

Kaedah mudah penentuan jumlah kandungan flavanoid di dalam produk minuman

(Simple method for determination of total flavonoid content in beverage products)

Nurul Nabilah Mohd Fiteri, Hasnisa Hashim, Mohamed Nazim Anvarali, Saiful Bahri Saari dan Hadijah Hassan

Pengenalan

Flavonoid merupakan sebatian antioksidan yang penting kepada kesihatan tubuh badan manusia. Flavonoid dikelaskan sebagai metabolit sekunder polifenolik dalam tumbuhan yang biasanya terdapat dalam diet harian manusia. Sebatian flavonoid banyak ditemui dalam makanan dan minuman berasaskan tumbuhan seperti buah-buahan, sayur-sayuran, teh, koko dan jus. Buah-buahan yang segar mempunyai kandungan flavonoid yang tinggi berbanding dengan buah yang tidak segar. Makanan yang kaya dengan flavonoid sebolehnya diambil dalam bentuk segar, ini kerana proses pemanasan makanan dalam tempoh yang lama boleh menyebabkan kandungan flavonoid berkurangan atau berlakunya degradasi.

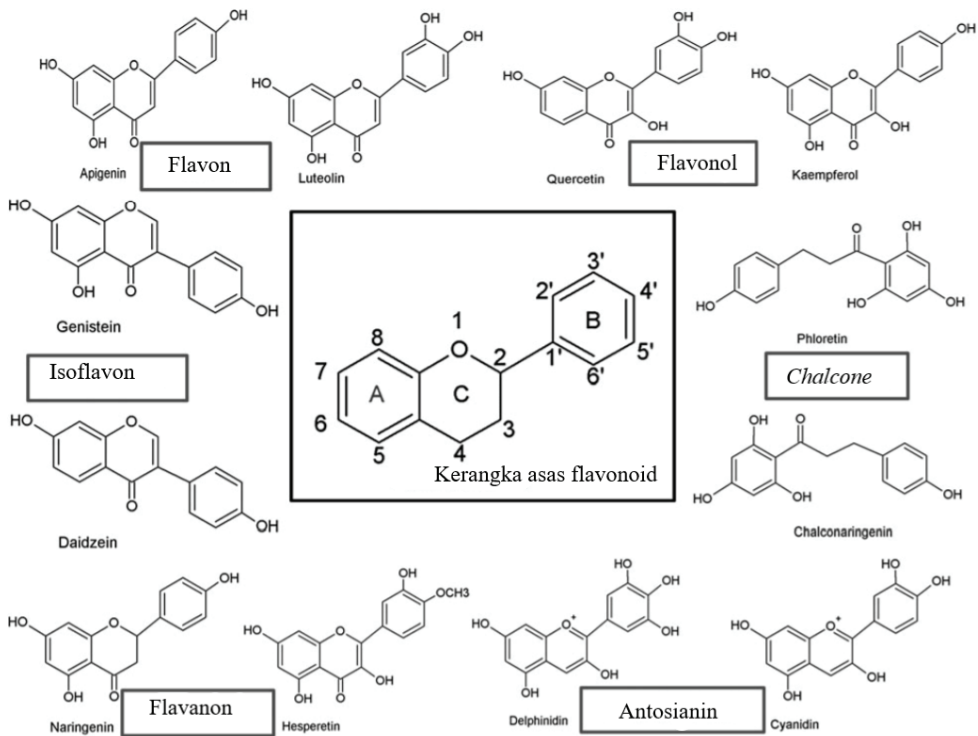
Flavonoid bertindak sebagai antioksidan yang dapat membantu menjaga ketahanan tubuh badan daripada diserang radikal bebas. Radikal bebas ini boleh menjadi penyebab yang membolehkan terjadinya kerosakan pada sel-sel yang sihat dan juga DNA (*deoxyribonucleic acid* - sebatian kimia utama kromosom yang membentuk bahan genetik) yang mengakibatkan terjadinya pelbagai penyakit kronik pada tubuh badan kita sekiranya dibiarkan. Sebatian flavonoid memiliki banyak manfaat pada tubuh badan kerana mempunyai sifat antioksidan, antiradang, antimutagenik dan antikanser serta mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Banyak kajian yang telah dijalankan menunjukkan pengambilan sebatian flavonoid dapat mencegah terjadinya beberapa risiko penyakit seperti diabetes, serangan jantung, kanser, alzheimer dan *atherosclerosis* (penyumbatan lemak pada arteri yang menyebabkan penyekatan aliran darah).

Terdapat kira-kira 6,000 sebatian flavonoid telah dikenal pasti yang menyumbang kepada warna pigmen buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan perubatan. Antaranya sebatian flavonoid yang berwarna kuning terdiri daripada kelas pigmen yang mempunyai persamaan struktur kimia dengan antosianin. Sebatian flavonoid termasuklah pigmen merah, ungu atau biru antosianin, putih atau kuning pucat seperti rutin, kuersetin dan kaempferol. Antosianin juga menyumbang kepada warna buah yang matang. Flavonoid mempunyai beberapa subkumpulan yang berbeza bergantung kepada kedudukan karbon cincin dalam struktur kimianya. *Gambar rajah 1* menunjukkan struktur asas kimia sebatian flavonoid yang biasa hadir dalam matriks makanan yang terdiri daripada flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, antosianin

dan *chalcone*. Perbezaan struktur kimia antara setiap sebatian subkumpulan ini adalah berdasarkan kedudukan hidroksil dan karbon cincin.

Gugusan hidroksil selalunya ditemui pada posisi 5 dan 7 daripada karbon cincin A. Kerangka dasar terdiri daripada 15 atom karbon yang membentuk susunan C6-C3-C6 (C ialah karbon) yang terdiri di atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B dan cincin tengah merupakan heterosiklik yang mengandungi oksigen dan bentuk teroksidasi cincin yang menjadikan dasar pembahagian flavonoid kepada sub-sub kumpulannya. Sebatian flavonoid di mana cincin B dihubungkan pada kedudukan 3 cincin C dipanggil isoflavon. Sebatian flavonoid di mana cincin B dihubungkan pada kedudukan 4 cincin C disebut neoflavonoid, sementara cincin B dihubungkan pada kedudukan 2 dapat dibahagikan lagi kepada beberapa subkumpulan (bergantung kepada struktur cincin C) iaitu flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, antosianin dan *chalcone* (*Gambar rajah 1*).

Kehadiran flavonoid dalam makanan boleh ditentukan menggunakan pelbagai teknik, antaranya kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC), kromatografi cecair spektrometer jisim (LCMS) dan spektrofotometri. Kaedah penentuan jumlah kandungan flavonoid (TFC) dalam matriks makanan



Gambar rajah 1. Struktur kimia flavonoid dan sub-sub kumpulan flavonoid yang biasa ditemui dalam matriks makanan (Sumber: Panche et al. 2016)

menggunakan teknik HPLC dan LCMS agak rumit dan melibatkan penggunaan pelarut organik berbahaya. Namun, teknik ini lebih jitu dan dapat ditentukan secara kualitatif dan kuantitatif setiap subkumpulan flavonoid. Manakala teknik spektrofotometri lebih mudah, di mana reagen yang diperlukan mudah diperolehi, pengaruh faktor persekitaran yang rendah dan digunakan secara meluas dalam analisis kimia makanan. Teknik ini sesuai bagi tujuan analisis dengan menggunakan jarak gelombang yang tertentu dengan pekali penyerapan yang sepadan. Dalam kajian ini, jumlah kandungan flavonoid (TFC) ditentukan menggunakan teknik spektrofotometri UV di dalam produk minuman berasaskan buah-buahan tempatan yang telah dibangunkan di Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI.

Kaedah penentuan jumlah kandungan flavonoid (TFC) menggunakan teknik spektrofotometri

Sebatian flavonoid di dalam makanan boleh ditentukan menggunakan teknik spektrofotometri UV. Teknik spektrofotometri ini digunakan untuk menganggar jumlah kandungan flavonoid (TFC) dalam makanan secara kuantitatif dan kualitatif dengan mudah dan pantas. Berdasarkan kajian pengoptimuman penentuan TFC menggunakan kaedah kolorimetrik aluminium klorida yang telah dijalankan oleh penyelidik terdahulu, penyerapan flavonoid ialah 300 – 500 nm bergantung kepada jumlah/kepekatan larutan aluminium klorida (AlCl_3) yang digunakan. Kajian ini menunjukkan semakin tinggi kepekatan atau amaun aluminium klorida yang digunakan, nilai serapan semakin besar. Terdapat pelbagai amaun dan kepekatan aluminium klorida yang digunakan pada pelbagai jarak gelombang. Bagi kajian yang menggunakan rutin sebagai sebatian piawai, ada kaedah yang menggunakan 0.3 mL AlCl_3 (10%) pada 510 nm. Sementara itu, kajian yang menggunakan *catechin* sebagai sebatian piawai, ada kaedah yang menggunakan 0.15 mL AlCl_3 (10%) pada 510 nm dan 0.6 mL AlCl_3 (10%) pada 510 nm. Manakala bagi kajian yang menggunakan kuersetin sebagai sebatian piawai, ada kaedah yang menggunakan 0.1 mL AlCl_3 (1%) pada 415 nm, 0.6 mL AlCl_3 (2%) pada 420 nm, 1.5 mL AlCl_3 (2%) pada 367 nm, 1.5 mL AlCl_3 (2%) pada 370 nm, 0.1 mL AlCl_3 (10%) pada 415 nm dan 1.6 mL AlCl_3 (2%) pada 430 nm. Namun, menurut beberapa kajian berkaitan validasi dan pengoptimuman kaedah spektroskopi, jarak gelombang maksimum (λ_{max}) bagi kuersetin ialah 361.8 – 372 nm. Maklumat penentuan jumlah kandungan flavonoid menggunakan amaun larutan AlCl_3 dan jarak gelombang berbeza ini diringkaskan seperti dalam *Jadual 1*. Dalam kajian ini, kaedah kolorimetrik aluminium klorida menggunakan kuersetin sebagai sebatian piawai telah dijalankan.

Jadual 1. Ringkasan amaun larutan ammonium klorida dan jarak gelombang berbeza bagi penentuan jumlah kandungan flavonoid

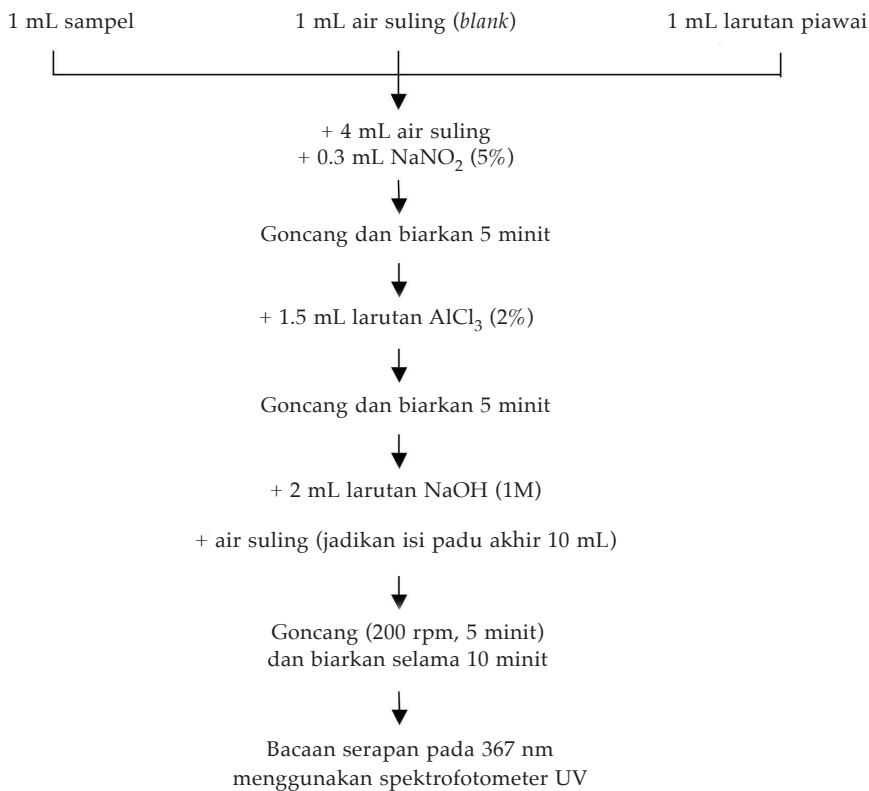
Sebatian piawai	Amaun dan kepekatan larutan ammonium klorida	Jarak gelombang (nm)
Rutin	0.3 mL 10%	510
<i>Catechin</i>	0.15 mL 10%	510
<i>Catechin</i>	0.6 mL 10%	510
Kuersetin	0.6 mL 1%	415
Kuersetin	0.6 mL 2%	420
Kuersetin	1.5 mL 2%	367
Kuersetin	1.5 mL 2%	370
Kuersetin	0.1 mL 10%	415
Kuersetin	1.6 mL 2%	430

Penyediaan larutan piawai kuersetin

Larutan piawai primer/stok piawai kuersetin berkepekatan 2 mg/72 mL disediakan. Larutan piawai sekunder berkepekatan 500 µg/mL disediakan di mana 1.0 mL larutan piawai primer dilarutkan bersama 3.0 mL metanol. Seterusnya, beberapa siri kepekatan 400, 300, 200, 100, 50 µg/mL (*working standard solution*) disediakan daripada larutan piawai 500 µg/mL ini untuk menghasilkan keluk penentukuran kuersetin.

Penentuan jumlah kandungan flavonoid

Bagi sampel minuman yang perlu dijalankan analisis, sampel akan dihomogenkan terlebih dahulu. Kemudian, 1 mL sampel minuman dimasukkan ke dalam kelalang isi padu 10 mL yang telah diisi dengan 4 mL air suling dan 0.3 mL larutan natrium nitrit (5% NaNO₂) (tiga replikasi; n = 3). Campuran ini digoncang dan dibiarkan selama 5 minit. Kemudian, 1.5 mL larutan ammonium klorida (AlCl₃; 2% dalam pelarut metanol) ditambah ke dalam campuran tersebut, digoncang dan dibiarkan selama 5 minit. Akhir sekali, 2 mL larutan natrium hidroksida (NaOH 1M) ditambah ke dalam campuran tersebut dan seterusnya, air suling ditambah bagi menjadikan isi padu akhir 10 mL. Campuran ini digoncang menggunakan penggoncang orbit (*orbital shaker*) pada kelajuan 200 rpm selama 5 minit. Campuran disimpan/dibiarkan di tempat gelap selama 10 minit dan serapan dibaca pada jarak gelombang 367 nm menggunakan instrumen UV - *Vis Double Beam PC Scanning Spektrophotometer* (Model UVD-2950). Kuersetin digunakan sebagai piawai untuk keluk penentukuran. Jumlah kandungan flavonoid ditentukan menggunakan persamaan linear berdasarkan keluk penentukuran. Jumlah kandungan flavonoid dinyatakan sebagai mg *quercetin equivalent* / (mg QE/mL) sampel. Ringkasan langkah penentuan jumlah kandungan flavonoid ditunjukkan seperti dalam *Carta alir 1*.

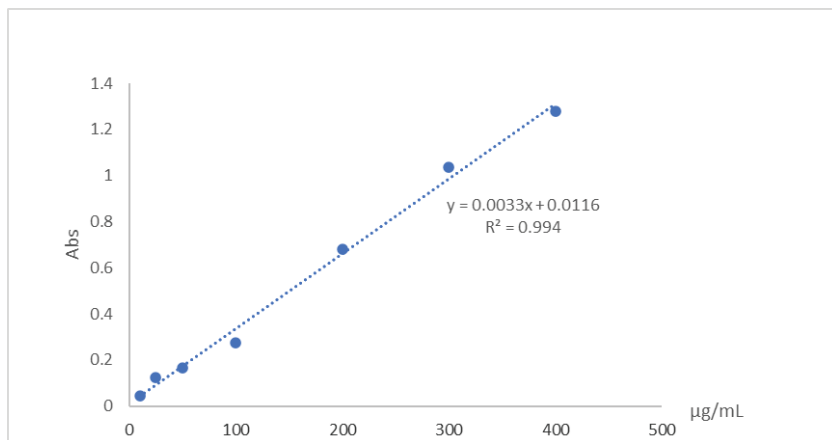


Carta alir 1. Langkah penentuan jumlah kandungan flavonoid (TFC) dalam sampel minuman

Jumlah kandungan flavonoid dalam produk minuman

Analisis penentuan TFC dijalankan terhadap puri dan sampel minuman berasaskan buah-buahan yang dibangunkan di Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan MARDI iaitu minuman berasaskan jus buah tembikai dan kuini. Analisis ini dijalankan bagi mendapatkan data sokongan kajian aktiviti antioksidan dalam produk minuman bernutrisi tersebut. Pengiraan kandungan flavonoid ditentukan menggunakan persamaan linear berdasarkan keluk penentukuran sebatian piawai kuersetin seperti dalam *Rajah 1*. Hasil analisis TFC adalah seperti dalam *Jadual 2* di mana puri tembikai dan minuman berasaskan tembikai masing-masing mengandungi flavonoid sebanyak 0.05 – 0.22 mg QE/mL dan 0.12 – 0.13 mg QE/mL. Puri tembikai Melaka mengandungi flavonoid lebih tinggi berbanding dengan puri tembikai Besut. Kandungan flavonoid dalam sumber tumbuhan dipengaruhi oleh kawasan penanaman tumbuhan (suhu/cuaca, intensiti cahaya dan pH tanah). Suhu persekitaran yang tinggi akan memberikan tekanan kepada tumbuhan untuk menghasilkan metabolit sekunder bagi melawan radikal bebas yang ada di persekitaran yang boleh merosakkan tanaman. Bagi sampel jus kuini pula, kandungan flavonoid bagi beberapa formulasi jus kuini ialah

0.21 – 0.34 mg QE/mL. Minuman jus kuini yang dibangunkan ini ialah minuman jus berciri prebiotik. Beberapa formulasi dibangunkan menggunakan empat bahan yang mempunyai ciri prebiotik iaitu *fructooligosaccharides* (FOS), serbuk kulit kuini, serbuk rumput laut dan serbuk pisang. *Jadual 2* menunjukkan jus kuini 2 mengandungi flavonoid tertinggi diikuti dengan jus kuini 1, jus kuini kawalan, jus kuini 3 dan jus kuini 4. Jus kuini 2 mengandungi bahan tambahan yang tinggi flavonoid iaitu serbuk kulit kuini yang menyumbang kepada peningkatan kandungan flavonoid berbanding dengan jus kuini kawalan. Manakala jus kuini 1, 3 dan 4 ditambah dengan *fructooligosaccharides*, serbuk rumput laut dan serbuk pisang yang tidak menunjukkan perbezaan yang ketara terhadap kandungan flavonoid berbanding



Rajah 1. Keluk penentukuran kuersetin piawai

Jadual 2. Jumlah kandungan flavonoid dalam puri buah dan sampel minuman berasaskan jus buah-buahan yang dibangunkan di Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan MARDI

Sampel	Jumlah kandungan flavonoid (mg quercetin equivalent/mL)
Jus kuini kawalan	0.26 ± 0.01
Jus kuini 1 (ditambah <i>fructooligosaccharides</i>)	0.27 ± 0.02
Jus kuini 2 (ditambah serbuk kulit kuini)	0.34 ± 0.02
Jus kuini 3 (ditambah serbuk rumput laut)	0.21 ± 0.01
Jus kuini 4 (ditambah serbuk pisang)	0.21 ± 0.01
Puri tembikai Besut	0.05 ± 0.01
Puri tembikai Melaka	0.22 ± 0.01
Minuman berasaskan tembikai (Formulasi 1)	0.13 ± 0.01
Minuman berasaskan tembikai (Formulasi 2)	0.12 ± 0.02

dengan jus kuini kawalan. Minuman jus kuini dan minuman berasaskan tembikai yang dianalisis ditunjukkan seperti dalam *Gambar 1* dan *Gambar 2*.



Gambar 1. Minuman jus kuini



Gambar 2. Minuman berasaskan tembikai

Kesimpulan

Penentuan jumlah kandungan flavonoid dalam matriks makanan dan minuman boleh dilaksanakan dengan mudah dan pantas menggunakan teknik spektrofotometer pada jarak gelombang tertentu, bergantung kepada kepekatan aluminium klorida dan jenis sebatian piawai yang digunakan. Bagi sampel minuman, analisis dan pengiraan TFC adalah secara terus menggunakan keluk penentuan sebatian piawai yang diplotkan. Bagi sampel pepejal, pengekstrakan sampel perlu dijalankan terlebih dahulu sebelum analisis TFC dilaksanakan. Kaedah ujian ini boleh diguna pakai untuk analisis buah-buahan tempatan yang lain bagi mengumpul data-data jumlah kandungan flavonoid.

Penghargaan

Sekalung penghargaan buat kumpulan penyelidik dan ahli-ahli kerja yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam kajian ini terutamanya En. Nik Mohd Faiz Che Mohamad Nor dan Pn. Kasmah Mohamad. Projek ini disokong oleh dana projek "Kajian pembangunan bio-ingredient dan produk fungsian bernilai tinggi bagi buah-buahan premium terpilih"- PRF 405 dan "Penghasilan produk berasaskan buah-buahan baharu serta penilaian kualiti, keselamatan dan kefungsiannya"- PRF 407.

Bibliografi

- Ahlem, R., Souad, I.B., Béatrice, B., Valérie, M.L., Fathi, M., Evelyne, O., Jamila, K.C. dan Malika, T.A. (2014). Total phenolic, total flavonoid, tannin content and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5 (01): 52 – 57
- Chaudhari, S.P., Bangar, J.V., Akuskar, G.K. dan Ratnaparkhi, M.P. (2014). Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of rutin and quercetin in niosome formulation. *Der Pharmacia Lettre* 6(3): 271 – 276
- Erma Yunita, Deni Yulianto, Siti Fatimah dan Tirsia Firanita (2020). Validation of UV-Vis spectrophotometric method of quercetin in ethanol extract of tamarind leaf. *Journal of Fundamental and Applied Pharmaceutical Science* 1(1): 11 – 18
- Olajire, A.A. dan Azeez, L. (2011). Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. *African Journal of Food Science and Technology* Vol. 2(2): 22 – 29
- Panche, A.N., Diwan, A.D. dan Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 5: 1 – 15
- Wei, Y., Wu, X., Yang, J. dan Zhang, K. (2019). Determination of total flavonoids in watermelon by spectrophotometry. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 612: 1 – 5
- Yu He, Zhimin He, Feng He dan Haitong Wan (2012). Determination of quercetin, plumbagin and total flavonoids in *Drosera peltata* Smith var. *glabrata* Y.Z. Ruan. *Pharmacognosy Magazine* 8(32): 263 – 267

Ringkasan

Teknik spektrofotometri merupakan satu teknik yang mudah, pantas dan tepat bagi penentuan jumlah kandungan flavonoid dalam matriks makanan/minuman. Kaedah ini sesuai digunakan bagi tujuan penyaringan penentuan jumlah kandungan flavonoid dalam kuantiti sampel yang banyak. Dalam kajian ini, penentuan flavonoid di dalam puri buah dan juga sampel produk minuman berasaskan buah-buahan dilaksanakan dengan menggunakan *UV-Vis Double Beam PC Scanning Spektrophotometer* (Model UVD-2950) pada jarak gelombang 367 nm di mana kuersetin sebagai sebatian piawai. Jumlah kandungan flavonoid dikira menggunakan persamaan linear berdasarkan keluk penentuan sebatian piawai kuersetin dan dinyatakan sebagai mg quercetin equivalent/mL (mg QE/mL) sampel.

Summary

Spectrophotometry technique is a simple, fast and accurate technique for the determination of the total flavonoid content in the food/beverage matrix. This method is suitable for screening the total flavonoid content of a large number of samples. In this study, the determination of flavonoids in fruit puree and fruit-based beverage products were performed using *UV-Vis Double Beam PC Scanning Spectrophotometer* (Model UVD-2950) at 367 nm and quercetin as standard. The total flavonoid content was calculated using a linear equation based on the quercetin calibration curve and expressed as mg quercetin equivalent/mL (mg QE/mL) of the sample.

Pengarang

Nurul Nabilah Mohd Fiteri

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

E-mel: nabilah@mardi.gov.my

Hasnisa Hashim, Mohamed Nazim Anvarali, Saiful Bahri Saari
dan Hadijah Hassan (Dr.)

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