

PENENTUAN PARAMETER FISIKA DAN KIMIA BROMELIN KASAR DARI BATANG NANAS

(*Ananas comosus* Merr.)

Rieke Azhar¹, Budi Ariyanto¹ dan Salman Umar²

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang

²Fakultas Farmasi, Universitas Andalas

ABSTRACT

Isolation of crude bromelain from pineapple stem has been done using phosphate buffer pH 7.0 as solvent, then it was centrifuged at 3,500 rpm for 15 minutes. Its physicochemical properties then evaluated by its organoleptic, solubility, loss of drying, ash content, pH value, microscopic photo, particle size distribution, water absorption, protein qualitative and quantitative test. Its total protein analysis done by using Mikro Kjeldahl method than gave result 8.0384% proteins.

Keywords: *Physical and chemical parameters, Crude bromelain, Pineapple stem..*

Pendahuluan

Bromelin merupakan enzim proteolitik seperti halnya renin, papain dan fisin yang mempunyai sifat menghidrolisa protein dan menggumpalkan susu. Dengan demikian enzim bromelin dapat digunakan sebagai substitusi bagi enzim sejenis lainnya. Enzim proteolitik digunakan dalam industri bir, industri cat, industri obat-obatan, pengolahan daging, penyamak kulit pembuatan konsentrat protein ikan, dan lain-lain (Sebayang, 2006).

Bromelin dapat diperoleh dari tanaman nanas baik dari tangkai, kulit, daun, buah, maupun batang dalam jumlah yang berbeda tetapi bromelin lebih banyak terdapat pada batang nanas yang selama ini belum 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 nanas mengandung bromelin lebih banyak dibandingkan dengan bagian tepinya (Rocky, 2009).

Bromelin berkhasiat membantu pencernaan makanan antiinflamasi, mengangkat sel-sel kulit yang mati serta mengobati penyakit kulit seperti gatal-gatal, eksim dan kudis. Selain itu enzim bromelin juga berkhasiat untuk proses penyembuhan luka dan mengurangi pembengkakan dan peradangan di dalam tubuh (Herdystuti, 2006).

Dalam bidang farmasi, bromelin banyak digunakan untuk mengobati gangguan saluran cerna seperti susah buang air besar (ISFI, 2009) dan khasiat lainnya seperti antiradang, mengganggu pertumbuhan sel kanker, mempunyai aktivitas

antiplatelet dan fibrinolitik (Anonim, 2011). Bromelin tergolong ke dalam enzim proteolitik yang mengkatalisa penguraian protein menjadi asam-asam amino. Bromelin stabil pada suhu 400°C – 600°C dan pH 4,0 – 8,0 yang dapat berkerja optimal pada suhu 55°C dan pH 7,0. Bromelin tidak stabil pada lambung, dimana lambung mempunyai pH asam berkisar 1 – 3 yang dapat menyebabkan protein bromelin terkoagulasi (Herdystuti, 2006). Disamping itu bromelin merupakan serbuk amorf yang mudah mengalami oksidasi dan hidrolisis karena pengaruh faktor lingkungan (Chaidir, 2006).

Preformulasi merupakan langkah awal dalam penelitian untuk memperoleh informasi yang dibutuhkan dalam proses formulasi sediaan obat yang stabil secara fisika, kimia dan dengan ketersediaan hayati yang menguntungkan. Preformulasi mulai berkembang pada akhir tahun 1950 dan awal tahun 1960, sebagai hasil dari perkembangan produk industri farmasi. Sampai pertengahan tahun 1950, penekanan hanya dalam perkembangan produk, untuk mengembangkan bentuk sediaan yang elegan dan pertimbangan organoleptis dari sediaan (Wells, 1987).

Ruang lingkup preformulasi meliputi studi sifat-sifat fisikokimia senyawa baru yang dapat mempengaruhi penampilan obat dan studi pengembangan bentuk sediaan yang manjur dengan rancangan formulasi yang rasional (Wells, 1987).

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti mencoba untuk melakukan penelitian tentang pengujian preformulasi terhadap bromelin dari batang nanas berdasarkan sifat-sifat fisikokimianya.

Metodologi Penelitian

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Pisau, blender, wadah plastik, kain kasa, sentrifuge (Tube Centrifuge DKC-1008T®), ayakan, oven, aluminium foil, kertas saring, alat-alat gelas standar laboratorium, pipet, buret dan standar, timbangan analitik (Shimadzu AUX 220®), krus porselen, desikator, pH meter (Hanna Instruments pH-211®), mikroskop-okulomikro meter, alat Enslin, seperangkat alat Kjeldahl (Gerhardt®).

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Batang nanas (*Ananas comosus* Merr.), dapar pospat pH 7,0, natrium metabisulfit 0,2%, reagen biuret, serum albumin, aquadest.

Prosedur Penelitian

Identifikasi Tanaman Nanas

Identifikasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Andalas Padang.

Pembuatan Bromelin Kasar

Pengambilan Batang Nanas

Batang nanas yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang nanas yang buahnya baru selesai dipanen di kabupaten Kampar, provinsi Riau.

Isolasi Bromelin Kasar dari Batang Nanas

Batang nanas yang telah dibersihkan, dipotong kecil-kecil, kemudian setiap 200 gram batang nanas diblender dengan menambahkan 100 mL buffer fosfat pH 7,0. Preparat halus ini kemudian disaring dengan menggunakan kain kasa untuk mendapatkan sari batang. Setelah itu sari batang disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Endapan yang muncul kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit sehingga diperoleh tiga lapisan. Lapisan pertama yaitu lapisan berupa cairan, lapisan kedua berupa koloid yang mengandung enzim bromelain dan lapisan ketiga berupa pati. Lapisan cairan diambil dengan menggunakan pipet tetes dan lapisan koloid diambil dengan menggunakan spatel. Lapisan cairan dan lapisan pati tidak digunakan, sehingga diperoleh lapisan koloid yang mengandung enzim bromelin. Selanjutnya ditambahkan larutan natrium metabisulfit 0,2%

sebanyak tiga kali berat koloid yang diperoleh, kemudian koloid ini dikeringkan pada suhu kurang lebih 55°C dalam oven selama lebih kurang 7 jam hingga diperoleh ekstrak kering, kemudian digerus dan diayak dengan ayakan mesh 48 (Herdyastuti, 2006).

Evaluasi Bromelin Kasar

Pemeriksaan Organoleptis (Depkes, 1979).

Pengamatan dilakukan secara visual dengan mengamati bentuk, warna dan bau dari serbuk bromelin.

Pemeriksaan Kelarutan (Depkes, 1979).

Pemeriksaan kelarutan dilakukan terhadap air, aseton, etanol, asam (HCl), dan basa (NaOH). Sebanyak 1 gram serbuk bromelin dimasukkan ke dalam erlemeyer, lalu dilarutkan dengan masing-masing pelarut melalui buret sampai sampel larut. Catat volume pelarut yang digunakan, kemudian bandingkan dengan istilah kelarutan yang tertera pada Farmakope Indonesia edisi III.

Pemeriksaan pH Larutan (Depkes, 1989).

Dengan menggunakan pH meter, caranya terlebih dahulu alat dikalibrasi menggunakan larutan dapar asetat pH 4,0 dan dapar fosfat pH 7,0 sehingga berada diantara angka tersebut. Kemudian elektroda dicuci dengan air suling dan keringkan dengan tissue. Pengukuran pH serbuk bromelin kasar dilakukan dengan cara mengencerkan 1 gram serbuk bromelin kasar dengan air suling hingga 10 mL dalam wadah yang cocok. Kemudian elektroda dicelupkan ke dalam wadah tersebut dan biarkan angka bergerak sampai posisi konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter merupakan harga pH serbuk bromelin.

Pemeriksaan Susut Pengeringan (Depkes, 1989).

Sebanyak 1 gram bromelin dimasukkan ke dalam botol timbang yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara, kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 2 jam lalu didinginkan dalam desikator dan timbang sampai diperoleh bobot tetap.

Pemeriksaan Kadar Abu (Depkes, 1989).

Sebanyak 1 gram serbuk bromelin dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah ditimbang dan dipijarkan. Pijarkan perlahan-lahan pada suhu $600^{\circ}\text{C} - 700^{\circ}\text{C}$ hingga arang habis, lalu didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap.

Pemeriksaan Foto Mikroskopis

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan alat mikroskop. Serbuk bromelin didispersikan dalam parafin lalu diteteskan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* kemudian dilihat di bawah mikroskop lalu difoto dengan pembesaran tertentu.

Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel (Voight, 1994).

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan metode mikroskop okulomikrometer, dimana partikel dapat dibandingkan berdasarkan ukuran panjang. Sebelum digunakan mikroskop dikalibrasi terlebih dahulu, dan partikel yang akan diamati pada mikroskop sebanyak 1000 partikel.

Pemeriksaan Daya Serap Air (Voight, 1994).

Dengan menggunakan alat *Enslin*, caranya sebanyak 1 gram serbuk bromelin diletakan di atas corong *hirsch* dan disebar merata kemudian catat jumlah air yang diserap tiap selang waktu tertentu dengan membaca skala pada alat, amati sampai 1 jam.

Pemeriksaan Kualitatif Protein (Anonim, 2009).

1. Metode Biuret

Larutan protein (sampel) dibuat alkalis dengan NaOH kemudian ditambahkan larutan CuSO_4 encer. Uji ini memberikan reaksi positif yang ditandai dengan timbulnya warna merah violet atau biru violet.

2. Reaksi Xantoprotein

Larutan HNO_3 pekat ditambahkan dengan hati-hati ke dalam protein. Setelah tercampur sempurna akan terjadi endapan putih yang dapat berubah menjadi kuning apabila dipanaskan.

3. Bromelin kasar ditambahkan pelarut alkohol.

Uji ini akan bereaksi positif apabila terbentuknya gumpalan.

Penentuan Kadar Protein dengan Metoda Mikro Kjeldahl (Sudarmadji, 1996).

Bahan ditimbang sebanyak 1 gram dan masukkan ke dalam labu Kjeldahl. Tambahkan 10 mL H_2SO_4 pekat, 1 gram selenium mixture dan beberapa batu

didih, lalu dipanaskan untuk menghilangkan uap SO_2 . Pemanasan mula-mula dengan nyala api kecil lalu api hijau, hingga terbentuk larutan berwarna jernih kehijauan dan uap SO_2 hilang. Kemudian dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas. Pipet 10 mL dan masukkan ke labu destilasi dan ditambahkan 10 mL NaOH 33 %, lalu disulung. Destilasi dilakukan sampai uap destilasi tidak bereaksi basa (diuji dengan kertas pH). Hasil destilasi ditampung dalam 10 mL larutan asam borat (H_3BO_3 3 %). Setelah selesai destilasi, ujung kondensor dibilas dengan aquadest. Kemudian dititrasikan dengan HCl standar menggunakan indikator merah metil.

Analisa Data

Penetapan kadar protein dari bromelin kasar diperoleh berdasarkan kandungannya dapat diketahui dengan menggunakan metode mikro kjeldahl:

$$\% \text{ N} = \frac{\text{mL HCl} \times \text{N HCl} \times \text{BM N} \times 100\% \times \text{FP}}{\text{mg sampel}}$$

$$\text{Kadar Protein} = \% \text{ N} \times \text{FK}$$

Keterangan:

FP : Faktor Pengenceran

FK: Faktor Konversi (6,25)

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk memformulasi dan mempelajari serta mengetahui tentang karakteristik sifat fisikokimia bromelin kasar dari batang nanas (*Ananas comosus* Merr.) dalam bentuk sedia serbuk, dimana telah dilaporkan bahwa batang nanas yang mengandung bromelin selama ini kurang dimanfaatkan (Herdyastuti, 2006). Identifikasi tanaman nanas telah dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Andalas (UNAND) Padang, dengan nomor specimen 1 didapatkan famili bromeliacease dengan nama spesies *Ananas comosus* Merr. yang kemudian dilakukan pengisolasian terhadap batang nanas tersebut.

Isolasi bromelin dari batang nanas dilakukan dengan menggunakan dapar fospat pH 7,0 untuk membantu memblendernya batang nanas yang sebelumnya sudah dipotong kecil-kecil, karena bromelin lebih efektif bekerja pada pH 7,0 yang merupakan pH optimumnya (Herdyastuti, 2006). Hasil dari pemblendernya batang nanas disaring kemudian sari batangnya dipisahkan dari ampas lalu dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 3,500 rpm selama lebih kurang 15 menit sehingga

didapatkan tiga lapisan yang mana lapisan atas berupa air, lapisan tengah berupa koloid dan lapisan bawah berupa pati. Dari ketiga lapisan tersebut hanya lapisan tengah (koloid) yang dibutuhkan karena pada lapisan itu banyak mengandung enzim bromelin. Koloid yang didapat ditambahkan natrium metabisulfit 0,2% sebanyak 3 kali beratnya, yang berfungsi sebagai antioksidan dan agar tidak terjadi perubahan warna terhadap koloid tersebut, kemudian koloid dioven sampai kering sehingga menghasilkan bromelin kasar.

Dalam memformulasi sediaan farmasi diperlukan 3 tahapan yaitu preformulasi, formulasi, dan evaluasi. Proses preformulasi ini diperlukan untuk pengujian karakteristik terhadap sifat fisikokimia dari bahan baku yang akan digunakan untuk membuat sediaan farmasi tersebut. Bromelin kasar sebagai bahan baku memerlukan pemeriksaan meliputi organoleptis, kelarutan, susut pengeringan dan kadar abu serta pH yang diperiksa sesuai dengan persyaratan oleh *Certificate of analysis* bromelin dari Bernofarm. Hasil pemeriksaan ini telah memenuhi persyaratan.

Hasil perolehan koloid bromelin yaitu 82,4491 gram, kemudian ditambahkan natrium metabisulfit 0,2% yang berfungsi agar tidak memberikan perubahan warna terhadap koloid tersebut sebanyak 3 kali berat koloid bromelin sebanyak 0,4947 gram sehingga berat koloid menjadi 82,9438 gram. Hasil koloid bromelin yang telah dikeringkan diperoleh berat 27,6341 gram dengan perolehan persentase rendemen 0,1382%.

Perolehan koloid kering bromelin kasar
 Berat cawan kosong = 31,2769 g
 Berat cawan dan koloid = 113,7260 g
 Berat koloid = 82,4491 g
 Penambahan Natrium metabisulfit 0,2% sebanyak tiga kali
 berat koloid yaitu:

$$3 \times 82,4491 \text{ g} = 247,3473 \text{ g}$$

$$0,2\% \times 247,3473 \text{ g} = 0,4947 \text{ g}$$

 Berat koloid bromelin = 82,9438 g
 Berat bromelin kasar = 27,6341 g

Contoh Perhitungan 2. Perolehan rendemen (%) bromelin kasar

Berat sampel (batang nanas) = 20 kg = 20.000 g
 Berat bromelin kasar = 27,6341 g

$$\text{Rendemen}(\%) = \frac{27,6341 \text{ g}}{20.000 \text{ g}} \times 100 \% = 0,1382 \%$$

Hasil evaluasi organoleptis menunjukkan bahwa bromelin kasar yang telah dilakukan pengisolasian tidak jauh berbeda dengan persyaratan *Certificate of analysis* bromelin dari Bernofarm, hal ini ditunjukkan dengan bentuk, warna, bau dan rasa.



Gambar 8. Serbuk Bromelin Kasar

Dari pemeriksaan kelarutan bromelin kasar dengan menggunakan beberapa pelarut didapatkan hasilnya berupa larutan koloid pada air (1 g : 100 mL), praktis tidak larut terhadap etanol 96% (1 g : 10.500 mL), dan HCl 0,1N (1 g : 10.200 mL), serta sangat sukar larut terhadap aseton (1 g : 10.000 mL) dan NaOH 0,1N (1 g : 2.500 mL). Hasil tersebut didapatkan sesuai dengan istilah kelarutan yang tertera pada Farmakope Indonesia Edisi III.

Tabel VIII. Hasil data pemeriksaan kelarutan bromelin kasar

No	Pemeriksaan	Pengamatan	Perbandingan (g/mL)
1.	Air	Larutan koloid	1 g : 100 mL
2.	Alkohol	Praktis tidak larut	1 g : 10500 mL
3.	HCl 0,1N	Praktis tidak larut	1 g : 10200 mL
4.	NaOH 0,1N	Sangat sukar larut	1 g : 2500 mL
5.	Aseton	Sangat sukar larut	1 g : 10000 mL

Pemeriksaan pH larutan dilakukan dengan menggunakan pH meter, dari hasil pemeriksaan bromelin kasar diperoleh pH 5,60; 5,62; dan 5,59 dengan perolehan hasil rata-rata pH 5,60 sedangkan dalam data *Certificate of analysis* bromelin dari Bernofarm, bromelin stabil pada pH 3,0 – 6,0. Menurut (Herdyastuti, 2006) pH optimum bromelin adalah 7,0 yang mana merupakan pH yang dapat bekerja secara optimal.

Tabel IX. Hasil data pemeriksaan pH larutan bromelin kasar

No	pH larutan bromelin kasar yang diperoleh
1.	5,62
2.	5,60
3.	5,59

$$\text{pH rata-rata} = 5,60 \pm 0,0158$$

Pemeriksaan susut pengeringan bromelin kasar dilakukan dalam tiga kali pengulangan dimana diperoleh hasil pertama 4,9660%; kedua 3,3250%; dan ketiga 4,9346% dengan perolehan rata-rata 4,4085%, dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa hasil susut pengeringan bromelin kasar memenuhi persyaratan karena tidak lebih dari 5,0% sesuai dengan *Certificate of analysis* bromelin dari Bernofarm.

Tabel X. Hasil data pemeriksaan susut pengeringan bromelin kasar

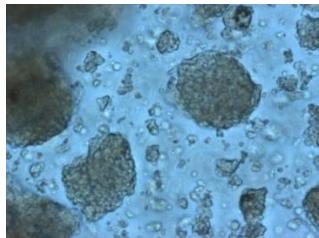
No	Susut pengeringan bromelin kasar yang diperoleh
1.	4,9660 %
2.	3,3250 %
3.	4,9346 %
Susut pengeringan rata-rata = $4,4085 \% \pm 0,9385$	

Pemeriksaan kadar abu bromelin kasar juga dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dimana hasil yang didapatkan 6,4983%; 7,3945%; dan 6,4738% dengan perolehan hasil rata-rata kadar abu pada bromelin kasar yaitu 6,7887%, sedangkan menurut *Certificate of analysis* bromelin dari Bernofarm kadar abunya adalah 6,0%.

Tabel XI. Hasil data pemeriksaan kadar abu bromelin kasar.

No	Kadar abu bromelin kasar yang diperoleh
1.	6,4983 %
2.	7,3945 %
3.	6,4738 %
Kadar abu rata-rata = $6,7887 \% \pm 0,5245$	

Pemeriksaan mikroskopis bromelin kasar dilakukan dengan menggunakan foto mikroskop dengan perbesaran 10×4 . Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bromelin kasar dalam bentuk serbuk yang dihasilkan berbentuk sferis atau mendekati bulat.

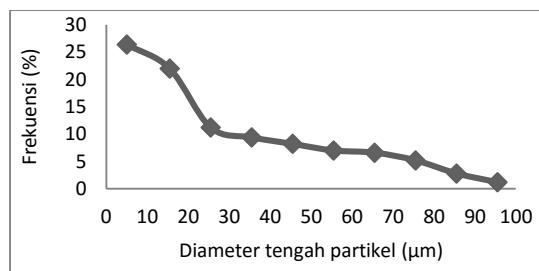


Gambar 9. Foto mikroskopis bromelin kasar dengan pembesaran 10×4 .

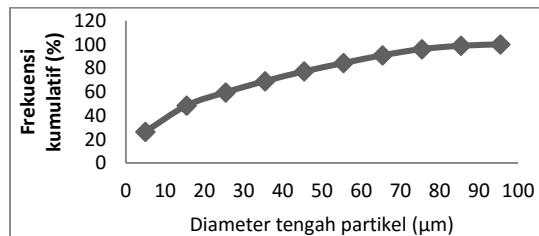
Distribusi ukuran partikel bromelin kasar dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi okulomikrometer, hasil kalibrasi dengan menggunakan mikrometer pentas diperoleh 1 skala okuler sama dengan $10 \mu\text{m}$. Pemeriksaan distribusi ukuran partikel ini dilakukan dengan menghitung partikel sebanyak 1000 partikel. Hasil yang diperoleh dari ukuran partikel bromelin kasar yaitu bentuk kurva distribusi ukuran partikel tidak berbentuk kurva distribusi normal atau tidak simetris terhadap nilai tengah, hal ini disebabkan karena jumlah partikel serbuk bromelin kasar banyak terdapat pada rentang ukuran partikel $0 - 10 \mu\text{m}$, sehingga diperoleh persentase frekuensinya lebih dari 25%, sedangkan diameter panjang rata-rata adalah $30,328 \mu\text{m}$.

Tabel XII. Hasil data pemeriksaan ukuran partikel bromelin kasar

No	Ukuran partikel (μm)	Diameter tengah partikel (d)	Jumlah partikel (n)	(n.d)	Frekuensi (%)	Frekuensi Kumulatif (%)
1	0 – 10	5	264	1320	26,4	26,4
2	11 – 20	15,5	220	3410	22,0	48,4
3	21 – 30	25,5	112	2856	11,2	59,6
4	31 – 40	35,5	94	3337	9,4	69,0
5	41 – 50	45,5	82	3731	8,2	77,2
6	51 – 60	55,5	70	3885	7,0	84,2
7	61 – 70	65,5	66	4323	6,6	90,8
8	71 – 80	75,5	52	3926	5,2	96,0
9	81 – 90	85,5	28	2394	2,8	98,8
10	91 – 100	95,5	12	1146	1,2	100
Σ			1000	30328	100	



Gambar 1. Kurva frekuensi distribusi ukuran partikel bromelin kasar.



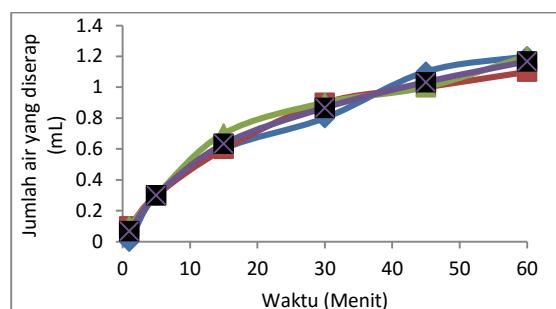
Gambar 2. Kurva kumulatif distribusi ukuran partikel bromelin kasar.

Daya penyerapan air bromelin kasar diperiksa dengan menggunakan alat Enslin, dimana dibutuhkan sebanyak 1 gram bromelin kasar untuk masing-masing pengamatan yang dilakukan, pemeriksaan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, dari hasil yang diperoleh pada pengamatan kedua jumlah air yang diserap sebanyak $1,1 \text{ mL}$, sedangkan pada pengamatan pertama dan ketiga jumlah air yang diserap oleh bromelin kasar dalam bentuk serbuk sebanyak $1,2 \text{ mL}$. Dari ketiga pengamatan tersebut ternyata jumlah air yang diserap oleh bromelin kasar selama selang waktu 1 jam diperoleh hasil yang hampir sama atau tidak jauh berbeda yaitu berkisar antara $1,1 \text{ mL}$ dan $1,2 \text{ mL}$, dengan jumlah air rata-rata yang diserap oleh bromelin kasar yaitu sebanyak $1,167 \text{ mL}$, sehingga diperoleh kurva yang

berbentuk isotherm tipe I menurut BET (Brunauer, Emmet, Teller).

Tabel XIII. Hasil data pemeriksaan daya serap air bromelin kasar

Waktu (menit)	Jumlah air yang diserap oleh bromelin kasar (mL)			Jumlah air rata-rata yang diserap oleh bromelin kasar (mL)
	I	II	III	
1	0	0,1	0,1	0,067
5	0,3	0,3	0,3	0,300
15	0,6	0,6	0,7	0,633
30	0,8	0,9	0,9	0,867
45	1,1	1	1	1,033
60	1,2	1,1	1,2	1,167



Gambar 3. Kurva daya serap air bromelin.

Pemeriksaan kualitatif bromelin kasar dengan menggunakan alkohol akan bereaksi positif membentuk gumpalan, dan direaksikan dengan menggunakan reagen biuret bromelin kasar membentuk larutan dan berubah warna menjadi biru violet sedangkan direaksikan dengan menggunakan larutan HNO_3 membentuk endapan warna kuning setelah dipanaskan.

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metoda mikro Kjeldahl. Prinsip metoda ini adalah oksidasi senyawa organik oleh asam sulfat untuk membentuk CO_2 dan H_2O serta pelepasan nitrogen dalam bentuk ammonia yaitu penentuan protein berdasarkan jumlah nitrogen. Dalam penentuan protein seharusnya hanya nitrogen yang berasal dari protein saja yang ditentukan. Akan tetapi teknik ini sulit sekali dilakukan mengingat kandungan senyawa nitrogen ini biasanya sangat kecil yang meliputi urea, asam nukleat, ammonia, nitrat, nitrit, asam amino, amida, purin, pirimidin. Oleh karena itu penentuan jumlah N total ini tetap dilakukan untuk mewakili jumlah protein yang ada (Sudarmadji, 1996). Analisa protein dengan metoda ini terbagi atas 3 tahapan yaitu proses destruksi, destilasi dan titrasi.

Pada tahap destruksi 1 gram sampel dimasukkan kedalam labu kjeldahl, kemudian ditambahkan 1 gram selenium dan 10 mL H_2SO_4 pekat. Kemudian

campuran ini dipanaskan dalam lemari asam sampai berhenti berasap dan diteruskan pemanasan sampai mendidih sehingga terbentuk suatu larutan menjadi jernih. Selenium berfungsi untuk mempercepat proses destruksi karena zat tersebut dapat menaikkan titik didih asam sulfat sehingga destruksi dapat berjalan lebih optimal. Suhu destruksi berkisar antara 370°C – 410°C . Pada proses ini terjadi penguraian sampel menjadi unsur-unsurnya yaitu unsur-unsur C, H, O, N, S, dan P. Unsur N digunakan untuk menentukan kandungan protein dalam sampel tersebut. Asam sulfat bersifat oksidator kuat yang akan mendestruksi sampel menjadi unsur-unsurnya. Penambahan asam sulfat dilakukan dalam lemari asam untuk menghindari S yang berada dalam protein akan terurai menjadi SO_2 yang sangat berbahaya. Selain selenium katalisator N juga dapat digunakan campuran K_2SO_4 dan HgO (20:1), dimana tiap 1 gram K_2SO_4 dapat menaikkan titik didih H_2SO_4 3°C (Sudarmadji, 1996).

Pada tahap destilasi, larutan sampel yang telah didestruksi didinginkan kemudian ditambahkan dengan 100 mL aquadest untuk melarutkan sampel hasil destruksi agar dapat didestilasi dengan sempurna, lalu larutan dipipet sebanyak 10 mL dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan 10 mL NaOH. Kemudian hasil destilat ditampung dalam labu erlenmeyer yang berisi 10 mL asam borat (H_3BO_3 3%) dan ditambah 3 tetes indikator BCG-MR (*bromo cresol green* dan *methyl red*) yang merupakan indikator bersifat amfoter, yaitu dapat bereaksi dengan asam maupun basa. Indikator ini digunakan untuk mengetahui asam dalam keadaan berlebih dan memiliki trayek pH 6-8 yang berarti trayek kerjanya luas (meliputi asam-netral-basa). Pada suasana asam akan berwarna merah muda, sedangkan pada suasana basa akan berwarna biru. Setelah ditambah BCG-MR, larutan akan berwarna merah muda karena berada dalam kondisi asam. Pada dasarnya tujuan destilasi adalah untuk memisahkan zat yang diinginkan, yaitu dengan memecah ammonium sulfat menjadi ammonia (NH_3) dengan menambah 10 mL NaOH kemudian dipanaskan. Prinsip destilasi adalah memisahkan cairan atau larutan berdasarkan perbedaan titik didih. Fungsi penambahan NaOH adalah untuk memberikan suasana basa karena reaksi tidak dapat berlangsung dalam keadaan asam.

Asam borat (H_3BO_3) berfungsi sebagai penangkap ammonia (NH_3) sebagai destilat berupa gas yang bersifat basa. Supaya ammonia dapat ditangkap secara maksimal, maka sebaiknya ujung alat destilasi ini tercelup semua ke dalam larutan asam standar sehingga dapat ditentukan jumlah protein sesuai dengan kadar protein bahan. Selama proses destilasi lama-kelamaan larutan asam borat akan

berubah membiru karena larutan menangkap adanya ammonia dalam bahan yang bersifat basa sehingga mengubah warna merah muda menjadi biru.

Reaksi destilasi akan berakhir bila ammonia yang telah terdestilasi tidak bereaksi. Setelah destilasi selesai larutan sampel akan berwarna keruh dan terdapat endapan di dasar labu destilat (endapan HgO) dan larutan asam dalam erlenmeyer berwarna biru karena dalam suasana basa akibat menangkap ammonia. Ammonia yang terbentuk selama destilasi dapat ditangkap sebagai destilat setelah diembunkan (kondensasi) oleh pendingin balik di bagian belakang alat Kjeldahl dan dialirkan ke dalam erlenmeyer.

Tahap titrasi ini merupakan tahap terakhir dari metoda Kjeldahl. Hasil dari destilasi akan dititrasi. Apabila penampung destilat digunakan asam borat maka banyaknya asam borat yang bereaksi dengan ammonia dapat diketahui dengan titrasi menggunakan asam klorida 0,1 N. Akhir titrasi ini menunjukkan perubahan warna larutan dari biru menjadi merah muda. Hasil dari destilasi dititrasi sehingga didapatkan volume HCl yang terpakai adalah 0,95 mL; 0,88 mL; dan 0,90 mL. Hasil titrasi menunjukkan perubahan warna biru menjadi warna merah muda. Dari data tersebut dapat diketahui kandungan protein dalam 1000 mg sampel adalah 8,0384%.

Tabel XV. Hasil Data Analisa Protein dan Metoda Mikro Kjeldahl

Pengulangan sampel	Volume HCl terpakai (mL)	% N	% Kadar protein
I	0,95	1,3427	8,3919
II	0,88	1,2450	7,7812
III	0,90	1,2707	7,9420
Rata-rata % kadar protein bromelin kasar			8,0384

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Bromelin kasar yang diisolasi dari batang nanas (*Ananas comosus* Merr.) dalam bentuk serbuk memiliki karakteristik sifat fisikokimia yang tidak jauh berbeda dengan *Certificate of analysis* bromelin Bernofarm.
2. Penetapan kadar protein bromelin kasar dengan menggunakan metoda Mikro Kjeldahl diperoleh sebesar 8,0384% protein.

Daftar Pustaka

- Anonim. (2011). *Nanas*, Diakses 15 Maret 2011 dari <http://agrolink.moa.my/doa/bcd/fruits/nanas/nanas.html>.
- Anonim. (2011). *Tanaman Obat Indonesia*, Diakses 15 Maret 2011 dari <http://www.itek.net.id.htm>.
- Chaidir, Z. (2006). *Enzim Amobil Bromelain*. (Tesis). Bandung: ITB.
- Departemen Kesehatan (1979). *Farmakope Indonesia*. (Edisi III). (Dirjen POM RI). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan (1989). *Materi Medika Indonesia*. (Jilid V). (Dirjen POM RI). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Hakim, A. (2009). *Analisa Protein*, Diakses 1 Mei 2011 dari <http://mgmpkimiasumbar.wordpress.com>.
- Herdyastuti, N. (2006). Isolasi dan Karakteristik Ekstrak Kasar Enzim Bromelain dari Batang Nanas (*Ananas comosus* L. Merr). *Jurnal Berk. Penel. Hayati* 12, 75 – 77.
- Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia, (2009). *Informasi Spesialite Obat Indonesia*. Bandung: PT. Errita Pharma.
- Rocky. (26 Agustus 2009). *Tanduran panen: Sejarah, Klasifikasi Dan Morfologi Nanas*, Diakses 21 April 2011 dari <http://www.rocky16amelungi.wordpress.com>.
- Rukmana, R. (1996). *Nanas Budidaya dan Pasca Panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sebayang, F. (2006). Pengujian Stabilitas Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Bonggol Nanas Imobilisasi Menggunakan Kappa Karagenan. *Jurnal Sains Kimia*. Vol 10, No.1, 20 – 26.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., & Suhardi, (1996). *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Voight, R. (1994). *Buku Pelajaran Tekhnologi Farmasi* (Edisi V). (Diterjemahkan oleh Soedani Noerono). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wells, J. I. (1987). *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances*. Wingham: Ellis Horwood Limited.