Buletin Teknologi MARDI Bil. 30 (2022) Khas Kolokium Pembaikbakaan Tanaman: 131 – 140

Penentuan kandungan sebatian antidiabetik charantin daripada bahagian buah induk dan hibrid peria

(Determination of antidiabetic compound charantin from fruits of parent and hybrid of bitter gourd)

Mohd Zulkhairi Azid, Razali Mirad, Nur Syafini Ghazali, Mohd Shukri Mat Ali @ Ibrahim, Aimi Athirah Ahmad, Siti Aisyah Mohd Noor, Nur Daliana Yusof, Rosali Hussin, Mohd Zamri Kamaruddin dan Nur Fatin Mohd Said

Pengenalan

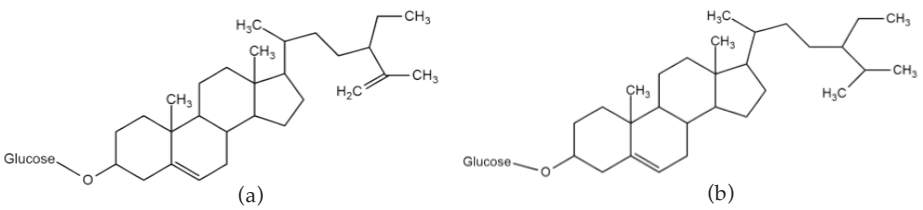
Peria atau nama saintifik *Momordica charantia* daripada famili Cucurbitaceae merupakan sayuran yang boleh ditemui di negara-negara beriklim tropika di Asia seperti India, Indonesia dan Malaysia. Peria juga dikenali dalam bahasa Inggeris sebagai *bitter gourd, balsam pear* atau *balsam apple* manakala di sesetengah negara lain ia dikenali sebagai *karalla* (India), *pare* (Indonesia), *margose* (Perancis), *balsambirne* (Jerman) dan *balsamito* (Sepanyol). Di Malaysia, peria terbahagi kepada dua jenis berdasarkan kepada ciri morfologi dan rasanya. Peria biasa yang selalunya dimakan segar atau dimasak bersaiz lebih besar dan panjang serta berwarna hijau cerah. Manakala peria katak (*dwarf bitter gourd*) adalah bersaiz kecil, mempunyai permukaan yang lebih menggerutu dan berwarna hijau gelap. Peria katak mempunyai rasa yang sangat pahit berbanding dengan peria biasa. Berat purata sebiji buah peria biasa ialah 300 – 600 g/biji dengan saiz panjang antara 17 – 23 cm. Peria cukup sinonim dalam perawatan tradisional sama ada dimakan mentah atau dijadikan sebagai minuman tonik. Misalnya, dalam perubatan kuno masyarakat Afrika, akar dan buahnya digunakan dalam merawat bronkitis dan diabetes. Manakala, jus segar daripada peria juga digunakan sebagai tonik oleh masyarakat India sebagai rawatan tradisional bagi pesakit diabetes. Justeru, tidak mustahil peria ini sinonim dengan kegunaannya dalam menurunkan kadar gula di dalam darah.

Berdasarkan kajian terdahulu yang dijalankan, setiap 100 g peria mengandungi 93% air, 840 mg protein, 4.32 g karbohidrat, 319 mg potasium, 4.8 μg vitamin K dan 79 kJ tenaga. Selain itu, asid lemak juga didapati terdapat dalam peria seperti asid laurik, palmitik, stearik dan linolik. Sebatian fitokimia daripada kelas steroid, fenolik dan terpena merupakan sebatian yang sering kali dijumpai dalam tumbuhan termasuk peria yang bermanfaat kepada kesihatan manusia. Kajian pemencilan daripada ekstrak peria menunjukkan kehadiran lebih daripada 30 jenis sebatian triterpenoida dan 10 jenis sebatian steroid. Sebatian-sebatian ini dilaporkan terdapat dalam buah, daun, biji, akar dan batang peria. Beberapa sebatian kimia berfungsi yang dipencilkan ialah momordicin, momordin, charantin, cucurbitin, asid gentisik,

eritodiol, diosgenin, chorine, cryptocantin, multiflorenol dan lain-lain. Berdasarkan kajian saintifik yang telah dijalankan oleh para saintis seluruh dunia, sebatian kimia yang tergolong dalam kelas glikosida steroidal dan charantin adalah antara sebatian kimia utama yang terdapat dalam peria (*Rajah 1*). Sebatian ini tergolong dalam kelas cucurbitane triterpernoida. Charantin wujud dalam campuran dua sebatian kimia, glukosida β-sitosteril ($C_{35}H_{60}O_6$) dan glukosida stigmasteril ($C_{35}H_{58}O_6$). Kajian aktiviti biologi juga mendapati, charantin mempunyai sifat seperti insulin dalam menurunkan kadar gula dalam darah (kesan hipoglisemik) seterusnya memberikan kesan yang baik terhadap pesakit diabetes.

Pelbagai kajian telah dijalankan dalam mengenal pasti keberkesanan sebatian ini dalam menurunkan aras gula di dalam darah. Kajian secara in vivo terhadap arnab mendapati, charantin berupaya untuk menurunkan kandungan gula dalam darah untuk jangka masa 1 – 4 jam dengan peratus penurunan sebanyak 42%. Selain itu, sebatian ini juga berupaya untuk merencat enzim hidrolisis karbohidrat, *α*-amylase dan *α*-glucosidase. Hasil kajian juga mendapati, charantin mempunyai aktviti perencatan enzim lebih baik daripada akarbos, ubat generik bagi merawat penyakit diabetes melitus jenis dua yang berada di pasaran. Kajian juga mendapati aglikon bagi charantin dapat menurunkan aras gula dalam darah mencit yang diaruhkan aras gula tinggi (diabetes) melalui mekanisme hipoglisemia iaitu pengaktifan AMP-protein kinase.

Dalam bidang fitokimia, salah satu kaedah pencirian dan pengenalpastian sebatian kimia adalah menggunakan kaedah kromatografi. Instrumen seperti Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi [*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)] merupakan salah satu teknologi yang sering digunakan dalam mengenal pasti dan menentukan kandungan sesuatu sebatian kimia. Secara teori, kaedah kromatografi menggunakan kaedah pemisahan sebatian kimia tertentu dengan menggunakan aliran pelarut (fasa bergerak) pada turus pepejal (fasa statik). Pemisahan ini dibantu oleh faktor tekanan, masa dan pengesan (*detector*) tertentu. Salah satu contoh pengesan yang digunakan ialah ultra lembayung (UV) pada bacaan gelombang tertentu (nm). Setiap sebatian kimia mempunyai respons khusus terhadap bacaan gelombang yang tertentu. Masa tahanan/*retention time* (t_R) sesuatu sebatian akan ditentukan berdasarkan kehadiran sebatian tersebut



Rajah 1. Struktur kimia charantin (campuran dua sebatian kimia) (a) Glukosida β-sitosteril ($C_{35}H_{60}O_6$), (b) Glukosida stigmasteril ($C_{35}H_{58}O_6$)

dalam analisis kromatogram. Kehadiran sebatian kimia dikenal pasti melalui puncak sebatian tersebut yang terbentuk susulan respons terhadap bacaan gelombang. Kelebihan menggunakan HPLC berbanding dengan instrumen lain adalah penyediaan sampel yang sedikit untuk proses analisis (1 – 20 μl), ketepatan yang tinggi dan masa analisis yang pantas.

Kaedah penentuan sebatian charantin dalam sampel peria menggunakan HPLC bukanlah sesuatu yang asing dalam kalangan penyelidik. Meskipun kaedah ini telah lama dipraktikkan, namun pengubahsuaian parameter yang telah dijalankan bersesuaian dengan teknologi semasa merupakan satu pembangunan teknik dalam penyelidikan yang dijalankan ini.

Penyediaan sampel

Sebanyak 17 sampel buah peria segar telah dituai dari plot penyelidikan tanaman peria, Pusat Penyelidikan Hortikultur, Ibu Pejabat MARDI, Serdang, Selangor. Sebanyak lapan sampel induk dan sembilan sampel hibrid peria telah dikenal pasti. *Gambar 1* menunjukkan 17 sampel peria bagi kajian penentuan sebatian charantin ini.

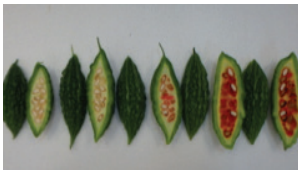
Sampel peria dituai pada kematangan komersial dan buah dipilih adalah bebas serangan perosak dan penyakit. Sampel yang dituai dibersihkan dan dipotong dengan ketebalan 1 cm. Sampel kemudiannya dikeringkan menggunakan kaedah sejuk dingin beku (Model; Labconco FreeZone -105 °C, kapasiti (4.5 L), tekanan (250 mbar), Cascade Benchtop, Amerika Syarikat dan Martin Christ Alpha 1 – 4, Jerman) selama tiga hari. Sampel dikisar sehingga menjadi serbuk halus dengan menggunakan pengisar mikro dengan saiz pengayak 0.25 (*Hole Size* Ø 0.25 mm) (Model; Ika Werke MF 10 Basic, Jerman) dan disimpan di dalam peti sejuk pada suhu 4 °C selepas proses pengekstrakan dijalankan.

Pengesktrakan charantin

Pengekstrakan charantin daripada peria berdasarkan prosedur yang telah dibangunkan terdahulu dengan sedikit pengubahsuaian. Sebanyak 1 g sampel peria yang telah dikeringkan diekstrak menggunakan 20 mL heksana (Fisher Chemical, Analytical Grade). Sampel tersebut dikeringkan di dalam kebuk wasap bagi mengeluarkan heksana tersebut. Proses ini diulang sebanyak dua kali bagi mengeluarkan kandungan minyak dan lemak yang terdapat dalam sampel. Sebanyak 10 mL metanol (100%) (Fisher Chemical, Analytical Grade) ditambah ke dalam sampel dan diekstrak menggunakan mesin pengekstrakan sonik (JAC Ultrasonic, Korea) selama sejam pada suhu bilik. Sampel diemparkan menggunakan mesin pengempar (Heraus Multifuge X3R, Jerman) berkelajuan 5,000 putaran/minit (rpm) selama 15 minit. Dua lapisan terhasil dan larutan atas dipisahkan dan diasingkan. Lapisan atas ditapis menggunakan kertas turas (Whatman 150 mm No.1) dan dikeringkan dalam keadaan vakum menggunakan penyejat putar (Buchi Rotavapor R-200). Ekstrak

Lapan sampel induk peria

11

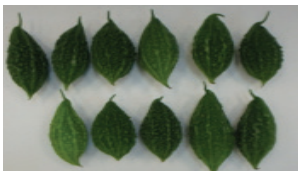


167

94

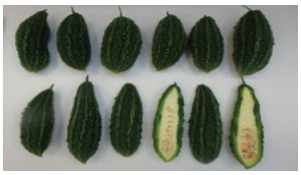
375

93



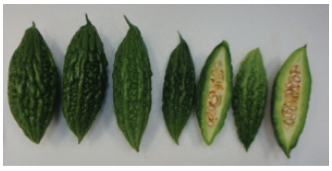
206

92



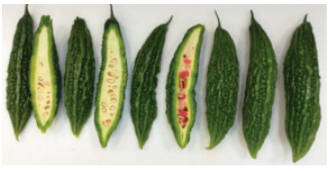
13

Sembilan sampel hibrid peria



167 × 93

93 × 92



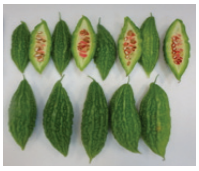
206 × 11

13 × 92

94 × 93

92 × 13

11 × 92



93 × 167

11 × 375

Gambar 1. Sampel peria induk dan hibrid yang dituai daripada plot penanaman peria di MARDI, Serdang

yang telah dikeringkan dilarutkan dengan 1 mL metanol (100%) (Gred HPLC) sebelum dianalisis. Sebanyak tiga replikasi (n = 3) ekstrak disediakan untuk analisis. Data dianalisis menggunakan kaedah ANOVA dan ujian Tukey (Perisian Minitab 18.0).

Analisis charantin menggunakan HPLC

Kandungan sebatian piawai charantin dalam sampel buah peria ditentukan dengan menggunakan HPLC (*Agilent chromatography* 1200 *Infinity Series*). Pemisahan charantin adalah berdasarkan rujukan prosedur yang telah dibangunkan sebelum ini dengan sedikit pengubahsuaian. Sampel dianalisis menggunakan turas membran, 0.45 μm politetrafluoroetilina (PTFE). Manakala, sebatian piawai charantin diperoleh daripada pembekal luar negara (Chromadex Inc, Santa Ana. California, Amerika Syarikat). *Jadual 1* dan 2 menunjukkan parameter pemisahan dan sistem pelarut yang digunakan dalam analisis charantin. Penentuan kandungan charantin ditentukan berdasarkan perbandingan masa tahanan, t_R dan luas di bawah puncak piawai berkenaan.

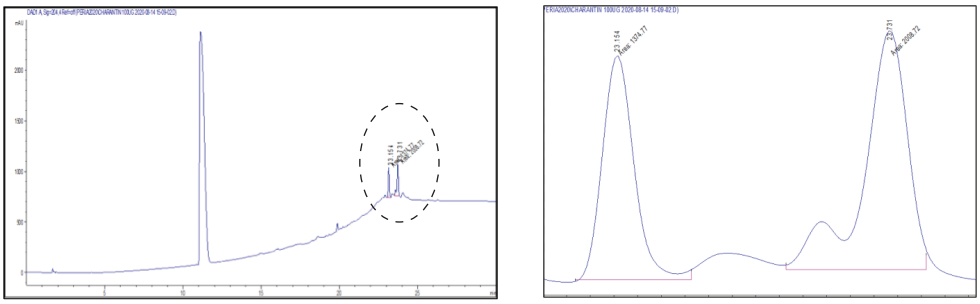
Rajah 2 (a) dan *2 (b)* menunjukkan kromatogram bagi piawai charantin pada kepekatan 100 μg/mL. Masa pemisahan t_R charantin adalah pada 23.154 – 23.731 min. Justeru, dengan membandingkan masa pemisahan t_R dan luas di bawah puncak bagi piawai charantin, maka kandungan charantin bagi 17 sampel peria yang lain dapat ditentukan. Kandungan charantin yang telah ditentukan adalah dalam unit μg/g berat kering (DW).

Jadual 1. Parameter bagi kaedah pemisahan dan pengenalpastian charantin menggunakan HPLC

Fasa cecair	(A) Air: (B) Metanol
Isi padu analisis	2.0 μl
Suhu turus (kolum)	30 °C
Masa	30 minit
Turus	Kinetex C18, 2.6 μm, 100 A, Amerika Syarikat
UV (DAD)	204 nm

Jadual 2. Sistem pelarut fasa cecair bagi pemisahan charantin menggunakan HPLC

Masa (Min)	Air (%)	Metanol (%)
0	50	50
5	25	75
20	0	100
29	0	100
30	50	50



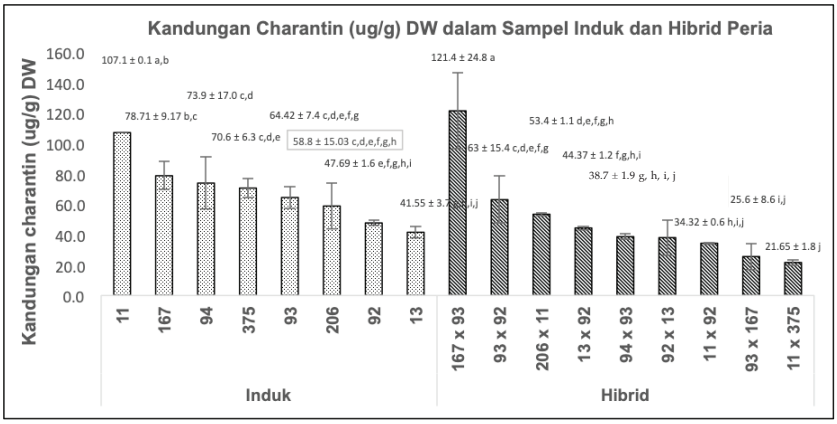
(a) (b)

Rajah 2. Kromatogram sebatian piawai charantin 100 μg/mL (a) Masa tahanan (t_R) adalah pada 23.154 min – 23.731 min (b) Kromatogram sebatian charantin secara lebih dekat

Penentuan kandungan charantin dalam sampel peria daripada analisis HPLC

Rajah 3 menunjukkan kandungan sebatian charantin dalam 17 sampel yang telah ditentukan menggunakan kaedah HPLC. Secara keseluruhan, kandungan charantin dalam peria adalah antara julat 21.7 – 121.4 μg/g berat kering. Julat kandungan charantin bagi lapan sampel induk peria ialah 41.6 – 107.1 μg/g. Sampel induk 11 mempunyai kandungan charantin tertinggi berbanding dengan induk peria lain dengan nilai 107.1 ± 0.1 μg/g DW diikuti dengan sampel 167 dan 94 dengan 78.7 ± 9.17 μg/g dan 73.9 ± 17.0 μg/g. Sampel induk 13 pula menunjukkan kandungan charantin terendah dengan 41.6 ± 3.7 μg/g. Manakala, sampel hibrid 167 × 93 menunjukkan kandungan charantin paling tinggi (p <0.05) berbanding dengan lapan sampel hibrid yang lain dengan nilai sebanyak 121.4 ± 24.8 μg/g DW. Hibrid 11 × 375 mempunyai kandungan charantin terendah dengan 21.7 ± 1.8 μg/g. Berdasarkan analisis yang telah dijalankan, kandungan charantin sampel hibrid peria (206 × 11, 11 × 92 dan 11 × 375) adalah rendah meskipun daripada induk (11) yang mempunyai kandungan charantin yang tertinggi. Perbezaan morfologi seperti saiz, bentuk hibrid dan warna hasil kacukan antara induk-induk dapat memberi gambaran awal perbezaan hibrid yang terhasil. Justeru, nilai charantin juga berbeza berbanding dengan induk.

Pelbagai kajian telah dijalankan menggunakan HPLC bagi menentukan kandungan charantin dalam peria (*M. charantia*). Nilai kandungan charantin ini adalah berbeza-beza bergantung kepada varieti, kaedah analisis, persekitaran, demografi penanaman dan lain-lain. Sebagai contoh, kajian yang dijalankan di Romania menunjukkan nilai kandungan charantin menggunakan kaedah HPLC, tetapi dengan parameter yang berlainan adalah dalam julat 22 – 1,134 μg/g. *Jadual 3* menunjukkan perbandingan, kaedah penentuan kandungan charantin menggunakan HPLC tetapi dengan parameter yang berbeza.



Rajah 3. Kandungan charantin (µg/g) dalam sampel buah induk dan hibrid peria (M. charantia) menggunakan kaedah HPLC

Jadual 3. Perbezaan kandungan charantin peria menggunakan HPLC dengan parameter yang berlainan

Sampel	Parameter HPLC*	Kandungan charantin (ug/g) DW *
Romania	Sistem: Shimadzu SPD-M20A Fasa cecair: A: Diklorometana, B: Asetonitril Isi padu Analisis: 30 µl Suhu turus: 45 °C Masa: 16 minit Turus: Kinetex 5 µm C-18 100A 150*4,60 mm UV: 180 – 800 nm	22 – 1134
Korea	Sistem: NS-4000; Futecs Co., Daejeon, Korea Fasa cecair: A: Air, B: Metanol Isipadu analisis: 20 µl UV: 204 nm Turus: Optimapak (4.6 mm × 250 mm, 5 µm, 100)	29.8 – 711.6
Indonesia	Sistem: Agilent 1290 Infinity LC with ISET Fasa cecair: A: Air, B: Asetonitril Isipadu analisis: 30 µl Suhu turus: 40 °C Masa: 20 minit Turus: ZORBAX SB-C18 column (5 µm particle, 4.6 x 250 mm ID) UV (DAD) : 205 nm	3.79 – 4.39
Malaysia	Sistem: Shidmadzu, CBM-20A Fasa cecair: A: Air, B: Metanol Isipadu analisis: 200 µl Turus: C18 Waters symmetry column (5 um x 3.9 x 150 mm) UV: 204 nm	204.6

*Data perbandingan adalah berdasarkan penyelidikan terdahulu

Parameter HPLC yang berbeza akan memberikan nilai kandungan charantin yang berlainan. Kaedah yang dibangunkan dalam kajian ini adalah lebih baik kerana isi padu sampel yang diperlukan untuk analisis adalah jauh lebih sedikit (2.0 μl) berbanding dengan penyelidikan terdahulu (20 – 200 μl) seperti yang diterangkan dalam *Jadual 3*. Ia sekali gus dapat mengurangkan kebergantungan terhadap sampel yang banyak semasa proses pengekstrakan. Ini juga bergantung kepada peningkatan sensitiviti alat HPLC yang digunakan dan kaedah pemisahan yang telah dibangunkan.

Kesimpulan

Kaedah penentuan kandungan charantin menggunakan HPLC yang dibangunkan merupakan satu cara yang efisien kerana dapat menjimatkan masa, menggunakan sampel yang sedikit dan ketepatan analisis yang tinggi. Analisis daripada 17 sampel peria (induk dan hibrid) menunjukkan kandungan charantin adalah dalam julat 21.7 – 121.4 μg/g berat kering. Sampel induk 11 mempunyai kandungan charantin tertinggi dengan 107.1 ± 0.1 μg/g. Namun begitu, hibrid yang terhasil daripada induk 11 iaitu 206 × 11, 11 × 92 dan 11 × 375 tidak menunjukkan kandungan charantin yang tidak setanding induk (21.7 – 53.4 μg/g). Kaedah yang dibangunkan ini, diharapkan dapat membantu para penyelidik dan pembaikbaka untuk menentukan kandungan sebatian antidiabetik charantin dalam peria untuk kajian akan datang. Ia juga dapat membantu penyelidik dalam mendokumentasikan hasil penemuan tersebut kerana kaedah yang digunakan adalah tepat walaupun menggunakan isi padu ekstrak sampel yang sedikit.

Bibliografi

Anon. (2021). Peria. Dalam: *Kompendium Sayuran Tradisional*. (Umikalsum, M.B. dan Mohd Zulkhairi, A., ed.), m.s. 30 – 31. Serdang: MARDI

Desai, S.S. (2014). Development and validation of HPLC method for charantin from *Momordica charantia* Linn, ICH guideline, 70 – 98

Desai, S. dan Tatke, P. (2015). Charantin: An important lead compound from *Momordica charantia* for the treatment of diabetes, *J. Pharmacogn. Phytochem* 163 – 166

Joseph, B. dan Jini, D. (2013). Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pac. J. Trop*. 3(2): 93 – 102

Kim, Y.K., Park, W.T., Uddin, M.R., Kim, Y.B., Bae, H., Kim, H.H., Park, K.W. dan Park, S.U. (2014). Variation of charantin content in different bitter melon cultivars,. *Asian J. Chem*. 26: 309 – 310

Laczkó Zöld, E., Horváth, A., Bacsadi, B. dan Csupor, D. (2019). Development And Validation of A HPLC-UV Method for the Quantification of Charantin In *Momordica charantia* Products. m.s. 24 – 25

Nagappan, K., Anoop, K., Kowmudi, G. dan Sailaja, M. (2018). Charantin: A neglected antidiabetic compound from *Momordica charantia* L. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 51(07): 35 – 40

Pitipanapong, J., Chitprasert, S., Goto, M., Jiratchariyakul, W., Sasaki, M. dan Shotipruk, A. (2007). New approach for extraction of charantin from *Momordica charantia* with pressurized liquid extraction *Sep. Purif. Technol*. 52: 416 – 422

Shian Tan, E., Abdullah, A. dan Kassim, N.K. (2015). Extraction of steroidal glycoside from small-typed bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(3): 870 – 878

Sung Goo, K., Ashari, S., Basuki, N. dan Sugiharto, A.N. (2016). The Bitter Gourd *Momordica charantia* L.: Morphological aspects, charantin and vitamin C contents. IOSR *Journal of Agriculture and Veterinary Science* 09(10): 76 – 81

Ringkasan

Charantin merupakan campuran dua sebatian kimia yang utama terdapat dalam peria (*Momordica charantia*). Kajian terdahulu menunjukkan charantin mempunyai sifat hipoglisemik sekali gus berpotensi untuk digunakan sebagai usaha pemulihan oleh pengidap penyakit diabetes. Pengekstrakan kandungan sebatian charantin daripada 17 sampel peria (lapan induk dan sembilan hibrid) telah dijalankan dan kaedah penentuan kandungan charantin telah dibangunkan menggunakan kaedah pemisahan kromatografi (HPLC). Parameter analisis telah ditentusahkan berdasarkan prosedur rujukan sebelum ini dengan sedikit pengubahsuaian. Meskipun kaedah ini telah lama digunakan dalam penentuan kandungan charantin, namun pengubahsuaian yang dijalankan lebih menjimatkan masa, amaun sampel untuk dianalisis yang sedikit sekali gus mengurangkan penyediaan sampel yang banyak. Parameter yang dibangunkan ini diharapkan dapat membantu para penyelidik dalam menentukan sebatian charantin tersebut pada masa akan datang.

Summary

Charantin is a mixture of two compounds that can be found in the bitter gourd (*Momordica charantia*). Previous study showed its hipoglycemic properties and hence potential for diabetic patient as alternative treatment. Extraction of charantin from 17 samples (eight parents and nine hybrids) was carried out and quantification of charantin was developed using chromatographic technique (HPLC). Although this method has been used widely, but the modification made from this study has shorten the analysis time, the less amount of samples to be analyzed and hence less raw materials needed for the extraction. These developed parameters are expected to assist researchers in determining such compound in the future.

Pengarang
Mohd Zulkhairi Azid
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor
E-mel: zulkhairi@mardi.gov.my

Razali Mirad dan Mohd Shukri Mat Ali @ Ibrahim (Dr.)
Siti Aisyah Mohd Noor, Nur Daliana Yusof dan Rosali Hussin
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor

Nur Syafini Ghazali, Mohd Zamri Kamaruddin dan Nur Fatin Mohd Said
Pusat Penyelidikan Hortikultur
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor

Aimi Athirah Ahmad
Pusat Penyelidikan Sosio Ekonomi, Risikan Pasaran dan Agribisnes
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor