

TOTAL ANTOSIANIN EKSTRAK BUAH SALAM DAN KORELASINYA DENGAN KAPASITAS ANTI PEROKSIDASI PADA SISTEM LINOELAT

Setyaningrum Ariviani
Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan UNS
Korespondensi : Jl. Ir.Sutami No 36A, Kentingan, Surakarta

ABSTRACT

*Dark red colored salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp) fruits was expected contain of anthocyanin compounds. Previous research results have shown that anthocyanins from edible fruits were effective antioxidants. Antioxidative properties of anthocyanins arise from their high reactivity as hydrogen or electron donors, and from the ability of the polyphenol-derived radicals to stabilize and delocalize the unpaired electron, and from their ability to chelate transition metal ion. This research aims to determine total anthocyanin content of salam fruits extracted with different solvent proportion and their correlation to the anti peroxidation capacity on linoleic system. Results of this research indicated total anthocyanin content of salam fruits extract increased along to solvent proportion raised. The anti peroxidation capacity showed no correlation with the total anthocyanin content ($R\ 0.283$, $P\ 0.644$)*

Keywords: salam fruits, extract, anthocyanin, anti radical capacity

PENDAHULUAN

Antosianin telah banyak digunakan sebagai pewarna, khususnya minuman, karena banyak pewarna sintetis diketahui bersifat toksik dan karsinogenik (Francis, 1999). Menurut Clifford *et al.* (2000), JEFCA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) telah menyatakan bahwa ekstrak yang mengandung antosianin efek toksisitasnya rendah.

Selain berperan sebagai pewarna makanan, antosianin juga dipercaya berperan dalam sistem biologis, termasuk kemampuan sebagai pengikat radikal bebas (*free radical scavenging*), *cardio protective capacity* dan kemampuan untuk mengambat tahap inisiasi reaksi kimiawi yang menyebabkan karsinogenesis (Smith *et al.*, 2000).

Antosianin dipercaya dapat memberikan manfaat bagi kesehatan manusia. Antosianin ini diketahui dapat diabsorpsi dalam bentuk molekul utuh dalam lambung (Passamonti *et al.*, 2003), meskipun absorbsinya jauh dibawah 1%, antosianin setelah ditransport ke tempat yang memiliki aktivitas metabolik tinggi memperlihatkan aktivitas sistemik seperti antineoplastik, antikarsinogenik, antiatherogenik, antiviral, dan efek anti-inflammatory, menurunkan

permeabilitas dan fragilitas kapiler dan penghambatan agregasi platelet serta immunitas, semua aktivitas ini didasarkan pada peranannya sebagai antioksidan (Clifford *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2000). Antosianin yang tidak terabsorpsi memberikan perlindungan terhadap kanker kolon (Halliwell *et al.*, 2000).

Antosianin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Umumnya senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan primer, chelator dan scavenger terhadap superoksida anion. Antosianin dalam bentuk aglikon lebih aktif daripada bentuk glikosidanya (Santoso, 2006). Kemampuan antioksidatif antosianin timbul dari reaktifitasnya yang tinggi sebagai pendonor hidrogen atau elektron, dan kemampuan radikal turunan polifenol untuk menstabilkan dan mendelokalisasi elektron tidak berpasangan, serta kemampuannya mengkhelat ion logam (terminasi reaksi Fenton) (Rice-Evans *et al.*, 1997). Aktivitas antioksidan antosianin dipengaruhi oleh sistem yang digunakan sebagai substrat dan kondisi yang dipergunakan untuk mengkatalisis reaksi oksidasi (Pokorny *et al.*, 2001).

Antosianin banyak ditemukan pada pangan nabati yang berwarna merah, ungu, merah gelap seperti pada beberapa buah, sayur, maupun umbi. Beberapa sumber antosianin telah dilaporkan seperti buah mulberry, blueberry, cherry, blackberry, rosela, kulit dan sari buah anggur, strawberry, lobak merah dan *java plum* (jawa: duwet) (Timberlake and Bridle, 1982; Pokorny *et al.*, 2001; Ayed and Al-Tamimi, 2007, Lestario *et al.*, 2005), namun masih sangat sedikit penelitian tentang sumber antosianin dari bahan lokal.

Beberapa dekade yang lalu anak-anak didaerah bantul mengkonsumsi buah salam tanpa menimbulkan dampak keracunan. Buah salam merupakan buah buni, bulat, berdiameter 8-9 mm, buah muda berwarna hijau, setelah masak menjadi merah gelap. Salam ditanam untuk diambil daunnya sebagai pelengkap bumbu dapur, sedangkan kulit batang, akar dan buah juga berkhasiat sebagai obat (Dalimartha, 2006). Buah salam masak berwarna ungu kehitaman, hal ini diduga karena adanya senyawa antosianin.

Ekstraksi antosianin dapat dilakukan dengan beberapa jenis solven, seperti air, etanol, metanol, tetapi yang paling efektif adalah dengan menggunakan metanol yang diasamkan dengan HCl. Tetapi karena sifat toksik dari metanol biasanya dalam sistem pangan digunakan air atau etanol yang diasamkan dengan HCl (Francis, 1982; Yu Gao and Cahoon, 1998).

Turker dan Erdogdu (2006) menyatakan bahwa suhu dan pH berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi antosianin dan koefisien difusinya, semakin rendah pH maka koefisien distribusi semakin tinggi, demikian juga semakin tinggi temperaturnya. Tetapi antosianin merupakan senyawa fenolik yang labil dan mudah rusak akibat pemanasan, sehingga berakibat pada penurunan bioaktivitasnya. Menurut Revilla (1998) pengaruh suhu menjadi tidak signifikan dengan penambahan HCl pada pelarut yang digunakan untuk ekstraksi, karena pengaruh HCl lebih besar daripada pengaruh suhu. Penggunaan HCl 1% dalam ekstraksi antosianin akan menyebabkan hidrasi sebagian hingga total antosianin yang terasetilasi sehingga akan mempengaruhi absorpsinya dalam tubuh.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar total antosianin ekstrak buah salam yang diekstrak dengan menggunakan air yang diasamkan dengan 1% HCl pada berbagai proporsi pelarut. Ekstrak yang dihasilkan ditentukan potensinya dalam menghambat peroksidasi sistem linoleat dan korelasinya dengan kadar total antosianinnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan adalah buah salam masak dengan warna merah gelap, buah salam diperoleh dari lahan salam di wilayah Gamping, Sleman Yogyakarta. Bahan kimia yang digunakan meliputi: asam linoleat, dan BHT masing-masing produksi Sigma, HCl p.a, etanol p.a dan ammonium thiocyanat produksi Merck.

Peralatan yang digunakan meliputi: Spektrofotometer Shimadzu Uv-Vis, vacuum filter Miliphore, rotary evaporator Buchi, peralatan gelas, kertas saring dan oven Memmert.

Metode

Persiapan sampel

Sampel buah salam dipisahkan daging buah dan isinya dengan cara diremas-remas hingga lumat, kemudian dilewatkan melalui ayakan aluminium untuk memisahkan daging buah. Rendemen daging buah 54,5% b/b. Sampel kering dipersiapkan dengan cara mengeringkan daging buah salam menggunakan freeze drier, dihaluskan dengan blender kering hingga dihasilkan bubuk kering lolos ayakan 30 mesh.

Ekstraksi buah salam

Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut air yang diasamkan dengan penambahan 1% HCl pada proporsi sampel : pelarut (1:1), (1:3) dan (1:5) b/v untuk buah salam basah, untuk sampel kering dengan proporsi (1:3) dan (1:5) b/v. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan menggunakan vacuum filter, dikentalkan menggunakan vacuum evaporator pada suhu 60°C hingga berbentuk pasta. Selanjutnya ekstrak dilarutkan (konsentrasi 10% b/v) dalam etanol 75%. Larutan ekstrak kemudian disimpan dalam botol gelap dan dihembus dengan nitrogen untuk mengusir oksigen dalam head space, botol ditutup dan disimpan dalam

coolroom suhu 4⁰C sampai digunakan untuk analisis.

Analisis kimia

Analisa kimia yang dilakukan meliputi analisis kadar total antosianin ekstrak buah salam dengan teknik spektrofotometri (Lees and Francis, 1972), kapasitas anti peroksidasi dalam sistem linoleat (Ohtsuki et al., 2003).

Analisis data

Data dianalisis menggunakan ANOVA dan untuk menguji perbedaan antar perlakuan dilakukan uji DMRT. Korelasi diuji dengan menggunakan bivariate corellation.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Antosianin Daging Buah Salam

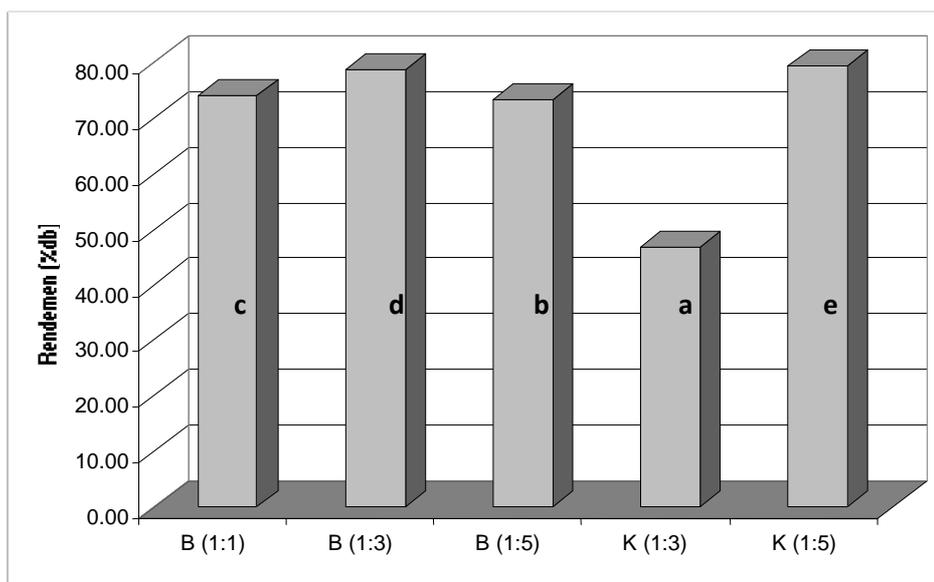
Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi antosianin buah salam dalam penelitian ini adalah air yang diasamkan dengan penambahan 1% HCl. Tujuan penambahan HCl adalah untuk memberikan suasana asam karena antosianin bersifat lebih stabil pada pH asam (Markakis 1982). Selain itu kemampuan mendonorkan hidrogen (*hydrogen-donating activity*) dari antosianin meningkat pada kondisi yang semakin asam (Pokorny et al. 2001). Turker dan Erdogdu (2006) menyatakan pH berpengaruh terhadap

efisiensi ekstraksi antosianin dan koefisien difusinya, semakin rendah pH maka koefisien distribusi semakin tinggi. Penggunaan HCl 1% dalam ekstraksi antosianin akan menyebabkan hidrasi sebagian hingga total antosianin yang terasetilasi sehingga akan mempengaruhi absorbsinya dalam tubuh (Revilla 1998)

Rendemen ekstrak buah salam dengan berbagai teknik ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan Gambar 1 tersebut diketahui bahwa teknik ekstraksi berpengaruh terhadap rendemen ekstrak yang dihasilkan. Rendemen yang paling tinggi diperoleh dari ekstraksi buah kering (K) dengan perbandingan sampel : pelarut 1: 5, yaitu mencapai 79.58%. Urutan dari rendemen tertinggi adalah sebagai berikut 1: 5 K > 1 : 3 B > 1 : 1 B > 1: 5 B > 1: 3 K.

Kadar Antosianin Ekstrak

Kadar antosianin ekstrak buah salam ditentukan dalam sistem pelarut etanol. Metode yang digunakan adalah metode Lees and Francis (1972) yang prinsipnya adalah mengukur absorbansi warna ungu dari antosianin dalam sistem pelarut etanol pada panjang gelombang 535 nm. Kadar total antosianin sebanding dengan absorbansinya.

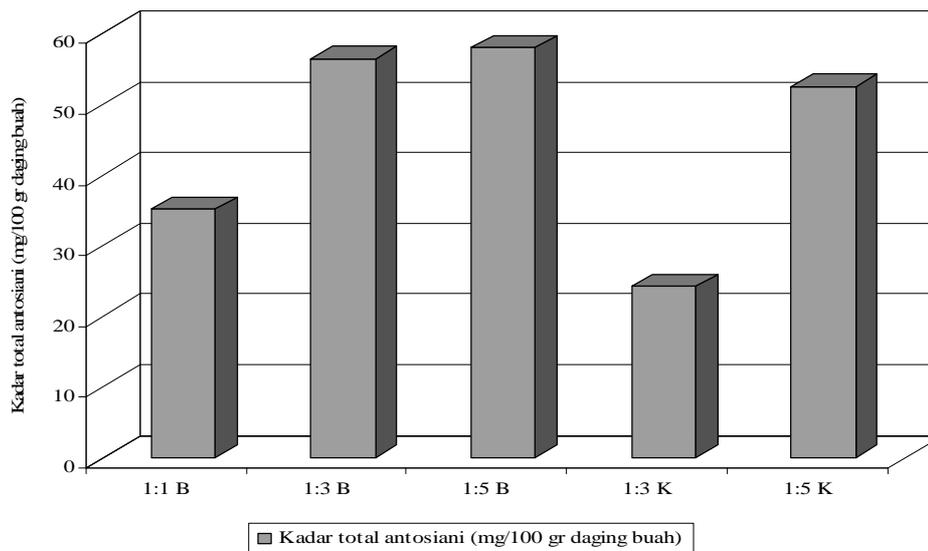


Gambar 1. Rendemen ekstrak buah salam (%db) pada sampel buah basah (B) maupun buah kering (K) dengan berbagai proporsi pelarut. Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada α 0.05

Tabel 1. Pengaruh Perbandingan Pelarut dan Jenis Sampel terhadap Kadar Total Antosianin Ekstrak

Sampel	Kadar antosianin total (mg/gr ekstrak) pada berbagai proporsi pelarut		
	1:1	1:3	1:5
Basah	2.37 ^a	3.59 ^{Bb}	3.95 ^{Bc}
Kering		2.59 ^{Aa}	3.30 ^{Ab}

Ket : Huruf besar dibandingkan pada kolom yang sama, huruf kecil pada baris yang sama. Huruf yang sama menyatakan tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan. Analisa statistik untuk sampel basah dilakukan dengan menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan Uji DMRT pada $\alpha = 0,05$, sedangkan untuk sampel kering dilakukan dengan menggunakan Independent Sample t-Test pada $\alpha = 0,05$.



Gambar 2. Kadar antosianin ekstrak buah salam (mg/100gr daging buah basah) yang dihasilkan dengan berbagai teknik ekstraksi. Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$

Berdasarkan analisis data yang dilakukan diketahui bahwa perbandingan pelarut dan jenis sampel berpengaruh terhadap kadar total antosianin ekstrak yang dihasilkan. Pengaruh pelarut dan jenis sampel terhadap kadar total antosianin dapat dilihat dalam Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1 tersebut diketahui bahwa pada sampel basah dan sampel kering, kadar antosianin terbesar diperoleh dengan ekstraksi menggunakan perbandingan sampel : pelarut 1: 5 (b/b). Jika dibandingkan antara sampel basah dan sampel kering maka ekstraksi dengan sampel buah basah memiliki kadar total antosianin yang lebih tinggi pada proporsi pelarut yang sama.

Kadar total antosianin (mg/gr daging buah basah) ekstrak buah salam dengan berbagai teknik ekstraksi dapat dilihat dalam Gambar 2. Gambar 2 memberikan informasi bahwa teknik ekstraksi berpengaruh terhadap

kadar antosianin ekstrak yang dihasilkan. Teknik ekstraksi yang menghasilkan ekstrak dengan kadar antosianin tertinggi adalah ekstraksi dengan menggunakan sampel buah basah dengan perbandingan pelarut 1:5 yaitu mencapai 58mg/ 100gr daging buah salam

Kapasitas Anti Peroksidasi Sistem Linoleat dengan Metode Ferry Thiocyanate (FTC) (Ohtsuki *et. al.*, 2003).

Prinsip penentuan kapasitas anti peroksidasi dengan metode FTC ini adalah peroksida akan mengakibatkan ferro teroksidasi menjadi ferry yang dengan thiocyanate akan membentuk kompleks berwarna merah. Intensitas warna merah sebanding dengan kadar peroksidanya dan dapat diukur dengan menentukan absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Adanya aktivitas anti peroksidasi akan menghambat pembentukan kompleks berwarna

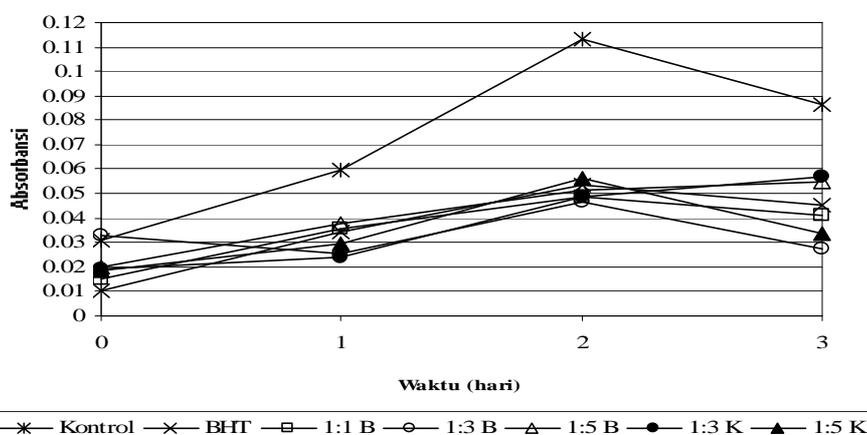
merah, sehingga intensitas warnanya lebih kecil (Pokorny, 2001). Kapasitas anti peroksidasi ditentukan dengan membandingkan penghambatan pembentukan kompleks berwarna merah oleh sampel dengan penghambatan oleh BHT 200 ppm.

Pola penghambatan pembentukan peroksida ekstrak buah salam, kontrol dan standar BHT 200 ppm pada Gambar 3. Gambar tersebut menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan peroksidasi 1% b/v ekstrak buah salam lebih tinggi dibandingkan BHT 200 ppm.

Pengaruh perbandingan pelarut dan jenis sampel terhadap aktivitas penghambatan peroksidasi ekstrak yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa baik jenis sampel maupun proporsi pelarut berpengaruh terhadap aktivitas anti peroksidasi ekstrak buah salam. Ekstrak daging buah kering menunjukkan aktivitas anti peroksidasi yang lebih kecil dibanding ekstrak dari daging buah basah.

Hasil ini sejalan dengan kadar total antosianinnya (Tabel 2).

Teknik ekstraksi dengan proporsi sampel : pelarut (1:3) b/v memperlihatkan aktivitas anti peroksidasi sistem linoleat yang lebih tinggi dibanding proporsi pelarut yang lain baik pada sampel daging buah basah maupun sampel buah kering. Berdasarkan analisis korelasi yang dilakukan diketahui bahwa kadar total antosianin ekstrak buah salam tidak memiliki korelasi terhadap kapasitas anti peroksidasinya (R 0.283, P 0.644). Hal ini dikarenakan pH suatu sistem sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan antosianin. Antosianin kurang efektif sebagai metal chelators pada kondisi pH rendah (asam). Tetapi kemampuan mendonorkan hidrogen (hydrogen-donating activity) dari antosianin meningkat pada kondisi yang semakin asam (Pokorny, 2001), dan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi ini adalah larutan HCL 1% yang tentu saja akan memberikan suasana asam pada ekstrak yang dihasilkan.



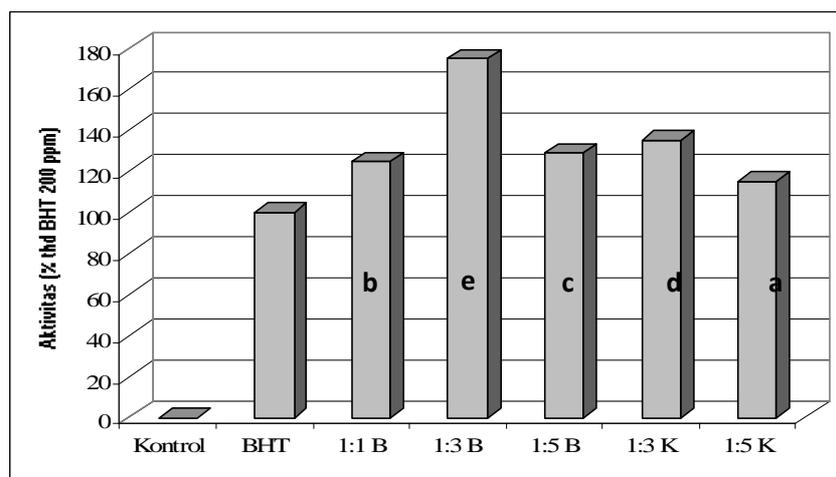
Gambar 3. Grafik absorbansi vs waktu pada pengujian penghambatan peroksidasi

Tabel 2. Pengaruh Perbandingan Pelarut terhadap Aktivitas Penghambatan Peroksidasi

Sampel	Daya antiradikal ekstrak (1% b/v) pada berbagai proporsi pelarut ^{*)}		
	1:1	1:3	1:5
Basah	124.62 ^a	174.62 ^{Bc}	128.83 ^{Bb}
Kering	-	135.08 ^{Aa}	114.92 ^{Ab}

Ket: Huruf besar dibandingkan pada kolom yang sama, huruf kecil pada baris yang sama. Huruf yang sama menyatakan tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan. Analisa statistik untuk sampel basah dilakukan dengan menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan Uji DMRT pada $\alpha = 0,05$, sedangkan untuk sampel kering dilakukan dengan menggunakan Independent Sample t-Test pada $\alpha = 0,05$.

^{*)} dinyatakan sebagai prosentase terhadap aktivitas BHT 200 ppm



Gambar 4. Aktivitas penghambatan pembentukan peroksida ekstrak buah salam terhadap aktivitas BHT 200ppm dengan berbagai teknik ekstraksi. Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 95%.

Berdasarkan Gambar 4 diketahui bahwa teknik ekstraksi berpengaruh terhadap kemampuan penghambatan peroksidasi ekstrak buah salam. Teknik ekstraksi menggunakan daging buah basah dengan perbandingan sampel : pelarut (1:3) b/v memperlihatkan aktivitas anti peroksidasi sistem linoleat tertinggi yaitu mencapai 1.7 kali aktivitas BHT 200 ppm, urutannya adalah sebagai berikut 1: 3 B > 1: 3 K > 1: 5 B > 1 : 1 B > 1 : 5 K.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa buah salam memiliki potensi sebagai sumber antosianin yang memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi terlihat dari kemampuannya sebagai anti peroksidasi pada sistem linoleat. Jenis sampel dan perbandingan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi berpengaruh terhadap kadar total antosianin dan kapasitas anti peroksidasi sistem linoleat ekstrak buah salam. Kapasitas anti peroksidasi ekstrak buah salam tidak memiliki korelasi dengan kadar total antosianinnya.

DAFTAR PUSTAKA

Ayed Amr and E. Al-Tamimi. 2007. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use

as food colourants. *International Journal of Food Science & Technology*. **42** (8). 985–991.

Clifford MN. 2000. Anthocyanins— nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**, 1063–1072.

Dalimartha S. 2006. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. www.pdpersi.co.id

Francis FJ. 1982. *Analysis of Anthocyanins dalam Anthocyanins as Food Colors*. New York : Academic Press inc.

Francis FJ. 1999. *Colorants*. Minnesota, USA. Eagan Press.

Halliwell B, K Zhao & M. Whiteman. 2000. The gastrointestinal tract: the major site of antioxidant action?. *Free Radical Research*. **33**. 819–830.

Kim HJ, F Chen, C Wu, X Wang, HY Chung, and Z Jin. 2004. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. *J. Agric Food Chem*. **Vol 52** p.2849-2854.

Lestario, L Ninan, S Raharjo, Suparmo, P Hastuti, Tranggono. 2005. Fractination and Identification of Java Plum Fruits (*Syzygium cumini*) Extract. *Kumpulan Makalah Seminar ASEAN Food Conference*.

Markakis P. 1982. *Stability of Anthocyanins in Foods dalam Anthocyanins as Food*

- Colors*. New York : Academic Press inc.
- Middleton E, C Kandaswami & TC Theoharides. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. **52**. 673–751.
- Passamonti S, U Vrhovsek, A Vanzo & F Mattivi. 2003. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*. **544**. 210–213.
- Pokorny JN, M Yanishlieva, Gordon. 2001. *Antioxidants in Food*. Boca Raton Boston New York Washington, DC: CRC Press.
- Revilla E. 1998. Comparison of Several Procedures Used for The Extraction of anthocyanin from Red Grape. *J. Agric Food Chem*.
- Rice-Evans C, NJ Miller & G Paganga. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. **2**. 152–159.
- Santoso U. 2006. *Antioksidan*. Yogyakarta. Yogyakarta: Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Smith M, K. Marley, D. Seigler, K. Singletary & B. Meline. 2000. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science*. **65**. 352–356
- Timberlake CF and P.Bridle. 1982. Distribution of Anthocyanins In Food Plants_dalam Anthocyanins as Food Colors. New York : Academic Press inc.
- Turker N dan F Erdogdu. 2006. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering*. **76**. 579–583
- Wrolstad RE. 2004. Anthocyanin Pigments—Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science* . **Vol. 69**. Nr. 5, C419 – C42
- Yu Gao and GA Cahoon. 1998. Cluster Thinning Effects on Fruit Weight, Juice Quality, and Fruit Skin Characteristics in 'Reliance' Grapes. *Fruit Crops: A Summary of Research*.