

Kaedah mudah penentuan likopena dalam penyaringan buah-buahan tempatan terpilih (Simple method for lycopene determination in selected local fruits)

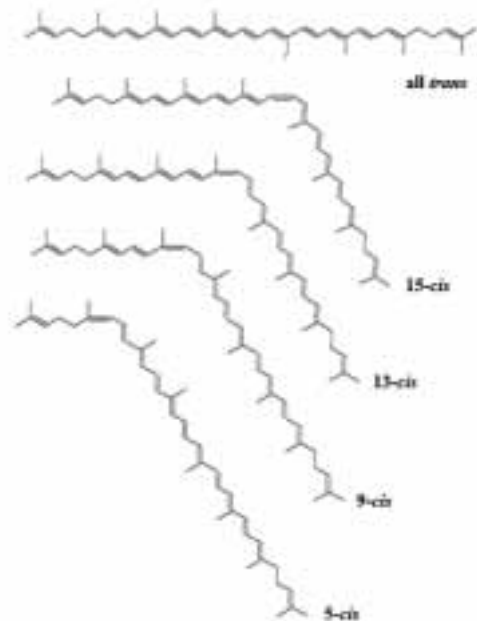
Hasnisa Hashim, Mohamed Nazim Anvarali, Syahida Maarof dan Hadijah Hassan

Pengenalan

Pigmen berwarna semula jadi daripada tumbuh-tumbuhan telah menarik perhatian dunia dalam pembangunan produk makanan berfungsi bagi mencegah penyakit kronik tidak berjangkit [*non communicable disease* (NCD)] seperti kanser, penyakit jantung, diabetes dan *atherosclerosis* (radang pada pembuluh darah/arteri). Pigmen-pigmen ini mempunyai pelbagai warna bergantung kepada jenis fitokimia yang hadir dalam matriks makanan contohnya jingga (β -karotena), hijau kekuningan (lutein), hijau (klorofil), biru-ungu (antosianin), zeaxanthin (kuning) dan merah (likopena).

Likopena ($C_{40}H_{56}$) merupakan sebatian fitokimia hidrokarbon yang tergolong dalam kumpulan karotenoid tetraterpena. Pigmen karotenoid merah terang ini tidak boleh dihasilkan dalam badan manusia mahupun haiwan. Ia perlu diambil daripada sumber makanan melalui diet harian. Likopena merupakan antioksidan kuat (*most potent antioxidant*) yang hadir secara semula jadi dalam buah-buahan dan sayur-sayuran berwarna merah (betik, tembikai, tomato, *pink guava*, lada merah dan lain-lain). Likopena ialah isomer daripada karotena (bahan pewarna kuning) di mana keduanya mempunyai formula molekul yang sama, $C_{40}H_{56}$, tetapi berbeza dari segi struktur kimia. Struktur kimia likopena ditunjukkan seperti dalam *Gambar rajah 1* di mana likopena boleh hadir dalam beberapa bentuk isomer iaitu *cis* dan *trans*.

Likopena terdiri daripada rantaian hidrokarbon berantai lurus dengan 13 ikatan karbon ganda dua. Terdapat dua kumpulan metil utama pada kedudukan 1,5 dan kumpulan metil tambahan pada kedudukan 1,6. Likopena bersifat lipofilik (iaitu larut minyak) dan tidak larut dalam air. Secara semula jadi, likopena dalam bentuk isomer *all-trans* (dirujuk sebagai *all-E-likopena*) yang



(Sumber: Agarwal dan Rao, 1998)

Gambar rajah 1. Struktur molekul isomer likopena

boleh didapati dalam kebanyakan buah-buahan dan sayur-sayuran berwarna merah. Proses memasak, pemprosesan makanan, pencernaan dan pendedahan kepada haba dan cahaya akan menyebabkan perubahan isomer *all-trans* kepada pelbagai bentuk isomer *cis* (dirujuk sebagai (Z)-likopena), termasuk 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* dan 15-*cis*. Peralihan likopena isomer *trans* kepada *cis* ini penting untuk meningkatkan kecekapan penyerapan (*bioavailability*) likopena di dalam tubuh manusia selain (Z)-likopena menunjukkan aktiviti antioksidan yang bagus dalam pemerangkapan radikal lipid peroksida. Beberapa kajian telah melaporkan bahawa isomer *cis* likopena lebih mudah diserap ke dalam badan dan memainkan peranan yang lebih penting dalam fungsi biologi berbanding dengan *all-trans* likopena.

Likopena adalah salah satu pigmen yang sangat diterima oleh industri makanan sebagai makanan tambahan dan juga untuk manfaat kesihatan. Permintaan pengguna terhadap likopena semakin meningkat seiring dengan peningkatan bukti kajian yang menunjukkan ciri-ciri pencegahan terhadap beberapa penyakit. Tidak seperti sebatian karotenoid lain, likopena tidak mempunyai sifat provitamin A, tetapi disebabkan sifat tak tepu semula jadi sebatian ini, likopena dianggap sebagai antioksidan yang kuat dan penyingkir oksigen tunggal. Keupayaan likopena dalam memerangkap radikal bebas dan menyingkir oksigen tunggal memainkan peranan penting dalam pencegahan penyakit kronik dan mengekalkan kesihatan yang baik. Beberapa kajian saintifik yang telah dijalankan telah melaporkan likopena mempunyai aktiviti antioksidan yang lebih tinggi daripada lutein atau β -karotena. Selain sebagai antioksidan yang kuat, likopena juga dilaporkan sebagai penyingkir oksigen tunggal yang paling berkesan dalam kumpulan karotenoid, di mana kebolehan penyingkirannya bergantung kepada bilangan ikatan ganda dua berkonjugat.

Kajian terdahulu juga menyatakan likopena bertindak sebagai penyingkir oksigen tunggal yang paling berkesan di mana kadar penyingkiran fizikal likopena adalah dua kali lebih tinggi daripada β -karotena dan 10 kali lebih tinggi daripada α -tokoferol. Ikatan ganda dua berkonjugat likopena memainkan peranan yang penting dalam tindak balas pemindahan tenaga di mana likopena mempunyai keupayaan untuk menyingkirkan oksigen tunggal ($^1\text{O}_2$). Oksigen tunggal ialah gas kimia bukan organik dengan formula $\text{O}=\text{O}$ (juga ditulis sebagai $^1[\text{O}_2]$ atau $^1\text{O}_2$) yang berada dalam keadaan kuantum di mana semua elektron diputar berpasangan. Oksigen tunggal juga merupakan radikal bebas dan juga satu bentuk oksigen yang bertenaga tinggi. Di dalam tubuh manusia, oksigen tunggal diklasifikasikan bawah spesies oksigen reaktif (ROS) yang dianggap berbahaya kepada sistem biologi tubuh.

Banyak kajian yang dijalankan menunjukkan pengambilan makanan berasaskan tomato yang kaya likopena dikaitkan dengan penurunan risiko penyakit kronik tidak berjangkit

(NCD) seperti kanser dan penyakit kardiovaskular sementara likopena juga menunjukkan aktiviti antioksidan yang ketara dalam beberapa sistem *in vitro* dan *in vivo*. Tekanan oksidatif adalah salah satu faktor risiko utama NCD. Radikal bebas atau oksidan adalah penyumbang yang berpotensi menyebabkan tekanan oksidatif. Kajian *in vitro*, *ex vivo* dan *in vivo* telah dijalankan untuk menunjukkan kesan likopena terhadap tekanan oksidatif. Dalam konteks ini, lipid, protein dan pengoksidaan DNA berkait rapat dengan tekanan oksidatif. Kajian terdahulu telah melaporkan diet yang kaya likopena dan makanan tambahan likopena memberikan kesan perlindungan terhadap kerosakan DNA di kedua-dua sel biasa dan sel kanser (sel manusia).

Kajian terhadap tikus yang disuntik dengan likopena (10 mg/kg sehari, selama lima hari) juga menunjukkan kesan perlindungan daripada kerosakan oksidatif yang disebabkan oleh aruhan zat besi (*iron-induced*) dalam tisu prostat dan pengurangan lipid peroksida. Kajian lain juga melaporkan pengambilan jus, makanan tambahan dan makanan kaya likopena telah menunjukkan kesan perlindungan terhadap kerosakan DNA dalam limfosit. Selain itu, kadar pengambilan jus tomato yang kaya dengan likopena menunjukkan kesan perlindungan yang kuat terhadap limfosit daripada kerosakan oksidatif disebabkan oleh oksigen tunggal dan nitrogen dioksida yang ditemui dalam subjek manusia. Likopena mampu melindungi sel limfoid manusia daripada oksigen tunggal dengan membina ikatan pada permukaan sel dan juga mampu melindungi limfosit daripada kerosakan DNA.

Plasma lipoprotein kepadatan rendah (LDL) adalah faktor risiko utama penyakit kardiovaskular (CVD). Peningkatan pengoksidaan LDL adalah hipotesis yang dikaitkan dengan peningkatan risiko *atherosclerosis* dan penyakit jantung koronari. Beberapa kajian saintifik ada melaporkan pengambilan sos tomato dan kapsul oleoresin yang mengandungi likopena mampu mengurangkan pengoksidaan lipid dan protein. Selain itu, pengoksidaan LDL juga didapati lebih rendah selepas pemakanan produk tomato (8 mg likopena/hari, selama tiga minggu). Pengambilan makanan tambahan iaitu kapsul likopena (4 mg/hari selama enam bulan) juga boleh menggantikan terapi penggantian hormon pada wanita selepas menopause untuk mencegah tekanan oksidatif dan *atherosclerosis*. Kajian-kajian ini juga menunjukkan bahawa serum lipid peroksida dan pengoksidaan LDL berkurangan dengan signifikan selepas memakan makanan yang kaya dengan likopena. Kebanyakan kajian saintifik juga menunjukkan peningkatan umur dan tahap lipid plasma (LDL, jumlah kolesterol dan trigliserida) semasa proses penuaan berkait rapat dengan penurunan aras likopena dalam darah. Oleh itu, formulasi nutraseutikal karotenoid dengan peningkatan penyerapan (*enhanced bioavailability*) amat diperlukan. Kajian klinikal menyarankan pengambilan likopena harian sebanyak 5 – 10 mg bagi seseorang yang sihat untuk

mengekalkan aras likopena yang mencukupi dalam badan untuk memerangi tekanan oksidatif dan mencegah penyakit kronik. Bagi mereka yang menghadapi penyakit seperti kanser dan penyakit kardiovaskular, aras likopena yang lebih tinggi diperlukan iaitu 35 – 75 mg sehari.

Kaedah penentuan sebatian likopena

Kedua-dua kaedah fizikal dan kimia boleh digunakan untuk menentukan kandungan likopena dalam matriks makanan. Kaedah fizikal mengkaji hubungan antara parameter warna dan kepekatan likopena, manakala teknik kimia memberi tumpuan kepada kuantifikasi likopena yang diekstrak daripada makanan. Pada masa kini, pendekatan terbaik terhadap analisis penentuan likopena adalah teknik kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Kajian saintifik yang dijalankan ada melaporkan bahawa teknik HPLC yang digabungkan dengan spektrometri kanta termal telah menunjukkan pengesanan yang sangat sensitif terhadap beberapa sebatian karotenoid termasuk likopena dalam minyak yang boleh dimakan. Penggunaan teknik kromatografi cecair spektrometri jisim (LCMS) dan juga gabungan LCMS dengan pengionan kimia tekanan atmosfera (APCI-LCMS) juga digunakan untuk menentukan dan mengesahkan sebatian karotenoid yang dikaji. Teknik-teknik ini mampu mengesan secara kualitatif dan kuantitatif setiap sebatian individu karotenoid yang telah diekstrak daripada makanan, tetapi teknik ini mengambil masa yang panjang dan kos yang amat tinggi.

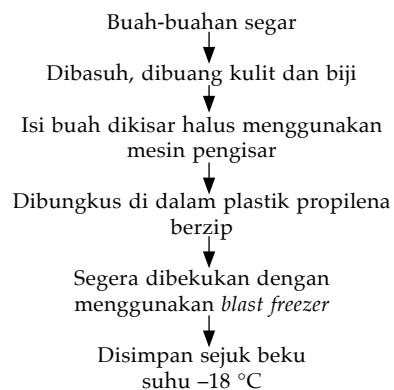
Teknik spektrofotometri UV juga digunakan secara meluas untuk menganggar jumlah kandungan likopena dalam produk makanan. Teknik spektrofotometri merupakan satu kaedah penentuan secara kualitatif dan kuantitatif yang mudah dan pantas. Namun, kaedah ini kurang jitu berbanding dengan kaedah HPLC. Kaedah ini sesuai digunakan bagi tujuan penyaringan sebatian kimia dalam kuantiti sampel yang banyak. Teknik ini telah disesuaikan untuk tujuan analisis makanan yang kaya dengan sebatian karotenoid spesifik menggunakan jarak gelombang tertentu dan pekali penyerapan yang sepadan. Kebanyakan makanan tumbuhan mengandungi β -karotena, likopena, zeaxanthin, lutein dan β -cryptoxanthin, maka purata pekali penyerapan boleh digunakan untuk kaedah spektrofotometri.

Kajian ini dijalankan bagi membuat saringan terhadap buah-buahan tempatan terpilih untuk memilih buah yang mengandungi kandungan likopena tertinggi bagi tujuan pembangunan produk minuman kaya likopena untuk mengurangkan NCD di kalangan warga emas dan memenuhi saranan pengambilan likopena harian. Ujian saringan dijalankan menggunakan teknik spektrofotometri UV iaitu kaedah penentuan likopena secara kuantitatif yang mudah dan pantas. Dalam kajian ini, penentuan jumlah kandungan likopena

dijalankan menggunakan *Spectro UV-Vis Double Beam PC Scanning Spectrophotometer* (Model UVD-2950; Labomed, USA) pada jarak gelombang 503 nm. Kandungan likopena dalam sampel buah-buahan tempatan boleh diukur melalui pengiraan menggunakan pekali penyerapan. Penentuan sebatian likopena berserta isomernya menggunakan teknik HPLC akan dibincangkan kemudian dalam kajian penentuan sebatian likopena dalam produk minuman kaya likopena untuk mengurangkan NCD di kalangan warga emas.

Penyediaan pulpa buah-buahan tempatan terpilih

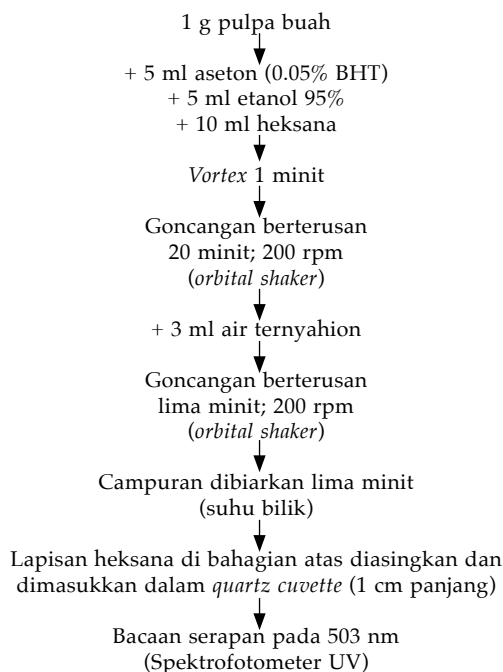
Dalam kajian ini, buah-buahan tempatan berwarna merah atau oren yang banyak dan sentiasa boleh diperolehi di pasaran dipilih iaitu mangga Chokanan, betik Sekaki (betik muda dan betik ranum), *rock melon*, tembikai Taiwan (merah) dan tembikai bulat (merah). Buah-buahan ini diperolehi dari Pasar Borong Selangor. Buah-buahan tersebut dibasuh, dibuang kulit dan bijinya, dikisar halus dengan menggunakan pemproses makanan/mesin pengisar dan dibungkus ke dalam plastik propilena berzip dan dengan segera dibekukan menggunakan *blast freezer* sebelum sampel tersebut disimpan di dalam peti sejuk beku bersuhu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Penyediaan pulpa buah diringkaskan seperti dalam *Carta alir 1*.



Carta alir 1. Penyediaan pulpa buah

Penentuan kandungan likopena menggunakan teknik spektrofotometri

Kaedah spektrofotometri merupakan satu kaedah penentuan secara kuantitatif yang mudah dan pantas. Namun, kaedah ini kurang jitu berbanding dengan kaedah kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC). Kaedah ini sesuai digunakan bagi tujuan penyaringan sebatian kimia [dalam bentuk jumlah kandungan (*total content*)] dalam sampel. Dalam kajian ini, pengekstrakan sebatian likopena dijalankan dalam keadaan malap bagi mengelakkan berlakunya degradasi karotenoid. Sebanyak 1 g sampel pulpa buah ditimbang ke dalam tiub ujian amber (tiub berwarna gelap bagi mengelakkan cahaya dan degradasi sebatian likopena) berisi padu 50 ml. Sebanyak 5 ml pelarut aseton (mengandungi 0.05% *butylated hydroxytoluene*; BHT), 5 ml etanol 95% dan 10 ml pelarut heksana ditambah ke dalam tiub tersebut. Campuran digoncang menggunakan penggoncang *vortex* selama satu minit dan digoncang berterusan selama 20 minit menggunakan *orbital shaker* pada kelajuan 200 rpm. Kemudian 3 ml air ternyahion dimasukkan ke dalam campuran tersebut dan digoncang sekali lagi selama lima minit menggunakan *orbital shaker* pada kelajuan 200 rpm. Campuran



Carta alir 2. Langkah-langkah penentuan jumlah kandungan likopena dalam pulpa buah

padu pelarut campuran yang digunakan dalam pengekstrakan, 0.55 adalah nisbah isi padu lapisan atas kepada pelarut campuran, W adalah berat sampel (gram) dan 172 mM^{-1} adalah *extinction coefficient* untuk likopena dalam pelarut heksana.

$$\begin{aligned} \text{Likopena (mg/kg berat segar)} &= \frac{A_{503} \times 537 \times 20 \times 0.55}{W \times 172} \\ &= \frac{A_{503} \times 34.34}{W} \end{aligned}$$

Jadual 1. Jumlah kandungan likopena dalam buah-buahan terpilih

Sampel pulpa	Kandungan likopena dalam pulpa segar (mg/kg berat segar)
Betik muda	31.29 ± 0.76
Betik ranum	22.62 ± 3.22
Tembikai bulat	66.60 ± 6.44
Tembikai Taiwan	62.98 ± 2.37
Rock melon	4.96 ± 1.69
Mangga Chokanan	0.67 ± 0.19

Bacaan likopena adalah purata bagi tiga replikasi ± sisihan piawai

tadi dibiarkan pada suhu bilik selama lima minit untuk pemisahan fasa polar dan tak polar. Setelah lima minit, campuran tersebut mempunyai dua lapisan iaitu lapisan heksana (tak polar) dan lapisan polar. Lapisan heksana di bahagian atas dasingkan dan dimasukkan ke dalam *quartz cuvette* untuk bacaan serapan menggunakan alatan spektrofotometri. Penentuan jumlah kandungan likopena diringkaskan seperti dalam *Carta alir 2*.

Penentuan kandungan likopena dijalankan menggunakan *Spectro UV-Vis Double Beam PC Scanning Spectrophotometer* (Model UVD-2950; Labomed, USA) pada jarak gelombang 503 nm (pelarut heksana sebagai *blank*). Kandungan sebatian likopena dalam sampel pulpa buah-buahan diukur berdasarkan formula berikut, di mana 537 g/mol adalah berat molekul likopena, 20 ml adalah isi

Hasil ujian saringan jumlah kandungan likopena dalam pulpa buah-buahan terpilih ditunjukkan seperti dalam *Jadual 1*. Daripada ujian yang dijalankan, didapati buah tembikai mengandungi sebatian likopena tertinggi diikuti buah betik, *rock melon* dan mangga. Tembikai bulat mengandungi 66.6 mg/kg likopena manakala tembikai Taiwan mengandungi 62.9 mg/kg likopena.

Kesimpulan

Penentuan likopena dalam buah-buahan tempatan dan juga sampel makanan/minuman boleh dilaksanakan menggunakan teknik spektrofotometri pada jarak gelombang 503 nm secara kuantitatif dengan mudah dan pantas. Ujian saringan yang dijalankan menunjukkan tembikai mengandungi likopena (66.6 mg/kg berat bersih) tertinggi berbanding dengan buah-buahan tempatan yang lain.

Penghargaan

Sekalung penghargaan buat kumpulan penyelidik dan ahli-ahli kumpulan kerja, Nurul Nabilah Mohamad Fiteri, Nik Mohd Faiz Che Mohamad Nor dan Mawaddah Mohd Salleh yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam kajian ini. Projek ini disokong oleh dana Projek Pembangunan RMK-11 iaitu "Kajian peningkatan hasil dan kualiti buah-buahan premium untuk peningkatan daya saing (betik, nanas, melon, belimbing, nangka, pisang, mangga, durian dan manggis)" (Subprojek: Kajian pembangunan bio-ingredient dan produk fungsian bernilai tinggi bagi buah-buahan premium terpilih; Kod Projek P-RF 405).

Bibliografi

- Agarwal, S. dan Rao, A.V. (1998). Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: A human dietary intervention study. *Lipids* 3: 981 – 984
- Di Mascio, P., Kaiser, S. dan Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys* 274: 532 – 538
- Khoo, H.E., Prasad, K.N., Kong, K.W., Jiang, Y. dan Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers: Color pigments in fruits and vegetables. *Molecules* 16: 1710 – 1738
- Kong, K.W. dan Ismail, A. (2011). Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. *Food and Bioproducts Processing* 89: 53 – 61
- Kong, K.W., Khoo, H.E., Prasad, K.N., Ismail, A., Tan, C.P. dan Rajab, N.F. (2010). Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules* 15: 959 – 987
- Lin, C.H. dan Chen, B.H. (2003). Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1,012: 103 – 109
- Rao, A.V. dan Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 55: 207 – 216

Ringkasan

Penentuan likopena dalam buah-buahan tempatan dan juga sampel makanan/minuman boleh dilaksanakan menggunakan teknik spektrofotometri dengan mudah dan pantas. Kaedah ini sesuai digunakan bagi tujuan penyaringan jumlah kandungan likopena (*total lycopene content*) dalam kuantiti sampel yang banyak. Beberapa jenis buah tempatan diproses kepada pulpa buah dan kandungan likopena diekstrak menggunakan pelarut heksana:aseton:etanol (2:1:1 v/v/v). Seterusnya kandungan likopena ditentukan menggunakan *Spectro UV-Vis Double Beam PC Scanning Spectrophotometer* (Model UVD-2950; Labomed, USA) pada jarak gelombang 503 nm. Ujian saringan yang dijalankan menunjukkan tembikai mengandungi likopena tertinggi berbanding dengan buah-buahan tempatan yang lain.

Summary

Determination of lycopene in local fruits as well as food/beverage samples can be carried out by using simple and quick spectrophotometric technique. This method is suitable for screening the total lycopene content in large quantities of samples. Few types of local fruits were processed into fruit pulp and the lycopene contents were then extracted using hexane: acetone: ethanol (2: 1:1 v/v/v). The lycopene contents were determined using a UV-Visible Double Beam PC Scanning Spectrophotometer (Model UVD-2950; Labomed, USA) at a wavelength of 503 nm. Screening tests had shown that watermelon contained the highest amount of lycopene compared to other local fruits.

Pengarang

Hasnisa Hashim

Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: hasnisa@mardi.gov.my

Mohamed Nazim Anvarali, Syahida Maarof (PhD) dan

Hadijah Hassan (PhD)

Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor