

Teknik pengekstrakan dan penentuan kandungan bromelin dalam nanas dan produk berasaskannya (Method to extract and determine bromelain in pineapple and its product based)

Mohd Nazrul Hisham Daud, Mohd Lip Jabit, Wan Nurzahidah Wan Zainon, Hadijah Hassan, Joanna Cho Lee Ying dan Razali Mustafa

Pengenalan

Nanas ataupun nama saintifiknya *Ananas comosus* tergolong dalam kategori buah-buahan tanaman utama di Malaysia. Sehingga tahun 2018, seluas 13,027 hektar tanah telah ditanam dengan tanaman ini dengan nilai pengeluaran berjumlah 375,900 tan. Negeri Johor mencatatkan nilai pengeluaran nanas paling tinggi iaitu 274,284 tan diikuti oleh Sarawak dan Sabah masing-masing mencatatkan nilai pengeluaran 25,664 dan 11,155 tan.

Berdasarkan rujukan Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia, terdapat beberapa varieti ataupun kultivar utama nanas yang ditanam bagi tujuan komersial di Malaysia antaranya ialah MD2, Moris, Nanas Sarawak, Yankee, Gandul, Josapine, Maspine dan N36. *Gambar 1* menunjukkan varieti ataupun kultivar utama nanas yang ditanam di Malaysia.

Pada masa kini, varieti nanas MD2 mempunyai nilai harga pasaran yang agak tinggi berbanding dengan varieti lain. Oleh yang demikian, ramai petani mula menumpukan usaha terhadap tanaman nanas varieti ini. Secara umumnya, 70% daripada nanas segar di Malaysia dipasarkan di dalam negara, manakala 30% lagi untuk pasaran eksport. Bagi nanas terproses pula terutama yang melibatkan pengkalengan, 95% daripadanya adalah untuk pasaran eksport dan 5% untuk pasaran tempatan. Antara negara pengimport utama nanas segar dan produk berasaskannya ialah Singapura, Asia Barat, Arab Saudi, Emiriah Arab Bersatu, Brunei dan Hong Kong. *Gambar 2* menunjukkan antara produk nanas yang terdapat di pasaran.





Kultivar	: Nanas Moris Gajah
Kumpulan	: Queen
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 3.0 – 6.0 kg
Bentuk buah	: Silinder
Warna kulit	: Ungu gelap
Jumlah mata	: 140 – 180 mata
Lebar empulur	: 1.8 – 2.2 cm
Warna isi	: Kuning keemasan
Kandungan gula	: 12 – 14% Brix
Asid sitrik	: 0.3 – 0.5%
Kegunaan	: Segar



Kultivar	: Nanas Sarawak
Kumpulan	: Cayenne
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 2 – 8 kg
Bentuk buah	: Tirus
Warna kulit	: Hijau jingga
Jumlah mata	: 100 – 160 mata
Lebar empulur	: 2.0 – 2.8 cm
Warna isi	: Kuning keemasan
Kandungan gula	: 14 – 17% Brix
Asid sitrik	: 0.3 – 1.2%
Kegunaan	: Segar



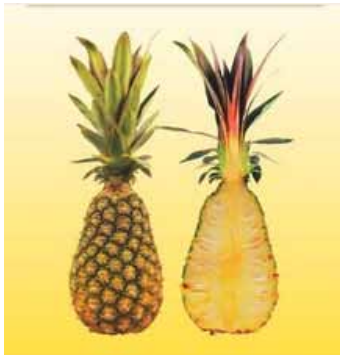
Kultivar	: Nanas Gandul
Kumpulan	: Spanish
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 1.0 – 1.5 kg
Bentuk buah	: Silinder
Warna kulit	: Ungu gelap
Jumlah mata	: 120 – 160 mata
Lebar empulur	: 1.8 – 2.2 cm
Warna isi	: Kuning keemasan
Kandungan gula	: 8 – 12% Brix
Asid sitrik	: 0.15 – 0.25%
Kegunaan	: Kaleng



Kultivar	: Nanas Josapine
Kumpulan	: Hibrid
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 1.0 – 1.3 kg
Bentuk buah	: Silinder
Warna kulit	: Merah jingga
Jumlah mata	: 120 – 140 mata
Lebar empulur	: 2.0 – 2.8 cm
Warna isi	: Kuning keemasan
Kandungan gula	: 16 – 17% Brix
Asid sitrik	: 0.5 – 1.2%
Kegunaan	: Segar



Kultivar	: Nanas Maspine
Kumpulan	: Hibrid
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 1.2 – 2.3 kg
Bentuk buah	: Silinder
Warna kulit	: Hijau muda
Jumlah mata	: 120 – 140 mata
Lebar empulur	: 2.0 – 2.8 cm
Warna isi	: Kuning keemasan
Kandungan gula	: 12 – 14% Brix
Asid sitrik	: 0.4 – 0.6%
Kegunaan	: Segar dan kaleng



Kultivar	: Nanas Yankee
Kumpulan	: Queen
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 1.0 – 2.1 kg
Bentuk buah	: Tirus
Warna kulit	: Hijau muda
Jumlah mata	: 100 – 120 mata
Lebar empulur	: 1.0 – 1.5 cm
Warna isi	: Putih jernih
Kandungan gula	: 11 – 14% Brix
Asid sitrik	: 0.6 – 0.8%
Kegunaan	: Segar



Kultivar	: N36
Kumpulan	: Hibrid
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 1.0 – 2.3 kg
Bentuk buah	: Silinder
Warna kulit	: Merah jingga
Jumlah mata	: 120 – 140 mata
Lebar empulur	: 2.0 – 2.8 cm
Warna isi	: Kuning keemasan
Kandungan gula	: 16 – 17% Brix
Asid sitrik	: 0.5 – 1.2%
Kegunaan	: Segar



Kultivar	: Nanas Moris
Kumpulan	: Queen
Pembiakan	: Sulur
Berat buah	: 0.8 – 2.0 kg
Bentuk buah	: Tirus
Warna kulit	: Hijau gelap
Jumlah mata	: 100 – 120 mata
Lebar empulur	: 2.0 cm
Warna isi	: Kuning, berongga dan rapuh
Kandungan gula	: 12 – 14% Brix
Asid sitrik	: 0.4 – 0.7%
Kegunaan	: Segar

Gambar 1. Varieti/kultivar nanas utama di Malaysia
 Sumber: Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia

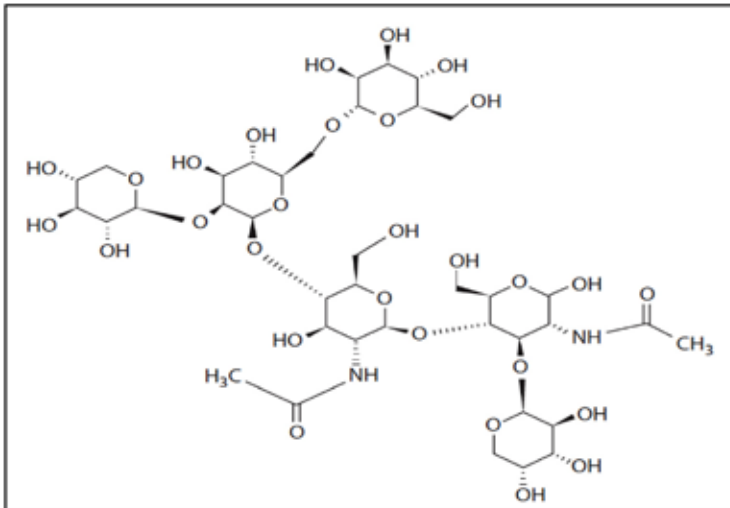


Gambar 2. Antara produk nanas yang terdapat di Malaysia

Selain rasa nanas yang enak, nilai pasaran ini dipengaruhi juga oleh kesedaran pengguna terhadap khasiat nanas. Nanas merupakan sumber vitamin utama yang penting seperti vitamin A, B1, B2, B3, B6 dan C yang mampu memainkan peranan dalam metabolisme badan manusia. Menurut kajian, nanas juga mengandungi kandungan sebatian kimia sekunder yang tinggi. Sebatian kimia sekunder yang tergolong dalam kumpulan fenolik seperti katekin, epikatekin dan asid sinapinik boleh ditemui secara dominan. Selain daripada vitamin dan sebatian kimia sekunder, nanas juga dilaporkan mengandungi enzim semula jadi unik dikenali sebagai bromelin yang mampu memberi kesan positif terhadap kesihatan. Oleh yang demikian, teknik pengesanan bagi enzim ini perlu diterokai agar kualiti bahan mentah dan produk yang dihasilkan dapat dikawal selia. Dalam kajian ini, teknik analisis enzim bromelin merangkumi pengekstrakan dan penentuan kandungannya telah dibangunkan.

Bromelin

Bromelin merupakan enzim semula jadi unik yang boleh didapati di dalam keseluruhan nanas terutama pada bahagian buah yang terdiri daripada sekumpulan sulfhidril proteolitik enzim dan sistenil protease. Struktur bromelin yang biasa dijumpai dalam nanas ditunjukkan seperti dalam *Gambar rajah 1*. Secara umumnya, struktur bromelin terdiri daripada rantaian sistenil asid amino yang memainkan peranan penting



Gambar rajah 1. Struktur bromelin nanas yang terdiri daripada rantaian asid amino

terutama dalam sistem biologi manusia. Secara tradisinya, jus buah nanas dilaporkan berpotensi digunakan bagi mengatasi masalah penghadaman. Kini hasil daripada kemajuan bidang sains perubatan, kajian mendapati nanas yang mengandungi kandungan enzim bromelin mampu bertindak secara berkesan sebagai agen antiradang. Terdapat kajian yang melaporkan, pengambilan jus buah nanas yang mengandungi enzim bromelin secara berterusan dalam jangka masa yang panjang adalah selamat dan mampu mengurangkan penyakit radang. Bagi mereka yang sering terlibat dalam aktiviti lasak dan berisiko mengalami kecederaan, pengambilan jus ataupun makanan sampingan yang mengandungi bromelin adalah digalakkan. Ini kerana ia dapat membantu dalam mempercepatkan proses pemulihan kecederaan yang dialami.

Penentuan kandungan bromelin

Penentuan kandungan bromelin melibatkan dua proses utama iaitu pengekstrakan dan diikuti dengan analisis kimia. Kedua-dua proses ini haruslah dilakukan dengan teliti dan berhati-hati bawah persekitaran terkawal pada suhu 23 °C. Ini bagi mengelakkan enzim bromelin teroksida dan seterusnya mengganggu keputusan analisis.

Pengekstrakan bromelin

Secara umumnya, pengekstrakan enzim bromelin daripada sampel nanas bergantung kepada sifat fizikalnya sama ada pepejal ataupun cecair. Bagi sampel pepejal (50 g), ia terlebih dahulu perlu ditambah dengan 50 ml air suling dan dikisar menjadi jus. Jus yang terhasil kemudiannya ditambah dengan larutan *buffer* sodium asetat pada nisbah 1:1. Campuran ini

ditapis menggunakan kertas saring. Hasil tapisan kemudiannya disentrifus pada kelajuan 6,000 rpm selama 20 minit. Mendakan yang terhasil daripada proses ini dikutip dan disimpan pada suhu -18 °C. Mendakan ini merupakan enzim bromelin yang terpisah daripada jus nanas. Bagi sampel cecair pula, kaedah pengekstrakan enzim bromelin adalah sama seperti sampel pepejal, namun tidak melibatkan proses penghasilan jus. Kaedah pengekstrakan enzim bromelin daripada sampel pepejal dan cecair berasaskan nanas diringkaskan seperti dalam *Carta alir 1*.

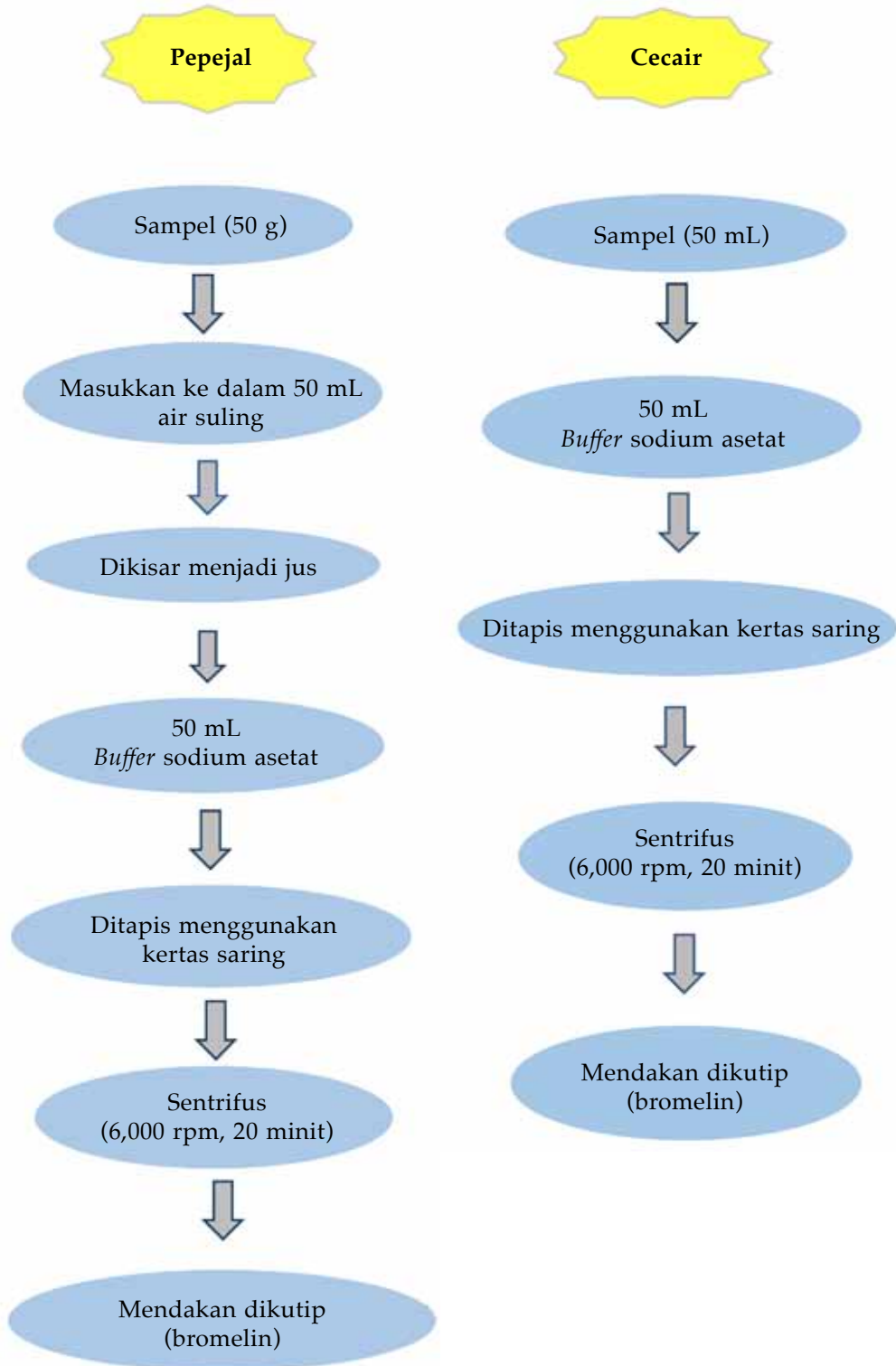
Analisis kimia bromelin

Analisis kimia bagi kandungan enzim bromelin boleh dilakukan melalui dua cara iaitu tindak balas kimia dan tanpa tindak balas kimia. Dalam analisis melibatkan tindak balas kimia, kandungan kimia secara *total* boleh diperolehi dengan pantas. Bagi analisis tanpa tindak balas kimia, ia melibatkan peralatan instrumentasi iaitu Kromatografi Cecair Prestasi Tinggi [*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)] secara terus.

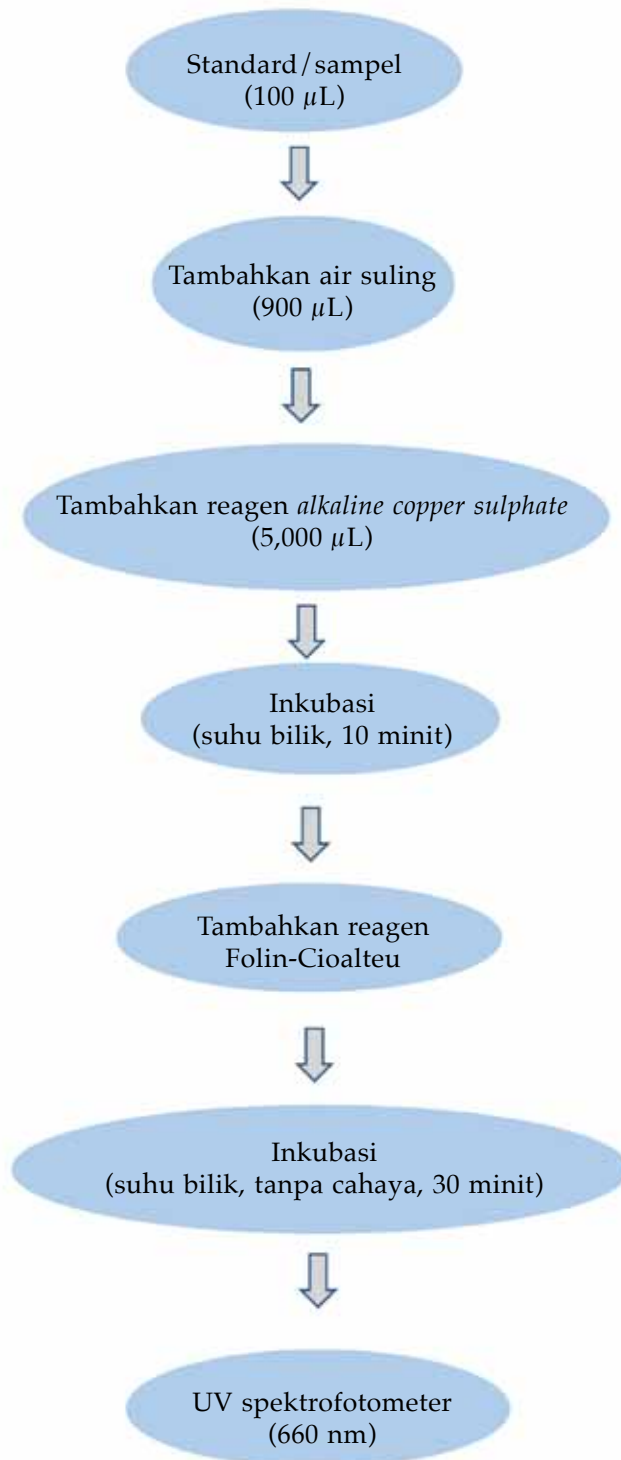
Tindak balas kimia

Analisis tindak balas kimia bagi bromelin ini juga dikenali sebagai analisis kandungan *total* bromelin. Dalam analisis ini, 100 µL sampel ekstrak bromelin ditambah ke dalam 900 µL air suling. Seterusnya, tambahkan 5,000 µL larutan reagen *alkaline copper sulphate*. Campuran larutan ini kemudiannya diinkubasi pada suhu bilik (25 °C) selama 10 minit. Setelah itu, tambahkan 500 µL reagen Folin-Cioaltea dan diinkubasi selama 30 minit dalam keadaan gelap. Selepas 30 minit, campuran ini dianalisis menggunakan UV spektrofotometer pada pengukuran serapan 660 nm. Kaedah analisis enzim bromelin menggunakan tindak balas kimia bagi sampel nanas diringkaskan seperti dalam *Carta alir 2*. Lengkok kalibrasi diplotkan bagi tujuan kuantifikasi di mana paksi Y mewakili nilai bacaan serapan dan paksi X mewakili kepekatan larutan piawai bromelin (µg). Kepekatan kandungan *total* bagi bromelin dikira berdasarkan formula seperti yang berikut:

Kepekatan bromelin dalam sampel = x/v (mg/mL)
x – nilai daripada graf (µg); v – isi padu sampel (µL)



Carta alir 1. Proses pengestrakan bromelin daripada sampel nanas



Carta alir 2. Proses analisis enzim bromelin menggunakan tindak balas kimia bagi sampel nanas

Tanpa tindak balas kimia

Analisis enzim bromelin tanpa tindak balas kimia dilakukan menggunakan peralatan Kromatografi Cecair Prestasi Tinggi (HPLC). Bagi tujuan analisis, peralatan HPLC jenama *Agilent Technologies 1200 Series* digunakan (*Gambar 3*).

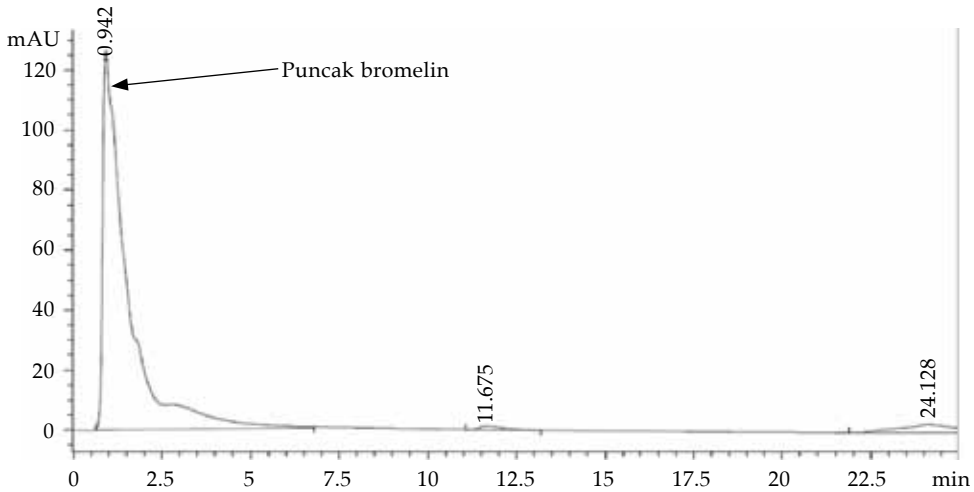
Secara umumnya, parameter peralatan HPLC yang digunakan bagi analisis ini adalah seperti yang berikut:

Kolumn pemisah	: TSKgel BioAssist S, 7 μ m, 4.6 mm ID \times 5 cm
Isi padu suntikan	: 10 μ L
Fasa bergerak	: 20 minit (TSKgel) linear gradien NaCl dari 0 hingga 0.5 mol/L di dalam 20 mmol/L larutan <i>buffer</i> sodium fosfat, pH 7.0
Kadar aliran	: 0.8 mL/min
Pengesanan	: UV 280 nm
Suhu	: 25 $^{\circ}$ C

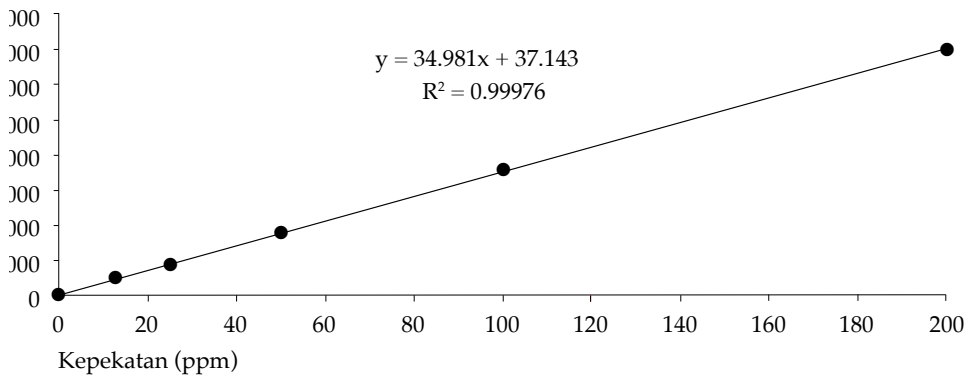
Hasil analisis menggunakan peralatan HPLC, enzim bromelin di dalam sampel nanas boleh dikesan dalam tempoh masa antara 0.625 – 6.875 minit (*Rajah 1*). Kandungan bromelin di dalam sampel nanas boleh ditentukan berdasarkan lengkung piawai sebatian tulen enzim bromelin. Lima kepekatan enzim bromelin tulen yang berlainan disediakan dan dianalisis menggunakan HPLC seperti parameter yang dinyatakan di atas. Graf keluasan isyarat (paksi-x) dan kepekatan bromelin (paksi-y) diplotkan sebagai rujukan bagi tujuan kuantifikasi enzim bromelin (*Rajah 2*). Daripada graf, nilai regrasi (r^2) yang diperoleh ialah 0.9998 menunjukkan parameter di atas adalah sangat sesuai bagi tujuan kuantifikasi.



Gambar 3. Peralatan HPLC Agilent Technologies 1200 Series



Rajah 1. Kromatogram HPLC bagi sebatian enzim bromelin



Rajah 2. Graf enzim bromelin piawai pada kepekatan berbeza

Kesimpulan

Teknik pengekstrakan enzim bromelin daripada nanas segar dan produk berasaskannya adalah bergantung kepada sifat fizikalnya sama ada cecair ataupun pepejal. Bagi sampel pepejal, ia perlu dikisar dengan menambahkan air suling dalam nisbah 1:1. Sampel dalam bentuk cecair seterusnya ditambahkan dengan *buffer* sodium asetat dan disentrifus selama 20 minit pada kelajuan 6,000 rpm. Mendakan yang terhasil terdiri daripada enzim bromelin dikutip untuk analisis kimia. Analisis enzim bromelin boleh dilakukan menggunakan tindak balas kimia atau tanpa tindak balas kimia. Kedua-dua teknik ini mempunyai kelebihan masing-masing. Dalam teknik analisis tindak balas kimia yang menggunakan beberapa reagen, ia melibatkan kos yang rendah dan cepat. Manakala bagi teknik analisis tanpa tindak balas kimia, keputusan analisis yang diperoleh adalah tepat dan jitu.

Bibliografi

- Booklet Statistik Tanaman (Sub-Sektor tanaman) (2018). Unit Perangkaan, Jabatan Pertanian Semenanjung Malaysia
- Guang-Ming, S., Xiu-Mei, Z., Alain, S. dan Paul-Alex, M.A. (2016). Nutritional composition of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Dalam: *Nutritional composition of fruit cultivars*, m.s. 609 – 637. Londres: Academic Press
- Hossain, M.F., Akhtar, S. dan Anwar, M. (2015). Nutritional value and medicinal benefits of pineapple. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 4(1): 84 – 88
- Kader, A., Hossain, F.M.J., Islam, M.M., Kabir, Sarkar, S.K. dan Absar, N. (2010). A comparative analysis on the nutritional contents of two varieties of pineapple of chittagong region. *Chittagong University Journal of Biological Sciences* 5(1 dan 2): 105 – 112
- Khalid, N., Suleria, H. dan Ahmed, I. (2016). Pineapple juice. Dalam: *Handbook of Functional Beverages and Human Health*, (Shahidi, F. dan Alasalvar, C., ed.), m.s. 489 – 500
- Majid, F.A.A, Gani, M.A., Talib, S.Z. dan Hasyim, K.K. (2008). Stability of bromelain-polyphenol complex in pineapple juice. *Jurnal Teknologi* 49: 27 – 38
- Verma, N., Meena, N.K., Majumdar, I., dan Paul, J. (2017). Role of bromelain as herbal anti-inflammatory compound using in vitro and in vivo model of colitis. *Journal of Autoimmune Disorders* 3(4), 52, 1 – 8
- Yapo, E.S., Kouakou, H.T., Kouakou, L.K., Kouadio, J.Y., Kouamé, P. dan Mérillon, J.M. (2011). Phenolic profiles of pineapple fruits (*Ananas comosus* L. Merrill) Influence of the origin of suckers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(6): 1,372 – 1,378

Ringkasan

Bromelin merupakan sebatian enzim semula jadi utama yang boleh ditemui secara meluas di dalam nanas yang merupakan sebatian berfungsi yang mampu meningkatkan kualiti kesihatan manusia. Bagi tujuan pengekstrakan, sampel nanas ataupun produk berasaskan nanas perlu disediakan dalam bentuk cecair. Ia kemudian ditambah dengan larutan *buffer* sodium asetat pada nisbah 1:1 dan campuran kemudiannya ditapis. Hasil tapisan kemudiannya disentrifus pada kelajuan 6,000 rpm selama 20 minit. Mendakan yang terhasil daripada proses ini mengandungi sebatian enzim bromelin yang kemudiannya dianalisis. Analisis sebatian enzim bromelin ini boleh dilakukan sama ada melibatkan tindak balas kimia ataupun tanpa tindak balas kimia. Bagi analisis melibatkan tindak balas kimia, dua reagen kimia utama yang dikenali sebagai larutan *alkaline copper sulphate* dan reagen Folin-Cioaltea digunakan. Manakala dalam analisis tanpa tindak balas kimia pula, melibatkan penggunaan peralatan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Kedua-dua teknik analisis ini mempunyai kelebihan masing-masing. Kebiasaannya, analisis menggunakan tindak balas kimia melibatkan kos yang rendah dan keputusan yang pantas. Manakala bagi analisis tanpa tindak balas kimia akan menghasilkan data yang tepat dan jitu.

Summary

Bromelain is a natural enzyme constituent that could be found widely in pineapple. It is a functional constituent which could increase human health quality. For extraction purpose, pineapple sample or pineapple based product need to be prepared in the form of liquid. It was then being added with sodium acetate buffer solution at ratio of 1:1 and then, the mixture was filtered. The filtrate was then being centrifuge at 6,000 rpm speed for 20 minutes. The sediment produced from this process which contain bromelain enzyme was further analysed. The analysis of the bromelain enzyme constituent could be carried-out either through chemical reaction or non-chemical reaction. For analysis involving chemical reaction, two main chemical reagent known as alkaline copper sulphate solution and Folin-Cioaltea solution were used. As for non-chemical reaction, it involved the usage of High Performance Liquid Chromatography instrumentation. Both analysis technique has their own advantages. Usually, analysis via chemical reaction involved low cost and fast detection. While for non-chemical analysis, it will result in exact and accurate data.

Pengarang

Mohd Nazrul Hisham Daud
Pusat Pengkomersialan Teknologi dan Bisnes, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor
E-mel: nazrul@mardi.gov.my

Mohd Lip Jabit
Pusat Pengkomersialan Teknologi dan Bisnes, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Wan Nurzahidah Wan Zainon dan Hadijah Hassan
Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Joanna Cho Lee Ying dan Razali Mustaffa
Pusat Penyelidikan Hortikultur, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor