

## Pengaruh kaedah pemprosesan yang berbeza ke atas kandungan lignan dalam kacang soya, kacang hijau dan *flaxseed*

(Influence of different processing methods on lignan content in soybean, mung bean and flaxseed)

Umi Kalsum Hussain Zaki, Christos Fryrganas, Laura Trijsburg, Edith Feskens dan Edoardo Capuano

### Pengenalan

Lignan merupakan sebatian difenolik yang terdiri daripada sebatian secoisolariciresinol (SECO), matairesinol (MATA), pinoresinol (PINO) dan lariciresinol (LARI). Minyak daripada biji benih, kekacang, bijirin, sayur-sayuran (spesies *Brassica*), buah-buahan dan minuman (teh, kopi, bir dan wain) adalah sumber utama lignan. Lignan boleh diserap secara langsung oleh tubuh manusia, tetapi sebatian ini perlu dipecahkan oleh mikroorganisma usus menjadi enterolignan (*enterolactone* atau enterodiol) untuk memberi kesan dan manfaat kepada kesihatan. Beberapa kajian epidemiologi telah mencadangkan bahawa lignan mengurangkan risiko penyakit kardiovaskular dan penyakit kronik lain (contohnya kanser payudara) serta mengurangkan berat badan dan pengumpulan lemak.

Teknik pemprosesan makanan boleh mempengaruhi kandungan lignan dalam makanan serta mempengaruhi kebolehserapan beberapa sebatian tertentu. Biopemprosesan merupakan teknologi lestari untuk mengekstrak, membersihkan dan menghasilkan bahan makanan dan minuman melalui penggunaan enzim dan/atau mikroorganisma. Fermentasi adalah salah satu kaedah biopemprosesan yang digunakan secara tradisional untuk memanjangkan jangka hayat makanan.

Tempe merupakan makanan tradisional yang dihasilkan daripada fermentasi kacang soya atau bijirin yang telah dimasak yang memberikan banyak manfaat kesihatan, termasuk meningkatkan kebolehcernaan. Proses fermentasi atau penapaian tempe menggunakan kulat yang kebanyakannya daripada *Rhizopus* spp. Proses percambahan pula merupakan proses fisiologi di mana benih menghasilkan akar embrio dan batang dalam jangka masa tertentu. Ia juga mengubah suai mikrostruktur benih, pencernaan dan profil sebatian aktif. Masa percambahan mempengaruhi kandungan lignan dalam sesuatu tumbuhan.

Sehingga kini, kajian dan maklumat berkaitan kesan teknik biopemprosesan terhadap kandungan lignan dalam makanan masih kurang dan memerlukan kajian lanjut. Oleh itu, penyelidikan ini bertujuan untuk menentukan kesan fermentasi dan percambahan terhadap kandungan lignan pada

Jadual 1. Anggaran purata pengambilan, alasan pemilihan dan kaedah pemrosesan yang digunakan untuk makanan yang dipilih dalam kajian

Kategori	Jenis makanan	Anggaran purata pengambilan (g/hari)*	Alasan pemilihan	Kaedah pemrosesan
Kumpulan sayuran lain	Tauge (kacang hijau) ( <i>Vigna radiata</i> )	7	Tauge merupakan makanan kedua tertinggi pengambilan dalam kategori 'kumpulan sayuran lain' di Malaysia selepas bawang merah.	Fermentasi percambahan
Kecacang dan produk kecacang	Kacang soya (Fermentasi kacang soya)( <i>Glycine max</i> )	4	Produk kacang soya merupakan produk yang paling tinggi pengambilannya dalam kategori 'kekacang dan produk' di Malaysia.	Fermentasi percambahan
Biji benih	<i>Flaxseed</i>		Sebagai sampel rujukan kerana <i>flaxseed</i> merupakan sumber makanan yang paling kaya lignan.	Fermentasi percambahan

\*Daripada Tinjauan Morbiditi Kesihatan Kebangsaan, Kajian Pemakanan Dewasa Malaysia (MANS) 2014

kacang soya, kacang hijau dan *flaxseed*. Dalam kajian ini, lignan diekstrak, dihidrolisis dan seterusnya dianalisis dengan menggunakan peralatan *Liquid Chromatograph Triple Quadrupole Mass Spectrometer* (LC-MS/MS).

### Pemilihan sampel

Pemilihan sampel makanan berasaskan tumbuhan adalah berdasarkan data Tinjauan Morbiditi Kesihatan Kebangsaan, Kajian Pemakanan Dewasa Malaysia (MANS) yang dijalankan pada tahun 2014. Beberapa jenis makanan berasaskan tumbuhan yang paling banyak dimakan dengan kandungan dan komposisi lignan yang tidak diketahui telah dipilih iaitu kacang soya dan kacang hijau. Sampel *flaxseed* ditambah sebagai sampel rujukan memandangkan ia merupakan sumber lignan yang paling tinggi. Makanan yang dipilih merupakan makanan dengan pengambilan tertinggi (g/hari) yang dilaporkan dalam setiap kumpulan makanan berikut: kumpulan sayuran lain, kekacang dan produk dan biji benih. Kaedah pemrosesan secara percambahan dan fermentasi telah digunakan pada subset tertentu sampel seperti dalam *Jadual 1*.

### Kaedah fermentasi

#### *Fermentasi kacang hijau dan kacang soya*

Kacang hijau dan kacang soya diperoleh daripada pasaran tempatan. Kacang hijau dan kacang soya dibilas dan direndam dengan air bertapis (1:3, w/v) selama 12 jam pada suhu bilik (20 – 22 °C). Selepas rendaman, sampel kekacang disejat, dibuang kulit dan dipecahkan kepada dua bahagian. Kemudian, sampel kekacang direbus selama 30 minit (nisbah kacang:air 1:2, w/v) pada suhu 100 °C. Selepas proses rebusan, sampel kekacang disejat dan disejukkan sehingga suhu <36 °C dan diletakkan di dalam bekas dengan campuran cuka (20 mL). Seterusnya, sampel diinokulasi dengan fungus *Rhizopus oryzae* pada tahap 0.1% (w/w). Kemudian sampel

dibungkus menggunakan plastik polietilena yang berlubang dan diinkubasi pada suhu 25 – 30 °C selama 24 – 48 jam atau sehingga pembentukan miselium putih yang padat. Seterusnya, sampel melalui proses pengeringan sejuk beku (*freeze dry*), dikisar halus sehingga menjadi serbuk, ditapis melalui penapis bersaiz 0.5 mm dan disimpan pada suhu –20 °C bagi analisis seterusnya.

#### ***Fermentasi campuran flaxseed dan kacang hijau***

Kacang hijau dan *flaxseed* diperoleh daripada pasaran tempatan. Kacang hijau dibasuh dan direndam dalam air bertapis (nisbah kacang hijau:air 1:3, w/v) selama 12 jam pada suhu bilik. Selepas air lebihan dibuang, kacang hijau dibuang kulit dan dibahagikan kepada dua, disejat dan direbus dengan air (nisbah kacang hijau:air 1:2, w/v) selama 30 minit. *Flaxseed* pula dibasuh, dibilas, disejat dan direbus (nisbah *flaxseed*:air 1:2, w/v) selama 3 minit. *Flaxseed* dan kacang hijau dicampurkan dalam nisbah 1:1 (w/w) bagi menghasilkan miselium putih padat di sekeliling campuran tersebut. Kemudian, sampel dibiarkan sejuk sehingga suhu 36 °C. Kemudian sampel dibungkus menggunakan plastik polietilena yang berlubang dan diinkubasi pada suhu 25 – 30 °C selama 24 – 48 jam atau sehingga pembentukan miselium putih yang padat. Seterusnya, sampel melalui proses pengeringan sejuk beku (*freeze dry*) dikisar halus sehingga menjadi serbuk, ditapis melalui penapis bersaiz 0.5 mm dan disimpan pada suhu –20 °C bagi analisis seterusnya.

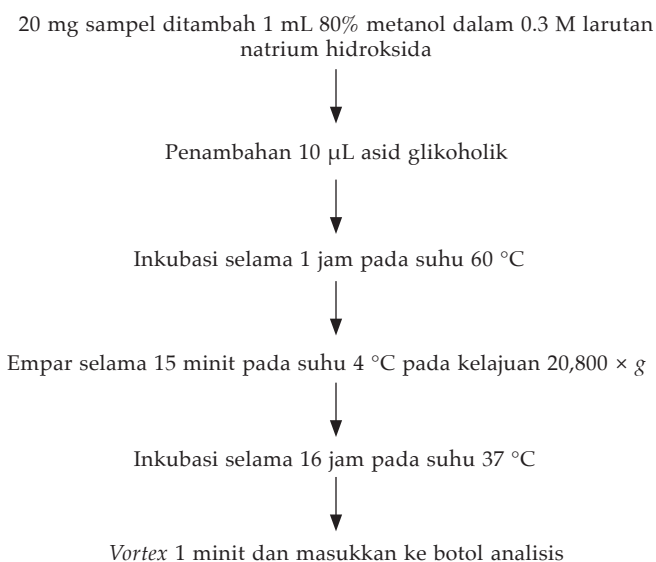
#### **Penyediaan sampel untuk percambahan**

Kacang hijau, soya dan *flaxseed* telah dipilih untuk proses percambahan. Kacang hijau dan kacang soya dibilas dan direndam di dalam air bertapis (1:3, w/v) selama 12 jam pada suhu 20 °C). *Flaxseed* pula dibilas dan direbus dalam air bertapis (1:2, w/v) selama 3 minit. Selepas air disejat, sebanyak 20 g sampel diletakkan dalam bekas (60 mm× 150 mm, 20 g) dan disimpan di tempat yang gelap bagi proses percambahan. Sampel dibilas dengan air setiap 12 jam bagi mengelakkan pertumbuhan mikroorganisma. Masa percambahan adalah selama tujuh hari dan sampel diambil setiap hari bagi tujuan analisis lignan. Seterusnya, sampel melalui proses pengeringan sejuk beku (*freeze dry*), dikisar halus sehingga menjadi serbuk, ditapis melalui penapis bersaiz 0.5 mm dan disimpan pada suhu –20 °C bagi analisis seterusnya.

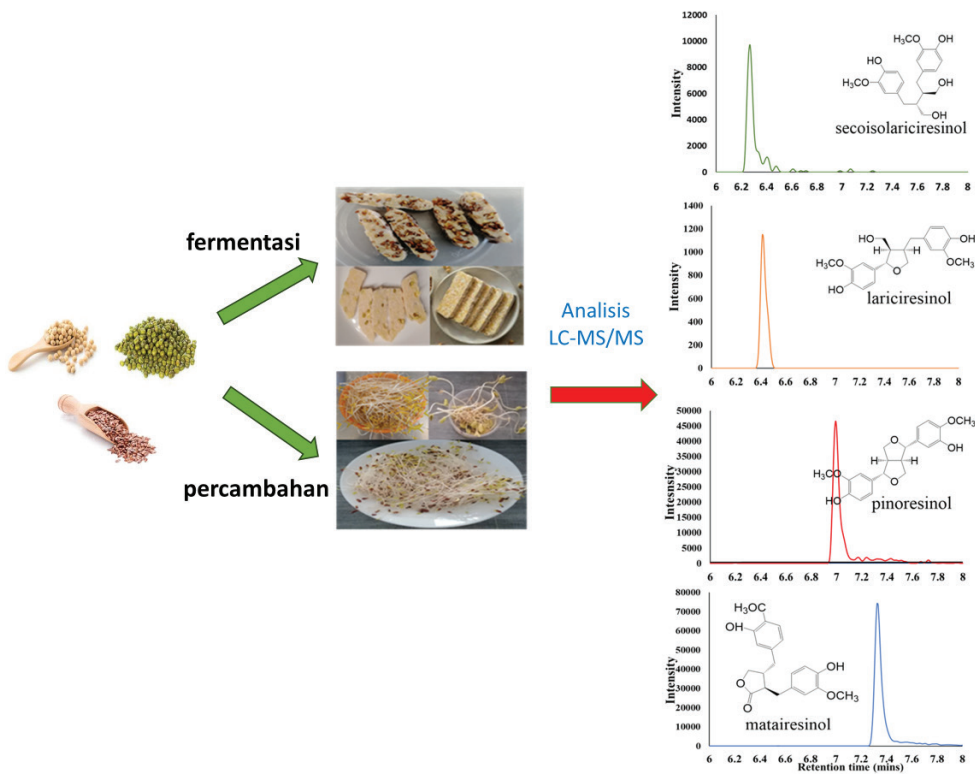
#### **Penentuan kandungan lignan**

Kaedah pengekstrakan lignan daripada tempe dan percambahan kecacang diringkaskan seperti dalam *Carta alir 1*. Analisis kandungan lignan dijalankan menggunakan sistem *Ultra-performance liquid chromatography* (UPLC) dan spektrometer LC-MS/MS-8050. *Gambar rajah 1* menunjukkan gambaran kajian yang dilaksanakan iaitu proses fermentasi dan percambahan kecacang terpilih dan juga analisis penentuan kandungan lignan dalam sampel fermentasi dan percambahan kecacang terpilih.

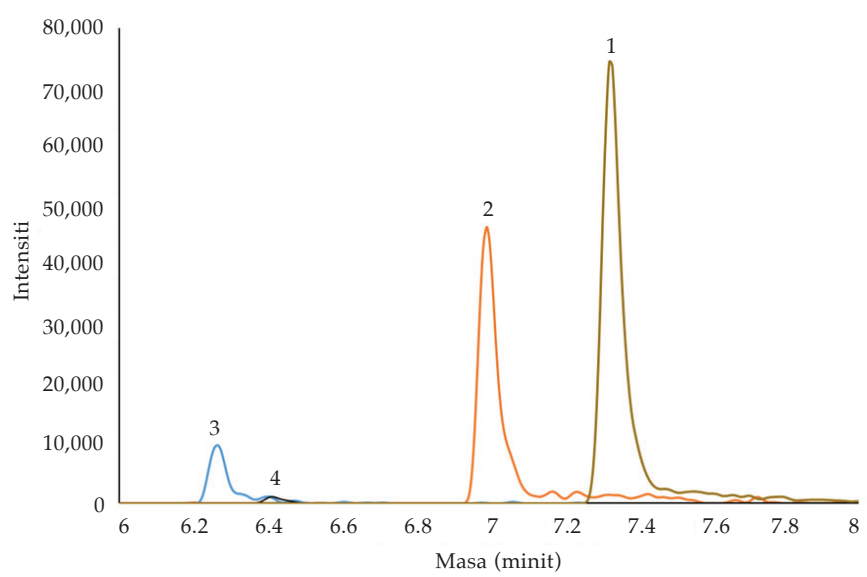
Kromatogram sebatian piawai lignan iaitu secoisolariciresinol (SECO), matairesinol (MATA), pinoresinol (PINO) dan lariciresinol (LARI) juga dapat dilihat seperti dalam *Gambar rajah 1* dan *Rajah 1. Jadual 2* pula menunjukkan persamaan regresi linear bagi setiap lekuk kalibrasi sebatian piawai lignan dengan nilai pekali kolerasi menghampiri nilai 1.0. Penentuan kandungan lignan dikira berdasarkan persamaan regresi linear lekuk kalibrasi lignan piawai yang telah dibangunkan. Data analisis dilaporkan sebagai nilai purata  $\pm$  sisihan piawai (SD) daripada analisis duplikasi dua sampel bebas. Keputusan dianalisis secara statistik antara sampel menggunakan analisis sehalu varians (ANOVA) dan ujian perbandingan berganda HSD Tukey HSD. Nilai  $p < 0.05$  dianggap signifikan secara statistik. Analisis statistik telah dilakukan menggunakan perisian IBM SPSS Statistics versi 25 (IBM Corp).



*Carta alir 1. Langkah-langkah pengekstrakan lignan daripada sampel tempe dan percambahan kacang hijau, kacang soya dan flaxseed*



Gambar rajah 1. Langkah proses fermentasi dan percambahan kekacang serta analisis penentuan lignan dalam sampel fermentasi dan percambahan kekacang



Rajah 1. Kromatogram campuran lignan piawai pada kepekatan 1250 ng/mL. (Puncak 1 = matairesinol, puncak 2 = pinoresinol, puncak 3 = secoisolariciresinol, puncak 4 = lariciresinol)

Jadual 2. Maklumat lekuk kalibrasi sebatian piawai lignan

Sebatian	Julat linear (g/mL)	Persamaan regresi rinear	Correlation coefficient (r2)
Lariciresinol	1000 – 10000	$y = 1.1215x - 407.37$	0.998
Matairesinol	200 – 10000	$y = 2E+06x + 537260$	0.998
Pinoresinol	12.5 – 5000	$y = 190120x + 3124.9$	0.999
Secoisolariciresinol	125 – 7500	$y = 43390x + 27.169$	0.998

### Pengaruh fermentasi terhadap kandungan lignan

Campuran *flaxseed* dan kacang hijau telah digunakan bagi menyerap kehadiran lapisan sel epidermal *flaxseed* yang menjadi berlendir dengan kehadiran air dan membentuk musilaj. Musilaj merupakan lapisan gel yang terbentuk apabila benih direndam di dalam air. Musilaj ini menghalang pembentukan miselium putih, seterusnya menghalang berlakunya proses fermentasi. Oleh itu, kacang hijau telah digunakan sebagai ramuan tambahan dalam campuran *flaxseed* dan kacang hijau (nisbah 1:1 w/w) bagi mengurangkan kelikatan musilaj dan merangsang pembentukan miselium putih di sekeliling campuran sampel dan membentuk tepe yang padat.

Jadual 3 menunjukkan campuran *flaxseed* dan kacang hijau difermentasi memberikan kandungan lignan paling tinggi ( $799.9 \pm 67.4$  mg/100 g berat kering) berbanding dengan semua sampel yang dianalisis. Ia menunjukkan peningkatan sebanyak 37% berbanding dengan campuran *flaxseed* dan kacang hijau yang tidak difermentasi. Sebaliknya, kedua-dua kacang soya difermentasi dan tidak difermentasi hanya memberikan nilai 0.3 mg/100 g berat kering, iaitu kandungan lignan terendah dalam sampel yang dianalisis. MATA, SECO dan PINO dikenal pasti dalam kedua-dua campuran *flaxseed* dan kacang hijau yang difermentasi dan tidak difermentasi. SECO merupakan penyumbang terbesar bagi kandungan jumlah lignan. Aras lignan tidak berbeza secara signifikan antara sampel kacang soya dan kacang hijau difermentasi dan tidak difermentasi.

Beberapa kajian saintifik telah melaporkan berlakunya perubahan kandungan fenolik semasa proses fermentasi antaranya kajian yang dilaksanakan oleh Schmidt et al. (2014) menunjukkan proses fermentasi dapat meningkatkan kandungan fenolik dalam dedak beras secara signifikan manakala kajian oleh Yadav et al. (2013) pula menunjukkan kandungan fenolik yang tinggi dalam bijirin *finger millet* apabila difermentasi bersama *Rhizopus oryzae*.

Sebatian aktif lignan banyak didapati pada lapisan luar bijirin. Dalam kajian ini, lapisan luar kacang soya dan kacang hijau telah dibuang sebelum proses fermentasi. Ini menjelaskan penentuan kandungan lignan yang rendah dalam sampel kacang soya dan kacang hijau disebabkan oleh lapisan luar telah dibuang sebelum proses fermentasi. Penemuan ini menunjukkan bahawa

proses fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* berpotensi dalam meningkatkan kandungan lignan, seterusnya menyumbang kepada penghasilan makanan yang mempunyai nilai tambah.

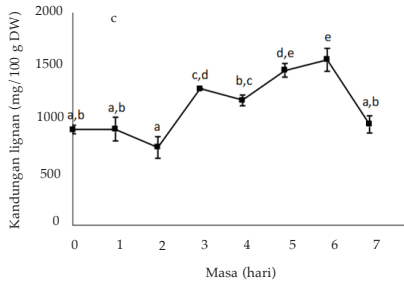
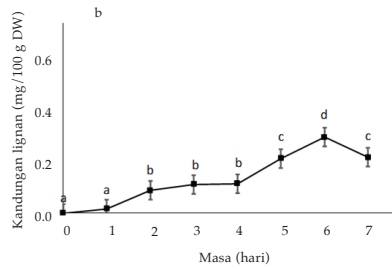
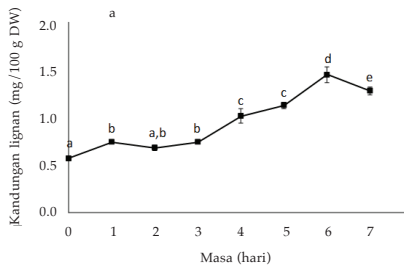
Jadual 3. Kandungan lignan (mg/100 g berat kering) pada sampel fermentasi dan tidak difermentasi

Sampel	MATA	SECO	PINO	Jumlah lignan
<b>Kacang soya</b>				
Tidak difermentasi	Tidak dikesan	0.3 ± 0.1	Tidak dikesan	0.3 ± 0.1
Difermentasi	Tidak dikesan	0.3 ± 0.0	Tidak dikesan	0.3 ± 0.0
<b>Kacang hijau</b>				
Tidak difermentasi	Tidak dikesan	0.4 ± 0.0	Tidak dikesan	0.4 ± 0.0
Difermentasi	Tidak dikesan	0.4 ± 0.1	Tidak dikesan	0.4 ± 0.1
<b>Campuran <i>flaxseed</i> dan kacang hijau</b>				
Tidak difermentasi	0.1 ± 0.1	501.0 ± 134.4	0.4 ± 0.1	501.4 ± 134.6
Difermentasi	0.1 ± 0.1	799.1 ± 67.3*	0.8 ± 0.1*	799.9 ± 67.4*

\*Menunjukkan perbezaan kandungan lignan yang signifikan antara sampel tidak difermentasi dan difermentasi. MATA = matairesinol; SECO = secoisolariciresinol; PINO = pinoresinol. (purata ± sisihan piawai, n = 2)

### Pengaruh percambahan terhadap kandungan lignan

Rajah 2 menunjukkan perubahan kandungan lignan semasa percambahan kacang hijau, kacang soya dan *flaxseed*. Kandungan lignan SECO merupakan sebatian lignan tertinggi di dalam *flaxseed*. Secara keseluruhan, kandungan lignan meningkat selari dengan masa percambahan dan mencapai kandungan maksimum pada hari keenam percambahan. Namun, kandungan lignan didapati berkurangan pada hari ketujuh percambahan. Kandungan lignan paling tinggi di dalam sampel *flaxseed* yang memberi nilai 1500 mg/100 g berat kering, manakala percambahan kacang hijau memberikan kandungan lignan paling rendah (0.3 mg/100 g berat kering). Hasil kajian ini merupakan data pertama yang menunjukkan pengaruh percambahan terhadap kacang soya dan kacang hijau. Kandungan tertinggi lignan diperolehi pada hari keenam percambahan. Tindak balas enzim endogenus bagi menghasilkan lignan telah mencapai tahap optimum pada hari keenam. Oleh itu proses percambahan selepas hari keenam menunjukkan pengurangan kandungan lignan.



Rajah 2. Kandungan lignan semasa percambahan (a) kacang soya, (b) kacang hijau dan (c) flaxseed (purata  $\pm$  sisihan piawai,  $n = 2$ ). Perbezaan huruf menunjukkan perbezaan yang signifikan pada kandungan lignan. (DW = berat kering)

## Kesimpulan

Kaedah fermentasi dan percambahan dapat meningkatkan kandungan lignan dalam makanan. Kajian lanjutan terhadap penghasilan kandungan lignan di dalam makanan difermentasi amat diperlukan untuk menghasilkan fermentasi yang optimum. Pengumpulan data ini dapat mengembangkan lagi maklumat kandungan lignan dalam makanan. Kaedah pemrosesan yang berbeza seperti fermentasi dan percambahan dapat mempengaruhi kandungan lignan dalam sampel makanan.

## Bibliografi

- Hussain Zaki, U. K., Fryganas, C., Trijsburg, L., Feskens, E. J. M., & Capuano, E. (2022). Influence of different processing method on lignan content of selected Malaysian plant-based foods. *Food Chemistry*, 404 (134607), 1 – V. Diperoleh dari <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134607>.
- MANS *National Health and Morbidity survey 2014: Malaysia Adult Nutrition Survey* (2014). Volume III (Food Consumption Statistics of Malaysia).
- Milder, I. E., Arts, I. C., Venema, D. P., Lasaroms, J. J., Wähälä, K., & Hollman, P. C. (2004). Optimization of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15), 4643–4651. Diperoleh dari doi: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf0497556>.
- Nørskov, N. P., & Knudsen, K. E. B. (2016). Validated LC-MS/MS Method for the Quantification of free and bound lignans in cereal-based diets and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (44), 8343–8351.



- Peñalvo, J. L., Haajanen, K. M., Botting, N., & Adlercreutz, H. (2005). Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (24), 9342–9347.
- Schmidt, C. G., Gonçalves, L. M., Prietto, L., Hackbart, H. S., & Furlong, E. B. (2014). Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chemistry*, 146, 371–377.
- Yadav, G., Singh, A., Bhattacharya, P., Yuvraj, J., & Banerjee, R. (2013). Comparative analysis of solid-state bioprocessing and enzymatic treatment of finger millet for mobilization of bound phenolics. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36 (11), 1563–1569.

### **Ringkasan**

Penyelidikan ini bertujuan menilai pengaruh proses fermentasi dan percambahan terhadap kandungan lignan bagi sampel kacang soya, kacang hijau dan *flaxseed*. Secoisolariciresinol (SECO) merupakan sebatian lignan tertinggi dalam sampel yang telah difermentasi dan dicambahkan. Proses fermentasi dapat meningkatkan kandungan lignan dalam campuran *flaxseed* dan kacang hijau (799.9 + 67.4 mg/100 g berat kering) berbanding dengan sampel yang tidak difermentasi (501.4 + 134.6 mg/100 g berat kering), manakala tiada perubahan ketara dalam kandungan SECO pada sampel kacang soya yang difermentasi. Kaedah percambahan kekacang juga dapat meningkatkan kandungan lignan dan mencapai tahap maksimum pada hari keenam percambahan bagi semua kekacang yang diuji.

### **Summary**

This research aimed to assess the influence of fermentation and germination, on lignans in soybean, mung bean and flaxseed. Secoisolariciresinol (SECO) was found to be the most abundant compound in fermented and germinated samples. Fermentation increased lignan content in a mixture of flaxseed and mung beans (799.9 + 67.4 mg/100 g dry weight) compared to the unfermented counterpart (501.4 + 134.6 mg/100 g dry weight), whereas the fermentation of soybeans and mung beans did not significantly affect the SECO content. Germination increased lignan content, which reached its peak on day 6 of germination for all the tested matrixes.

### **Pengarang**

Umi Kalsum Hussain Zaki (Dr.)  
Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor,  
E-mel: umikal@mardi.gov.my

Christos Fryganas dan Edoardo Capuano  
Food Quality and Design Department, Wageningen University and Research,  
Wageningen

Laura Trijsburg dan Edith Feskens  
Division of Human Nutrition and Health, Wageningen University and Research,  
Wageningen