

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode Penelitian

1. Kajian Artikel

Penelitian ini menggunakan metode kajian artikel atau *literature review*. Kajian artikel merupakan tinjauan komprehensif (menyeluruh) dari penelitian sebelumnya mengenai topik tertentu dengan memasukkan analisis sekunder pengetahuan secara eksplisit, serta menunjukkan kepada pembaca mengenai hal yang telah diketahui dan belum diketahui dari suatu topik (Jesson, *et al.*, 2011). Untuk mencari dan menyeleksi artikel-artikel yang akan digunakan maka penulis menggunakan pendekatan PICOS (*Population, Intervention, Comparison, Outcomes, dan Study Design*), yaitu kerangka kerja yang membantu untuk mengembangkan strategi pencarian literatur (Suci, *et al.*, 2021). Adapun strategi pencarian jurnal atau artikel berdasarkan pendekatan PICOS adalah sebagai berikut:

1. *Population/problem*, merupakan populasi atau permasalahan yang akan dianalisis.
2. *Intervention*, merupakan pemaparan dan tindakan penatalaksanaan dalam suatu kasus yang dianalisis.
3. *Comparison*, merupakan penatalaksanaan sebagai pembanding.
4. *Outcome*, merupakan hasil yang diperoleh dari penelitian yang dianalisis oleh penulis untuk *review* jurnal.

5. *Study design*, merupakan desain dari penelitian menggunakan media jurnal atau artikel ilmiah yang dianalisis (kajian artikel).

Tabel 3.1 Kriteria PICOS yang digunakan

Kriteria PICOS	Panduan Pertanyaan
<i>Population/Problem</i>	Populasi berasal dari wortel yang tumbuh pada beberapa daerah
<i>Intervention</i>	Preparasi sampel, analisis kualitatif, penentuan panjang gelombang, penetapan kadar beta karoten.
<i>Comparison</i>	Membandingkan preparasi sampel, analisis kualitatif, penentuan panjang gelombang, dan penetapan kadar beta karoten pada wortel.
<i>Outcome</i>	Nilai kadar beta karoten.
<i>Study design</i>	Kajian artikel/ <i>literature review</i>

2. Kata Kunci

Kata kunci yang digunakan dalam pencarian artikel ilmiah untuk bahan *review* jurnal yaitu “beta karoten”. “wortel”, “analisis”, “tanaman jingga”, dan “penetapan kadar”.

3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi yang digunakan dalam pencarian artikel ilmiah untuk dikaji adalah artikel memiliki ISSN, artikel diterbitkan dalam *database* terpercaya seperti Google Cendekia/Google Scholar, MDPI, PubMed, ScienceDirect dan Springer, artikel ditulis dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris, berbentuk *fulltext* format .pdf, terdapat wortel dalam sampel yang digunakan, memiliki hasil akhir berupa nilai kadar beta karoten, serta penelitian menggunakan desain eksperimental. Adapun kriteria eksklusi yang digunakan adalah artikel tidak memiliki ISSN, artikel ditulis dalam bahasa lain selain Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris, artikel menggunakan format lain

selain .pdf, tidak menggunakan sampel wortel, tidak ada nilai kadar beta karoten yang ditemukan, serta bentuk penelitiannya bukan eksperimental.

4. Database Pencarian

Basis data (*database*) adalah sebuah sistem yang digunakan sebagai sumber informasi yang efektif dan efisien (Silalahi dan Wahyudi, 2018). Pencarian artikel acuan untuk *review* dilakukan pada beberapa *database*, seperti Google Cendekia/Google Scholar, MDPI, PubMed, ScienceDirect, dan Springer. Untuk melihat keabsahan dan akreditasi dari jurnal yang digunakan, maka artikel dan jurnal yang digunakan telah diperiksa pada portal jurnal seperti SINTA untuk jurnal nasional dan Scimago Journal & Country Rank untuk jurnal internasional. Kriteria yang diterapkan dalam pencarian yaitu artikel ditemukan dalam *database* di atas, memiliki ISSN, terindeks portal jurnal SINTA (untuk artikel nasional) dan Scimago Journal & Country Rank (untuk artikel internasional), tertulis dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris, meneliti kadar beta karoten, dan menggunakan sampel wortel (diutamakan wortel jingga).

5. Jenis dan Jumlah Sumber

Sebanyak 5 sumber acuan digunakan untuk sumber data sebagai dasar analisis dari topik penelitian yang telah dipilih. Adapun artikel-artikel yang digunakan berasal dari jurnal-jurnal yang sudah bisa dipastikan keabsahannya, yaitu 2 jurnal nasional yang telah terakreditasi portal SINTA, 1 prosiding seminar internasional yang telah terindeks Scopus, serta 2 jurnal internasional yang telah terakreditasi portal Scimago Journal & Country Rank.

Tabel 3.2 Informasi Singkat tentang Artikel yang digunakan

No.	Judul Artikel	ISSN	SINTA	Scimago	Scopus	H-index
1.	Penetapan Kadar β -Karoten pada Wortel (<i>Daucus carota</i> L.) Mentah dan Wortel Rebus dengan Spektrofotometri Visibel	2579-4558	S3	-	-	10
2.	Penentuan β -Karoten dalam Buah Wortel (<i>Daucus Carota</i>) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (U-HPLC)	2548-5741	S2	-	-	13
3.	<i>Isolation and Determination of Beta-Carotene in Carrots by Magnetic Chitosan Beta-Cyclodextrin Extraction and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	1532-236X	-	Q3	CiteScore: 2,4 SJR: 0,3 SNIP: 0,463	62
4.	<i>Isolation of β-carotene, α-carotene and lutein from carrots by countercurrent chromatography with the solvent system modifier benzotrifluoride</i>	1873-3778	-	Q1	CiteScore: 7,3 SJR: 1,693 SNIP: 1,413	237
5.	<i>Total β-carotene of β-carotene carrot powder (<i>Daucus carota</i> L.) encapsulation result</i>	1755-1315	-	-	CiteScore: 0,5 SJR: 0,179 SNIP: 0,446	-

B. Isi Artikel

Berikut ini merupakan isi dari artikel yang ditelaah:

a. Artikel pertama

Judul artikel	: Penetapan Kadar β -Karoten pada Wortel (<i>Daucus carota</i> L.) Mentah dan Wortel Rebus dengan Spektrofotometri Visibel
Nama jurnal	: Jurnal Farmasi Sains dan Praktis (JFSP)
Penerbit	: Universitas Muhammadiyah Magelang
Volume dan halaman	: Volume V No. 1, Halaman 7-13
Tahun terbit	: 2019
Penulis	: Agustina, A., Nurul, H., dan Putri, S.
Isi artikel	
- Tujuan Penelitian	: Untuk mengetahui perbedaan kadar β -karoten pada wortel mentah dan wortel rebus menggunakan analisis kualitatif dan kuantitatif.
- Metode Penelitian	:
Desain	: Eksperimental
Populasi dan sampel	: Wortel berumur 3-3,5 bulan dari perkebunan sayuran di Selo, Boyolali.
Instrumen	: Lempeng KLT, <i>chamber</i> , labu takar 50 mL, labu takar 100 mL, labu ukur 10 mL, spektrofotometri visibel.

- Metode Analisis :

1. *Preparasi sampel wortel mentah*

Wortel dicuci bersih, dipotong dengan ketebalan $\pm 0,5$ cm, dihaluskan dengan *blender* tanpa air, kemudian diambil sebanyak 100 gram dan diekstraksi dengan heksan:aseton:etanol dengan rasio perbandingan 2:1:1 sebanyak 200 mL. Fase atas diambil sedangkan fase air diekstraksi lagi sampai lapisan bawah tidak berwarna, kemudian fase atas diuapkan sehingga memperoleh larutan kental.

2. *Preparasi sampel wortel rebus*

Wortel dicuci bersih, dipotong dengan ketebalan $\pm 0,5$ cm, kemudian dimasukkan dalam panci yang berisi air suling mendidih dan dipanaskan selama ± 7 menit sambil beberapa kali diaduk. Kemudian sepotong sampel diambil lalu ditusuk dengan garpu/pisau, apabila sudah lunak berarti sudah matang. Sampel diangkat dan ditiriskan, kemudian dilakukan preparasi seperti pada wortel mentah.

3. *Analisis kualitatif β -karoten dengan KLT*

Fase gerak yang digunakan adalah petroleum eter:benzen (9:1). Fase diam yang digunakan adalah Silika gel 60 F254. Larutan β -karoten murni sebagai pembanding dan larutan sampel ditotolkan bersama-sama pada lempeng KLT dengan jarak 1 cm dari tepi bawah lempeng KLT dan jarak rambat (pada jarak rambat diberi tanda). Setelah lempeng KLT jenuh, lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di udara, dan bercak diamati dengan lampu UV 254 nm. Lakukan pengukuran dan dicatat tiap-tiap bercak dari titik penotolan. Nilai Rf kemudian dihitung.

4. Penetapan kadar β -karoten

Ditimbang 10 mg ekstrak wortel lalu dilarutkan dan diencerkan dengan etanol pada labu takar 5 mL. Kemudian dipipet 0,5 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol dalam labu takar 10 mL. Kemudian serapan diukur dengan Spektrofotometri Visibel pada λ_{\max} dengan etanol sebagai blangko. Kadar β -karoten pada sampel kemudian ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier $Y = bx + a$.

- Hasil Penelitian :

1. Hasil analisis kualitatif

Analisis kualitatif identifikasi β -karoten pada wortel mentah dan wortel rebus dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan cairan pengelusi petroleum eter : benzene (9:1) dengan penampak noda UV 254 nm menunjukkan hasil yang sesuai dengan baku pembanding yaitu baik sampel wortel mentah maupun wortel rebus menunjukkan 1 bercak berwarna kuning dengan nilai Rf 0,5. Berdasarkan hasil yang didapat menunjukkan bahwa sampel wortel mentah dan wortel rebus mempunyai warna dan nilai Rf yang sama dengan baku pembandingnya. Sehingga wortel mentah dan wortel rebus positif mengandung senyawa β -karoten.

Tabel 3.3 Hasil analisis kualitatif

Sampel	Nilai Rf
Baku pembanding	0,54
Wortel mentah	0,54
Wortel rebus	0,54

2. Hasil penetapan kadar β -karoten

Tabel 3.4 Hasil penetapan kadar β -karoten

Sampel (Replikasi)	Serapan	Konsentrasi (ppm)	Kadar (%)	Rata-rata \pm SD (%)
Wortel mentah (1)	0,600	21,35	42,70	
Wortel mentah (2)	0,495	17,52	35,04	34,94 \pm 7,810
Wortel mentah (3)	0,386	13,54	27,08	
Wortel rebus (1)	0,401	14,09	28,18	
Wortel rebus (2)	0,294	10,18	20,36	23,31 \pm 4,246
Wortel rebus (3)	0,308	10,70	21,40	

Berdasarkan data pada **Tabel 3.4** terlihat adanya perbedaan kadar β -karoten antara wortel mentah dan wortel rebus. Kadar β -karoten pada wortel direbus mempunyai kadar yang lebih kecil dibandingkan dengan wortel mentah karena adanya pemanasan. Proses pemanasan pada β -karoten menurunkan kandungan β -karoten karena β -karoten terisomerisasi dari bentuk trans ke bentuk cis. Pada penelitian ini, batas suhu pemanasan tidak diukur dengan jelas sehingga tidak dapat menentukan suhu kerusakan β -karoten. Besarnya kadar β -karoten kemudian dianalisa menggunakan uji sample paired t-test untuk mengetahui ada dan tidaknya perbedaan yang bermakna antara kadar β -karoten wortel mentah dan wortel rebus. Hasil uji menunjukkan bahwa nilai P value 0,06 ($> 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan bermakna antara kadar β -karoten pada wortel mentah dan wortel rebus.

- Kesimpulan :

Hasil analisis kuantitatif menunjukkan kadar β -karoten pada wortel mentah adalah $34,94 \pm 7,810$ % dan pada wortel rebus adalah $23,31 \pm 4,246$ %. Hasil dianalisis dengan uji sample paired t-test menunjukkan bahwa nilai P value 0,06 ($> 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan bermakna antara kadar β -karoten pada wortel mentah dan wortel rebus.

b. Artikel kedua

Judul artikel : Penentuan β -Karoten dalam Buah Wortel (*Daucus carota*) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (U-HPLC)

Nama jurnal : Jurnal AcTion: Aceh Nutrition Journal;

Penerbit : Poltekkes Kemenkes Aceh

Volume dan halaman : Volume 4 No. 1, Halaman 36-41

Tahun terbit : 2019

Penulis : Mangunsong, S., Rifqy, A., Eka, P.S., Priscila, N.M., dan Rahma, A.S.

Isi artikel

- Tujuan Penelitian : Untuk mendapatkan metode yang tepat dan teliti dalam penentuan β -karoten pada wortel, serta mengetahui kandungan β -karoten yang dari wortel.

- Metode Penelitian :

Desain : Eksperimental

Populasi dan sampel : Wortel yang berasal dari supermarket Palembang

Instrumen : KCKT (U-HPLC Thermo versi Ultimate 3000 series), Spektrofotometer UV-Vi (Analytic Jena specord 200), timbangan analitik (Sartorius Dragon), timbangan mikro (Sartorius Dragon), pelumat (Philips), Rotavapor (Buchi V-800), corong pisah, alat-alat gelas, kertas saring Whatman No. 40.

- Metode Analisis :

1. *Persiapan sampel/pembuatan ekstrak*

Wortel segar yang telah dipotong-potong dan dihaluskan, ditimbang sejumlah 100 gram (wortel), 50 gram di-*blender* menggunakan pelarut air mineral, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diberi garam kalsium, disentrifuse 3000 rpm 15 menit. Residu sebagai *pellet* adalah beta karoten, dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 40°C. Disimpan dalam suhu dingin.

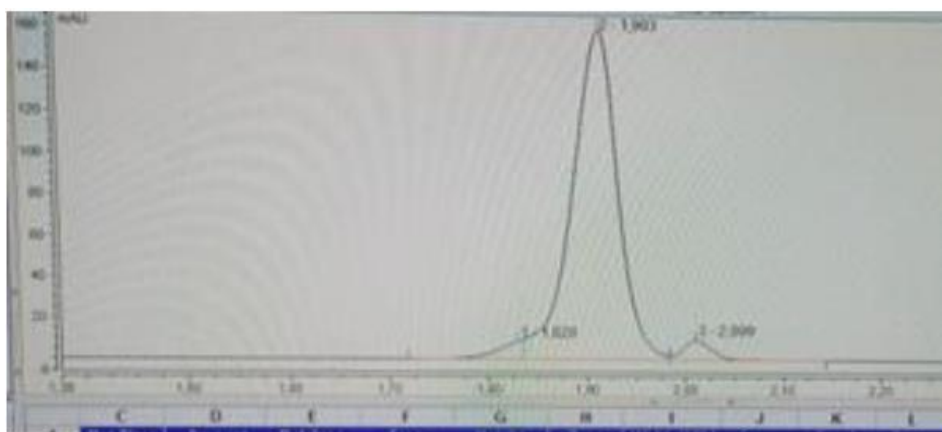
2. *Analisis kuantitatif secara KCKT*

Untuk pengujian dalam sampel, larutan uji disonikasi selama 10 menit. Masing-masing disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam alat KCKT dan diukur luas puncaknya dengan kondisi KCKT yang optimum.

- Hasil Penelitian :

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 sebaga betakaroten yang berwarna jingga. 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. Hasil penetapan panjang gelombang dapat dilihat pada **Gambar 3.1**, hasil pemilihan

fase gerak dan laju alir terlihat pada **Gambar 3.1**. Pada penelitian ini telah dihasilkan waktu retensi beta karoten adalah 1,903 menit menggunakan laju alir 1 mL/ menit dengan fase gerak kloroform : metanol (95:5) hasil kromatograf **Gambar 3.1**. Selanjutnya menggunakan pembanding laju alir 1 ml/menit β -karoten baku dapat terpisah pada waktu retensi 1,392 menit.



Gambar 3.13 Kromatografi isolat beta karoten wortel dengan waktu retensi 1,903 menit fase gerak kloroform:metanol (95:5)

- 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.

c. Artikel ketiga

Judul artikel : *Isolation and Determination of Beta-Carotene in Carrots by Magnetic Chitosan Beta-Cyclodextrin*

Extraction and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- Nama jurnal : Analytical Letters
- Penerbit : Taylor & Francis Group
- Volume dan halaman : Volume 51, Halaman 1-16
- Tahun terbit : 2019
- Penulis : Dai, Y., dan Kyung, H.R.
- Isi artikel
- Tujuan penelitian : Untuk mengetahui efektivitas analisis beta karoten jika menggunakan kombinasi magnet chitosan dan biopolimer beta-siklodekstrin.
 - Metode penelitian :
- Desain : Eksperimental
- Populasi dan sampel : Wortel yang dibeli dari pasar lokal (Yonghyeondong, Incheon, Korea) pada 5 Agustus 2018.
- Instrumen : Spektroskopi FT-IR (Vertex 80v), perangkat KCKT, mikroskop elektron (FE-SEM, S-4300SE), vakuum, *oil bath*, tabung kaca.
- Metode analisis :
1. *Persiapan sampel*

Sampel wortel dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan tanah yang menempel, kemudian kulit wortel dikupas manual menggunakan pisau buah berbahan *stainless steel* lalu diiris merata. Sampel dihaluskan dan dikeringkan dengan suhu 50°C untuk ekstraksi paralel beta karoten.

2. *Persiapan nanopartikel kitosan magnetik*

Pembuatan kitosan magnetik disintesis oleh pengendapan kimia *in situ* dari Fe^{2+} dan Fe^{3+} dalam larutan basa dengan kitosan. Kitosan (60 mg) dilarutkan dalam 80 mL air deoksigenasi dan diaduk selama 2 jam. Selanjutnya, 35 mL campuran yang mengandung 300 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan 810 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan ke dalam dispersi kitosan homogen dengan pengadukan mekanis terus-menerus selama 1 jam dibawah atmosfer nitrogen.

Endapan besi oksida didapatkan dengan menambahkan 20 mL amonia (30,0% berat) tetes per tetes pada suhu 70°C . Reaksi kemudian dilakukan pada suhu 70°C dengan pengadukan mekanis pada kecepatan 1000 rpm selama 3 jam untuk memungkinkan kristal nanopartikel bertumbuh dengan baik. Produk kecoklatan diperoleh dari campuran menggunakan magnet permanen yang kuat, dibilas beberapa kali menggunakan air deionisasi dan etanol, dikeringkan di dalam oven vakum pada suhu 50°C selama 24 jam, kemudian digiling untuk mendapatkan partikel berukuran 100-mesh, dimana akan digunakan untuk isolasi eksperimen.

3. *Persiapan biopolimer beta-siklodekstrin kitosan magnetik*

Senyawa dibuat dengan reaksi esterifikasi dan amidasi berdasarkan metode yang dilaporkan oleh Binello *et al.* (2004). Pertama, 9 gram beta-siklodekstrin dan 15 gram maleat anhidrat ditambahkan ke dalam anhidrat N, N-dimetilformamida dan larutan yang dihasilkan langsung dipindahkan ke labu alas bulat berleher ganda di bawah atmosfer nitrogen. Campuran ini

kemudian diaduk pada suhu 25°C selama 48 jam sampai larutan berubah menjadi kuning. Kemudian etil asetat (50 mL) ditambahkan ke dalam larutan untuk membentuk endapan putih seperti gel. Proses ini dilakukan 3 kali agar mengendapkan seluruhnya.

Produk putih dikumpulkan dengan filtrasi dan dikeringkan sepanjang malam pada suhu 50°C di dalam oven vakuum. Selanjutnya, 2 gram dari produk dan 0,25 gram 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidroklorida dilarutkan dalam 100 mL air deioniasi, kemudian ditambahkan 0,5 gram N-hidroksisuksinimida, 25 mmol etilenglikol dimetakrilat, dan 0,3 mmol 2,2-azobisisobutironitril ke dalam campuran setelah diaduk selama 2 jam. Kedua larutan dideoksigenasi dengan menggelegak nitrogen selama 10 menit, dan campuran ini dipolimerisasi pada suhu 60°C selama 24 jam.

Setelah dipolimerisasi, larutan tadi diendapkan beberapa kali dengan aseton setelah diaduk selama 48 jam. Polimer curah yang dihasilkan digiling dan dilewatkan melalui saringan *stainless steel* berukuran 105 µm, dan endapan putih diberi tanda sebagai beta-siklodekstrin kitosan magnetik. Kitosan murni disintesis dibawah kondisi yang sama dan produk tersebut ditandai sebagai beta-siklodekstrin kitosan sebagai perbandingan.

4. Analisis dan penentuan kandungan beta karoten

1 g sampel dicampur dengan 60 µg biopolimer siklodekstrin kitosan magnetik dan 20 mL alkohol oleil dan diaduk menggunakan *mixer* pengaduk. Ekstrak kemudian dipindah melalui penyaring nilon 0,45 µm. Alikuot dari filtrat kemudian disaponifikasi dalam 180 µL dari 0,55g/mL

kalium hidroksida. Campuran ini kemudian diaduk dan dibilas dengan nitrogen dan didiamkan dalam gelap pada suhu ruang selama 12 jam. Selanjutnya, setiap alikuot dari sampel dipindahkan ke corong pemisah dan dibilas dengan air suling deionisasi dan heksana. Sampel kemudian di-vortex dengan kuat selama 40-55 detik untuk memisahkan lapisan sepenuhnya. Lapisan air dibuang dan ekstrak dipindahkan ke dalam tabung kaca. *Pellet* yang didapatkan diekstrak tiga kali. Untuk menguapkan heksana, tabung yang berisi ekstrak akhir diletakkan dalam *oil bath* pada suhu 60°C di bawah vakuum. Terakhir, sampel dilarutkan dalam metanol-triklorometana dan dianalisis menggunakan KCKT.

- Hasil penelitian :

Sampel dianalisis sebanyak 2 kali. Tiga sampel dipilih dari total kumpulan sampel dan dianalisis ulang untuk memeriksa keakuratan dan reproduktifitas metode.

Tabel 3.5 Hasil Penentuan Kadar Beta Karoten (*Dai & Kyung, 2019*)

Metode	Sistem Pendeteksi	Pelarut untuk ekstraksi	Waktu ekstraksi (menit)	Sampel	Jumlah Kandungan ($\mu\text{g/g}$)	Batas Deteksi/LOD ($\mu\text{g/g}$)	Batas Kuantifikasi /LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sumber Penelitian
Ultrasonik - ekstraksi dengan beta-siklodekstrin kitosan magnetik	KCKT	Alkohol oleil	25	Wortel	41,06 \pm 0,02	0,17	0,48	(Dai & Kyung, 2019)

Metode yang digunakan dalam penelitian ini lebih sedikit memakan waktu untuk mendapatkan ekstraksi penuh karena ikatan molekuler hidrogen intermolekuler diantara biopolimer magnetik dan sampel. Dibandingkan dengan metode konvensional, pelarut ekstraksi yang bekerja dalam metode ini lebih sedikit memiliki racun dan memerlukan lebih sedikit pelarut dan tidak diperlukan pelarut organik.

- Kesimpulan dan saran :

Biopolimer beta-siklodekstrin kitosan magnetik disintesis dan digunakan sebagai bahan ekstraksi yang efektif untuk ekstraksi beta karoten di dalam sampel wortel sebelum dideteksi menggunakan KCKT. Kondisi ekstraksi yang optimal saat menggunakan bahan ini adalah: waktu ekstraksi selama 25 menit, suhu ekstraksi pada 40°C dan rasio dari ekstraksi adalah 1:20 (g/mL). Di bawah kondisi ini, beta karoten yang didapatkan dari wortel sebesar $41,06 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$.

d. Artikel Keempat

Judul artikel : *Isolation of β -carotene, α -carotene and lutein from carrots by countercurrent chromatography with the solvent system modifier benzotrifluoride*

Nama jurnal : Journal of Chromatography A

Penerbit : Elsevier

Volume dan halaman : Volume 1388, Halaman 119-125

Tahun terbit : 2015

Nama penulis : Englert, M., Simon, H., dan Walter, V.

Isi artikel

- Tujuan penelitian : Mengembangkan metode pemurnian/purifikasi yang sesuai dalam pemisahan senyawa α dan β -karotene serta lutein yang memiliki kemiripan struktur.
- Metode penelitian :
- Desain : Eksperimental
- Populasi dan sampel : Wortel segar yang didapatkan dari supermarket lokal di Stuttgart, Jerman.
- Instrumen : Labu 2 L, kertas saring Whatman grade 40, labu erlenmeyer 1 L, vakuum, gelas ukur tutup (*glass stopperd graduated cylinder*) 20 mL, *water bath*, penggiling analitik IKA A11 (IKA, Staufen, Germany), instrumen CCC-1000 (Pharma-Tech Research, Baltimore, MD, USA), pompa KCKT 665A-12 (Merck, Darmstadt, Germany), detektor spektrofotometri UV-Vis 87 (Knauer, Berlin, Germany), *data logger* DI-160 (Dataq, Akron, OH, USA), Isco Retriever 500 (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), katup putaran Teflon 50 (Rheodyne, Cotati, CA, USA).

- Metode analisis :

1. *Persiapan sampel*

1 kg wortel segar dicuci dengan air, dihaluskan dan dihomogenkan dengan alat penggiling. Sampel kemudian dibagi menjadi dua bagian sebanyak masing-masing 500 g dan karotenoid diekstrak dari masing-masing bagian di dalam labu 2 L pada suhu ruang sembari diaduk dengan campuran 1000 mL n-heksana dan 1000 mL aseton yang mengandung BHT dan BHA 100 mg/L. Larutan disaring menggunakan kertas Whatman grade 40, lalu pelarutnya diuapkan sampai kering pada suhu 25°C dan tiap residu yang didapat dilarutkan dalam 200 mL n-heksana. Setelah rekombinasi dua bagian, larutan dibilas tiga kali dengan 800 mL air deionisasi di dalam labu erlenmeyer 1 L. Ekstrak n-heksana dipisahkan dan dikeringkan di atas Na₂SO₄ anhidrat diikuti penguapan pelarut organik menggunakan vakuum hingga menghasilkan ekstrak karotenoid wortel mentah sebanyak 505 mg. Residu kering kemudian disimpan di dalam labu kaca kuning di bawah atmosfer nitrogen di dalam kulkas pada suhu 4°C sampai digunakan.

2. *Prosedur pemisahan*

Pemisahan CCC mode ganda dilakukan pada suhu laboratorium 22°C. Mode ekor-ke-kepala dipilih dan kolom pemisahan sepenuhnya diisi dengan fase bawah yang awalnya mewakili fase diam pada laju aliran 10 mL/menit. Setelah dilakukan penyesuaian laju aliran menjadi 2,0 mL/menit, perputaran rotasi dimulai dan kecepatan rotasi dinaikkan menjadi 1010±10 rpm. Kemudian fase atas (fase gerak) dipompa ke peralatan dengan laju

aliran 2,0 mL/menit dan efluen dikumpulkan dalam 100 mL gelas silinder ukur.

Setelah langkah-langkah persiapan ini selesai, penyuntikan sampel dilakukan dengan memasukkan larutan sampel ke dalam loop sampel melalui katup injeksi diikuti dengan memutar sakelar injeksi ke posisi injeksi. Fraksi β -karoten dikumpulkan pada menit 95-105 (1 fraksi, 20 mL), fraksi α -karoten dikumpulkan dari menit 115-130 dengan kecepatan 2,5 menit/tube (6 fraksi, masing-masing 5 mL) dan fraksi lutein dikumpulkan pada menit 160-172 dengan kecepatan 2,0 menit/tube (6 fraksi, masing-masing 8 mL). Fraksi dikumpulkan lalu dikeringkan dengan vakuum konsentrator AVC 2-33 IR (Christ, Osterode, Jerman) pada 25°C dan 10 mbar dan berat sampel ditentukan secara gravimetri. Setelah itu sampel dilarutkan kembali dalam MTBE:MeOH:H₂O (81:15:4. v/v/v).

3. Uji labu kocok

Sebanyak 1-2 mg ekstrak wortel mentah dipindahkan ke dalam 4 mL vial kaca kuning, diikuti dengan penambahan masing-masing 2 mL fase atas dan bawah dari sistem pelarut yang sudah diseimbangkan. Vial kemudian dikocok selama 30 detik dan disetimbangkan di *water bath* pada suhu 10, 15, 20, 22, 25, dan 30°C selama 30 menit. Setelah kesetimbangan telah tercapai, pisahkan 100 μ L dari setiap fase ke dalam vial kaca kuning berukuran 1,5 mL. Pelarut diuapkan menggunakan nitrogen yang dialirkan perlahan pada suhu ruang dan residu yang didapat dibilas dengan 1 mL MeOH:MTBE:H₂O (81:15:4, v/v/v).

4. Analisis ekstrak dan fraksi CCC menggunakan KCKT

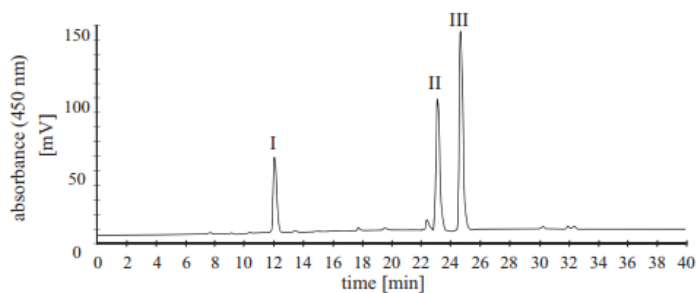
Ekstrak wortel mentah dan fraksi yang dikumpulkan dari pemisahan CCC mode ganda dianalisis dengan KCKT-UV-Vis dengan sistem ProStar (Varian, Darmstadt, Jerman) dari pompa model 230, detektor UV-Vis model 325 (mode panjang gelombang tunggal menggunakan 450 nm) dan injektor sampel otomatis Dynamax model AI-A1, dilengkapi *loop* sampel 100 mL. Sampel disuntikkan ke dalam mode pengisian *loop* parsial dengan volume injeksi 10 μ L dan rentang konsentrasi sampel 0,02 - 0,30 mg/mL. Pemisahan karotenoid secara kromatografi dilakukan menggunakan kolom polimer C₃₀ 250 \times 4,6 mm i.d. dengan ukuran partikel 5 μ m (YMC, Wilmington, MA, USA) dilengkapi dengan kolom pengaman 10 \times 4,6 mm i.d. dari fase diam yang sama. Pemisahan untuk deteksi umum karoten dan xantofil dilakukan pada suhu laboratorium dengan laju alir 1,0 mL/menit menggunakan gradien linear dari 100%A sampai 100%B selama 40 menit dengan pelarut A: MeOH/MTBE/H₂O (81:15:4, v/v/v) dan pelarut B: MeOH/MTBE/H₂O (6:90:4, v/v/v).

- Hasil penelitian :

1. Analisis KCKT/UV-Vis ekstrak wortel mentah

Kromatogram KCKT-UV-Vis dari ekstrak wortel mentah menunjukkan puncak dari masing-masing 3 komponen penting yaitu (I) lutein, (II) α -karoten dan (III) β -karoten, dengan intensitasi sinyal berbeda pada 450 nm (lihat **Gambar 3.2.**). Ada beberapa puncak samping yang lebih kecil ymuncul selain puncak utama, terdiri kurang dari 10% dari total karotenoid yang terdeteksi tetapi identifikasinya sulit dilakukan. Puncak-

puncak ini mungkin disebabkan oleh beberapa karotenoid hidrokarbon, termasuk produk degradasi klorofil seperti fitofluena, fitoen dan neurosporena yang biasanya ditemukan dalam ekstrak wortel (C.Y. Lee, 1986).

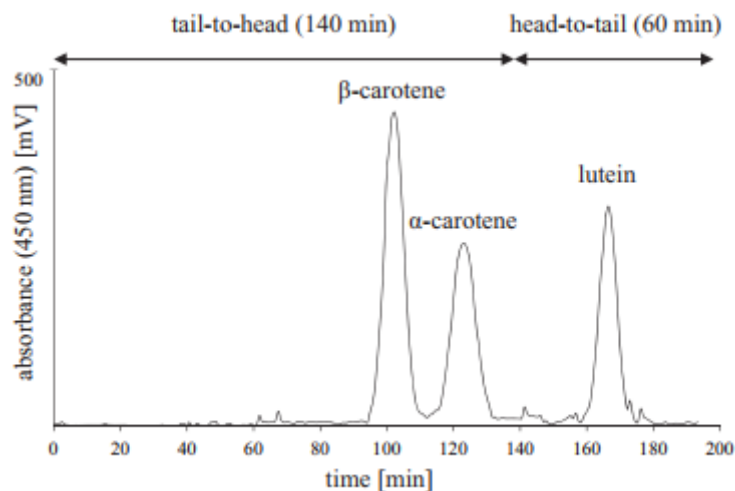


Gambar 3.2 Kromatogram KCKT-UV-Vis (450 nm) ekstrak wortel mentah menunjukkan puncak dari 3 komponen (I) lutein, (II) α -karoten dan (III) β -karoten. Kondisi: kolom polimer C_{30} ($250 \times 4,6$ mm i.d., ukuran partikel 5 μ m); gradien linear dari pelarut A 100%: MeOH/MTBE/ H_2O (81:15:4, v/v/v) ke pelarut B: MeOH/MTBE/ H_2O (6:90:4, v/v/v) dalam 40 menit; laju alir: 1,0 mL/menit.

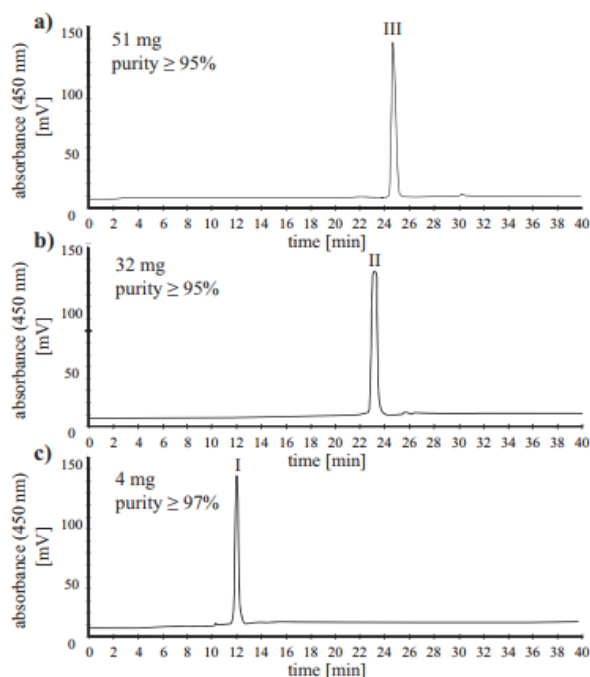
2. Pemisahan CCC (Kromatografi berarus)

Pemisahan ekstrak karotenoid kasar dilakukan dengan CCC mode ganda, dimulai pada suhu 22°C dalam elusi ekor-ke-kepala selama 140 menit dengan 2 mL/menit setelah penyuntikan sampel sebanyak 100,2 mg dibawah kondisi optimal (**Gambar 3.3**). Urutan elusi dalam CCC merupakan kebalikan dari pemisahan pada kolom polimer C_{30} KCKT dengan elusi β -karoten pada menit ke-115 dan α -karoten pada menit ke-125, menunjukkan bahwa elusi terjadi karena adanya penurunan polaritas pada karotenoid. Resolusi dasar didapatkan antara α -karoten dan β -karoten yang memiliki kemiripan struktural. Fraksi β -karoten dapat dikumpulkan antara menit ke 95 dan 105 dan fraksi α -karoten dapat dikumpulkan antara menit ke 115 dan 130. Analisis KCKT-UV-Vis selanjutnya dari fraksi gabungan

menunjukkan bahwa 51 mg β -karoten dan 32 mg α -karoten telah dikumpulkan dengan kemurnian sebesar 95% (**Gambar 3.4**).



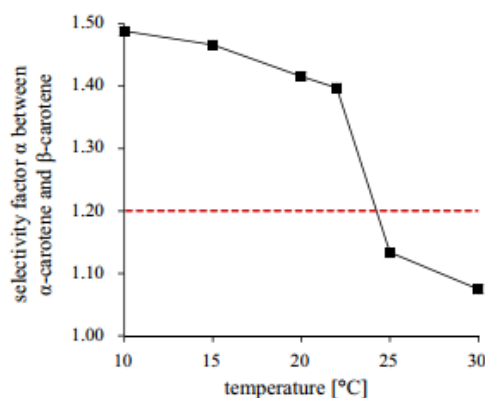
Gambar 3.3 Kromatogram CCC-UV-Vis (450 nm) dari proses pemisahan ekstrak wortel mentah dengan pemanfaatan mode ganda (fase gerak dan mode elusi terbalik). Kondisi: CCC-1000 dengan tiga koil multilapis yang terhubung secara serial (tabung PTFE 1,6 mm i.d.) dan kapasitas total kolom 325 mL dan loop sampel 10 mL; kecepatan rotasi 1010 ± 10 rpm; pelarut sistem: n-heksana/benzotrifluorida/asetonitril (10:3,5:6,5, v/v/v) ukuran sampel: 100,2 mg; pemisahan: pemisahan dengan CCC mode ganda dengan mode ekor-ke-kepala selama 140 menit pada laju alir 2 mL/menit dan elusi kepala-ke-ekor selama 60 menit pada laju alir 4 mL/menit.



Gambar 3.4 Kromatogram KCKT-UV-Vis (450 nm) dari fraksi pemisahan CCC ekstrak wortel mentah menunjukkan a) (III) β -karoten, b) (II) α -karoten, dan c) (I) lutein. *Kondisi*: kolom polimer C₃₀ (250 × 4,6 mm i.d., ukuran partikel 5 μ m); gradien linear dari pelarut A 100%: MeOH/MTBE/H₂O (81:15:4, v/v/v) ke pelarut B 100%: MeOH/MTBE/H₂O (6:90:4, v/v/v) selama 40 menit; laju alir: 1,0 mL/menit.

3. Pengaruh suhu pada reproduktifitas

Uji kocok labu (*shake-flask test*) memverifikasi bahwa koefisien partisi dari senyawa, dan selanjutnya, pemisahan faktor α diantara α - dan β -karoten dari sistem pelarut yang sudah dipilih dapat terpengaruh oleh perubahan suhu dari rentang 10 sampai 30°C (**Tabel 3.6, Gambar 3.5**). Tidak ada perubahan signifikan yang dapat diamati pada pemisahan faktor α dengan suhu diantara 10°C ($\alpha = 1,49$) dan 22°C ($\alpha = 1,40$). Namun, ketika suhu dinaikkan ke 25 dan 30°C, α secara signifikan masing-masing turun ke 1,13 dan 1,07. Pada suhu tinggi ini pemisahan garis bawah tidak terduga, karena umumnya membutuhkan $\alpha > 1,2$ dalam CCC.



Gambar 3.5 Pengaruh suhu dalam rentang suhu 10°- 30°C pada pemisahan faktor α antara α -karoten dan β -karoten dengan nilai kritis untuk pemisahan dasar $\alpha = 1,2$ di CCC digambarkan sebagai garis horizontal.

Tabel 3.6 Koefisien partisi K α -karoten dan β -karoten dan pemisahan faktor α diantara senyawa pada suhu yang berbeda dengan sistem pelarut dua fase n-hekana/benzotrifluorida/asetonitril (10:3,5:6,5, v/v/v) ditentukan oleh KCKT-UV-Vis (yang berarti nilai diperoleh setelah duplikasi penetapan)

Suhu	K (α -karoten)	K (β -karoten)	α
10	1,27	1,89	1,49
15	1,33	1,95	1,47
20	1,42	2,01	1,42
22	1,46	2,04	1,40
25	1,87	2,12	1,13
30	2,01	2,16	1,07

- Kesimpulan dan saran :

Benzotrifluorida, sebagai pengubah sistem pelarut, diperkenalkan untuk sistem n-hekana/asetonitril pada CCC, menghasilkan sistem pelarut yang unik dan terutama fitur yang memuaskan. Secara khusus, senyawa ini dapat bermanfaat untuk pemisahan isokratik senyawa lipofilik seperti karotenoid karena menyediakan koefisien partisi dalam rentang yang sesuai untuk CCC. Di bawah kondisi dioptimalkan bahkan pemisahan senyawa yang memiliki kemiripan struktur seperti α -karoten dan β -karoten dalam ekstrak wortel bisa tercapai melalui interaksi kimiawi spesifik seperti interaksi molekul π - π

diantara senyawa dan benzo-trifluorida. Kelemahan dari penggunaan sistem pelarut n-heksana/benzo-trifluorida/asetonitril dalam metode ini adalah kelarutan yang cenderung rendah saat digunakan untuk ekstrak wortel mentah dan mudah terpengaruh suhu pada saat pemisahan faktor α diantara α -karoten dan β -karoten.

e. Artikel Kelima

- Judul artikel : *Total β -carotene of β -carotene carrot powder (Daucus carota L.) encapsulation result*
- Nama prosiding : IOP Conference Series: Earth and Environmental Science
- Penerbit : Institute of Physics Publishing
- Volume dan halaman : Volume 443
- Tahun terbit : 2020
- Nama penulis : M. Rifqy, I.S. Setiasih, dan Y. Cahayana
- Isi artikel
- Tujuan penelitian : Untuk menentukan konsentrasi maltodekstrin terbaik untuk mempertahankan β -karoten total dari bubuk wortel β -karoten.
 - Metode penelitian :
 - Desain : Eksperimental
 - Populasi dan sampel : Wortel jenis Chante nay dengan panjang 15-18 cm dan berusia 3 bulan dari penyebaran benih, dengan berat sekitar 200-600 gram diperoleh dari Pasar Induk Caringin (Bandung, Indonesia).

Instrumen : *Blender*/pelumat, *magnetic stirrer*, *rotary evaporator*, oven vakuum, vortex, tabung reaksi, sentrifugator

- Metode analisis :

1. *Persiapan sampel*

Wortel dipotong ke dalam potongan kecil lalu dihaluskan menggunakan *blender*. Setelah dihaluskan, ditimbang sebanyak 100 gram. Wortel halus sebanyak 100 gram kemudian diekstraksi dengan campuran n-heksana dan aseton dengan perbandingan 1:1 lalu dimaserasi menggunakan *magnetic stirrer*. Ekstrak yang diperoleh kemudian dikonsentrasi menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak β -karoten kental dari wortel.

2. *Pembuatan bubuk β -karoten dengan metode mikroenkapsulasi*

Ekstrak β -karoten kental ditambahkan maltodekstrin sebanyak 10% (b/v), 20% (b/v), dan 30% (b/v). Campuran ekstrak dan maltodekstrin kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga tercampur rata. Tujuan penambahan maltodekstrin adalah sebagai pelapis yang berfungsi untuk melindungi β -karoten dalam ekstrak sehingga dapat bertahan selama proses pengeringan menjadi serbuk. Campuran ekstrak dan maltodekstrin dikeringkan menggunakan oven vakuum pada suhu 50°C selama kurang lebih 120 menit. Pengeringan bertujuan untuk mengubah bentuk ekstrak menjadi serbuk.

3. Identifikasi total β -karoten

Timbang sampel sebanyak 10 gram, tambahkan 8 mL aquades, homogenkan dengan cara dikocok menggunakan vortex, lalu ambil 2 mL ke dalam tabung reaksi, tambahkan 2 mL alkohol 96% dan 10 mL dietil eter. Setelah itu, kocok selama 2 menit menggunakan vortex dan sentrifugasi selama 3-5 menit. Saat lapisan dietil eter terbentuk tandai sebagai lapisan I, dan sisanya (setelah mengambil dietil eter (lapisan I)) ditambahkan dengan 10 mL dietil eter. Campuran tadi dikocok lagi selama 2 menit (dihomogenkan dengan vortex) lalu disentrifugasi selama 3-5 menit. Lapisan dietil eter yang terbentuk ditandai sebagai lapisan II yang menyatu dengan lapisan I. Ambil 2 mL (dari campuran I + II) lalu langsung dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

- Hasil penelitian :

1. Total β -karoten wortel yang diekstrak menggunakan n-heksana dan aseton

Tabel 3.7 Rata-rata total β -karoten wortel dalam ekstrak menggunakan n-heksana dan aseton

Perlakuan	Rata-rata Total β -karoten (ppm)
n-heksana:aseton (1:1)	33,67 \pm 1,02

Hasil akhir ekstrak β -karoten dari wortel dipengaruhi jumlah senyawa yang terekstraksi selama proses ekstraksi, dimana keberhasilan proses ekstraksi sangat ditentukan oleh penggunaan pelarut. Kecocokan pelarut dengan senyawa yang diekstraksi akan menghasilkan rendemen yang tinggi. Senyawa polar akan terlarut dalam pelarut polar, begitu juga dengan pelarut non polar yang dapat melarutkan bahan non polar juga. Senyawa non polar seperti β -karoten lebih mudah terlarut dalam pelarut non polar seperti n-

heksana. Penambahan aseton bertujuan untuk meningkatkan ekstraksi dimana senyawa β -karoten mudah terlarut dalam pelarut organik seperti karbon disulfida, benzena, kloroform, aseton, eter dan petroleum eter. Campuran n-heksana yang bersifat non polar dan aseton yang bersifat aseton membantu mengekstraksi β -karoten dalam jumlah tinggi. β -karoten secara alami terdapat dalam sel dan dikelilingi oleh media protoplasma berair, sehingga aseton dapat mengikat air dan memaksa β -karoten untuk keluar.

Hasil ekstraksi menggunakan campuran n-heksana dan aseton menghasilkan rata-rata total β -karoten sebesar 33,67 ppm. Total β -karoten yang digunakan dipengaruhi oleh proses pemanasan dimana pada penelitian ini dilakukan penguapan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Proses pemanasan pada β -karoten menurunkan kandungan β -karoten karena β -karoten mengalami isomerisasi dari bentuk trans menjadi bentuk cis. Pada penelitian ini, batas suhu pemanasan tidak diukur secara jelas sehingga tidak dapat menentukan suhu kerusakan β -karoten selama proses ekstraksi.

2. Efek penambahan maltodekstrin pada total β -karoten dalam serbuk β -karoten wortel

Perlakuan penambahan maltodekstrin memberikan efek berbeda yang signifikan pada total β -karoten dalam serbuk β -karoten wortel yang dibuat. Hasil dari perhitungan total statistik dari β -karoten dalam serbuk β -karoten wortel dapat dilihat pada **Tabel 3.8**.

Tabel 3.8 Efek dari penambahan maltodekstrin terhadap total β -karoten (ppm) dalam serbuk β -karoten wortel

Perlakuan	Kadar β-karoten (ppm)
A = Maltodekstrin 10% (b/v)	15,258 \pm 0,748 ^a
B = Maltodekstrin 20% (b/v)	29,160 \pm 0,433 ^c
C = Maltodekstrin 30% (b/v)	21,025 \pm 0,659 ^b

Catatan: Rata-rata perlakuan yang ditandai dengan huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan berdasarkan Duncan's Test pada level 5%

Hasil dari uji statistik menggunakan uji Duncan pada level 5% menunjukkan bahwa serbuk β -karoten wortel dengan beragam perlakuan penambahan maltodekstrin ternyata menunjukkan efek signifikan pada total kadar β -karoten yang diperoleh. Hasil rata-rata yang diperoleh pada konsentrasi maltodekstrin 10%-30% menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Serbuk β -karoten wortel dengan penambahan 20% maltodekstrin memiliki hasil tertinggi dengan nilai 29,160 ppm dibandingkan dengan penambahan 10% dan 30% yang memiliki nilai masing-masing 15,258 ppm dan 21,025 ppm.

Penambahan 20% maltodekstrin merupakan konsentrasi yang tepat untuk membuat serbuk karbohidrat β -karoten tertinggi dengan total β -karoten tertinggi. Maltodekstrin dalam jumlah kecil pada 10% tidak terlalu maksimal dalam melapisi atau melindungi senyawa β -karoten di dalam serbuk sedangkan penambahan maltodekstrin dalam jumlah besar yaitu 30% juga tidak terlalu baik, sebab maltodekstrin berwarna putih sedangkan warna kompleks dari senyawa β -karoten adalah merah, sehingga ketika diukur menggunakan spektrofotometer intensitas warna merah yang dihasilkan juga berkurang yang akhirnya mempengaruhi kadar total β -karoten yang diperoleh.

- Kesimpulan dan saran :

Serbuk β -karoten wortel dengan perlakuan beragam yaitu penambahan maltodekstrin memberikan efek signifikan pada nilai total β -karoten dalam serbuk β -karoten wortel. Perlakuan penambahan konsentrasi maltodekstrin sebesar 10%, 20%, dan 30% menghasilkan total β -karoten masing-masing sebesar 15.258 ppm, 29.160 ppm, dan 21.025 ppm. Serbuk β -karoten wortel dengan penambahan 20% maltodekstrin merupakan konsentrasi terbaik yang menghasilkan nilai kadar β -karoten tertinggi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan maltodekstrin mempunyai potensi untuk menjaga senyawa kimia yang terkandung dalam makanan dalam bentuk serbuk.