

Teknik analisis kurkuminoid dalam bahan mentah dan produk rizom kunyit

(Method for curcuminoid analysis from turmeric rhizome and rhizome-based products)

Mohd Lip Jabit dan Mohd Nazrul Hisham Daud

Pengenalan

Kunyit atau nama saintifiknya *Curcuma longa/Curcuma domestica* merupakan tumbuhan vegetatif yang mempunyai rizom yang sangat popular digunakan dalam masakan. Rizomnya digunakan secara tradisi sebagai rawatan traditional, seperti sembelit, masalah kitaran haid dan senggugut. Oleh kerana khasiatnya yang banyak, ia telah digunakan dalam ramuan penyediaan makanan khasnya dalam bentuk kering yang dipanggil serbuk kunyit. Serbuk kunyit digunakan sebagai perapan bahan mentah seperti ayam, daging dan ikan untuk memberikan warna yang menarik. Selain itu, ia juga mampu bertindak sebagai bahan perasa dalam masakan. Pada hari ini, kunyit bukan sahaja sebagai bahan penting dalam resepi masakan, tetapi terdapat produk yang berdasarkan rizom kunyit (*Gambar 1*) dihasilkan untuk pelbagai tujuan seperti i) bahan kandungan makanan (*food ingredient*) seperti bahan tambahan makanan (*food additive*) dan bahan makanan kegunaan (*functional food*) untuk tujuan tertentu ii) farmaseutikal seperti produk antimikrob dan antikeradangan.

Kehadiran produk-produk yang berdasarkan rizom kunyit di pasaran menyebabkan keperluan membangunkan teknik untuk menganalisis produk-produk tersebut. Melalui teknik analisis tersebut kawalan kualiti, pembangunan produk berdasarkan penanda kimia, pelabelan dan pensijilan dapat dilakukan untuk tujuan pemasaran dan keberkesanannya produk. Kunyit mengandungi sebatian unik berfungsi iaitu kurkuminoid yang boleh dijadikan sebagai bahan kimia penanda (*biomarker*) kepada produk-produk berdasarkan kunyit.

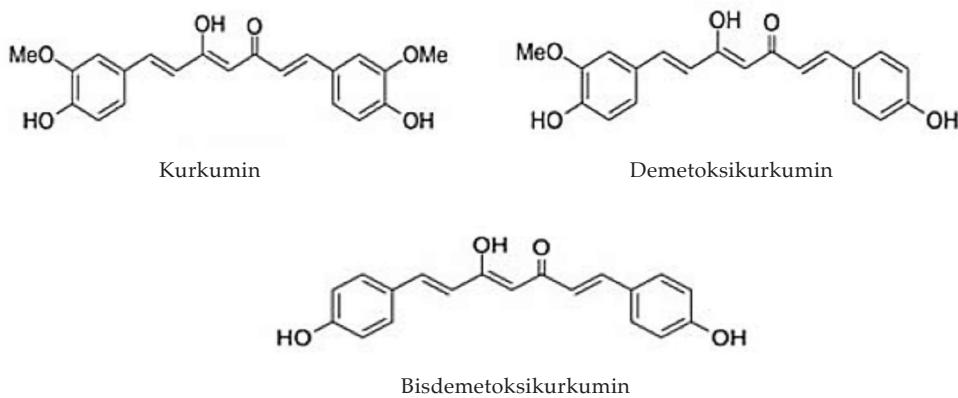


Gambar 1. Produk-produk kunyit di pasaran

Kurkuminoid

Kurkuminoid merupakan sebatian kimia utama yang terdapat di dalam kunyit yang mempunyai pelbagai khasiat semula jadi seperti minuman kesihatan untuk melancarkan peredaran darah, merawat luka kulit dan mencantikkan kulit untuk manusia. Ia menyumbang kepada warna kuning kunyit dan mudah larut air pada suhu didih.

Sebatian ini juga larut dalam dimetil sulfoksida (DMSO), aseton, etanol, metanol, isopropanol dan pelarut bersifat alkali seperti 0.1 M sodium hidroksida dan sodium bikarbonat. Sebatian kurkuminoid mampu bertindak sebagai agen antioksidan yang kuat secara sinergi dengan enzim tubuh badan manusia seperti *glutathione peroxidase*, *catalase* dan *superoxide dismutase* untuk meneutralkan atau memusnahkan radikal bebas yang menyumbang kepada pembentukan sel-sel kanser. Dalam dos yang bersesuaian, bahan kurkuminoid mampu menentang inflamasi dalam tubuh badan manusia. Menurut kajian, bahan ini dapat melawan kanser apabila digabungkan bersama ubat antiinflamasi seperti celecoxib yang memberikan kesan lebih berpotensi berbanding dengan penggunaan tanpa gabungan. Rajah 1 menunjukkan struktur kimia bagi tiga jenis kurkuminoid yang telah dikenal pasti di dalam rizom kunyit iaitu kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin.



Rajah 1. Kurkumin dan dua sebatian lain yang dikenali sebagai dimetoksikurkumin dan bisdimetoksikurkumin adalah sejenis sebatian polifenol

Teknik analisis kurkuminoid

Penentuan secara analitikal sebatian kimia kurkuminoid dalam sampel mentah dan produk rizom kunyit melibatkan pengekstrakan menggunakan pelarut organik dan seterusnya pengesan atau analisis sebatian kimia menggunakan alatan *hyphenated* seperti kromatografi cecair berprestasi tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Pengekstrakan kurkuminoid

Pengekstrakan sebatian kimia kurkuminoid merupakan proses yang paling penting dalam memastikan ketepatan analisis. Oleh yang demikian, pemilihan teknik pengekstrakan yang sesuai adalah sangat penting. Teknik pengekstrakan sampel mentah adalah berbeza berbanding dengan sampel produk. Pengekstrakan sampel produk lebih rumit kerana kebiasaannya ia terdiri daripada formulasi pelbagai bahan lain.

Pengekstrakan sampel kunyit mentah dan produk kunyit serbuk

Teknik pengekstrakan pepejal cecair adalah sangat sesuai bagi sampel kunyit mentah atau serbuk kunyit. Bagi sampel kunyit mentah, sampel kunyit dihiris menjadi kepingan kecil (*Gambar 2*) bagi menambah jumlah luas permukaan. Ia ditimbang tepat 1 g ke dalam *thimble* yang diperbuat daripada kertas penapis yang kuat. Bagi sampel produk kunyit serbuk boleh ditimbang terus ke dalam *thimble* untuk proses pengekstrakan seterusnya.

Segumpal bulu kapas diletakkan di atas sampel untuk mengelakkannya terkeluar daripada *thimble* semasa pengekstrakan. *Thimble* diletakkan di dalam pengekstrak *soxhlet* (*Gambar 3*). Kemudian, 50 mL heksana dimasukkan ke dalam balang bulat *soxhlet* (100 mL) dan dipanaskan selama 30 minit. Ekstrak heksana kemudian dibuang dan serbuk yang sama diekstrak semula dengan 50 mL metanol selama dua jam. Apabila telah sejuk, ekstrak metanol dimasukkan ke dalam kelalang isi padu 50 mL dan dipiawaikan isi padu pada 50 mL. Sebanyak 1 mL sampel diambil dan dicairkan 10 kali. Kemudian 1 mL sampel diambil dan dipindahkan ke vial HPLC (2 mL) untuk dianalisis.



Gambar 2. Sampel kunyit yang telah dihiris halus



Gambar 3. Radas soxhlet

Pengekstrakan sampel produk dalam medium minyak

Pengekstrakan sampel produk yang ada dalam pasaran berbeza mengikut jenis sampel tersebut. Secara umumnya, sampel dalam medium minyak menggunakan teknik yang berbeza berbanding dengan sampel serbuk.

Sebanyak 5 mL sampel yang ditimbang tepat dimasukkan ke dalam corong pemisah untuk diekstrak dengan 20 mL metanol sebanyak tiga kali. Ketiga-tiga hasil ekstrak dikumpul di dalam kelalang bulat. Sampel dipekatkan kepada 5 mL menggunakan alat penyejat berputar. Sampel dipindahkan ke dalam vial kaca 2 mL untuk disuntik ke dalam sistem HPLC.

Pengesan sebatian kurkuminoid

Pengesan bahan kimia khususnya sebatian kurkuminoid adalah berdasarkan aplikasi mudah bermigrasi iaitu sebatian kimia dapat dipisahkan melalui pelarut yang digunakan dikawal selia berdasarkan prinsip fasa pegun dan fasa cecair yang boleh ditentukan menggunakan teknik *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (*Gambar 4*). Sebatian ini dapat ditentukan secara kualitatif dan kuantitatif berdasarkan penyerapan cahaya bawah pengesan menggunakan Pengesan *Photo Diode Array* (PDA) dengan serapan gelombang UV 370 nm. Secara umumnya, parameter berikut menunjukkan kaedah penggunaan HPLC:

Alat pengesan: *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)
jenis Agilent 1,200

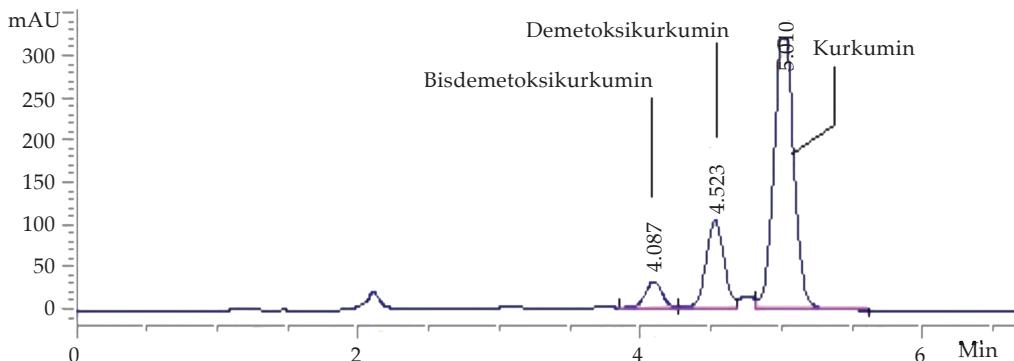
Kolumn: Jenama Phenomenex Kinetec C18, 250 mm x 4.6 mm (ID),
Saiz partikel 5 μm

Parameter: Suhu operasi kolumn 30 °C, isi padu injek sampel ialah 10 μL , kadar alir fasa gerak (campuran pelarut asetonitril/metanol/air pada nisbah 40:20:40) ialah 1.5 mL/min, Pengesan *Photo Diode Array* (PDA) digunakan untuk mengesan serapan gelombang UV pada 370 nm

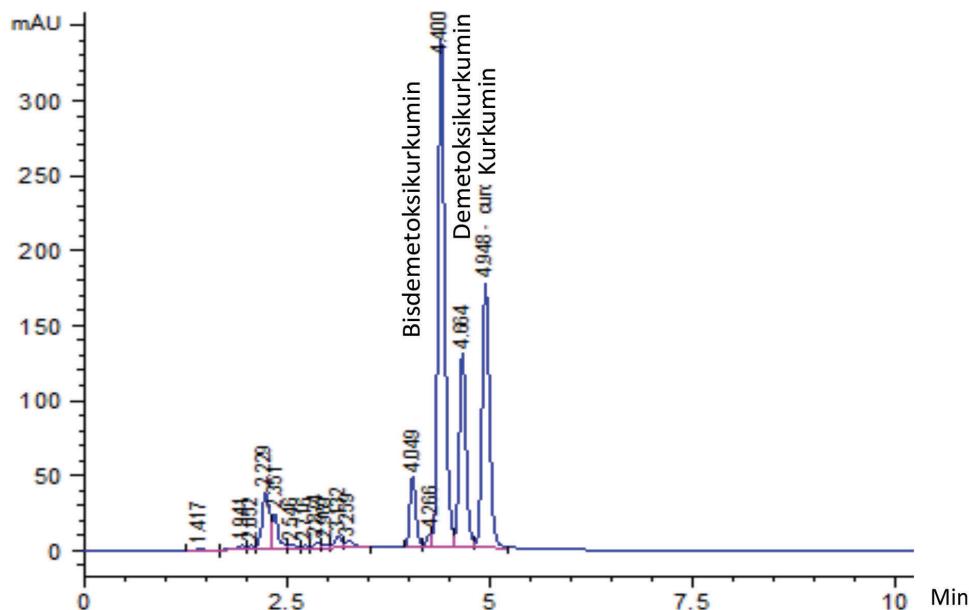


Gambar 4. HPLC yang digunakan untuk pengesan sebatian kimia kurkuminoid

Melalui teknik yang telah dibangunkan untuk analisis kurkuminoid dalam produk hasilan kunyit terdapat tiga sebatian kimia utama seperti dalam *Rajah 2*. Sebatian bisdemetoksikurkumin akan keluar terlebih dahulu sekitar 4.09 minit, diikuti dengan demetoksikurkumin dan kurkumin, masing-masing pada 4.52 dan 5.01 minit. Secara ringkasnya, signal daripada sebatian piawai ini akan digunakan untuk perbandingan dengan signal yang datang daripada sampel hasilan kunyit seperti dalam *Rajah 3*.



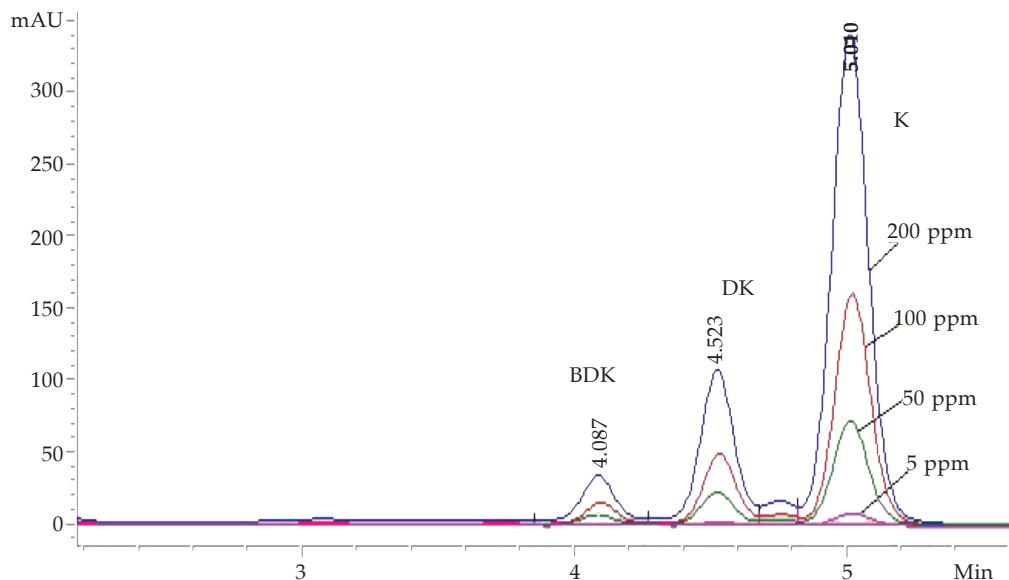
Rajah 2. Kromatogram HPLC bagi sebatian piawai kimia utama kurkuminoid



Rajah 3. Kromatogram HPLC ekstrak sampel produk hasilan kunyit

Penentuan kandungan sebatian kimia

Penentuan kandungan sebatian kimia utama secara kuantitatif boleh dicapai dengan memplotkan graf lengkuk kalibrasi menggunakan sebatian kimia piawai (*standard*) yang dibeli daripada pembekal. Sebatian kimia piawai bagi ketiga-tiga sebatian kimia utama itu akan dianalisis menggunakan kondisi HPLC yang sama pada empat kepekatan berbeza seperti dalam *Rajah 4*.

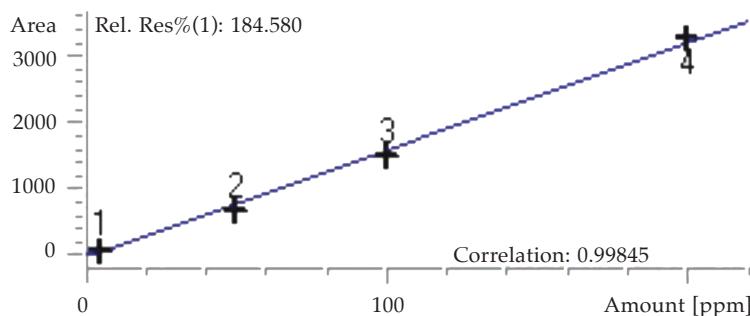


Rajah 4. Sebatian kurkumin (K), demetoksikurkumin (DK) dan bisdemetoksikurkumin (BDK) dianalisis pada kondisi HPLC yang sama tetapi pada kepekatan berbeza iaitu 5 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm

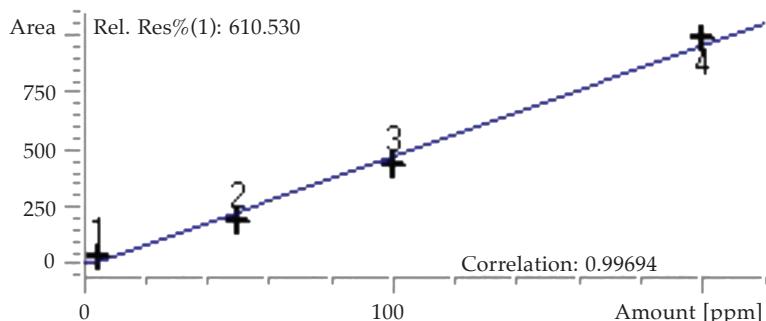
Secara teorinya semua signal sebatian kimia yang sama sifat kepolarannya akan keluar pada masa yang sama. Hanya magnitud signal akan bertambah dengan bertambahnya kepekatan sebatian kimia tersebut. Keluasan puncak signal bagi setiap sebatian kimia utama pada kepekatan berbeza direkodkan dan diplotkan terhadap kepekatan masing-masing sehingga membentuk lenguk kalibrasi seperti dalam *Rajah 5*.

Proses keseluruhan analisis sebatian utama kurkuminoid dalam sampel hasilan kunyit dapat diringkaskan seperti dalam *Carta alir 1*.

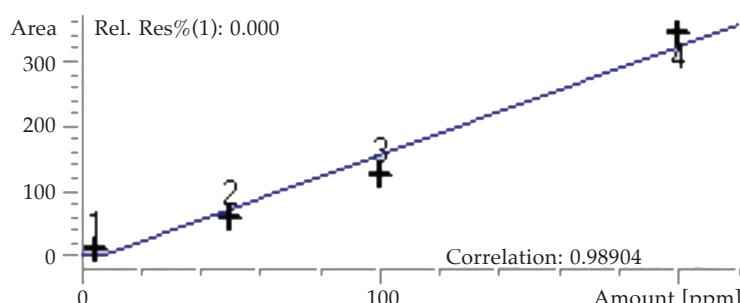
Kurkumin, DAD1 A
Area = $16.364876 \times \text{Amt} - 52.795119$



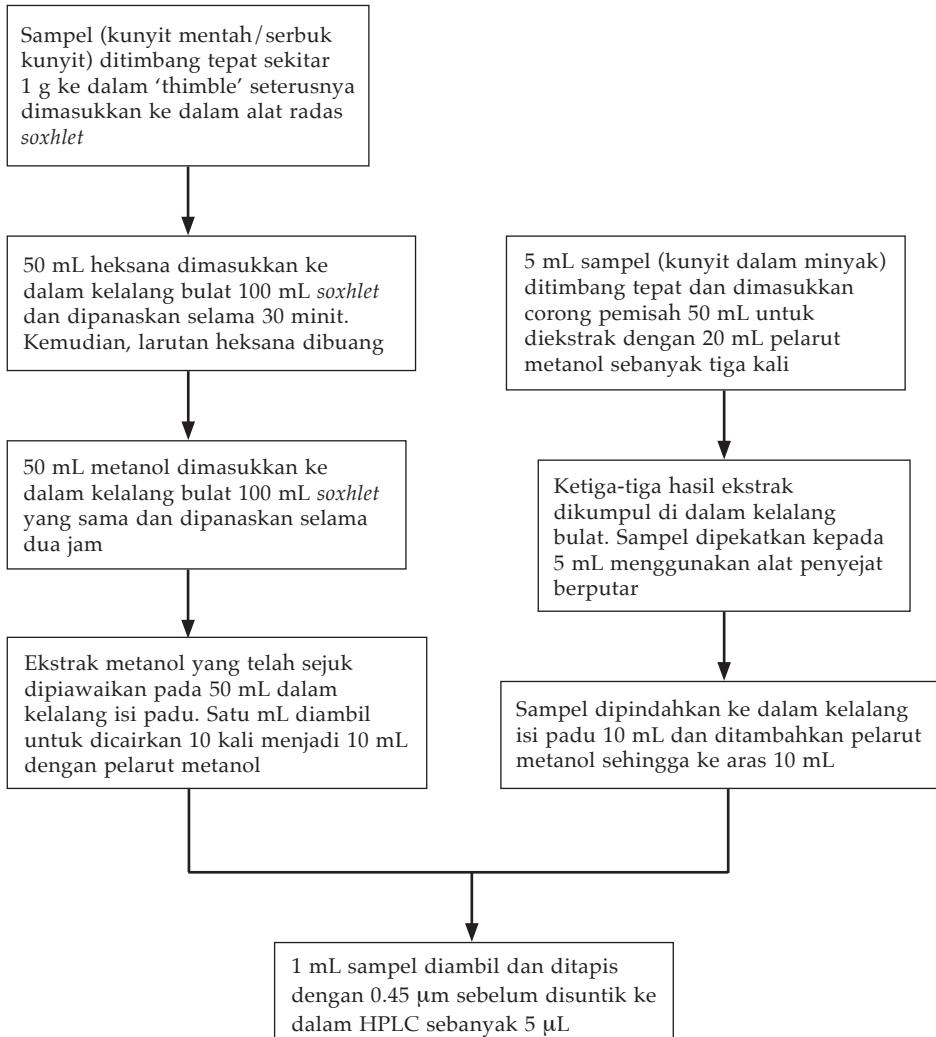
Demetoksikurkumin, DAD1 A
Area = $4.91070792 \times \text{Amt} - 20.821504$



Bisdemetoksikurkumin, DAD1 A
Area = $1.68565607 \times \text{Amt} - 12.141159$



Rajah 5. Lengkuk kalibrasi contoh bagi sebatian kimia utama piawai (ketulenan minimum 95%)



Carta alir 1. Teknik analisis sebatian kurkuminoid utama dalam sampel hasilan kunyit (kunyit mentah, serbuk kunyit dan produk kunyit di dalam minyak)

Kesimpulan

Kualiti sesuatu produk kunyit boleh ditentukan melalui penentuan kandungan kurkuminoid utama iaitu kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin. Penentuan kandungan ini boleh dilaksanakan melalui pengekstrakan yang telah dibangunkan dan seterusnya dianalisis menggunakan alat Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi [*High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*]. Kaedah ini bukan sahaja dapat menentukan kandungan kurkuminoid dalam serbuk dan kunyit mentah, tetapi kandungan kurkuminoid dapat diukur dalam sampel minyak.

Bibliografi

- Ammon, H.P.T. dan Wahl, M.A. (1991). Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* 57: 1 – 7
- Bulboaca, A.E., Bulboaca, S.D., Bolboac, A.C., Porfire, A.S., Tefas, L.R., Suciu, S.M., Dogaru, G. dan Stanescu, J.C. (2019). Liposomal curcumin and naproxen in experimental migraine. *Med Sci Monit* 25: 5,087 – 5,097
- Hewlings, S.J. dan Kalman, D.S. (2017). Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods* 6 (10): 92
- Jayaprakasha, G.K., Rao, L.J.M. dan Sakariah, K.K. (2002). Improved HPLC Method for the Determination of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3,668 – 3,672
- Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K. dan George, M.C. (2011). Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.) by Column Chromatography. *Journal of Experimental Sciences* 2(7): 21 – 25
- Nabati, M., Mahkam, M. dan Heidari, H. (2014). Isolation and characterization of curcumin from powdered rhizomes of turmeric plant marketed in Maragheh city of Iran with soxhlet technique. *Iranian Chemical Communication* 2: 236 – 243
- Pe'ret-Almeida, L., Cherubino, A.P.F., Alves, R.J., Dufosse', L. dan Gloria, M.B.A (2005). Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* 38: 1039 – 1044

Ringkasan

Kunyit atau nama saintifiknya *Curcuma longa* atau sinonimnya *Curcuma domestica* adalah bahan yang penting dalam masakan. Penggunaannya sangat meluas dalam resipi masakan bukan sahaja dalam kalangan bangsa Melayu, tetapi juga digunakan oleh bangsa lain seperti India dan orang Eropah. Atas keperluan ini produk-produk berdasarkan kunyit semakin meningkat di pasaran. Antaranya ialah produk-produk makanan, makanan kesihatan, makanan berfungsi dan produk perubatan. Bagi menentukan kesahihan produk berdasarkan kunyit, satu kaedah analisis telah dibangunkan bagi melaksanakan verifikasi dan pembangunan produk usahawan menggunakan alat Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Kaedah ini menggunakan kolumn jenis Phenomenex Kinetek C18, 250 mm x 4.6 mm dan saiz partikel 5 μm . Alat HPLC menggunakan fasa gerak yang mengandungi campuran pelarut asetonitril/metanol/air (40:20:40), yang mengalir pada kadar 1.5 mL/minit. Pengesan yang digunakan ialah *Diode Array Detector* (DAD) yang memantau gelombang pada 370 nm. Kaedah ini boleh digunakan untuk memantau jumlah kurkuminoid dalam sampel rizom kunyit dan produk berdasarkan kunyit. Sebatian kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin sesuai dijadikan sebatian kimia penanda untuk memantau kualiti bahan mentah kunyit dan juga produk berdasarkan rizom kunyit.

Summary

Turmeric which is the scientific name *Curcuma longa* or its synonym *Curcuma domestica*, is an important ingredient in local cuisine. Its use is very widespread as food flavour not only among the Malays but also used by other races such as Indian and European. Due to its importance, turmeric based products is increasing in the market. Among them are food products, health foods, functional foods and medical products. To validate the authenticity of tumeric, an analytical method has been developed to

carry out the verification and development of entrepreneurial products using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This method uses a Phenomenex Kinetek C18 column, 250 mm x 4.6 mm and a particle size of 5 μm . The HPLC apparatus uses a phase containing a solvent of acetonitrile/methanol/water (40:20:40), which flows at a rate of 1.5 mL/minute. The detector used is the Diode Array Detector (DAD) which monitors wavelength at 370 nm. This method can be used to monitor the amount of curcumanoids in turmeric rhizome samples and turmeric rhizome based products. Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin are suitable to be used as a chemical marker to monitor the quality of turmeric raw materials as well as in turmeric-based products.

Pengarang

Mohd Lip Jabit

Pusat Pengkomersialan Teknologi dan Bisnes, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor
E-mel: alip@mardi.gov.my

Mohd Nazrul Hisham Daud

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