

**PENENTUAN β -KAROTEN DALAM BUAH WORTEL (*DAUCUS CAROTA*)
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (U-HPLC)
(*Determine of β -Caroten in carrot (*Daucus carota*) using Ultra High Performance
Liquid Chromatograph (U-HPLC)*)**

Sonlimar Mangunsong^{1}, Rifqi Assiddiqy², Eka Puspa Sari³, Priscila Natalia Marpaung⁴, Rahma Arum Sari⁵*

¹Program Studi Farmasi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Palembang, Indonesia. Email: sonlimar@gmail.com

²Program Studi Farmasi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Palembang, Indonesia. Email: rassiddiqy@gmail.com

³Program Studi Farmasi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Palembang, Indonesia. Email: o09eka_x3@yahoo.com

⁴Program Studi Farmasi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Palembang, Indonesia.

Email: priscilanataliamarpaung@gmail.com

⁵Program Studi Farmasi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Palembang, Indonesia. Email: rahmaarumsari149@gmail.com

Received: 28/2/2019

Accepted: 26/3/2019

Published online: 13/5/2019

ABSTRAK

Pola hidup masyarakat yang cenderung tidak sehat menyebabkan banyak radikal bebas di dalam tubuh yang dapat mengakibatkan berbagai penyakit terutama penyakit degeneratif. Perlindungan tubuh dari serangan radikal bebas, perlu antioksidan seperti β -karoten. Salah satu sayuran yang mengandung β -karoten adalah wortel, jumlahnya sangat banyak dalam pertanian. Berdasarkan warnanya, maka kandungan β -karoten yang terdapat dalam wortel menjadi penentu kandungan beta karoten. Metode ekstraksi yang aman dari bahan pelarut kimia mutlak diperlukan. Untuk mengetahui kandungan β -karoten dalam wortel, lebih dahulu dilakukan penghalusan dengan blender, kemudian sari difilter /dipisahkan dari ampasnya. Sari yang diperleh ditambahkan garam kalsium kemudian disentrifus 3000 rpm 15 menit. Pelet dipisahkan dari larutannya, diuapkan hingga kering. Diukur pada panjang gelombang 450-460. Pelet sebagai garam kalsium betakaroten dianalisa dengan U-HPLC. Pelet selanjutnya diukur pada panjang gelombang 460. ditetapkan kadarnya secara kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom C18 dan fase gerak kloroform-metanol (95:5) dengan laju alir 1 ml/menit pada panjang gelombang 460 nm. Kandungan β -karoten dalam pemeriksaan sampai 92,5%. Waktu retensi yang diperoleh adalah 1,903 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini dapat digunakan untuk penarikan dan penetapan kadar β -karoten dalam tanpa pelarut kimia organik.

Kata kunci : β -karoten, kromatografi cair kinerja tinggi, HPLC

ABSTRACT

The lifestyle of people who tend to be unhealthy causes a lot of free radicals in the body which can cause various diseases, especially degenerative diseases. To protect the body from attacks by free radicals, the body needs

antioxidants such as β -carotene. One of the vegetables containing β -carotene is "wortel" *Daucus carota*, that is very large in agriculture. The spread of beta carotene from carrots with chemical solvents has been done a lot, but without chemical solvents it has never been done. Based on the color, the content of β -carotene contained in carrots determines the content of beta carotene. The juice obtained by calcium salt was then centrifuged for 3000 rpm 15 minutes. The pellets are separated from the solution, evaporated to dryness, measured at a wavelength of 450-460. Pellets as beta-carotene calcium salts were analyzed by U-HPLC. The next pellet is measured at 460 wavelengths. The levels are determined by high performance liquid chromatography using C18 column and the mobile phase of chloroform-methanol (95:5) with a flow rate of 1 ml / minute at a wavelength of 460 nm. The content of β -carotene in the examination is up to 92,5%. The retention time obtained is 1,903 minutes. The results showed that this method can be used for the withdrawal and determination of β -carotene levels without organic chemical solvents.

Keywords: β -carotene, High Performance Liquid Chromatography, HPLC

PENDAHULUAN

Antioksidan belakangan ini telah banyak dibicarakan bukan hanya di kalangan ilmuwan tetapi juga dalam masyarakat yang semakin menyadari manfaatnya.¹ Selain dikenal sebagai senjata ampuh untuk menangkal berbagai penyakit, antioksidan juga dipercaya bisa membuat awet muda.² Seiring dengan perkembangan zaman,

* Penulis untuk korespondensi: sonlimar@gmail.com

menimbulkan perubahan pada gaya hidup masyarakat yang cenderung menjalani gaya hidup yang tidak sehat seperti merokok, minum minuman keras, mengkonsumsi *junk food* dan terkena paparan sinar ultraviolet secara berlebihan. Akibat dari gaya hidup tersebut, di dalam tubuh banyak terkandung radikal bebas yang sangat membahayakan tubuh. Senyawa radikal bebas ini dapat terbentuk akibat dari proses kimia yang terjadi di dalam tubuh, seperti proses oksidasi, metabolisme dan peradangan.^{3,4}

Dalam jumlah tertentu radikal bebas dibutuhkan sebagai bagian dari pertahanan tubuh. Namun pada kenyataannya radikal bebas sering terbentuk melebihi kebutuhannya sehingga peranannya berubah menjadi liar atau destruktif (merusak) yang dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti pengerasan pembuluh darah, jantung koroner, stroke, kanker dan penuaan dini. Untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, maka tubuh memerlukan antioksidan, antara lain terdiri dari β -karoten, vitamin E, vitamin C dan selenium³.

β -karoten merupakan salah satu antioksidan yang dapat mencegah penyakit. Senyawa antioksidan ini mampu menetralkan zat-zat radikal bebas dalam tubuh yang merupakan sumber pemicu timbulnya berbagai penyakit terutama penyakit degeneratif. Secara alamiah β -karoten banyak terdapat pada buah-buahan seperti, labu, buah merah, semangka, mangga, tomat, melon dan cabe. Salah satu sumber utama yang mengandung β -karoten adalah wortel. Wortel digolongkan kelompok sayur-sayuran, kandungan β -karoten yang terdapat pada wortel juga berbeda-beda.³ Perbedaan kandungan β -karoten dalam wortel dan mengingat β -karoten adalah senyawa antioksidan yang bermanfaat maka untuk mengetahui kandungan β -karoten diperlukan metode untuk menentukan kadarnya.^{4,5}

Pada penelitian ini dilakukan Isolasi dan Pemeriksaan kadar menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan fase balik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode yang tepat dan teliti dalam penentuan β -karoten

pada wortel, serta mengetahui kandungan β -karoten yang dari wortel.

METODE

Beberapa penggunaan bahan yang dibutuhkan dalam beta karoten dalam buah yaitu: wortel, yang diperoleh dari Super market Palembang, bahan β -karoten, kloroform tetrahidrofuran (THF), metanol, aquabides, acetonitril grade HPLC.

Alat yang digunakan dalam penentuan β -karoten yaitu Kromatografi cair kinerja tinggi (U-HPLC *Thermo Versi Ultimate 3000 series*), *Spektrofotometer ultraviolet – cahaya tampak (Analytic Jena specord 200)*, timbangan analitik (*Sartorius Dragon*), timbangan mikro (*Sartorius Dragon*), blender (*Philips*), Rotavapor (*Buchi V-800*), corong pisah, alat-alat gelas, Kertas saring *Whatman No 40*.

1. Metode Penetapan Kondisi Optimum HPLC/KCKT

a. Penetapan panjang gelombang serapan maksimum β -karoten

Sejumlah 20 mg β -karoten isolate dimasukkan ke dalam labu tentukur 50-mL larutkan dan encerkan dengan kloroform hingga tanda. Kemudian dipipet sejumlah 2,5 mL dimasukkan ke dalam labu labu tentukur 10-mL diencerkan dengan kloroform sampai tanda. Selanjutnya dibuat spektrum menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420- 500 nm.⁶

b. Pemilihan fase gerak dan laju alir

Sejumlah 20 mg β -karoten dimasukkan ke dalam labu tentukur 50-mL dilarutkan dan diencerkan dengan kloroform hingga garis tanda. Kemudian dipipet sejumlah 2,5 mL dimasukkan ke dalam labu labu tentukur 10- mL diencerkan dengan kloroform sampai tanda. Suntikkan sejumlah 20 μ l ke dalam alat KCKT menggunakan fase gerak methanol - kloroform (95:5); metanol-tetrahidrofuran-air (67:27:6); kloroform-tetrahidrofuran-air (67:27:6); asetonitril-kloroform (92:8); kloroform –metanol

(95:5) dan kloroform-tetrahidrofur-anmetanol (70:25:5) dengan laju alir 0,5 mL/menit dan 1 mL/menit. Fase gerak dan laju alir yang dipilih adalah yang memberikan pemisahan terbaik dengan waktu retensi yang tidak terlalu lama.

2. Identifikasi β -Karoten dalam Wortel

a. Pembuatan ekstrak/Isolat:

Wortel segar yang telah dipotong-potong dan dihaluskan, ditimbang sejumlah 100 g (wortel), 50 g diblender menggunakan pelarut air mineral, kemudian disaring. Residu dibilas dengan Filtrat yang diperoleh diberi garam kalsium, disentrifuse 3000 rpm 15 menit. Residu sebagai pellet adalah beta karoten, dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 40⁰ C. Disimpan dalam suhu dingin.

b. Pembuatan larutan

Pembuatan larutan baku: Sejumlah 10 mg β -karoten dimasukkan ke dalam labu tentukur 50-mL larutkan dan diencerkan dengan kloroform hingga tanda. Kemudian dipipet sejumlah 2,5 mL dimasukkan ke dalam labu tentukur 10-mL diencerkan dengan kloroform sampai garis tanda (Standar beta karoten).⁷

c. Cara identifikasi :

Sejumlah larutan uji disuntikkan sebanyak 20 μ l ke dalam alat KCKT, kemudian dibandingkan waktu retensinya dengan waktu retensi baku β - karoten.

3. Analisis kuantitatif secara kromatografi cair kinerja tinggi

a. Uji kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui apakah alat, metode dan kondisi membentuk sistim analisis tunggal. Sejumlah 20 μ l larutan baku β - karoten disuntikkan sebanyak 5 kali ke dalam alat KCKT, kemudian diukur luas puncaknya dengan kondisi KCKT yang optimum, selanjutnya dihitung nilai simpangan baku relatifnya.

b. Penetapan kadar β -karoten dalam ekstrak Wortel secara KCKT.

Larutan uji di sonikasi selama 10 menit. Masingmasing disuntikkan sebanyak 20 μ l

ke dalam alat KCKT dan diukur luas puncaknya dengan kondisi KCKT yang optimum. Kadar β -karoten isolat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar } (\mu\text{g/g}) = \frac{(Au/Ab) \times Cb \times fp \times VL}{B}$$

Keterangan:

Au = Luas puncak larutan uji

Ab = Luas puncak larutan baku

Cb = Konsentrasi betakaroten ($\mu\text{g/ml}$)

Fp = Faktor pengenceran (ml)

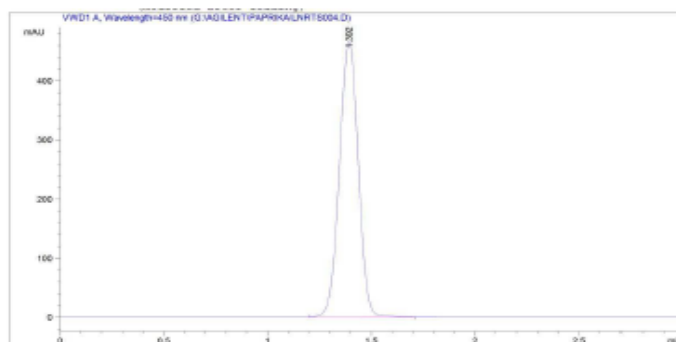
VL = Volume contoh (ml)

B = Bobot contoh yang ditimbang (g)

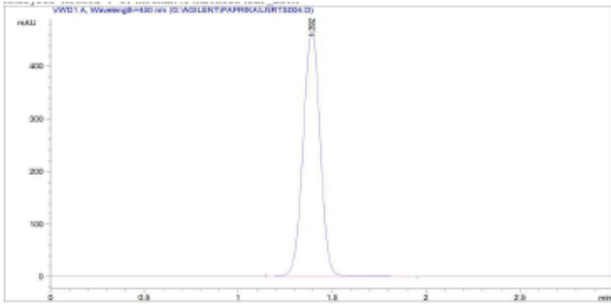
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis kualitatif β -karoten baku secara KCKT pada ekstrak paprika diperoleh waktu retensi yang mendekati waktu retensi baku β -karoten. Identifikasi baku beta karoten diperoleh dari hasil pengukuran.³ Hasil identifikasi β -karoten baku standar dapat dilihat pada Gambar 1, 2 dan 3. Pada Gambar 1. Kromatogram baku β -karoten dengan waktu retensi 1.392 menit. Pada Gambar 2 adalah Kromatogram baku β -karoten dengan waktu retensi 2.86 menit kecepatan alir 0.5 menit/mL. Gambar 3 adalah spekturm baku beta karoten UV –Vis.³

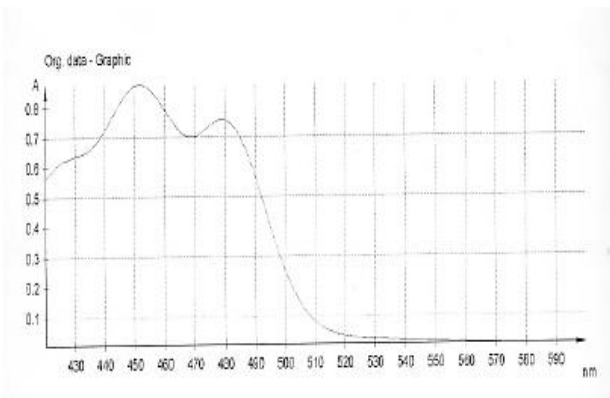
Gambar 4 adalah spekturm isolat beta karoten UV –Vis. Gambar 5 adalah kromatogram isolat beta karoten wortel hasil penelitian dengan U-HPLC waktu retensi 1,903 menit.



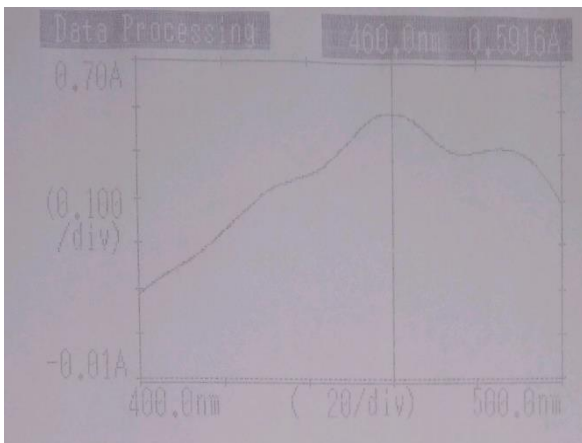
Gambar 1. Kromatograf baku β -karoten dengan waktu retensi 1,392 menit



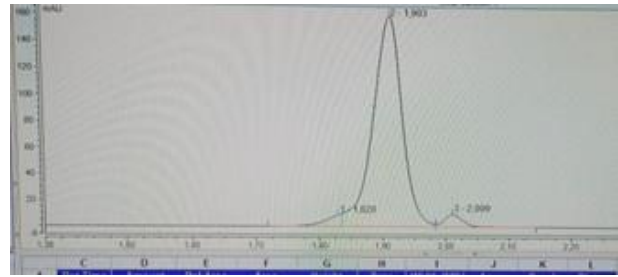
Gambar 2. Kromatograf baku Beta Karoten yang menghasilkan: RT 2,86 menit dengan laju alir 0,5 mL/menit fase mobil Kloroform: THF:Metanol=70:20:5



Gambar 3. Kromatograf spektrum beta karoten baku pengukuran UV-vis pada panjang gelombang 450 nm¹⁰



Gambar 4. Kromatograf spektrum beta karoten baku pengukuran UV-vis pada panjang gelombang 460 nm pelarut kloroform.¹⁰



Gambar 5. adalah Kromatogram Isolat beta karoten wortel dengan waktu retensi 1.903 menit fase mobile kloroform dan methanol (95:5)

Isolasi beta karoten dari wortel dengan pelarut organik telah banyak dilakukan, salah satunya penelitian Fikselova, meneneliti hubungan kombinasi pelarut dan suhu penyaringan.⁶ Beta karoten bersifat hidrofob sehingga disebut larut dalam pelarut organik. Pelarut organik yang sering digunakan terutama adalah kloroform, petroleum eter, diklorometan, dan heksan. Sifat kimia beta karoten terutama disebabkan banyaknya mengandung ikatan rangkap.^{6,7} Pada penelitian ini isolasi beta karoten dari wortel digunakan tanpa pelarut organik, prinsip go to green. Ikatan rangkap pada beta karoten dapat mengendap dengan garam kalsium sehingga prinsip ini digunakan dalam penelitian untuk mendapatkan beta karoten dari sari wortel. Kemudian pemisahannya digunakan dengan cara pengendapan melalui sentrifuse. Pelet yang diperoleh adalah sebagai betakaroten yang berwarna jingga. Sehingga banyak buku referensi melakukan ekstraksi dengan pelarut organik. Meskipun demikian dalam penelitian ini tidak menggunakan pelarut organic namun menggunakan prinsip pengendapan sesuai sifat dan prinsip metode yang digunakan dalam penelitian. Beta karoten yang diperoleh selanjut diperlakukan seperti beta karoten baku. Menggunakan UHPLC berbeda dengan beta karoten baku menggunakan HPLC. Namun belum sepenuhnya lengkap dilakukan karena keterbatasan bahan dan waktu.

Dari hasil penetapan kondisi optimum, menunjukkan bahwa β -karoten memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 460 nm dengan pelarut kloroform (Gambar 4). Pergeseran panjang gelombang dari 450-460

adalah memungkinkan dipengaruhi oleh faktor pelarut yang digunakan yang berbeda saat pengukuran dibandingkan referensi.^{7,8} Berdasarkan hasil percobaan, perbandingan yang terbaik adalah kloroform–metanol (95:5) dengan laju alir 1 mL/menit, sesuai dengan waktu retensi yang diperoleh lebih cepat dan resolusinya baik. Fase gerak yang lazim digunakan sesuai kondisi adalah kloroform, alkohol, heksan, methanol, asetonitril, akuadest grade HPLC.^{9,10} Selanjutnya dapat diberi larutan penunjang seperti THF.¹¹ Hasil penetapan panjang gelombang dapat dilihat pada Gambar 5, hasil pemilihan fase gerak dan laju alir terlihat pada Gambar 5. Meskipun beberapa penelitian telah menunjukkan hasil (waktu retensi) beta karoten yang berbeda dengan penelitian ini, oleh karena fase mobile yang dilakukan adalah berbeda, kecepatan alir yang berbeda dan alat HPLC yang berbeda.^{7,12} Sehingga setiap pengukuran RT adalah merupakan kondisi optimal yang dilakukan oleh peneliti dalam menghasilkan kromatogram dari beta karoten untuk menghasilkan RT yang relative cepat dan gambar peak yang jelas.^{6,13,14}

Pada penelitian ini telah dihasilkan waktu retensi beta karoten adalah 1,903 menit menggunakan laju alir 1 mL/ menit dengan fase mobile kloroform : methanol (95:5) hasil kromatograf Gambar 5. Selanjutnya menggunakan pembanding laju alir 1 ml/menit β -karoten baku dapat terpisah pada waktu retensi 1,392 menit. Perbaikan peak kromatogram dapat dilanjutkan dengan penambahan kombinasi larutan fase mobile dengan kombinasi THF sehingga diperoleh peak yang lebih tajam. Dari hasil uji linearitas (Gambar 1), sehingga diperoleh nilai untuk larutan baku β -karoten sebesar 0,9971. Nilai r tersebut menunjukkan nilai yang ideal karena mendekati 1, sehingga koefisien korelasi antara konsentrasi larutan dengan luas puncak yang terdeteksi oleh KCKT adalah baik dan dapat digunakan untuk penelitian. Dari penelitian Serlahwaty⁷ dan Fikselova⁹ telah memberikan inspirasi dalam penelitian ini terutama dalam menggunakan data baku beta karoten. Penelitian lanjutan sedang dilakukan untuk pembuatan sediaan formulasi dan pembuatan beta karoten mendekati baku.

KESIMPULAN DAN SARAN

Metode isolate yang digunakan telah menghasilkan beta karoten bentuk garam kalsium 1 gram / 100 Gram wortel basah. Pembuktian dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (UHPLC) menggunakan fase diam kolom C18. Fase gerak adalah campuran kloroform– metanol (95:5), laju alir 1,0 ml/menit dengan detektor cahaya tampak (visibel) pada panjang gelombang 460 nm. Penetapan terhadap β -karoten dalam wortel, menghasilkan kromatograf dan waktu retensi yang mirip dengan pola kromatograf baku.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan Terima Kasih disampaikan kepada Politeknik Kesehatan Kemenkes Palembang sebagai pemberi bantuan dan dalam penelitian ini. Laboratorium Kesehatan Palembang tempat melakukan penentuan beta karoten dengan metode HPLC.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winarsi H. β -karoten dalam buah. In: *Antioksidan Alami Dan Radikal Bebas*. Jakarta: Kanisus; 2007. <http://bluejack.binus.ac.id>.
2. Böhm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, Schwartz SJ. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(1):221-226.
3. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. *Food Chemistry 1070*. Berlin: Springer Verlag; 2004.
4. Stutz H, Bresgen N, Eckl PM. Analytical tools for the analysis of β -carotene and its degradation products. *Free radical research*. 2015;49(5):650-680.
5. Biranti F, Nursid M, Cahyono B. Analisis Kuantitatif B-Karoten dan Uji Aktvitas Karotenoid dalam Alga Coklat *Turbinaria Decurrens*. *Jurnal Sains dan Matematika*. 2009;17(2):90-96.

6. British Pharmaceutical Commission. *British Pharmacopeia*. London: The Station of Office; 2007.
7. Serlahwaty D, Farida Y, Asriyana T. Penetapan Kadar Beta Karoten dalam Buah annuum Var. annuum L.) by using HPLC]. *Wijaya, H, Giyatmi, HE Irianto, A Amar, RDE Wijayanti, E Wahyono, et al.* 2009:1-7.
8. Calvo MM, Dado D, Santa-María G. Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β -carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. *European Food Research and Technology*. 2007;224(5):567-571.
9. Fikselová M, Šilhár S, Mareček J, Frančáková H. Extraction of carrot (*Daucus carota* L.) carotenes under different conditions. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008;26(4):268-274.
10. Harborne JB. *Metode Fitokimia*. Edisi Kedu. Bandung: Institut Tehnologi Bandung; 2000.
- Paprika Merah, Kuning dan Hijau (*Capsicum annuum* Var. *annuum* L.) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi [Determination of β -carotene in Red, Yellow and Green Pepper (*Capsicum*
11. Harwitz W. *Official Method of Analysis of AOAC International 17th Edition*. Vol II. Virginia: AOAC International
12. United State Pharmacopeia Convention. *The United States Pharmacopeia 28 The National Formulary 23*. Roskville: United states Pharmacopeia Convention inc
13. Suharyani. Penetapan Kadar Beta-Karoten dalam Sari Buah Merah (*Pandanus conoldeus* Lam.) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. 2007.
14. Zakiah N, Yanuarman Y, Frengki F, Munazar M. Aktifitas Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) Terhadap Kerusakan Hati Tikus yang Diinduksi dengan Parasetamol. *AcTion: Aceh Nutrition Journal*. 2017;2(1):25-31.
<http://dx.doi.org/10.30867/action.v2i1.33>