

REVIEW ARTIKEL : TEKNIK ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA KAROTENOID

Fikri Dwi Alminda, Zelika Mega Ramadhania
Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung Sumedang km 21 Jatinangor 45363
hackerskalsky@gmail.com

ABSTRAK

Teknik Isolasi dan Identifikasi senyawa pada tanaman sangat diperlukan dalam pengembangan obat. Dalam pengembangan teknik ini, diperlukan juga pengembangan teknologi isolasi dan identifikasi yang lebih modern guna mempermudah, mempercepat dan menyatakan hasil yang akurat. Berbagai teknik yang digunakan untuk identifikasi antara lain FTIR (Fourier Transform Infra Red), Spektrofotometri UV-Vis, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), dan NIR (*Near Infrared Reflectance*). Tiga tanaman dengan golongan karotenoid yang berbeda dipilih untuk membandingkan metode yang dinilai efisien. FTIR akan memberikan spektrum mengenai gugus fungsi yang terdapat pada karotenoid, HPLC akan memberikan data berupa AUC, serapan dan waktu retensi yang disesuaikan dengan standar, dan NIR akan memberikan gambar mengenai marker karotenoid. Hasil perbandingan metode dari tiga tanaman tersebut, FTIR dan HPLC dinilai paling efisien untuk identifikasi senyawa golongan karotenoid.

Kata Kunci: FTIR, HPLC, NIR, Karotenoid

ABSTRACT

Isolation and Identification Techniques of compounds in plants are indispensable in drug development. In the development of this technique, it is also necessary to develop more modern isolation and identification technology in order to facilitate, accelerate and declare accurate results. Various techniques used for identification include FTIR (Fourier Transform Infra Red), UV-Vis Spectrophotometry, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), and NIR (Near Infrared Reflectance). Three plants with different classes of carotenoids were selected to compare methods that were considered efficient. FTIR will provide a spectrum of functional groups present in carotenoids, HPLC will provide data in the form of AUC, absorbance and retention time adjusted to the standard, and NIR will provide images of carotenoid markers. The results of the comparison of the methods of the three plants, FTIR and HPLC were considered the most efficient for the identification of carotenoid group compounds.

Keywords: FTIR, HPLC, NIR, Carotenoid

Diserahkan: 4 Juli 2018, Diterima 4 Agustus 2018

PENDAHULUAN

Sejak dahulu manfaat obat herbal berasal dari berbagai tanaman baik buah ataupun sayur (Handayani A., 2015). Kandungan senyawa metabolit sekunder seperti steroid, terpenoid, flavonoid, dsb

memiliki efek farmakologi tertentu bagi tubuh (Saraf, et al., 2011). Senyawa golongan karotenoid terbagi menjadi 2 kelompok pigmen yakni karoten dan xantofil (Sedjati, dkk., 2015). Salah satunya adalah beta karoten yang termasuk

dalam golongan karotenoid hasil turunan tetraterpene (Taipina, et al., 2013) berfungsi sebagai antioksidan, bekerja dengan mekanisme pengurangan kecepatan pembentukan radikal bebas sehingga dapat mencegah berbagai penyakit (Chandra, et al., 2017). Beberapa tanaman yang mengandung beta karoten adalah daun bayam merah (Sulistyaningrum, 2014), pisang (Samson, et al., 2013), alga coklat (Biranti, et al., 2009), alga merah (El-Gamal, 2010), putih telur, dan buah buriti (Ribeiro, et al., 2012). Warna yang dihasilkan pada tanaman atau biasa disebut pigmen memiliki efek farmakologi tertentu bagi manusia (Prateesh, 2009).

Selain beta karoten, beberapa golongan karotenoid yang berada di alam antara lain: hidrokarbon, alkohol, glikosida, eter, epoksida, dsb. (Butnairu, 2016).

Untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan pada suatu tanaman maka perlu dilakukan proses isolasi, isolasi sendiri merupakan suatu tahapan pemurnian senyawa kimia tertentu yang terdapat dalam tanaman hingga didapatkan isolat (Susanah, 2010). Tahapan isolasi dimulai dari proses ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian senyawa. Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa metabolit pada tanaman menggunakan pelarut yang sesuai dengan produk akhir berupa ekstrak (Fahim, et al., 2014), selanjutnya proses fraksinasi dimana senyawa target

dipisahkan sesuai kepolaran tertentu (Mika, et al., 2013). Fraksi yang didapat dilanjutkan dengan tahap isolasi atau pemurnian dan diakhiri dengan proses identifikasi dengan instrument.

Review ini membandingkan Teknik analisis senyawa karotenoid pada tanaman secara umum hingga didapatkan metode yang paling mudah, murah, efisien, dan sederhana.

METODE INSTRUMENTASI

FTIR dan UV-Vis

FTIR dan UV-Vis didasarkan atas prinsip penyerapan tingkat energi tertentu. Frekuensi yang dihasilkan akan berbeda karena atom-atom yang berada pada senyawa tersebut berbeda dan memiliki kekuatan ikatan yang beragam antar atom atau antar molekulnya (Suseno dan Firdausi, 2008). Sehingga, spektrum yang dihasilkan oleh FTIR dapat di analisis dengan cara kualitatif maupun kuantitatif untuk sampel-sampel biologis (Sjahfirdi, et al., 2015).

HPLC

HPLC (High Performed Liquid Chromatography) merupakan suatu pengembangan teknologi kromatografi kolom dengan penambahan detektor yang sangat peka dan sensitif terhadap senyawa yang di analisis. Pada penggunaannya terdapat fase diam dan fase gerak, fungsinya sebagai pemisah berdasarkan

daya adsorpsi, partisi, kelarutan, ukuran molekul, tekanan uap dan ukuran ion yang dibawa oleh fase gerak melalui fase diam dalam kolom tersebut (Aulia, dkk., 2016).

NIR

Prinsip NIR sendiri berdasarkan hukum Hooke yang menghitung vibrasi diatomic molekul secara fundamental, NIR sendiri berada pada Panjang gelombang 780 nm – 2500 nm (Aenugu, et al., 2011).

NIR (Near Infrared) metode yang mirip dengan FTIR namun Panjang

HASIL

Data hasil yang ditampilkan didapat dari 3 tanaman yakni bunga kenikir (Kusmiati, et al., 2015), buah *Persimmon*

gelombang yang digunakan berbeda serta pita *spectra* yang dihasilkan pun memiliki perbedaan dan cenderung sulit untuk penentuan senyawa yang di analisis. Prinsip NIR sendiri merupakan teori absorpsi atau penyerapan serta adanya getaran ikatan kimia sehingga terjadi penyerapan energi transisi elektronik, penguatan dan kombinasi pita oleh *stretching* dan *deformation* (Agustin, dkk., 2015).

(Zaghdoudi, et al., 2017), dan pisang tongkat langit (Samson, et al., 2013). Dilampirkan dalam bentuk tabel dan gambar sebagai berikut:

Tabel 1. Ekstraksi Tanaman Dengan Berbagai Metode dan Pelarut

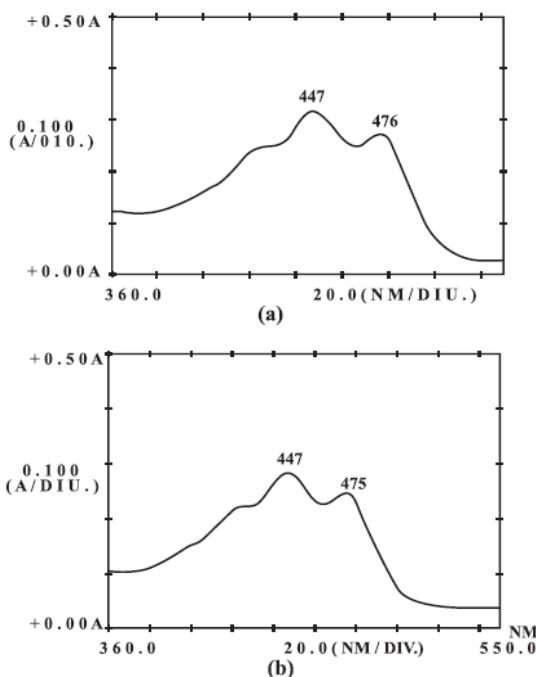
NO.	TANAMAN	TEKNIK EKSTRAKSI	PELARUT
1	Bunga Kenikir	Maserasi	N-Heksan
2	Buah <i>Persimmon</i>	Ekstraksi solven dipercepat	Metanol dan Tetrahydrofuran
3	Pisang tongkat langit	Ekstraksi Konvensional	Aseton

Tabel 2. Proses Saponifikasi dan Fraksinasi Tanaman

NO.	TANAMAN	SAPONIFIKASI	FRAKSINASI
1	Bunga Kenikir	NaOH 50%	-
2	Buah <i>Persimmon</i>	20% KOH metanolik dalam nitrogen	ECC (Ekstraksi Cair-Cair) Petroleum eter (0,1% BHT)
3	Pisang tongkat langit	-	-

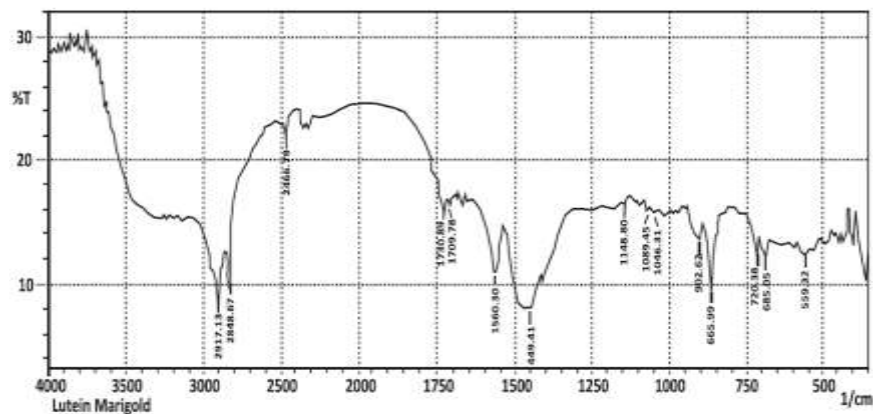
Tabel 3. Hasil Analisis Senyawa Karotenoid Dengan Berbagai Instrumen

NO.	TANAMAN	INSTRUMEN	KETERANGAN
1	Bunga Kenikir	FTIR dan HPLC	1. UV-VIs



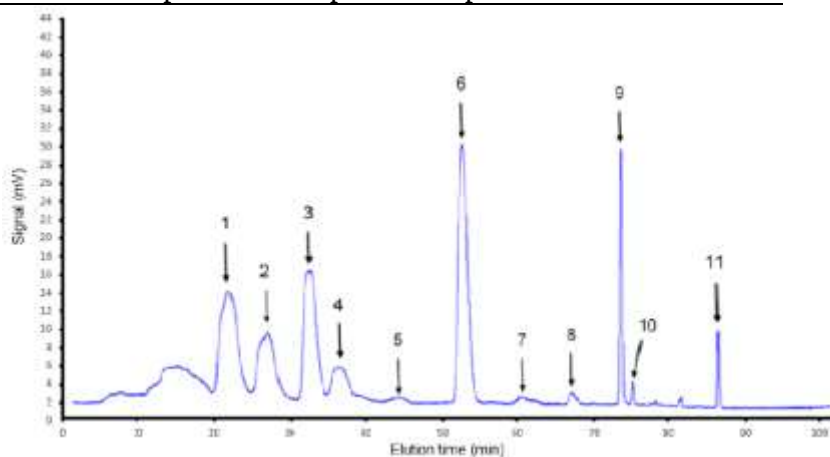
Gambar 1. Hasil serapan lutein (a) pada fraksi ke 3 dan (b) fraksi ke 4 menggunakan spektrofotometri UV-VIS

2. FTIR

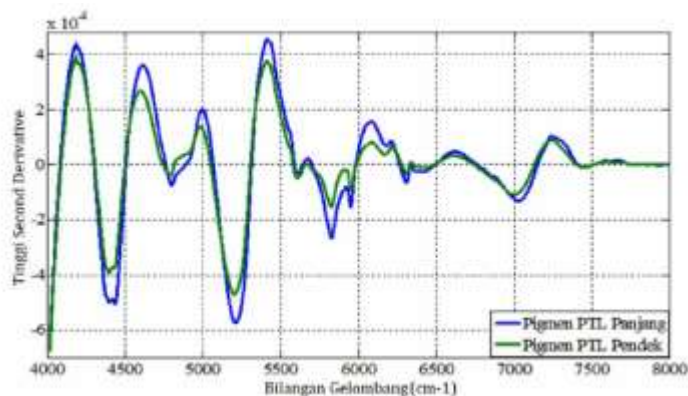


Gambar 2. Spektrum serapan lutein pada FT-IR

2	Buah	HPLC
	<i>Persimmon</i>	Semi
	on	Preparatif
		Fase
		Terbalik

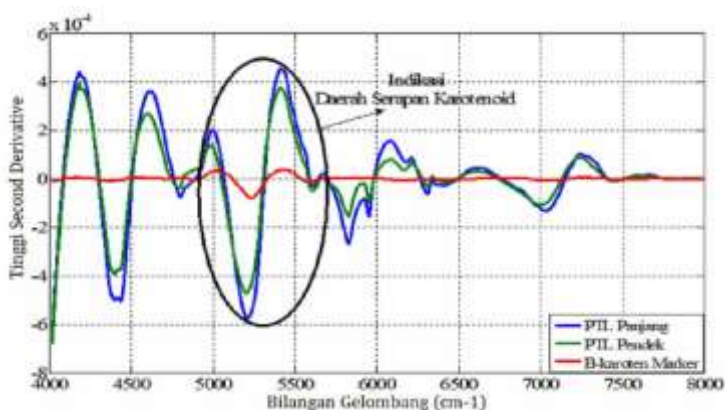


NO.	TANAMAN	INSTRUMEN	KETERANGAN
Gambar 3. Kromatogram karotenoid pada C ₃₀ semi preparatif HPLC			
3	Pisang Tongkat Langit	Spektroskopi NIR	1. Spektrum Pisang tongkat langit Panjang dan Pendek



Gambar 4. Spektrum Pisang tongkat langit (biru) Panjang dan (hijau) pendek

2. Spektrum pendugaan senyawa beta karoten



Gambar 5. Spektrum pisang dibandingkan dengan Beta-karoten marker (merah)

PEMBAHASAN

Pada review jurnal ini akan membahas mengenai perbedaan metode yang digunakan pada berbagai tanaman untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa karotenoid. Tanaman yang digunakan memiliki kandungan karotenoid dengan golongan yang berbeda yakni buah kenikir (lutein), buah *persimmon*,

karotenoid dengan yang paling dominan violaxanthin) dan pisang tongkat langit (beta karoten). Tahap awal yang dilakukan adalah ekstraksi. Ekstraksi pada setiap tanaman berbeda, bunga kenikir menggunakan n-heksan, buah *persimmon* menggunakan methanol dan tetrahidrofur, dan pisang tongkat langit menggunakan aseton. Menurut penelitian

yang dilakukan oleh Butnariu, senyawa karotenoid bersifat non-polar sehingga ekstraksi yang paling tepat menggunakan pelarut seperti kloroform, n-heksan, aseton. Pada penelitian lain juga dikatakan bahwa untuk ekstraksi senyawa karotenoid dengan sampel buah atau sayur direkomendasikan menggunakan aseton atau tetrahydrofuran (Khachik and Chang, 2009), sehingga ekstraksi untuk ketiga tanaman sudah sesuai literatur.

Selain teknik tersebut, terdapat beberapa teknik lain yang bisa digunakan antara lain karbon dioksida superkritik (Durante, et al., 2014), ultrasonic Assisted extraction pada beberapa tanaman untuk ekstraksi lutein dan beta karoten (Altemimi, et al., 2015), dan elektroforesis kapiler (Belin and Gulacar, 2007).

Setelah dilakukan ekstraksi dilakukan proses saponifikasi dengan tujuan untuk menghilangkan pengotor seperti lipid dan klorofil. Dari ketiga tanaman, hanya tanaman kenikir dan buah *persimmon* yang dilakukan proses saponifikasi karena, tanaman lain tidak memiliki klorofil yang banyak sehingga proses saponifikasi tidak dilakukan (Khachik and Chang, 2009) selain itu, proses saponifikasi juga dilakukan untuk penyederhanaan pemisahan pada kromatografi. Kelebihan dari proses saponifikasi adalah memperbanyak ekstrak yang dihasilkan dan pemurnian awal untuk

memudahkan identifikasi KLT di awal, kekurangannya ekstrak yang dihasilkan akan lebih lengket dan kental sedikit menyulitkan dalam preparasi sampel pada tahap selanjutnya.

Setelah proses saponifikasi tahap selanjutnya adalah fraksinasi. Fraksinasi merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa yang terdapat dalam sampel berdasarkan sifat kepolarannya. Hanya Buah *persimmon* yang dilakukan tahap fraksinasi dengan metode ECC (ekstraksi cair-cair) menggunakan petroleum eter (10% BHT), pelarut ini juga merupakan pelarut non-polar sehingga tepat digunakan untuk memisahkan senyawa karotenoid.(Schwartz, et al., 2008).

Dibandingkan buah kenikir setelah saponifikasi langsung dilanjutkan dengan kromatografi kolom karena ekstraksi awal telah menggunakan N-Heksan yang dianalogikan senyawa target larut semua pada pelarut ekstraksi. Kelebihannya untuk senyawa target yang belum diketahui sifatnya metode ECC tepat digunakan untuk memperoleh fraksi dan penyederhanaan prosedur. Kekurangannya, tidak efisien karena menggunakan 3 pelarut dengan kepolaran berbeda dan volume yang digunakan cukup banyak tergantung dari ekstrak yang dihasilkan pada tahap ekstraksi.

Selanjutnya adalah tahapan identifikasi senyawa dengan menggunakan instrumen. Keuntungan identifikasi senyawa dengan instrumen adalah dapat diterapkan secara luas, penentuan lebih cepat, reproduksibilitas, dan memiliki sensitivitas yang tinggi. Instrumen yang digunakan berbeda untuk masing-masing senyawa. Bunga kenikir menggunakan FTIR dan HPLC untuk mengidentifikasi adanya senyawa karotenoid. Kelebihannya FTIR dapat digunakan untuk mengetahui struktur senyawa target dengan adanya tipe ikatan dan tipe senyawa yang dihasilkan misal; alkane, alkena, alkohol, dsb. Dan selanjutnya disesuaikan dengan literatur untuk pemastiannya.

Pada bunga kenikir menggunakan spektrofotometri UV-Vis data yang dihasilkan berupa spektrum serapan di panjang gelombang 360-550 nm pada fraksi ke 3 dan ke 4. Karena lutein termasuk karotenoid alkohol puncak serapan yang dihasilkan menandakan adanya gugus kromofor seperti -OH dan pada penelitian Davies, lutein dengan ekstraksi N-Heksan mempunyai lamda maksimal 447 nm dan 476 nm. Kelebihan UV-Vis senyawa yang memiliki gugus kromofor dapat diidentifikasi namun, untuk senyawa non-kromofor akan sulit diidentifikasi menggunakan instrumen tersebut.

Metode instrument pada buah *persimmon* menggunakan HPLC fase terbalik dengan data yang dihasilkan berupa kromatogram absorpsi dengan waktu retensi. Karena buah *persimmon* memiliki banyak sekali karotenoid maka penggunaan HPLC sangat tepat dibuktikan dengan adanya 11 karotenoid yang terdeteksi pada kromatogram.

Analisis karotenoid pada pisang tongkat langit dengan NIR merupakan penelitian lanjutan dari samson, et al (Samson, et al., 2011) yang menggunakan spektroskopi UV-Vis *varian carry 50* dan KLT. Namun, sebelum disimpulkan senyawa yang dikandung oleh sampel menggunakan NIR perlu beberapa tahap yakni; normalisasi spektrum sampel, normalisasi spektrum sampel dengan pelarut ekstraksi (aseton) dan marker, dan normalisasi spektrum sampel dengan marker (Suhandy, 2009). Kelebihan menggunakan NIR untuk senyawa target yang sudah diketahui strukturnya NIR sangat tepat digunakan, namun karena tahapan yang cukup Panjang dengan proses normalisasi spektrum dan lainnya instrumen NIR menjadi kurang efektif digunakan.

SIMPULAN

Data yang dihasilkan dari 3 tanaman dengan perbedaan golongan karotenoid, penggunaan metode instrumen FTIR dan HPLC dinilai tepat digunakan

untuk identifikasi senyawa dengan reproduktibilitas yang tinggi dan dengan data yang dihasilkan mudah untuk dianalisis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aenugu R.P.H., Kumar S.D., Srisudharson.2011.Near Infra Red Spectroscopy – An Overview.International Journal of Chemtech Research Vol.3 No. 2.
2. Agustina S., Purwanto A.Y., Budiastra W.I.2015.Prediksi Kandungan Kimia Mangga Arumanis Selama Penyimpanan Menggunakan Spektroskopi NIR.Jurnal Keteknik Pertanian Vol. 3 No. 1
3. Altemimi A, Lightfoot DA, Kinsel M, Watson DG (2015) Employing Response Surface Methodology for the Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Lutein and β -Carotene from Spinach. *Molecules* 20: 6611-6625.
4. Aulia Silma S., Iyan S., Muchtaridi.2016.Penetapan Kadar Simvastatin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT): Review.Jurnal Farmaka Vol. 14 No. 4
5. Belin GK, Gülaçar FO (2007) Separation of chlorins and carotenoids in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science* 45:593-599.
6. Biranti F., Nursid M., Cahyono B.2009. ANALIS KUALITATIF B-KAROTEN DALAM ALGA COKLAT TURBINARIA DECURRENS.Jurnal Sains dan Matematika (JSM) Vol. 17 No. 2.
7. Butnariu M.2016.Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification, and Quantification) of Carotenoids from Natural Products.Journal of Ecosystem and Ecography Vol. 6 Issue 2.
8. Chandra B., Zulharmita, Handayani Hutri D.A.2017. Analisis Kandungan Beta Karoten pada Daun Bayam Merah (*Amaranthus hybridus* L.) dengan Metode Spektrofotometri Visibel.Jurnal Farmasi Higea Vol. 9 No. 2.
9. Durante M, Lenucci MS, Mita G (2014). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (*Cucurbita* spp): a review. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 6725-6740.
10. El-Gamal, A.A., 2010, Biological Importance of Marine Algae, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18 (2): 1-25.
11. Fahim TK, Zaidul IS, Bakar MA, Salim UM, Awang MB, Sahena F,

- Jalal KC, Sharif KM, Sohrab MH. Particle formation and micronization using non-conventional techniques review. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 2014 Dec 31;86:47-52.
12. Handayani A. 2015. Pemanfaatan Tumbuhan Berkhasiat Obat Oleh Masyarakat Sekitar Cagar Alam Gunung Simpang Jawa Barat. Prosiding Semnas Masy Biodiv Indon Vol. 1 No. 6.
 13. Khachik, F.; Chang, A.N. 2009. Total synthesis of (3R,30R,60R)-lutein and its stereoisomers. J. Org. Chem. 74: 3875–3885.
 14. Kusmiati, Tamar R.S., Ilmiarti A.T. 2015. Isolasi Lutein dari Bunga Kenikir (*Tagetes erecta* L.) dan Identifikasi Menggunakan *Fourier Transformed Infra Red* dan Kromatografi Cair Spektrometri Massa. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* Vol. 13 No. 2
 15. Mika Adi Santosa IN, Raka Astiti Asih IA, Mayun Laksmiwati AA. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Toksik Pada Ekstrak Metanol Daun Gaharu (*Gyrinops versteegii*). *Journal of Chemistry*. 2013 Jan 7;7(2).
 16. Pratheesh, V.B., Benny, N., dan Sujatha, C.H., 2009, Isolation, Stabilization and Characterization of Xanthopyll from Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.), *Modern Applied Science*, 3(2), 19-28.
 17. Ribeiro, B.D.; Coelho, M.A.Z. Barreto, D.W. Production of concentrated natural beta carotene from buriti (*Mauritia vinifera*) oil by enzymatic hydrolysis. *Food Bioprod Process*, 2012; 90 (2) 141-147.
 18. Samson E., Semangun H., Rondonuwu F.S. 2013. ANALISIS KANDUNGAN KAROTENOID EKSTRAK KASAR BUAH PISANG TONGKAT LANGIT (*MUSA TROGLODYTARUM*) DENGAN MENGGUNAKAN SPEKTROSKOPI NIR (NEAR INFRARED). *Traditional Medicine Journal* 18(1).
 19. Samson, E., Rondonuwu, F.S., dan Semangun H., 2011, Kajian Kandungan Karotenoid Buah Pisang Tongkat Langit (*Musa troglodytarum*). *Prosiding Teknologi Berkelanjutan, Desa Digital Berkelanjutan Menuju Kedaulatan dan Kesejahteraan Masyarakat*, 105-110. (gaada sumber)
 20. Saraf S, Jeswani G, Kaur CD, Saraf S. Development of novel herbal cosmetic cream with curcuma longa extract loaded transfersomes for antiwrinkle effect. *African journal of*

- pharmacy and pharmacology. 2011 Aug 1;5(8):1054-62.
21. Schwartz, S.J.; von Elbe, J.; Guisti, M. 2008. Colorants. In: Fennema's Food Chemistry, 4th edn. (Damodaran, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R., Eds.). CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp. 571–638.
 22. Sedjati S., Yudiati E., Suryono. 2015. Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut *Spirulina* sp. dan Potensinya Sebagai Pewarna Alami. *Jurnal Ilmu Kelautan* Vol 17 No. 3
 23. Shanab, S.M.M., and Shalaby, E.A., 2012, The First Record of Biological Activities of the Egyptian Red Algae Species *Compsopogon heelwanii*, *Int. J. Biosc. Biochem. Bioinforma.*, 2 (4):291-296.
 24. Sjahfirdi L., Aldi N., Maheswari H., Astuti P. 2015. Aplikasi Fourier Transform Infrared (FTIR) dan Pengamatan Pembengkakan Genital Pada Spesies Primata, Lutung Jawa (*Trachypitecus auratus*) Untuk Mendeteksi Masa Subur. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 9 No. 2 ISSN: 1978-225X
 25. Suhandy, D., 2009, Pendugaan Kandungan Padatan Terlarut Buah Sawo Menggunakan NIR Spectroscopy, *Jurnal Bionatura*, 11(1), 11- 20.
 26. Sulistyaningrum N. 2014. Isolasi dan Identifikasi Struktur Karotenoid dari Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus Tricolor* L.). *Jurnal Kefarmasian Indonesia* Vol. 4 No.2 Hal. 75-82
 27. Susanah Rita W. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid Pada Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). *Journal of Chemistry*. 2010;4(1).
 28. Suseno, J., E., dan Firdausi, K., S., 2008, Rancang Bangun Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) untuk Penentuan Kualitas Susu Sapi, *Berkala Fisika*, 11(1):23-28.
 29. Taipina et al. 2013. Review of literature: carotenoids, chemical composition and dietary reference intake of buriti fruits. *International Journal of Nutrology* V.6 N.3 P. 102-106
 30. Zaghdoudi K., Ngomo O., Vanderes R., Arnoux P., Myrzakhmetov B., Frochot C., Guivarc'h Y. 2017. Extraction and Identification and Photo-Physical Characterization of Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Carotenoids. *Journal of Foods MDPI* Vol. 6 No. 4.