

Teknik pengekstrakan dan penentuan kandungan metoksiflavin dalam aksesori rizom kunyit hitam (Extraction and quantification technique of methoxyflavone in black ginger rhizome accessions)

Mirfat Ahmad Hasan Salahuddin, Razali Mirad, Izlamira Roslan, Rosalizan Md Saleh, Muhammad Faris Mohd Radzi dan Zulkefli Abd Rahman

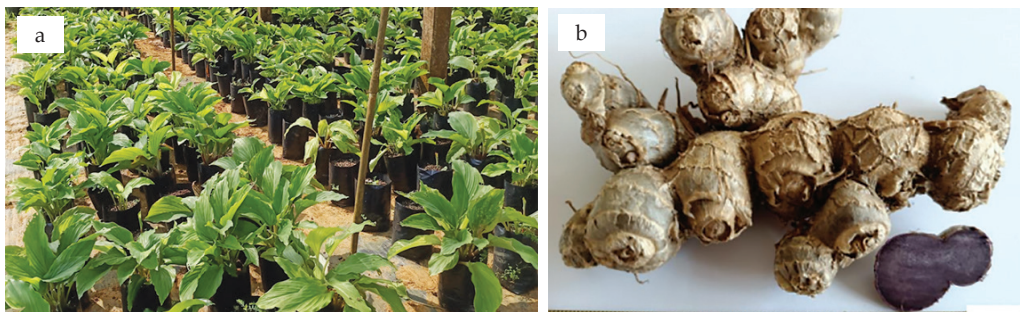
Pengenalan

Kaempferia parviflora Wallich. ex Baker atau dikenali sebagai kunyit hitam (*Gambar 1*), ialah herba ubatan yang popular daripada keluarga Zingiberaceae. Spesies ini berasal dari Thailand dan boleh juga ditemui di Malaysia dan negara-negara Asia Tenggara yang lain. Sejak zaman dahulu lagi, kunyit hitam digunakan secara tradisional untuk merawat pelbagai penyakit termasuk keradangan, ulser, gout, abses, alahan, cirit-birit, jangkitan, hipertensi dan osteoarthritis. Selain itu, tanaman ini juga telah digunakan untuk merawat keletihan, meningkatkan kecergasan fizikal dan meningkatkan tahap kesihatan umum.

Kebaikan dan manfaat kesihatan yang ditunjukkan oleh kunyit hitam telah menjadikannya sebagai tumbuhan umbisi baharu yang berpotensi tinggi untuk diteroka. Malah, permintaan terhadap produk berasaskan bahan semula jadi yang semakin meningkat juga telah menarik perhatian penyelidik dan pengusaha herba untuk menghasilkan pelbagai produk berasaskan ekstrak rizom kunyit hitam. Walau bagaimanapun, di Malaysia, kunyit hitam belum dikaji secara menyeluruh berbanding dengan tumbuhan herba dan tanaman industri yang lain. Generasi masa kini juga kurang mengenali spesies herba ini apatah lagi mengetahui khasiatnya. Ini mungkin disebabkan kesukaran untuk mendapatkan bahan tanaman ini di pasaran tempatan. Pada masa kini, bekalan sumber tanaman masih bergantung pada import terutamanya dari negara Thailand yang menawarkannya pada harga yang tinggi. Faktor-faktor inilah yang membataskan penyelidik dan pengusaha herba di Malaysia untuk mengeksploitasi dan memperkenalkan tanaman ini dalam pasaran industri herba tempatan.

Oleh itu, penilaian kualiti aksesori kunyit hitam yang berbeza adalah penting sebagai langkah awal untuk mengenal pasti bahan tanaman terbaik. Bagi kajian ini, teknik pengekstrakan dan penentuan sebatian 5,7,4'-trimetoksiflavin di dalam ekstrak rizom kunyit hitam menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) telah dibangunkan sebagai salah satu usaha untuk mengenal pasti aksesori elit kunyit hitam daripada 12 aksesori yang ditanam di janaplasma herba di MARDI Jerangau, Terengganu (*Gambar 1*).

Teknik pengekstrakan dengan penggunaan pelarut yang bersesuaian merupakan satu elemen penyelidikan yang penting



Gambar 1. (a) Pokok dan (b) rizom kunyit hitam di janaplasma herba MARDI Jerangau

bagi memastikan sebatian fitokimia yang diinginkan dapat diasingkan dan diekstrak secara optimum. Selain pengekstrakan, kandungan sebatian fitokimia serta fungsi aktiviti biologinya boleh dipengaruhi oleh pelbagai aktiviti pengendalian lepas tuai dalam proses rantaian pengeluarannya seperti umur tuaian, tahap kematangan dan kaedah pengeringan. Kesemua aktiviti ini haruslah dikawal selia secara efektif untuk mendapatkan kandungan sebatian fitokimia yang konsisten. Bagi mengukur kandungan sebatian fitokimia spesifik dalam sesuatu ekstrak, kromatografi cecair berprestasi tinggi atau HPLC boleh digunakan. Teknik pemisahan sebatian menggunakan instrumen HPLC ini digunakan secara meluas dalam pelbagai bidang saintifik termasuk kimia analitik, farmaseutikal, biokimia dan persekitaran. Ia membolehkan pengasingan komponen individu dalam campuran, pengenalpastian dan penentuan secara kuantitatif komponen individu dalam campuran dengan ketepatan yang tinggi.

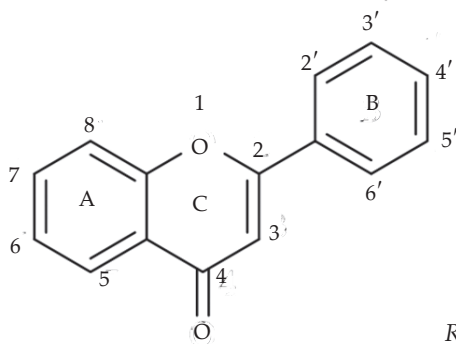
Sebatian kimia metoksiflavon

Kajian telah menunjukkan kunyit hitam mempunyai pelbagai aktiviti biologi yang dikaitkan dengan kehadiran pelbagai sebatian kimia atau sebatian aktif yang terkandung di dalamnya. Terdapat 25 jenis flavonoid yang dikenal pasti termasuk polimetoksiflavon seperti 5,7-dimetoksiflavon (DMF), 5,7,4'-trimetoksiflavon (TMF) dan 3,5,7,3',4'-pentametoksiflavon (PMF) yang menjadi sebatian aktif utama dalam kunyit hitam. Beberapa kajian farmakologi terhadap kunyit hitam telah mendedahkan bahawa sebatian-sebatian metoksiflavon inilah yang menyumbang kepada banyak manfaat kesihatan seperti peningkatan metabolisme dan aliran darah, antioksidan, antimikrob, antiradang, antialahan (alergi), antikanser, antiobesiti, perangsang seks dan sebagai agen pelindung saraf dan jantung. Sebatian-sebatian metoksiflavon yang ditemui dalam ekstrak kunyit hitam ditunjukkan dalam *Jadual 1*. Struktur utama sebatian metoksiflavon termasuk cincin benzena dengan dua kumpulan pengganti (substituen) pada kedudukan lima dan tujuh, cincin aromatik B dengan dua kumpulan pengganti pada kedudukan tiga dan empat, dan gelang C dengan kumpulan pengganti memaut pada kedudukan tiga (*Rajah 1*). Kumpulan pengganti ini terdiri daripada -H, -OH atau -OCH₃.

Jadual 1. Sebatian metoksiflavin dan sebatian terbitannya

Sebatian metoksiflavin	Kumpulan pengganti				
	3	5	7	3'	4'
3,5,7,3',4'-pentametoksiflavin	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
3,5,7,4'-tetrametoksiflavin		-OCH ₃	-OCH ₃		-OCH ₃
5,7,3',4'-tetrametoksiflavin		-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
5,7,4'-trimetoksiflavin		-OCH ₃	-OCH ₃		-OCH ₃
3,5,7-trimetoksiflavin	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃		
5,7-dimetoksiflavin		-OCH ₃	-OCH ₃		
3,5-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
5,3'-dihidroksi-3,7,4'-trimetoksiflavin			-OCH ₃		
5,4'-dihidroksi-7-metoksiflavin		-OH	-OCH ₃		
5-hidroksi-3,7,3',4'-tetrametoksiflavin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
5-hidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavin		-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
5-hidroksi-3,7,4'-trimetoksiflavin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃		-OCH ₃
5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃		
5-hidroksi-7,4'-dimetoksiflavin		-OH	-OCH ₃		-OCH ₃
5-hidroksi-7-metoksiflavin		-OH	-OCH ₃		
4'-hidroksi-5,7-dimetoksiflavin		-OCH ₃	-OCH ₃		-OH

Sumber: Chen et al., 2018



Rajah 1. Struktur utama sebatian metoksiflavin

Penyediaan sampel

Dua belas akses kunyit hitam berbeza yang terdiri daripada LAO, LAO-1, LAO-2, THA-1, THA-2, THA-4, THA-5, THA-10, BKK, DN, MJ dan VIET-1 telah diperolehi dari pelbagai lokasi dan ditanam di janaplasma herba di MARDI Jerangau, Terengganu. Selepas 10 bulan ditanam, rizom yang matang dituai. Umur tuaian dan tahap kematangan kunyit hitam ini adalah berdasarkan beberapa kajian terdahulu. Setibanya di makmal, sampel segar rizom tersebut dibasuh dengan air paip yang mengalir untuk menghilangkan sebarang kekotoran dan dibiarkan kering di atas rak pengering untuk seketika. Kemudian, sampel dihiris menjadi kepingan nipis dan dikeringkan menggunakan ketuhar (Model: Memmert, Jerman) pada suhu 60 °C selama 48 jam. Selepas

proses pengeringan (kandungan lembapan 8 – 10%), sampel dikisar menjadi serbuk halus menggunakan pengisar mikro (Model: Ika Werke MF 10 Basic, Jerman) bersaiz 0.25 mm. Serbuk yang terhasil disimpan di dalam bekas kedap udara sebelum diekstrak (Gambar 2).



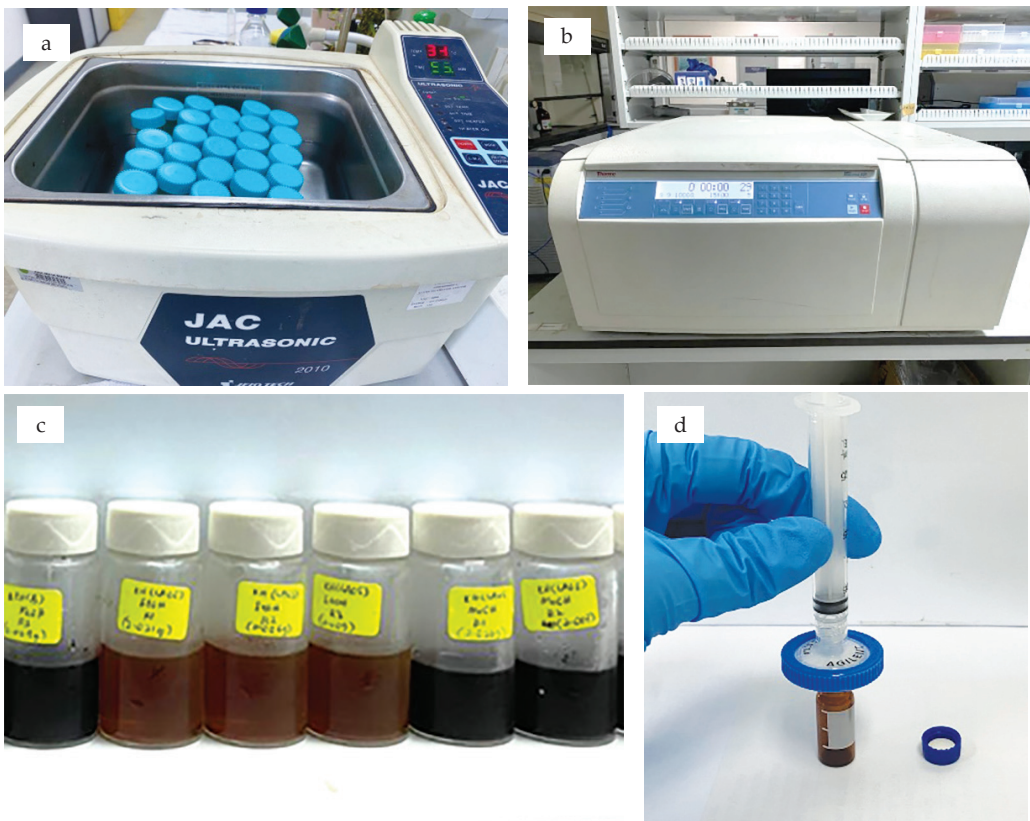
Gambar 3. Proses penyediaan dan pengeringan sampel rizom kunyit hitam. (a) Sampel rizom kunyit hitam, (b) Sampel rizom yang dihiris nipis, (c) Pengeringan menggunakan ketuhar dan (d) Sampel yang telah kering dan dikisar halus

Pengekstrakan sampel

Pengekstrakan adalah proses pengeluaran atau pengasingan sebatian kimia semula jadi atau sebatian aktif daripada bahagian tisu tumbuhan dengan menggunakan pelarut terpilih dan prosedur pengekstrakan yang bersesuaian. Bagi kajian ini, pengekstrakan sampel serbuk kunyit hitam dijalankan menggunakan kaedah pengekstrakan berbantuan-sonikasi. Gelombang bunyi yang terhasil semasa proses pengekstrakan ini boleh memecahkan sel tumbuhan dan meningkatkan luas permukaan dan ketelapan dinding sel tumbuhan terhadap penembusan pelarut. Antara kelebihan kaedah ini berbanding dengan kaedah konvensional yang lain ialah menjimatkan masa, mengurangkan penggunaan sampel dan meminimumkan isi padu pelarut yang digunakan untuk pengekstrakan.

Sebanyak 1 g serbuk dicampurkan dengan 10 mL pelarut 70% metanol (1:10 b:v) dan diekstrak menggunakan mesin sonik (JAC

Ultrasonic, Korea) yang beroperasi pada kuasa tinggi (300 W) pada suhu 40 – 50 °C. Pelarut organik metanol digunakan kerana ia adalah pelarut semipolar yang efektif dalam mengekstrak banyak sebatian fitokimia termasuk flavonoid. Selepas 1 jam pengekstrakan, campuran ekstrak dipisahkan menggunakan mesin pengempar (Heraeus Multifuge X3R, Jerman) pada kelajuan 10,000 rpm selama 15 minit untuk mengasingkan supernatan daripada sedimen. Pengekstrakan ini diulang sebanyak dua kali dalam keadaan yang sama. Kesemua supernatan digabungkan untuk mendapatkan ekstrak mentah. Ekstrak ini kemudiannya ditapis ke dalam botol *autosampler* dengan menggunakan penapis picagari membran (nilon) bersaiz 0.22 μm sebelum dianalisis menggunakan HPLC.



Gambar 4. Proses pengekstrakan rizom kunyit hitam. (a) Pengekstrakan menggunakan mesin sonik, (b) Pemisahan menggunakan mesin pengempar, (c) Esktrak mentah kunyit hitam dan (d) Ekstrak yang ditapis untuk analisis HPLC

Penyediaan sebatian kimia piawai

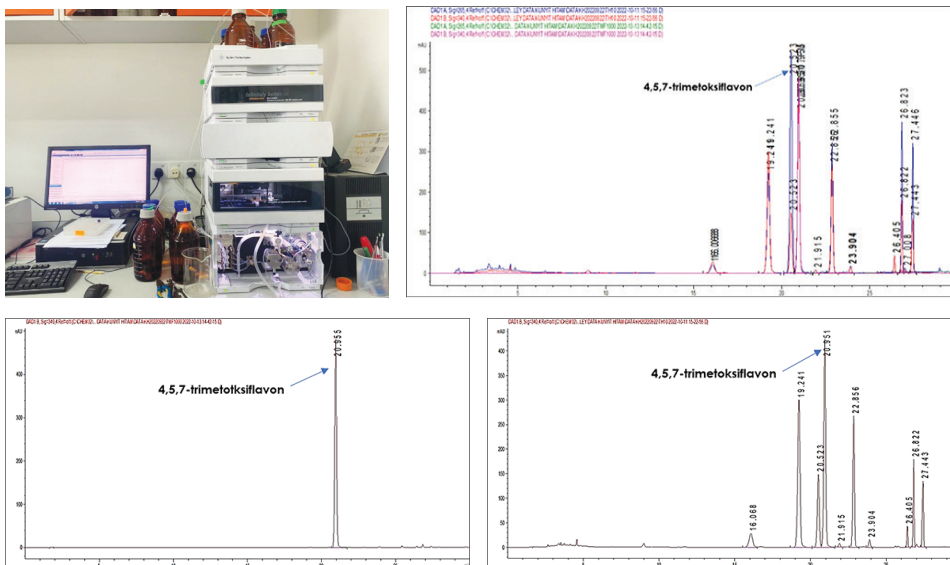
Bagi tujuan kuantifikasi sebatian 5,7,4'-trimetoksiflavin (TMF) dalam ekstrak rizom kunyit hitam, sebatian kimia piawai TMF diperlukan sebagai rujukan. Sebatian ini dipilih sebagai sebatian penanda kerana ia adalah antara sebatian metoksiflavin utama dalam kunyit hitam dengan pelbagai aktiviti farmakologi yang

dilaporkan. Sebanyak 1 mg sebatian kimia piawai TMF (Sigma Aldrich, St Louis, Amerika Syarikat) ditimbang dan dilarutkan ke dalam 1 mL pelarut 70% metanol bagi menghasilkan stok yang berkepekatan 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Seterusnya, larutan ini dicairkan melalui proses pencairan bersiri bagi menghasilkan sampel pada enam kepekatan larutan piawai yang berbeza. Julat kepekatan larutan piawai yang digunakan ialah 25 – 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bagi membangunkan lengkung kalibrasi piawai TMF dan membolehkan kandungan TMF diukur. Kesemua sampel ini ditapis ke dalam botol *autosampler* dengan menggunakan penapis picagari membran (nilon) bersaiz 0.22 μm dan disimpan beku pada suhu $-20\text{ }^\circ\text{C}$ sehingga analisis.

Analisis HPLC

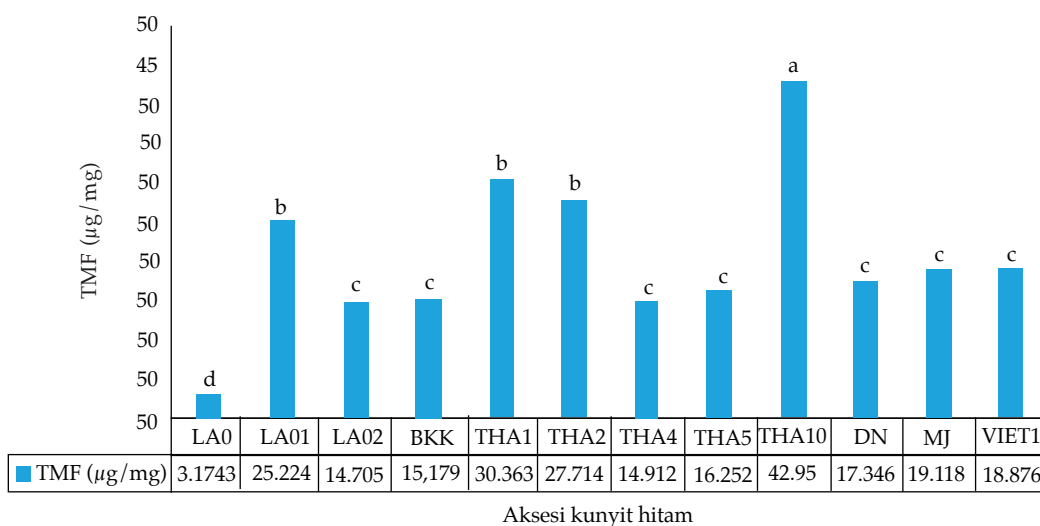
Pengasingan dan pemisahan sebatian kimia menggunakan HPLC menawarkan banyak kelebihan berbanding dengan teknik-teknik lain. Teknik ini membolehkan pengasingan komponen individu dalam campuran, pengenalpastian dan penentuan secara kuantitatif komponen individu dalam campuran dengan ketepatan yang tinggi. Ini kerana sistem HPLC terdiri daripada beberapa komponen utama yang bekerjasama untuk memberikan kecekapan pemisahan yang sangat baik dan kepekaan yang jitu.

Pengenalpastian dan penentuan kandungan 4,5,7-trimethoxyflavone dijalankan pada instrumen HPLC (Agilent chromatography 1290 Infinity Series) (*Gambar 4*) yang terdiri daripada pam kuaternari, degasser vakum, pengesan *diode array* (DAD), *autosampler* dan ketuhar turus. Sebatian TMF diasingkan secara kromatografi menggunakan turus jenis XBRIDGE



Gambar 4. Penentuan kandungan TMF dalam ekstrak kunyit hitam menggunakan HPLC. (a) Kuantifikasi sebatian TMF menggunakan HPLC, (b) Profil sebatian piawai rujukan TMF dan ekstrak THA-10, (c) Kromatogram HPLC bagi piawai TMF dan (d) Kromatogram HPLC bagi ekstrak THA-10

(150 mm × 4.6 mm × 3 μm) (Waters, Amerika Syarikat) dan dikekalkan pada 40 °C. Kecerunan binari linear air (0.1% asid formik) dan asetonitril (0.1% asid formik) digunakan masing-masing sebagai fasa bergerak A dan B. Semasa analisis dijalankan, komposisi fasa bergerak diubah seperti berikut: 0 min, 11% B; 3 min, 30% B; 15.00 min, 30% B; 23.00 min, 50% B; 27.00 min, 90% B, 29.00 min, 90% B dan 30.00 min, 11% B. Kesemua pelarut yang digunakan adalah daripada gred HPLC. Kadar aliran fasa bergerak ditetapkan pada 1 mL/min dan isi padu suntikan ialah 1 μL. Panjang jarak gelombang penyerapan UV/Vis dikesan pada 340 nm menggunakan pengesan DAD. Kromatogram HPLC menunjukkan kehadiran sebatian TMF pada masa tahanan (t_R) 20.5 – 21.5 minit (*Gambar 4*). Oleh itu, berdasarkan masa tahanan dan lengkung kalibrasi piawai yang diperolehi daripada piawai TMF ini, kandungan TMF dalam kesemua ekstrak kunyit hitam dapat dikenal pasti dan ditentukan. Julat kandungan TMF dalam 12 ekstrak kunyit hitam yang diuji ialah 3.17 – 42.95 μg/mg (*Rajah 2*), dengan kepekatan aksesori THA-10 adalah yang tertinggi (42.95 μg/mg). Manakala, aksesori LAO mencatatkan kepekatan TMF terendah (3.17 μg/mg).



Rajah 2. Kandungan TMF dalam ekstrak aksesori berbeza kunyit hitam

Kesimpulan

Pengenalpastian aksesori elit kunyit hitam dapat ditentukan melalui penentuan kandungan sebatian kimia utamanya iaitu 5,7,4'-trimetoksiflavin (TMF). Sebatian flavonoid metoksiflavin ini terbukti mempunyai pelbagai fungsi nutraseutikal yang memberi manfaat perubatan dan kesihatan kepada manusia. Pengekstrakan dan penentuan kandungan sebatian kimia secara kuantitatif menggunakan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) adalah dua kaedah utama yang menjadi penanda aras kualiti dalam penilaian 12 aksesori kunyit hitam ini. Meskipun kaedah

ini telah lama diaplikasikan oleh para saintis di seluruh dunia, beberapa pengubahsuaian dan pengoptimuman telah dilakukan berdasarkan spesies herba yang diuji dan kemudahan yang digunakan. THA-10 adalah aksesori elit yang dikenal pasti dan boleh dicadangkan sebagai bahan tanaman yang berpotensi untuk pembiakan, pemuliharaan, pembangunan produk dan tujuan komersial.

Penghargaan

Sekalung penghargaan buat ahli kumpulan penyelidik di Makmal Pengendalian Lepastuai, Pusat Penyelidikan Tanaman Industri dan Makmal Fitokimia, Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam kajian ini. Projek ini disokong oleh dana Projek Pembangunan RMK-12: Pengeluaran Tanaman Berfungsi yang Berkualiti, Berhasil Tinggi dan Produk Nilai Tambah serta Kaedah Validasi untuk Ketulenan dan Kualiti Keselamatan Pengguna (Kod Projek: PIC-1001-507).

Bibliografi

- Azmin, S. N. H. M., Manan, Z. A., Alwi, S. R. W., Chua, L. S., Mustaffa, A. A., & Yunus, N. A. (2016). Herbal processing and extraction technologies. *Separation and Purification Reviews*, 45(4), 305–320.
- Chaisuwan, V., Dajanta, K., & Srikaeo, K. (2022). Effects of extraction methods on antioxidants and methoxyflavones of *Kaempferia parviflora*. *Food Research*, 6(3), 374–381.
- Chen, D., Li, H., Li, W., Feng, S., & Deng, D. (2018). *Kaempferia parviflora* and its methoxyflavones: chemistry and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4, 1–15.
- Huo, C., Lee, S., Yoo, M. J., Lee, B. S., Jang, Y. S., Kim, H. K., Lee, S., Bae, H. Y., Kim, K. H. (2023). Methoxyflavones from black ginger (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) and their inhibitory effect on melanogenesis in b16f10 mouse melanoma cells. *Plants*, 12(5), 1183.
- Yoshino, S., Tagawa, T., Awa, R., Ogasawara, J., Kuwahara, H., & Fukuhara, I. (2021). Polymethoxyflavone purified from *Kaempferia parviflora* reduces visceral fat in Japanese overweight individuals: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Food & function*, 12, 1603–1613.

Ringkasan

Kaempferia parviflora Wallich. ex Baker. atau dikenali sebagai kunyit hitam, ialah herba ubatan yang popular dalam keluarga Zingiberaceae. Spesies ini berasal dari Thailand, dan boleh juga ditemui di Malaysia dan negara-negara Asia Tenggara yang lain. Beberapa kajian farmakologi telah mendedahkan pelbagai manfaat kesihatannya termasuk sebagai antioksidan, antimikrob, antiradang, antialahan (alergi), antikanser, antiobesiti, perangsang seks, dan agen pelindung saraf dan jantung. Penilaian aksesori berbeza kunyit hitam adalah penting sebagai langkah awal untuk mengenal pasti bahan tanaman terbaik dengan kualiti dan potensi yang tinggi. Oleh itu, kajian ini telah dijalankan untuk menilai 12 aksesori kunyit hitam (LAO, LAO-1, LAO-2, THA-1, THA-2, THA-4, THA-5, THA-10, BKK, DN, MJ dan VIET-1) yang diperolehi dari pelbagai lokasi yang ditanam di janaplasma herba di MARDI Jerangau, Terengganu. Rizom kunyit hitam telah dikeringkan menggunakan ketuhar pada suhu 60 °C sebelum pengekstrakan dengan 70% metanol menggunakan kaedah pengekstrakan berbantuan-sonikasi. Analisis kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) menunjukkan bahawa kesemua aksesori yang diuji mengandungi 4,5,7-trimetoksiflavon (TMF) iaitu salah satu sebatian metoksiflavon utama dalam kunyit hitam. Julat kandungan sebatian ialah 3.17 – 42.95 µg/mg, dengan aksesori THA-10 yang tertinggi. Secara kesimpulannya, kajian ini mencadangkan THA-10 sebagai aksesori elit kunyit hitam yang berpotensi tinggi yang boleh diteroka untuk pelbagai aktiviti biologi pada masa hadapan. Aksesori yang terpilih ini juga boleh dipromosikan sebagai sumber bahan tanaman terbaik untuk tujuan pembiakan, pemuliharaan dan komersial.

Summary

The rhizomes of *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker., also known as black ginger, are popular medicinal herb in the Zingiberaceae family. The species is originally found in Thailand as well as Malaysia and other Southeast Asian countries. A number of pharmacological studies on black ginger have revealed its wide range health benefits including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiallergic, anticancer, sex-enhancing, neuroprotective and cardioprotective activities. Screening of different accessions of black ginger is warranted as the initial step for identifying the best planting materials with high quality and potentials. Therefore, the current work was undertaken to evaluate twelve different accessions of black ginger (LAO, LAO-1, LAO-2, THA-1, THA-2, THA-4, THA-5, THA-10, BKK, DN, MJ and VIET-1) that were obtained from various locations and established in herbal germplasm in MARDI Jerangau, Terengganu. The rhizomes were dried under a hot air oven at 60 °C prior to extraction with 70% methanol using sonication-assisted extraction method. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that all extracts contained 4,5,7-trimethoxyflavone, one of the primary methoxyflavones in black ginger. The concentrations varied from 3.17 – 42.95 µg/mg, with THA-10 being the highest. In conclusion, the study may suggest that THA-10 as the elite accession of black ginger, which provides new possibilities to exploring them for other potential bioactivities in the future. The selected accession can also be promoted as the best source of planting material for breeding, conservation and commercial purposes.

Pengarang

Mirfat Ahmad Hasan Salahuddin (Dr.)
Pusat Penyelidikan Tanaman Industri
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor
E-mel: mirfat@mardi.gov.my

Razali Mirad
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor

Izlamira Roslan
Pusat Penyelidikan Tanaman Industri
MARDI Jerangau, KM 50
Jalan Ajil-Jerangau, Kampung Landas
21820 Ajil, Terengganu

Rosalizan Md Saleh (Dr.), Muhammad Faris Mohd Radzi dan Zulkefli Abd Rahman
Pusat Penyelidikan Tanaman Industri
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor