

Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Dari Daun Wortel (*Daucus carota* L.)

Fahrauk Faramayuda, Ari Sri Windyaswari, Akhirul Kahfi Syam, Salma Sofia
Kelompok Keahlian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Unjani
ramayuda_f@yahoo.com

Abstrak— Wortel (*Daucus carota* L.) merupakan salah satu tanaman sayuran yang berperingkat nomer 10 dalam nilai gizi di antara 39 buah dan sayuran. Hasil karakteristik simplisia daun wortel diperoleh kadar air dengan cara destilasi sebesar 2,29% v/b, kadar abu total sebesar 13,21% b/b, kadar abu larut air sebesar 5,05% b/b, kadar abu tidak larut asam sebesar 2,68% b/b, kadar sari larut air sebesar 20,41% b/b, dan kadar sari larut etanol sebesar 11,76% b/b. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia, fraksi etil asetat daun wortel mengandung senyawa golongan flavonoid, polifenol, monoterpen/seskuiterpenoid, dan steroid/triterpenoid. Dari fraksi gabungan hasil Kromatografi Kolom, yaitu F6-F8, kemudian dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis menghasilkan bercak berfluoresensi biru dan memiliki nilai R_f 0,43. Bercak yang dihasilkan semakin terang dengan penambahan penampak bercak uap ammonia dan AlCl₃. Selanjutnya pemurnian senyawa dilakukan secara Kromatografi Lapis Tipis 2 dimensi. Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat yang dengan penambahan penampak bercak uap ammonia dan AlCl₃ diduga merupakan senyawa golongan flavonoid. Panjang gelombang maksimum isolat 206,30 nm dan dari profil spektra infra merah didapatkan pita absorpsi khas di daerah bilangan gelombang 2920 cm⁻¹ (Regang CH, Ar-H), 2360 cm⁻¹ (Regang CH), 1716 cm⁻¹ (Regang C=O), 1462 (Lentur C-H) dan 1087 cm⁻¹ (Ar-H).

I. PENDAHULUAN

Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat dewasa ini sangat diminati dibandingkan obat sintesis. Selain bahannya mudah didapat dan harganya terjangkau, pengobatan tradisional dengan menggunakan tumbuhan juga dianggap lebih aman karena efek samping yang ditimbulkan lebih kecil. WHO (World Health Organization) juga merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk herbal dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit terutama untuk penyakit kronis, penyakit degeneratif dan kanker. WHO juga mendukung upaya-upaya dalam peningkatan keamanan dan khasiat dari obat tradisional.

Wortel (*Daucus carota* L.) [1] merupakan salah satu tanaman sayuran yang berperingkat nomer 10 dalam nilai gizi di antara 39 buah [2]. Tanaman wortel terdiri dari umbi dan daun. Umbinya paling sering dimanfaatkan sebagai sumber makanan dan minuman serta sudah banyak diteliti, sedangkan daunnya hanya dimanfaatkan oleh petani wortel sebagai kompos dan pakan ternak serta belum banyak diteliti. Berdasarkan studi pustaka daun wortel beraktivitas sebagai antioksidan [3,4]. Daun wortel memperlancar kencing pada radang kandung kemih dan batu ginjal serta untuk mengatasi nyeri perut (kolik). Daun wortel juga dapat menghambat pertumbuhan sel tumor dan dapat menurunkan kadar gula dalam darah [5].

Dari potensi aktivitas farmakologis daun wortel tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dalam daun wortel.

II. METODE

Metode pemeriksaan karakteristik simplisia daun wortel meliputi penetapan kadar abu total, kadar abu larut air, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan penetapan kadar air [6]. Penapisan fitokimia Simplisia meliputi golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, terpenoid dan seskuiterpenoid, triterpenoid dan steroid, dan kuinon [7].

A. Ekstraksi

Sebanyak masing-masing 500 gram serbuk simplisia daun wortel diekstraksi menggunakan cara dingin yaitu dimaserasi selama 24 jam dengan menggunakan pelarut etanol 95% dengan perbandingan simplisia : pelarut sekitar 1:3, dilakukan pengadukan selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Setelah 24 jam filtrat disaring, dan residu dimaserasi kembali dengan pelarut baru yang sama. Proses ini dilakukan berulang kali hingga diperoleh filtrat yang bening. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan sebagai ekstrak total. Ekstrak dipekatkan dengan

penguap putar sampai dihasilkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat kemudian diuapkan diatas penangas air sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian ditimbang.

B. Fraksinasi

Proses dilanjutkan dengan fraksinasi, dimana ekstrak kental yang diperoleh difraksinasi secara ECC yaitu dengan cara diambil sejumlah ekstrak etanol dari daun wortel kemudian dilarutkan dalam air-etanol (8:2) dan difraksinasi dengan n-heksana (1:1), sampai terpisah sempurna hingga diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi air. Fraksi air difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat (1:1) sampai terekstraksi sempurna hingga diperoleh fraksi air dan fraksi etil asetat. Setiap fraksi kemudian dipekatkan kembali hingga diperoleh ekstrak pekat dari tiap-tiap fraksi.

C. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)[8]

Fraksi – fraksi dilarutkan ke dalam pelarut metanol, kemudian ditotolkan pada pelat silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 10x1 cm. Digunakan pengembang kloroform:metanol dengan perbandingan 96:4 dan dijenuhkan dalam bejana tertutup selama 30 menit. Kemudian pelat dimasukkan ke dalam bejana untuk dielusi dengan pengembang diatas hingga batas yang telah ditentukan pada pelat silika. Selanjutnya dilakukan identifikasi kandungan dengan memberikan penampak bercak yang spesifik untuk setiap golongan senyawa.

D. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif [9,10]

Berdasarkan profil KLT yang dilanjutkan ke tahap isolasi, fraksi ditotolkan disepanjang salah satu sisi pelat KLT preparatif berupa pelat kaca berukuran 20x20 cm yang dilapisi oleh lapisan silika gel GF₂₅₄ dengan ketebalan 0,5 mm. dengan Pengembang yang cocok lalu dijenuhkan dalam bejana pengembang tertutup selama 1 jam. Kemudian pelat dielusi hingga batas yang telah ditentukan. Hasil preparatif kemudian diamati pada UV 254 nm dan 365 nm, kemudian ditentukan pita mana yang akan dikerok atau diambil, dilarutkan dalam pengembang, disaring dan diuapkan.

E. Analisis Spektrofotometer UV-Sinar Tampak

Isolat hasil kerokan KLT preparatif yang dilarutkan ke dalam metanol kemudian dianalisis menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Sinar tampak dan diukur spektrumnya

F. Analisis Spektrofotometer Infra Merah (IR)

Spektrofotometri inframerah yang dilakukan dengan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) dimana isolat KLT preparatif yang telah diuapkan dicampur dengan KBr kemudian dikempa hingga

terbentuk pelet selanjutnya diukur dengan spektrofotometer FTIR.

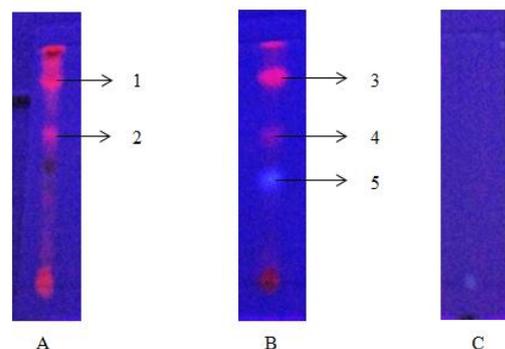
III. HASIL DAN DISKUSI

TABEL I. PEMERIKSAAN KARAKTERISTIK SIMPLISIA DAUN WORTEL (*DAUCUS CAROTA* L.)

No.	Parameter	Hasil (%)
1.	Kadar air (v/b)	2,29 ± 0,0707
2.	Kadar abu total (b/b)	13,21 ± 0,1278
3.	Kadar abu larut air (b/b)	5,05 ± 0,0354
4.	Kadar abu tidak larut asam (b/b)	2,68 ± 0,3606
5.	Kadar sari larut air (b/b)	20,41 ± 0,2828
6.	Kadar sari larut etanol (b/b)	11,76 ± 0,3465

TABEL II. PENAPISAN FITOKIMIA SIMPLISIA DAUN WORTEL (*DAUCUS CAROTA* L.)

No.	Golongan Senyawa	Hasil
1.	Alkaloid	-
2.	Flavonoid	+
3.	Polifenol	+
4.	Tanin	-
5.	Kuinon	-
6.	Monoterpenoid dan seskiterpen	+
7.	Steroid dan triterpenoid	+
8.	Saponin	-



Gambar 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) fraksi n-heksana, etil asetat dan fraksi air dibawah UV 365 nm

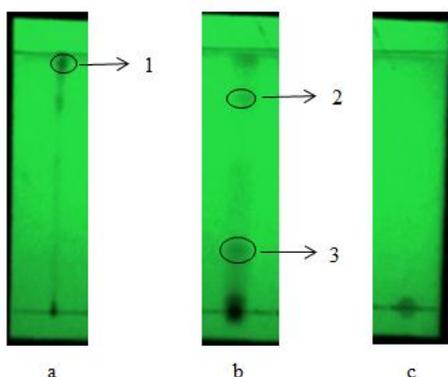
Keterangan:

Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄

Fase gerak yang digunakan kloroform : etil asetat (8:2)

A. Profil KLT fraksi n-heksana

B. Profil KLT fraksi etil asetat



Gambar 2. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) fraksi *n*-heksana etil asetat, dan fraksi air di bawah sinar UV 254 nm

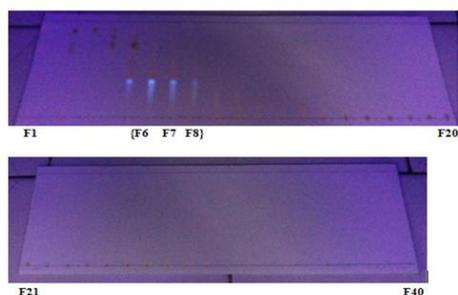
Keterangan:

Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄

Fase gerak yang digunakan kloroform: etil asetat (8:2)

- Profil KLT fraksi *n*-heksana
- Profil KLT fraksi etil asetat
- Profil KLT fraksi air

Pemisahan dilakukan dengan metode Kromatografi Kolom menggunakan fasa diam silika gel 60 dan fasa gerak kloroform: etil asetat. Fraksi etil asetat sebanyak 1 gram dilarutkan dalam kloroform ± 20 mL sampai larut, kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dielus dengan fasa geraknya. Proses elusi dilakukan secara gradien dan subfraksi ditampung tiap 10 mL. Hasil dari pemisahan ini diperoleh subfraksi sebanyak 40 vial. Terhadap setiap subfraksi dipantau menggunakan KLT agar terlihat spot yang berfluoresensi dan memiliki nilai R_f yang sama. Dari hasil pemantauan dibawah sinar UV 366 nm, diputuskan untuk menggabungkan subfraksi nomor 6, 7, dan 8 karena memiliki profil KLT yang sama.



Gambar 3. Profil KLT hasil Kromatografi Kolom yang diamati di bawah lampu UV 366 nm

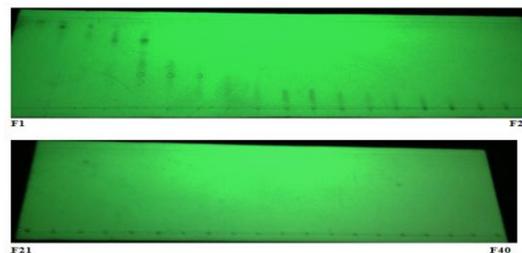
Keterangan:

KLT Hasil Kromatografi Kolom yang dideteksi di bawah sinar UV 366 nm

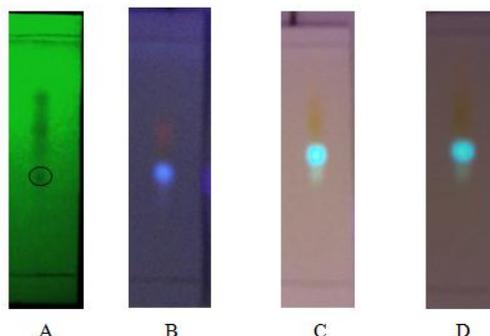
Fraksi dengan fluoresensi dan R_f sama digabung (subfraksi no 6,7 dan 8)

Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄

Fase gerak yang digunakan kloroform : etil asetat (8:2)



Gambar 4. Profil KLT hasil Kromatografi Kolom yang diamati di bawah lampu UV 254 nm



Gambar 5. Profil Kromatografi Lapis Tipis penggabungan subfraksi F6-F8 dari Kromatografi Kolom

Keterangan:

Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄

Fase gerak yang digunakan kloroform : etil asetat (8:2)

Nilai R_f yang dihasilkan 0,43

- Hasil KLT penggabungan subfraksi yang diamati dibawah lampu UV 254 nm
- Hasil KLT penggabungan subfraksi yang diamati dibawah lampu UV 366 nm
- Hasil KLT penggabungan subfraksi menggunakan penampak bercak uap ammonia yang diamati dibawah lampu UV 366 nm
- Hasil KLT penggabungan subfraksi menggunakan penampak bercak $AlCl_3$ yang diamati dibawah lampu UV 366 nm.



Gambar 6. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Keterangan:

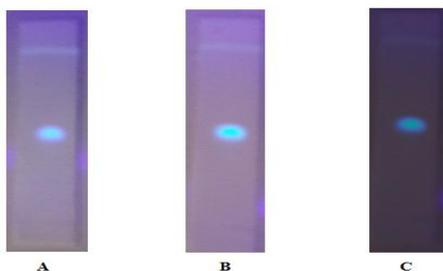
Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄

Fase gerak yang digunakan kloroform : etil asetat (8:2)

Pita berfluoresensi biru yang diamati dibawah sinar UV 366 nm.

A. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Pemisahan isolat dilanjutkan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) diatas pelat kaca yang disaput dengan silika gel GF₂₅₄ dan menggunakan fasa gerak kloroform : etil asetat (8:2). Dihasilkan pita yang memberikan fluoresensi biru pada UV 366 nm. Hasil KLTP dapat dilihat Gambar 6. Pita yang diperoleh dikerok, dilarutkan dalam larutan pengembangnya kemudian disaring, filtrat yang mengandung isolat tersebut dipantau dengan Kromatografi Lapis Tipis dan menggunakan penampak bercak uap ammonia dan AlCl₃. Hasil yang terlihat dibawah UV 366 nm, spot isolat semakin terang dengan penambahan uap ammonia dan penampak bercak AlCl₃⁽¹⁾. Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Profil Kromatografi Lapis Tipis isolat hasil KLTP

Keterangan:

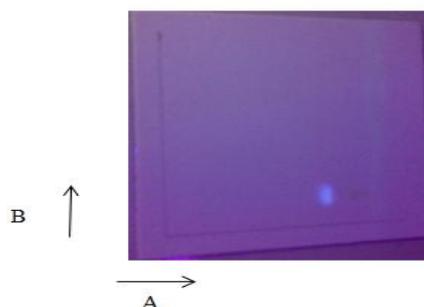
Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄

Selanjutnya isolat dipantau dengan KLT 2 Dimensi dengan pengembang pertama kloroform : etil asetat (2:8) dan pengembang kedua *n*-heksana. Hasil menunjukkan satu bercak berfluoresensi biru. Hasil dapat dilihat pada Gambar 8.

Fase gerak yang digunakan kloroform: etil asetat (8:2)

Nilai R_f yang dihasilkan 0,43

- KLT isolat hasil kerokan KLTP yang diamati dibawah lampu UV 366 nm
- KLT isolat dengan penampak bercak uap ammonia yang diamati dibawah lampu UV 366 nm
- KLT isolat dengan penampak bercak AlCl₃ yang diamati dibawah lampu UV 366 nm



Gambar 8. Profil Kromatografi Lapis Tipis 2 dimensi isolat fraksi etil asetat

Keterangan:

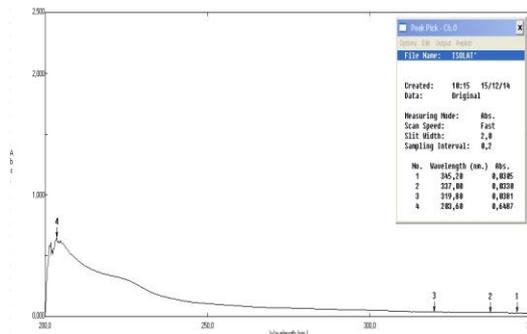
Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄

- Arah pengembang pertama dengan pengembang kloroform : etil asetat (2:8)
- Arah pengembang kedua dengan pengembang *n*-heksana

Nilai R_f yang dihasilkan 0,76 (arah pengembang pertama) dan 0,18 (arah pengembang kedua)

G. Spektrofotometer UV-Sinar Tampak

Isolat hasil kerokan KLT preparatif yang dilarutkan ke dalam metanol kemudian dianalisis menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Sinar tampak dan diukur spektrumnya. Hasil menunjukkan isolat mempunyai panjang gelombang maksimum 203,60 nm.



Gambar 9. Profil Spektra UV Isolat Daun Wortel

H. Analisis Spektrofotometer Infra Merah (IR)

Spektrofotometri inframerah yang dilakukan dengan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) dimana isolat KLT preparatif yang telah diuapkan dicampur dengan KBr kemudian dikempa hingga terbentuk pelet selanjutnya diukur dengan spektrofotometer FTIR.



TABEL I. DATA SPEKTOFOTOMETRI INFRA MERAH ISOLAT DAUN WORTEL

NO	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsional
1	2920	Regang CH, Ar-H
2	2360	Regang CH
3	1716	C=O
4	1462	Lentur C-H
5	1087	Ar-H

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Unjani yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Cronquist, A., 1981, An Integrated System of Classification Flowery Plants, *Columbia Press*, New York, 13-18.
- [2] Sun, T., Simon, W. P., and Tanumihardjo, S.A., 2009, Antioxidant Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Biofortified Carrots (*Daucus carota* L.) of Various Colors, *J Agri Food Chem*, 57, 4142-4147.
- [3] Limsangouan, N dkk., 2011, Functional Properties of Cereal and Legume Based Extruded Snack Foods Fortified with By-Products from Herbs and Vegetables, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 44, 271 – 279.
- [4] Sudewi, S., 2011, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Penangkap Radikal Bebas Dari Daun Wortel (*Daucus carota* L.), *Tesis* Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- [5] Kojima, A dkk., 2006, Inhibitory Effect of Carrot Leaves Extract On Tumor Cell Growth, *The FASEB Journal*, 566.
- [6] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta, 1-37
- [7] Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terbitan ke-2, Penerbit ITB, Bandung.
- [8] Sudjadi., 1986, *Metode Pemisahan*, UGM Press, Yogyakarta.
- [9] Gritter, R. J., James M. B., Arthur E. S., 1991, *Pengantar Kromatografi*, Edisi Kedua, Penerbit ITB, Bandung. 160-179.
- [10] Hostettmann, K. dan Hostettmann, M., 1995, *Cara Kromatografi Preparatif, Penggunaan pada Isolasi Alam*, Penerbit ITB, Bandung, 9-11.
- [11] Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung, 1-53.