

# ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR ENZIM BROMELIN DARI BATANG NANAS (*Ananas comusus L.merr*)

Nuniek Herdyastuti

Jurusan Kimia-FMIPA Universitas Negeri Surabaya  
Kampus UNESA Jl. Ketintang Surabaya 60231 Telp.(031) 8298761  
Email : [nherdyastuti@yahoo.com](mailto:nherdyastuti@yahoo.com)

## ABSTRACT

*Brommelain is an enzyme hydrolyze most soluble protein easily and efficiently. This enzyme is used in many industry like food industry. This research aimed to isolation and characterization crude extract brommelain. This enzyme has been extracted from the stems of pineapples to produce crude extract, precipitated with amonium sulfat, and enzyme activity to decided with Bergmeyer methode. The higher activity was 1,996 U/ml in precipitate 40–60% amonium sulfat. Optimum temperature and pH to decided temperature and pH variation was detected based on enzyme activity. Characterization to indicate that brommelain has an optimum temperature at 55 °C, optimum pH of 7,  $K_M = 5.074$  mg/ml and  $V_{max} = 0.666$  mg/ml.second.*

**Key words:** Bromelain, characterization, enzyme activity, precipitated

## PENGANTAR

Bromelin merupakan salah satu jenis enzim protease yang mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein atau polipeptida menjadi molekul yang lebih kecil yaitu asam amino. Bromelin banyak digunakan dalam bidang industri pangan maupun nonpangan seperti industri daging kalengan, minuman bir dan lain-lain (Wiseman, 1986).

Bromelin dapat diperoleh dari tanaman nanas baik dari tangkai, kulit, daun, buah, maupun batang dalam jumlah yang berbeda. Dilaporkan bahwa kandungan enzim bromelin lebih banyak terdapat pada batang yang selama ini kurang dimanfaatkan. Distribusi bromelin pada batang nanas tidak merata dan tergantung pada umur tanaman. Kandungan bromelin pada jaringan yang umurnya belum tua terutama yang bergetah sangat sedikit sekali bahkan kadang-kadang tidak ada sama sekali. Sedangkan bagian tengah batang mengandung bromelin lebih banyak dibandingkan dengan bagian tepinya (Hartadi, 1980).

Untuk pemanfaatan enzim secara optimal dan efisien, baik untuk kepentingan penelitian maupun pemanfaatan industri, maka perlu dilakukan penelitian tentang faktor-faktor yang memengaruhi aktivitas enzim seperti pH, suhu, waktu inkubasi, konsentrasi enzim, dan konsentrasi substrat sehingga dapat diketahui nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  enzim tersebut. Enzim mempunyai kisaran pH dan suhu tertentu yang memengaruhi kemampuan katalisisnya sehingga menyebabkan aktivitas enzim menjadi maksimum jika konsentrasi substrat dan enzim konstan (Lehninger, 1993). Apabila dilakukan variasi konsentrasi substrat maka dapat diketahui harga konstanta disosiasi enzim dengan substrat atau dikenal dengan  $K_M$ . Selain itu juga dapat diketahui

harga kecepatan maksimum pada konsentrasi substrat tertentu di mana gejala tersebut disebut dengan kinetika penjuhan. Apabila enzim bekerja pada kondisi optimum tersebut maka akan diperoleh produk yang maksimal.

## BAHAN DAN CARA KERJA

**Bahan-bahan** yang digunakan adalah: batang nanas, amonium sulfat, kasein, pereaksi Folin Ciocalteu, tirosin, *bovine serum albumin* (BSA), TCA, bufer sitrat pH 4, bufer asetat pH 5, dan bufer fosfat pH 6, 7, 8.

**Alat-alat yang digunakan** adalah spektrofotometer, sentrifuga, *autoclave*, *homogenizer*, mikropipet, dan peralatan gelas.

## Isolasi Enzim Bromelin (Darwis dan Sakara, 1990)

Batang nanas yang telah dihaluskan dengan homogenizer diambil filtratnya kemudian ditambahkan bufer fosfat 0,1 M pH 7. Untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak larut yang masih ada di dalam filtrat disentrifuga dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Diperoleh filtrat yang mengandung ekstrak kasar enzim bromelin.

## Fraksinasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin dengan Amonium sulfat (Bollag, 1991)

Larutan enzim ditambahkan ammonium sulfat dengan kadar sedemikian hingga tercapai kejenuhan 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Setiap fraksi enzim yang diendapkan dilarutkan dalam larutan bufer fosfat 0,1 M pH 7 dan selanjutnya masing-masing fraksi didialisis.

### Karakterisasi Enzim Bromelin (Bollag dan Edelstein, 1991)

Fraksi enzim bromelin dengan aktivitas tertinggi ditentukan konsentrasi substrat, suhu optimum, dan pH optimum. Kondisi optimum tersebut ditentukan berdasarkan aktivitas maksimum yang dicapai. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan variasi suhu pada 45, 50, 55, 60, 65, dan 70 °C. Sedangkan penentuan pH optimum dilakukan pada variasi pH 4, 5, 6, 7, 8, dan 9.

#### Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$

Penentuan  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dilakukan dengan cara menentukan aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat kasein yaitu 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 mg/ml selanjutnya harga  $K_M$  dan  $V_{maks}$  ditentukan dari grafik antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi yang telah ditransformasikan ke dalam persamaan Lineaweaver-Burk.

#### Penentuan Kadar Protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Biuret pada  $\lambda$  520 nm dan sebagai standar digunakan larutan *bovine serum albumin* (BSA) dengan variasi konsentrasi

#### Penentuan Aktivitas Enzim (Bergmeyer, 1983)

Aktivitas enzim diuji menggunakan metode Bergmeyer yang didasarkan pada kemampuan protease menghidrolisis substrat menjadi tirosin. Selanjutnya tirosin dengan pereaksi folin akan membentuk senyawa kompleks dan absorbansinya dibaca pada  $\lambda$  578 nm

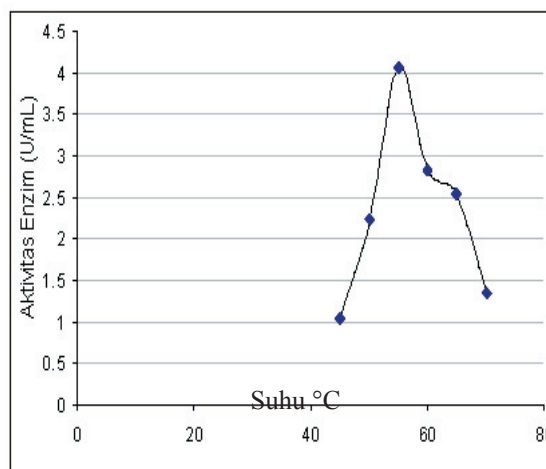
### HASIL

Sumber bromelin yang digunakan pada penelitian ini adalah batang nanas dari jenis nanas Queen yang diperoleh dari perkebunan di daerah Srengat Blitar Jawa Timur dengan umur yang sama (buah nanas siap petik). Ekstrak kasar enzim bromelin yang telah diisolasi dari batang nanas dilarutkan dalam bufer fosfat pH 7 kemudian diendapkan dengan amonium sulfat dalam beberapa fraksi. Masing-masing fraksi ditentukan kadar protein dengan metode Biuret dan aktivitas enzim dengan metode Bergmeyer seperti pada Tabel 1. Ekstrak kasar bromelin tersebut selanjutnya dilakukan karakterisasi hasilnya seperti ditampilkan pada Gambar 1. Hasil penentuan pH optimum dengan variasi pH 4–9 pada suhu optimumnya ditampilkan pada Gambar 2. Penentuan  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dilakukan dengan variasi konsentrasi substrat 2–12 mg/ml. Aktivitas untuk masing-masing variasi konsentrasi substrat tampak pada Tabel 2. Selanjutnya hasil tersebut ditransformasikan pada

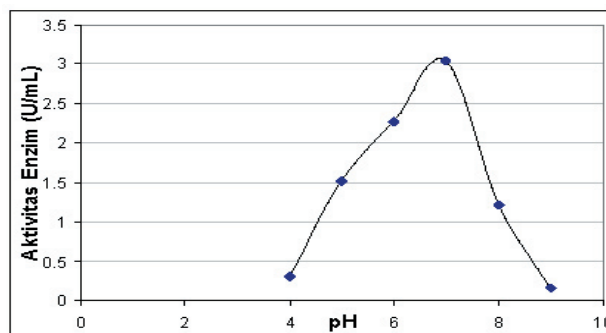
persamaan Lineweaver-Burk dengan membuat grafik antara  $1/V$  dan  $1/[S]$  seperti pada Gambar 3.

**Tabel 1.** Data hasil fraksinasi enzim bromelin

Fraksi $(NH_4)_2SO_4$ (%)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas (U/ml)
0–20	1,896	0,733
20–40	1,915	1,108
40–60	2,424	1,996
60–80	2,013	0,437



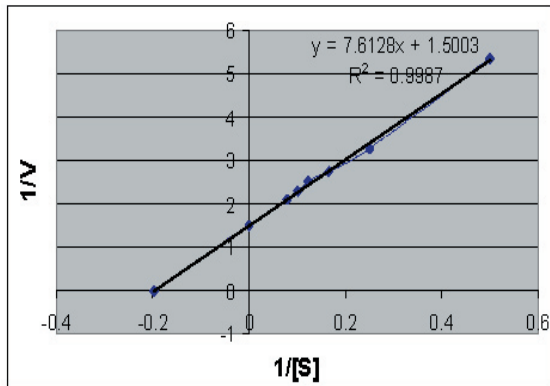
**Gambar 1.** Hasil penentuan suhu optimum enzim bromelin



**Gambar 2.** Hasil penentuan pH optimum bromelin

**Tabel 2.** Penentuan aktivitas enzim bromelin pada variasi konsentrasi substrat

Konsentrasi Substrat (mg/ml)	Aktivitas Enzim (U/ml)
2	0,187
4	0,304
6	0,363
8	0,398
10	0,434
12	0,477



**Gambar 3.** Hasil transformasi persamaan Michaelis-Menten ke persamaan Lineweaver-Burk untuk menentukan harga  $K_M$  dan  $V_{maks}$

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan karakterisasi enzim bromelin dari batang nanas. Enzim bromelin dapat diperoleh dari tanaman nanas baik tangkai, kulit, daun, buah, maupun batangnya dan selama ini beberapa penelitian banyak memperoleh enzim bromelin dari buahnya. Pada penelitian ini enzim bromelin diisolasi dari batangnya yang selama ini belum banyak dimanfaatkan dan dilaporkan bahwa kandungan enzim paling banyak terdapat pada batangnya (Hartadi, 1980). Ekstrak kasar bromelin yang diperoleh dilakukan fraksinasi dengan amonium sulfat. Fraksi 40–60% menunjukkan bahwa aktivitas bromelin dan kadar protein tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pada fraksi tersebut terdapat protein paling banyak dan sebagian besar dari protein tersebut merupakan enzim bromelin yang ditunjukkan dengan nilai aktivitas yang tinggi dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang lainnya.

Karakterisasi bromelin untuk menentukan suhu optimum diperoleh semakin tinggi suhunya aktivitas enzim semakin naik dan menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu 55 °C dengan nilai aktivitas 4,05 U/ml. Tetapi setelah melewati suhu tersebut aktivitasnya semakin menurun (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa pada suhu 55 °C tersebut enzim bekerja secara maksimal. Pada suhu di atas 55 °C kerja enzim mulai menurun, hal ini dikarenakan enzim adalah suatu protein apabila berada pada suhu yang tinggi maka akan mengalami denaturasi sehingga enzim rusak dan aktivitasnya turun (Cristara, 2003). Demikian halnya dengan penentuan pH optimum, pada pH tertentu enzim akan mempunyai kondisi yang optimal untuk berikatan dengan substratnya karena pH akan menentukan konformasi

dari enzim tersebut berdasarkan keadaan asam amino pada pusat aktifnya. Diperoleh pH optimum bromelin adalah 7 dengan aktivitas enzim sebesar 3,05 U/ml. Saat pH berada di bawah atau pun di atas pH tersebut aktivitasnya mengalami penurunan (Gambar 2). Hal ini dikarenakan pada pH 7 enzim mempunyai konformasi yang paling sesuai dengan substratnya sehingga dapat membentuk kompleks enzim-substrat yang tepat sehingga dapat menghasilkan produk secara maksimal (Puspita, 2005).

Penentuan  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dilakukan berdasarkan variasi konsentrasi substrat dan diperoleh aktivitas enzim yang sebanding dengan kecepatan reaksi enzimatik. Semakin besar konsentrasi substrat maka kecepatannya semakin tinggi (Tabel 2). Selanjutnya nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  ditentukan dengan mentransformasikan persamaan Michaelis-Menten  $V = V_{maks} \cdot [S] / K_M + [S]$  ke dalam persamaan Lineweaver-Burk yaitu  $1/V_o = K_M/V_{maks} \cdot 1/[S] + 1/V_{maks}$  dengan membuat grafik antara  $1/V$  dengan  $1/[S]$  (Gambar 3). Berdasarkan persamaan garis pada grafik tersebut diperoleh harga  $K_M = 5,074$  mg/ml. Nilai  $K_M$  tersebut menyatakan tetapan disosiasi kompleks enzim-substrat. Apabila nilai  $K_M$  kecil menunjukkan kompleks enzim-substrat semakin mantap sehingga enzim mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat dan sebaliknya. Harga  $V_{maks}$  diperoleh 0,666 mg/ml menit, hal ini menunjukkan bahwa setiap milliliter ekstrak kasar bromelin menghasilkan produk setiap menitnya maksimal 0,666 mg.

## KEPUSTAKAAN

- Bergmeyer HU dan Grassl M, 1983. Method of Enzyme Analysis. vol. 2: Verlag Chemie, Weinheim.
- Bollag DM and Edelman SJ, 1991. Protein Methods. Willey-Liss, Inc., New York.
- Cristara Avanes, 2003. The effect of Temperature an Enzymes ability to Digest Protein. California State Science Fair.
- Darwis A Azis dan Sakara E, 1990. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim. IPB, Bogor.
- Hartadi H, 1980. Komposisi bahan Makanan Indonesia : data Ilmu makanan untuk Indonesia. Yogyakarta. UGM.
- Lehninger Albert, 1993. Dasar-dasar Biokimia, Alih bahasa Meggy Thenawijaya Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Puspita A, 2005. Determination of Optimum Condition of Papain Enzyme from Papaya var Java (*Carica papaya*). *International Journal Chemistry*. 5(2): 147–151.
- Wiseman, Alan, 1986, Handbook of Enzyme Biotechnology, 2<sup>nd</sup>, John Wiley and son. New York .
- [www.christineterry.com](http://www.christineterry.com): Pineapple and enzyme, 2003