



PROSIDING SEMINAR NASIONAL

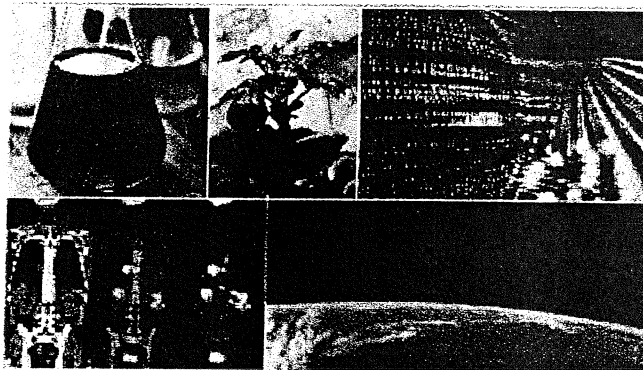
Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA
Tanggal 15 Mei 2010, FMIPA UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

ISBN: 978 - 979 - 9314 - 4



Bidang:

- Matematika dan Pendidikan Matematika
- Fisika dan Pendidikan Fisika
- ✓ **Kimia dan Pendidikan Kimia**
- Biologi dan Pendidikan Biologi



Tema:

**“Peningkatan Keprofesionalan Peneliti, Pendidik dan Praktisi MIPA
Untuk Mendukung Pembangunan Karakter Bangsa”**

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Yogyakarta
Tahun 2010

TINJAUAN BERBAGAI METODE ANALISIS KAROTEN DALAM BAHAN PANGAN

Susila Kristianingrum^[1]

^[1]Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta



Abstrak

Sayuran dan buah-buahan yang berwarna hijau atau kuning biasanya banyak mengandung karoten. Dalam tanaman terdapat beberapa jenis karoten, namun yang lebih banyak ditemukan adalah α (alpha), β (beta), dan γ (gamma) karoten. Dalam wortel ditemukan β -karoten yang mempunyai peranan sebagai antioksidan. Berbagai penelitian telah banyak dilakukan untuk menganalisis kandungan β -karoten dalam berbagai bahan pangan, yang ternyata memberikan hasil yang bervariasi satu dengan yang lain. Oleh karena itu dalam makalah ini dibahas mengenai berbagai metode analisis karoten dalam bahan pangan, yang dapat memberikan hasil seoptimal mungkin untuk menentukan karoten, di antaranya dengan metode spektrofotometri dan kromatografi.

Kata kunci: karoten, spektrofotometri, kromatografi

Pendahuluan

Vitamin merupakan suatu molekul organik yang sangat diperlukan oleh tubuh untuk proses metabolisme dan pertumbuhan yang normal. Vitamin-vitamin tidak dapat dibuat oleh tubuh manusia dalam jumlah yang cukup, oleh karena itu harus diperoleh dari bahan pangan yang dikonsumsi oleh manusia. Dalam bahan pangan vitamin dalam bentuk yang berbeda-beda di antaranya provitamin atau calon vitamin yang selanjutnya dalam tubuh diubah menjadi vitamin yang aktif. Salah satu jenis vitamin adalah vitamin A. Vitamin A pada umumnya stabil terhadap panas, asam, dan alkali. Namun sayangnya vitamin A mempunyai sifat yang sangat mudah teroksidasi oleh udara, dan akan rusak bila dipanaskan pada suhu tinggi bersama udara, sinar dan lemak yang sudah tengik.

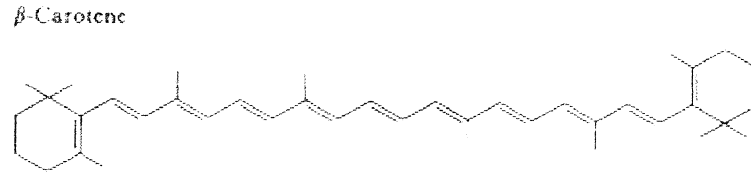
Sebagian besar sumber vitamin A adalah karoten yang banyak terdapat dalam bahan-bahan nabati. Tubuh manusia mempunyai kemampuan mengubah sejumlah besar karoten menjadi vitamin A. Dalam tanaman terdapat beberapa jenis karoten, namun yang lebih banyak ditemukan adalah α (alpha), β (beta), dan γ (gamma) karoten. Selain itu mungkin juga ditemukan kriptoxantin. Dalam bahan pangan terdapat vitamin A dalam bentuk karoten sebagai ester dari vitamin A dan sebagai vitamin A bebas.

Sayuran dan buah-buahan yang berwarna hijau atau kuning biasanya banyak mengandung karoten. Semakin hijau daun tersebut semakin tinggi kadar karotennya. Wortel, ubi jalar, dan waluh juga banyak mengandung karoten. Dalam wortel ditemukan β -karoten yang mempunyai peranan sebagai antioksidan. Berbagai penelitian telah banyak dilakukan untuk menganalisis kandungan β -karoten dalam berbagai bahan pangan, yang ternyata memberikan hasil yang bervariasi satu dengan yang lain. Oleh karena itu dalam makalah ini dibahas mengenai berbagai metode analisis karoten dalam bahan pangan, yang dapat memberikan hasil seoptimal mungkin untuk menentukan karoten..

Pembahasan

Beta-karoten

Beta-karoten adalah antioksidan, merupakan provitamin A yang apabila dalam tubuh berubah menjadi vitamin A (Winarno, F.G., 1991). Dewasa ini tersedia dalam bentuk suplemen dan dalam dosis tinggi. Karena sifatnya sebagai antioksidan, maka sering dipercaya dapat membantu mengurangi resiko kanker (M. Satria Ramadhani R, 2010). Adapun struktur β -karoten ditunjukkan seperti dalam gambar 1 berikut.



Gambar 1. Struktur β -karoten

Wortel juga mengandung pectin yang baik dalam menurunkan kolesterol darah. Selain itu, seratnya yang tinggi bermanfaat untuk mencegah terjadinya sembelit. Wortel juga berkhasiat mengatasi masalah kulit seperti jerawat, ataupun kulit kering. Kalium yang ada dalam wortel juga membantu menetralkan asam dalam darah, dan vitamin A nya membantu hati menghilangkan toksin dalam tubuh (<http://republika.co.id/wortel>).

Spirulina memiliki beberapa karotenoid, yang komponen utamanya β -karoten zeaxanthin, echinenone, myxoxanthophyll dan β -cryptoxanthin. Beberapa isomer dari betakaroten juga ada. Studi perbandingan penelitian telah menunjukkan bahwa Metode Analisis A.O.A.C. (1995): 941,15 tidak sepenuhnya mengekstrak atau merecoveri beta-karoten dan lain-lain karotenoid dari sampel Spirulina.

Metode Spektrofotometri

Metode spektrofotometri UV-VIS juga telah digunakan untuk menganalisis kadar β -karoten dalam berbagai sayuran dan buah-buahan seperti: wortel, pepaya, dan labu kuning dan ternyata belum memberikan hasil yang optimal (Dhian J, Khusna H, Lina F, dan Susila K, 2009).

Dewasa ini berbagai metode spektrofotometri telah ditingkatkan untuk mengukur β -karoten dan total karotenoid dibandingkan dengan metoda AOAC untuk berbagai sayuran kering dan hasilnya telah divalidasi oleh HPLC (www.cyanotech.com).

Catatan: Semua pekerjaan harus dilakukan dalam cahaya rendah dan suhu rendah. Sebagai karotenoid sangat sensitif terhadap cahaya, oksigen, dan panas. Hal ini merekomendasikan bahwa uji yang dilakukan di kamar gelap dapat suhu serendah mungkin.

Prosedur Ekstraksi dalam Methanol

Lakukan ekstraksi metanol secara terpisah untuk setiap sampel.

- 1) Timbang kira-kira 30 mg bubuk Spirulina langsung ke dalam tabung dan catat beratnya.
- 2) Tambahkan 3 gram manik-manik kaca dan 2,5 ml DMSO untuk setiap tabung.
- 3) ketat tutup tabung dan vortex mereka sebentar selama 30 detik.
- 4) Tempatkan tabung ke dalam water bath 50 derajat C selama 30 menit. Setiap 10 menit keluarkan tabung dari water bath dan vortex selama 30 detik
- 5) Setelah 30 menit dalam water bath, ambil tabung tersebut
- 6) Tambahkan 5 ml metanol untuk setiap tabung, tutup tabung dan vortex mereka keras selama 30 detik. Sentrifus tabung pada 4200 rpm selama 3 menit.
- 7) Dengan pipet pasteur, ambil supernatan dari setiap tabung dan masukkan ke dalam corong pisah
- 8) Tambahkan 4 ml metanol, tutup tabung, vortex selama 15-30 detik dan centrifuge lagi selama tiga menit. Kumpulkan supernatan ke dalam corong pisah
- 9) Tambahkan metanol secukupnya untuk menutup manik-manik kaca. Tutup tabung dan vortex keras selama 30 detik. Lepaskan penutup dan tambahkan 4 ml metanol. Tutup kembali tabung dan lakukan vortex selama 30 detik
- 10) Lanjutkan untuk menambahkan metanol, vortex, sentrifus dan kumpulkan supernatan dalam corong pisah sampai metanol benar-benar jelas. Penting untuk dicatat bahwa warna yang tersisa dalam metanol adalah beta-karoten Jadi sangatlah penting untuk mengekstrak semua pigmen dari bahan tersebut bahkan jika mungkin lakukan ekstraksi ulang untuk verifikasi.

- 11) Setelah semua supernatan tersebut dikumpulkan dalam corong pisah, lalu tambahkan methanol sampai volumenya 25ml.
- 12) Tempatkan sumbat dalam corong pisah dengan hati-hati. Jika mungkin perlu untuk dilakukan sentrifugasi.

Bagian 2. Prosedur Analisis: Beta-Karoten (dibuat ulangannya duplo atau triplo)

- 1) Dengan menggunakan pipet volum, ambil 8 ml ekstrak metanol dari 25 ml yang ada dalam corong pisah dan masukkan ke dalam tabung centrifuge 15 ml yang bersih
- 2) Tambahkan 5 ml heptana dan 1,5 ml KOH jenuh dalam metanol. Tutup tabung tanpa pencampuran
- 3) Pasang tabung di tempat gelap untuk saponify. Setelah 15 menit, vortex ringan tabung tersebut
- 4) Setelah 30 menit, vortex tabung keras selama 15 detik dan centrifuge selama 3 menit pada 4200 rpm
- 5) Dengan pipet Pasteur ambil lapisan heptana dan masukkan ke dalam labu takar 10 ml. Dengan lembut menambahkan sekitar 1 ml heptana segar ke dalam tabung dan mencuci interfase. Heptana Pipet ke dalam labu takar 10 ml.
- 6) Tambahkan 3 ml heptana segar ke dalam tabung. Tutup tabung dan gojog 8 kali untuk memungkinkan setiap beta-karoten yang tersisa di metanol untuk memasukkan heptana tersebut. Biarkan heptana terpisah dari metanol selama 2 menit dan kemudian pipet heptana ke dalam labu takar 10 ml
- 7) Bawa labu takar 10 ml tepatkan volume dengan heptana. Tutup labu takar dan gojog campuran. (Catatan: Jika analisis HPLC beta-karoten diperlukan, keluarkan 3 ml ekstrak heptana. Uapkan di bawah nitrogen dan re-suspend pelarutnya.)
- 8) Tuangkan sekitar 5 ml ekstrak heptana ke dalam tabung Hach bersih, tambahkan sama jumlah air DI dan penuh, vortex selama 5 detik. Sentrifus tabung tersebut selama 3 menit pada 4200 rpm.
- 9) Pada spektrofotometer, baca Absorbansi pada 436 nm dari ekstrak terhadap blanko (heptana).

Perhitungan

$$\text{Beta-Carotene (percent)} = \frac{\text{Abs } 436 \times 25 \text{ mL} \times 1.25 \times 100 \times 0.84}{196 \times (\text{wt (mg)} \times \text{dry wt})}$$

Faktor penyesuaian 0,84 digunakan karena adanya karotenoid lain seperti echinenone dan beta-heptana cryptoxanthin di ekstrak. Faktor ini telah diverifikasi oleh analisis HPLC paralel Spirulina dan telah ditemukan untuk konsisten untuk sampel bubuk segar. Faktor ini harus dievaluasi secara berkala dengan analisis HPLC. Contoh bubuk lama atau tablet harus memiliki 3 ml aliquots ekstrak heptana dipersiapkan (seperti dalam langkah 7) dianalisa dengan HPLC.

Prosedur Analisis Total Karotenoid

- 1) Dengan pipet volum 2 ml ambil 2 ml ekstrak dan memasukkannya ke dalam 15 ml tabung sentrifus yang bersih.
- 2) Tambahkan 4 ml dietil eter ke dalam tabung
- 3) Tambahkan 0,5 ml KOH jenuh dalam air ke dalam tabung.
- 4) vortex tabung pelan-pelan
- 5) Tempatkan tabung di tempat gelap selama 30 menit. Vortex tabung pelan-pelan setiap 10 menit
- 6) Ambil tutup dari tabung dan tambahkan 5 ml air
- 7) Tutup tabung dan vortex sebentar untuk mencampurkan
- 8) Sentrifus tabung pada 4200 rpm selama 3 menit. Lapisan eter harus mengandung semua pigmen kuning dan lapisan air harus menjadi pucat biru-hijau.
- 9) Perhatikan volume eter di setiap tabung, catat kedua lapisan dari paling atas dan bawah meniskus.

- 10) Dengan spektrofotometer, baca absorbansi maksimum ekstrak eter pada absorbansi 450-453 nm terhadap blanko (eter).

Perhitungan:

Total karotenoid. (Persen) =

$$\frac{\text{Max abs (450-453)} \times 25 \text{ ml} \times \text{vol. of ether (ml)} \times 100}{\text{sample wt. (mg)} \times \text{dry wt.} \times 2}$$

259.2 x (sample wt. (mg) x dry wt.) 2

Metode Kromatografi

Kandungan vitamin A palmitat dan β -karoten dalam margarin dan dalam margarine yang tercampur dengan polyester sukrosa juga telah dianalisis dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi). Sampel disiapkan dengan melarutkan 10 g margarin dalam 50 ml metilen klorida. Larutan disaring dan diencerkan dengan metilen klorida sampai 100 ml. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan kolom μ Styragel 100 GPC yang dihubungkan seri dengan eluen metilen klorida dengan laju alir 1 ml/menit. Pemisahan diikuti dengan detektor UV (313 nm) dan detektor indeks bias. Fraksi-fraksi yang mengandung polyester sukrosa dan vitamin diuapkan terlebih dulu sebelum dilakukan analisis dengan KCKT. Poliester sukrosa diukur dengan kolom oktadesil silan (250x4,6 mm i.d) dengan elusi gradient yang terdiri dari metilen klorida, asetonitril, dan 2-propanol. Laju alir berubah dari 1 ml/menit- 1,5 ml/menit. Solut dideteksi dengan detektor hamburan cahaya dengan tekanan 2 bar dan suhu 40°C. Sedangkan vitamin dipisahkan dengan kolom yang sama dan fase gerak asetonitril, metilen klorida dan methanol (700:300:2 v/v) dengan laju alir 1 ml/menit dan panjang gelombang detektor vitamin A dan β -karoten masing-masing 313 nm dan 436 nm (Abdul Rohman dan Sumantri, 2007).

β -karoten merupakan jenis provitamin A yang tidak larut dalam air yang dapat dianalisis dengan HPLC/KCKT. β -karoten diekstraksi dari 6 ml bahan (susu) lalu yang dicampur dengan 2 ml 2-propanol dan diekstraksi 2x dengan 4,5 ml heksana. Pemisahan antar fase dilakukan dengan sentrifugasi. Ekstrak yang terkumpul dicuci dengan 3 ml natrium sulfat 0,47 M dan diuapkan dengan nitrogen sampai 2 ml. Saponifikasi dilakukan dengan melarutkan 50-100 mg lemak dalam 1 ml etanol 95% yang mengandung pirogalol 12,5% mg/ml sebagai antioksidan. Selanjutnya ditambahkan 1 ml KOH 60% dalam air dan campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit, lalu 1 ml air ditambahkan dan campuran diekstraksi dengan 2 ml heksana. Fase organik dikeringkan dengan gas nitrogen dan dilarutkan kembali dalam 300 μ L heksana: diklorometan (95:5 v/v). Kandungan trigliserida dikontrol dengan KLT dengan kondisi: silika, eluen:heksana: dietileter (7:3), deteksi dengan asam fosfomolibdat 10% dalam dietileter:etanol (1:1 v/v).

Pemisahan dilakukan dengan kolom Chrom-Sep ChromSpher PAH (100x3 mm i.d) yang dihubungkan seri. Fase gerak dielusikan secara isokratik yang terdiri dari asetonitril:methanol:diklorometan (80:14:6 v/v). Laju alir fase gerak 0,7 ml/menit dan panjang gelombang detektor 450 nm. Hasilnya menunjukkan bahwa β -karoten terpisah baik dari α -karoten dan komponen-komponen lain yang ada di dalam sampel (Abdul Rohman dan Sumantri, 2007).

Penutup

Berdasarkan atas kajian berbagai metode analisis karoten di atas maka metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menunjukkan parameter validasi yang bagus dibandingkan dengan metode spektrofotometri. Dengan KCKT diperoleh linieritas 0,67-4 μ g/ml, dengan batas kuantifikasi 30 ng/ml, dan perolehan kembali (% *recovery*) 100 \pm 6%.

DAFTAR PUSTAKA

Abdul Rohman dan Sumantri. (2007). Analisis Makanan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Cyanotech Corporation (2002). *Spirulina Pacifica Technical Bulletin*.

www.cyanotech.com, diakses tanggal 29 April 2010.

Dhian J dan Susila K. (2009). Pengaruh Lama Ekstraksi Terhadap Kadar β -karoten pada Wortel (*Daucus carota*) dengan Metode Spektrofotometri.. UV-VIS. *Laporan Penelitian*. Yogyakarta: FMIPA UNY.

<http://republika.co.id/wortel>. Diakses tanggal 3 November 2009.

Khusna H dan Susila K. (2009). Pengaruh Lama Ekstraksi Terhadap Kadar β -karoten dalam Buah Pepaya (*Carica Papaya L*) dengan Metode Spektrofotometri.. UV-VIS. *Laporan Penelitian*. Yogyakarta: FMIPA UNY.

Lina F dan Susila K. (2009). Pengaruh Lama Ekstraksi Terhadap Kadar β -karoten pada Labu Kuning (*Cucurbita moschata* Durh) dengan Metode Spektrofotometri.. UV-VIS. *Laporan Penelitian*. Yogyakarta: FMIPA UNY.

Satria Ramadhani R. (2010). *Suplemen Beta Karoten dan Kanker*.

Winarno, F.G. (1991). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.

SEMINAR NASIONAL

Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA

Sertifikat

No. : 2075/H34.13/PS/2010

diberikan kepada:

Susila Kristianingrum, M.Si.
Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA UNY

sebagai : *Penyaji Makalah*

dengan judul:

Tinjauan Berbagai Metode Analisis Karoten dalam Bahan Pangan

diselenggarakan oleh FMIPA UNY dalam rangka DIES NATALIS UNY ke-46,
pada tanggal 15 Mei 2010 di Gedung Seminar Fakultas Matematika dan
Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta

Mengetahui
Dekan FMIPA UNY,

Dr. Ariswan

NIP. 19590914 198803 1 003

Yogyakarta, 15 Mei 2010

Retno Ranitia,

Harjo Sutrisno

NIP. 19670407 199203 1 002

