

Analisis A-Tokoferol (Vitamin E) pada Minyak Biji Kelor (*Moringa Oleifera* Lam.) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Puteri Amelia^{1*}, Nurul Fithriyah¹, Chairul²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

²Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong Bogor

*Email : puti_andalusia@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis kandungan vitamin E dalam minyak biji kelor secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil analisis menunjukkan bahwa variasi metode perolehan minyak (ekstraksi dengan pelarut dan kempa dengan variasi suhu pengeringan sampel) memberikan hasil rendemen minyak dan kandungan α -tokoferol yang berbeda-beda. Pada metode ekstraksi yakni maserasi dengan *n*-heksan menghasilkan minyak dengan jumlah 40.01%, sedangkan metode pengepresan mekanis dengan variasi suhu pengeringan sampel 40°C, 80°C dan 120°C menghasilkan minyak berturut-turut 10%; 7.6%; dan 6.77%. Masing-masing sampel minyak tersebut menghasilkan kadar α -tokoferol berturut-turut 0.235; 0.37; 0.265; dan 0.265 mg/g. Untuk mengetahui kualitas minyak tersebut dilakukan analisis kandungan minyak dengan GCMS. Hasil menunjukkan bahwa minyak biji kelor terdiri dari asam lemak tidak jenuh berupa asam oleat dan asam-asam lemak jenuh yang dominan yaitu asam palmitat dan asam stearat.

Kata kunci : Biji kelor, minyak, tokoferol, KCKT, kolom C18.

Abstract

The purpose of the present study was to determine vitamin E in the seed oil of moringa with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The analysis showed that the various method of oil production, produce variations of oil yield and tocopherol content. Maceration extraction method with *n*-hexane produces 40.01% of oil, while mechanical pressing method with variations of sample drying temperature 40 °C, 80 °C and 120 °C produce oil 10%; 7.6%; and 6.77%. Each of the oil samples contains 0.235; 0.37; 0.265 and 0.265 mg/g α -tocopherol. Determination of oil quality carried by oil contents analysis by GCMS. Result showed that moringa seed oil is composed by unsaturated fatty acids such as oleic acid and dominated by saturated fatty acids such as stearic acid and palmitic acid.

Keywords : Moringa seeds, oil, tokoferol, HPLC, C18 column

1. PENDAHULUAN

Tanaman kelor atau *Moringa oleifera* Lam. yang termasuk dalam familia *moringaceae* merupakan tanaman yang kerap kali ditemukan dan dibudidayakan di berbagai negara seperti India, Filipina, Pakistan, Thailand dan Indonesia (Promkum *et al.* 2010). Studi sebelumnya telah mendokumentasikan adanya senyawa fenolik, flavonoid, saponin, terpenoid, proantosianidin dan glikosida jantung pada polong/biji dari *M.oleifera* (Sharma *et al.* 2012). Biji (polong) kelor mengandung \pm 38% minyak yang mengandung

vitamin E (0.01%) dan beta karoten (0.014%) (Bhoomika *et al.* 2007).

Vitamin E (tokoferol) merupakan salah satu komponen yang terkandung dalam biji buah kelor. Vitamin E merupakan suatu zat antioksidan yang sangat dibutuhkan oleh tubuh manusia karena memiliki peranan penting dalam menjaga keseimbangan sel dari radikal bebas dan menghambat proses oksidasi. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan sangat berbahaya bagi tubuh karena dapat menyebabkan perubahan pada sel-sel tubuh yang memicu terjadinya proses penuaan dini dan penyakit degeneratif seperti kanker.

Dengan kemampuannya sebagai zat antioksidan, vitamin E dapat mengurangi resiko penyebab berbagai macam penyakit, seperti jantung dan diabetes. Selain itu vitamin E juga dapat mengurangi resiko terjadinya pembekuan darah, mencairkan darah beku, mencegah penyumbatan pembuluh darah, menguatkan dinding pembuluh darah kapiler, meningkatkan pembentukan sel-sel darah merah, mengurangi kadar gula darah, memperbaiki kerja insulin serta meningkatkan kekuatan otot dan stamina (Winarsi 2007).

Selain variasi metode perolehan minyak, tingkat kekeringan sampel juga akan menentukan jumlah dan mutu minyak yang dihasilkan. Metode yang akan digunakan dalam perolehan minyak biji kelor ini menurut Ketaren (1986) menggunakan *solvent extraction* yakni maserasi dengan *n*-heksan dan juga kempa hidrolis dengan variasi suhu pengeringan pada sampel sebelum dikempa. Analisis vitamin E dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas (KG) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pada penelitian ini digunakan metode KCKT karena memiliki kelebihan yaitu: kolom KCKT dapat digunakan berulang kali, resolusi yang didapatkan jauh lebih tinggi daripada metode lain (KLT, spektrofotometer); teknik yang digunakan tidak terlalu tergantung pada kemampuan operator, waktu analisisnya cepat dan cara kerjanya relatif sederhana, selain itu KCKT juga dapat menganalisis senyawa yang tidak mudah menguap dan termolabil (Ekasari 2008).

Dalam penelitian ini dipelajari pengaruh proses perolehan minyak terhadap jumlah rendemen minyak yang dihasilkan dan juga kandungan tokoferol pada masing-masing minyak tersebut. Selain itu, untuk mengetahui kualitas minyak yang dihasilkan dari biji kelor maka akan digunakan alat GCMS untuk mengetahui komponen-komponen asam lemak penyusun trigliseridanya.

2. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan uji yang digunakan adalah biji kelor (*Moringa oleifera* Lam) yang sudah masak dengan spesifikasi kulit warna coklat kehitaman dan isi berwarna putih kotor dengan bau tidak spesifik dan rasa sepah, *n*-heksan, Na_2SO_4 anhidrat, standar α -Tokoferol ($\geq 96\%$)

grade HPLC, etanol p.a., Tetrahydrofuran (THF) p.a., metanol grade HPLC.

Alat yang digunakan timbangan bahan dan timbangan analitik; grinder; *rotary evaporator* (Eyela N-1000); oven; seperangkat alat kempa hidrolis (manual); seperangkat instrument HPLC (Perkin Elmer series 200) yang dilengkapi dengan pompa, kolom LiChosper® C18 (25 cm x 5 μm), *degasser*, detektor spektrofotometer UV/VIS, pemroses data dan interfase; seperangkat instrumen GCMS (Agilent Technologies 6890 N); labu Erlenmeyer; corong; botol vial; pipet tetes; beaker gelas; dan alat-alat gelas lainnya.

Prosedur Penelitian

Penyiapan simplisia dilakukan dengan : Buah yang sudah masak dikupas dan dikeluarkan biji-bijinya. Kemudian biji dikeringkan dengan udara (kering angin). Kemudian kulit biji dikupas/dibuang kulit arinya. Biji yang sudah dikupas dibagi menjadi 4 kelompok untuk memperoleh minyak berdasarkan perlakuan.

Ekstraksi dengan Pelarut

Sampel dikupas kemudian di giling menggunakan alat grinder. Sampel halus ditimbang sebanyak 130 g sebanyak 3 kali kemudian masing-masing di maserasi dengan *n*-heksan. Ekstrak dikentalkan menggunakan *Rotary vacuum Evaporator* suhu $< 40^\circ\text{C}$. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemennya.

Pengepresan Mekanis

Sampel halus ditimbang 130 g sebanyak 3 kali dan dikeringkan di oven dengan variasi suhu 40°C , 80°C dan 120°C . Pengeringan dilakukan selama 2 jam. Masing-masing sampel di kempa menggunakan alat kempa hidrolis manual dan minyaknya ditampung lalu ditimbang dan dihitung rendemen minyak yang dihasilkan dari masing-masing suhu. Pembuatan larutan induk deret standar α -tokoferol. α -Tokoferol ditimbang seksama 25 mg lalu diencerkan dengan etanol hingga 50 mL ($500\ \mu\text{g/mL}$). Diambil 0,5 mL dan dilarutkan dengan etanol:THF (1:1) hingga 25 mL ($10\ \mu\text{g/mL}$). Kemudian dibuat deret standar dengan konsentrasi 0,5; 1; 2; 5 dan $10\ \mu\text{g/mL}$.

Validasi Metode Analisis

Uji linieritas dan pembuatan kurva kalibrasi

Seri larutan standar α -tokoferol dengan konsentrasi 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$ masing-masing disuntikkan sebanyak 20 μL ke dalam instrumen KCKT. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ($y=a+bx$). Linieritas dari kurva kalibrasi dilihat dengan menghitung koefisien korelasi (r) dari persamaan garis linier.

Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{3,3 \left(\frac{S_y}{x}\right)}{b}$$

$$\text{LOD} = \frac{10 \left(\frac{S_y}{x}\right)}{b}$$

Uji Perolehan Kembali

Sampel minyak dari biji kelor ditimbang sebanyak 0.25 g dan dilarutkan dengan etanol 10 mL, ditambahkan larutan induk dari standar (spike) sebanyak 0.5 mL lalu dicukupkan volumenya hingga 25 mL menggunakan etanol:THF (1:1). Dimasukkan ke dalam vial kemudian injeksikan sebanyak 20.0 μL ke alat KCKT dan dicatat luas puncaknya. Dan dihitung persen perolehan kembali (*recovery*) dengan rumus :

$$\% \text{ recovery} = \frac{a-b}{c} \times 100\%$$

a = kadar terukur sampel yang ditambahkan spike

b = kadar rata-rata sampel yang tidak ditambahkan spike

c = penambahan spike

Analisis A-Tokoferol pada Minyak Biji Kelor Dengan KCKT

Sampel minyak dari biji kelor ditimbang sebanyak 0.25 g dan dilarutkan dengan etanol 10 mL, lalu dicukupkan volumenya hingga 25 mL menggunakan etanol:THF (1:1). Sampel dimasukkan ke dalam vial kemudian injeksikan sebanyak 20.0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak metanol, panjang gelombang 280 nm, dan laju alir 1.0 mL/menit lalu dicatat luas puncaknya. Percobaan diulang sebanyak dua kali.

Analisis kandungan minyak biji kelor dengan GCMS

Sebanyak 0.5 g minyak dilarutkan dengan Etil asetat 5 mL lalu disuntikkan ke alat kromatografi gas. Parameter pengujian GCMS mengacu pada penelitian Nassir, *et al.* (2010).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Perolehan Minyak

Variasi proses perolehan minyak dilakukan untuk mengetahui jumlah minyak yang dihasilkan dan kadar vitamin E dari masing-masing minyak yang diperoleh. Metode ekstraksi yang dipakai dalam perolehan minyak ini adalah maserasi. Maserasi merupakan ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam suatu pelarut selama beberapa hari pada temperatur kamar (Sudjadi 1986). Keuntungan dari maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah

Tabel 1. Data hasil perolehan minyak

Metode	Berat sampel (g)	Minyak yang dihasilkan (g)	Persentase (%)	(%) Rata-rata	
Ekstraksi	Maserasi	130	52.2	40.14	
	dengan n-heksan	130	51.8	39.84	
		130	52.1	40.07	
Pengepresan mekanis	Tempering biji suhu 40°C	130	11.23	8.64	
		130	14.77	11.36	
		130	13	10	
	Tempering biji suhu 80°C	130	10.75	8.27	7.6
		130	8	6.15	
		130	10.9	8.38	
Tempering biji suhu 120°C	130	10.29	7.92	6.77	
	130	8.67	6.67		
		130	7.48	5.72	

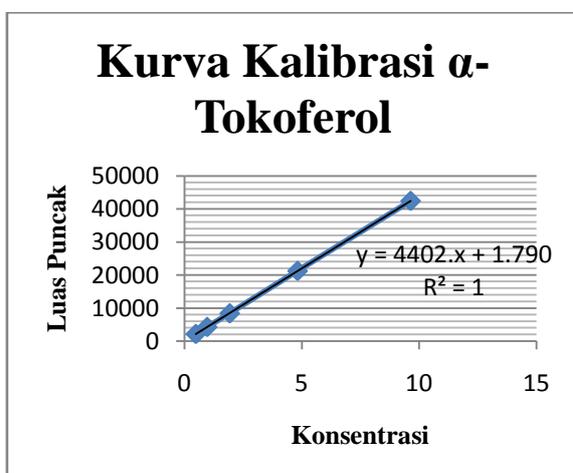
diusahakan (Ketut Ristiasa *et al.* 2000). Metode selanjutnya adalah pengepresan mekanis dengan berbagai macam suhu pemanasan diantaranya 40 °C, 80 °C dan 120 °C. Menurut Ketaren (1986), adanya perlakuan panas pada biji menyebabkan protein yang terdapat di dalam biji terkoagulasi (menggumpal), dan menyebabkan pecahnya emulsi antara minyak dan protein sehingga memudahkan minyak mengalir keluar, sedangkan protein tetap tertinggal di dalam bungkil.

Validasi Kurva Kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi α -tokoferol dilakukan dengan menghubungkan 5 titik pada berbagai konsentrasi yaitu 0.5; 1; 2; 5 dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Persamaan garis kurva kalibrasi yang didapat yaitu $y = 17908091 + 4402.4227 x$ dengan koefisien korelasi (r) : 0.999991. Koefisien korelasi yang semakin mendekati nilai 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan.

Tabel 2. Data uji linearitas

Konsentrasi (C) ($\mu\text{g/mL}$)	Luas puncak (A) ($\mu\text{V/s}$)
0.48	2156.71
0.96	4271.09
1.93	8401.82
4.8	21246.04
9.64	42433.07



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar α -tokoferol

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantifikasi merupakan parameter dalam analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). Batas deteksi dan batas kuantifikasi α -tokoferol yaitu masing-masing sebesar 0.06 $\mu\text{g/mL}$ dan 0.2 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 3. Data penentuan LOD dan LOQ

Konsentrasi (C) ($\mu\text{g/mL}$)	Luas puncak (A) ($\mu\text{V/s}$) (Y)	Yi	(Y-Yi) ²
0.48	2156.71	2114.95	1743.59
0.96	4271.09	4228.12	1846.71
1.93	8401.82	8485.26	6962.12
4.8	21246.04	21133.42	12683.31
9.64	42433.07	42441.15	65.29
			$\Sigma =$ 23301.02
LOD = 0.06		LOQ = 0.2	

Uji Perolehan Kembali

Kecermatan atau akurasi adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya (Harmita 2004). Hasil rata-rata uji perolehan kembali pada matriks minyak biji kelor adalah 95.8%. Hasil tersebut sudah masuk kedalam rentang *recovery factor* untuk analisis vitamin E yakni 90%-110% (AOAC SMPR 2011). Maka analisis α -tokoferol disini sudah dikatakan akurat. Hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada tabel 4.

Kandungan α -tokoferol dalam Sampel Minyak Biji Kelor

Preparasi sampel untuk minyak biji kelor sebelum di analisis dengan KCKT adalah dengan melarutkan minyak dalam pelarut campuran dari etanol dan THF. Pelarut etanol digunakan untuk memecahkan/memisahkan vitamin E yang terikat pada membran/lipoprotein/liposom karena alkohol merupakan medium dimana α -tokoferol larut dan bebas mengelusi (Ubaldi 2005). Kadar rata-rata α -tokoferol dari sampel minyak hasil ekstraksi

Tabel 4. Uji perolehan kembali

No	Bobot sampel (g)	Luas puncak	Kadar (mg/g)	Penambahan spike ($\mu\text{g/g}$)	UPK (%)	UPK rata-rata (%)
1	0.264	52011.17	1.1187	91.27	96.40	95.8
2	0.2637	52408.53	1.1286	91.38	95.29	

Tabel 5. Data kadar α -tokoferol dari sampel

Sampel		Waktu retensi	Luas puncak	Rata-rata Luas puncak	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar (mg/g)	Kadar rata-rata (mg/g)
A	1	10.313	10150.07	10397.415	2.305	0.23	0.235
	2	10.347	10644.76		2.417	0.24	
B	1	10.41	16350.03	16300.365	3.71	0.37	0.37
	2	10.423	16250.7		3.69	0.37	
C	1	10.392	11680.8	11583.39	2.65	0.27	0.265
	2	10.419	11485.98		2.609	0.26	
D	1	10.393	11702.13	11473.44	2.658	0.27	0.265
	2	10.36	11244.75		2.55	0.26	

Tabel 6 Kandungan senyawa kimia sampel

No	Nama trivial senyawa	Turunan senyawa	Waktu retensi	Quality (SI)	Rumus molekul
1	Asam palmitat ($\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$)	Metilpalmitat/matil n-heksadekanat	16.38	98	$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOCH}_3$
2	Asam stearat ($\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$)	Metilstearate	17.96	99	$\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOCH}_3$
3	Asam oleat ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$)	Trans asamoleat / trans-9-asamoktadekanat / asamelaidat	18.18	99	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$, Δ^9 trans
		Metiloleat	17.81	99	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOCH}_3$
		Etiloleat	18.36	99	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOC}_2\text{H}_5$

dan dan hasil kempa berbeda presentasinya (Tabel 5).

Hasil uji statistik dengan uji pearson dan juga uji spearman menunjukkan hubungan yang tidak signifikan antara kadar α -tokoferol yang dihasilkan dengan proses perolehan minyak maupun dengan perbandingan suhu. Hasil yang tidak signifikan tersebut dinyatakan dengan nilai p yang dihasilkan adalah 0.333 (signifikan apabila $p < 0.05$).

Analisis kandungan minyak biji kelor bertujuan untuk mengetahui kualitas minyak biji kelor. Apabila minyak tersusun dari asam-asam lemak yang tidak jenuh maka minyak akan mudah teroksidasi (dengan adanya rantai ganda) menjadi peroksida kemudian menjadi aldehid+keton sehingga minyak tersebut

berbau tengik (Winarsi 2007). Hasil yang didapat adalah minyak mengandung asam lemak tidak jenuh berupa asam oleat dengan turunan-turunannya yaitu metil oleat, etil oleat dan bentuk cis-trans dari asam oleat tersebut. Serta asam lemak jenuh yang dominan berupa asam palmitat dan turunannya yaitu metil palmitat, asam stearat dan turunannya yaitu metil stearat.

4. KESIMPULAN

Proses perolehan minyak dan pemanasan pada sampel minyak biji kelor tidak mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap kadar vitamin E yang dihasilkan dari sampel.

Daftar Pustaka

- AOAC SMPR. 2011. Determination of vitamin E in Infant and adult/pediatric nutritional formula. *Stakeholder panel for infant formula and adult nutritionals* Version 7.
- Bhoomika R Goyal, Babita B Agrawal, RameshK Goyal, Anita A Metha. 2007. Phyto-pharmacology of *Moringaoleifera* Lam. *An overview. Natural Product Radiance*. 6(4)
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3): 117-135.
- Ketaren S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta (ID): UI-Press.
- Ketut Ritiasa. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta (ID): Dirjen BPPOM. Departemen Kesehatan RI: 10-11.
- Nasir, S. Soraya, D.F. Pratiwi, D. 2010. Pemanfaatan Ekstrak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) Untuk Pembuatan Bahan Bakar Nabati, *Jurnal Teknik Kimia*, No. 3, Vol. 17, Agustus 2010.
- Sudjadi. 1983. *Penuntun Struktur Senyawa Organik*. Bandung (ID): Ghalia Indonesia.
- Ubaldi A, Delbono G, Fusari A, Serventi P. 2005. Quick HPLC Method to Determine Vitamin E Concentration in Cow's Milk. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*. XXV :101-110.
- Winarsi Herry. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta (ID): Kanisus.