

Teknik analisis sebatian kimia fitosterol bagi sampel pertanian dan produk makanan

(Analysis method of phytosterol chemical constituents for agricultural samples and food products)

Mohd Nazrul Hisham Daud, Mohd Lip Jabit, Tun Norbrillinda Mokhtar dan Faridah Hussin

Pengenalan

Mengikut statistik Jabatan Pertanian Malaysia pada tahun 2017, keluasan penanaman sayur-sayuran dan buah-buahan ialah 263,040 hektar. Dengan keluasan ini, nilai pengeluaran sayur-sayuran dianggarkan 1.2 juta tan manakala buah-buahan pula sekitar 1.7 juta tan. Sebanyak 27 jenis sayur-sayuran dan 21 jenis buah-buahan utama telah ditanam secara komersial di seluruh Malaysia. Faktor pendorong kepada nilai pengeluaran sayur-sayuran dan buah-buahan adalah kesedaran masyarakat tentang kesan khasiatnya terhadap kesihatan.

Selain kandungan vitamin dan mineral, sayur-sayuran dan buah-buahan juga mengandungi sebatian kimia sekunder yang mampu mengekalkan kesihatan manusia. Antara sebatian kimia sekunder yang mampu menjalankan fungsi ini ialah fitosterol yang telah dilaporkan dalam banyak penulisan saintifik secara global. Pertubuhan kesihatan dunia seperti *United State Food and Drug Administration* (USFDA) telah menggariskan pengambilan sekurang-kurangnya 400 mg fitosterol daripada tumbuh-tumbuhan sebanyak dua kali sehari dapat mengurangkan risiko penyakit jantung. Sehubungan dengan ini, pihak pengusaha dan pengilang produk makanan kesihatan telah berusaha menghasilkan produk makanan yang mengandungi fitosterol. Kini, terdapat pelbagai jenis produk kesihatan yang mengandungi fitosterol telah berada di pasaran seperti dalam *Gambar 1*. *Gambar 2* pula menunjukkan sebahagian daripada sayur-sayuran dan buah-buahan yang ditanam secara komersial di Malaysia



Gambar 1. Antara produk fitosterol yang terdapat di pasaran

Buah-buahan



Durian



Betik



Tembikai



Nanas



Mangga



Manggis



Nangka



Pisang



Rambutan

Sayuran



Bayam



Kangkung



Kubis



Salad



Sawi



Kailan



Daun bawang



Kucai

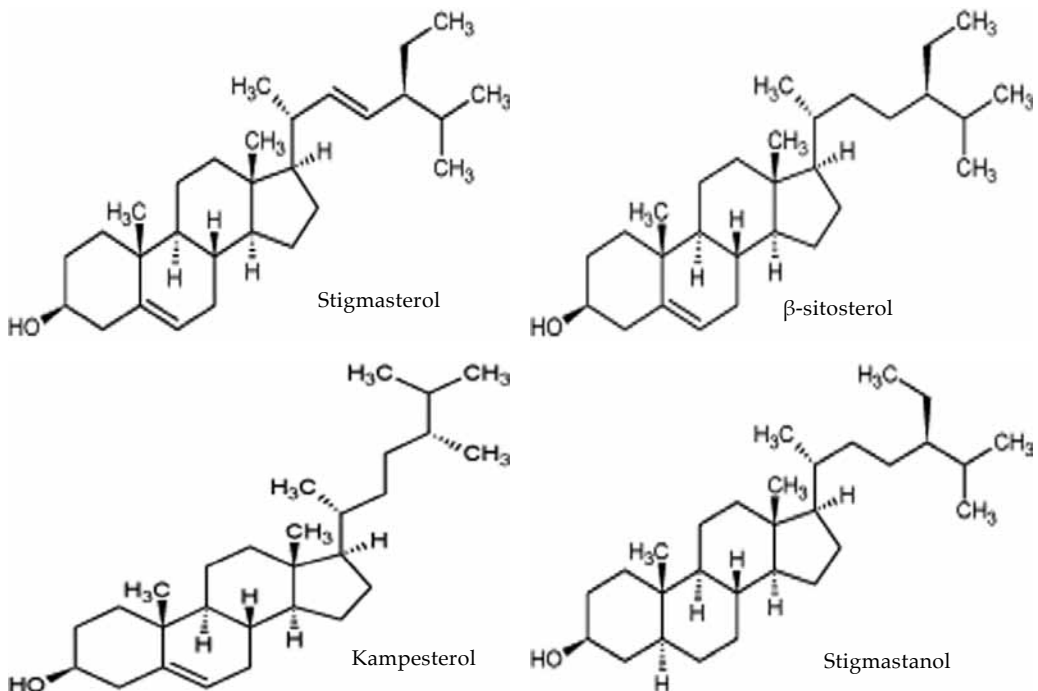


Saderi

Gambar 2. Sebahagian sayur-sayuran dan buah-buahan utama yang ditanam di Malaysia

Fitosterol

Fitosterol merupakan sebatian kimia sekunder semula jadi yang wujud dalam tumbuhan. Sebatian kimia fitosterol boleh dibahagikan kepada dua kumpulan utama iaitu sterol dan stanol. Pada kebiasaannya dalam struktur kimia kumpulan sterol terdapat ikatan ganda dua dan diklasifikasikan sebagai ikatan tidak tepu. Manakala bagi stanol pula, ikatan ganda dua ini kebiasaannya tidak wujud dan diklasifikasikan sebagai ikatan tepu. Kebiasaannya empat jenis fitosterol boleh ditemui secara meluas dalam sayur-sayuran dan buah-buahan. Struktur sebatian kimia fitosterol yang biasa ditemui secara semula jadi terutama dalam sayur-sayuran dan buah-buahan adalah seperti yang berikut:



Analisis fitosterol

Penyediaan ekstrak fitosterol

Bagi tujuan analisis, penyediaan ekstrak fitosterol dilakukan berdasarkan sifat fizikal sampel. Secara umumnya, sampel kebiasaannya dalam fasa pepejal ataupun cecair dan teknik penyediaan ekstrak kedua-duanya adalah berbeza.

Sampel pepejal

Bagi sampel pepejal seperti daun, batang, ranting, dahan pokok dan produk makanan dalam bentuk pepejal, sampel perlu dipotong kecil dan dikisar (2.0 mm). Sampel kemudiannya dikeringkan di dalam ketukar pada suhu 40 °C selama 48 jam. Seterusnya, sampel direndam di dalam pelarut kloroform pada

suhu bilik (25 °C) selama 72 jam dan ditapis menggunakan kertas turas Whatman No. 1. Hasil turasan dalam bentuk larutan kemudiannya dikeringkan menggunakan rotavapor pada suhu 45 °C bagi mendapatkan ekstrak fitosterol.

Sampel cecair

Bagi sampel cecair, sebatian kimia fitosterol perlu diekstrak menggunakan teknik pemisahan cecair-cecair. Dalam teknik ini, sampel cecair ditambahkan dengan pelarut organik kloroform, metanol dan air suling pada nisbah 1:1:1. Campuran ini kemudiannya dimasukkan ke dalam corong pemisah dan digoncang bagi memastikan ia bercampur sekata dan dibiarkan selama 10 minit. Selepas 10 minit, dua lapisan akan terbentuk dan lapisan bawah dikeluarkan daripada corong pemisah. Lapisan bawah ini kemudiannya dikeringkan menggunakan rotavapor pada suhu 45 °C bagi mendapatkan ekstrak fitosterol.

Pengesanan fitosterol

Bagi tujuan pengesanan secara kualitatif, ekstrak fitosterol yang telah disediakan dilarutkan ke dalam pelarut kloroform. Larutan ini kemudiannya ditapis menggunakan penapis picagari bersaiz 0.45 µm [politetrafluoroetilen (PTFE)]. Setelah itu ia disuntik ke dalam sistem kromatografi gas spektrometri jisim (GCMS) (*Gambar 3*) bagi tujuan pengesanan sebatian kimia fitosterol.



Gambar 3. Peralatan kromatografi gas spektrometri jisim (GCMS) yang digunakan bagi tujuan pengesanan dan pengenalpastian sebatian kimia fitosterol

Secara umumnya, parameter berikut menunjukkan kaedah pengesanan fitosterol menggunakan GCMS:

Pemisahan

Kromatografi gas

Pengesanan

Spektrometri jisim (GCMS) Thermo Scientific

Kolum

Jenama Thermo Scientific, TG-5MS, panjang 30 m x 0.25 mm I.D, 0.25 μ m tebal

Parameter

Isi padu suntikan 2 μ l

Suhu suntikan penyuntik 250 °C

Kelajuan aliran gas 0.8 ml/min

Suhu pengesanan 150 – 320 °C

Suhu laluan 270 °C

Suhu punca ion 260 °C

Penyaringan jisim 50 – 600

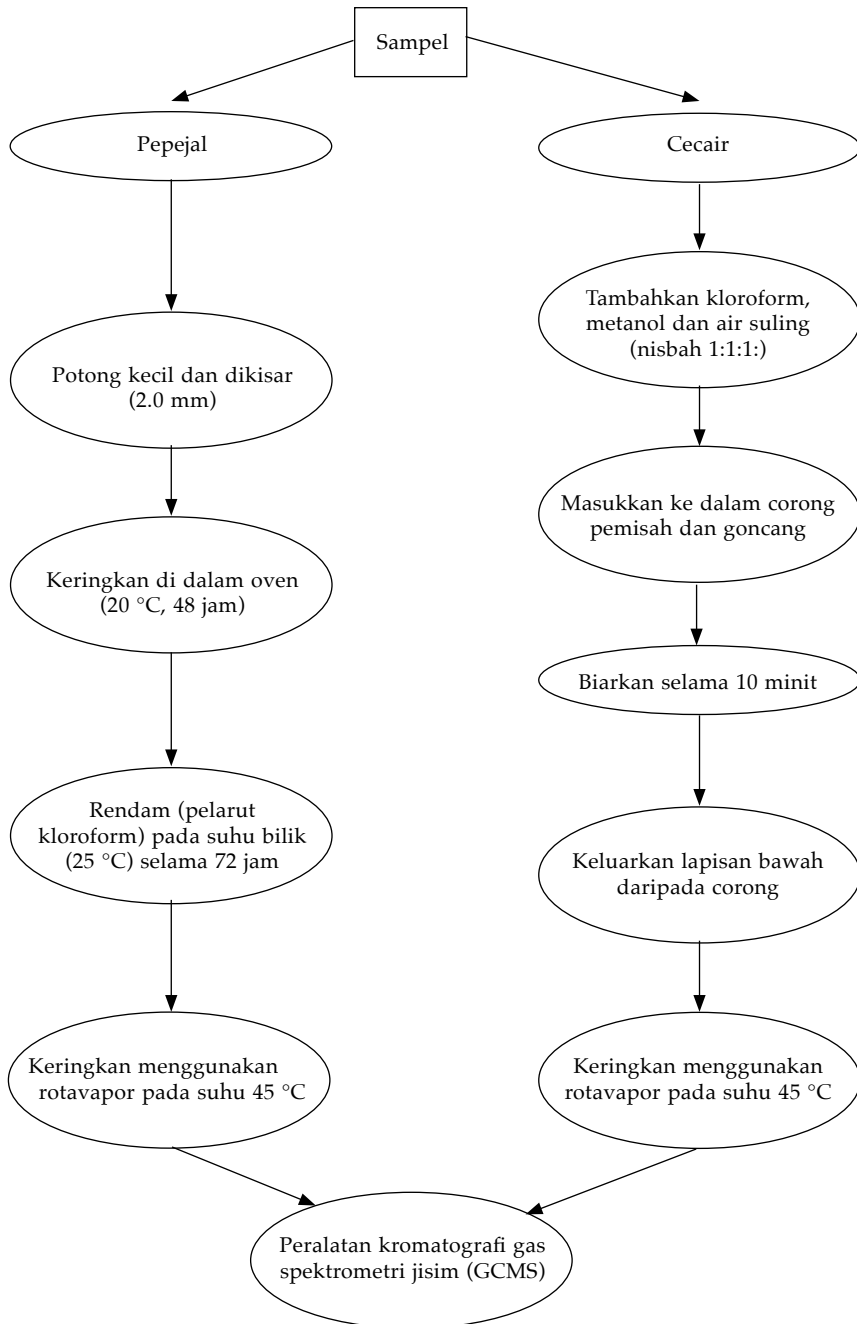
Pengenalpastian: Perbandingan dengan Pusat Data Institut Piawaian dan Teknologi Kebangsaan (NIST) Gaithersburg, USA

Kaedah analisis sebatian kimia fitosterol bagi sampel pertanian dan produk makanan dalam bentuk pepejal dan cecair secara keseluruhannya dirumuskan seperti dalam *Carta alir 1*.

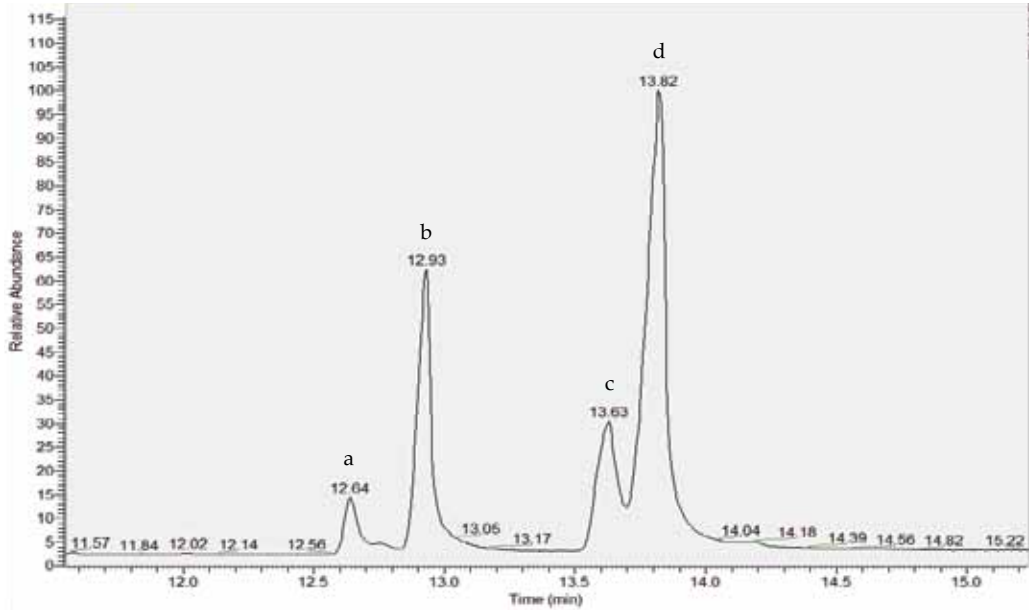
Melalui teknik yang telah dibangunkan berdasarkan kromatogram GCMS dalam *Rajah 1*, empat sebatian kimia fitosterol utama dapat dikesan secara serentak dalam satu analisis masa iaitu 12.5 – 14.5 minit. Secara umumnya, sebatian kimia fitosterol ini dikenal pasti berdasarkan perbandingan nilai data jisim yang diperolehi dengan pangkalan data Pusat Data Institut Piawaian dan Teknologi Virtual (NIST) Gaithersburg, USA.

Spektrum jisim pada *Rajah 2, 3, 4* dan *5* mewakili puncak *a, b, c* dan *d* dengan nilai tertinggi masing-masing m/z 400, 412, 414 dan 416. Berdasarkan nilai jisim (g/mol) ini, puncak *a, b, c* dan *d* masing-masing mewakili kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol dan stigmastanol.

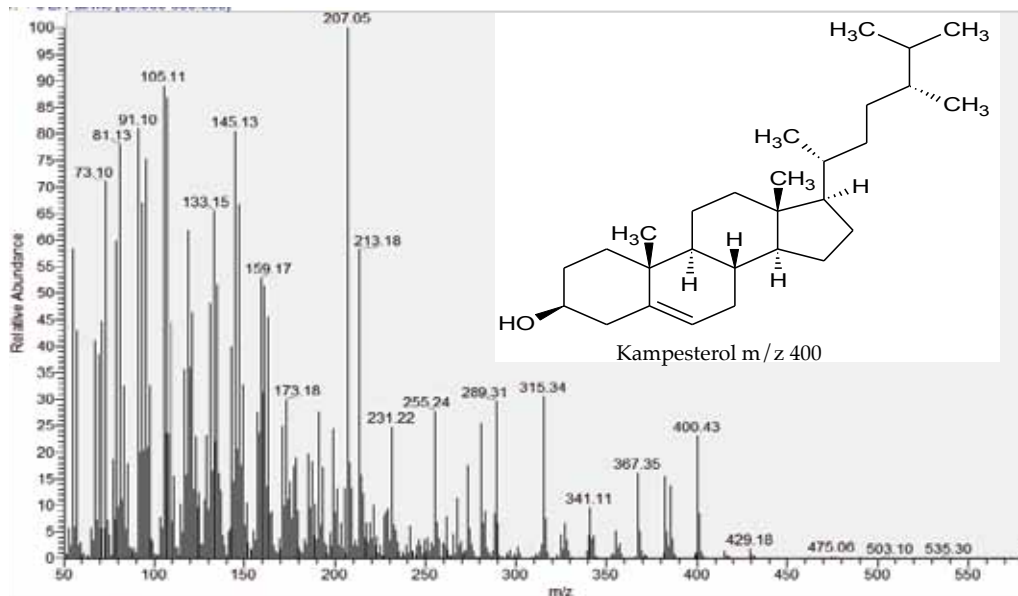
Jadual 1 menunjukkan maklumat analisis bagi sebatian kimia fitosterol utama yang terdapat dalam sampel pertanian dan produk makanan. Berdasarkan masa pengesanan, didapati sebatian kimia kampesterol dapat dikesan lebih cepat berbanding dengan sebatian fitosterol yang lain. Ini disebabkan oleh nilai jisim yang lebih rendah berbanding dengan sebatian kimia fitosterol yang lain. Stigmastanol yang mempunyai nilai jisim yang paling tinggi (m/z 416) dikesan pada masa yang paling lewat berbanding dengan yang lain iaitu pada minit ke 13.82.



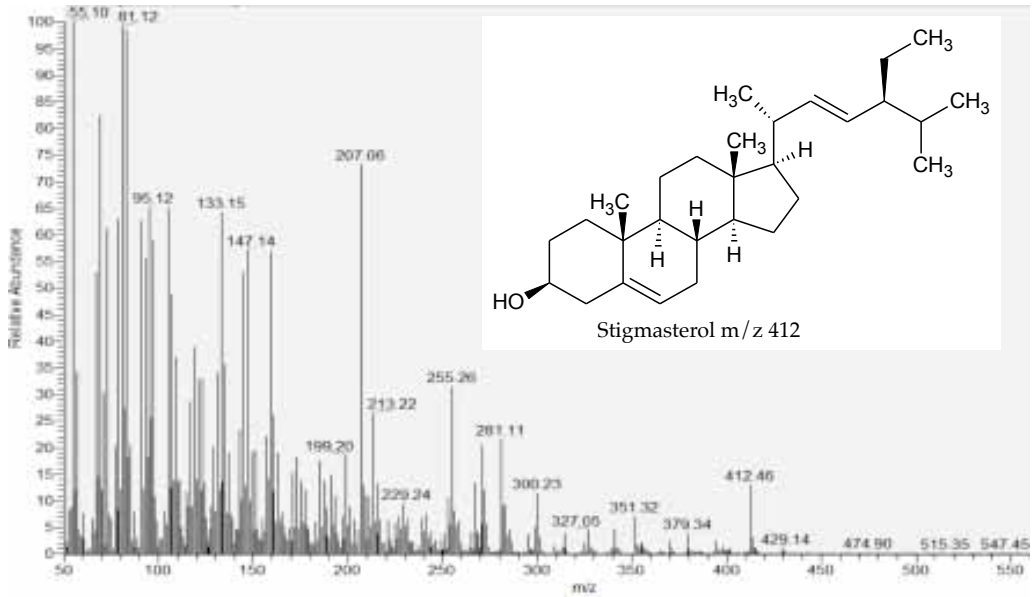
Carta alir 1. Teknik analisis sebatian kimia fitosterol utama dalam sampel pertanian dan produk makanan



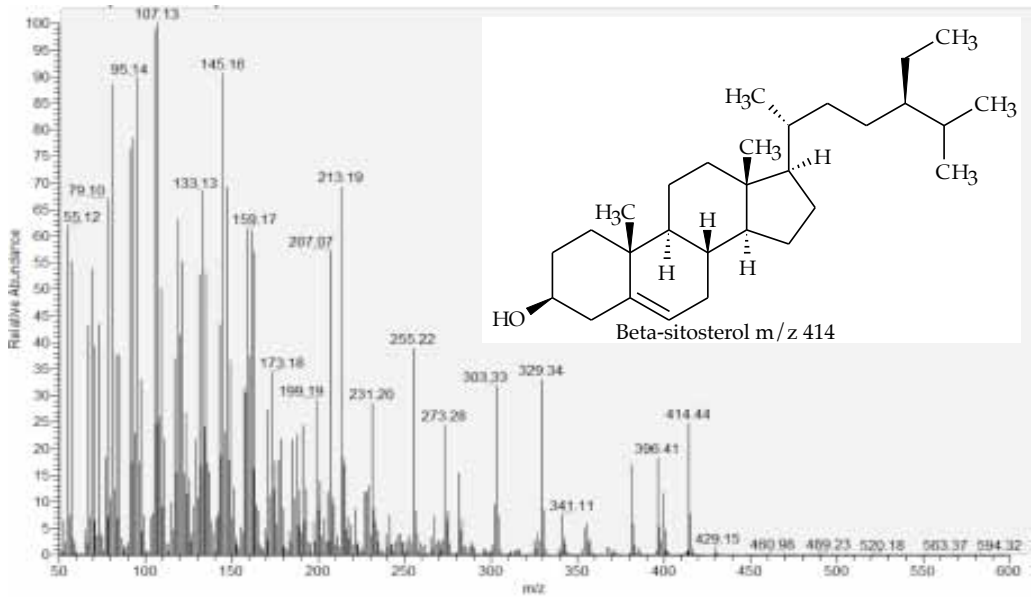
Rajah 1. Sebatian kimia fitosterol utama dalam sampel pertanian dan produk makanan yang dikesan oleh peralatan GCMS [(a) campesterol (b) stigmasterol (c) beta-sitosterol (d) stigmasteranol] dengan merujuk kepada pangkalan data NIST



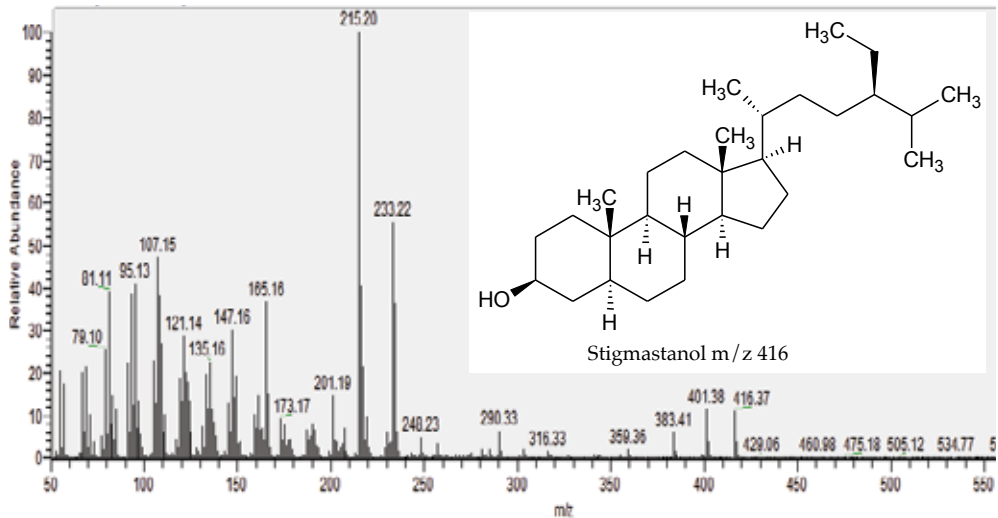
Rajah 2. Spektrum jisim kampesterol dengan nilai jisim m/z 400



Rajah 3. Spektrum jisim stigmasterol dengan nilai jisim m/z 412



Rajah 4. Spektrum jisim beta-sitosterol dengan nilai jisim m/z 414



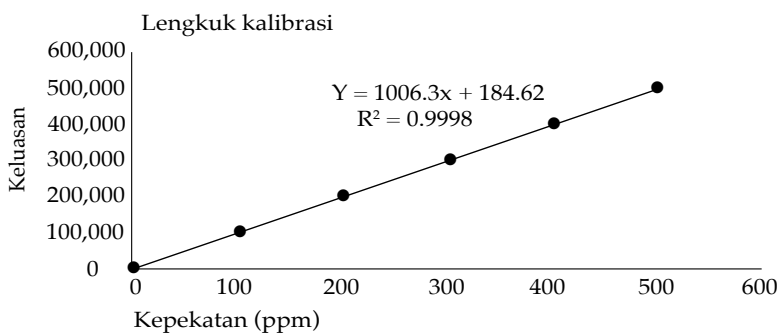
Rajah 5. Spektrum jisim stigmasterol dengan nilai jisim m/z 416

Jadual 1. Maklumat analisis sebatian kimia fitosterol utama menggunakan peralatan GCMS

Masa penahanan (minit)	Fitosterol	Jisim (g/mol)
12.64	Kampesterol	400
12.93	Stigmasterol	412
13.63	Beta-sitosterol	414
13.82	Stigmastanol	416

Penentuan kandungan fitosterol

Hasil daripada pengesanan kehadiran sebatian kimia fitosterol menggunakan GCMS, kandungannya dalam sampel boleh diukur dengan memplotkan graf lengkung kalibrasi. Setiap sebatian fitosterol tulen sekurang-kurangnya pada lima kepekatan yang berbeza perlu disuntik dan dianalisis menggunakan GCMS. Keluasan puncak bagi setiap kepekatan perlu direkodkan. Seterusnya, graf keluasan puncak melawan kepekatan diplotkan. *Rajah 6* menunjukkan contoh lengkung kalibrasi kepekatan yang biasa digunakan untuk mengukur kepekatan sebatian kimia fitosterol.



Rajah 6. Contoh lengkung kalibrasi kepekatan

Kesimpulan

Analisis bagi tujuan pengenalpastian dan penentuan kandungan sebatian kimia fitosterol utama dalam sampel pertanian dan produk makanan boleh dilakukan dengan melibatkan proses pengekstrakan dan seterusnya analisis menggunakan peralatan kromatografi spektrometri jisim (GCMS). Empat sebatian kimia dikenali sebagai kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol dan stigmastanol ditemui dalam sampel pertanian dan produk makanan. Kajian ini menunjukkan, sebatian kimia stigmasterol dan beta-sitosterol boleh ditemui secara lebih meluas dalam sampel dan produk makanan semula jadi.

Bibliografi

- Daud, N.H., Jabit, M.L., Roowi, S., Hussain, M.S., Zahid, K., Shazlin, K., Normah, A. dan Fiteri, M.N.N. (2012). Agrowaste: Phytosterol from durian seed. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* 6(9): 416 – 419
- Han, J.H., Yang, Y.X. dan Feng, M.Y. (2008). Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. *Biomedical and Environmental Sciences* 21(6): 449 – 453
- Ogbe, R.J., Ochalefu, D.O., Mafulul, S.G. dan Olaniru, O.B. (2015). A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian Journal of Plant Science and Research* 5(4): 10 – 21
- Piironen, V., Toivo, J., Puupponen-Pimia, R. dan Lampi, A.M. (2003). Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 330 – 337
- Racette, S.B., Lin, X., Lefevre, M., Spearie, C.A., Most, M.M., Ma, L. dan Ostlund Jr., R.E. (2010). Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study¹⁻³. *American Journal of Clinical and Nutrition* 91(1): 32 – 38
- Statistik Tanaman (Sub-sektor Tanaman Makanan 2017). Unit Statistik Bahagian Perancangan Maklumat dan Komunikasi, Jabatan Pertanian Semenanjung Malaysia
- Trautwein, E.A., Vermeer, M.A., Hiemstra, H. dan Ras, R.T. (2018). LDL-Cholesterol lowering of plant sterols and stanols—Which factors influence their efficacy?. *Nutrients* 10(1262): 1 – 15

Ringkasan

Kewujudan sebatian kimia fitosterol dalam sampel pertanian dan produk makanan sama ada dalam bentuk pepejal ataupun cecair boleh ditentukan melalui proses pengekstrakan dan analisis menggunakan peralatan kromatografi gas spektrometri jisim (GCMS). Bagi sampel pepejal, sebatian kimia fitosterol boleh diekstrak secara terus melalui teknik rendaman menggunakan pelarut kloroform selama 72 jam pada suhu bilik (25 °C). Manakala untuk sampel cecair, ia perlu melalui proses pemisahan cecair-cecair. Dalam proses ini, campuran kloroform, metanol dan air pada nisbah 1:1:1 perlu dimasukkan ke dalam sampel. Campuran kompleks ini kemudiannya dimasukkan ke dalam corong pemisah dan dibiarkan selama 10 minit. Seterusnya, lapisan bawah diasingkan bagi tujuan analisis sebatian kimia fitosterol menggunakan peralatan kromatografi gas spektrometri jisim (GCMS). Kebiasaannya empat sebatian fitosterol utama dikenali sebagai kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol dan stigmastanol dapat dikesan di dalam sampel pertanian dan produk makanan. Hasil kajian menunjukkan, stigmasterol dan beta-sitosterol boleh ditemui wujud secara lebih meluas dalam sumber pertanian dan produk berasaskannya.

Summary

Presence of phytosterol constituents in agricultural and food product samples either in form of solid or liquid could be determined through extraction process and analysis via gas chromatography mass spectrometer (GCMS). For solid sample, phytosterol constituents could be extracted directly via maceration technique using chloroform as solvent for 72 hours at room temperature (25 °C). As for the liquid sample, it needs to undergo liquid-liquid separation process. In this process, a mixture of chloroform, methanol and water with a ratio of 1:1:1 was added to the sample. This complex mixture was further transferred into a separating funnel and allowed to stand for 10 minutes. Subsequently, the bottom layer was collected for detection of phytosterol constituents via gas chromatography mass spectrometer (GCMS) instrumentally. Usually four phytosterol constituents known as campesterol, stigmasterol, beta-sitosterol and stigmastanol could be detected in agricultural and food product samples. From this study, stigmasterol and beta-sitosterol could be found to exist widely in agricultural sources and products based on it.

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

Tun Norbrillinda Mokhtar dan Faridah Hussin
Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor