



Pengaruh Variasi Bahan Pengendap pada Proses Purifikasi Enzim Bromelin dari Bonggol Nanas (*Ananas Comosus L.*)

Warlinda Eka Triastuti^{1*}, Sunia Rahma Cahyaning Tyas¹, Hanifah Fauziyah Zahrah¹, Kabira Bennani¹, Erika Desi Cahyani¹, Tatya Annur Ramadita¹, Adel Frisca Rahayu¹

¹Program Studi Teknologi Rekayasa Kimia Industri, Fakultas Vokasi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Jl. Raya ITS Sukolilo Surabaya 60111, Telp. (031) 5937968 Fax (031) 5965183

*E-mail: warlindaeka@chem-eng.its.ac.id

Abstract

Waste from processed pineapples (pineapple core) is currently underutilized, despite the high content of the bromelain enzyme found in the fruit. This research aims to determine the effect of precipitating agents on the purification process of bromelain enzyme production using a phosphate buffer on the resulting enzyme yield and to analyze the effect of the precipitating agents on the purification process of bromelain enzyme production using a phosphate buffer on the bromelain enzyme activity. The variables used in this study were a 0.1 M phosphate buffer, 55%; 60%; 65%; 70%; 75% aseton concentration, 5%; 10%; 15%; 20%; 25% NaCl concentration, and 60%; 65%; 70%; 75%; 80% ethanol concentration. This study will be conducted in three stages, namely Extraction, Purification, and Drying. The highest yield was obtained with 60% aseton concentration (1.44%), 65% ethanol concentration (1.42%), and 15% NaCl concentration (2.2%). The optimal enzyme activity was obtained with 60% aseton concentration (20225.616 U/gr), 65% ethanol concentration (6266.765 U/gr), and 15% NaCl concentration (2281.357 U/gr). In conclusion, the best result for producing bromelain enzyme powder from pineapple cores is by using a 60% aseton concentration solvent.

Keywords: pineapple; enzyme bromelain; purification; enzyme activity

Pendahuluan

Indonesia menjadi produsen buah nanas terbesar kelima setelah Brazil, Thailand, Filipina dan Cina. Menurut Badan Pusat Statistik, produksi buah nanas di Indonesia mengalami peningkatan dari tahun 2018 hingga 2020 yaitu 1.805.506 hingga 2.447.243 ton. Sejalan meningkatnya produksi buah nanas yang cukup tinggi, maka akan menghasilkan limbah buangan nanas yang banyak pula. Karena sampai saat ini yang diolah hanya daging nanas namun untuk limbah buangan dari buah nanas seperti batang, daun, kulit dan bonggol hanya di gunakan sebagai pakan ternak (Ilyas, 2020).

Bromelain telah menarik perhatian dalam berbagai aplikasi industri karena nilai komersialnya yang lebih tinggi dan potensi propertinya. Protease termasuk bromelain memegang sekitar 60% pangsa pasar enzim global. Pertumbuhan ini terkait dengan meningkatnya kesadaran umum tentang perlindungan lingkungan dari dampak berbahaya dari industrialisasi kimia (Arshad, 2014). Aktivitas degradasi protein bromelain yang kuat telah membentuk minat yang luas dalam sejumlah aplikasi, terutama dalam pelunakan daging dalam industri makanan. Industri farmasi dan makanan dan minuman memiliki aplikasi bromelain terbesar untuk berbagai keperluan, kedua bagian ini selama periode perkiraan 2017-2025, sama-sama berharap untuk memegang lebih dari 85% pangsa pasar global bromelain (Labrou, 2019). Ketertarikan yang tak terbatas pada berbagai macam aplikasi bromelain telah mendorong banyak peneliti untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim protease dari limbah atau jus nanas. Dilaporkan bahwa batang nanas yang robek memiliki konsentrasi bromelain tertinggi. Namun, bagian limbah nanas seperti kulit, inti, dan tajuk yang merupakan produk sampingan dalam industri pengolahan nanas juga kaya akan bromelain dan masih belum dimanfaatkan dengan baik. Bromelain komersial, sebagian besar waktu diekstraksi dari batang nanas dengan cara sentrifugasi, ultrafiltrasi, liofilisasi dan Kromatografi Cair Protein Cepat (FPLC) dua langkah (Manzoor, 2016).

Proses yang optimal untuk mendapatkan ekstrak kasar bromelin dari buah nanas dengan isolasi enzim berdasarkan kelarutan dapat menggunakan pelarut organik dan pengendapan dengan garam. Penambahan pelarut organik atau garam ke dalam larutan berisi enzim menyebabkan kelarutan enzim di dalam larutan akan turun, dan enzim akan mengendap (Dewi *et al.*, 2020). Sehingga pada penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan enzim bromeline yang berkualitas dengan menggunakan pengendap *aseton*, etanol dan NaCl pada proses pengendapan, karena *aseton*, etanol dan NaCl memiliki banyak keunggulan, salah satunya yaitu merupakan jenis pelarut organik yang dapat mempercepat proses pengendapan mengendap dan garam-garam netral yang ditambahkan dengan konsentrasi tinggi akan mampu

mengendapkan protein. Pengendapan terus terjadi karena kemampuan ion garam untuk menghidrasi, sehingga terjadi kompetisi antara garam dengan molekul protein untuk mengikat air. Garam lebih kuat menarik air sehingga jumlah air yang tersedia untuk molekul protein akan berkurang maka akan terjadi pengendapan protein, dan bromelin yang merupakan senyawa protein akan mudah diisolasi dengan penambahan garam-garam tersebut (Dewi *et al.*, 2020).

Metode Penelitian

Dalam pembuatan Enzim Bromeline bahan yang digunakan antara lain : Bonggol nanas dari Kabupaten Kediri, Jawa Timur, aquades, NaCl dari Merck, Etanol dari Merck, Aseton dari Merck dan buffer fosfat dengan merk Merck. Sedangkan alat yang digunakan adalah *juicer*, timbangan elektrik, lemari pendingin, oven, dan mesin sentrifuge.

Variabel yang digunakan meliputi 3 yaitu variabel tetap, variabel bebas, dan variabel respon. Variabel tetap yang digunakan yaitu bonggol nanas dan buffer fosfat 0,1 M. Variabel bebas yang digunakan yaitu larutan pengendap antara lain aseton konsentrasi 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; NaCl konsentrasi 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; dan etanol konsentrasi 60%; 65%; 70%; 75%; 80%. Variable respon yang digunakan yaitu yield dan aktivitas enzim.

Prosedur pertama yang dilakukan yaitu tahap persiapan, dimana bonggol nanas yang telah dicuci bersih dihaluskan menggunakan *juicer* lalu diukur sebanyak 200 mL, lalu membuat larutan aseton, NaCl, dan etanol sesuai dengan variabel yang telah ditetapkan. Selanjutnya tahap ekstraksi dimana larutan bonggol nanas 200 ml dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 dengan perbandingan 1:1, setelahnya didinginkan ke dalam lemari pendingin hingga suhunya 4°C, lalu disentrifuge dengan kecepatan 2.000 rpm selama 30 menit dan diukur berat endapannya. Tahap selanjutnya adalah pemurnian dimana setiap larutan pengendap ditambahkan dengan perbandingan 1:3 kedalam endapan larutan bonggol nanas dan didinginkan kembali di dalam lemari pendingin selama 12 jam, setelah itu disentrifuge lagi selama 30 menit dengan kecepatan 2.000 rpm lalu diukur berat endapan larutan bonggol nanas. Setelah itu tahap pengeringan, dimana larutan endapan nanas dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama ±2 jam dan enzim yang sudah kering dihaluskan menggunakan *crusher* lalu dihitung massa enzim yang telah diserbukkan. Prosedur selanjutnya yaitu analisa perhitungan *Yield* dengan rumus sebagai berikut :

$$Yield = \frac{Massa\ Enzim\ Bromelin}{Massa\ Bahan\ Baku\ (Bahan\ Nanas)} \times 100\% \quad (1)$$

Setelah menghitung *Yield*, prosedur selanjutnya yaitu uji aktivitas enzim, pertama-tama mereaksikan 0,2 mL enzim dengan 1 mL substrat Kasein Hammerstein dan 1 mL buffer borat setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit dan ditambahkan 0,1 M TCA (Trichloroacetic Acid), diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Mengambil campuran hasil sentrifugasi sebanyak 1,5 mL supernatant dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL Na₂CO₃ 0,4 M lalu ditambahkan 1 mL pereaksi Folin Ciocalteau dengan perbandingan 1:2 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm. Secara kuantitatif kemurnian ditentukan berdasarkan aktivitas spesifik (U/mg) yaitu perbandingan antara Unit Aktivitas (U/mL) dan kadar protein (mg/mL), dapat dilihat dengan perhitungan sebagai berikut :

$$UA = \frac{A_1 - A_0}{A_s - A_0} \times P \times \frac{1}{T} \quad (2)$$

Keterangan :

UA = Unit Aktivitas (U/mL/menit)

A₁ = Absorbansi sampel

A₀ = Absorbansi blanko

A_s = Absorbansi standar

P = Faktor pengenceran

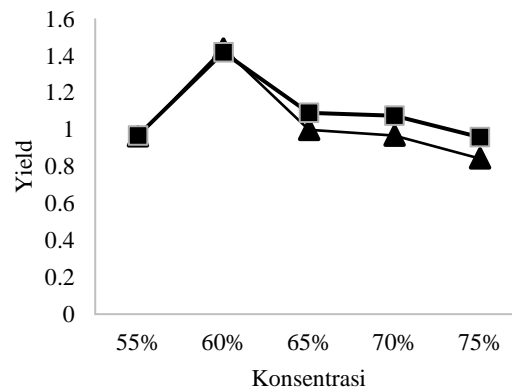
T = Lama inkubasi

Hasil dan Pembahasan

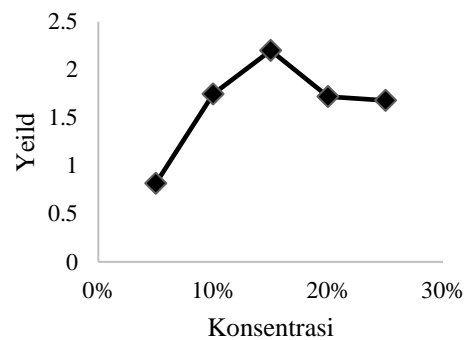
Berikut ini data analisa pengaruh jenis bahan pengendap dan konsentrasi aseton 55%; 60%; 65%; 70%; 75%, NaCl 5%; 10%; 15%; 20%; 25% dan etanol 60%; 65%; 70%; 75%; 80% terhadap yield enzim bromelin.

Tabel 1. Pengaruh Jenis Bahan Pengendap dan Konsentrasi Bahan Pengendap Terhadap Yield Enzim Bromelin

Etanol		Aseton		NaCl	
Konsentrasi	Yield(%)	Konsentrasi	Yield (%)	Konsentrasi	Yield (%)
60%	0.968	55%	0.964	5%	0.816
65%	1.42	60%	1.44	10%	1.748
70%	0.956	65%	1	15%	2.2
75%	1.076	70%	0.968	20%	1.72
80%	0.96	75%	0.844	25%	1.76



(a)



(b)

Gambar 1. Pengaruh Jenis Bahan Pengendap dan Konsentrasi Bahan Pengendap Terhadap Yield Enzim Bromelin (a) Etanol dan Aseton (b) NaCl, Note: ◆= Natrium Klorida 15%, ■= Etanol, ▲= Aseton.

Gambar 1 menunjukkan bahwa yield enzim terus meningkat seiring bertambahnya konsentrasi bahan pengendap, akan tetapi pada konsentrasi tertentu yield enzim mengalami penurunan. Berdasarkan Gambar 1 diperoleh yield tertinggi buffer fosfat dengan konsentrasi Etanol 65% sebesar 1.42%, konsentrasi aseton 60% sebesar 1.44% dan konsentrasi NaCl 15% sebesar 2.2%. Hal ini disebabkan oleh penambahan pelarut organik atau garam ke dalam larutan berisi enzim menyebabkan kelarutan enzim di dalam larutan akan turun, dan enzim akan mengendap (Dewi *et al.*, 2020).

Aseton, Etanol dan NaCl memiliki banyak keunggulan dibandingkan dengan ammonium sulfat, salah satunya yaitu merupakan jenis pelarut organik yang dapat mempercepat proses pengendapan mengendap dan garam-garam netral yang ditambahkan dengan konsentrasi tinggi akan mampu mengendapkan protein. Pengendapan terus terjadi karena kemampuan ion garam untuk menghidrasi, sehingga terjadi kompetisi antara garam dengan molekul protein untuk mengikat air. Garam lebih kuat menarik air sehingga jumlah air yang tersedia untuk molekul protein akan berkurang maka akan terjadi pengendapan protein, dan bromelin yang merupakan senyawa protein akan mudah diisolasi dengan penambahan garam-garam tersebut (Dewi *et al.*, 2020).

Pengendapan memberikan kemudahan untuk memusatkan molekul target dalam larutan yang mengandung protein atau kontaminan lain. Konsentrasi pengendap merupakan parameter penting dalam kimia protein. Pengendapan garam umumnya menghasilkan aktivitas dan pemulihan yang lebih baik. Pada penelitian Pardhi (2016) bromelain mengendap pada konsentrasi garam 20-60% dengan aktivitas spesifik 100-350 U/mg yang lebih maksimum daripada konsentrasi garam yang lebih tinggi. Pengendapan garam memfasilitasi konsentrasi hasil Bromelain dalam pemurnian 4,4 kali lipat. Oleh karena itu, 20% amonium sulfat untuk pengendapan Bromelain bisa menjadi konsentrasi optimum.

Dari nilai Yield yang dihasilkan nilai terbesar dari masing-masing jenis pengendap dihasilkan pada Etanol konsentrasi 65%, Aseton 60%, dan NaCl 15%, yang kemudian akan diuji aktivitas enzim. Berikut ini data analisa pengaruh jenis bahan pengendap terhadap Aktivitas enzim bromelin.

Tabel 2. Pengaruh Jenis Bahan Pengendap Terhadap Aktivitas Enzim Bromelin

Konsentrasi Aseton (%)	Aktivitas Enzim (U/g)
60%	20225.616
Konsentrasi NaCl (%)	Aktivitas Enzim (U/g)
15%	6266.765
Konsentrasi Ethanol (%)	Aktivitas Enzim (U/g)
65%	2281.357

Berdasarkan Tabel 2 Di dapatkan aktivitas enzim paling tinggi yaitu pada penambahan larutan aseton 60% sebesar 20225.616 U/g. Hal ini sesuai dengan literature yang menyebutkan bahwa bromelin dapat mengendap dengan sempurna jika ditambahkan dengan pelarut organik, seperti alcohol sebab bromelin praktis tidak larut dalam aseton, alcohol, kloroform, dan eter serta pelarut organik tidak merusak struktur enzim bromeline. Maka aseton merupakan bahan pengendap yang cocok untuk proses pemurnian enzim bromeline jika dibandingkan dengan Ethanol dan NaCl karena selain mampu mengendapkan kandungan bromeline pada nanas, Aseton juga menjaga agar struktur bromeline tidak rusak sehingga aktivitas enzim bromeline tetap tinggi. Karena apabila struktur enzim bromeline rusak maka kemampuan enzim bromeline dalam menghidrolisa substrat juga semakin kecil (Wiyono, 2019).

Soares dkk. (2012) memurnikan bromelain dari limbah nanas dengan pengendapan etanol menggunakan konsentrasi alcohol yang berbeda (20-90%) pada suhu 0°C. Hasilnya menunjukkan bahwa bromelain diperoleh kembali dalam kisaran 30 hingga 70%, di mana faktor pemurnian 2,28 kali lipat dicapai, mempertahankan lebih dari 98% aktivitas enzim total.

Kesimpulan

Yield tertinggi perolehan serbuk enzim bromelin terdapat pada variabel menggunakan pengendap buffer fosfat dan purifikasi menggunakan Etanol 65% sebesar 1.42%, aseton 60% sebesar 1.44% dan NaCl 15% sebesar 2.2%. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh jenis bahan pengendap yang digunakan dimana pada penambahan larutan Aseton 60% menghasilkan aktivitas enzim sebesar 20225.616 U/gr. Pada penambahan larutan Etanol 65% menghasilkan aktivitas enzim 281.357 U/gr. Pada penambahan NaCl 15% menghasilkan aktivitas enzim 6266.765 U/gr.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih pada Direktorat Riset dan Pengabdian kepada Masyarakat ITS yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Keilmuan Dana Lokal ITS 2022

Daftar Notasi

- UA = Unit Aktivitas (U/mL/menit)
- AI = Absorbansi sampel
- AO = Absorbansi blanko
- As = Absorbansi standar
- P = Faktor pengenceran
- T = Lama inkubasi
- P = tekanan [atm]
- T = suhu [°C]

Daftar Pustaka

- Arshad ZI, Amid A, Yusof F, Jaswir I, Ahmad K, Loke SP. Bromelain: an overview of industrial application and Purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(17):7283-97
- Dewi, N., Sundara, M.Y. and Fusvita, M. (2020), "Isolasi Bromelin dari Buah Nanas (Ananas comosus L. Merr) dengan Garam Dapur", *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, Vol. 12 No. 2, pp. 348–355.
- Ilyas, N.M. (2020), "Isolasi dan Karakterisasi Enzim Bromelain dari Bonggol dan Daging Buah Nanas (Ananas comosus)", *Chemica: Jurnal Ilmiah Kimia Dan Pendidikan Kimia*
- Labrou N, editor. *Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications.* Springer Nature; 2019.
- Manzoor Z, Nawaz A, Mukhtar H, Haq I. Bromelain: Methods of extraction, purification and therapeutic applications. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2016;59.
- Soares, P.A.G, Vaz, A.F.M., Correia, M.T.S., Pessoa Jr, A., Carneiro-da-Cunha, M.G. Purification of bromelain from pineapple wastes By ethanol precipitation. *Sep.Purif. Technol.*, 98, 389-395 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.Seppur.2012.06.042>



- Vinal Pardhi et al., An Overview of Purification And Activity of Bromelain International Journal of Recent Scientific Research Vol. 7, Issue, 8, pp. 12860-12865, August, 2016
- Wiyono, Anang Setyo and Mustofani, Dian (2019) *Efektivitas Gel Ekstrak Kasar Bromelin Kulit Nanas (Ananus comosus L. Merr) Hasil Optimasi Formula Pada Tikus Yang Dibuat Luka Memar*. As-Syifaa Jurnal Farmasi, 11 (2). ISSN 2502-9444.