

Pemurnian Parsial Ekstrak Bonggol Nanas (*Ananas comosus*) dengan Kromatografi Kolom Penukar Ion

Partial Purification of Pineapple Core Extract (*Ananas comosus*) with Ionic Exchange Chromatography Column

¹⁾Nita Magfirah Ilyas, ²⁾Gusma Harfiana Abbas, ³⁾Munawwarah, ⁴⁾Halimah Husain
^{1,2,,3,4)}Jurusan Kimia, Universitas Negeri Makassar, Indonesia
Email: nita.magfirah@unm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan bromelain dari bonggol nanas (*Ananas comosus*). Proses pemurnian bromelain dimulai dengan pengendapan bertingkat menggunakan amonium sulfat, diikuti dengan proses dialisis. Tahap pemurnian dilanjutkan dengan metode kromatografi kolom penukar ion DEAE-Sepharosa. Fraksi bromelain yang diperoleh dari tiap tahapan pemurnian menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik. Aktivitas spesifik tertinggi ekstrak bromelain kasar hasil fraksinasi dengan amonium sulfat terdapat pada tingkat kejenuhan 20-50% (fraksi 2) sebesar 260,042 U/mg dengan tingkat kemurnian 2,548 kali ekstrak enzim kasarnya. Proses dialisis meningkatkan aktivitas spesifik menjadi 381,287 U/mg dengan tingkat kemurnian 3,737 kali ekstrak enzim kasarnya. Pemurnian lanjutan dengan kromatografi kolom penukar ion Dietilaminoetil-Sepharosa (DEAE-Sepharosa) menunjukkan adanya peningkatan aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian menjadi 500 U/mg dengan tingkat kemurnian 4,901 kali ekstrak enzim kasarnya.

Kata Kunci: bonggol nanas, bromelain, pemurnian, kromatografi

ABSTRACT

The aim of this research was to purify bromelain from pineapple core extract (*Ananas comosus*) through fractionation using ammonium sulfate followed by dialysis. The purification step was continued with the DEAE-Sepharosa ion exchange column chromatography method. The fraction of bromelain obtained from each purification step showed an increase in specific activity compared to crude extract. Fractionation of crude enzyme bromelain with ammonium sulfate produces highest specific activity on ammonium sulfate 20-50% fraction (fraction 2) 260.042 U/mg with purify level 2.548 fold compared to crude extract. After dialysis, the bromelain fraction showed an increase in specific activity (381.287 U/mg) with purify level 3.737 fold compared to crude extract. The bromelain fraction after purification by using ion exchange column chromatography DEAE-sepharose showed an increase in specific activity become 500 U/mg with purify level 4.901 fold compared to crude extract.

Keywords: pineapple core, bromelain, purification, chromatograph

PENDAHULUAN

Kardiovaskular adalah penyakit yang terjadi pada jantung dan pembuluh darah. Faktor pemicu terbesar penyakit ini adalah Diabetes. Penyakit tersebut mengarah pada komplikasi, seperti gangguan pada pembuluh darah (kardiovaskular), perubahan dalam fungsi trombosit, terutama peningkatan agregasi trombosit.

Dalam proses pengobatan penyakit ini digunakan obat-obatan antitrombosit (antiplatelet) sintetik seperti aspirin. Obat-obatan tersebut memberikan beberapa efek samping seperti meningkatkan tekanan darah dan menyebabkan mual. Hal ini, memicu pencarian obat-obatan antiplatelet herbal (tradisional) yang efektif dan tidak memberikan efek samping.

Nanas (*Ananas comosus* [L.] Merr.) merupakan komoditas buah tropik dengan urutan kedua terbesar setelah pisang. Nanas menempati urutan keempat dalam kontribusi terhadap produksi buah di Indonesia. Produksi buah nanas yang cukup tinggi akan menyumbangkan limbah yang banyak pula. Banyak varietas nanas yang termasuk dalam famili *bromeliaceae* mengandung enzim proteolitik yang disebut bromelain.

Bromelain terdapat dalam semua jaringan tanaman nanas. Sekitar setengah dari protein dalam nanas mengandung protease bromelain. Bromelain dilaporkan juga hadir dalam limbah nanas seperti inti (bonggol), kulit, daun dan batang. Enzim ini menguraikan protein dengan jalan memutuskan ikatan peptida dan menghasilkan protein yang lebih sederhana.

Manfaat bromelain yang cukup luas di bidang farmakologi dan industri makanan mendorong banyak peneliti mempelajarinya lebih lanjut. Berbagai cara isolasi telah dilakukan untuk

mendapatkan bromelain dari nanas dengan aktivitas enzim terbaik. Enzim ini bermanfaat dalam mengurangi penggumpalan dari platelet (antiplatelet), pembentukan plak di arteri dan pembekuan dalam darah. Semua efek ini membantu dalam pengobatan penyakit kardiovaskular.

Dalam penelitian ini digunakan bonggol nanas sebagai sumber bromelain yang akan melalui proses pemurnian secara parsial. Bromelain dimurnikan dengan cara fraksinasi bertingkat menggunakan amonium sulfat. Pemurnian lebih lanjut fraksi enzim dilakukan menggunakan kromatografi kolom penukar ion.

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol vial uji, batang pengaduk, *beaker glass*, gelas ukur, labu ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet ukur, mikropipet, kromatografi kolom, termometer, vortex, blender, hotplate, pH meter, *refrigerated centrifuge* (Thermo Scientific HANIL COMBIL 514 R), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-2450), *shaker waterbath*.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini terdiri dari akuades, Buffer fosfat, Amonium sulfat (Merck), EDTA (Sigma) dan Na_2CO_3 (Merck), BaCl_2 (Merck), HCl (Merck). Resin *Diethylaminoethyl-Sepharosa* (DEAE-Sepharosa) (Merck), Buffer Tris-HCl yang dibuat dari *Tris(hydroxymethyl) aminomethane* (Merck), dan garam NaCl (Merck), kasein, TCA (Merck), Bovine Serum Albumin atau BSA (Merck).

B. Prosedur Kerja

Prosedur kerja meliputi preparasi sampel Bonggol Nanas, proses pembuatan dan isolasi bromelain (enzim

kasar) dari Bonggol Nanas, Pemurnian enzim dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu fraksinasi pengendapan menggunakan amonium sulfat diikuti dengan proses dialisis dan kromatografi kolom penukar ion dengan resin DEAE-Sepharosa.

1. Isolasi Enzim Bromelain dari Bonggol Nanas

Proses isolasi diawali dengan menyiapkan bonggol nanas dari buahnya lalu dihancurkan menggunakan blender, (dengan penambahan buffer fosfat dingin). Campuran tersebut lalu disaring dan filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada suhu dingin. Supernatan yang diperoleh dari masing-masing sampel merupakan larutan ekstrak kasar bromelain (*crude enzyme*).

2. Fraksinasi Enzim dengan Amonium Sulfat

Ekstrak enzim kasar difraksinasi melalui pengendapan bertingkat dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (interval: 0-20%, 20-50%, 50-80%). Larutan ekstrak enzim kasar sebesar 150 mL dimasukkan kedalam beaker glass yang ditempatkan pada wadah dingin. Kemudian, secara perlahan ditambahkan garam amonium sulfat sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer. Setelah penambahan garam selesai, proses pengadukan terus dilanjutkan selama 20 menit.

Selanjutnya, larutan tersebut dibiarkan mengendap semalam dalam lemari pendingin. Larutan yang telah terendapkan lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada suhu dingin. Endapan yang diperoleh dari setiap fraksi disuspensi dalam larutan buffer fosfat 0,2 M, pH=7,0. Sedangkan filtrat digunakan

untuk fraksinasi berikutnya dengan tingkat kejenuhan yang berbeda.

Pada masing-masing fraksi dilakukan uji aktivitas enzim dan penentuan kadar protein. Fraksi yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi kemudian dimurnikan dengan dialisis dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom penukar ion.

3. Pemurnian dengan Kromatografi Kolom Penukar Ion

Suspensi DEAE-sepharosa dimasukkan kedalam sistem kolom dan siap digunakan untuk prosedur berikutnya. Sistem elusi menggunakan eluen berupa buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 yang mengandung larutan garam NaCl dengan konsentrasi bertingkat secara bertahap, yaitu 0,25-1,0 M. Efluen ditampung dengan laju alir 1 mL/menit dan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 280 nm.

4. Penentuan kadar protein dan Aktivitas Enzim

Penentuan kadar protein dengan metode Lowry. Penentuan aktivitas enzim dengan metode Kunitz menggunakan kasein sebagai substrat pada suhu 37°C selama 30 menit. Enzim diinaktivasi dengan penambahan TCA 5% kemudian diinkubasi dalam air dingin selama 30 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak kasar bromelain dari bonggol nanas dimurnikan dengan fraksinasi menggunakan amonium sulfat, diikuti dengan dialisis. Enzim kasar yang diperoleh melalui proses ekstraksi dari bonggol nanas memiliki aktivitas spesifik sebesar 102,018 U/mg protein.

Tahap selanjutnya untuk memurnikan enzim kasar adalah metode

fraksinasi menggunakan amonium sulfat dengan variasi konsentrasi berbeda menghasilkan fraksi enzim yang memiliki aktivitas proteolitik dan kandungan protein yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil dari Metode Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Nama Sampel	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kadar Protein (mg)
F1	149,465	0,818
F2	260,042	0,858
F3	60,902	0,532

Keterangan:

*F1=Fraksi dengan konsentrasi garam (0-20%)

*F2= Fraksi dengan konsentrasi garam (20-50%)

*F3= Fraksi dengan konsentrasi garam (50-80%)

Berdasarkan data pada tabel 1 maka diketahui bahwa fraksi 2 dari bonggol nanas memiliki aktivitas spesifik lebih tinggi dibandingkan fraksi 1 dan 3. Fraksi 2 kemudian dilakukan proses dialisis yang bertujuan untuk menghilangkan pengaruh dari ammonium sulfat yang terdapat dalam fraksi tersebut. Dari proses dialisis diketahui bahwa fraksi enzim mengalami peningkatan nilai aktivitas spesifik menjadi 381,287 U/mg protein dengan kemurnian sebesar 3,737 kali terhadap ekstrak enzim kasar.

Kromatografi kolom penukar ion merupakan tahapan pemurnian untuk memisahkan protein bromelain dari protein lainnya sehingga diperoleh protein bromelain dengan aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian yang lebih tinggi. Tahapan ini dilakukan pada fraksi bromelain hasil dialisis. Pemurnian dengan kromatografi kolom penukar ion

didasari pada adanya perbedaan muatan antara protein dengan gugus bermuatan yang terdapat pada matriks kolom. Protein dengan muatan yang berbeda dengan matriks akan berinteraksi dengan matriks secara elektrostatis dan tertahan lama pada kolom bergantung kekuatan ikatannya. Protein dengan muatan yang sama seperti matriks akan terelusi terlebih dahulu dari kolom. Jika muatan protein berbeda dengan matriks, maka protein akan berinteraksi secara elektrostatis pada matriks dan keluar dari kolom dengan waktu yang berbeda tergantung kekuatan ikatannya. Jika muatan sama dengan matriks, maka protein akan terelusi terlebih dahulu dari kolom. Data hasil kromatografi kolom penukar ion dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil dari Pemurnian dengan Kromatografi Kolom Penukar Ion

Nama Sampel	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kadar Protein (mg)
AP1	21,764	0,612
AP2	257,272	0,110
AP3	500	0,286
AP4	161,764	0,272
AP5	250	0,224

Keterangan:

*AP1=Fraksi gabungan 13-20

*AP2= Fraksi gabungan 36-55

*AP3= Fraksi gabungan 59-80

*AP4= Fraksi gabungan 82-89

*AP5= Fraksi gabungan 92-115

Berdasarkan data pada tabel 2 maka diketahui bahwa fraksi gabungan ketiga (AP3) yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 500 U/mg protein dengan kemurnian sebesar 4,901 kali dari ekstrak enzim kasar.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Bromelain telah berhasil dimurnikan melalui beberapa tahapan metode pemurnian. Hasil dari pemurnian dengan garam ammonium sulfat didapatkan bahwa fraksi 2 memiliki aktivitas tertinggi sebesar 381,287 U/mg protein dengan kemurnian sebesar 3,737 kali terhadap ekstrak enzim kasar. Hasil pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi kolom penukar ion DEAE-Sepharosa meningkat nilai aktivitas spesifik menjadi 500 U/mg protein dengan tingkat kemurnian 4,901 kali terhadap ekstrak enzim kasarnya.

B. Saran

Pemurnian bromelain dapat dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom gel filtrasi untuk mendapatkan enzim lebih murni dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi. Fraksi enzim dari setiap tahap pemurnian perlu dipisahkan dengan menggunakan *freeze dry* untuk mendapatkan fraksi dengan aktivitas proteolitik yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Arshad, Z.I.M., et al., 2014. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Journal of Appl Microbiol Biotechnol* 98:7283–7297.
- Bhattacharyya, B.K., 2008. Bromelain. India: Biotechnology and Molecular Biology. East India Pharmaceutical Works Ltd. Vol 7(4).
- Kaur, T., Kaur, A. & Grewal, R.K., 2015. Kinetics studies with fruit bromelain (*Ananas comosus*) in the presence of cysteine and divalent ions, *J Food Sci Technol*, 52(9), 5954–5960.
- Moriyama, H. et al., 2009. Assay-guided Informatory Screening Method for Antiplatelet Effect of Adenosine Isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300: Inhibitory Behaviors of Adenosine in Different Solvents. *Journal of Health Science*; 55 suppl 1:103–108.
- Neta JLV., et al., 2012. Bromelain Enzyme from Pineapple: In Vitro Activity Study under Different Micropropagation Conditions. *Appl Biochem Biotechnol*; 168(2): 234-246.
- Rugayah, Anggalia, I., Cahya, Y., 2012. Pengaruh Konsentrasi dan Cara Aplikasi Iba (Indole Butiric Acid) terhadap Pertumbuhan Bibit Nanas (*Ananas Comosus* [L.] Merr.) Asal Tunas Mahkota. Bandar Lampung: Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
- Sathyapriya, E., Velpandian, V., Anbu, J. & Anjana, A., 2012. In vitro anti platelet aggregation activity and thrombolytic activity of Cheenalinga chendhuram. *Internatioal Journal of Life Science & Pharma Research*; Vol 2: 2250-0480.
- Walsh, G., 2002. Protein biochemistry and biotechnology. John Wiley and Sons, New York, 312.