

KANDUNGAN ANTOSIANIN DAN IDENTIFIKASI ANTOSIANIDIN DARI KULIT BUAH JENITRI (*Elaeocarpus angustifolius* Blume)

Anthocyanin Content and Identification of Anthocyanidin of Blue Marble (*Elaeocarpus angustifolius* Blume) Fruit Peel

Lydia Ninan Lestario, Elisabeth Rahayuni, Kris Herawan Timotius

Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana,
Jl. Diponegoro 52-60 Salatiga -50711
Email: nlestario@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan antosianin total dan mengidentifikasi jenis-jenis antosianidin dari kulit buah jenitri (*Elaeocarpus angustifolius* Blume). Kandungan antosianin total kulit buah jenitri yang diukur dengan metode perbedaan pH adalah $23,87 \pm 4,11$ mg/100 g berdasarkan berat kering kulit buah. Jenis antosianidin yang diukur dengan KLT, spektrofotometer UV-VIS dan KCKT, menunjukkan bahwa antosianin yang paling dominan pada kulit buah jenitri adalah sianidin-3-rutinosida, sedang dua jenis yang lain adalah delphinidin-3-rutinosida, dan delphinidin-3-glikosida.

Kata kunci : Kulit buah jenitri, antosianinidin, antosianin

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine total anthocyanin content and to identify kinds of anthocyanidin of blue marble (*Elaeocarpus angustifolius* Blume) fruit peel. Total anthocyanin content was determined by pH differential method was $23,87 \pm 4,11$ mg/100 g of dry weight of fruit peel. Kinds of anthocyanidin determined by TLC, UV-VIS spectrophotometer and HPLC and it showed that the major anthocyanin of blue marble fruit peel was cyanidin-3-rutinoside, and two others were delphinidin-3-rutinoside and delphinidin-3-glucoside.

Keywords : Blue marble fruit peel, anthocyanidin, anthocyanin

PENDAHULUAN

Warna merupakan faktor penting yang menentukan ketertarikan konsumen terhadap suatu produk pangan, oleh sebab itu produsen pangan olahan umumnya menambahkan pewarna ke dalam produknya agar dapat menarik selera konsumen. Sayangnya, kebanyakan pewarna yang digunakan adalah pewarna sintetik, bahkan pewarna *non-food grade* seperti pewarna tekstil yang akan memberikan efek buruk bagi kesehatan, diantaranya efek toksik dan karsinogenik (Lestario *dkk.*, 2004). Seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan kesehatan, maka meningkat pula tuntutan untuk menggunakan pewarna alami yang diyakini lebih aman bagi kesehatan.

Salah satu pigmen alami yang berpotensi sebagai alternatif pengganti pewarna sintetik adalah antosianin. Pigmen ini tergolong dalam senyawa flavonoid dan bertanggung jawab terhadap timbulnya warna oranye, jingga, merah, ungu, dan biru pada beberapa daun, bunga dan buah (Gross, 1987). Antosianin berpotensi untuk menggantikan pewarna sintetik, khususnya pewarna merah seperti FD&C Red # 40 dan FD&C Red # 3 yang sudah dilarang (Rodriguez-Saona *dkk.*, 1998). Potensi antosianin sebagai pewarna makanan dikarenakan warnanya yang menarik, tersebar luas di alam, aman, dan sifatnya yang larut air sehingga mudah dicampurkan ke dalam sistem pangan yang '*aqueous*' (Pazmiño-Durán *dkk.*, 2001).

Walaupun demikian, stabilitasnya yang relatif rendah bila dibandingkan pewarna sintetik menyebabkan keter-

batasannya dalam aplikasi antosianin pada pangan (Pazmiño-Durán *dkk.*, 2001). Selain itu, kesulitan dalam mencari metode yang sederhana dan efisien untuk ekstraksi maupun pemurnian antosianin juga menjadi faktor penyebab keterbatasan penggunaannya secara komersial pada industri pangan (Ozela *dkk.*, 2007). Oleh karena itu, perlu dicari sumber – sumber baru antosianin dengan harapan akan didapatkan antosianin yang memiliki intensitas warna kuat dan relatif stabil terhadap beberapa faktor yang terlibat dalam proses pengolahan pangan seperti pemanasan dan cahaya.

Jenitri (*Elaeocarpus angustifolius* BL.) merupakan salah satu tanaman tropis yang tumbuh di Indonesia. Kulit buahnya yang berwarna biru keunguan mengindikasikan adanya antosianin. Sejauh ini, jenitri belum banyak dikenal dan dimanfaatkan oleh masyarakat. Penelitian mengenai antosianin dari kulit buah jenitri juga masih sulit ditemui. Hal ini menimbulkan ketertarikan untuk meneliti antosianin dari kulit buah jenitri.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah menentukan kandungan antosianin total dari kulit buah jenitri (*E. angustifolius* BL.) dan mengidentifikasi jenis antosianidin dan antosianinnya.

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan baku penelitian adalah kulit buah jenitri yang didapat langsung dari pohonnya di daerah Salatiga. Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain : akuades, akuabides, dietil eter (teknis), KCl, NaOH, natrium asetat, butanol, metanol, asam format, asam asetat, HCl, etil asetat, amil alkohol, AlCl₃, asetonitril, silica gel 60 (ukuran 0,04 – 0,063 mm), pelat KLT selulosa (Merck, Jerman), antosianidin standar delfinidin, sianidin, dan pelargonidin (Extrasynthèse, Perancis), kertas saring (Whatman No.1), dan Sep-Pak cartridge C-18 (Waters, Irlandia).

Peralatan yang digunakan antara lain : alat gelas, *water-bath*, corong pisah, kolom kromatografi (diameter = 1,5 cm ; panjang = 20 cm), *rotary evaporator* (Heidolph Laborota-4000, Jerman), neraca analitis ketelitian 0,0001 g (Mettler

H-80, Jerman), spektrofotometer UV-VIS (mini Shimadzu 1240, Jepang), dan KCKT (Knauer GmbH-Smart Line Series, Jerman) dengan detektor UV (Smart Line UV Detektor 2500 A-5140), kolom fase terbalik (RP) Vertex-XH-123 dengan pengisi Eurosphere C-18, dimensi 150 x 4,6 mm, ukuran partikel 5 µm).

Ekstraksi dan Isolasi Antosianin

Kulit buah jenitri dipotong kecil – kecil lalu dimaserasi dengan metanol yang mengandung 1 % HCl dengan perbandingan sampel terhadap pelarut 1 : 4 (b/v), selama selama pada suhu dingin ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). Filtrat disaring dengan kertas Whatman No. 1, lalu dipartisi dengan corong pisah dengan penambahan dietil eter untuk memisahkan komponen non-antosianin (Ozela *dkk.*, 2007). Untuk menambah kepolaran agar larutan terpisah dengan baik, ditambahkan akuades (perbandingan volume filtrat : dietil eter : akuades = 1 : 2 : 1). Lapisan bawah yang berwarna merah ditampung kemudian digenapkan menjadi 50 mL dengan metanol yang mengandung 1 % HCl. Ekstrak ini digunakan untuk pengukuran kandungan antosianin total, sedangkan untuk keperluan identifikasi digunakan ekstrak kasar yang dipisahkan dari senyawa-senyawa non-antosianin seperti klorofil atau flavonoid-flavonoid lainnya dengan kromatografi kolom.

Ekstrak kasar (tanpa partisi) dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* suhu 35°C. Ekstrak cair pekat ini ditambah dengan sejumlah silica gel hingga menjadi padatan / serbuk berwarna merah, kemudian dimasukkan ke dalam sistem kolom kromatografi yang sudah diisi dengan silica gel sampai hampir penuh sebagai fase diam. Setelah itu dilakukan elusi dengan etil asetat sebagai fase gerak. Setelah terjadi pemisahan dan semua fraksi non-antosianin turun, fraksi antosianin (warna merah) yang tertinggal di bagian atas diambil dengan cara dikerok, dan dikeringkan dengan N₂ untuk menghilangkan sisa etil asetat, kemudian diekstrak dengan metanol yang mengandung 1 % HCl. Filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 35°C untuk memperoleh ekstrak pekat.

Uji Pembuktian Antosianin (Harborne, 1996)

Uji pembuktian adanya antosianin dilakukan dengan metode seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji untuk membedakan antosianin dari betasianin

No.	Perlakuan	Karakteristik Antosianin	Karakteristik Betasianin
1.	Dipanaskan dengan HCl 2 M selama ± 5 menit pada 100°C	Warna merah tidak pudar	Warna merah pudar
2.	Ditambahkan NaOH 2 M tetes demi tetes	Warna merah berubah menjadi hijau biru dan memudar perlahan – lahan	Warna merah berubah menjadi kuning
3.	Kromatografi dengan pengembang HCl 1%	Rf rendah sampai pertengahan	Rf tinggi
4.	Kromatografi dengan BAA	Rf sedang (10 – 40)	Rf sangat rendah (0 - 10)
5.	Spektrum tampak	λ maksimum 505 -535 nm	λ maksimum 532 – 554 nm
6.	Elektroforesis pada pH 2 – 4	Bergerak ke arah katode	Bergerak ke arah anode

Sumber : (Harborne, 1996)

Kandungan Antosianin Total

Penentuan kandungan antosianin total dilakukan dengan metode pH perbedaan (Giusti and Wrolstad, 2000). Ekstrak antosianin dilarutkan dalam *buffer* KCl-HCl (1 M, pH 1) dan *buffer* NaOAc (1 M, pH 4,5) dengan perbandingan ekstrak terhadap *buffer* = 1 : 5 (v/v). Masing-masing larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm setelah diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, hasilnya dimasukkan ke dalam rumus :

$$A = [(A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5}]$$

Selanjutnya, hasil perhitungan diatas dimasukkan ke dalam hukum Lambert-Beer : $A = \epsilon \cdot L \cdot C$. ϵ dan berat molekul mengikuti antosianin yang dominan pada kulit buah jenitri, sesuai hasil identifikasi, yaitu sianidin-3-rutinosida (koefisien ekstingsi 28.800 L mol⁻¹ cm⁻¹ dan berat molekul 595,55 g mol⁻¹).

Identifikasi Antosianidin

Hidrolisis asam (Harborne, 1996). Hidrolisis asam dilakukan terhadap ekstrak antosianin kulit buah jenitri untuk memperoleh ekstrak antosianidin. Ekstrak antosianin kulit buah jenitri dipanaskan dalam HCl 2 M selama 40 menit pada 100°C, didinginkan, kemudian dicuci dengan etil asetat sebanyak 2 kali. Fraksi etil asetat dibuang dan fraksi air dipanaskan pada 80°C selama 3 menit untuk menghilangkan sisa etil asetat. Fraksi air diekstraksi dengan amil alkohol, kemudian fraksi amil alkohol dipekatkan pada gelas arloji di atas penangas air yang mendidih. Ekstrak antosianidin yang telah kering dilarutkan dalam ± 1 ml metanol yang mengandung 0,01 % HCl.

Kromatografi lapis tipis (Harborne, 1996). Ekstrak antosianidin ditotolkan pada pelat selulosa kemudian dike-

ringkan dengan N₂, selanjutnya dilakukan pengembangan satu arah dengan fase gerak forestal (asam asetat : HCl pekat : H₂O = 30 : 3 : 10, v/v) dan format (asam format: HCl pekat : H₂O = 5 : 2 : 3, v/v). Warna visual, warna di bawah sinar UV, dan Nilai Rf dari masing-masing spot yang terlihat dicocokkan dengan Tabel Referensi (Sherma and Zweig, 1971).

Spektrum absorpsi maksimum (Francis dalam Markakis, 1982). Ekstrak antosianidin dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) preparatif, dengan jumlah sampel lebih banyak, dengan fase gerak yang sama seperti metode sebelumnya. Setelah pemisahan tercapai, pelat diangkat dan dikeringkan dengan diuapi gas N₂. Spot - spot yang tampak dikerok dari pelat, dilarutkan lagi dengan metanol - 0,01 % HCl, kemudian disaring dengan kertas Whatman No.1 untuk memisahkan filtrat dari serbuk selulosa. Ekstrak tersebut diukur absorbansi maksimumnya pada 200 – 800 nm (*scanning*). Selanjutnya, ditambahkan beberapa tetes AlCl₃ (5 % b/v dalam metanol), diamati perubahan warnanya, dan diukur kembali absorbansi maksimumnya untuk melihat ada atau tidaknya pergeseran batokromik.

Kromatografi cair kinerja tinggi (Nyman and Kumpulainen, 2001 yang Dimodifikasi). Ekstrak antosianidin diinjeksikan ke dalam sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kondisi operasional sebagai berikut :

Fase diam	: Eurosphere RP C-18 (150 × 4,6 mm, 5µm)
Fase gerak	: 10 % asam format (dalam air) : asetonitril (85 : 15 v/v)
Kecepatan alir	: 1,2 mL/menit
Volume injeksi	: 20 µL
Detektor	: UV-VIS (diatur pada λ 530 nm)

Identifikasi Antosianin

Kromatografi Lapis Tipis (Harborne, 1996). Ekstrak antosianin ditotolkan pada pelat selulosa kemudian dikeringkan dengan diuapi gas N₂, selanjutnya dilakukan pengembangan satu arah dengan fase gerak BAA (*n*-butanol : asam asetat : H₂O = 4 : 1 : 5, v/v, lapisan atas) dan HCl 1 % (H₂O : HCl pekat = 97 : 3, v/v). Warna visual, warna di bawah sinar UV, dan nilai R_f dari masing-masing spot dicocokkan dengan Tabel Referensi antosianin (Sherma and Zweig, 1971).

Spektrum Absorpsi Maksimum (Francis dalam Markakis, 1982). Ekstrak antosianin dipisahkan dengan KLT preparatif dengan fase gerak seperti metode e.1. Setelah pemisahan tercapai, pelat diangkat dan dikeringkan dengan N₂. Spot-spot yang tampak dikerok dari pelat, kemudian dilarutkan dalam metanol - 0,01 % HCl, lalu disaring dengan kertas Whatman no. 1 untuk memisahkan filtrat dari serbuk selulosa. Ekstrak ini diukur absorbansi maksimumnya pada 200 – 800 nm (*scanning*). Dilakukan juga pengukuran absorbansi pada 440 nm untuk menentukan rasio $\frac{A_{440\text{ nm}}}{A_{1\text{ maks}}}$, yang mencerminkan posisi ikatan glikosidanya.

Pemurnian Antosianin dengan Sep-Pak cartridge (Giusti and Wrolstad, 1996). Ekstrak antosianin diinjeksikan ke dalam Sep-Pak cartridge C-18 yang telah diaktifkan dengan metanol diikuti dengan 0,01 % HCl. Selanjutnya dilakukan elusi dengan 0,01 % HCl untuk melarutkan gula, asam organik dan senyawa fenolik lain selain antosianin, yang mungkin terdapat dalam ekstrak. Antosianin diperoleh kembali dengan cara mengelusi dengan metanol yang mengandung 0,01 % HCl.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Nyman and Kumpulainen, 2001 yang Dimodifikasi). Ekstrak antosianin yang telah dimurnikan dengan Sep-Pak cartridge C-18 diinjeksikan ke dalam sistem KCKT dengan kondisi sebagai berikut :

- Fase diam : Eurosphere RP C-18 (150 × 4,6 mm, 5µm)
- Fase gerak : 10 % asam format (dalam air) : asetonitril (85 : 15 v/v)

- Kecepatan alir : 1,2 mL/menit
- Volume injeksi : 20 µL
- Detektor : UV (λ 530 nm)

Analisis Data

Identifikasi antosianin dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh pemisahan yang baik, sedang pengukuran kandungan antosianin total dilakukan dengan 5 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Pembuktian Adanya Antosianin

Hasil uji pembuktian adanya antosianin dapat dilihat pada Tabel 2, yang menunjukkan bahwa pigmen dalam kulit buah jenitri adalah antosianin, dan bukan betasianin.

Kandungan Antosianin Total

Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh kandungan antosianin total kulit buah jenitri adalah sebesar 23,87 ± 4,11 mg/100 g berat kering atau 9,58 ± 1,65 mg/100 g berat basah, yang dihitung sebagai sianidin-3-rutinosida, yaitu antosianin yang dominan dalam kulit buah jenitri berdasarkan hasil identifikasi. Kandungan antosianin kulit buah jenitri ini lebih rendah bila dibandingkan dengan beberapa buah berantosianin lain seperti stroberi (45-70 mg/100g), cranberi (45-100 mg/100g), ceri asam 45 mg/100g, anggur muscadine (40-403 mg/100g), dan raspberi (20 - 60 mg/100g) semuanya berdasarkan berat basah (Gross, 1987).

Kandungan antosianin dari kulit buah jenitri ini juga lebih rendah bila dibandingkan dengan buah maqui-beri (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) yang berasal dari famili yang sama dengan jenitri yaitu Elaeocarpaceae, dengan kandungan antosianin sebesar 211,9 ± 0,6 mg/100 g berat kering (Escribano-Bailón *dkk.*, 2006). Perbedaan kandungan antosianin total kulit buah jenitri dan buah maqui-beri dapat diperkirakan dari warna kulit buah secara visual. Kulit buah maqui-beri berwarna biru keunguan dengan intensitas yang lebih kuat (lebih gelap) dibandingkan kulit buah jenitri yang memiliki warna biru cerah.

Tabel 2. Hasil uji antosianin-betasianin dari kulit buah jenitri

No.	Perlakuan	Karakteristik Antosianin	Hasil Uji
1.	Dipanaskan dengan HCl 2 M selama ± 5 menit pada 100°C	Warna merah tidak pudar	Warna merah tidak pudar
2.	Ditambahkan NaOH 2 M tetes demi tetes	Warna merah berubah menjadi hijau biru dan memudar perlahan – lahan	Warna hijau kebiruan
3.	Kromatografi dengan pengembang HCl 1%	R _f rendah	R _f = 0,07
4.	Kromatografi dengan BAA	R _f sedang (10 – 40)	R _f = 0,25
5.	Spektrum tampak	λ maksimum 505 -535 nm	λ maks = 525 nm

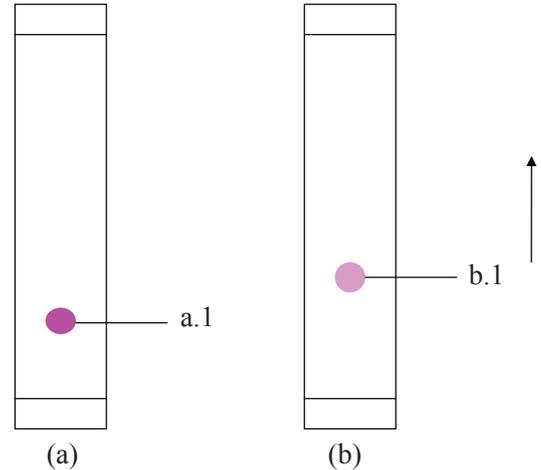
Identifikasi Antosianidin

Identifikasi Antosianidin dengan KLT. Jenis antosianin sangat banyak, lebih dari 200 jenis, karena variasi jenis dan posisi gula serta gugus asam organik yang terikat, namun jumlah senyawa standar antosianin murni yang tersedia terbatas. Oleh karena itu sangat sulit untuk mendapatkan senyawa standar bagi setiap jenis antosianin dalam sampel. Hal ini merupakan salah satu kendala dalam identifikasi antosianin. Oleh sebab itu, untuk mendekati hal tersebut, maka dilakukan identifikasi jenis antosianidin terlebih dahulu.

Kromatogram ekstrak antosianidin kulit buah jenitri dapat dilihat pada Gambar 1. (a) menunjukkan adanya satu spot (a.1) dengan warna merah ungu dan nilai $R_f = 0,22$, yang sesuai dengan ciri-ciri sianidin (Sherma and Zweig, 1971); sedang Gambar 1 (b) menunjukkan adanya satu spot dengan warna merah ungu yang lebih muda dibandingkan warna spot a.1. dengan nilai $R_f = 0,35$. Berdasarkan warna, spot tersebut sesuai dengan sianidin, namun berdasarkan nilai R_f spot tersebut lebih sesuai dengan delfinidin.

Identifikasi Antosianidin dengan Spektrofotometri. Identifikasi dengan spektrofotometri dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang maksimum dari setiap spot yang terpisah, karena nilai itu khas untuk setiap jenis antosianidin. Penambahan $AlCl_3$ dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya pergeseran batokromik, yang menandakan ada atau tidaknya gugus orthohidroksi. Antosianidin yang memiliki gugus orto-hidroksi seperti delfinidin, sianidin, dan petunidin akan bereaksi positif dengan $AlCl_3$, yang ditandai dengan terbentuknya kelat berwarna biru yang menimbulkan pergeseran absorbansi maksimum ke arah panjang gelombang yang lebih besar (Gross, 1987).

Rangkuman hasil identifikasi dengan KLT dan dengan spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 3. Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa baik spot a.1 maupun b.1 mengalami pergeseran batokromik; berdasarkan spektrum absorpsinya,



Gambar 1. Profil kromatogram antosianidin kulit buah jenitri

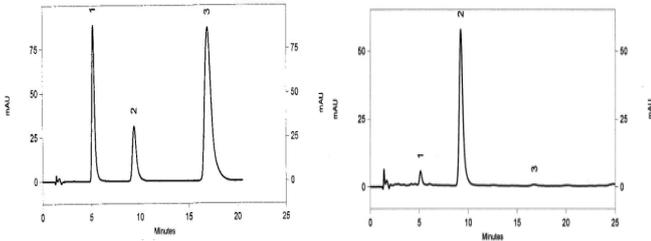
Keterangan : (a) pengembang format (asam format-HCl pekat- H_2O 5 : 2 : 3), (b) pengembang forestal (asam asetat-HCl pekat- H_2O 30 : 3 : 10), spot a.1 : R_f 0,22 ; spot b.1 : R_f 0,35.

kedua spot dengan pengembang format maupun forestal adalah sianidin. Sianidin berwarna merah ungu dengan λ maksimum 535 nm, sedangkan delfinidin berwarna ungu dengan λ maksimum 546 nm (Harborne, 1996). Namun, bila ditinjau dari nilai R_f nya, spot dari pengembang forestal menunjukkan delfinidin (R_f sianidin dengan pengembang forestal = 0,49). Untuk memastikan hal tersebut, dilakukan identifikasi dengan KCKT yang lebih sensitif untuk mendeteksi jenis antosianidin dalam sampel.

Identifikasi Antosianidin dengan KCKT. Kromatogram KCKT dapat dilihat pada Gambar 2, yang menunjukkan bahwa pada sampel kulit buah jenitri (b) terlihat ada satu puncak dominan (puncak 2) yang terdeteksi sebagai sianidin, dan dua puncak lain yang terdeteksi sebagai delfinidin (puncak 1) dan pelargonidin (puncak 3, dapat dikatakan tidak terdeteksi).

Tabel 3. Rangkuman hasil identifikasi ekstrak antosianidin kulit buah jenitri

Pelarut	Spot	Rf	Warna		λ maksimum (nm)		Pergeseran batokromik (nm)	Pendugaan
			Visual	UV 254 nm	Sebelum + $AlCl_3$	Setelah + $AlCl_3$		
Format	a.1	0,22	merah ungu	ungu	536	556	+ 20	sianidin
Forestal	b.1	0,35	merah ungu	ungu	535	554	+ 19	sianidin/ delfinidin



Gambar 2. Profil kromatogram : (a) antosianidin murni (b) antosianidin kulit buah jenitri. Fase diam : E urosphere RP C-18, 5 µm. 150 x 4,6 mm. Fase gerak : 10 % asam format (dalam air) : asetonitril (85 : 15 v/v). Kecepatan alir : 1,2 mL/menit. Volume injeksi : 20 µL. Dideteksi pada 530 nm.

Keterangan : (a) Puncak 1 : delfinidin (tr = 5,167 menit), puncak 2 : sianidin (tr = 9,383 menit), puncak 3 : pelargonidin (tr = 16,9 menit) ; (b) Puncak 1 : delfinidin (tr = 5,117 menit), puncak 2 : sianidin (tr = 9,233 menit), puncak 3 : pelargonidin (tr = 16,75 menit).

Dari hasil pemisahan dengan KCKT ini diketahui ternyata kulit buah jenitri mempunyai satu antosianidin yang dominan, yaitu sianidin dan satu yang lain yang kurang dominan, yaitu delfinidin; sedang pelargonidin berada dalam konsentrasi yang sangat kecil sehingga dapat dikatakan tidak terdeteksi. Spot yang nampak pada KLT baik pada a.1 maupun b.1 kemungkinan besar adalah sianidin, bahwa dalam b.1 nilai Rfnya kurang sesuai (lebih rendah dari seharusnya, dan agak mendekati delfinidin) mungkin disebabkan karena campuran pelarut yang kurang sesuai atau karena faktor-faktor lain. Dalam hal ini penggunaan KCKT sangat bermanfaat karena dapat mendeteksi senyawa dengan lebih teliti, yang menunjukkan bahwa dalam sampel memang terdapat dua jenis antosianidin, yaitu sianidin yang lebih dominan dan delfinidin yang konsentrasinya lebih kecil. sehingga tidak nampak pada KLT. Pada KLT hanya nampak satu spot untuk masing-masing larutan pengembang.

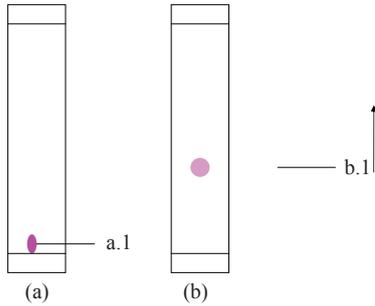
Jenis antosianidin yang ditemukan pada kulit buah jenitri ini sama dengan jenis antosianidin pada buah maqui-beri, yaitu tumbuhan dari suku yang sama dengan jenitri, yang juga mengandung antosianidin jenis sianidin dan delfinidin (Escrribano-Bailón dkk., 2006). Kesamaan tersebut terlihat juga secara visual, dimana warna kulit buah jenitri hampir sama dengan kulit buah maqui-beri, yaitu biru keunguan tetapi warna biru pada kulit buah maqui-beri lebih tua (intensitas warna birunya lebih kuat). Perbedaan intensitas warna biru pada kedua buah tersebut kemungkinan dikarenakan perbedaan jenis antosianidin yang dominan, dimana pada buah maqui-beri didominasi oleh delfinidin sedangkan pada kulit buah jenitri didominasi oleh sianidin. Warna pigmen antosianidin salah satunya dipengaruhi oleh pola substitusi gugus hidroksil (-OH). Peningkatan jumlah gugus hidroksil menyebabkan peningkatan intensitas warna biru (Delgado-Vargas and Paredes-López, 2003). Delfinidin memiliki tiga gugus hidroksil pada cincin B, sedangkan sianidin hanya memiliki dua gugus hidroksil pada cincin B, sehingga delfinidin cenderung memiliki warna biru yang lebih kuat dibandingkan sianidin. Hal ini dapat menjelaskan mengapa warna biru pada kulit buah maqui-beri memiliki intensitas yang lebih kuat.

Hasil identifikasi yang menunjukkan bahwa sianidin merupakan antosianidin yang dominan pada kulit buah jenitri, kurang sesuai dengan dugaan semula bahwa antosianidin yang dominan adalah delfinidin. Dugaan ini muncul karena warna kulit buah jenitri yang tampak jelas dari bagian luar adalah biru. Walaupun demikian, menurut Lee (1998), munculnya warna biru pada kulit buah jenitri sebenarnya lebih disebabkan karena pembentukan struktur iridosom yang dihasilkan oleh sel-sel epidermal dan terletak di bagian terluar dari dinding sel epidermis. Mekanisme pembentukan warna biru ini lebih dominan dibandingkan mekanisme pigmentasi antosianidin yang juga berperan terhadap timbulnya warna biru (Tomás-Barberán and Robins, 1997). Seiring dengan tahap pemasakan buah (*ripening*), sitoplasma membentuk struktur seperti prisma yang dapat merefleksikan sinar biru sehingga menimbulkan kenampakan warna biru pada kulit buah. Oleh karena itu, warna biru dari kulit buah jenitri tidak larut ke dalam pelarut antosianin, sehingga tidak menghasilkan larutan berwarna biru (Burchill and Hall, 2007). Hal tersebut memang ditemui pada proses ekstraksi kulit buah jenitri dalam penelitian ini, dimana warna biru tidak luntur walaupun telah diekstraksi hingga beberapa kali, sebaliknya yang terekstrak adalah senyawa berwarna merah, yang terletak pada lapisan dalam kulit buah jenitri, yaitu sianidin.

Hasil identifikasi antosianidin kulit buah jenitri dengan KCKT ini sesuai dengan kandungan antosianidin black-currant (*Ribes nigrum*), yaitu delfinidin dan sianidin, sedang pada buah stroberi (*Fragaria ananassa*) ditemukan sianidin dan pelargonidin (Nyman and Kumpulainen, 2001). Kandungan antosianidin pada buah duwet (*Syzygium cumini*) dengan KCKT adalah delfinidin, sianidin, dan pelargonidin (Lestario, 2006), namun pada penelitian lain ditemukan antosianidin pada buah duwet adalah delfinidin, sianidin, petunidin, peonidin, dan malvidin (Sari dkk., 2009).

Identifikasi Antosianin dalam Kulit Buah Jenitri

Identifikasi Antosianin dengan KLT. Kromatogram ekstrak antosianin kulit buah jenitri dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Profil kromatogram antosianin kulit buah jenitri

Keterangan : (a) HCl 1 % (H₂O : HCl pekat = 97 : 3);
 (b) BAA (*n*-butanol : asam asetat : H₂O = 4 : 1 : 5, lapisan atas),
 spot a.1 : Rf 0,03 ; spot b.1 : Rf 0,37.

Pada Gambar 3 a. terlihat bahwa dengan pelarut HCl 1% hanya muncul satu spot (spot a.1), dengan warna merah ungu dan Rf = 0,03. Berdasarkan nilai Rf, spot tersebut sesuai dengan delfinidin-3-glikosida. Pada Gambar 3 b, terlihat bahwa dengan pelarut BAA hanya muncul satu spot (spot b.1), dengan warna merah ungu dan Rf = 0,37. Berdasarkan nilai Rf, spot tersebut sesuai dengan sianidin-3-rhamnoglukosida atau disebut juga sebagai sianidin-3-rutinosida.

Identifikasi Antosianin dengan Spektrofotometri.

Data-data hasil identifikasi berdasarkan warna spot, nilai Rf, panjang gelombang maksimum, dan serapan pada λ=440 nm dari spot a.1 dan b.1 yang diperoleh dari pemisahan dengan KLT preparatif dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rangkuman hasil identifikasi ekstrak antosianin kulit buah jenitri

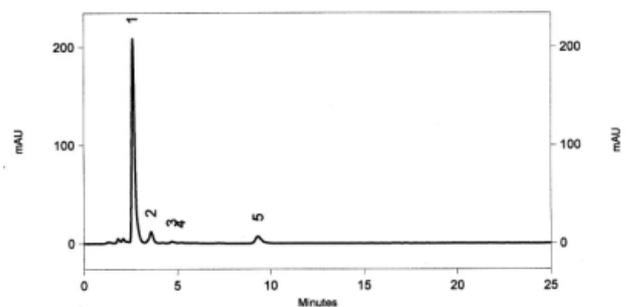
Pelarut	Spot	Rf	Warna		λ maksimum (nm)	A _{440m} / A _{λ maks} (%)	Pendugaan
			Visual	UV 254 nm			
HCl 1%	a.1	0,03	merah ungu	ungu muda	527	46,53	delfinidin-3-rutinosida/ delfinidin-3-glikosida
BAA	b.1	0,37	merah ungu	ungu muda	529	33,33	sianidin-3-rutinosida

Pada Tabel 4, spot a.1 dengan panjang gelombang maksimum 527 nm dan rasio A₄₄₀/A_{λ maks} 46,53 % diduga merupakan delfinidin-3-rutinosida. Persentase rasio A₄₄₀/A_{λ maks} yang relatif tinggi menunjukkan pola glikosilasi antosianin di posisi 3 (3-glikosida) (Rodriguez-Saona *dkk.*, 1998). Namun, berdasarkan nilai Rf, spot a.1 merupakan delfinidin 3-glikosida. Ada kemungkinan keduanya memang ada dalam sampel, satu jenis antosianidin dapat berikatan dengan beberapa gula yang berbeda jenis ataupun posisi ikatan glikosidanya sehingga jumlah antosianin yang terdapat dalam sampel bisa lebih banyak dibandingkan jumlah antosianidannya. Mengacu pada hasil KCKT antosianidin, delfinidin memang terdapat pada sampel.

Sementara itu, hasil identifikasi dari spot b.1 menunjukkan kesesuaian antara nilai Rf dan spektrum absorpsi, dimana spot tersebut diduga kuat merupakan sianidin-3-rutinosida.

Identifikasi Antosianin dengan KCKT. Identifikasi antosianin juga dilakukan dengan metode KCKT. Profil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 4. Pada profil kromatogram antosianin kulit buah jenitri, terlihat ada lima puncak yang terdeteksi dengan satu puncak yang dominan yaitu puncak (1), yang diduga merupakan sianidin-3-rutinosida, meng-

ingat bahwa sianidin merupakan antosianidin yang dominan pada KCKT antosianidin; sedangkan puncak-puncak lainnya tidak dapat diduga secara pasti, karena tidak tersedia standar antosianin murni.



Gambar 4. Profil kromatogram antosianin kulit buah jenitri. Fase diam : Eurosphere RP C-18, 5 μm. 150 x 4,6 mm. Fase gerak : 10 % asam format (dalam air) : asetoni-tril (85 : 15 v/v). Kecepatan alir : 1,2 mL/menit. Volume injeksi : 20 μL. Dideteksi pada 530 nm.

Keterangan : Puncak 1 (tr : 2,633 menit), puncak 2 (tr : 3,583 menit), puncak 3 (tr : 4,7 menit), puncak 4 (tr : 5,133 menit), puncak 5 (tr : 9,317 menit).

Puncak no. 3 dan no. 4 sebenarnya berada pada konsentrasi yang sangat kecil, sehingga mungkin dapat diabaikan.

kan, sedangkan puncak 2 dan 5 bila memperhatikan data-data hasil identifikasi sebelumnya kemungkinan adalah antosianin dari delphinidin (delphinidin-3-rutinosida dan delphinidin-3-glikosida, mengacu pada Tabel 4, karena delphinidin terdeteksi pada KCKT antosianidin.

Jenis antosianin yang ditemukan pada kulit buah jenitri berbeda dengan jenis antosianin dari buah maqui-beri. Jenis antosianin dari buah maqui-beri adalah delphinidin dan sianidin dengan ikatan gula 3-glukosida, 3,5-diglukosida, 3-sambubiosida dan 3-sambubiosida-5-glukosida (Escribano-Bailón *dkk.*, 2006). Perbedaan jenis antosianin dari kulit buah jenitri dan buah maqui-beri terletak pada jenis substitusi gula. Jenis gula pada antosianin buah maqui beri adalah sambubiosa dan glukosa, sedangkan jenis gula pada antosianin kulit buah jenitri adalah rutinosa. Hal ini membuktikan bahwa sebaran atau distribusi antosianin di alam sangat luas, tergantung pada jenis antosianidin serta jenis, jumlah, dan posisi molekul gula yang terikat (Delgado-Vargas and Paredes-López, 2003).

Antosianin pada kulit buah jenitri ini mirip dengan yang ditemukan pada black-currant (*Ribes nigrum* L), yaitu delphinidin 3-rutinosida, sianidin 3-rutinosida, delphinidin 3-galaktosida, dan sianidin 3-galaktosida (Degenhardt, *dkk.*, 2000), sedang pada black-berry antosianin yang ditemukan semuanya berasal dari sianidin, yaitu sianidin 3-glukosida, sianidin 3-rutinosida, sianidin 3-xylosida, sianidin 3-malonilglukosida, dan sianidin 3-dioksalil-glukosida (Fan-Chiang and Wrolstad, 2005). Antosianin pada buah duwet (*Syzygium cumini*) adalah delphinidin 3,5-diglukosida, sianidin 3,5-diglukosida, petunidin 3,5-diglukosida, peonidin 3,5-diglukosida, dan malvidin 3,5-diglukosida (Sari *dkk.*, 2009)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa kandungan antosianin total dari kulit buah jenitri adalah sebesar $23,87 \pm 4,11$ mg/100 g berat kering. Kulit buah jenitri mengandung antosianin yang diduga merupakan sianidin-3-rutinosida sebagai jenis antosianin yang paling dominan, serta dua jenis lainnya yang kurang dominan, yaitu delphinidin-3-rutinosida dan delphinidin-3-glikosida.

Diperlukan usaha-usaha untuk menemukan metode ekstraksi termasuk kombinasi pelarut yang tepat serta aman, sehingga dapat mengekstrak senyawa antosianin dari kulit buah jenitri dengan lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

Burchill, S. dan Hall, J. (2007). Fruit of the month : *Elaeocarpus angustifolius*. <http://www.treat.net.au/publications/WnsOct2001.html>. [16 Agustus 2009].

- Degenhardt, A., Knapp, H. dan Winterhalter, P. (2000). Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 338 – 343.
- Delgado-Vargas, F., dan Paredes-López, O. (2003). *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. CRC Press, Washington, DC.
- Escribano-Bailón, M.T., Alcalde-Eon, C., Muñoz, O., Rivas-Gonzalo, J.C. dan Santos-Buelga, C. (2006). Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochemical Analysis* **17** : 8-14.
- Fan-Chiang, H. dan Wrolstad, R.E. (2005). Anthocyanin pigment composition of blackberries. *J. Food Science* **70** : 198 – 202.
- Francis, F.J. (1982). Analysis of anthocyanins. Dalam : Markakis, P. (ed.). *Anthocyanin as Food Color*. hal 181-207. Series Food Science and Technology, Academic Press, New York.
- Giusti, M.M. dan Wrolstad, R.E. (1996). Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food. Sci.* **61** : 322-326.
- Gross, J. (1987). *Pigments in Fruits*. Academic Press, London.
- Harborne, J.B. (1996). *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Terjemahan : Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro). ITB, Bandung.
- Lee, D. W. (1998). The biology of Rudraksha. *Journal Current Science* **75** : 26-30.
- Lestario, L.N., Raharjo, S., Suparmo, Hastuti, P. dan Tranggono (2004). Fractionation and identification of Java plum (*Syzygium cumini*) fruit extract. *Indonesian Food and Nutrition Progress* **11** : 41-47.
- Lestario, L.N. (2006). Potensi buah duwet (*Syzygium cumini*) sebagai sumber antioksidan alami. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Nyman, N.A. dan Kumpulainen, J.T. (2001). Determination of anthocyanidins in berries and red wine by High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **49** : 4183-4188.
- Ozela, E.F., Stringheta, P.C. dan Milton, C.C. (2007). Stability of anthocyanin in spinach vine (*Basella rubra*) fruits. *Cien. Inv. Agr.* **34** : 115-120.
- Pazmiño-Durán, E.A., Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. dan Gloria, M.B.A. (2001). Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. *J. Food Chem.* **75**: 211-216.
- Rodriguez-Saona, L.E., Giusti, M.M. dan Wrolstad, R.E. (1998). Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *J. Food Sci.* **63** : 458-465.

Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D., dan Supratman, U. (2009). Identifikasi Antosianin Buah Duwet (*Syzygium cumini*) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Diode Array Detection. *J. Teknol. dan Industri Pangan*. Vol. **XX** : 102-108.

Sherma, J. dan Zweig, G. (1971). *Paper Chromatography*. Academic Press, New York.

Tomás-Barberán, F.A. dan Robins, R.J. (1997). *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford University Press, London.

Wrolstad, R.E., Durst, R.W. dan Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin product. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 423–428.