

Analisis Senyawa *L-arginine* pada Bawang Putih Tunggal dan *Black Garlic* Tunggal Dengan Menggunakan Metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Abdul Aziz Setiawan^{1*}, Tafriani Sucianti Nesha¹, Dina Pratiwi¹,
Gany Herianto², Edy Marwanta²

ABSTRACT: *L-Arginine* is a semi essential amino acid and has a function in arterial vascular relaxation and improves blood flow. Single-bulb black garlic was produced from ordinary single-bulb garlic clove by process from maillard browning at temperature at 70oC and 95% of humidity controlled room for a month. It is known that single-bulb black garlic has benefits as antidiabetes, uric acid, cholesterol, hypertension, endurance and others. This study aims to determine the content of *L-Arginine* compound on single-bulb garlic and single-bulb black garlic by using HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) method. The mobile phase used consists of buffer A and buffer B. Buffer A consists of Na-Acetate (pH 6.5), Na-EDTA, Methanol, and Tetrahydrofuran. While B buffer consists of Methanol and Water Pro Injection. Thermo Scientific Column ODS-2 Hyersil C18, flow rate 1 ml / min, using flouresensi detector with 350 nm wavelength. Based on the results obtained *L-Arginine* compound contained in a single-bulb garlic of 2.50% while for single-bulb black garlic that is equal to 0.670%. The content of *L-Arginine* compounds in single garlic is greater than that of a single black garlic.

Keywords: Single-bulb black garlic, *L-Arginine*, HPLC

ABSTRAK: *L-Arginin* merupakan asam amino semi esensial dan mempunyai fungsi dalam relaksasi pembuluh darah arteri dan memperlancar aliran darah. *Black garlic* tunggal merupakan hasil modifikasi dari bawang putih tunggal yang sudah mengalami proses pencoklatan pada temperatur 70°C dengan kelembapan 90% dalam ruang terkendali selama satu bulan. Diketahui bahwa *black garlic* tunggal memiliki manfaat sebagai antidiabetes, asam urat, kolesterol, hipertensi, daya tahan tubuh dan lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa *L-Arginine* pada bawang putih tunggal dan *black garlic* tunggal dengan menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Fase gerak yang digunakan terdiri dari buffer A dan buffer B. Buffer A terdiri dari Na-Asetat (pH 6,5), Na-EDTA, Metanol, dan Tetrahidrofuran. Sedangkan buffer B terdiri dari Metanol dan Air Pro Injeksi. Kolom Thermo Scientific ODS-2 Hyersil C18, laju alir 1 ml/menit, menggunakan detektor flouresensi. Dengan panjang gelombang 350 nm. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh senyawa *L-Arginine* yang terkandung pada bawang putih tunggal sebesar 2,50% sedangkan untuk *black garlic* tunggal yaitu sebesar 0,670%. Kandungan senyawa *L-Arginine* pada bawang putih tunggal lebih besar dibandingkan dengan *black garlic* tunggal.

Kata kunci : *black garlic* tunggal, *L-Arginin*, HPLC.

¹ Sekolah Tinggi Farmasi Muhammadiyah Tangerang
² Pusat Biotek, Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi (Pusat Bioteknologi – BPPT)

Korespondensi :

Abdul Aziz Setiawan
alazizsetiawan@stfm.ac.id

PENDAHULUAN

Bawang putih (*Allium sativum*) telah lama digunakan sebagai pemberi aroma dan berpotensi untuk mencegah serta menyembuhkan berbagai penyakit [1]. Banyak studi terbaru menunjukkan efek farmakologis bawang putih, seperti antibakteri, antijamur, hipolipidemik, hipoglikemik, antitrombotik, antioksidan dan antikanker [2]. Jenis bawang putih yang banyak ditemui di Indonesia adalah Lumbu hijau, Lumbu kuning, Cirebon, Tawangmangu, jenis Iliocos dari Filipina dan jenis Thailand. Lumbu hijau merupakan varietas unggul yang memiliki potensi produksi tinggi dan dianjurkan untuk ditanam [3].

Berbagai penelitian menunjukkan efektivitas bawang putih dalam mengatasi hiperkolesterolemia [4], hipertensi [5]. Bawang putih juga dapat digunakan sebagai antioksidan dan antimikroba [6], antidiabetes [7] dan memberikan efek perlindungan terhadap potensi Cyclosporin A nefrotoksistas [8]. Sedangkan manfaat dari black garlic yaitu dapat mengobati kolesterol, asam urat, hipertensi, diabetes, antioksidan, antiinflamasi, dan anti alergi [9].

Menurut penelitian Sasaki tahun 2007 dalam 100 g bawang putih segar dan bawang hitam mengandung 18 asam amino, diantaranya cystein, ricin, histidine, phenylalanine, tyrosine, leucin, isoleucin, methionine, valine, alanine, glycine, proline, glutamic acid, serine, threonine, aspartic acid, tryptophane, dan arginine.

Bawang putih atau bawang putih tunggal dapat diolah dengan cara fermentasi dan menghasilkan bawang hitam atau black garlic. Black garlic merupakan produk fermentasi dari bawang putih yang dipanaskan pada suhu 65 – 800 C dengan kelembapan 70 – 90% dan suhu kamar selama satu bulan. Black garlic memiliki warna hitam, ringan karena kadar airnya berkurang dan mempunyai aroma serta rasa yang tidak terlalu menyengat seperti bawang putih [10].

Arginin merupakan asam amino semi esensial yang artinya tubuh dapat memproduksi asam amino ini dalam jumlah kecil, sehingga asupan dari luar masih diperlukan. *L – Arginin* (2-amino-

5-guanidinovaleric acid) merupakan asam amino dasar yang terdapat dalam cairan fisiologis tubuh. *L-Arginin* banyak terdapat dalam seafood, semangka, kacang – kacangan, daging, konsentrat proteinasi dan isolasi protein kedelai, namun rendah dalam susu mamalia [11].

L-Arginin dalam kekebalan tubuh merupakan salah satu substansi yang meregulasi sintesis NO (Nitric Oxide) oleh NOS2 (Nitric Oxide Synthase 2), produksi antibodi oleh sel-B, serta sel-T ekspresi reseptor dan perkembangan sel-B [12]. Ekspresi reseptor sel T yang menyebabkan *L-Arginin* penting dalam sistem kekebalan bawaan (innate immune system) dan sistem kekebalan adaptasi (*adaptive immune system*). *L-arginin* merupakan prekursor dalam sintesis NO yang dilakukan oleh *Nitric Oxide Synthase* (NOS). Kekurangan *L – Arginin* dalam diet akan menyebabkan gangguan sintesis NO [11].

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini dengan metode eksperimen, eksperimen adalah suatu penelitian dengan menggunakan percobaan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Sekolah Tinggi Farmasi Muhammadiyah Tangerang yang beralamat di Jalan Raya Pemda Tigaraksa KM 4 No. 13 Tangerang, Banten dan Laboratorium Kimia Terpadu Institut Pertanian Bogor yang beralamat di Gedung Pasca Sarjana Wing Kimia Lantai Dasar Kampus IPB Baranangsiang, Jl. Pajajaran Bogor 1614.

Alat

Seperangkat alat HPLC Shimadzu CBM-20A, Sentrifugasi, alat – alat gelas (Phyrex), timbangan analitik, mikro pipet, mortar, stemper, kertas saring, oven, membran millipore 0,45 mikron, syringe 100 µL, vial 1 mL, neraca analitik, pipet 1 mL, labu takar 100 ml, dan tabung ulir.

Bahan

Sedangkan Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel bawang putih tunggal, black garlic tunggal, senyawa *L-Arginin*,

aqua bidestilasi, Metanol pro analisis (Merck®), Etanol pro analisis (Merck®), *ortoftalaldehida*, *Natrium hidroksida*, Asam Borat, Larutan brij-30 30%, *2-merkaptotetanol*, *Na-EDTA*, *Tetrahidrofuran* (THF), Na-asetat, dan air pro injeksi.

Determinasi Tanaman

Determinasi bawang putih tunggal yang diperoleh dari Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Kawasan Puspitek, Serpong dilakukan untuk mengetahui identitas taksonominya di Herbarium Bogoriense, Balai Penelitian dan Pengembangan Botani Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI Bogor

Prosedur Pembuatan *Black Garlic* Tunggal

Bawang putih tunggal segar ditimbang sebanyak 100 gram. Kemudian bawang putih tunggal akan melalui proses fermentasi yaitu dimasukan ke dalam oven padasuhu 70°C dengan kelembaban 75% dalam waktu 30 hari. Selama proses fermentasi, bawang putih tunggal yang berwarna putih akan berubah menjadi warna abu-abu dan berkembang menjadi hitam. Sifat dari warna hitam tidak akan menimbulkan aroma yang menyengat dan akan menimbulkan rasa yang manis (Sasaki, et al., 2007).

Prosedur Pembuatan Ekstrak

1. Prosedur Pembuatan Ekstrak *Black Garlic* Tunggal

Black garlic tunggal yang sudah dihancurkan dan dipanaskan pada suhu 100oC selama 2 jam, digunakan pelarut aqudest sehingga menghasilkan senyawa larut air. Setelah itu, hasil yang sudah diekstraksi diambil filtratnya untuk disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit dan supernatant yang dihasilkan dibekukan dalam suhu -80oC semalam (Sasaki et al., 2007).

2. Prosedur Pembuatan Ekstrak Bawang Putih Tunggal

Bawang putih tunggal yang telah dicuci sebanyak 100 gram, kemudian timbang bawang putih yang sudah dihaluskan dengan menggunakan

mortar dan stemper. Bawang putih yang sudah ditimbang dan halus dipindahkan ke dalam beaker glass dan tambahkan 200 ml etanaol p.a, kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk, tutup dengan menggunakan alumunium foil. Setelah itu didiamkan selama 24 jam hingga terbentuk campuran etanol-bawang putih tunggal. Hasil dari campuran tersebut didekantasi hingga dihasilkan larutan hasil ekstraksi, kemudian ambil ± 10 ml untuk di uji menggunakan HPLC.

Analisis Kualitatif

Siapkan ekstrak bawang putih tunggal dan black garlic tunggal sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi yang berbeda, kemudian tambahkan larutan ninhidrin 0,1 % sebanyak 5 tetes dipanaskan dan akan terjadi perubahan warna menjadi biru sampai keunguan.

Analisis Kuantitatif

1. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan menentukan kadar protein dari sampel dengan metode Kjeldahl. Masukkan sampel yang mengandung 3 mg sampel ke dalam tabung ulir, tambahkan 1 mL HCl 6 N, tabung ulir yang mengandung larutan sampel dialirkan gas nitrogen selama 0,5 – 1 menit dan tutup segera tabung. Tabung yang telah tertutup dimasukkan ke dalam oven suhu 110oC selama 24 jam untuk melakukan tahap hidrolisis. Sampel yang telah terhidrolisis didinginkan pada suhu kamar dan larutan dipindahkan secara kuantitatif ke labu rotary evaporator. Kemudian, tabung ulir dibilas dengan 2 mL HCl 0,01 N sebanyak 2 – 3 kali dan digabungkan hasil larutan yang telah dibilas ke labu rotary evaporator. Sampel dikeringkan dengan rotary evaporator, hasil sampel yang sudah kering ditambahkan dengan HCl 0,01 N dan sampel siap uantuk dianalisis dengan menggunakan HPLC.

2. Pembuatan Pereaksi OPA (*Ortoftalaldehida*)

Sebanyak 50 mg OPA (*Ortoftalaldehida*) dilarutkan dalam 4 mL metanol dan

ditambahkan merkaptotetanol, kemudian campuran tersebut dikocok hati – hati. Setelah itu, ditambahkan larutan brij-30 30% dan buffer borat. Simpan larutan dalam botol berwarna gelap pada suhu 4oC dan akan stabil selama 2 minggu. Pereaksi derivatisasi dibuat dengan cara mencampurkan satu bagian larutan stok dengan dua bagian larutan buffer kalium borat pH 10,4 dan harus dibuat segar setiap hari.

3. Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan terdiri dari dua macam yaitu Buffer A dan Buffer B. Buffer A terdiri dari Na-Asetat (pH 6,5) 0,025 M, Na-EDTA 0,05 %, Metanol 9,00 %, dan THF 1,00 %. Pada pembuatan Buffer A dilarutkan dalam 1 liter air Pro Injeksi, kemudian larutan tersebut disaring menggunakan kertas milipore 0,45 µm dan akan stabil selama 5 hari pada suhu kamar bila disimpan dalam botol berwarna gelap yang diisi dengan gas He atau Nitrogen. Sedangkan pada fase gerak Buffer B terdiri dari metanol 95% dan air pro injeksi, setelah itu campuran Buffer B disaring menggunakan kertas milipore 0,45 mikron dan larutan ini akan stabil dalam waktu tak terbatas.

4. Analisis L-Arginine

Larutan sampel yang telah dihidrolisis dalam 5 mL HCl 0,01 N kemudian disaring dengan

kertas milipore 0,45 µm. Tambahkan buffer kalium borat pH 10,4 dengan perbandingan 1 : 1, kemudian masukkan ke dalam vial kosong yang bersih. Sebanyak 50 µl sampel dimasukkan ke dalam vial tersebut dan ditambahkan 250 µl pereaksi OPA, biarkan selama 1 menit agar derivatisasi berlangsung sempurna. Campuran larutan tersebut kemudian diinjeksikan ke dalam kolom HPLC sebanyak 5 µl. Kemudian ditunggu sampai pemisahan semua asam amino selesai dan waktu retensi diperlukan sekitar ± 30 menit.

Analisis Data

Adapun analisis data yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu analisis data secara deskriptif terhadap hasil penelitian yang dilakukan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui identitas tanaman yang digunakan. Determinasi dilakukan di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia) Cibinong, Bogor. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan merupakan jenis *Allium sativum* L. dari suku *Amaryllidaceae*.

Analisis Kualitatif Uji Ninhidrin

Pengujian secara kualitatif dilakukan menggunakan uji ninhidrin. Pengujian ini

Tabel 1. Gradien Fase Gerak

Waktu (Menit)	Laju aliran fase mobil (mL/menit)	% Buffer A	% Buffer B
0,01	1	95	5
2	1	95	5
13	1	65	35
15	1	65	35
20	1	30	70
22	1	10	90
25	1	0	100
28	1	100	0
35	1	100	0

dilakukan untuk mengetahui asam amino yang terkandung pada bawang putih tunggal dan black garlic tunggal. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Identifikasi senyawa *L-Arginin*

No	Bahan	Hasil	Keterangan	Kesimpulan
1	Bawang putih Tunggal	Ungu	Penambahan larutan ninhidrin 5 tetes	+
2	<i>Black Garlic</i> Tunggal	Ungu	Penambahan larutan ninhidrin 20 tetes	+

Keterangan : (+) Mengandung senyawa *L-Arginine*
 (-) Tidak mengandung senyawa *L-Arginine*

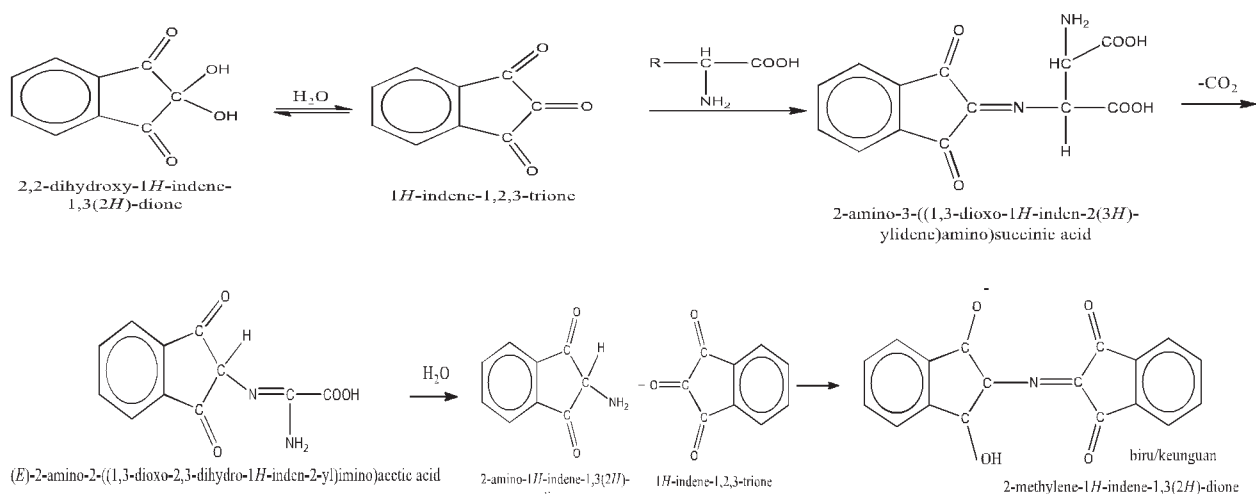
Hasil yang diperoleh pada bawang putih tunggal positif mengandung senyawa *L-Arginine* dengan penambahan larutan ninhidrin 0,1 % sebanyak 5 tetes dan menghasilkan perubahan warna biru keunguan. Hal ini disebabkan karena gugus amina dan karboksil bereaksi dengan ninhidrin dan terjadi perubahan warna, dimana gugus amina pertama melekat pada karbon alfa rantai asam amino kemudian atom nitrogen dari gugus amina beraksi dengan ninhidrin sehingga menghasilkan atau terjadi perubahan warna menjadi biru keunguan.

Hasil pengujian pada ekstrak black garlic tunggal mengandung senyawa *L-Arginine* dengan penambahan larutan ninhidrin 0,1 % sebanyak 5 tetes belum ada perubahan dan

masih berwarna coklat kehitaman dan ketika penambahan larutan ninhidrin 0,1 % sebanyak 20 tetes terjadi perubahan warna menjadi warna ungu. Hal ini disebabkan karena ekstrak

bawang yang digunakan telah melalui proses fermentasi selama 30 hari dengan temperatur 70 0C sehingga kandungan *L-Arginine* pada black garlic tunggal adalah pengaruh dari cara ekstraksi. Perbedaan penggunaan pelarut pada proses ekstraksi menyebabkan kandungan *L-arginine* yang terekstraksi pada bawang putih tunggal dan black garlic tunggal berbeda. Pada black garlic tunggal menunjukkan bahwa kandungan gugus amin dan karboksil yang bereaksi hanya sedikit sehingga tidak ada perubahan warna yang dihasilkan oleh pereaksi ninhidrin dan adanya perubahan warna ketika ditambahkan 20 tetes larutan ninhidrin 0,1 %.

Reaksi uji ninhidrin yang sudah diuraikan pada gambar 4.1.bahwa reaksi ninhidrin terjadi



Gambar 1. Reaksi Uji Ninhidrin

akibat pelepasan ikatan H₂O dan menghasilkan senyawa 2 (*1H-indene-1,2,3-trione*). Dimana senyawa 2 (*1H-indene-1,2,3-trione*) direaksikan dengan asam amino. Asam amino menghasilkan senyawa 3. Setelah itu, terjadi pelepasan energi dengan melepas CO₂, dan menghasilkan senyawa 4. Kemudian dihidrolisis dengan air menghasilkan aldehyd dan senyawa 5 (*2-Amino-1H-indene-1,3(2H)-dione*). Senyawa 5 (*2-Amino-1H-indene-1,3(2H)-dione*) direaksikan dengan senyawa 2 (*1H-indene-1,2,3-trione*) menghasilkan senyawa enol atau senyawa kompleks berwarna biru keunguan.

Uji Kuantitatif

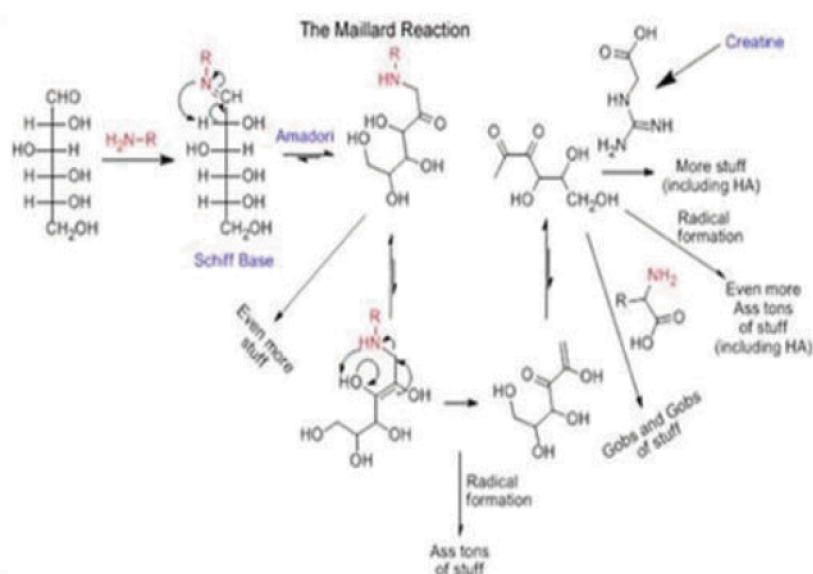
Pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa

L-Arginine pada bawang putih tunggal dan black garlic tunggal. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 3.

Hasil analisis kuantitatif *L-Arginine* pada bawang putih tunggal dan black garlic tunggal yang diperoleh menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Menunjukkan bahwa senyawa *L-Arginine* yang terkandung pada bawang putih tunggal yaitu sebesar 2,50%, sedangkan untuk black garlic tunggal yaitu sebesar 0,67%. Hal ini disebabkan karena polaritas dari senyawa arginine memiliki kepolaran yang rendah dan mempunyai unsur N yang banyak dibandingkan dengan fase diam C18 yang mempunyai rantai C yang banyak sehingga bersifat non polar. Fase Gerak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Na-Asetat (pH 6,5), Na-EDTA, Metanol, Air Pro Injeksi

Tabel 3. Hasil Analisis HPLC

No	Bahan	Konsentrasi standar (µg/mL)	Waktu Retensi (menit)	Area (µmol)	Hasil (%)
1	Bawang putih Tunggal	0,5	16,181	1.122.276	2,50
2	Black Garlic Tunggal	0,5	16,113	240.122	0,67



Gambar 2. Reaksi Millard

dan *Tetrahidrofuran* merupakan senyawa yang bersifat polar atau polaritasnya tinggi. Hasil yang diperoleh dalam waktu retensi berkaitan dengan sifat kepolaran pada fase gerak, fase diam dan sampel, sehingga berdampak dalam hasil waktu retensi bawang putih tunggal 16,181 menit dan *black garlic* tunggal 16,113 menit.

Perbedaan kadar *L-Arginine* pada bawang putih tunggal dan *black garlic* tunggal disebabkan karena *black garlic* tunggal telah mengalami proses fermentasi dan terjadi reaksi *maillard*.

Dimana reaksi *maillard* terjadi akibat pencoklatan non enzimatis yang terjadi antara gugus amin (*asam amino*) dan gula pereduksi (gugus keton atau aldehidnya). Pada akhir reaksi terbentuk pigmen coklat melanoidin yang memiliki bobot molekul besar. Reaksi yang diawali dengan reaksi antara gugus aldehid

atau keton pada gula dengan asam amino pada protein ini membentuk glukosilamin. Selain gugus aldehid/keton dan gugus amino, faktor yang memengaruhi reaksi *Maillard*, adalah suhu, konsentrasi gula, konsentrasi amino, pH, dan tipe gula (Arsha, 2016).

KESIMPULAN

Berdasarkan pada hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Pada ekstrak bawang putih tunggal dan ekstrak *black garlic* tunggal terdapat kandungan senyawa *L-Arginine*.
2. Kandungan senyawa *L-Arginine* pada bawang putih tunggal sebanyak 2,50% dan *black garlic* tunggal sebanyak 0,67%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Amagse, B.I. Petesh., H. Matsuura, S. Kasuga and Y. Itakura. 2001. "Intake of Garlic and its Bioactive components". Journal of Nutrition. Vol. 131. No. 955S-962S.
2. Song, K. and J. A. Milner. 2001. *The influence of heating on the anticancer properties of garlic*. Journal of Nutrition 131: 1054S-1057S
3. Rukmana, R. 2012. Budidaya Bawang Putih. Yogyakarta: Kanisius.
4. Stevinson C, Pittler MH, Ernst E. 2000. *Garlic for Treating Hypercholesterolemia, A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials*. Annals of Internal Medicine. 133(6):420-429 <https://doi.org/10.7326/0003-4819-133-6-200009190-00009>.
5. Reinhart KM, Coleman CI, Teevan C, Vachhani P, White C. 2008. *Effect of Garlic on Blood Pressure in Patients with and Without Systolic Hypertension: A Meta-Analysis*. The Annals of Pharmacotherapy. 42(12):1766-1771 <https://doi.org/10.1345/aph.1L319>.
6. Gebreyohannes G, Gebreyohannes M. 2013. *Medicinal values of garlic: A review*. International Journal of Medicine and Medical Sciences. 5(9):401-408
7. Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. 2006. *Antidiabetic effect of garlic (Allium sativum L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats*. Phytomedicine. 13:624-629 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.09.010>.
8. Marsoul RD, Abbood RM, Abbas MT. 2016. *Effect of Garlic Oil on Cyclosporine Induced Renal Toxicity in Rats*. International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research. 5(2).
9. Choi, D.J., Lee, S.J., Kang, M.J., Cho, H.S., Sung, N.J dan Shin, J.H. 2008. *Physicochemical Characteristics of Black Garlic (Allium sativum L.)*. Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition, 37, 456-467.
10. Wang, Danan. et al. 2010. *"Black garlic (Allium sativum) Extracts Enhance The Immune System"*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, vol. 4 (1). 37.
11. Wu, G., Bazer, F., Davis, T. 2009 *Arginine Metabolism and Nutrition in Growth, Health and Disease*. Amino Acids. 37(1):153-168.