

Teknik analisis sebatian kimia eurikumanon dan skopoletin daripada tongkat ali

(Chemical constituents analysis technique of eurycomanone and scopoletin from *tongkat ali*)

Mohd Nazrul Hisham Daud, Mohd Lip Jabit dan Noor Ismawaty Nordin

Pengenalan

Tongkat ali atau nama saintifiknya *Eurycoma longifolia* merupakan tumbuhan herba tradisional yang popular di Malaysia kerana mempunyai pelbagai khasiat. Mengikut amalan tradisi, air rebusannya dipercayai mampu memberi kesan afrodisiak, dapat mengurangkan pening kepala, merawat kurap, bengkak, ketumbuhan, darah tinggi dan kencing manis. Pokok tongkat ali (*Gambar 1*) tumbuh secara semula jadi di dalam hutan dan kini telah diusahakan secara besar-besaran di ladang bagi memenuhi keperluan pasaran semasa. Berdasarkan laporan, bermula 2017 sehingga 2021, empat negeri di Malaysia iaitu Johor, Kelantan, Negeri Sembilan dan Terengganu telah dilaporkan giat menjalankan penanaman tongkat ali secara komersial.



Gambar 1. Tongkat ali

Keseluruhan keluasan bertanam bagi keempat-empat negeri ini adalah sekitar 28 hektar dengan Terengganu mencatatkan keluasan penanaman tertinggi iaitu sebanyak 20 hektar. Ini diikuti negeri Johor, Kelantan dan Negeri Sembilan masing-masing dengan 7.0, 1.6 dan 0.1 hektar. Sehingga kini terdapat pelbagai produk berasaskan tongkat ali boleh didapati di pasaran tempatan (*Gambar 2*).



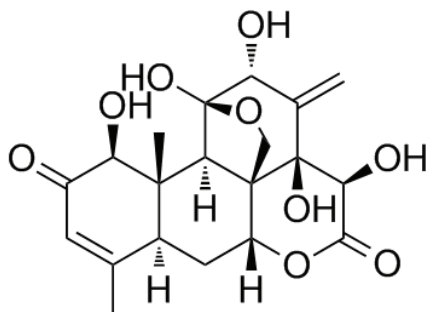
Gambar 2. Produk berasaskan tongkat ali

Sehubungan itu, bagi menjamin kualiti bahan mentah dan produk berasaskan tongkat ali, kawalan kualiti berdasarkan kandungan kimia amat perlu dijalankan. Bagi tujuan ini, dua sebatian kimia utama yang dikenali sebagai eurikumanon dan skopoletin telah dipilih sebagai rujukan utama. Kedua-dua sebatian kimia ini wujud dalam kuantiti yang besar dalam tongkat ali berdasarkan kajian dan laporan terdahulu oleh ramai penyelidik. Satu teknik analisis menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) telah dibangunkan untuk mengesan kedua-dua sebatian kimia rujukan ini.

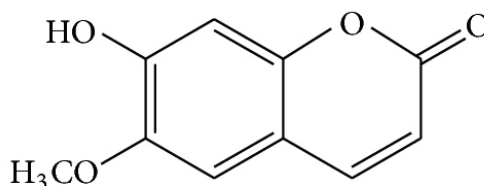
Sebatian kimia

Eurikumanon dan skopoletin dilaporkan mempunyai aktiviti biologi yang aktif dan berkhasiat untuk tubuh badan manusia yang berfungsi sebagai agen antioksidan, memberikan kesan spermatogenesis, antiinflamatori, antikolinesterase dan banyak lagi. Dari segi struktur kimia, kedua-dua sebatian ini adalah sangat berbeza dan tergolong dalam kumpulan yang berlainan. Sebatian kimia eurikumanon tergolong dalam kumpulan siklo ataupun gelung yang melibatkan perkongsian elektron antara atom yang membentuk ikatan kovalen. Struktur bagi sebatian kimia eurikumanon terdiri daripada 20 unsur karbon, 24 hidrogen dan 9 oksigen. Sebatian kimia ini mengandungi banyak kumpulan hidroksi yang memberikan ciri kekutuban ataupun kepolaran yang tinggi. Secara keseluruhan terdapat lima kumpulan hidroksi (-OH) dalam struktur kimia eurikumanon seperti dalam *Gambar 3*. Manakala, sebatian kimia skopoletin pula tergolong dalam kumpulan gelang ataupun aromatik. Keseluruhan struktur skopoletin terbentuk melalui ikatan ganda dua yang melibatkan atom karbon kepada karbon (*Gambar 4*) berbanding dengan

sebatian kimia eurikumanon yang hanya mengandungi satu kumpulan hidroksi (-OH). Oleh itu, sebatian ini hanya bersifat sederhana polar ataupun berkutub.



Gambar 3. Struktur kimia eurikumanon



Gambar 4. Struktur kimia skopoletin

Bahan dan kaedah kajian

Penyediaan sampel

Sampel tongkat ali mentah (akar, batang dan daun) dikisar halus (0.05 mm) menggunakan pengisar kering (*dry grinder*).

Pengekstrakan sebatian kimia (eurikumanon dan skopoletin)

Sebanyak 1.0 g sampel yang telah dikisar direndam ke dalam 10 mL pelarut organik metanol dan disonikasi selama 1 jam. Rendaman kemudiannya dituras menggunakan kertas turas whatmann bersaiz 113. Sampel seterusnya ditapis menggunakan penapis picagari bersaiz 0.45 μM ke dalam vial suntikan bersaiz 1.5 mL. Bagi sampel cecair khususnya produk minuman, 10 mL sampel akan ditapis secara terus menggunakan penapis picagari saiz yang sama. Ini penting bagi menyingkirkan bendasing dalam produk tersebut.

Penyediaan larutan sebatian kimia piawai (eurikumanon dan skopoletin)

Penyediaan larutan sebatian kimia piawai adalah penting untuk proses pengiraan kandungan kedua-dua sebatian kimia piawai ini di dalam sampel. Proses pengiraan ini dilakukan berdasarkan eksperimen lengkung kalibrasi. Sebanyak 5.0 mg setiap satu sebatian kimia piawai eurikumanon dan skopoletin ditimbang dan dilarutkan menggunakan pelarut organik yang berbeza. Bagi sebatian kimia piawai eurikumanon, ia dilarutkan menggunakan pelarut organik metanol, manakala kloroform digunakan sebagai pelarut bagi skopoletin. Kedua-dua larutan pelarut ini seterusnya dicairkan daripada kepekatan asal iaitu 5,000 ppm kepada 1,000 ppm. Kemudian dicairkan lagi secara pencairan bersiri kepada lima kepekatan yang berbeza iaitu pada 500, 250, 125, 62.5 dan 31.2 ppm.

Instrumentasi

Peralatan HPLC yang digunakan adalah jenama Agilent Siri 1,200 dilengkapi dengan kolum *reverse phase* Phenomenex Kinetex C18 (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) untuk memisahkan kandungan kedua-dua sebatian kimia dalam tongkat ali dan isi padu suntikan adalah sebanyak 10 μl. Analisis dijalankan menggunakan kombinasi sistem pelarut sebagai fasa bergerak secara gradien, menggunakan pelarut yang berbeza bagi setiap sebatian kimia.

Analisis eurikumanon, menggunakan fasa asetonitril (A) dan air yang mengandungi 0.1% asid formik (B) yang diprogramkan secara gradien, 0 – 13 minit (10 – 25% A), 13 – 15 minit (25 – 10% A) dan 15 – 20 minit (10% A) dengan kadar alir 1 mL/minit. Ringkasan bagi parameter proses fasa bergerak adalah seperti dalam *Jadual 1*.

Manakala bagi analisis skopoletin, fasa bergerak yang digunakan ialah asetonitril (A), metanol (B) dan air yang mengandungi 0.1% asid asetik (C) yang diprogramkan secara gradien, 0 – 12 minit (4% B, 90% C – 8% B, 84% C), 12 – 37 minit (8% B, 84% C – 15% B, 70% C), 37 – 50 minit (15% B, 70% C – 25% B, 50% C), 50 – 55 minit (25% B, 50% C – 45% B, 10% C), 55 – 56 minit (45% B, 10% C – 4% B, 92% C) dan 56 – 60 minit (4% B, 92% C) dengan kadar alir 0.5 mL/minit. Pengesanan pada peralatan HPLC ditetapkan pada gelombang masing-masing 254 nm dan 330 nm bagi eurikumanon dan skopoletin untuk tujuan pengesanan. Ringkasan bagi parameter proses fasa bergerak adalah seperti dalam *Jadual 2*.

Jadual 1. Sistem pelarut fasa bergerak HPLC bagi analisis eurikumanon

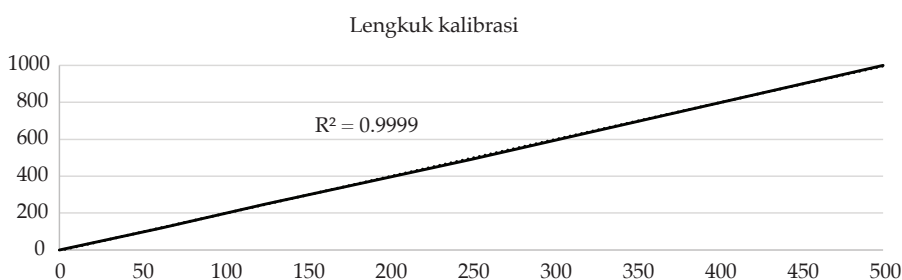
Masa/minit	Asetonitril	H ₂ O mengandungi 0.1% asid formik	Kadar alir (mL/minit)
0	10	90	1
13	25	75	1
15	10	90	1
20	10	90	1

Jadual 2. Sistem pelarut fasa bergerak HPLC bagi analisis skopoletin

Masa/minit	Asetonitril	Metanol	H ₂ O mengandungi 0.1% asid asetik	Kadar alir (mL/minit)
0	6	4	90	0.5
12	8	8	84	0.5
37	15	15	70	0.5
50	25	25	50	0.5
55	45	45	10	0.5
56	4	4	92	0.5
60	4	4	92	0.5

Penentuan kandungan sebatian kimia

Penentuan kandungan sebatian kimia eurikumanon dan skopoletin di dalam sampel tongkat ali dilakukan melalui eksperimen lengkung kalibrasi bagi kedua-dua sebatian kimia piawai tersebut. Teknik ini sangat sesuai digunakan bagi tujuan penentuan kandungan sebatian kimia seperti dilaporkan dalam kajian terdahulu. Larutan piawai kedua-dua sebatian kimia pada kepekatan yang berbeza iaitu pada 500, 250, 125, 62.5 dan 31.2 ppm disediakan dan disuntik ke dalam peralatan HPLC. Keluasan *signal* yang diperolehi bagi setiap kepekatan direkodkan dan diplotkan dalam bentuk graf seperti dalam *Rajah 1*. Nilai koefisien penentuan (R^2) sekitar 0.999 dianggap sebagai bersesuaian atau tepat bagi penentuan kandungan sebatian kimia menggunakan eksperimen lengkung kalibrasi.

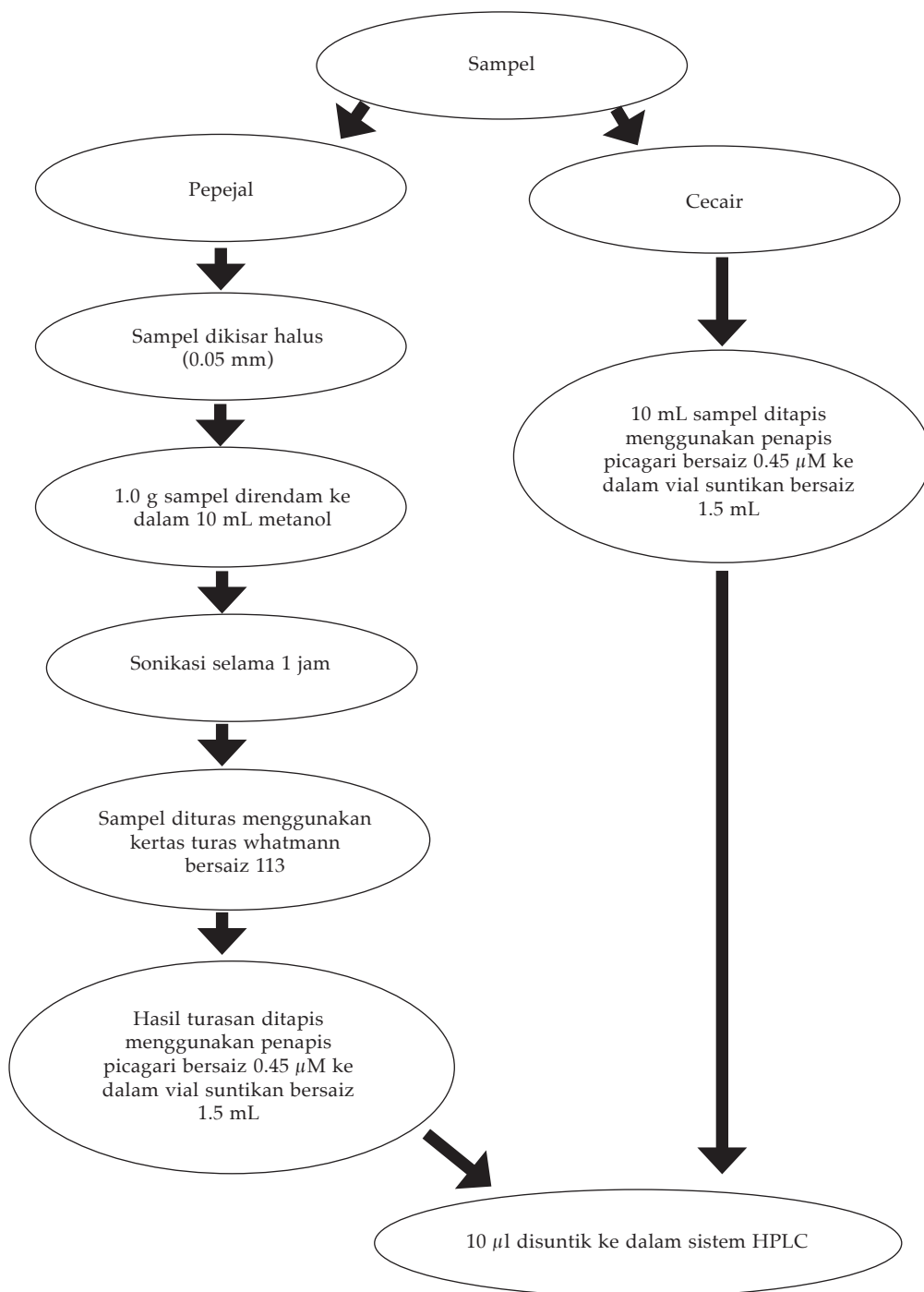


Rajah 1. Lengkuk kalibrasi sebatian kimia piawai

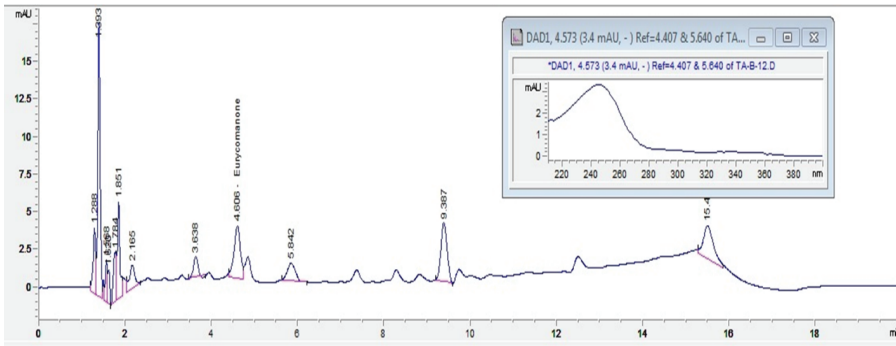
Pengesanan

Berdasarkan data analisis sebatian kimia menggunakan HPLC, eurikumanon dan skopoletin masing-masing dapat dikesan pada sekitar 4.6 dan 29.9 minit di dalam kedua-dua kromatogram. *Rajah 2* dan *Rajah 3* pula menunjukkan *signal* kedua-dua sebatian kimia eurikumanon dan skopoletin dikesan daripada sampel tongkat ali. Pengenalpastian *signal* bagi kedua-dua sebatian kimia ini juga telah disokong oleh pengesanan menggunakan *ultraviolet-visible* (UV-Vis) spektrofotometri [pengesanan *diode array* (DAD)] di samping sebatian kimia piawai sebagai rujukan. Pemisahan matriks sampel yang baik diikuti oleh sokongan pengesanan telah memberikan keputusan yang tepat sebagaimana yang telah dilaporkan dalam kajian-kajian sebelum ini.

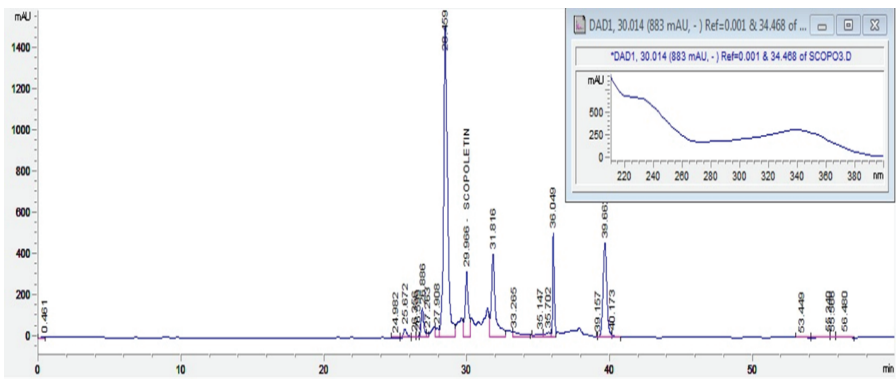
Pengesanan kedua-dua sebatian kimia ini melalui teknik HPLC telah membuktikan teknik pengekstrakan sampel tongkat ali menggunakan pelarut organik terpilih adalah bersesuaian. Sebatian kimia eurikumanon adalah sesuai diekstrak menggunakan pelarut metanol kerana bersifat berkutub ataupun polar. Manakala skopoletin pula sesuai diekstrak daripada sampel tongkat ali menggunakan pelarut kloroform kerana bersifat sederhana polar.



Carta alir 1. Keseluruhan teknik bagi analisis sebatian kimia daripada eurykumanon dan skopoletin daripada tongkat ali dan produk berasaskannya menggunakan HPLC



Rajah 2. Signal eurykumanon dikesan menggunakan HPLC sekitar 4.6 minit



Rajah 3. Signal skopoletin dikesan menggunakan HPLC sekitar 29.9 minit

Kesimpulan

Teknik analisis sebatian kimia eurykumanon dan skopoletin daripada sampel tongkat ali khususnya dalam bentuk pepejal boleh dilakukan melalui beberapa proses iaitu penyediaan sampel, pengekstrakan sebatian kimia, instrumentasi dan penentuan kandungan sebatian kimia. Sampel dalam bentuk cecair perlu melalui proses yang sama kecuali penyediaan sampel yang melibatkan pengisaran. Sampel yang diperoleh daripada proses pengekstrakan disuntik ke dalam instrumentasi ataupun peralatan analisis HPLC. Data signal kedua-dua sebatian kimia yang dikesan pada kromatogram direkodkan dari segi keluasan puncak. Data keluasan puncak signal kemudiannya dibandingkan dengan nilai sebatian kimia piawai. Hasil perbandingan yang diperoleh akan memberikan nilai kuantiti sebatian kimia eurykumanon dan skopoletin dalam sampel yang dianalisis. Ini seterusnya dapat menentukan kualiti tongkat ali dan produk berasaskannya.

Bibliografi

- Loneman, D.M., Peddicord, L., Al-Rashid, A., Nikolau, B.J., Lauter, N. dan Yandeau-Nelson, M.D. (2017). A robust and efficient method for the extraction of plant extracellular surface lipids as applied to the analysis of silks and seedling leaves of maize. *PLoS ONE* 12(7): e0180850. Diperoleh dari <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180850>
- Low, B.S., Choi, S.B, Abdul Wahab, H., Das, P.K. dan Chan, K.L. (2013). Eurycomanone, the major quassinoid in *Eurycoma longifolia* root extract increases spermatogenesis by inhibiting the activity of phosphodiesterase and aromatase in steroidogenesis. *Journal of Ethnopharmacology* 149(1): 201 – 207
- Mogana, R., Teng-Jin, K. dan Wiart, C. (2013). Anti-inflammatory, anticholinesterase, and antioxidant potential of scopoletin isolated from *canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Vol. 2013, 734824: 1 – 7
- Mohd Nazrul Hisham, D., Lip, J.M., Arif Zaidi, J. dan Normah, A. (2010). Main non-polar chemical constituent from *Morinda citrifolia* fruits. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 38(1): 97 – 102
- Moosavi, S.M. dan Ghassabian, S. (2018). Linearity of Calibration Curves for Analytical
- Nguyen, H.P. dan Schug, K.A. (2008). The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *Journal of Separation Science* 31: 1465 – 1480
- Statistik Tanaman Herba Dan Rempah Ratus (2021). Jabatan Pertanian Malaysia, muka surat 96.
- Truong, D.H., Nguyen, D.H., Ta, N.T.A., Bui, A.V., Do, T.H. dan Nguyen, H.C. (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality* Volume 2019, Article ID 8178294, 9 pages
- Yusuf, H., Mustofa, M., Wijayanti, A., Asmah Susidarti, R., Asih, B.S., Suryawati dan Sofia (2013). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 4 (3): 728 – 734

Ringkasan

Tongkat ali atau nama saintifiknya *Eurycoma longifolia* merupakan tumbuhan herba tradisional Malaysia yang popular kerana mempunyai pelbagai khasiat. Mengikut amalan tradisi, air rebusan tongkat ali dipercayai mampu memberi kesan yang signifikan kepada kesihatan seperti mengurangkan pening kepala, merawat darah tinggi dan kencing manis. Berdasarkan kajian saintifik, tongkat ali didapati mengandungi dua sebatian kimia utama dikenali sebagai eurykumanon dan skopoletin. Kedua-dua sebatian kimia ini dilaporkan memainkan peranan yang penting kepada kesihatan menurut pengetahuan tradisi. Bagi memastikan kehadiran kedua-dua sebatian kimia tersebut dalam tongkat ali dan produk berasaskannya, teknik analisis khusus melibatkan beberapa proses telah dibangunkan. Bagi sampel pepejal, secara umumnya proses ini melibatkan penyediaan sampel, pengekstrakan

sebatian kimia, instrumentasi dan penentuan kandungan sebatian kimia. Penyediaan sampel melibatkan pengisaran sampel kepada 0.005 mm saiz partikal. Selanjutnya, 1.0 g sampel tersebut direndam menggunakan 10 mL pelarut metanol dan disonikasi selama 1 jam. Rendaman tersebut dituras menggunakan kertas turas jenama whatmann bersaiz 113. Kemudian, ekstrak yang diperoleh ditapis menggunakan penapis picagari bersaiz 0.45 μ M ke dalam vial suntikan. Proses yang sama dilakukan bagi sampel cecair kecuali untuk penyediaan sampel yang melibatkan pengisaran. Isi padu sebanyak 10 mL sampel ditapis menggunakan penapis picagari yang sama saiz bagi mengeluarkan bendasing. Ekstrak yang telah ditapis dan larutan piawai disuntik ke dalam instrumentasi analisis HPLC. Larutan sebatian kimia piawai pada kepekatan yang berbeza (500, 250, 125, 62.5 dan 31.2 ppm) juga perlu disediakan. Pengesanan sebatian kimia dan larutan piawai merangkumi eurikumanon dan skopoletin yang dicapai sebagai signal direkodkan dalam bentuk kromatogram. Keluasan kawasan signal bagi ekstrak dan larutan piawai dibandingkan bagi menentukan kandungan eurikumanon dan skopoletin di dalam sampel. Teknik yang telah dibangunkan ini amat berguna bagi menentukan tahap kualiti tongkat ali dan produk berasaskannya.

Summary

Tongkat ali or scientifically known as *Eurycoma longifolia* has been significantly known as one of the popular Malaysian traditional herbal plants due its nutritional value. Traditionally, the decoction of *tongkat ali* believes could give significant impact to health benefit such as reduce headache, high blood pressure and diabetic. Through scientific study, two major chemical constituents known as eurycomanone and scopoletin have been identified from *tongkat ali*. Both chemical constituents were widely reported play an important role to health benefit in line with the traditional claims. In order to ensure the presence of both chemical constituents in *tongkat ali* and product based on it, a dedicated analysis method has been developed which involved several processes. For solid sample, generally the process involved preparation of sample, extraction of chemical constituents, instrumentation and determination of chemical constituents content. The preparation of sample involved grinding of sample into particle size of 0.05 mm. Further 1.0 g of it was macerated with 10 mL methanol solvent and sonicated for 1 hour. The macerate was filtered using filter paper whatmann brand size of 113. Subsequently, the extract obtained was filtered using syringe filter size of 0.45 μ M into injection vial. As for liquid sample, the analysis involved the same process except for preparation of sample which involved grinding. Volume of 10 mL of sample was filtered using the same size of syringe filtered in order to remove the impurities. Different concentrations of both standards chemical constituent solution were prepared at 500, 250, 125, 62.5 and 31.2. The filtered extract and standard solutions were subjected to the HPLC analytical instrument. Detection of the chemical constituents and standard solutions comprising eurycomanone and scopoletin was accomplished as signal recorded in form of chromatogram. The signal area value of extract and standard solutions in chromatogram was compared in order to determine the amount of eurycomanone and scopoletin in the sample. The developed method is useful to ensure the quality of tongkat ali and product based on it.

Pengarang

Mohd Nazrul Hisham Daud (Dr.)

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: nazrul@mardi.gov.my

Mohd Lip Jabit

Pusat Pengurusan Harta, Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

Noor Ismawaty Nordin

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri, Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor