

Kaedah pengekstrakan dan penentuan sebatian toksik cerberin dalam ekstrak buah pong-pong menggunakan teknik kromatografi

(Extraction method and determination of toxic compound cerberin in pong-pong fruit extract using chromatographic techniques)

Mirfat Ahmad Hasan Salahuddin, Norzainih Jasmin Jamin, Muhammad Faris Mohd Radzi, Che Ammar Abqari Che Omar dan Azimah Abd Kadir

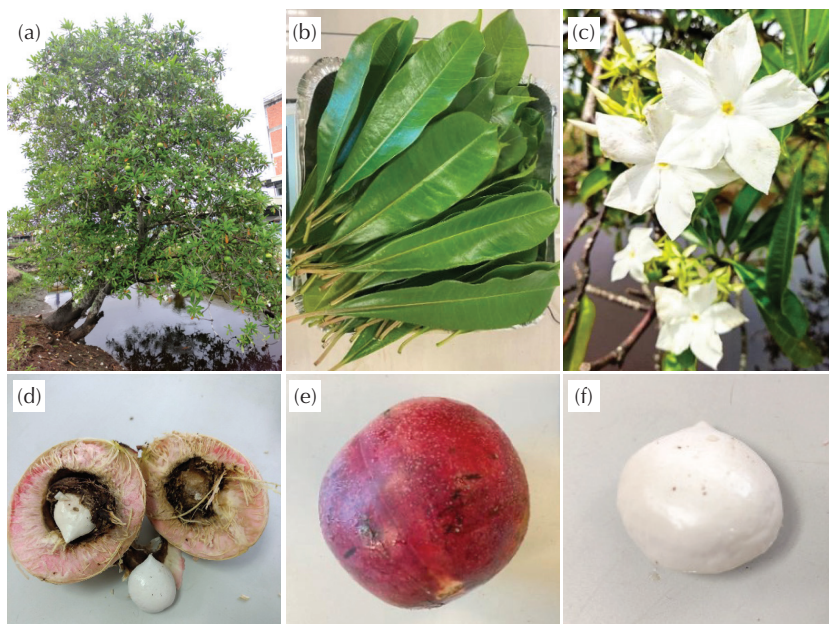
Kata kunci: cerberin, pong-pong, HPLC, pengekstrakan, kepolaran

Pengenalan

Pong-pong atau nama saintifiknya *Cerbera odollam* Gaertn. ialah spesies tumbuhan Angiosperma (tumbuhan berbunga dan berbiji) daripada keluarga Apocynaceae. Selain pong-pong, tumbuhan ini turut dikenali sebagai pokok bunuh diri (*suicide tree*) atau mangga laut (*sea mango*). Di India, tumbuhan ini dikenali dengan nama *othalanga maram* dan *kattu arali*, manakala di Madagascar, ia dipanggil *famenta*, *samanta*, *tangena* dan *kisopo*. Di Asia Tenggara, selain pong-pong, pokok ini lebih dikenali dengan nama buta-buta atau nyan. Pokok ini biasanya tumbuh di habitat lembap seperti paya, pesisir pantai dan tebing sungai. Ia banyak ditemui di India Selatan (terutama Kerala), Sri Lanka, Vietnam, Kemboja, Myanmar, Malaysia, Madagascar dan Australia. Di Malaysia, ia kerap ditanam sebagai pokok hiasan di tepi jalan. Secara fizikal, pokok ini boleh mencapai ketinggian 12 – 15 m [Gambar 1(a)] dengan daun berwarna hijau gelap berkilat [Gambar 1(b)]. Bunganya besar dengan kelopak berwarna putih [Gambar 1(c)] dan bahagian tengah yang berwarna kuning. Buah pong-pong yang muda berwarna hijau, manakala buah yang matang berwarna merah gelap [Gambar (d)]. Ia mempunyai kulit berserat tebal yang melindungi biji berbentuk ovoid berukuran kira-kira 2 cm × 1.5 cm [Gambar 1(e)]. Bahagian dalam biji ini berwarna putih [Gambar 1(f)], tetapi berubah menjadi ungu, kelabu gelap, coklat dan akhirnya hitam apabila terdedah kepada udara.

Pong-pong mengandungi pelbagai sebatian fitokimia penting seperti steroid, tanin, terpenoid, flavonoid, fenol, saponin, glikosida jantung (*cardiac glycoside*), lignan dan iridoid di bahagian tumbuhannya yang berbeza. Walau bagaimanapun, biji adalah bahagian yang paling beracun kerana mengandungi cerberin, iaitu sejenis sebatian glikosida jantung utama yang sangat toksik (kardiotoksik) dan berbahaya. Kajian menunjukkan bahawa dengan memakan sedikit sahaja biji ini boleh membawa maut. Hanya setengah atau satu biji sudah memadai untuk menyebabkan kematian dalam tempoh 3 – 6 jam atau sehingga 1 – 2 hari. Dos maut bagi anjing ialah 1.8 mg/kg, manakala bagi kucing ialah 3.8 mg/kg. Disebabkan kadar ketoksikannya yang tinggi dan kesan kardiotoksik yang kuat, pong-pong sering digunakan dalam kes bunuh diri dan sebagai agen pembunuhan. Di Kerala, India, tumbuhan ini menyumbang kepada hampir 50% daripada kes keracunan

tumbuhan yang mengakibatkan kadar kematian yang tinggi. Sebanyak 537 kematian akibat *C. odollam* telah direkodkan dalam tempoh 11 tahun, menjadikannya penyumbang utama keracunan tumbuhan dengan purata 49 kematian setahun.



Gambar 1. (a) Pokok pong-pong, (b) Daun pong-pong, (c) Bunga pong-pong, (d) Buah pong-pong yang masak, (e) Bahagian dalam buah pong-pong yang berserat tebal dan mengandungi biji berbentuk ovoid dan (f) Biji buah pong-pong

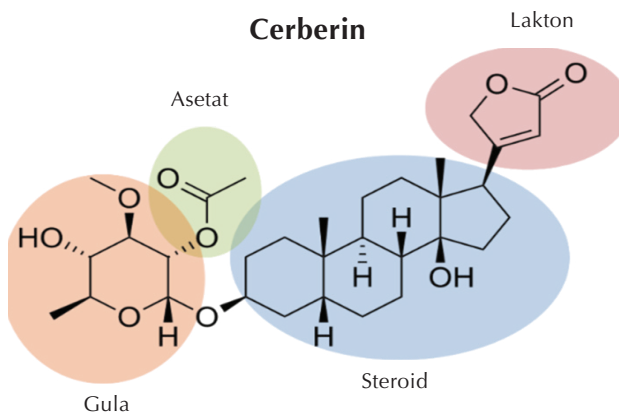
Cerberin dan mekanisme ketoksikannya

Cerberin adalah sebatian yang bersifat separa polar kerana struktur kimianya mengandungi kedua-dua komponen tidak polar (lipofilik) dan komponen polar (hidrofilik), menjadikannya amfipatik (mempunyai sifat polar dan tidak polar). Bahagian aglikon (seperti struktur steroid) dalam cerberin bersifat tidak polar, namun kehadiran unit gula seperti glikosida dan cincin lakton meningkatkan kepolarannya, menjadikannya sebatian separa polar. Oleh itu, cerberin boleh larut dalam pelarut organik yang bersifat polar atau separa polar kerana kumpulan fungsinya dapat berinteraksi dengan pelarut tersebut melalui ikatan hidrogen atau interaksi dipol.

Cerberin bertindak dengan mengganggu fungsi normal jantung, menyebabkan gangguan irama jantung yang boleh membawa kepada kegagalan jantung yang mendadak dan seterusnya menyebabkan kematian. Sebatian ini menghalang aktiviti pam natrium-kalium ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) dalam sel otot jantung. Perencatan pam ini menyebabkan pengumpulan natrium (Na^+) di dalam sel dan kalium (K^+) di luar sel yang mengakibatkan hiperkalemia (aras kalium tinggi dalam darah). Akibatnya, pertukaran natrium-kalsium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) menjadi perlahan dan menyebabkan pengumpulan ion kalsium (Ca^{2+}) dalam sel jantung. Peningkatan kalsium ini merangsang

kontraksi otot jantung secara berlebihan yang boleh mengganggu ritma jantung normal dan menyebabkan aritmia jantung seperti bradikardia (degupan jantung perlahan), blok atrioventrikular, fibrilasi ventrikel (degupan jantung tidak terkawal) dan asistol (jantung berhenti berdegup sepenuhnya). Gangguan ini mengakibatkan penurunan tekanan darah (hipotensi) dan penghantaran oksigen yang tidak mencukupi ke organ penting yang boleh menyebabkan hipoksia (kekurangan oksigen dalam tisu), asidosis laktik dan kegagalan pelbagai organ seperti otak dan buah pinggang. Jika tidak dirawat, fibrilasi ventrikel atau asistol boleh menyebabkan serangan jantung secara tiba-tiba yang membawa kepada kematian.

Kandungan cerberin yang tinggi dan bersifat kardiotoxik dalam biji pong-pong menunjukkan potensi penggunaannya sebagai agen kawalan perosak semula jadi. Di Malaysia, tikus merupakan antara perosak utama tanaman seperti padi, kelapa sawit, koko dan tebu yang lazimnya dikawal menggunakan racun kimia seperti zink fosfida dan racun antipembekuan. Walau bagaimanapun, kerintangan tikus terhadap racun generasi pertama telah direkodkan sejak 1980-an, dan pilihan alternatif sekiranya berlaku kerintangan terhadap generasi kedua adalah sangat terhad. Situasi ini menunjukkan keperluan mendesak untuk meneroka bahan semula jadi sebagai alternatif dalam kawalan perosak. Oleh itu, kajian ini dijalankan bagi mengenal pasti kepekatan optimum cerberin melalui kaedah pengekstrakan dan teknik kromatografi yang efektif sebagai asas dalam penilaian potensi pong-pong sebagai agen bioaktif semula jadi untuk kawalan perosak.



Sumber: <https://naturespoisons.com/2015/03/18/cerberin-the-heartbreaker-of-the-suicide-tree-cerbera-odollam/>

Rajah 1. Struktur kimia sebatian cerberin

Kaedah penentuan sebatian cerberin

Kandungan cerberin dalam ekstrak biji pong-pong boleh dikenal pasti dan diukur secara berkesan menggunakan teknik kromatografi cecair berprestasi ultra tinggi yang digabungkan dengan pengesanan spektrometri jisim [*quadrupole time-of-flight* (UHPLC-MS/QTOF)] serta kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC). UHPLC-MS/QTOF digunakan untuk tujuan pengenalanpastian cerberin melalui padanan jisim molekul dan corak fragmen dengan sebatian piawai tulen. Nisbah jisim-ke-cas (m/z) ion dianalisis berdasarkan masa penerbangan (*time of flight*) dalam medan elektrik yang ditetapkan. Ciri-ciri ini membolehkan UHPLC-MS/QTOF memberikan ketepatan tinggi dalam pengesanan sebatian sasaran, walaupun dalam kehadiran campuran matriks yang kompleks. Bagi penentuan kuantitatif sebatian, HPLC digunakan untuk mengasingkan cerberin daripada sebatian-sebatian lain yang hadir dalam sampel dan mengukur kandungannya berdasarkan masa penahanan [*retention time* (tR)] dan keluasan puncak (*peak area*) dalam kromatogram. Penentuan kuantiti dibuat dengan membandingkan isyarat kromatografi ekstrak yang diuji dengan lengkung penentukuran yang diperoleh daripada larutan piawai cerberin. Gabungan kedua-dua teknik kromatografi ini membolehkan pengesanan cerberin secara spesifik dan penentuan kuantitatif yang tepat dalam ekstrak.

Penyediaan dan pengekstrakan sampel

Buah pong-pong yang digunakan dalam kajian ini adalah buah yang telah masak sepenuhnya (matang) yang diperoleh dari beberapa lokasi berbeza di Sekinchan dan Serdang, Selangor. Biji pong-pong dikeluarkan daripada buah, dihiris secara kasar dan dikeringkan menggunakan ketuhar udara panas (Memmert, Jerman) [*Gambar 2(a)*] pada suhu 60 °C selama tiga hari. Suhu dan sampel yang telah kering [*Gambar 2(b)*] kemudiannya dikisar menggunakan pengisar (Biolomix, US). Serbuk yang terhasil dibungkus dan disimpan di dalam bekas kedap udara sebelum diekstrak [*Gambar 2(c)*].

Kaedah pengekstrakan dan pemilihan pelarut yang sesuai amat penting bagi menghasilkan ekstrak tumbuhan dengan sebatian kimia yang optimum. Dalam kajian ini, sampel biji buah pong-pong yang telah dikeringkan diekstrak menggunakan kaedah pengekstrakan pelarut berturutan (*successive solvent extraction*). Kaedah ini berfungsi berdasarkan konsep kelarutan sebatian dalam pelarut yang mempunyai tahap kepolaran berbeza. Setiap sebatian dalam sampel mempunyai ciri kelarutan tertentu, sama ada dalam pelarut tidak polar, separa polar atau polar. Dengan menggunakan pelarut secara berperingkat mengikut kepolaran yang meningkat, komponen bioaktif dapat diekstrak secara sistematik.

Dalam kajian ini, empat pelarut organik dengan tahap kepolaran yang berbeza telah digunakan, bermula daripada heksana (sangat tidak polar), diikuti oleh kloroform (tidak polar), etil asetat (separa polar) dan metanol (paling polar). Proses pengekstrakan dijalankan di dalam kebuk wasap pada suhu bilik (25 – 27 °C). Sebanyak 10 g serbuk biji pong-pong direndam dengan 100 mL pelarut heksana, kloroform,

etil asetat dan metanol (1:10 b:v) secara berasingan. Seterusnya, larutan sampel digoncang pada kelajuan 100 rpm selama kira-kira 24 jam [Gambar 2(d)] menggunakan penggoncang orbital (Protech, Malaysia). Seterusnya, pelet dipisahkan daripada supernatan melalui penapisan menggunakan kertas turas Whatman No. 1 dengan corong turas [Gambar 2(e)]. Proses pengekstrakan serbuk biji pong-pong yang tinggal diulang dua kali lagi dalam keadaan yang sama. Semua hasil turasan yang diperoleh kemudiannya digabungkan dan dipekatkan menggunakan penyejat putar (Buchi, Switzerland) di bawah tekanan rendah [Gambar 2(f)]. Hasil turasan kemudiannya dikeringkan sepenuhnya bagi mendapatkan ekstrak kasar (*crude extract*) heksana. Prosedur pengekstrakan yang sama diaplikasikan pada pelarut berturutan (kloroform, etil asetat dan metanol) bagi mendapatkan ekstrak kasar masing-masing [Gambar 2(g)].



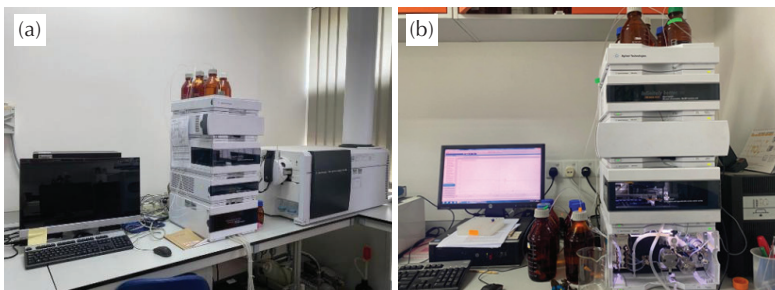
Gambar 2. (a) Pengeringan biji buah pong-pong menggunakan ketuhar, (b) Biji pong-pong yang telah kering, (c) Biji pong-pong yang telah dikisar, (d) Pengekstrakan biji pong-pong menggunakan pelarut yang berbeza, (e) Ekstrak biji pong-pong yang dituras menggunakan kertas turas, (f) Pemekatan ekstrak biji pong-pong menggunakan penyejat berputar dan (g) Pekatan ekstrak biji pong-pong

Penyediaan sebatian kimia piawai cerberin

Bagi tujuan kuantifikasi sebatian cerberin dalam ekstrak biji pong-pong, sebatian kimia piawai cerberin diperlukan sebagai rujukan. Sebanyak 10 mg sebatian kimia piawai cerberin ($C_{32}H_{48}O_9$) (Sigma Aldrich, Amerika Syarikat) ditimbang dan dilarutkan ke dalam 1 mL pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) (gred HPLC) bagi menghasilkan stok yang berkepekatan 10,000 $\mu\text{g/mL}$. Seterusnya, larutan ini dicairkan melalui proses pencairan bersiri bagi menghasilkan larutan piawai dengan enam kepekatan yang berbeza. Julat kepekatan larutan piawai yang digunakan ialah 100 – 10,000 $\mu\text{g/mL}$ bagi membangunkan lengkung kalibrasi piawai dan membolehkan kandungan sebatian tersebut diukur. Kesemua larutan piawai dan ekstrak sampel biji pong-pong yang dihasilkan dituras ke dalam botol *autosampler* menggunakan penuras picagari membran (PTFE dan nilon) bersaiz 0.22 μm dan disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehingga analisis seterusnya dijalankan.

Analisis UHPLC-MS/QTOF

Analisis UHPLC-MS/QTOF dijalankan menggunakan sistem Agilent 6550A yang terdiri daripada pam binari, *autosampler* dan ketuhar turus [Gambar 3 (a)]. Pemisahan kromatografi dilakukan menggunakan turus pemisah Agilent Zorbax Eclipse C18 (4.6 mm $\times$ 100 mm $\times$ 3.5 μm) pada suhu $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sumber pengionan ialah Dual AJS ESI dalam mod positif, beroperasi di bawah pemerolehan AutoMS2 dengan julat imbasan jisim 100 – 1700 m/z . Program kecerunan bermula dengan 80% pelarut A [larutan penimbal ammonium asetat (5 mM, pH 3.8)] dan 20% pelarut B (asetonitril), berubah kepada 15% A dan 85% B dalam masa 0.8 minit dan dikekalkan sehingga 3.00 minit. Pada minit ke-9.60, komposisi kembali kepada keadaan asal dengan 80% A dan 20% B. Kadar aliran ditetapkan pada 0.45 mL/min, dengan isi padu suntikan sebanyak 10 μL . Fragmentasi dilakukan menggunakan lebar pengasingan sederhana dengan tenaga perlanggaran bertingkat daripada 10 – 90 eV. Parameter utama spektrometri jisim (MS) termasuk voltan kapilari 3.5 kV, voltan *fragmentor* 175 V dan voltan *nozzle* 1 kV. Tekanan *nebulizer* dikekalkan pada 35 psig dengan aliran gas *sheath* 11 L/min pada $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan aliran gas 14 L/min pada $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pengenalpastian sebatian dilakukan melalui spektrum jisim imbasan penuh, analisis ion induk dan perbandingan data MS/MS dengan entri pangkalan data.



Gambar 3. Analisis kandungan cerberin menggunakan teknik (a) UHPLC-MS/QTOF dan (b) HPLC

Analisis HPLC

Analisis penentuan kandungan sebatian cerberin secara kuantitatif dilaksanakan menggunakan HPLC di mana turus pemisah, pelarut fasa gerak A dan B serta penetapan parameter yang sama seperti yang diterangkan pada teknik UHPLC-MS/QTOF. Tempoh masa pengasingan ialah 15 minit dan kuantifikasi sebatian cerberin dilakukan pada jarak gelombang 219 nm (pengesanan UV). Kromatogram HPLC menunjukkan kehadiran sebatian cerberin pada masa penahanan pada minit ke-3.5. Kandungan sebatian cerberin dalam ekstrak biji pong-pong ditentukan berdasarkan masa penahanan, spektrum sebatian pada 219 nm dan lengkung kalibrasi yang diperoleh daripada sebatian piawai cerberin.

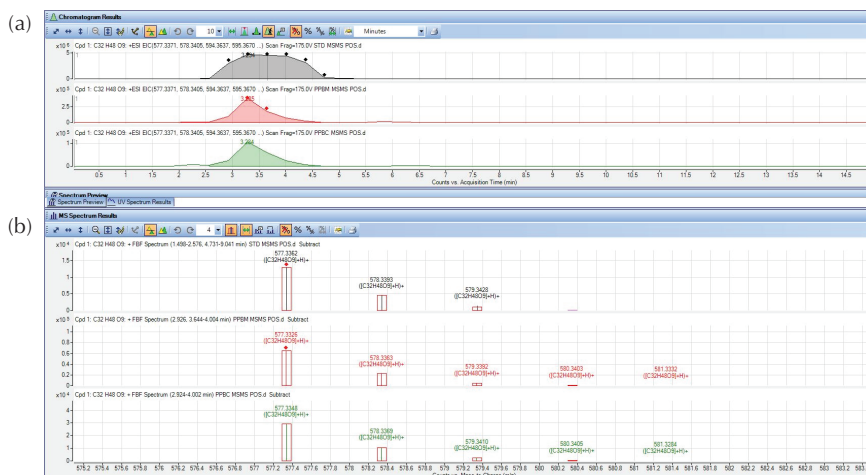
Kandungan sebatian cerberin

Analisis UHPLC-MS/QTOF ke atas ekstrak biji pong-pong yang berbeza (heksana, kloroform, etil asetat dan metanol) menunjukkan kehadiran sebatian cerberin dalam ekstrak metanol dan kloroform. Kehadiran cerberin ini dikenal pasti berdasarkan respons isyarat (*signal*) dan corak fragmen MS/MS yang sepadan dengan sebatian piawai cerberin seperti ditunjukkan dalam *Rajah 2*. Kedua-dua ekstrak ini menunjukkan corak fragmen yang serupa, menandakan kehadiran cerberin. Namun begitu, ekstrak kloroform menghasilkan isyarat yang lebih tinggi berbanding dengan metanol. Tiada isyarat dikesan dalam ekstrak heksana dan etil asetat, mencadangkan ketiadaan cerberin dalam pelarut-pelarut tersebut. *Jadual 1* menunjukkan cerberin yang telah dikenal pasti dalam ekstrak metanol dan kloroform berdasarkan padanan formula molekul, masa penahanan, jisim molekul dan jisim molekul terion yang hampir sama dengan sebatian piawai cerberin. Maklumat ini mengesahkan kehadiran cerberin dalam kedua-dua jenis ekstrak. Untuk pengesahan lanjut kandungan cerberin, analisis kuantitatif menggunakan teknik HPLC telah dijalankan terhadap ekstrak kloroform dan metanol. Hasil analisis menunjukkan hanya ekstrak kloroform disahkan mengandungi cerberin secara kuantitatif, berdasarkan masa penahanan (3.284 – 3.294 minit) dan perbandingan dengan lengkung kalibrasi sebatian piawai cerberin seperti dalam *Rajah 3*.

Walaupun UHPLC-MS/QTOF digunakan untuk pengesanan awal kehadiran cerberin, teknik ini lebih sesuai untuk pengenalpastian sebatian secara kualitatif berdasarkan jisim molekul yang spesifik. Sebaliknya, HPLC digunakan secara meluas untuk analisis kuantitatif kerana membolehkan penentuan kandungan (kepekatan) sebatian dengan lebih tepat berdasarkan masa penahanan, lengkung kalibrasi sebatian piawai rujukan dan isyarat yang konsisten. Perbezaan kandungan cerberin dalam setiap pelarut berkait rapat dengan struktur kimia cerberin dan sifat pelarut yang digunakan. Cerberin ialah sebatian separa polar yang dapat diekstrak secara efektif menggunakan pelarut yang sesuai dengan sifatnya. Oleh itu, pelarut yang sangat tidak polar seperti heksana, pelarut separa polar lemah seperti etil asetat atau terlalu polar seperti metanol didapati tidak dapat mengekstrak cerberin dengan baik. Kloroform yang mempunyai kepolaran sederhana terbukti

paling efisien, mungkin kerana sifatnya yang mampu melarutkan kedua-dua komponen polar dan tidak polar dalam molekul cerberin. Kecekapan pelarut kloroform dalam mengekstrak cerberin menjelaskan mengapa ekstrak ini menghasilkan isyarat MS yang lebih tinggi dan jelas berbanding dengan pelarut lain yang diuji.

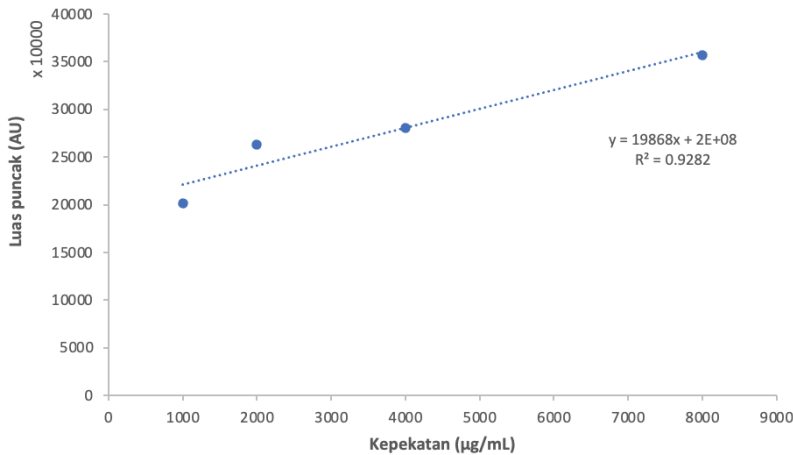
Jadual 2 menunjukkan kandungan cerberin (%) dalam ekstrak kloroform bagi sampel biji pong-pong yang diperoleh daripada tiga lokasi berbeza iaitu Sekinchan 1, Sekinchan 2 dan Serdang. Kandungan cerberin ditentukan berdasarkan lengkung kalibrasi sebatian piawai cerberin seperti dalam Rajah 3. Nilai ini diperoleh daripada luas puncak yang diukur dalam kromatogram dan dikira menggunakan persamaan yang dihasilkan daripada lengkung kalibrasi tersebut. Didapati ekstrak dari Serdang mengandungi kandungan cerberin tertinggi (1.113%), diikuti oleh Sekinchan 2 (1.027%), manakala Sekinchan 1 mencatatkan kandungan terendah (0.677%). Perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara sampel menunjukkan bahawa variasi genetik mungkin mempengaruhi biosintesis cerberin dalam tumbuhan ini. Selain itu, faktor persekitaran seperti suhu, kelembapan, komposisi tanah dan jumlah hujan memainkan peranan penting dalam metabolisme tumbuhan ini yang seterusnya mempengaruhi penghasilan sebatian cerberin.



Rajah 2. (a) Kromatogram ion terekstrak dan (b) fragmen MS/MS bagi sebatian piawai cerberin dan ekstrak biji pong-pong

Jadual 1. Perbandingan masa penahanan dan jisim molekul sebatian piawai cerberin dan cerberin yang dikesan dalam ekstrak biji pong-pong

Sampel	Formula molekul	Masa penahanan	Jisim molekul	Jisim molekul terion (m/z)
Sebatian piawai cerberin	$C_{32}H_{48}O_9$	3.294	576.328	577.3362
Cerberin dalam ekstrak metanol	$C_{32}H_{48}O_9$	3.284	576.325	577.3393
Cerberin dalam ekstrak kloroform	$C_{32}H_{48}O_9$	3.285	576.327	577.3348



Rajah 3. Lengkok kalibrasi sebatian piawai cerberin

Jadual 2. Kandungan sebatian cerberin bagi ekstrak biji pong-pong yang berbeza

Ekstrak	Kandungan cerberin (%)
Kloroform	
Sekinchan 1	0.677 ± 0.089 ^b
Sekinchan 2	1.027 ± 0.214 ^a
Serdang	1.113 ± 0.155 ^a
Heksana	nd
Etil asetat	nd
Metanol	nd

Nota: Huruf yang berbeza dalam lajur menunjukkan perbezaan yang signifikan pada $p < 0.05$, berdasarkan *Duncan Multiple Range Test*; nd: tidak dapat dikesan (*not detected*)

Berbanding dengan ekstrak, kandungan cerberin dalam biji pong-pong yang belum diekstrak adalah lebih rendah kerana cerberin secara semula jadi wujud dalam bentuk terikat dalam sel atau tisu tumbuhan. Proses pengekstrakan menggunakan pelarut yang sesuai, seperti kloroform, mampu memecahkan struktur sel dan membebaskan cerberin daripada matriks sel tumbuhan. Ini seterusnya membolehkan sebatian ini dikesan dan diukur dengan lebih efisien menggunakan teknik kromatografi. Berdasarkan pengiraan, biji pong-pong kering mengandungi 0.028% cerberin bersamaan 280 µg bagi setiap gram biji kering. Jumlah ini adalah jauh lebih rendah berbanding dengan kandungan cerberin dalam ekstraknya yang direkodkan antara 0.677 – 1.113% (*Jadual 2*). Namun, apabila mengambil kira kandungan kelembapan sebanyak 53%, kandungan cerberin dalam biji segar menjadi lebih rendah iaitu 0.0132% (bersamaan 132 µg/g berat basah).

Penemuan ini sejajar dengan kajian pada tahun 2014 yang turut melaporkan kepekatan cerberin sekitar 285.9 µg/g dalam biji pong-pong kering. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa walaupun cerberin hanya wujud dalam jumlah kecil dalam biji pong-pong mentah, ia boleh diekstrak dan dipekatkan menggunakan pelarut yang sesuai, lalu dikesan dengan tepat melalui teknik kromatografi.

Kesimpulan

Kajian ini membuktikan bahawa *Cerbera odollam* atau pong-pong mengandungi cerberin, iaitu sebatian glikosida jantung yang sangat toksik. Pemilihan pelarut yang sesuai seperti kloroform, bersama gabungan teknik kromatografi, UHPLC-MS/QTOF dan HPLC membolehkan pengenalpastian dan penentuan kandungan cerberin dalam biji pong-pong secara tepat dan berkesan. Pendekatan ini menekankan kepentingan strategi analisis bersepadu sebagai penilaian awal sebatian toksik daripada sumber semula jadi. Sifat ketoksikan cerberin mencadangkan potensinya sebagai agen kawalan biologi terhadap perosak. Oleh itu, kajian lanjutan diperlukan untuk meneroka keberkesanan, kestabilan dan keselamatan penggunaannya dalam konteks ini.

Penghargaan

Sekalung penghargaan buat ahli kumpulan penyelidik di Makmal Entomologi, 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 dua dana iaitu Projek Khas Dalam (SIC0333S14) dan Projek Pengukuhan Penyelidikan dan Pembangunan Industri Jagung Bijian (K/G 00335).

Bibliorafi

- Allwood, J. W., Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2008). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant – host interactions. *Physiologia Plantarum*, 132, 117–135.
- Carlier, J., Guitton, J., Bévalot, F., Fanton, L., & Gaillard Y. (2014). The principal toxic glycosidic steroids in *Cerbera manghas* L. seeds: Identification of cerberin, neriifolin, tanghinin and deacetyltanghinin by UHPLC-HRMS/MS, quantification by UHPLC-PDA-MS. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 962, 1–8.
- Gaillard, Y., Krishnamoorthy, A., & Bevalot, F. (2004). *Cerbera odollam*: A 'suicide tree' and cause of death in the state of Kerala, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2–3), 123–126.
- Menezes, R. G., Usman, M. S., Hussain, S. A., Madadin, M., Siddiqi, T. J., Fatima, H., Ram, P., Pasha, S. B., Senthilkumaran, S., Fatima, T. Q., & Luis, S. A. (2018). *Cerbera odollam* toxicity: A review. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 58, 113–116.

- Pitt, J. J. (2009). Principles and Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clinical Biochemistry Reviews*, 30, 19–34.
- Saxena, M., Ekta, B. J., Sankhla, M. S., Muskan, S., Kapil, P., Kumud, A., & Garima, A. (2022). Bintaro (*Cerbera odollam* and *Cerbera manghas*): an overview of its eco-friendly use, pharmacology, and toxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(28), 71970–71983.

Ringkasan

Cerbera odollam atau pong-pong menghasilkan biji yang sangat beracun disebabkan kehadiran cerberin, sejenis glikosida jantung yang toksik dan berbahaya. Kajian ini dijalankan untuk mengekstrak dan menentukan kandungan cerberin daripada sampel biji buah pong-pong menggunakan teknik kromatografi yang bersesuaian. Pemilihan kaedah pengekstrakan serta jenis pelarut yang tepat adalah penting bagi memastikan ekstrak yang diperoleh mengandungi sebatian cerberin dalam kepekatan optimum. Dalam kajian ini, sampel biji pong-pong diekstrak melalui kaedah pengekstrakan pelarut berturutan menggunakan empat jenis pelarut organik yang berbeza kepolaran iaitu heksana, kloroform, etil asetat dan metanol. Pemilihan pelarut yang sesuai bersama gabungan teknik kromatografi UHPLC-MS/QTOF dan HPLC telah membolehkan pengesanan dan penentuan cerberin dalam biji pong-pong secara tepat dan menyeluruh. UHPLC-MS/QTOF membolehkan pengenalpastian cerberin secara kualitatif berdasarkan jisim molekul dan corak fragmen MS/MS yang sepadan dengan sebatian piawai, manakala HPLC mengesahkan kehadirannya secara kuantitatif berdasarkan masa penahanan dan lengkung kalibrasi. Kloroform, pelarut dengan kepolaran sederhana, didapati paling berkesan untuk mengekstrak cerberin yang bersifat separa polar, justeru menghasilkan isyarat MS yang paling tinggi dan kandungan cerberin yang signifikan berbanding pelarut lain yang diuji. Kandungan cerberin yang berbeza mengikut lokasi pengumpulan sampel, menunjukkan kemungkinan pengaruh faktor persekitaran dan variasi genetik terhadap biosintesis cerberin. Strategi analisis bersepadu ini bukan sahaja membolehkan penentuan cerberin secara tepat dan berkesan, malah menekankan kepentingan teknik kromatografi yang sesuai dalam penilaian awal sebatian toksik daripada sumber semula jadi.

Summary

Cerbera odollam, also known as *pong-pong*, produces seeds that are highly poisonous due to the presence of cerberin, a toxic and hazardous cardiac glycoside. This study aimed to extract and quantify cerberin from *pong-pong* fruit seed samples using robust chromatographic techniques. The selection of an appropriate extraction method and solvent system was critical to ensure efficient recovery of cerberin at optimal concentrations. In this study, a successive solvent extraction method was conducted using four organic solvents; hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. A combination of ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-MS/QTOF) and high performance liquid chromatography (HPLC) enabled comprehensive qualitative and quantitative analyses, respectively. UHPLC-MS/QTOF facilitated the identification of cerberin based on its accurate mass and characteristic MS/MS fragmentation patterns matched against reference standards, while HPLC confirmed its concentration through retention time matching and calibration curve analysis.

Chloroform, a moderately polar solvent, was the most effective for extracting the semi-polar cerberin, yielding the highest MS signal and the most significant cerberin content among all solvents tested. Variations in cerberin levels across different collection sites suggest that environmental and genetic factors may influence its biosynthesis. This integrated analytical strategy underscores the importance of employing precise chromatographic techniques for precise detection and quantification of toxic phytochemicals from natural sources.

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

Norzainih Jasmin Jamin (Dr.), Muhammad Faris Mohd Radzi dan Azimah Abd Kadir
Pusat Penyelidikan Tanaman Industri
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor

Che Ammar Abqari Che Omar
Pusat Penyelidikan Hortikultur
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor