Profil Berat Molekul Enzim Bromelain dari Bonggol Nanas (*Ananas Comosus*) dengan Metode Elektroforesis SDS-PAGE

Nita Magfirah Ilyas*
Jurusan Kimia Universitas Negeri Makassar
*Authors Correspondence: nita.magfirah@unm.ac.id

ARTICLE INFO

Article History:
Received
Accepted
Published online

Keywords:
Bromelain;
Protease;
SDS-Page;

ABSTRAK

Bromelain is found in all pineapple plant tissues. About half of the protein in pineapple contains the protease bromelain. Bromelain has been used in the food and health industry for various purposes, such as accelerating wound healing, helping digestion, increasing drug absorption, increasing immunity. The aim of this research was to determine the molecular weight profile of the bromelain enzyme from pineapple core (Ananas comosus) using the SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) electrophoresis method. The bromelain purification process begins with multistage precipitation using ammonium sulfate, followed by a dialysis process. The purification process was continued with ion exchange column chromatography method by using DEAE-Sepharose. Furthermore, the molecular weight of enzyme solution were determined using SDS-PAGE method. Further purification using Diethylaminoethyl-Sepharose (DEAE-Sepharose) ion exchange column chromatography showed an increase in specific activity and purity level to 500 U/mg with a purity level of 4.901 times the crude enzyme extract. The molecular weight of the enzyme fraction purified with DEAE-Sepharose has a molecular weight range of 21.5-31 kDa. The synthesized enzyme fraction has a molecular weight range that is relatively the same as standard bromelain, ranging from 28-30 kDa.

PENDAHULUAN

Enzim merupakan unit protein fungsional yang berperan mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia. Setiap enzim bersifat sangat spesifik untuk berbagai tipe reaksi yang dikatalisisnya Sisi katalitik dari enzim mengandung gugus-gugus yang secara langsung berpengaruh dalam proses katalisis. Sisi katalitik ini hanya menempati sebagian kecil wilayah daripada permukaan enzim. Sisi pengikatan substrat dan sisi katalitik terletak saling berdekatan dan overlapping. Keduanya tergabung bersama sebagai suatu bagian dari 'sisi aktif'. Aktivitas katalitik beberapa enzim dapat diatur oleh kofaktor ion logam atau molekul organik yang kompleks dikenal sebagai koenzim Bromelain merupakan enzim yang menguraikan protein dengan jalan memutuskan ikatan peptida dan menghasilkan protein yang lebih sederhana (Ilyas et al., 2020).

Bromelain terdapat dalam semua jaringan tanaman nanas. Sekitar setengah dari protein dalam nanas mengandung protease bromelain. Di antara berbagai jenis buah, nanas merupakan sumber protease dengan konsentrasi tinggi dalam buah yang masak (Ramalingam et al., 2012). Enzim ini merupakan proteinase yang berperan baik dalam anti-inflamasi, anti-trombotik, dan agen fibrinolitik (Bhattacharyya, 2008). Enzim bromelain juga bermanfaat dalam mengurangi penggumpalan dari platelet (antiplatelet), pembentukan plak di arteri dan pembekuan dalam darah. Semua efek ini membantu dalam pengobatan penyakit kardiovaskular(Ilyas et al., 2023).

Elektroforesis SDS gel poliakrilamida merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk melihat profil protein dan dalam menentukan berat molekul protein. Metode gel satu dimensi umumnya menggunakan sodium dodesil sulfat (SDS) yang diperankan untuk solubilisasi, denaturasi dan memberikan muatan negatif pada suatu protein. Protein dapat dipisahkan dari protein jenis lain atau dari molekul lain berdasarkan ukuran, kelarutan, muatan dan afinitas ikatan. Pemisahan protein merupakan tahap yang harus dilakukan untuk mempelajari karakter dan fungsi protein. Berbagai jenis protein pada suatu sampel akan terpisah pada gel poliakrilamida yang tergantung pada mobilitasnya, dengan demikian pada jalur pergerakan protein akan didapatkan jajaran protein yang disebut sebagai pita protein yang akan memisah berdasarkan ukuran berat molekul protein (Fatchiyah et al., 2011).

METODE

Sumber bromelain yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari nanas (Ananas comosus var. Comosus) bagian bonggol yang berasal dari Palembang.

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 Na2CO3 (Merck), BaCl2 (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).

Adapun prosedur kerja dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

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.

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^{o}C selama 30 menit. Enzim diinaktivasi dengan penambahan TCA 5% kemudian diinkubasi dalam air dingin selama 30 menit.

5. Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamida

Elektroforesis dilakukan berdasarkan metode Laemmli. Gel poliakrilamida dicetak diantara lempengan kaca. Setelah gel mengeras, gel pengumpul mulai disiapkan dan dimasukkan kedalam cetakan. Cetakan gel kemudian dipindahkan ke wadah elektroforesis. Sampel dan marker bromelain dimasukkan kedalam masing-masing cetakan gel (well). Alat elektroforesis dinyalakan sampai pewarna mencapai ujung gel (± 1 jam). Gel dilepaskan dari cetakan dan direndam dalam larutan pewarna Coommasie brilliant blue selama semalam. Gel dicuci dengan larutan destaining dan akuades. Bobot molekul dari masing-masing protein dapat ditentukan dengan cara menghitung nilai Rf dari masing-masing pita protein yang tampak. Setelah itu dibuat kurva standar hubungan antara log BM terhadap Rf dari bromelain standar sehingga nilai BM bromelain sampel dapat dihitung.

HASIL

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. Fraksi 2 (260,042 U/mg protein) dari bonggol nanas memiliki aktivitas spesifik lebih tinggi dibandingkan fraksi 1 (149,465 U/mg protein) dan 3 (60,902 U/mg protein). Fraksi 2 kemudian dilakukan proses dialisis yang bertujuan untuk menghilangkan pengaruh dari ammonium sulfat yang terdapat dalam fraksi tersebut. Fraksi enzim setelah dialisis mengalami peningkatan nilai aktivitas spesifik menjadi 381,287 U/mg protein dengan kemurninan 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 elektrostatik dan tertahan

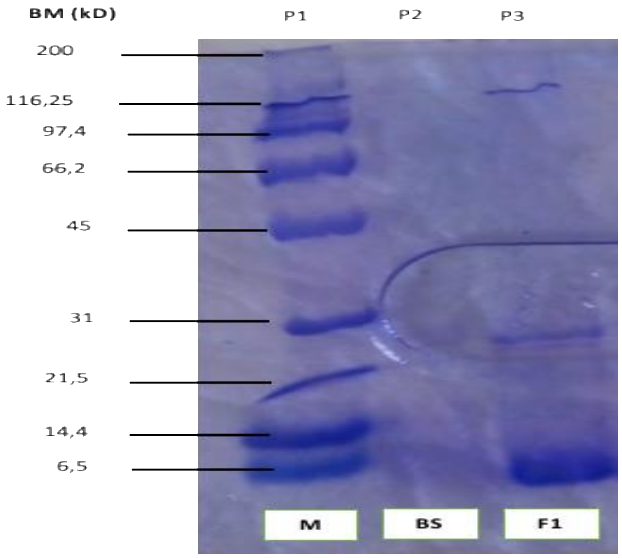
lama pada kolom bergantung kekuatan ikatannya. Protein dengan muatan yang sama seperti matriks akan terelusi terlebih dahulu dari kolom. Jika muatan protein berbeda dengan matriks, maka protein akan berinteraksi secara elektrostatik pada matriks dan keluar dari kolom dengan waktu yang berbeda tergantung kekuatan ikatannya. Jika muatan sama dengan matriks, maka protein akan terelusi terlebih dahulu dari kolom (Nadzirah et al., 2013). Data hasil kromtografi kolom penukar ion dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil dari Pemurnian dengan Kromatografi Kolom Penukar Ion

Nama Sampel	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kadar Protein (mg)
F1	21,764	0,612
F2	257,272	0,110
F3	500	0,286
F4	161,764	0,272
F5	250	0,224

Berdasarkan data pada Tabel 1 maka diketahui bahwa fraksi gabungan ketiga (AP3) yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 500 U/mg protein dengan kemurnian sebesat 4,901 kali dari ekstrak enzim kasar.

Elektroforesis SDS gel poliakrilamida merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk melihat profil protein dan dalam menentukan berat molekul protein. Protein dapat dipisahkan dari protein jenis lain atau dari molekul lain berdasarkan ukuran, kelarutan, muatan dan afinitas ikatan. Pemisahan protein merupakan tahap yang harus dilakukan untuk mempelajari karakter dan fungsi protein. Berbagai jenis protein pada suatu sampel akan terpisah pada gel poliakrilamida yang tergantung pada mobilitasnya, dengan demikian pada jalur pergerakan protein akan didapatkan jajaran protein yang disebut sebagai pita protein yang akan memisah berdasarkan ukuran berat molekul protein (Fatchiyah et al., 2011).



Gambar 1. Elektroforesis SDS-PAGE pada Fraksi Hasil Pemurnian
M: Marker, BS: Bromelain Standar, F1: Fraksi DEAE-SEpharosa

DISKUSI

Isolasi enzim dari bonggol nanas dilakukan berdasarkan prinsip metode ekstraksi yang bertujuan untuk mengeluarkan bromelain dari dalam jaringan tanaman nanas. Temperatur pada proses ini harus tetap dijaga dingin agar dapat menginaktivasi enzim protease lain yang dapat merusak dan menghambat aktivitas bromelain. Penambahan buffer fosfat bertujuan untuk mempertahankan kestabilan struktur dan memperkecil kemungkinan terdenaturasinya protein enzim yang dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim.

Selanjutnya ekstrak enzim kasar diuji aktivitas proteolitik dan kadar proteinnya. Aktivitas spesifik dari ekstrak enzim kasar diperoleh dari hasil pengujian aktivitas proteolitik dan penentuan kadar protein menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Penentuan kadar protein dilakukan berdasarkan metode Lowry menggunakan larutan standar BSA (Bovine Serum Albumin) dan aktivitas proteolitik berdasarkan metode Kunitz menggunakan substrat kasein. Aktivitas proteolitik bromelain merupakan kemampuan bromelain dalam menghidrolisis substratnya pada kondisi optimum (pH 7,0 suhu 37°C selama 30 menit).

Aktivitas spesifik dan kemurnian ekstrak enzim kasar pada tahapan ini masih relatif rendah. Hal ini karena di dalam ekstrak enzim kasar masih terkandung protein-protein terlarut lainnya selain protein enzim bromelain. Oleh karena itu, untuk mendapatkan enzim bromelain dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi, perlu dilakukan beberapa rangkaian proses pemurnian lebih lanjut melalui berbagai cara pemisahan protein enzim bromelain dari protein-protein lainnya.

Fraksinasi dengan cara pengendapan menggunakan amonium sulfat belum murni sepenuhnya meskipun sudah terbebas dari pengotor non-protein terlarut. Hal ini dikarenakan protein yang terendapkan oleh garam amonium sulfat tidak hanya protein enzim bromelain, namun juga bisa berasal dari protein lainnya (Soares et al., 2012). Selain itu, dalam endapan tersebut juga masih terdapat pengaruh dari garam amonium sulfat yang ditambahkan sebelumnya. Oleh karena itu, fraksi enzim yang diperoleh dari tahap fraksinasi dengan amonium sulfat perlu dilakukan tahapan pemurnian lebih lanjut.

Kromatografi kolom penukar ion merupakan tahapan pemurnian lanjutan yang bertujuan untuk memisahkan protein bromelain dari protein non-bromelain lainnya sehingga diperoleh protein bromelain dengan aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian yang lebih tinggi. Gabungan fraksi-fraksi yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi berada pada puncak serapan protein ketiga (AP3), yaitu kumpulan fraksi 59 sampai dengan 80. Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa AP3 merupakan fraksi bromelain yang paling murni dan terelusi pada gradien konsentrasi garam NaCl 0,75 M. selanjutnya, fraksi AP 3 dengan aktivitas spesifik 500 Unit/mg

Berat molekul dari fraksi enzim dengan aktivitas spesifik tertinggi hasil pemurnian dengan DEAE-Sepharosa memiliki range berat molekul berkisar 21,5-31 kDa. Data untuk berat molekul bromelain standar juga berkisar 21,5-31 kDa. Oleh karena itu, fraksi enzim hasil pemurnian memiliki range berat molekul yang relatif sama dengan bromelain standar berkisar 28-30 kDa.

SIMPULAN DAN REKOMENDASI

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 kemurninan 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. Fraksi enzim hasil pemurnian memiliki range berat molekul yang relatif sama dengan bromelain standar berkisar 28-30 kDa.

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 dipekatkan dengan menggunakan freeze dry untuk mendapatkan fraksi dengan aktivitas proteolitik yang lebih tinggi.

REFERENSI

Bhattacharyya, B. K. (2008). *Bromelain: An Overview*.

Fatchiyah, E. L., Arumingtyas S., Widyarti, & Rahayu, S. (2011). *Biologi molekuler: prinsip dasar analisis*.

Ilyas, N. M., Abbas, G. H., Munawwarah, & Halimah Husain. (2023). Pemurnian Parsial Ekstrak Bonggol Nanas (Ananas comosus) dengan Kromatografi Kolom Penukar Ion. *Jurnal Chemica*, *24*(1), 73–77.

Ilyas, N. M., Setiasih, S., Hudiyono, S., Negeri Makassar, U., Daeng Tata Makassar, J., & UNM Parangtambung, K. (2020). *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Bromelain dari Bonggol dan Daging Buah Nanas (Ananas comosus)*.

Nadzirah, *, Zainal, K. Z., Noriham, S., & Normah, A. (2013). Efficacy of selected purification techniques for bromelain. In *International Food Research Journal* (Vol. 20, Issue 1).

Ramalingam, C., Srinath, R., & Nasimun Islam, N. (2012). Isolation and characterization of Bromelain from pineapple (Ananas Comosus) and comparing its anti-browning activity on apple juice with commercial anti-browning agents. *Elixir Food Science*, *45*, 7822–7826.

Soares, P., Coelho, D., Mazzola, P., Silveira, E., Das, M., Carneiro-Da-Cunha, G., Pessoa, A., & Tambourgi, E. (2012). *Purification of bromelain from bromelain wastes by precipitation ethanol*.