

Isolasi dan Identifikasi Struktur Karotenoid dari Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus Tricolor* L.)

Novi Sulistyaningrum

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes, Kemenkes RI

email: novisulistya@litbang.depkes.go.id

Diterima : 14 Maret 2014

Direvisi : 7 April 2014

Disetujui : 2 Juni 2014

Abstract

Amaranthus tricolor L. was reported as source of carotenoid compounds (tetraterpenoids) which is a natural pigments and has bioactivity as antioxidants. They are beneficial to health. Carotenoids isolate are obtained by maceration method in methanol, saponification with KOH / MeOH 5%, fractionated by vacuum column chromatography, preparative thin layer chromatography (preparative-TLC) repeatedly and each fraction monitored using thin layer chromatography (TLC). Structure analysis of carotenoids based on UV, IR and GC-MS spectroscopic data showed similarities as lutein structure.

Keywords: *Amaranthus tricolor* L., Carotenoid, Lutein, Spectroscopic.

Abstrak

Amaranthus tricolor L. dilaporkan sebagai sumber senyawa karotenoid (tetraterpenoid) yang merupakan pewarna alami dan antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan. Isolasi karotenoid dilakukan melalui tahapan metode maserasi dalam metanol, saponifikasi dengan larutan KOH/MeOH 5 %, fraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis preparatif (KLTp) secara berulang dan setiap fraksi dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil analisis struktur karotenoid dengan spektroskopi ultra violet (UV), infra merah (*infra red*, IR) dan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS) diketahui memiliki kemiripan dengan struktur lutein.

Kata kunci : *Amaranthus tricolor* L., Karotenoid, Lutein, Spektroskopi.

Pendahuluan

Penelitian ilmiah terhadap kandungan zat warna alami dari tumbuhan semakin berkembang. Hal ini disebabkan karena zat warna alami banyak digunakan dalam industri makanan. Disamping itu zat warna alami dari tumbuhan warnanya lebih menarik dan relatif aman untuk dikonsumsi sehingga dapat meminimalisir timbulnya penyakit yang disebabkan oleh zat warna sintetis.¹

Salah satu tumbuhan yang potensial sebagai sumber zat warna alami adalah bayam merah (*Amaranthus tricolor*). Tumbuhan ini merupakan salah satu spesies dari famili Amaranthaceae (ke -

lompok tanaman bayam-bayaman). Amaranthaceae pada umumnya adalah tumbuhan terna berumur pendek yang tersebar di daerah-daerah tropika dan sub-tropika. *Amaranthus tricolor* berasal dari daerah Amerika tropis dan disebut *tricolor* karena daunnya berwarna 3 yaitu hijau, merah dan keunguan. Namun dari jenis ini ada yang berwarna hijau saja atau merah saja. Daunnya memiliki kandungan protein yang cukup tinggi, cukup banyak mengandung asam amino, steroid, asam lemak serta kaya akan besi, kalsium dan karoten.² Kandungan asam folat dan asam oksalat tumbuhan *Amaranthus tricolor* L. Bermanfaat untuk menurunkan kadar kolesterol, mencegah sakit gusi, merawat kulit -

kepala dan rambut, serta mengobati rasa lesu akibat kurang darah. Lebih dari itu, kandungan seratnya yang tinggi sangat bagus untuk pencernaan dan juga merupakan sumber zat warna alami karotenoid.³

Karotenoid tersebut adalah pewarna alami yang larut dalam lemak, metabolit sekunder dari jenis terpenoid⁴ berupa suatu poliisoprenoid panjang (terdiri atas 40 atom karbon/tetraterpen) yang mengandung ikatan rangkap dan tersusun dari rantai poliisoprena simetris terhadap pusat ikatan. Kedua molekulnya mengandung cincin sikloheksena yang tersubstitusi.⁵ Karotenoid dapat ditemukan dalam tumbuhan, beberapa jenis hewan, alga, bakteri dan jamur. Pigmen karotenoid pada tumbuhan mempunyai dua fungsi, yaitu sebagai pigmen pembantu dalam fotosintesis dan sebagai pewarna dalam bunga dan buah. Karotenoid merupakan pigmen yang berwarna kuning, oranye atau merah, sehingga dapat diidentifikasi melalui warnanya.⁶

Penelitian sebelumnya terhadap tumbuhan *Amaranthus tricolor* yang berasal dari negara Cina telah ditemukan senyawa zat warna lutein (sebagai komponen utamanya), zeasantin, violasantin, neosantini, β -karoten.⁷ Tumbuhan yang sama dari Malaysia menghasilkan senyawa karotenoid jenis β -karoten dan lutein.⁸

Berdasarkan uraian di atas, maka dalam penelitian ini dilakukan isolasi komponen utama senyawa karotenoid dari tumbuhan bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) yang tumbuh di Indonesia sebagai sumber zat warna alami dan dianalisa strukturnya dengan spektroskopi UV, IR dan GC-MS.

Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Sampel yang digunakan adalah bayam merah (*Amaranthus* -

tricolor L.), berasal dari kota Batu-Malang, Jawa Timur. Proses penelitian dilakukan dengan mengisolasi karotenoid terlebih dahulu hingga diperoleh senyawa karotenoid tunggal (isolat) yang kemudian dianalisa struktur-nya berdasarkan serapan UV, IR dan GC-MS.

Isolasi Karotenoid

Isolasi karotenoid dilakukan dengan modifikasi dari prosedur standar analisis karotenoid.⁷ Ekstraksi karotenoid dilakukan dengan teknik maserasi dalam pelarut metanol teknis, diuapkan pelarut-nya, ditambah larutan NaCl jenuh lalu dipartisi dengan campuran n-heksana/dietil eter (1:1), diuapkan pelarutnya dan disaponifikasi dalam larutan KOH/metanol 5% selama 3 jam pada suhu kamar. Hasil saponifikasi dipartisi kembali dengan n-heksana/dietil eter (1:1), dicuci dengan air destilasi, dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrat kemudian diuapkan pelarutnya dan difraksinasi secara kromatografi kolom dengan gradien eluen n-heksana/etil asetat, sehingga diperoleh fraksi-fraksi. Keberadaan karotenoid dalam setiap tahapan isolasi dimonitor menggunakan plat aluminium kromatografi lapis tipis (KLT) SiO_2 60 GF₂₅₄ dengan eluen n-heksana:aseton (70:30). Selanjutnya fraksi yang dominan dimurnikan dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif (KLTp) hingga diperoleh isolat yang selanjutnya dianalisa strukturnya menggunakan spektroskopi UV, IR dan GC-MS.

Analisis Spektroskopi Ultra Violet (UV)⁷

Analisis spektroskopi UV dilakukan di laboratorium Kimia Universitas Surabaya dengan spektrofotometer UV-1700 (Shimadzu) dalam pelarut n-heksana pada panjang gelombang 350-600 nm.

Infra Merah/*Infra Red* (IR)

Analisis spektroskopi IR dilakukan di laboratorium Kimia Universitas Surabaya dalam pelet KBr menggunakan spektro -

meter IR Buck 500 pada daerah 600-4000 cm^{-1} .

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)⁹

Analisis GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Gadjah Mada, dengan pengembangan metode yang ada menggunakan spektrometer massa GC-17A Shimadzu QP-5000, kolom CPSil 5CB (25 m x 0,25 mm). Suhu kolom 180 °C s/d 300 °C dengan kenaikan 10 °C/menit. Suhu injektor 300 °C, split rasio 57. Tekanan gas pembawa 12 kPa, total aliran 30 ml/menit. Volume injeksi 1 μL .

Hasil Dan Pembahasan

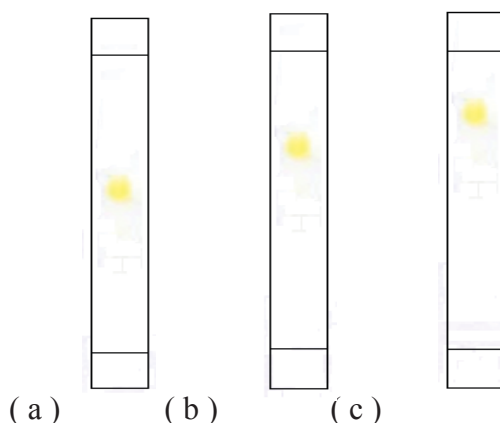
Isolasi Karotenoid dari tumbuhan Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.)

Isolasi senyawa karotenoid dari tumbuhan bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) menghasilkan senyawa murni (isolat) berwujud pasta berwarna oranye kemerahan. Data spektroskopi UV-Vis λ_{maks} (n-heksana) 432, 456 dan 483 nm. Data IR ν_{maks} (KBr) 3422,6; 2932,3; 2864,9; 2744,7; 2696,6; 1706,4; 1586,3; 1466,1; 1370,1; 1206,7; 1149; 1091,3 cm^{-1} . Data MS: 532 [M^+ - 18 - 18], 312 [M^+ - 256], 193 [M^+ - 375], 167 [M^+ - 401], 153 [M^+ - 415] dan 43.

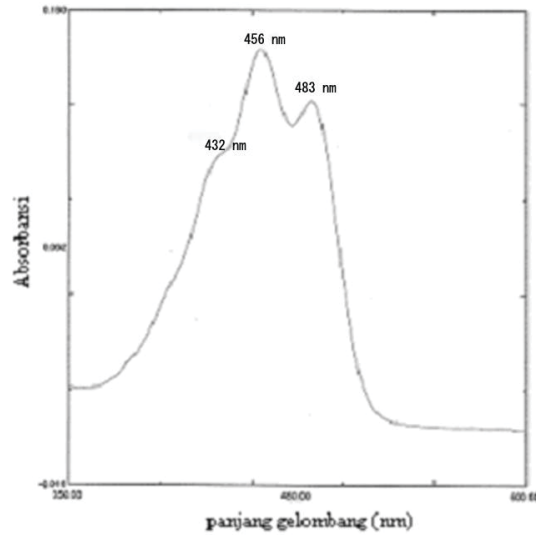
Isolat karotenoid yang diperoleh diuji kemurniannya dengan menggunakan 3 campuran eluen yang berbeda (Gambar 1), menunjukkan spot (noda) tunggal yang berarti isolat tersebut sudah merupakan senyawa tunggal.

Hasil analisa spektrofotometer UV isolat yang ditunjukkan pada Gambar 2 adalah khas untuk senyawa karotenoid yang menyerap sinar UV pada daerah 300-600 nm, terdiri atas sebuah puncak utama dan dua puncak tambahan pada kedua sisi puncak utama. Serapan-serapan ini muncul karena adanya transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$ yang menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa karotenoid.

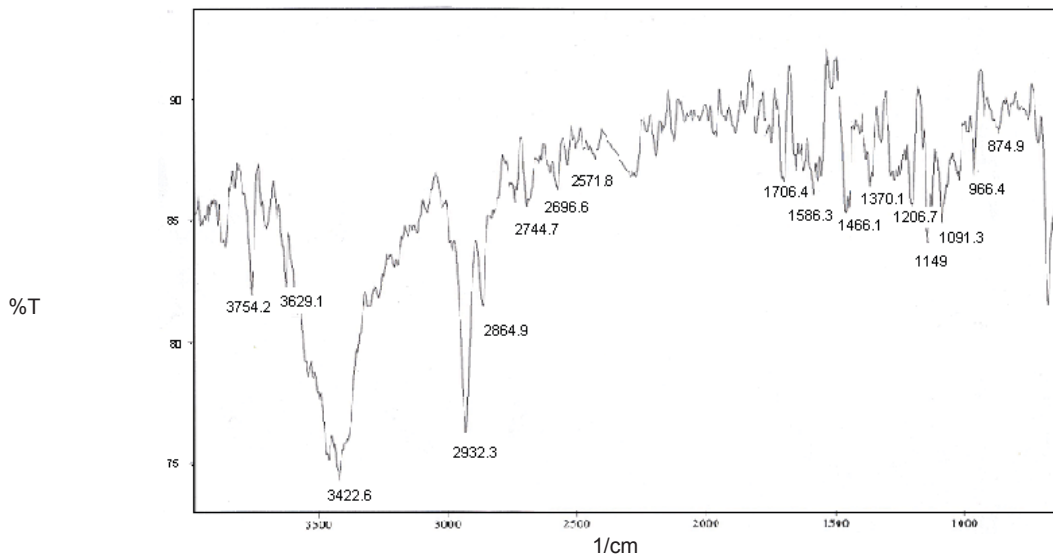
Analisis spektroskopi IR terhadap isolat (Gambar 3) memperkuat hipotesis dari hasil analisis spektroskopi UV bahwa isolat merupakan golongan senyawa karotenoid, dengan ciri rantai poliena (ikatan rangkap) alifatik terkonjugasi¹⁰ pada serapan bilangan gelombang 1706,4 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur C=C terkonjugasi yang diperkuat oleh serapan C-H dari ikatan rangkap terkonjugasi pada bilangan gelombang 1586,3 dan 1466,1 cm^{-1} .



Gambar 1. KLT SiO₂ 60 GF₂₅₄ fraksi A1 dengan eluen :(a) n-heksana:kloroform (90:10), (b) n-heksana:dietil eter (95:5), (c) n-heksana:etil asetat (95:5)



Gambar 2. Spektrum UV isolat dalam n-heksan



Gambar 3. Spektrum IR isolat dalam pelet KBr

Serapan lebar pada bilangan gelombang $3422,6 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus hidroksil (-OH). Adanya gugus hidroksil ini diperkuat dengan adanya vibrasi ulur dari C-O- pada bilangan gelombang 1149 cm^{-1} dan $1091,3 \text{ cm}^{-1}$. Serapan tajam pada bilangan gelombang $2932,3 \text{ cm}^{-1}$ dan $2864,9 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi ulur C-H alifatik yang didukung -

oleh serapan pada bilangan gelombang 1370 cm^{-1} yang ditimbulkan oleh vibrasi ulur C-C, dari gugus metil.

Analisa spektrum massa, terhadap puncak dengan waktu retensi (t_R) 15,267 menit, menunjukkan pola fragmen yang sesuai dengan senyawa karotenoid. Jika diperhatikan puncak-puncak spektrum -

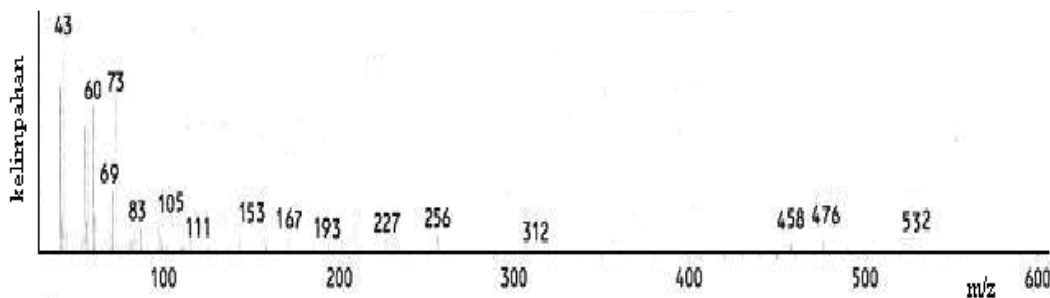
pada gambar 4, diduga puncak ion molekul isolat bukanlah pada m/z 532, tapi pada m/z 568 yang selanjutnya mengalami pelepasan fragmen OH sebanyak dua kali sebagai H_2O menghasilkan ion m/z 550 dan 532. Puncak ion molekuler dengan m/z 568 $[M^+]$ dan 550 $[M^+ - 18]$ tidak terlihat pada spektrum karena struktur telah mengalami proses hidrolisis sehingga kedua gugus hidroksilnya lepas sebagai molekul H_2O membentuk fragmen molekul dengan m/z 532 $[M^+ - 18 - 18]$. Lepasnya molekul OH dalam struktur lutein sangat mungkin terjadi, karena senyawa karotenoid sangat rentan mengalami degradasi oleh cahaya selama proses analisis.⁷

Mercadante, dkk (1997) mengatakan bahwa pada buah mangga telah berhasil ditemukan senyawa lutein (Gambar 5) yang memberikan puncak ion molekul pada m/z 568 dan puncak-puncak lain pada m/z 550, 532, 476, 458, 193, 153, 105 yang sesuai dengan rumus molekul $C_{40}H_{56}O_2$.¹¹ Data spektrum massa isolat

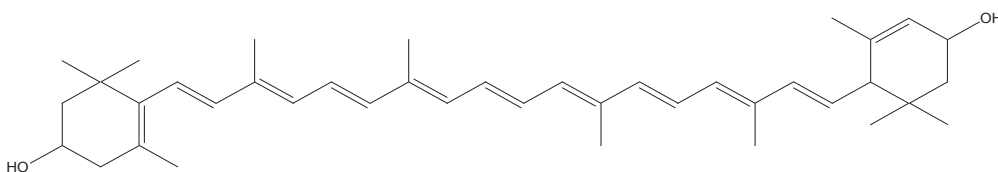
yang diperoleh pada penelitian ini mempunyai kemiripan dengan spektrum - massa senyawa lutein yang ditemukan oleh

Mercadante dkk (1997), yaitu pada m/z 532, 476, 458, 193, 153 dan 105 sehingga isolat hasil penelitian ini diduga sebagai karotenoid jenis lutein.

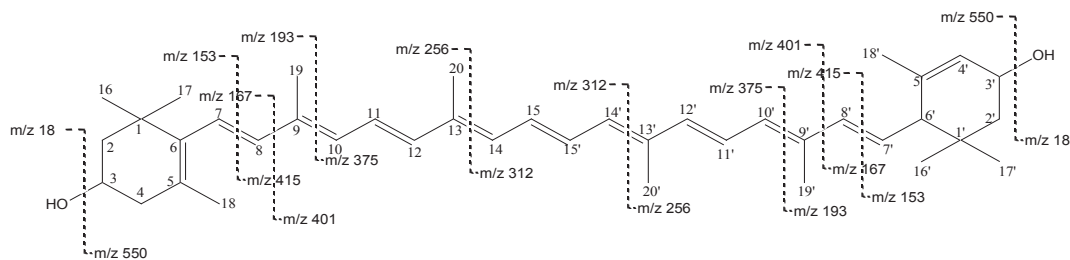
Pembuktian senyawa lutein ini dapat dilihat pada pola fragmentasi Gambar 6. Hilangnya fragmen - OH sebagai H_2O ditunjukkan oleh data fragmentasi dengan m/z 550 $[M^+ - 18]$ dan 532 $[M^+ - 18 - 18]$. Fragmen dengan m/z 312 ditunjukkan dengan pemutusan pada rantai $C_{13}-C_{14}$ dan pada rantai $C_{13}'-C_{14}'$. Pemutusan rantai C_9-C_{10} dan $C_9'-C_{10}'$ menghasilkan fragmen dengan m/z 193. Pemutusan rantai C_8-C_9 dan $C_8'-C_9'$ menghasilkan fragmen dengan m/z 167. Fragmen dengan m/z 153 diperoleh dengan pemutusan pada rantai C_7-C_8 dan $C_7'-C_8'$. Fragmen m/z 193 dan m/z 153 adalah fragmen yang spesifik menunjukkan lepasnya cincin- β dengan sebuah gugus hidroksil.¹²



Gambar 4. Spektrum GC-MS isolat



Gambar 5. Struktur Lutein



Gambar 6. Fragmentasi Isolat

Berdasarkan analisa data spektrum massa, kesesuaian antara data ion molekul (m/z) dengan pola fragmentasi di atas memperkuat dugaan bahwa isolat karotenoid yang diperoleh dari penelitian ini memiliki struktur menyerupai lutein. Lutein memiliki spektrum yang sama dengan induk karotenoidnya yaitu α -carotene, perbedaan terletak pada lokasi terminal dari ikatan rangkapnya.⁷ Degradasi karotenoid terjadi oleh berbagai macam faktor, diantaranya karena perlakuan selama proses pengemasan, kondisi penyimpanan aktivitas enzim dan terjadinya oksidasi. Proses degradasi karotenoid dapat menyebabkan terjadinya reaksi yang berakibat pada perubahan struktur dan berkurangnya massa molekul karotenoid. Rantai poliena (ikatan rangkap alifatik selang-seling) dari karotenoid memberi peluang besar untuk terjadinya oksidasi dan isomerisasi. Panas, cahaya dan asam merupakan pemicu terjadinya isomerisasi struktur trans-carotenoids menjadi bentuk cis-carotenoids. Proses oksidasi bergantung pada ketersediaan oksigen dimana karotenoid tersebut berada membentuk apocarotenoid dan apocarotenals. Fragmentasi struktur yang berakibat menjadi lepasnya beberapa gugus menjadi molekul dengan massa molekul yang lebih rendah merupakan akibat dari proses oksidasi, dapat memicu perubahan rasa (misalnya pada wine atau -

teh) dan dapat pula menyebabkan pelepasan molekul air seperti yang terjadi pada wortel dan kentang.¹³

Kesimpulan

Isolasi senyawa karotenoid dari tumbuhan bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) dari Malang, Jawa Timur diperoleh komponen utama karotenoid yang strukturnya menyerupai lutein setelah dianalisa menggunakan spektroskopi UV, IR, GC-MS.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Dra. Yulfi Zetra, M.Si. Kementerian Pendidikan Nasional sebagai pemberi biaya penelitian Student Grant. Laboratorium Kimia UGM Yogyakarta untuk pengujian spektroskopi GC-MS, Laboratorium Kimia UNESA untuk pengujian spektroskopi UV dan IR.

Daftar Rujukan

1. Aberoumand A. A. Review article on edible pigments properties and sources as natural bio-colorants in foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 2011; 6(1):71-78.
2. Aneja S., Vats M., Sardana S., Aggarwal S. Pharmacognostic evaluation and phytochemical studies on the roots of *Amaranthus tricolor* (Linn.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011; 2(9):2332-36.

3. Xiao Z., Lester G.E., Luo Y., Wang Q. Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: edible microgreens. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 7644–51.
4. Mueller L., Boehm V. Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays. *Molecules.* 2011; 16:1055-69.
5. Wirahadikusumah M. Biokimia, me-tabolisme energi, karbohidrat dan lipid. Bandung: ITB; 1985.
6. Harborne J.B. Metode fitokimia, Edisi ke dua. Bandung: ITB; 1987.
7. Rodriguez D.B., Amaya. A guide to carotenoid analysis in foods. Washing-ton: ILSI Press; 2001.
8. Tee, Siong E. Carotenoid composition and content of malaysian vegetables and fruits by the aoac and hplc methods. *Food Chemistry.* 1991; 41:309-339.
9. Careri M. , Bianchi F., Corradini C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography A.* 2002; 970: 3-64.
10. Zeb A., Mehmood S. Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. *Pakistan Journal of Nutrition.* 2004; 3(3): 199-204.
11. Mercadante A.Z., Rodriguez D.B., Amaya, Britton G. HPLC and Mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *Journal of agricultural chemistry.* 1997; 45: 120-123.
12. Azevedo C.H., Meleiro, Rodriguez D.B., Amaya. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2004; 17: 385-396.
13. Dutta D., Chaudhuri U.R. and Chakraborty R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology.* 2005; 4(13): 1510-20.