

Teknik analisis asid fenolik daripada sayur-sayuran (Analysis technique of phenolic acid in vegetables)

Mohd Nazrul Hisham Daud, Mohd Lip Jabit, Nur Syafini Ghazali dan Joanna Cho Lee Ying

Pengenalan

Asid fenolik merupakan sebatian kimia sekunder yang wujud secara semula jadi yang boleh ditemui secara meluas dalam sayur-sayuran di samping buah-buahan dan metabolisme manusia.

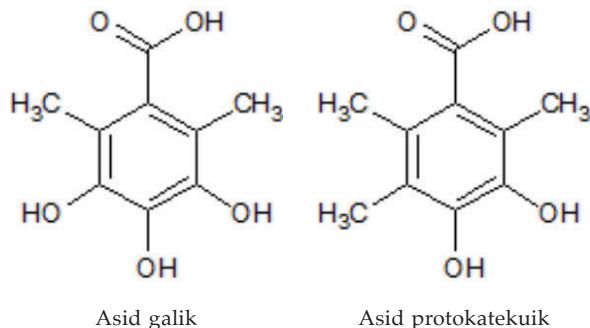
Banyak kajian menunjukkan sayur-sayuran menyumbang kepada aktiviti biologi ataupun khasiat seperti antioksidan, antiinflamasi, antidiabetes, antimikrobial, antikanser dan banyak lagi. Oleh yang demikian, tidak hairan mengapa kerajaan Malaysia menyediakan peruntukan bawah Rancangan Fizikal Negara ke-3 (RFN3) bermula tahun 2020 – 2040 bagi menggalakkan rakyat mananam sayuran di kawasan komuniti. Antara sayur-sayuran yang menjadi tumpuan bagi tujuan ini adalah daripada jenis yang mudah ditanam seperti terung, sawi, petola, bayam, bendi, sawi pendek dan banyak lagi yang sering dan mudah didapati di pasaran (Gambar 1).



Gambar 1. Antara sayuran popular yang sering ditanam dan mudah didapati di pasaran

Asid fenolik

Hasil kajian saintifik yang berterusan mendapati sebatian kimia terbitan asid fenolik memainkan peranan yang besar terhadap aktiviti biologi dan khasiat sayur-sayuran. Dari segi struktur, asid fenolik tergolong dalam kumpulan fenol susulan daripada struktur kimianya yang terdiri daripada satu kumpulan gelang aromatik ataupun dikenali juga sebagai benzene, hidrogen (H), karboksil ($C=O$) dan sekurang-kurangnya satu kumpulan hidroksil ($O-H$). Bagi sayur-sayuran, jenis sebatian kimia asid fenolik yang biasa ditemui ialah asid galik dan asid protokatekuik (*Gambar 2*). Kedua-dua sebatian kimia ini mempunyai struktur yang hampir sama dan dibezakan oleh bilangan hidroksil (OH). Asid galik mempunyai lebihan satu kumpulan hidroksil (OH) berbanding dengan asid protokatekuik. Kehadiran kumpulan hidroksil ini sering dikaitkan dengan kebolehan antioksidan. Semakin banyak bilangan kumpulan hidroksil, semakin kuat kesan antioksidannya.



Gambar 2. Struktur kimia asid fenolik utama yang sering dijumpai dalam sayur-sayuran

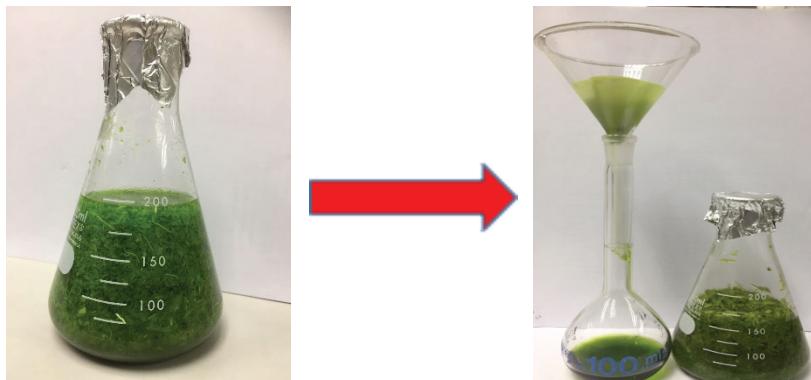
Analisis asid fenolik

Analisis sebatian kimia asid fenolik daripada sampel sayuran melibatkan beberapa langkah utama iaitu penyediaan dan pengekstrakan sampel, penyediaan sampel analisis, penyediaan larutan piawai dan penentuan sebatian asid fenolik.

Penyediaan dan pengekstrakan sampel

Sampel sayuran segar dipotong halus dan seterusnya dikisar menggunakan pengisar makanan. Ini bertujuan meningkatkan jumlah luas permukaan sampel bagi memastikan keberkesanan pengekstrakan asid fenolik daripada sampel sayuran. Pengekstrakan sebatian kimia asid fenolik yang terdiri daripada asid galik dan asid protokatekuik daripada sayur-sayuran melibatkan proses rendaman di dalam pelarut organik. Bagi tujuan ini, pelarut organik metanol digunakan memandangkan pelarut ini bersifat polar ataupun berkutub bersamaan dengan struktur kimia asid fenolik. Sebanyak 100 g sampel sayur yang telah dikisar halus direndam dalam 200 mL pelarut metanol selama 24 jam. Rendaman ini kemudiannya dituras menggunakan

kertas turas Whatman no. 1 (*Gambar 3*). Ekstrak sayuran ini seterusnya dituras ke dalam *vial* menggunakan penapis PTFE (Polytetrafluoroethylene) bersaiz $0.45\text{ }\mu\text{m}$ bagi menyingkirkan partikel asing yang boleh menjadikan keputusan akhir analisis.



Gambar 3. Pengekstrakan sebatian kimia asid fenolik

Penyediaan sampel analisis

Ekstrak sayuran dalam bentuk larutan yang telah melalui proses pengekstrakan seterusnya dibersihkan daripada partikul tidak larut menggunakan penapis piagari (Polytetrafluoroethylene (PTFE) bersaiz $0.45\text{ }\mu\text{m}$ (*Gambar 4*). Ini perlu dilakukan bagi mengelakkan partikul tidak larut memasuki sistem peralatan analisis yang boleh menjadikan keputusan akhir analisis.

Penyediaan larutan piawai asid fenolik

Larutan piawai asid fenolik disediakan bagi menentukan sebatian asid fenolik secara kuantitatif dalam sayur-sayuran menggunakan teknik kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC). Penyediaan larutan piawai kumpulan sebatian kimia asid fenolik dilakukan bagi membolehkan kandungannya diukur dalam sampel sayuran. Kesemua sebatian kimia piawai ini diperoleh daripada pembekal sebatian kimia berakreditasi (*Gambar 5*). Sebanyak 5 mg asid galik piawai dan asid protokatekuik piawai masing-masing dilarutkan ke dalam 1 mL metanol bagi menghasilkan larutan stok piawai berkepekatan 5,000 ppm. Seterusnya beberapa siri kepekatan larutan piawai campuran asid fenolik disediakan antara 30 – 500 ppm bagi membangunkan lenguk kalibrasi piawai asid fenolik.



Gambar 4. Ekstrak ditapis menggunakan penapis piagari (PTFE)



Asid galik

Asid protokatekuik

Gambar 5. Sebatian kimia asid fenolik piawai

Penentuan sebatian asid fenolik

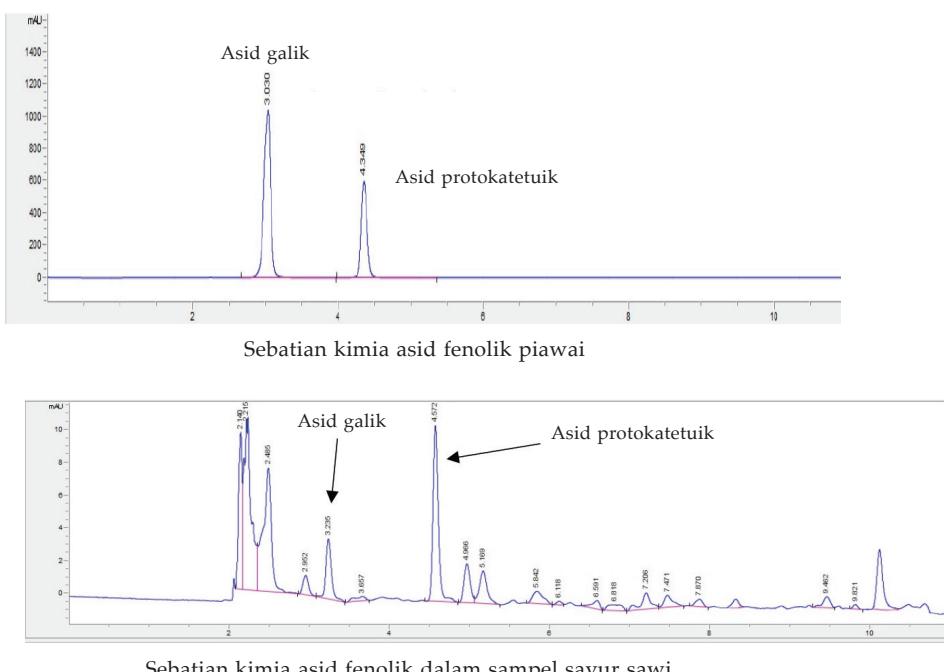
Analisis verifikasi kehadiran dan penentuan secara kuantifikasi kesemua sebatian kimia asid fenolik dilakukan dengan menggunakan peralatan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Gambar 6). Peralatan HPLC jenis Agilent 1,200 series dilengkapi dengan *auto sampler* (G1367D), pam binari 1260 (G1312B), simpanan turus pemisah (G1316B) dan pengesan *photo diode array* jenis 1260. Pemisahan sebatian kimia asid fenolik dalam peralatan ini menggunakan turus pemisah C-18 (*Sciences - Inertsustain Column C-18*) bersaiz 250 mm x 4.6 mm, i.d., 5 μm dengan suhu turus pemisah 25 °C. Pelarut bagi tujuan pemisahan yang digunakan ialah air ternyahion (H_2O), metanol (MeOH), asetonitril (ACN) dan asid formik secara kombinasi. Parameter bagi analisis sebatian asid fenolik menggunakan teknik HPLC adalah seperti berikut:



Gambar 6. Peralatan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC)

Turus pemisah	: <i>Sciences - Inertsustain Column C-18</i> (250 mm x 4.6 mm, i.d., 5 μm)
Isi padu suntikan	: 5 μl
Fasa bergerak	: 95:5 kombinasi pelarut A (H_2O : MeOH (8:2) 0.1% asid formik : B (ACN 0.1% asid formik) secara gradien daripada 5% pelarut B pada 0 minit, 55% pelarut B pada 30 minit kepada 100% pelarut B pada masa 40 minit
Kadar aliran	: 0.8 mL/minit
Pengesanan	: UV 280 nm
Suhu turus pemisah	: 25 °C

Berdasarkan kromatogram HPLC (*Rajah 1*), asid galik piawai boleh dikesan pada julat masa 2.5 – 3.5 minit manakala asid protokatekuik piawai pada minit ke 4.2 – 4.6 minit. Dalam sampel sayuran seperti sawi, kedua-dua sebatian kimia ini juga dapat dikesan pada julat masa yang hampir sama dengan sebatian kimia piawai. Asid galik dikesan lebih awal berbanding dengan asid protokatekuik kerana lebih polar ataupun berkutub. Sifat polar ataupun kekutuhan ini dipengaruhi oleh bilangan kumpulan hidroksil yang terdapat pada struktur kimia kedua-dua asid fenolik. Oleh kerana asid galik mempunyai empat kumpulan hidroksil, maka ia lebih polar ataupun berkutub berbanding dengan asid protokatekuik yang cuma mempunyai tiga kumpulan hidroksil.



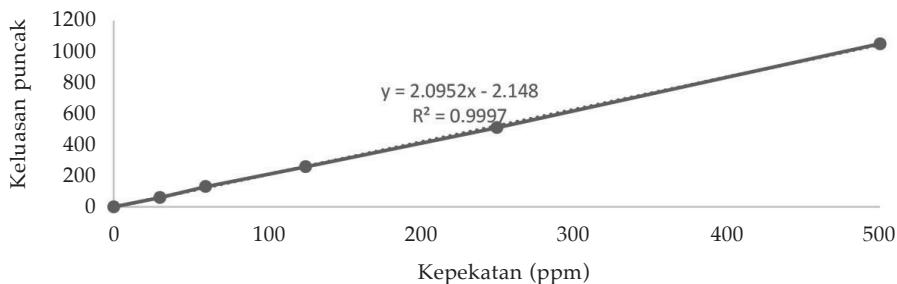
Rajah 1. Kromatogram HPLC bagi pemisahan sebatian asid galik dan asid protokatekuik piawai dan pemisahan asid fenolik dalam sayur sawi

Lengkuk kalibrasi

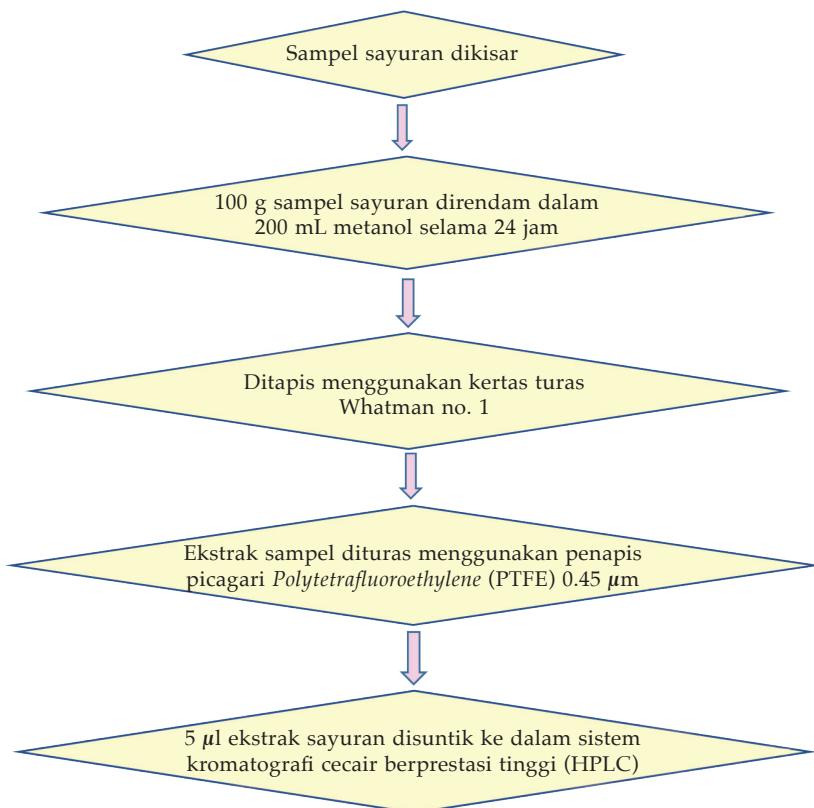
Lengkuk kalibrasi bagi sebatian kimia asid fenolik piawai dibangunkan bagi tujuan kuantifikasi asid fenolik di dalam sampel sayuran (*Rajah 2*). Kepekatan sebatian kimia asid fenolik yang berbeza (500, 250, 125, 60 dan 30 ppm) disuntik dan dianalisis menggunakan teknik HPLC. Nilai keluasan puncak (paksi y) dan kepekatan asid fenolik (paksi x) diplotkan membentuk lengkuk kalibrasi dengan nilai R^2 menghampiri 1.0. Ini penting bagi memastikan ketepatan lengkuk kalibrasi yang diplotkan dan sangat memberi kesan kepada keputusan analisis. Seterusnya,

kandungan asid fenolik dalam sampel sayuran boleh ditentukan secara kuantitatif menggunakan pengiraan berdasarkan lengkuk kalibrasi yang telah dibangunkan. Kesemua nilai kandungan sebatian kimia asid fenolik dalam kajian ini adalah dalam unit bahagian per sejuta (ppm).

Keseluruhan penerangan proses utama analisis sebatian kimia asid fenolik (asid galik dan asid protokatekuik) daripada sampel sayuran diringkaskan seperti dalam *Carta alir 1*.



Rajah 2. Lengkuk kalibrasi asid fenolik piawai



Carta alir 1. Langkah-langkah analisis sebatian kimia asid fenolik dalam sayur-sayuran menggunakan teknik HPLC

Kesimpulan

Analisis asid fenolik daripada sayur-sayuran boleh dilakukan dengan melibatkan empat langkah utama. Langkah ini terdiri daripada penyediaan dan pengekstrakan sampel, penyediaan sampel analisis, penyediaan larutan piawai dan penentuan sebatian asid fenolik menggunakan teknik kromatografi cecair berprestasi tinggi. Kandungan asid fenolik dalam sampel sayur-sayuran ditentukan secara kuantitatif berdasarkan lengkuk kalibrasi piawai asid fenolik. Memandangkan asid fenolik merupakan sebatian kimia bernilai dari segi kesihatan, teknik ini amat berguna untuk penyaringan dan penentuan kandungannya dalam sayur-sayuran bagi tujuan kawalan kualiti.

Bibliografi

- Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N. dan Kim, C.K. (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Report* 10 (2611): 1 – 9
- Farhoosh, R., Johnny, S., Asnaashari, M., Molaahmadibahrasereman, N. dan Sharif, A. Structure-AA relationships of o-hydroxyl, omethoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chemistry* 194: 128 – 134
- Kumara, N. dan Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* 24: 1 – 9
- PLANMalaysia Perancangan Melangkaui Kelaziman (2019).
- PLANINFO#30 Ketua Pengarah PLAN Malaysia
- Wright, J.S., Johnson, E.R. dan DiLabio, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 123: 1173 – 1183

Ringkasan

Asid fenolik merupakan sebatian kimia berfungsi yang mampu meningkatkan pertahanan tubuh manusia dan telah dikenal pasti di dalam sayur-sayuran. Asid galik dan asid protokatekuik merupakan dua jenis asid fenolik yang telah dilaporkan secara meluas wujud di dalam sayur-sayuran. Dalam teknik analisis yang dibangunkan terdapat empat proses utama iaitu penyediaan dan pengekstrakan sampel, penyediaan sampel analisis, penyediaan larutan piawai dan penentuan sebatian asid fenolik. Proses penyediaan sampel melibatkan pemotongan dan pengisaran sayuran bagi tujuan meningkatkan luas permukaan. Setelah itu sampel akan melalui proses rendaman selama 24 jam kedalam pelarut metanol bagi tujuan pengekstrakan sebatian asid fenolik. Ia kemudian ditapis menggunakan kertas turas Whatman no. 1 bagi mendapatkan ekstrak dalam bentuk larutan. Ekstrak ini ditapis sekali lagi menggunakan penapis picagari PTFE (Polytetrafluoroethylene) bersaiz 0.45 μm bagi memisahkan partikal halus yang tidak larut. Sebatian kimia asid galik dan asid protokatekuik piawai dilarutkan ke dalam pelarut metanol dan dicairkan sebanyak lima kali melalui pencairan bersiri. Ekstrak yang telah ditapis dan larutan piawai disuntik ke dalam sistem HPLC secara berasingan. Keluasan isyarat setiap puncak bagi ekstrak dan larutan piawai

yang diperoleh pada kromatogram dibandingkan bagi mendapatkan nilai kandungan asid fenolik terpilih dalam sampel. Teknik yang dibangunkan ini berguna bagi tujuan penyaringan dan penentuan kandungan asid fenolik daripada sayur-sayuran.

Summary

Phenolic acid is one of the functional constituents which could increase the human defence system and is identified in vegetables. Gallic acid and protocatechuic acid which belong to the phenolic acid group have been reported to dominantly exist throughout vegetables. In this study, the analysis technique for these two phenolic acids has been developed which involved four main processes such as sample preparation and extraction, preparation of the sample for analysis, standard solution preparation and determination of phenolic acid constituents using high performance liquid chromatography technique. The sample preparation process involved cutting and grounding of sample to increase the surface area. The sample was further undergone a maceration process for 24 hours in methanol solvent to extract the phenolic constituents. After the period, the macerated sample was filtered with filter paper Whatman no. 1 to obtain extract in solution form. The extract was further filtered using a syringe filter with the size of $0.45\text{ }\mu\text{m}$ to separate the small undissolved particle. The chemical constituents of gallic acid and protocatechuic acid standard were dissolved in methanol solvent and diluted five times through serial dilution. The filtered extract and chemical standard solutions were injected into HPLC system separately. The signal area of every peak for extract and standard solutions obtained from the chromatogram was compared to obtain the value of phenolic acid content in the sample. The developed technique is useful for screening purposes and the determination of phenolic acid content in vegetables.

Pengarang

Mohd Nazrul Hisham Daud (Dr.)

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

Mohd Lip Jabit

Pusat Pembangunan dan Pengurusan Harta, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Nur Syafini Ghazali dan Joanna Cho Lee Ying

Pusat Penyelidikan Hortikultur, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor