya berpori dan tidak dapat larut di alam [13]. Bahan pendukung anorganik seperti silika, keramik berpori, dan bahan anorganik lain

memiliki keunggulan berupa kekakuan dan porositas yang menjamin bentuk dan volume tetap serta sifat resistensi yang baik terhadap mikroba. Bahan anorganik juga memiliki ketahanan termal dan mekanisme yang lebih tinggi [29]. Jenis-jenis bahan pendukung yang sering digunakan terlihat seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Jenis-Jenis Bahan Pendukung

Bahan Pendukung			
Organik		Anorganik	Sumber
Biopolimer	Polimer Sintetik		
Alginat	DEAE	Silika	[13, 36]
Kitosan	selulosa	Keramik	[13, 36]
Kolagen	PVC	Kaca	[36]
Karagenan	Polistirena	Zeolit	[36]
Pati	Poliamida	Karbon	[36]
	Poliurethan	teraktivasi	
Selulosa		Alumina	[13, 36]
Pektin		Zirkonia	[13, 36]
Sepharose		Charcoal	[36]

Silika Mesopori

Silika Mesopori (MPS) merupakan bagian dari nanomaterial, hasil modifikasi silika koloid secara sintesis yang memiliki pori-pori berskala meso berukuran 2-50 nm. Silika mesopori banyak digunakan dibidang biomedis karena ukuran pori yang mudah dikontrol, besarnya volume pori dan luasnya area permukaan spesifik [37].

Silika mesopori dapat diperoleh dengan menggunakan *surfactant templating*, contohnya adalah metode *liquid crystal templating*. Penggunaan surfaktan diperlukan sebagai template karena surfaktan berperan dalam pembentukan struktur dan ukuran pori. Pada metode tersebut kalsinasi dilakukan untuk menghilangkan surfaktan saat lapisan silika telah terbentuk sehingga diperoleh silika mesopori [38].

Hasil penelitian pertama mengenai silika mesopori dipublikasikan pada tahun 1990 yang dikenal sebagai FSM-n (*Folded Sheet Material*, n = jumlah atom karbon pada rantai alkil surfaktan). FSM-n merupakan silika mesopori dengan persebaran ukuran pori tidak seragam. Pada tahun 1992 MCM-41 (*Mobil Composition of Matter* No,41), MCM-48, dan MCM-50 diperkenalkan sebagai bagian dari M41S (kelompok material mesopori) yang memiliki persebaran pori lebih baik. Selanjutnya peneliti

mensintesis material silika mesopori dan menghasilkan struktur kubik tiga dimensi bernama SBA-1 (*Santa Barbara Material No.1*), bentuk pori yang lebih besar berukuran 5-30 nm disebut SBA-15. Pengembangan material silika mesopori terbaru adalah MCFs (*Mesostructured Cellular Foams*) dengan ukuran pori dan volume yang lebih besar sehingga sesuai digunakan sebagai bahan pendukung imobilisasi [15].

Silika mesopori sebagai bahan pendukung memiliki volume pori dan luas permukaan yang besar. Enzim mudah terperangkap dalam pori dan tidak bebas bergerak, dengan demikian stabilitas enzim meningkat. Bahan pendukung tersebut populer dalam imobilisasi enzim karena struktur porinya mudah disesuaikan dan mampu melindungi enzim dari suhu dan konsentrasi garam tinggi, serta pH ekstrim [39].

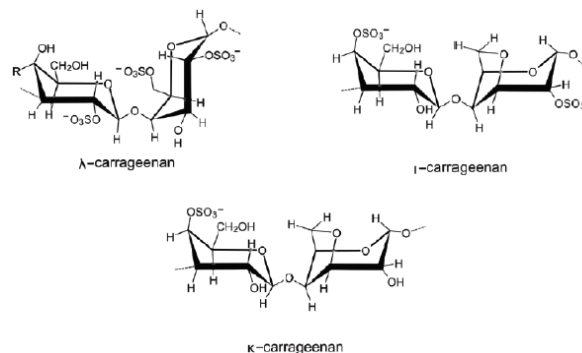
Karagenan

Karagenan adalah polisakarida yang berasal dari spesies rumput laut merah dan bersifat hidrofilik. Karagenan diperoleh dari proses isolasi sel rumput laut menggunakan alkali panas. Rumput laut tersebut banyak ditemukan di Amerika utara, Filipina, Atlantik Eropa dan Indonesia. Secara umum karagenan bersifat *pseudoplastik* dimana dibawah tegangan geser akan menipis dan setelah tegangan dihilangkan viskositasnya akan kembali [36]. Sebanyak 3,167% sulfur terkandung dalam karagenan, dan terdapat satu gugus sulfat disetiap molekul karagenan [40].

Terdapat enam jenis dasar karagenan yang tersusun dari unit berulang D-galaktosa dan 3,6-anhidro-D-galaktosa, yaitu: Kappa (κ), Iota (ι), Lambda (λ), Theta (θ), Nu (ν), dan Mu (μ) [13]. Perbedaan antara keenam karagenan ini terletak pada posisi dan jumlah gugus sulfat pada galaktosa. Utamanya karagenan yang sering digunakan ada tiga jenis yaitu Kappa (κ), Iota (ι), dan Lambda (λ), strukturnya dapat dilihat pada Gambar 5. Sebagai bahan pendukung imobilisasi, Kappa paling banyak digunakan diantara jenis karagenan yang lain [41].

κ -karagenan secara khusus diperoleh dari rumput laut *Euchema cottonii*. Karagenan tersebut memiliki gugus fungsional pada permukaannya, sifat mekanik yang baik, tahan terhadap mikroba, dan harga jual yang murah [42]. κ -karagenan mudah larut di air panas, sifat

hidrofiliknya lebih rendah dari iota atau lamda karagenan [43].



Gambar 5. Struktur kappa, iota, dan lamda karagenan [41]

Karagenan dapat meningkatkan viskositas dan mengarah pembentukan gel sehingga dimanfaatkan sebagai penstabil, pengental, dan pembentuk gel. Gel yang terbentuk dari κ -karagenan bersifat termoreversibel dan kuat. Oleh karenanya digunakan sebagai bahan pendukung imobilisasi dengan metode penjebakan atau enkapsulasi. Karakteristik gel kappa berbeda dari iota atau lamda karagenan. Gel iota adalah gel yang bersifat elastis dan lunak, sedangkan lamda tidak dapat membentuk gel. [43].

Pembentukan gel karagenan diakibatkan oleh proses gelasi, yaitu terjadinya perubahan konformasi dari kumparan acak (*random coil*) menjadi heliks. Heliks identik yang berdekatan akan membentuk heliks ganda, kemudian beragregasi dengan bantuan kation sehingga terbentuk jaringan tiga dimensi. Kation yang umum digunakan adalah kation logam alkali. K^+ dan Rb^+ merupakan kation yang paling efektif. Faktor lain yang mempengaruhi pembentukan gel selain keberadaan kation adalah suhu, konsentrasi polimer, dan kekuatan ionik larutan [43].

ENZIM PAPAIN

Papain (EC 3.4.22.2) merupakan enzim protease yang termasuk dalam sistein endopeptidase, dapat diperoleh dari beberapa sumber diantaranya dari getah pepaya (*Carica papaya* L.) [44]. Getah pepaya dapat ditemukan di bagian batang, daun dan buah pepaya, tetapi pada bagian buah aktivitas enzim papain lebih tinggi. Aktivitas proteolitik pada buah pepaya sebanyak 400 unit/gram sedangkan pada bagian

daun dan batang hanya sebesar 200 unit/gram [45]. Pepaya yang digunakan sebaiknya adalah pepaya yang belum matang dengan usia 2-3 bulan, karena buah pepaya yang masih muda memiliki aktivitas enzim papain yang tinggi [45,46]. Salah satu cara untuk memperoleh enzim papain adalah dengan memotong kulit buah pepaya kemudian dikumpulkan dan getah yang mengalir dari bagian potongan tersebut dikeringkan [46].

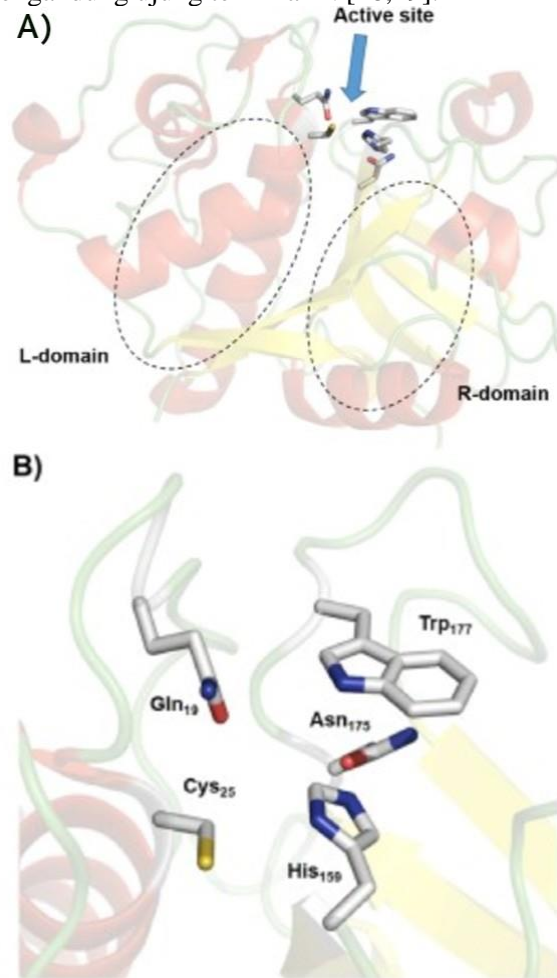
Struktur dan Sifat Papain

Papain memiliki berat molekul sebesar 23,406 DA dan mudah aktif pada pH optimum kisaran 3-9 dalam substrat yang berbeda. Papain secara khusus memecah ikatan peptida dari protein yang melibatkan asam amino seperti lisin, arginin dan residu setelah fenilalanin [46]. Aktivitasnya cukup tinggi, ketahanan suhu dan stabilitas termalnya cukup baik. Papain bekerja dalam suhu optimum 65°C dan tergolong tidak beracun [47,48].

Papain tersusun atas protein globular yang mengandung 212 asam amino dengan tiga ikatan disulfida dan terdiri dari dua domain yaitu domain L dan R dimana pada domain L terdapat α -heliks, sedangkan pada domain R terdapat β -barrel-sheets. Pada celah antarmuka kedua domain yang berbentuk V terdapat situs aktif enzim [48]. Didalam situs aktif tersebut aktivitas katalitik diatur oleh diad katalitik (asam amino yang terkoordinasi dalam situs aktif) yang merupakan pasangan ion Cys-His⁺. Selain diad katalitik terdapat juga residu lain seperti Asn175 dan Gln19 yang diperlukan untuk penataan posisi dari diad katalitik [49]. Struktur enzim papain seperti pada Gambar 6.

Secara khusus Gln19 berperan dalam membentuk lubang oksianion dengan menstabilkan zat antara. Asn-175 berperan dalam mengarahkan cincin imidazol His-159 dan Trp-177 berperan dalam pembentukan karakter nukleofilik diad katalitik. Mekanisme katalitik papain terjadi ketika gugus sulfhidril atau thiol (-SH) dari Cys25 melakukan serangan nukleofilik pada karbon karbonil di ikatan peptida substrat, membebaskan ujung amina protein dan memutus ikatan peptida sehingga terbentuk zat antara tetrahedral yang tidak stabil. Zat antara kemudian hilang dan terjadi regenerasi gugus karbonil yang mengarah pada pembentukan kompleks enzim asil. Selanjutnya terjadi hidrolisis dimana kedudukan gugus amina yang telah hilang diganti

oleh molekul OH sehingga hasil akhirnya akan menjadi enzim bebas dan substrat yang mengandung ujung terminal-N [48,49].



Gambar 6. A. Struktur Enzim Papain, B. Situs Aktif Papain [48]

Imobilisasi Papain

Papain telah diimobilisasi dengan berbagai macam teknik dan bahan pendukung. Aplikasi enzim papain dibagi bidang industri menjadi lebih mudah karena papain bebas sangat mudah terdenaturasi dan terdeaktivasi ketika berada dikondisi lingkungan ekstrim. Papain bebas juga sulit dipisahkan dari campuran reaksi sehingga tidak dapat digunakan berkelanjutan [50]. Oleh sebab itu, dilakukan imobilisasi agar enzim papain dapat digunakan secara maksimal.

Imobilisasi Papain dengan Silika

Wenyue Bian dkk, mensintesis silika mesopori SBA-15 yang dimodifikasi dengan

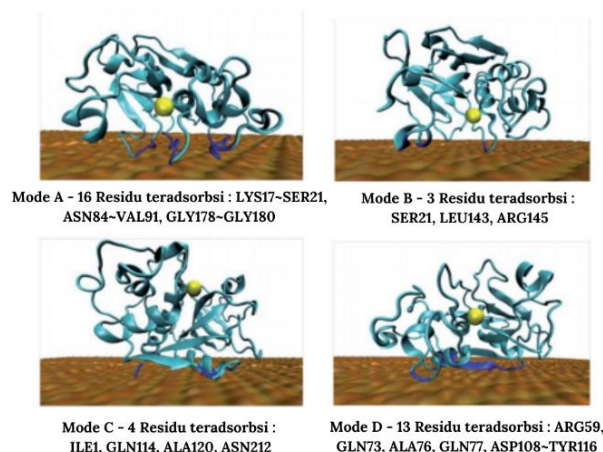
cairan ionik suhu kamar atau yang disebut *Room Temperature Ionic Liquid* SBA-15 (RTIL-SBA-15) untuk imobilisasi enzim papain [51]. Hasil imobilisasi enzim papain menunjukkan terjadinya interaksi enzim papain dengan bahan pendukung melalui gaya elektrostatis, dimana titik isoelektrik (pI) papain berkisar 8,75. Pada pH di bawah pI enzim bermuatan positif dan di atas pI enzim bermuatan negatif. Titik isoelektrik SBA-15 berkisar 2 sehingga permukaan SBA-15 bermuatan negatif pada pH di atas 2. Dalam RTIL-SBA-15, kation [Simim+] digunakan untuk mengikat papain dengan gaya elektrostatis. Ketika pH buffer berada dalam kisaran antara 2 dan 8,75, tarikan elektrostatis akan mendukung imobilisasi papain ke SBA-15. Hasil imobilisasi enzim dalam hidrolisis kasein menunjukkan aktivitas papain yang diimobilisasi pada RTIL-SBA-15 lebih tinggi daripada SBA-15 tanpa modifikasi, yaitu sebesar 0,8 U/mg. pH optimum papain yang diimobilisasi juga bergeser lebih tinggi daripada enzim papain bebas [51].

Interaksi elektrostatis juga dijelaskan oleh Yung-Chin dkk, yang mengimobilisasi enzim papain dalam silika mesopori jenis kubik FDU-12 berpori besar dan difungsionalisasi dengan asam karboksilat (-COOH), dituliskan sebagai LP-FTC-x [52]. Dalam kasus tersebut enzim papain bermuatan positif dan kapasitas adsorpsi papain dipengaruhi oleh pH larutan. Ketika pH larutan meningkat dari 7.0 ke 8.2, kapasitas adsorpsi papain ke LP-FTC-x meningkat. Kapasitas adsorpsi maksimum terjadi pada LP-FTC-30 masing-masing sebesar 823 mg g⁻¹ pada pH 7.0 dan 895 mg g⁻¹ pada pH 8.2. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa interaksi elektrostatis yang terjadi antara papain bermuatan positif dan partikel LP-FTC-x bermuatan negatif adalah gaya pendorong utama imobilisasi papain untuk menghasilkan kapasitas adsorpsi tinggi [52].

Pada tahun 2014 Jia He dkk, berhasil mengimobilisasi enzim papain pada silika berpori jenis SBA-1 yang memiliki kapasitas tinggi untuk imobilisasi papain [53]. Enzim papain yang berukuran lebih kecil dari pori-pori SBA-1 menyebabkan papain teradsorpsi di permukaan luar partikel dan juga memungkinkan papain teradsorpsi ke dalam pori. Interaksi elektrostatis dan gaya van der Waals mendorong terjadinya adsorpsi secara bersamaan. Mekanisme adsorpsi yang terjadi dianalisa menggunakan *molecular docking*, simulasi MD (*Molecular Dynamics*) dan

perhitungan MM-PBSA (*Molecular Mechaniscs Poisson-Boltzmann Surface Area*) [53].

Hasil dari *molecular docking* dan simulasi MD memungkinkan ada empat mode imobilisasi yaitu mode A,B,C dan D seperti pada Gambar 7. Analisis perhitungan dengan MM-PBSA menunjukkan mode D sebagai mode adsorpsi yang paling stabil. Pada mode D ekor terminal-C (ASN212) bersentuhan dengan permukaan silika. Ekor terminal-N berbalik dari permukaan silika dan membuat enzim papain terikat melalui bidang *a-helix* (ASP108-TRY116), *b-sheet* (GLN73, ALA76, GLN77), dan belokan (ARG59). Interaksi papain dengan permukaan bahan pendukung disertai dengan sedikit terbukanya *a-helix*. Sisi aktif termasuk gugus katalik CYS25 dan HIS169 beserta residu yang menyertainya dilaporkan tidak tertutup permukaan SBA-1 tetapi terbuka dan terpapar pelarut. Hal tersebut memberikan kemampuan papain untuk menghidrolisis protein lebih lanjut [53].



Gambar 7. Gambaran papain setelah adsorpsi yang diklasifikasikan dalam Mode A,B,C dan D [53]

Karakterisasi enzim papain seperti pH, suhu, stabilitas termal dan penyimpanan dianalisis pada imobilisasi enzim papain dengan komposit hidrogel berbasis silika mesopori [54]. Komposit hidrogel terdiri dari karboksimetil selulosa kulit nanas, PVA dan SBA-15. Papain diimobilisasi menggunakan metode adsorpsi dan ikat silang dengan glutaraldehid sebagai jembatan ligan agar papain dan komposit hidrogel saling terikat silang. Nilai pH optimum papain yang terimobilisasi sebesar 6.5 telah menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi. Aktivitas papain imobil menurun pada pH di atas

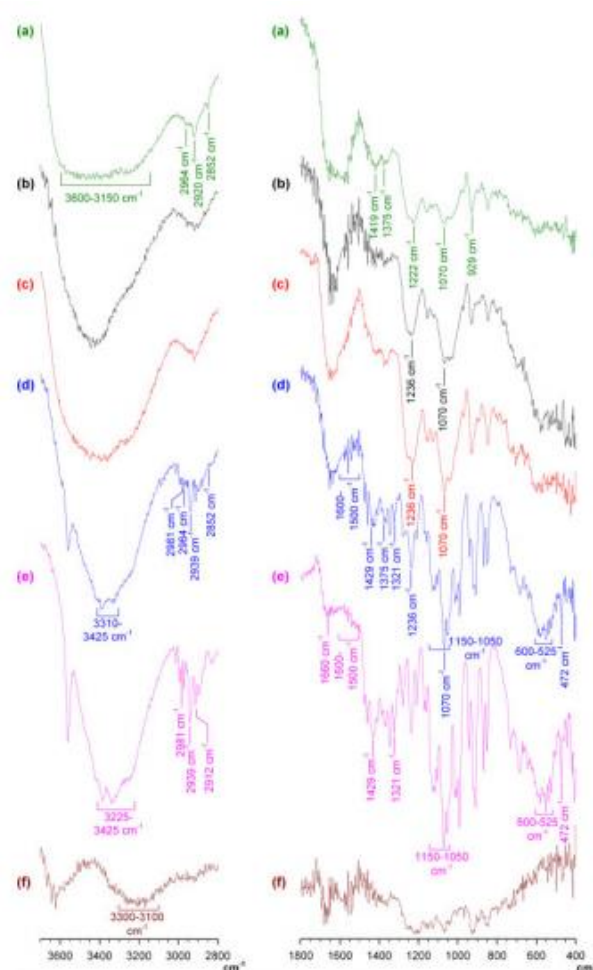
7.0 dan hanya 11% dari aktivitas maksimumnya dipertahankan pada pH 8.0 sedangkan papain bebas mempertahankan aktivitas sebesar 73%. Suhu optimum papain yang diimobilisasi sebesar 40°C, suhu tersebut lebih rendah dibandingkan suhu papain bebas. Hal tersebut dapat disebabkan oleh jaringan bahan pendukung yang sensitif terhadap pH dan suhu tinggi. Sebaliknya, stabilitas termal dan penyimpanan papain imobil lebih baik dibandingkan enzim papain bebas karena aktivitas enzim yang dapat dipertahankan lebih tinggi [54].

Imobilisasi Papain dengan Karagenan

Enzim papain diketahui telah diimobilisasi pada karagenan menggunakan metode penjemuran, tetapi tidak banyak artikel yang membahas topik tersebut. Pada tahun 2006, Sankalia mempublikasikan karakteristik fisikokimia dari enzim papain yang terjebak dalam *gel-bead* kappa karagenan [55]. Penjemuran papain dalam bead karagenan dianalisis menggunakan FTIR (*Fourier-transform Infrared Spectroscopy*) dan DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) untuk mengetahui karakterisasi sifat termal dari enzim yang telah diimobilisasi. Hasil FTIR menunjukkan adanya perbedaan spektrum di daerah panjang gelombang 3100-3300/cm dari bead karagenan kosong dengan bead karagenan yang dioptimasi. Hasil tersebut menjadi penentu bahwa enzim papain telah terjebak dalam bead κ -karagenan pada tingkat molekuler. Hasil termogram penggunaan DSC juga menunjukkan bahwa enzim papain telah tersebar dalam bead karagenan [55]. Hasil FTIR dapat dilihat seperti pada Gambar 8.

Penelitian lain dari Wuryanti menunjukkan hasil imobilisasi enzim papain dalam κ -karagenan yang menyebabkan perubahan sifat enzim seperti pH dan suhu optimum [56]. Papain bebas memiliki pH sebesar 5.0 dan setelah imobilisasi pH enzim menjadi 6.0. Perubahan ini disebabkan karena papain terjebak didalam gel dan terjadi interaksi elektrostatis antara enzim papain dengan karagenan. Muatan-muatan papain bergabung dalam karagenan, menyebabkan perbedaan konsentrasi muatan enzim yang terimobilisasi. Hal tersebut memicu terjadinya perubahan pH optimum. Sebaliknya, perubahan suhu optimum papain bebas dari 35°C menjadi 41°C dikarenakan oleh efek difusi. Enzim yang terimobilisasi pada karagenan menjadi lebih tahan

terhadap panas dan terhindar dari denaturasi karena enzim terikat dan terjebak dalam pori-pori matriks. Aktivitas imobilisasi papain dapat digunakan sebanyak dua kali pemakaian. Pada pemakaian ketiga aktivitasnya akan menurun sebesar 0,75% sedangkan pada pemakaian keempat dan kelima aktivitas papain menurun sebesar 15,28% dan 20,12%. Hal tersebut dikarenakan beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim seperti pemanasan saat imobilisasi, pemotongan, ketebalan dan bentuk gel [56].



Gambar 8. Spektra FTIR dari (a) κ -karagenan bubuk, (b) bead karagenan kosong, (c) bead yang dioptimasi dengan muatan papain, (d) campuran fisik papain dan bead kosong, (e) papain, dan (f) spektrum perbedaan bead kosong dan bead yang dioptimasi sebesar 3100 - 3300/cm [55]

KESIMPULAN

Imobilisasi enzim papain dapat dilakukan menggunakan bahan pendukung organik maupun anorganik. Karagenan menjadi bahan pendukung organik yang mampu menjebak enzim papain di dalam gel sedangkan silika mesopori menjadi bahan pendukung anorganik yang mampu mengadsorpsi enzim papain ke dalam pori. Hasil imobilisasi enzim berpengaruh pada karakteristik enzim papain seperti pH optimum, suhu optimum, aktivitas dan kemampuan untuk digunakan berulang kali. Modifikasi bahan pendukung atau teknik imobilisasi seringkali dilakukan untuk mendapatkan hasil imobilisasi papain yang terbaik. Penelitian lebih lanjut masih diperlukan untuk imobilisasi enzim papain dengan karagenan dan perlu dikaji kembali pengaplikasian imobilisasi enzim papain dengan silika mesopori.

DAFTAR PUSTAKA

1. Min, K. & Yoo, Y. J. 2014, Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 553–567.
2. Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. & Rodrigues, R. C. 2011, Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.* 353, 2885–2904.
3. Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T. & Pinelo, M. 2018, A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*. 8, 92.
4. Soeka, Y. S., Rahayu, S. H., Setianingrum, N. & Naiola, E. 2011, Kemampuan *Bacillus Licheniformis* dalam Memproduksi Enzim Protease yang Bersifat Alkalik dan Termofilik. *Media Litbang Kesehatan*. 21, 89–95.
5. Yuniati, R., Nugroho, T. T. & Puspita, F. 2015, Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *JOM FMIPA*. 1, 116–122.
6. Noviyanti, T., Ardiningsih, P. & Rahmalia, W. 2012, Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *JKK* 1, 31–34.
7. Moreira Filho, R. N. F., Vasconcelos, N. F., Andrade, F. K., Rosa, M. de F. & Vieira, R. S. 2020, Papain immobilized on alginate membrane for wound dressing application. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 194, 111222.
8. Paul, B., Nasreen, M., Sarker, A. & Islam, M. R. 2013, Isolation, Purification and Modification of Papain Enzyme to Ascertain Industrially Valuable Nature. *Int. J. Bio-Technol. Res.* 3, 11–22.
9. S, N., S, A. K. & N, G. 2012, A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chem. Sci. Rev. Lett.* 1, 148–155.
10. Jesionowski, T., Zdarta, J. & Krajewska, B. 2014, Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* 20, 801–821.
11. Sun, L., Liang, H., Yuan, Q., Wang, T. & Zhang, H. 2012, Study on a carboxyl-activated carrier and its properties for papain immobilization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 1083–1088.
12. Barbosa, O. *et al.* 2013, Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules* 14, 2433–2462.
13. Yushkova, E. D. *et al.* 2019, Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* 67, 11553–11567.
14. Vaghari, H. *et al.* 2016, Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnol. Lett.* 38, 223–233.
15. Hartmann, M. & Kostrov, X. 2013, Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6277.
16. Chakraborty, S. 2017, Carrageenan for encapsulation and immobilization of flavor, fragrance, probiotics, and enzymes: A review. *J. Carbohydr. Chem.* 36, 1–19.
17. Homei, A., Sariri, R., Vianello, F. & Stevanato, R. 2013, Enzyme Immobilization: an Update. *J Chem Biol.* 6, 185–205

- 18.Zhang, B., Weng, Y., Xu, H. & Mao, Z. 2012, Enzyme immobilization for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 61–70.
- 19.Es, I., Vieira, J. D. G. & Amaral, A. C. 2015, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 2065–2082.
- 20.Bernardino, S., Estrela, N., Ochoa-Mendes, V., Fernandes, P. & Fonseca, L. P. 2011, Optimization in the immobilization of penicillin G acylase by entrapment in xerogel particles with magnetic properties. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 58, 545–556.
- 21.Chapman, J., Ismail, A. & Dinu, C. 2018, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* 8, 238.
- 22.Liu, D.-M., Chen, J. & Shi, Y.-P. 2018, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends Anal. Chem.* 102, 332–342.
- 23.Gorecka, E. & Jastrzebska, M. 2011, Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol Food Science* 75, 65–68.
- 24.S, J. S., Seethadevi, A., Prabha, K. S., Muthuprasanna, P. & Pavitra, P. 2012, Microencapsulation: A Reviw. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 3, 509–531.
- 25.Miletić, N., Nastasović, A. & Loos, K. 2012, Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresour. Technol.* 115, 126–135.
- 26.Ungurean, M., Paul, C. & Peter, F. 2013, Cellulase immobilized by sol–gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 1327–1338.
- 27.Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. 2012, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* 30, 489–511.
- 28.Nguyen, H. H. & Kim, M. 2017, An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Conver. Technol.* 26, 157–163.
- 29.Zucca, P. & Sanjust, E. 2014, Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules* 19, 14139–14194.
- 30.Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R. & Sanjust, E. 2016, Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules* 21, 1577.
- 31.Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á. & Fernandez-Lafuente, R. 2011, Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. *Adv. Synth. Catal.* 353, 2216–2238.
- 32.Sheldon, R. A. 2011, Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Org. Process Res. Dev.* 15, 213–223.
- 33.Tran, D. N. & Balkus, K. J. 2011, Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *ACS Catal.* 1, 956–968.
- 34.Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Mateos-Díaz, J. C. & Favela-Torres, E. 2016, Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. *Biocatalysis* 1.
- 35.Santos, J. C. S. dos *et al.* 2015, Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem* 7, 2413–2432.
- 36.Datta, S., Christena, L. R. & Rajaram, Y. R. S. 2013, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3, 1–9.
- 37.Lee, S., Yun, H.-S. & Kim, S.-H. 2011, The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials* 32, 9434–9443.
- 38.Hartono, S. B. & Hadisoewignyo, L. 2017, Pembuatan, modifikasi dan pemanfaatan material nano-pori. *Widya Tek.* 16, 105–110.
- 39.Carlsson, N. *et al.* 2014, Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical–chemical perspective. *Adv. Colloid Interface Sci.* 205, 339–360.
40. Wahba, M. I. & Hassan, M. E. 2017, Agar-carrageenan hydrogel blend as a carrier for the covalent immobilization of β -D-galactosidase. *Macromol. Res.* 25, 913–923.
41. Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H. & Masoudpour-Behabadi, M. 2016, Development of

edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydr. Polym.* 137, 360–374.

42. Hassan, M. E., Yang, Q. & Xiao, Z. 2019, Covalent immobilization of glucoamylase enzyme onto chemically activated surface of κ -carrageenan. *Bull. Natl. Res. Cent.* 43.

43. Ghanbarzadeh, M., Golmoradzadeh, A. & Homaei, A. 2018, Carrageenans and carrageenases: versatile polysaccharides and promising marine enzymes. *Phytochem. Rev.* 17, 535–571.

44. Zhang, B. *et al.* 2016, Papain/Zn₃ (PO₄)₂ hybrid nanoflower: preparation, characterization and its enhanced catalytic activity as an immobilized enzyme. *RSC Adv.* 6, 46702–46710.

45. Putri, R. A., Kusrijadi, A. & Suryatna, A. 2013, Kajian Penggunaan Amonium Sulfat Pada Pengendapan Enzim Protease (Papain) dari Buah Papaya Sebagai Koagulan dalam Produksi Keju Cottage. *J. Sains Dan Teknol. Kim.* 4, 159–168.

46. Amri, E. & Mamboya, F. 2012, PAPAINE, A PLANT ENZYME OF BIOLOGICAL IMPORTANCE: A REVIEW. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 8, 99–104.

47. Gu, Y.-J., Zhu, M.-L., Li, Y.-L. & Xiong, C.-H. 2018, Research of a new metal chelating carrier preparation and papain immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* 112, 1175–1182.

48. Fernández-Lucas, J., Castañeda, D. & Hormigo, D. 2017, New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 68, 91–101.

49. Novinec, M. & Lenarčič, B. 2013, Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomol. Concepts* 4, 287–308.

50. Sheng, W., Xi, Y., Zhang, L., Ye, T. & Zhao, X. 2018, Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 114, 143–148.

51. Bian, W., Yan, B., Shi, N., Qiu, F., Lou, L.,

Qi, B. & Liu, S. 2012, Room Temperature Ionic Liquid (RTIL)-decorated Mesoporous Silica SBA-15 For Papain Immobilization: RTIL Increased The Amount and Activity of Immobilized Enzyme. *Materials Sci and Eng C.* 32, 364–368.

52. Yang, Y., Deka, J., Wu, C., Tsai, C., Saika, D. & Kao, H. 2017, Cage Like Ordered Carboxylic Acid Functionalized Mesoporous Silica With Enlarged Pores For Enzyme Adsorption. *J Mater Sci.* 52, 6322–6340.

53. He, J., Wu, M., Feng, X., Shao, X. & Cai, W. 2014, Immobilization of papain on nanoporous silica. *RSC Adv* 4, 13304–1331.

54. Dai, H., Ou, S., Liu, Z. & Huang, H. 2017, Pineapple peel carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol/mesoporous silica SBA-15 hydrogel composites for papain immobilization. *Carbohydr. Polym.* 169, 504–514.

55. Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M. & Sutariya, V. B. 2006, Physicochemical Characterization of Papain Entrapped in Ionotropically Cross-Linked Kappa-Carrageenan Gel Beads for Stability Improvement Using Doehlert Shell Design. *J. Pharm. Sci.* 95, 1994–2013.

56. Wuryanti. 2009, Penggunaan Karagenan dari Rumpun Laut (*Eucheima Cotonii*) sebagai Bahan Pendukung (Support) pada Amobilisasi Enzim Papain. *J. Sains Mat.* 17.