



## PERANAN STEROL SEBAGAI PENUNJUK BIO-LIPID BAGI BAHAN ORGANIK DI KUALA SELANGOR, SELANGOR, MALAYSIA

NORFARIZA HUMRAWALI, MASNI MOHD ALI & MOHD TALIB LATIF

Pusat Pengajian Sains Sekitaran dan Sumber Alam, Fakulti Sains dan Teknologi,  
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor.

Emel: [masni@ukm.my](mailto:masni@ukm.my)

No. Tel. : 03-89214054 No. Faks : 03-89253357

### ABSTRAK

Di Malaysia penggunaan sebatian sterol sebagai penunjuk bio-lipid untuk menilai kandungan bahan organik di dalam sedimen akuatik adalah masih di peringkat awal. Kajian ini menyetujui penggunaan sterol untuk mengenal pasti input bahan organik daripada pelbagai sumber yang terdapat di dalam sampel sedimen permukaan yang diambil dari Kuala Selangor dan dianalisis dengan menggunakan kaedah pengekstrakan dan dikuantifikasi menggunakan GC-MS. Hasilnya menunjukkan sepuluh sebatian sterol dikenal pasti hadir. Fitosterol merupakan sebatian dominan dengan menyumbangkan 56% daripada jumlah sterol yang hadir, diikuti oleh kolesterol dan sterol daripada sumber marin masing-masing dengan 14% daripada jumlah sterol manakala selebihnya dalam julat 1-8%. Indeks sumber sterol (SSI) turut menunjukkan kandungan fitosterol yang tinggi di kesemua stesen persampelan tetapi pada kadar yang berbeza bagi berlainan jenis sebatian fitosterol. Penilaian kontaminasi kumbahan menggunakan nisbah coprostanol/kolesterol pula menunjukkan input daripada sumber biogenik yang tinggi berbanding sisa kumbahan yang turut disokong oleh nisbah coprostanol/(coprostanol + cholestanol) yang memberikan nilai kurang dari 0.7 mewakili tiada kontaminasi kumbahan berlaku di kawasan kajian. Hasil analisis yang dilakukan menunjukkan sedimen di kawasan kajian mengandungi campuran sterol daripada pelbagai sumber walaupun didominasi oleh fitosterol dan bebas dari kontaminasi kumbahan.

**Kata kunci :** *penunjuk bio-lipid; sterol; bahan organik; fitosterol; kolesterol; sterol kumbahan*

## STEROLS AS LIPID BIOMARKERS TO ASSESS ORGANIC MATTER AT KUALA SELANGOR, SELANGOR, MALAYSIA

### ABSTRACT

*Application of sterol as lipid biomarkers to assess input of organic matter in aquatic sediments is still at early phase in Malaysia. In this study we focused on sterols to identified contribution of organic matter derived from various sources in surface sediments samples taken from Kuala Selangor, Selangor and the analyses were performed with GC-MS. The results showed 10 sterol compounds have been quantified. Phytosterols was the principal compounds which accounted 56% of total sterols, followed by cholesterol and marine-derived sterols which both accounted 14% of total sterols and the rest are in the range of 1-8%. Sterol Source Index (SSI) also reflected phytosterols predominant at all sampling stations but in different degree based on phytosterol compounds. Another issue arise is sewage contamination assessment using coprostanol/cholesterol ratio which indicates high input from biogenic source compared to sewage source. This finding also supported by coprostanol/(coprostanol + cholestanol) ratio where all sampling stations have the value less than 0.7 indicative uncontaminated area. This analytical study indicates that the sediments in the study area consist of a mixture of sterols from various sources even though dominated by phytosterols and free from sewage contamination.*

**Keywords:** lipid biomarker; sterol; organic matter; phytosterols; cholesterol; fecal sterols

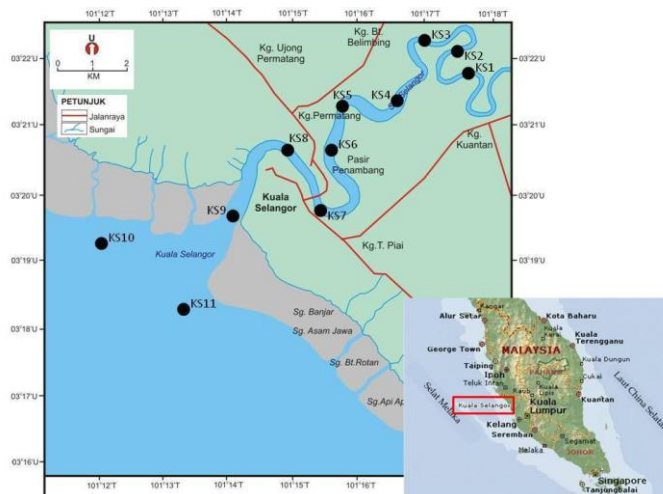
### PENDAHULUAN

Sebatian sterol yang merupakan sebatian lipid telah terbukti berpotensi bertindak sebagai penunjuk biologi bagi input bahan organik ke persekitaran akuatik kerana sifatnya yang unik (Froehner et al. 2008, Méjanelle & Laureillard 2008, Santos et al. 2008 dan Vonk et al. 2008). Sterol merupakan sebatian hidrofobik dan apabila memasuki persekitaran akuatik, sebatian ini akan terjebak pada partikel terampai dalam turus air sebelum termendak ke lapisan sedimen (Froehner et al. 2008). Di lapisan sedimen pula, sterol tidak mengalami proses degradasi yang membolehkan sterol kekal untuk suatu tempoh yang lama terutamanya di persekitaran anoksik (Seguel et al. 2001; Mudge & Duce 2005). Keunikan sterol juga terserlah apabila organisma yang berlainan menghasilkan sterol yang berbeza (Santos et al. 2008). Maka, kelebihan yang dimiliki oleh sterol ini, menjadikannya sebagai penunjuk bio-lipid bagi kajian melibatkan kandungan, taburan, sumber dan pergerakan bahan organik di persekitaran akuatik.

Objektif utama kajian ini dilaksanakan adalah untuk menentukan taburan variasi sterol di dalam sedimen permukaan di Kuala Selangor dan mengenal pasti sumber utama sebatian tersebut di kawasan kajian.

## BAHAN DAN KAEDAH LOKASI KAJIAN DAN PERSAMPELAN

Lokasi kajian terletak di Kuala Selangor yang merupakan perkampungan nelayan dan terletak di tepian Sungai Selangor di mana aktiviti persampelan telah dijalankan. Sungai Selangor adalah salah satu sistem sungai utama di Selangor yang mengalir terus ke Selat Melaka. Di sekitar kawasan persampelan terdapatnya kawasan hutan tanah rata serta paya bakau. Pokok bakau yang terdapat di sepanjang tepian Sungai Selangor adalah habitat bagi koloni kelip-kelip yang merupakan tarikan perlancongan di kawasan Kuala Selangor. Selain itu, kawasan perkampungan di sepanjang Sungai Selangor juga dipenuhi dengan dusun tanaman campuran, ladang kelapa sawit dan ladang kelapa. Oleh yang demikian, Sungai Selangor mengalir merentas ladang kelapa sawit dan tidak memasuki sebarang kawasan perbandaran utama.



Rajah 1. Lokasi kajian dan persampelan

Jadual 1. Koordinat stesen persampelan

Stesen persampelan	Longitud	Latitud	Stesen persampelan	Longitud	Latitud
KS1	03°21'50	101°17'46	KS7	03°19'53	101°15'7
KS2	03°22'05	101°17'31	KS8	03°20'48	101°15'01
KS3	03°22'22	101°17'02	KS9	03°19'39	101°14'00
KS4	03°21'22	101°16'49	KS10	03°19'17	101°12'00
KS5	03°21'18	101°15'51	KS11	03°18'23	101°13'21
KS6	03°20'42	101°15'37			

Sampel sedimen permukaan diambil menggunakan pencekup PONAR di sebanyak sebelas stesen persampelan di sepanjang Sungai Selangor (Rajah 1; Jadual 1). Sampel dimasukkan ke dalam botol kaca dan disimpan pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$  sehingga analisis sterol dilakukan.

#### ANALISIS STEROL

Kaedah pengekstrakan untuk analisis sterol diadaptasi daripada literatur Masni & Mudge (2006). Lebih kurang 30-40g berat basah sampel sedimen dihidrolisis melalui kaedah refluks selama 4 jam dengan menggunakan 50 ml 6% kalium hidroksida dalam metanol. Sampel kemudiannya diempar pada 4000 r.p.m selama tiga minit dan supernatan yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong pemisah.

Bahagian lipid tidak berkutub diekstrak daripada sampel dengan menambahkan 20 ml heksana dan 10 ml air suling nyah-ion ke dalam sampel dan kemudian digoncang dengan kuat sehingga dua lapisan terbentuk. Prosedur ini diulangi untuk memaksimumkan pengekstrakan. Sampel yang terdiri daripada lipid tidak berkutub seterusnya disejat dengan menggunakan penyejat berputar pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$  dan dilarutkan semula dalam 2-3 ml heksana sebelum dipindahkan ke dalam vial. Natrium sulfat kontang ditambah ke dalam sampel untuk menyingkirkan molekul air dan sebatian berkutub yang masih hadir di

dalam sampel. Larutan sampel seterusnya dituras dengan kertas turas dan dikering dengan menggunakan gas nitrogen (OFN).

Prosedur terakhir sebelum analisis sampel menggunakan GC-MS adalah fasa penerbitan yang bertujuan untuk menjadikan sampel lebih stabil untuk suntikan kromatografi gas (GC) nanti. Sebanyak 2-3 titik bis(trimetilsilil)trifloroacetamida (BSTFA) ditambahkan ke dalam sampel sebelum dipanaskan di dalam blok pemanas pada suhu 60°C selama 10 minit. Sampel dikering menggunakan gas nitrogen (OFN) sekali lagi dan dilarutkan semula dengan 1 ml heksana. Sampel seterusnya disimpan pada suhu -20°C sehingga dianalisis menggunakan kromatografi gas-spektrometri jisim (GC-MS).

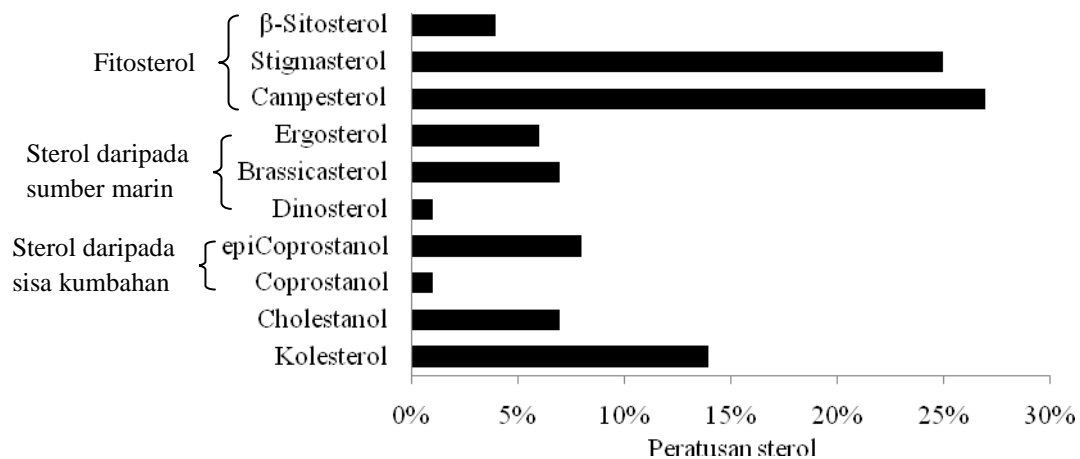
Kromatografi gas - spektrometri jisim (GC-MS) (Perkin Elmer Clarus 500) digunakan untuk menganalisis sebatian alkohol lemak yang terdapat di dalam sampel. Suhu program bermula pada 80°C dan meningkat 15°C min<sup>-1</sup> sehingga mencapai suhu 300°C yang kemudiannya meningkat 5°C min<sup>-1</sup> kepada suhu maksimum 350°C selama 10 minit. Larutan kolesterol-TMS pada pelbagai kepekatan digunakan sebagai larutan piawai. Setiap sampel disuntik untuk dianalisis sekali sahaja iaitu sebanyak 5 µL.

## HASIL DAN PERBINCANGAN

Hasil analisis sterol menggunakan sampel sedimen permukaan daripada Kuala Selangor, Selangor menunjukkan sepuluh sebatian sterol utama dikenal pasti hadir. Secara keseluruhannya kawasan kajian menunjukkan variasi sebatian sterol yang berpunca daripada pelbagai sumber di sekitar kawasan tersebut. Kepekatan setiap sebatian sterol disenaraikan dalam Jadual 2 dan peratusan individu sebatian sterol ditunjukkan dalam Rajah 2.

Jadual 2. Kepekatan sterol bagi setiap stesen persampelan (ng g<sup>-1</sup> berat kering sedimen)

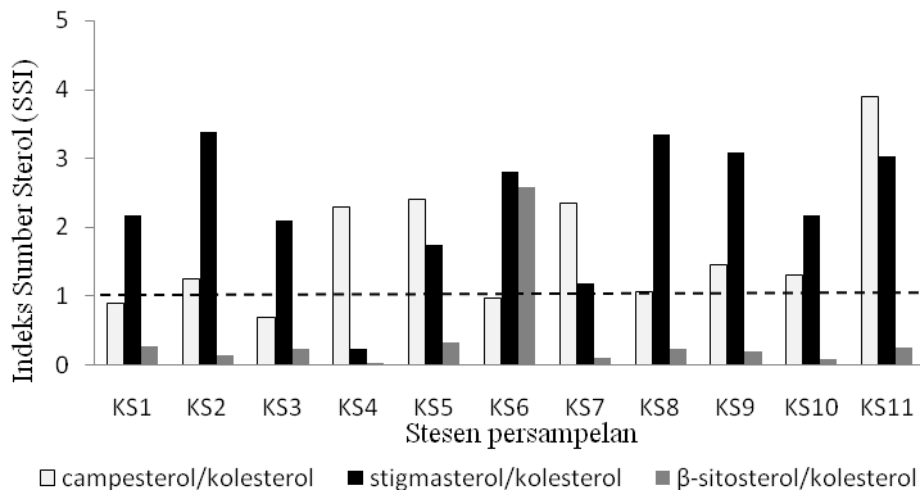
	KS1	KS2	KS3	KS4	KS5	KS6	KS7	KS8	KS9	KS10	KS11
Coprostanol	16.64	33.09	54.90	91.51	219.05	45.80	49.00	28.42	80.64	46.45	96.54
epicoprostanol	365.56	164.47	213.77	129.96	567.31	1497.01	336.60	249.31	208.03	332.78	1101.66
Cholesterol	598.56	551.54	592.37	2394.46	433.82	367.50	1079.19	456.58	610.94	781.87	1354.24
Cholestanol	395.93	504.60	199.96	970.59	147.21	124.78	891.82	345.35	205.17	688.90	432.80
Brassicasterol	230.55	235.88	190.18	857.05	32.01	1476.48	614.54	150.10	194.60	381.92	315.41
Ergosterol	279.21	162.93	267.04	201.30	511.21	1200.27	267.74	171.35	240.34	239.91	857.76
Campesterol	531.93	692.57	412.96	5498.88	1042.96	354.32	2542.62	486.96	891.77	1025.44	5281.75
Stigmasterol	1294.77	1859.95	1242.97	525.30	751.03	1026.35	1277.66	1524.48	1881.72	1697.76	4098.51
Sitosterol	156.78	70.76	134.02	62.41	138.28	949.05	94.51	106.31	115.84	65.62	317.89
Dinosterol	0.00	0.00	0.00	0.00	29.98	33.35	233.33	94.67	134.99	119.04	342.09



Rajah 2. Peratusan individu sebatian sterol

Fitosterol yang merangkumi tiga sebatian utama iaitu  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol dan campesterol merupakan sebatian dominan yang dikenal pasti hadir di kawasan kajian. Di antara ketiga-tiga sebatian tersebut, kandungan campesterol adalah yang paling tinggi iaitu 27% daripada keseluruhan sterol, diikuti oleh stigmasterol (25%) manakala  $\beta$ -sitosterol hanya 4%. Fitosterol adalah sterol utama bagi tumbuhan terestrial (Santos et al. 2008) tetapi juga dilaporkan hadir dalam kuantiti yang sedikit di dalam alga dan fitoplankton air tawar (M $\acute{e}$ janelle & Laureillard 2008; Vonk et al. 2008). Namun, sumber utama fitosterol di kawasan kajian adalah limpahan pokok bakau yang terdapat di sepanjang tepian sungai sehingga ke kawasan muara. Selain itu, di sekitar kawasan kajian juga terdapatnya aktiviti pertanian oleh penduduk setempat dan perladangan kelapa sawit serta kelapa dijalkan.

Selain penilaian berdasarkan kepekatan sebatian fitosterol, penggunaan indeks sumber sterol (SSI) juga mengesahkan kemasukkan bahan organik dari sumber terestrial khususnya fitosterol ke persekitaran akuatik (Mudge & Norris 1997). Hasil SSI yang dikira menggunakan nisbah campestro/kolesterol, stigmasterol/kolesterol dan  $\beta$ -sitosterol/kolesterol menunjukkan kandungan setiap sebatian fitosterol yang berbeza bagi setiap stesen persampelan (Rajah 3). Nilai SSI yang melebihi 1 menunjukkan kandungan sebatian fitosterol yang mendominasi stesen persampelan tersebut. Di antara faktor yang mempengaruhi perbezaan input ketiga-tiga sebatian tersebut adalah kandungan sterol yang berbeza bagi berlainan spesies tumbuhan serta berlainan peringkat pertumbuhan tumbuhan (Puglisi et al. 2003).



Rajah 3. Indeks sumber sterol (SSI) bagi setiap stesen persampelan

Sebatian sterol utama di persekitaran iaitu kolesterol, hadir di kesemua stesen persampelan iaitu sebanyak 14% daripada jumlah keseluruhan sterol. Walaupun kolesterol merupakan sterol utama yang dihasilkan

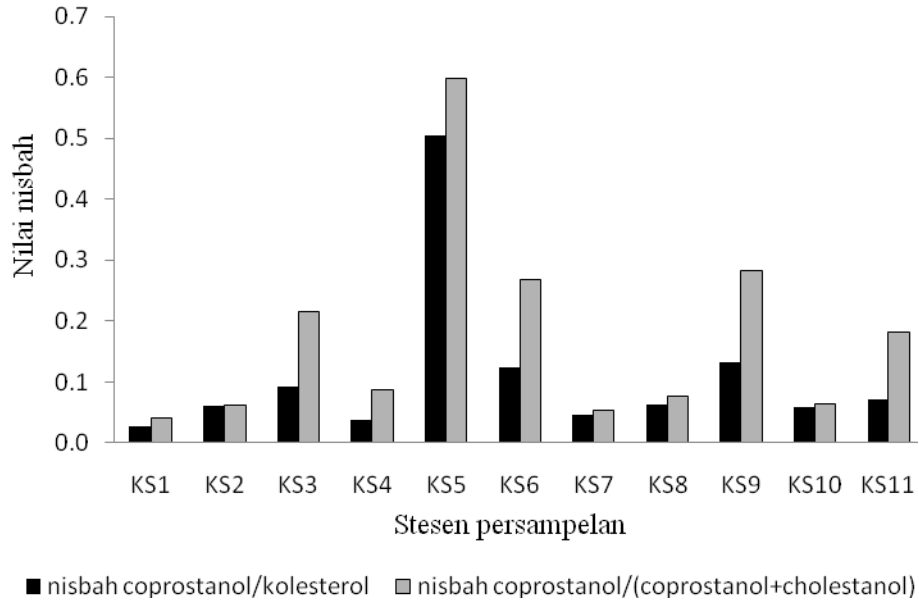
oleh haiwan (Puglisi et al. 2003) tetapi sebatian ini turut dihasilkan oleh organisma lain seperti tumbuhan vaskular dan organisma akuatik khususnya plankton, diatom, makrofit dan alga (Logan et al. 2001; Azevedo 2003). Selain itu, sumber antropogenik seperti sisa kumbahan dan air larian yang membawa sisa baja serta pestisid organik turut menyumbang kandungan kolesterol ke persekitaran akuatik (Reeves & Patton 2001; Seguel et al. 2001). Oleh kerana sumbernya yang pelbagai, kolesterol sukar dijadikan penunjuk spesifik suatu sumber, sebaliknya seringkali diguna bersama sebatian sterol yang lain dalam bentuk nisbah. Salah satu isomer kolesterol iaitu cholestanol juga hadir di kesemua stesen persampelan yang terdiri 7% daripada jumlah keseluruhan sterol. Cholestanol terhasil daripada tindakan penghidrogenan kolesterol oleh bakteria tetapi boleh juga diperolehi daripada sumber lain seperti tumbuhan terestrial serta akuatik, dan plankton (Devane et al. 2006; Froehner et al. 2008). Namun begitu, cholestanol cenderung diguna sebagai penunjuk bagi pencemaran kumbahan dalam bentuk nisbah dengan sterol daripada sisa kumbahan (Froehner et al. 2008).

Input sisa kumbahan ke persekitaran lazimnya ditentu berdasarkan kehadiran coprostanol yang juga merupakan isomer kolesterol, dan epicoprostanol yang merupakan isomer coprostanol. Kedua-dua sebatian tersebut hadir di kesemua stesen persampelan tetapi epicoprostanol lebih mendominasi kawasan kajian iaitu 8% daripada jumlah keseluruhan sterol berbanding coprostanol yang hanya 1%. Coprostanol terbentuk oleh tindakan bakteria terhadap kolesterol di dalam sistem pencernaan manusia dan kebanyakan haiwan tetapi sebatian ini hadir pada kadar yang lebih banyak di dalam sisa kumbahan manusia berbanding haiwan (Puglisi et al. 2003; Shah et al. 2007). Epicoprostanol pula terhasil daripada tindakan degradasi bakteria terhadap coprostanol yang menunjukkan sisa kumbahan yang telah melalui proses rawatan atau sisa kumbahan yang telah lama berada di persekitaran (Mudge & Duce 2005; Froehner et al. 2008). Oleh yang demikian kandungan epicoprostanol yang lebih tinggi berbanding coprostanol di kawasan kajian menunjukkan tiada pencemaran kumbahan berlaku. Ini turut disokong oleh dua nisbah yang seringkali diguna dalam penentuan tahap pencemaran kumbahan (Rajah 4); nisbah coprostanol/kolesterol dan coprostanol/(coprostanol+cholestanol).

Nisbah coprostanol/kolesterol menunjukkan pencemaran kumbahan berlaku apabila nilai nisbah  $>0.2$  (Grimalt et al. 1990) tetapi nilai nisbah  $<1$  pula menunjukkan input daripada sumber biogenik (Fattore et al. 1996) seperti fitoplankton, zooplankton dan tumbuhan akuatik yang menghasilkannya pada kuantiti yang lebih rendah (Reeves & Patton 2005; Devane et al. 2006), manakala nilai nisbah coprostanol/(coprostanol+cholestanol)  $>0.7$  juga menunjukkan berlakunya pencemaran kumbahan



(Grimalt et al. 1990). Maka, berdasarkan nilai penghad tersebut, kawasan kajian adalah bebas daripada pencemaran kumbahan, namun stesen KS5 mempunyai nilai nisbah yang tinggi bagi kedua-dua nisbah tersebut yang berkemungkinan mempunyai kandungan sisa kumbahan yang tinggi tetapi tidak sehingga berlakunya pencemaran kumbahan.



Rajah 4 Nisbah penilaian kesan input sisa kumbahan

Walaupun kawasan kajian terletak agak jauh dari sumber marin, sebatian sterol yang signifikan dengan organisma marin turut dikenal pasti hadir iaitu brassicasterol, ergosterol dan dinosterol masing-masing dengan 7%, 6% serta 1% daripada jumlah keseluruhan sterol. Umumnya, brassicasterol dilaporkan berpunca daripada diatom marin dan dihasilkan pada kuantiti yang rendah oleh diatom air tawar (Hernandez et al. 2008; Bechtel & Schubert 2009) manakala ergosterol merupakan sterol utama bagi fungi dan beberapa spesies mikroalga (Fahl & Stein 1999; Puglisi et al. 2003) dan dinosterol yang hanya hadir di tujuh stesen persampelan sahaja adalah berpunca daripada dinoflagelat (Santos et al. 2008).

#### KESIMPULAN

Hasil analisis di dalam sampel sedimen permukaan di Kuala Selangor, Selangor menunjukkan kepelbagaian sebatian sterol yang hadir pada kepekatan yang berbeza dan diterima daripada input pelbagai sumber yang terdapat di sekitar kawasan kajian. Walau bagaimanapun, fitosterol merupakan sterol dominan yang dikenal pasti iaitu 56% daripada keseluruhan sterol, diikuti oleh sebatian kolesterol dan sterol daripada sumber marin yang masing-masing menyumbang 14% daripada keseluruhan sterol

manakala sterol daripada sisa kumbahan 9% dan isomer kolesterol iaitu cholestanol 7%. Nilai SSI yang diperoleh juga menunjukkan fitosterol mendominasi kawasan kajian tetapi kandungan di antara ketiga-tiga sebatian fitosterol adalah berbeza bagi berlainan stesen persampelan. Penilaian tahap pencemaran kumbahan berdasarkan kepekatan coprostanol yang amat rendah dan nilai nisbah coprostanol/kolesterol serta coprostanol/(coprostanol+cholestanol) pula menunjukkan tiada pencemaran kumbahan berlaku di kawasan kajian.

#### PENGHARGAAN

Jutaan terima kasih kepada Kementerian Sains Teknologi dan Inovasi Malaysia di atas pembiayaan penyelidikan ini melalui geran Sciencefund 04-01-02-SF0193 dan Universiti Kebangsaan Malaysia serta semua pihak yang terlibat.

#### RUJUKAN

- Azevedo, D. de A. 2003. A preliminary investigation of the polar lipids in recent tropical sediment from aquatic environments at Campos dos Goytacazes, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14 (1) : 97-106.
- Bechtel, A. & Schubert, C. J. 2009. Biogeochemistry of particulate organic matter from lakes of different trophic levels in Switzerland. *Organic Geochemistry*. 40 (4): 441-454.
- Devane, M., Saunders, D. & Gilpin, B. 2006. Faecal sterols and fluorescent whiteners as indicators of the source of faecal contamination. *Chemistry in New Zealand*. 70 (3) : 74-77.
- Fahl, K. & Stein, R. 1999. Biomarkers as organic-carbon-source and environmental indicators in the Late Quaternary Arctic Ocean : problems and perspectives. *Marine Chemistry*. 63 : 293-309.
- Fattore, E., Benfenati, E., Marelli, R., Cools, E. & Fanelli, R. 1996. Sterols in sediment samples from Venice Lagoon, Italy. *Chemosphere*. 33 : 2383-2393.
- Froehner, S., Martins, R. F. & Errera, M. R. 2008. Assessment of fecal sterols in Barigui River sediments in Curitiba, Brazil. *Environment Monitoring Assessment*. DOI: 10.1007/s10661-008-0559-0
- Grimalt, J.O. & Albaigés, J. 1990. Characterization of the depositional environments of the Ebro Delta (western Mediterranean) by the study of sedimentary lipid markers. *Marine Geology*. 95 : 207-224.
- Hernandez, M. T., Mills, R. A. & Pancost, R. D. 2008. Algal biomarkers in surface waters around the Crozet plateau. *Organic Geochemistry*. 39 : 1051-1057.
- Logan, G. A., Fredericks, D. J., Smith, C. & Heggie, D. T. 2001. Sources of organic matter in Wallis Lake. *AGSO Research Newsletter 2001* : 15-20.

- Masni, M. A. & Mudge, S. M. . 2006. Cluster analysis in lipid biomarker studies: A case of Clyde Sea. *Sains Malaysiana*. 35(2): 41-47.
- Méjanelle, L. & Laureillard, J. 2008. Lipid biomarker record in surface sediments at three sites of contrasting productivity in the tropical North Eastern Atlantic. *Marine Chemistry*. 108 : 59-76.
- Mudge, S.M. & Duce, C.E. 2005. Identifying the source, transport path and sinks of sewage derived organic matter. *Environmental Pollution*. 136 : 209-220.
- Mudge, S.M. & Norris, C.E. 1997. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.) : a comparison between fatty alcohols and sterols. *Marine Chemistry*. 57 : 61-84.
- Puglisi, E., Nicelli, M., Capri, E., Trevisan, M. & Del Re, A. M. 2003. Cholesterol,  $\beta$ -sitosterol, ergosterol and coprostanol in agricultural soils. *Journal of Environmental Quality*. 32 : 466-471.
- Reeves, A. D. & Patton, D. 2001. Measuring change in sterol input to estuarine sediments. *Physics and Chemistry of The Earth*. 26 : 753-757.
- Reeves, A.D. & Patton, D. 2005. Faecal sterols as indicators of sewage contamination in estuarine sediments of the Tay Estuary, Scotland : an extended baseline survey. *Hydrology and Earth System Sciences*. 9 : 81-94.
- Santos, E. S., Carreira, R. de S. & Knoppers, B. A. 2008. Sedimentary sterols as indicators of environmental conditions in Southeastern Guanabara Bay, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*. 56 : 97-113.
- Seguel, C.G., Mudge, S.M., Salgado, C. & Toleda, M. 2001. Tracing sewage in the marine environment : Altered signatures in Concepción Bay, Chile. *Water Research*. 17 : 4166-4174.
- Shah, V. G., Dunstan, R. H., Geary, P. M., Coombes, P., Roberts, T. K. & Nagy-Felsobuki, E. V. 2007. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Research*. 41 : 3691-3700.
- Vonk, J. E., van Dongen, B. E. & Gustafsson, Ö. 2008. Lipid biomarker investigation of the origin and diagenetic state of sub-arctic terrestrial organic matter presently exported into the northern Bothnian Bay. *Marine Chemistry*. 112 : 1-10.