

ANALISA KUALITATIF DAN KUANTITATIF α -TOKOFEROL PADA EKSTRAK KECAMBACH KACANG HIJAU (*Vigna radiata* L.) SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Hilma¹, Mauizatul Hasanah, Tiwi Sully Maolina

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi Palembang

Jl. Ariodillah III No. 22A Ilir Timur I Palembang, Sumatera Selatan

Email: ¹89hilma@gmail.com

ABSTRAK

Kecambah kacang hijau merupakan salah satu tanaman yang mengandung α - tokoferol cukup tinggi dan telah diketahui mempunyai banyak manfaat. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan kandungan α - tokoferol dalam ekstrak kecambah. Ekstraksi α - tokoferol dalam kecambah kacang hijau dilakukan dengan ekstraksi sokhletasi. Hasil ekstraksi kecambah kacang hijau diperoleh rendemen ekstrak sebesar 1,4% Ekstrak dianalisis dengan sistem KCKT fase terbalik dengan sistem kolom C18 (250 x 4,6 mm), fase gerak metanol, kecepatan alir 1 mL/ menit, detektor UV dengan panjang gelombang 291 nm dengan volume injeksi 20 μ L. Hasil uji linearitas didapatkan persamaan garis regresi $y = 335,72 x + 34131$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,997. Hasil analisis kandungan α - tokoferol diperoleh kadar rata-rata 3,470 mg/g.

Kata Kunci : α - tokoferol, kecambah kacang hijau, sokhletasi, KCKT

PENDAHULUAN

Tanaman kacang hijau merupakan tanaman kacang-kacangan ketiga yang banyak dibudidayakan di Indonesia setelah kedelai dan kacang tanah (Purwono dan Hartono, 2005). Kecambah adalah tumbuhan kecil yang baru tumbuh dari biji kacang-kacangan yang disemaikan (Anggrahini, 2007). Vitamin yang ditemukan dalam kecambah diantaranya vitamin C, thiamin, riboflavin, niasin, asam pantothenik, vitamin B6, folat, kolin, β -karoten, vitamin A, vitamin E (α -tokoferol), dan vitamin K (Maulana, 2010). Perkecambahan biji kacang hijau akan memperkaya kandungan vitamin kacang hijau dan meningkatkan kandungan vitamin E (α -tokoferol) selama perkecambahan (Anggrahini, 2007).

Vitamin E (α -tokoferol) adalah vitamin yang larut dalam minyak, bersifat non toksik dan memegang peranan penting dalam berbagai fungsi fisiologis seperti fungsi reproduksi, sistem imun, fungsi syaraf serta otot (Widada, 2013). Vitamin E juga berperan sebagai antioksidan yang membantu

melindungi tubuh dari efek radikal bebas (Andarwulan dan Koswara, 1989). Vitamin E (α -tokoferol) banyak dijumpai dalam minyak tumbuhan (seperti minyak bunga matahari dan minyak zaitun), kacang-kacangan, sayuran yang berwarna hijau, serta biji-bijian yang dikecambahkan seperti kacang hijau dan kedelai (Kumalaningsih, 2006)

Anggrahini (2007) melakukan penelitian tentang pengaruh lama pengecambahan terhadap kandungan α -tokoferol pasta kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L) dengan metoda KCKT menggunakan fasa gerak metanol. Hasil penelitiannya menunjukkan pada waktu inkubasi 36 dan 48 jam, masing-masingnya menunjukkan kadar α -tokoferol sebesar 0,21 μ g/g dan 0,53 μ g/g.

Kromatografi cair kinerja tinggi memiliki banyak keuntungan diantaranya waktu analisa cepat, resolusi yang tinggi, sensitifitas tinggi, mampu menganalisa cuplikan secara kualitatif dan kuantitatif dan kolom dapat digunakan kembali. (Rohman, 2007). Berdasarkan latar belakang tersebut, pada penelitian ini dilakukan analisa kandungan α -tokoferol pada

ekstrak kecambah kacang hijau hasil ekstraksi secara sokletasi dengan menggunakan metoda KCKT.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu: Timbangan analitik, seperangkat alat sokletasi; seperangkat instrumen HPLC (Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters 600 Controller, Waters 626 pump) yang dilengkapi dengan pompa dan detektor uv, kolom C-18 (4,6 x 25 cm), syringe mikroliter 50 µl (SGE), spektrofotometri UV-Vis (Bel Photonics), pipet volumetri dan ultrasonicator, pipet tetes, beaker gelas, dan alat-alat gelas lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksan, standar α -tokoferol ($\geq 96\%$) grade HPLC (Sigma), etanol pro analis (Merck), metanol grade HPLC).

Prosedur Penelitian

Sampel Penelitian

Sampel biji kacang hijau diambil di Desa Sinar Mulyo, Simpang Martapura, Sumatera Selatan. Pembuatan kecambah kacang hijau dilakukan menggunakan biji kacang hijau yang sudah tua dan sudah lepas dari kulitnya. Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas.

Pembuatan Kecambah Kacang Hijau

Pembuatan kecambah dilakukan dengan cara: 700 gr biji kacang hijau dibersihkan dari pengotor kemudian direndam selama 8 jam, biji kacang hijau dicuci kembali dan ditiriskan. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 36 jam. Selama proses perkecambahan dilakukan penyiraman dengan air setiap 12 jam sekali (Anggrahini, 2007).

Ekstraksi Kecambah Kacang Hijau dengan Sokhletasi

Sampel kecambah kacang hijau segar ditimbang sebanyak 500 g lalu diblender, hingga menjadi pasta kecambah. Ditimbang sebanyak 400 g kemudian dibungkus dengan kertas saring dan ikat dengan benang dan dimasukkan ke dalam wadah sampel sokhletasi, ditambahkan n-heksan 500 ml sampai seluruh bahan terendam. Dilakukan sokhletasi dengan suhu 70 °C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi atau kurang lebih 3 jam. Pada proses sokhletasi dilakukan dua kali pengulangan sokhletasi. Hasil sokhletasi dihasilkan berupa maserat kemudian dipisahkan dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan Vacuum rotary Evaporator hingga didapatkan ekstrak kental.

Hasil rendemen ekstrak n-heksan kecambah kacang hijau dapat di hitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot yang diekstraksi}} \times 100 \%$$

Pembuatan Larutan Induk α -tokoferol

Minyak α -tokoferol dipipet 0,26 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas, dikocok homogen hingga diperoleh konsentrasi 10.000 ppm. Kemudian diencerkan lagi menjadi konsentrasi 500 ppm dengan memipet 1,25 ml larutan standar 10.000 ppm dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan etanol p.a (Fithriyah, 2013).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Baku α -tokoferol

Penentuan panjang gelombang maksimum baku α -tokoferol menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan range panjang gelombang 250-350 nm (Fithriyah, 2013). Dari larutan induk baku standar 500 ppm diambil dari konsentrasi 5 ppm dipipet sebanyak 0,1 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas lalu dimasukkan ke dalam

kuvet dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Baku α -tokoferol dan Uji Linearitas

Dari larutan induk baku standar 500 ppm dibuat variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Masing-masing di injeksikan sebanyak 20 μ l ke dalam sistem KCKT pada panjang gelombang maksimum untuk mendapatkan nilai persamaan regresi linearnya.

Menggunakan data konsentrasi vs absorbansi dibuat kurva kalibrasi hingga diperoleh persamaan garis regresi linear ($y = ax + b$). Linearitas dari kurva kalibrasi dilihat dengan menghitung koefisien korelasi (r) dari persamaan garis linear.

Penetapan kadar α - tokoferol ekstrak kecambah kacang hijau

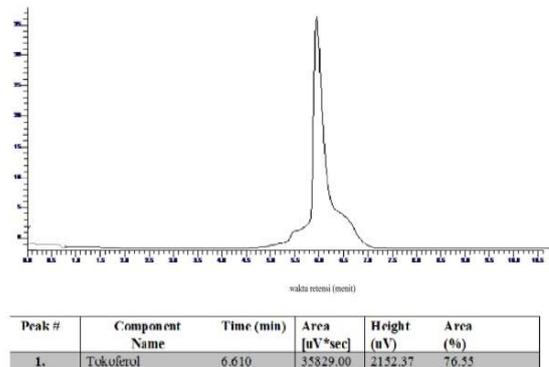
Ekstrak kecambah kacang hijau ditimbang sebanyak 0,25 g dan dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 25 mL. Setelah itu sampel disaring dan diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke alat KCKT menggunakan kolom C18 (250 x 4.6 mm) kecepatan aliran 1,0 mL/min dan menggunakan fasa gerak methanol . Luas puncak yang didapat kemudian di substitusikan ke dalam persamaan regresi pada kurva kalibrasi sebagai nilai y, sehingga didapat konsentrasi sampel dalam satuan ppm. Kemudian dilakukan perhitungan kadar % b/b .

HASIL DAN PEMBAHASAN

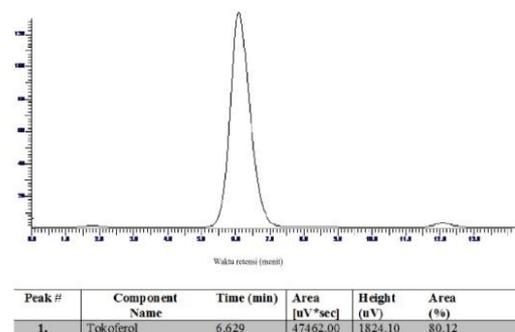
Metode ekstraksi yang dipakai untuk memperoleh ekstrak kecambah kacang hijau (*Vigna radiata* L.) ini adalah soxhletasi. Soxhletasi merupakan metoda ekstraksi cara panas yang dapat menghasilkan ekstrak yang lebih banyak, pelarut yang digunakan lebih sedikit, waktu pengerjaan lebih cepat dan ekstraksi sampel lebih sempurna karena pengerjaannya dilakukan berulang-ulang (Puspitasari, 2017). Soxhletasi kecambah kacang hijau dilakukan menggunakan pelarut

n- heksan karena pelarut n-heksana bersifat inert, sangat non polar dan memiliki narrow distillation range sehingga tidak memerlukan suhu pemanasan yang tinggi yang menjadikannya pelarut yang tepat digunakan untuk mengekstraksi minyak (Prasetiowati, 2010). Dari proses ekstraksi diperoleh ekstrak kental sebanyak 5,7 g dengan persen rendemen 1,4% (b/b). Hasil pemeriksaan pada ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak kental kecambah berwarna kuning kecoklatan , bau khas kecambah dan rasa pahit.

Identifikasi α -tokoferol dalam sampel ekstrak kecambah kacang hijau dilakukan dengan membandingkan waktu retensi (Rt) sampel dengan baku standar α -tokoferol. Dari pengujian diperoleh waktu retensi sampel hampir sama dengan baku standar yaitu 6,610 menit, membuktikan bahwa ekstrak sokletasi kecambah kacang hijau mengandung α -tokoferol.

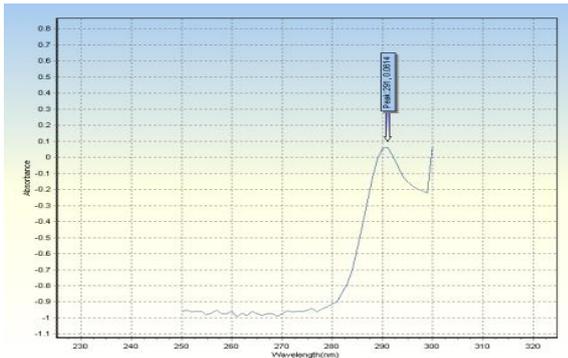


Gambar 1. Kromatogram α -tokoferol baku Standard



Gambar 2. Kromatogram sampel ekstrak kecambah kacang hijau

Sebelum pembuatan kurva kalibrasi ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimum α -tokoferol baku yang digunakan. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis, diperoleh λ maksimum α -tokoferol 291 nm. Seperti dalam gambar 1.

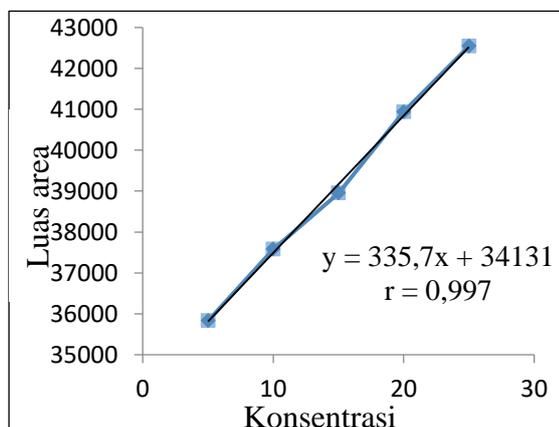


Gambar 3. Spektrum panjang gelombang maksimum α -tokoferol baku murni

Hasil uji linearitas larutan baku α -tokoferol konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm pada panjang gelombang 291 nm di dapatkan persamaan garis linearnya $y = 335,72 x + 34131$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,997

Tabel 1 Data uji linearitas

Konsentrasi (C) (ppm)	Luas Puncak (μ V/s)
5	35829
10	37575,82
15	38949,16
20	40936,53
25	42541,66



Gambar 4. Kurva Kalibrasi α -tokoferol

Sebelum dilakukan penetapan kadar, ekstrak terlebih dahulu dilarutkan dengan pelarut etanol p.a. Pelarut etanol digunakan untuk memisahkan vitamin E yang terikat pada membran karena alkohol merupakan medium dimana α -tokoferol larut dan bebas mengelusi (Ubaldi, 2005).

Rata-rata kadar α -tokoferol yang diperoleh hasil ekstraksi dengan metoda sokletasi adalah adalah 3,47 mg/g. Dibandingkan dengan hasil penelitian Anggrahini (2007) yang melakukan analisa kandungan α -tokoferol pada pasta kecambah kacang hijau diperoleh kandungan α -tokoferolnya sebesar 0,21 μ g/g, dapat disimpulkan bahwa metoda ekstraksi berpengaruh terhadap perolehan α -tokoferol dalam kecambah kacang hijau.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan kadar α -tokoferol dalam ekstrak kecambah kacang hijau yang diperoleh dengan metoda sokletasi sebesar 3,47 mg/g.

SARAN

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk menganalisis α -tokoferol pada ekstrak kecambah kacang hijau dengan metode ekstraksi yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Andarwulan, N. dan koswara, S. 1989. *Kimia Vitamin*. Jakarta :Rajawali Press, 209-216
- Anggrahini, S. 2007. Pengaruh Lama Perkecambahan Terhadap Kandungan α -tokoferol dan Senyawa Proksimat Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.). *Agritech*. 27(4):152-156
- Fithriyah, Nurul. 2013. *Analisis A-Tokoferol (vitamin E) Pada Minyak Biji Kelor (Moringa Oleifera Lam) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. (Skripsi). Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah.

- Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami*. Surabaya: Trubus Agrisarana
- Maulana, A. I. 2010. *Pengaruh ekstrak taugé (phaseolus radiatus) terhadap kerusakan sel ginjal mencit (mus musculus) yang diinduksi parasetamol.* (skripsi) Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Prasetyowati. 2010. Pengambilan Minyak Biji Alpukat (*Persea Americana Mill*) dengan Metoda Ekstraksi. *Jurnal Teknik Kimia*. 17 (2): 16-24
- Purwono dan Hartono R, 2005, *Kacang Hijau*, Penebar Swadaya, Depok.
- Puspitasari, Anita Dwi dan Lean Syam Proyogo. 2017. Perbandingan Metoda Ekstraksi Maserasi dan Soxletasi terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendikia Eksakta*. 2(1): 1-8
- Rohman, A. 2009 . *Kromatografi Untuk Analisa Obat*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Ubaldi, Delbaono. A. Quick Hplc Method to determine Vitamin E concentration in cows milk. *Ann. Fac.Medic, diparma*. Vol 25: 101-110
- Widada, H. 2013. *Analisis Kandungan Vitamin E Pada Buah Borrassus flabellifer linn. Menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. 13, 143-150.

