

Teknik Isolasi Antosianin Utama dari Ekstrak Buah *Ficus padana* Burm.f dengan KCKT Tipe Standar

Daimon Syukri, Djaswir Darwir, dan Adlis Santoni

ABSTRACT: Preparative High performance liquid chromatography (HPLC) today is one of the popular methods to isolate anthocyanin from extract containing anthocyanins. The working principle of preparative-HPLC can be applied to the laboratory standard type of HPLC, so it can be used also to isolate the main anthocyanin compounds from anthocyanin mixtures. The function of fraction collector on preparative HPLC equipment were replaced by opening the mobile phase line after the exit of the detector and hold out the solution manually on the standard type of HPLC. Resolution value between the peaks and the computation time when cuts in the chromatogram peak collection mobile phase containing the analyte is of concern in these activities. The appearance of a single peak in the chromatogram of the isolates showed that the technique can be applied for the simple and fast technique of anthocyanins isolation.

Key words: isolation, anthocyanin, *Ficus padana* Burm. f, Preparative-HPLC, standard type of HPLC.

ABSTRAK: Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)-preparatif saat ini merupakan salah satu metoda yang populer untuk mengisolasi antosianin dari suatu ekstrak yang mengandung antosianin. Prinsip kerja KCKT- preparatif dapat diaplikasikan pada KCKT tipe standar yang umum dipakai di laboratorium sehingga KCKT tipe standar dapat digunakan juga untuk mengisolasi senyawa antosianin utama dari campuran antosianin. Kerja dari perangkat *fraction collector* yang terdapat pada KCKT-preparatif dapat digantikan secara manual pada KCKT tipe standar dengan membuka saluran fase gerak setelah keluar dari detektor. Nilai resolusi antar puncak dan perhitungan waktu ketika pemotongan puncak kromatogram dalam pengumpulan fase gerak yang mengandung analit merupakan hal yang menjadi perhatian dalam kegiatan ini. Munculnya satu puncak tunggal pada kromatogram dari isolat yang didapat menunjukkan bahwa teknik kerja ini dapat diaplikasikan sebagai salah satu teknik isolasi yang sederhana dan cepat.

Jurusan Kimia, Fakultas MIPA,
Universitas Andalas, Padang

Kata kunci: isolasi, antosianin, *Ficus padana* Burm.f, KCKT-preparatif, KCKT tipe standar.

Korespondensi:

Daimon Syukri

Email : daimon_syukri@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Saat ini antosianin telah menjadi sumber yang penting bagi pewarna alami dalam produksi bahan pangan, kosmetik, dan farmasi yang dapat digunakan sebagai pengganti dari pewarna buatan (1).

Penelitian lainya juga menunjukkan bahwa antosianin memiliki banyak sifat yang menguntungkan bagi kesehatan seperti aktivitas antioksidan (2-6) dan antikanker (7). Hal ini juga menjadi alasan terhadap peningkatan penggunaan antosianin dalam produksi bahan pangan, kosmetik dan farmasi pada saat ini.

Buah *Ficus padana* Burm.f diduga mengandung antosianin karena warna dari biji dan daging buahnya yang bewarna merah. Kemungkinan adanya senyawa antosianin di dalam buah *Ficus padana* Burm.f juga diperkuat dengan hasil yang positif dari pengujian fitokimia terhadap kandungan flavonoid dari buah *Ficus padana* Burm.f tersebut. Berdasarkan data ini diharapkan buah *Ficus padana* Burm.f dapat digunakan sebagai alternatif sumber antosianin yang cukup potensial.

Isolasi dan identifikasi antosianin cukup sulit dilakukan yang diakibatkan oleh karena kemampuan antosianin tersebut untuk mengalami transformasi struktural. Selain itu, antosianin sulit untuk diukur secara independen dari flavonoid lain karena mereka memiliki karakteristik reaksi yang serupa (8).

Menurut Liu dkk (9), tahapan isolasi ekstrak antosianin dari bahan alam dengan teknik kromatografi cair preparatif menjadi semakin populer, penggunaan kromatografi preparatif secara luas dapat diterima. Pengembangan teknik isolasi preparatif berlangsung dengan sangat pesat, karena teknik ini memungkinkan pengerjaan dengan cepat untuk mendapatkan senyawa murni. Informasi tentang siklus waktu dan faktor pemisahan dapat diperoleh dari data analitis kromatografi. Optimasi dari kromatografi cair kinerja tinggi preparatif (KCKT-preparatif) merupakan suatu usaha pemisahan yang kompleks.

Intrumentasi KCKT-preparatif memiliki kelebihan dari KCKT tipe standar yaitu memiliki perangkat *fraction collector* yang dapat diperintah dengan program untuk melakukan pengumpulan larutan yang mengandung senyawa antosianin yang diinginkan. KCKT tipe standar yang ada di suatu laboratorium juga dapat digunakan untuk melakukan isolasi terhadap isolat antosianin seperti yang dapat dilakukan oleh KCKT-preparatif. Isolasi dilakukan dengan menampung secara manual larutan fase gerak yang keluar setelah melewati detektor yang diperkirakan mengandung isolat antosianin yang hendak diisolasi.

Dalam studi ini akan dibahas tentang isolasi senyawa antosianin utama yang terdapat pada ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f secara sederhana dan cepat dengan instrument KCKT tipe standar.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah *Ficus padana* Burm.f yang belum matang yang diperoleh dari tanaman *Ficus padana* Burm.f yang terdapat di kawasan kampus Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat.

Bahan kimia yang digunakan antara lain adalah: etanol, asam sitrat teknis dan air destilasi (kualitas teknis). Air demineralisasi, asetonitril dan metanol (kualitas KCKT-(Merck-Germany)), Asam format proanalisa (Merck-Germany).

Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah: inkubator *shaker* (Gehardt), *Rotary Evaporator* (Buchi), *Rechirculating Chiller* (Buchi), KCKT dengan detektor *diode array* SPD-M20A (Shimadzu), neraca analitik (Kern), *Hot Plate stirrer* (Velp), pH meter (Delta Ohm), dan peralatan gelas lainnya.

Cara kerja

Antosianin dari buah *Ficus padana* Burm.f

diekstraksi dengan pelarut etanol yang sudah diasamkan. Ekstraksi dilakukan secara maserasi. Hasil maserasi lalu disaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Ekstraksi diulang kembali dengan menggunakan pelarut yang sama dan perlakuan yang sama. Filtrat kemudian digabung dan disaring dengan menggunakan penyaring vakum, lalu pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator*.

Isolasi dengan KCKT tipe standar yang dilakukan pada Shimadzu *liquid chromatography* (Kyoto, Jepang) dengan menggunakan detektor *diode array* (SPD-M20A, Shimadzu, Kyoto, Jepang). Data diproses melalui komputer personal menggunakan program *Lab Solution* (LC solution Shimadzu). Kolom analitik yang digunakan adalah Shimadzu-ODS (250 X 4 mm diameter internal, 5 µm ukuran partikel; Shimadzu, Jepang) dengan kondisi suhu 30 °C.

KCKT dikondisikan mengikuti prosedur dari Huang dkk (8). Fase gerak yang digunakan adalah fase gerak A: asam format 2% dan fase gerak B: asetonitril : air : asam format (49 :49:2, v/v/v). Sistem elusi KCKT dilakukan secara gradien linear sebagai berikut: 0-4 menit, fase gerak B meningkat dari 6 ke 10%; 8-12 menit, fase gerak B meningkat dari 10 ke 25%; 12-13 menit fase gerak B tetap (isokratik) pada 20%; 13-20 menit fase gerak B meningkat dari 25 ke 40%; 20-35 menit fase gerak B meningkat dari 40 ke 60%; 35-40 menit fase gerak B meningkat dari 60 ke 100% dan 40-45 menit fase gerak B kembali ke 5%. Laju alir fase gerak diatur 1,0 mL/menit. Larutan contoh diinjeksikan sebanyak 100 µL, sebelum diinjeksikan, larutan contoh disaring menggunakan saringan Whatman dengan ukuran pori 0,45 µm. Spektrum absorpsi UV-Vis diukur secara langsung selama analisis KCKT.

Spektrum direkam pada rentang panjang gelombang 200-600 nm dengan 516 nm sebagai panjang gelombang deteksi.

Pengumpulan larutan yang mengandung senyawa antosianin utama dilakukan pada awal kemiringan puncak utama dan diakhiri ketika puncak utama didapat.

HASIL DAN DISKUSI

Ekstraksi antosianin merupakan langkah awal dalam penentuan total dan individu antosianin sebelum isolasi, karakterisasi dan pengukuran dilakukan (10). Umumnya ekstraksi antosianin menggunakan metanol atau etanol yang diasamkan. Meskipun etanol kurang efisien dan lebih sulit untuk dihilangkan akan tetapi penggunaan etanol lebih disukai untuk aplikasi ke produk makanan, hal ini disebabkan antara lain karena sifat metanol yang beracun (11). Penelitian yang membahas tentang proses ekstraksi antosianin dari buah-buahan dan sayuran seperti ubi jalar ungu, jagung ungu, kismis merah, kismis hitam, dan anggur telah menunjukkan bahwa alkohol merupakan pelarut yang baik untuk digunakan dalam proses ekstraksi antosianin dari tanaman-tanaman tersebut (12).

Isolasi dari ekstrak antosianin diperlukan karena tidak ada sistem pelarut yang dapat digunakan untuk memisahkan antosianin secara spesifik dari campurannya. Sejumlah komponen lainnya juga harus diperhitungkan, antara lain adalah polifenol dan pektin yang dapat mengganggu stabilitas dan atau proses analisis dari pigmen antosianin tersebut (13).

Menurut Welch dkk (14) KCKT telah menjadi metode pilihan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif dari antosianin. Hal ini karena kemampuan kromatografi cair dalam isolasi antosianin secara cepat pada berbagai skala pengukuran. Pada skala yang besar dapat menggunakan KCKT-preparatif dengan kolom preparatif, isolasi antosianin pada skala yang kecil dapat dilakukan dengan kolom semipreparatif sedangkan pada skala yang sangat kecil atau mikrogram dapat dilakukan dengan kolom analitik. Penggunaan kolom analitik secara langsung akan berkaitan dengan penggunaan KCKT tipe standar.

Isolasi senyawa antosianin utama yang ada di dalam ekstrak yang mengandung antosianin dilakukan dengan melakukan modifikasi pada alat KCKT tipe standar dengan melepaskan saluran setelah detektor agar larutan fase gerak

yang sudah lewat dari detektor dapat langsung ditampung ke dalam vial. Cara ini mengadopsi prinsip kerja dari KCKT-preparatif. Isolasi dengan cara ini sangat mungkin dilakukan apabila komponen yang dideteksi memiliki resolusi yang baik antara satupuncak dengan puncak lainnya. Oleh karena itu pencarian kondisi fase gerak yang optimum merupakan hal yang wajib dilakukan sebelum melakukan isolasi suatu senyawa dengan cara ini.

Puncak kromatogram merupakan suatu gangguan sinyal yang terjadi pada *baseline* yang diakibatkan oleh adanya serapan oleh suatu senyawa terhadap sinar UV-Vis yang mengenai senyawa tersebut, hal ini merupakan aplikasi dari prinsip elektrokimia pada KCKT. Hal ini menjadi perhatian dalam pemotongan puncak dari kromatogram yang didapat pada saat pengumpulan larutan fase gerak ketika proses isolasi dilakukan. Serapan dari suatu senyawa terhadap sinar UV-Vis ditunjukkan dengan terjadinya gangguan sinyal terhadap *baseline* dan ketika serapan itu sudah tidak ada lagi maka sinyal akan kembali lagi ke *baseline*.

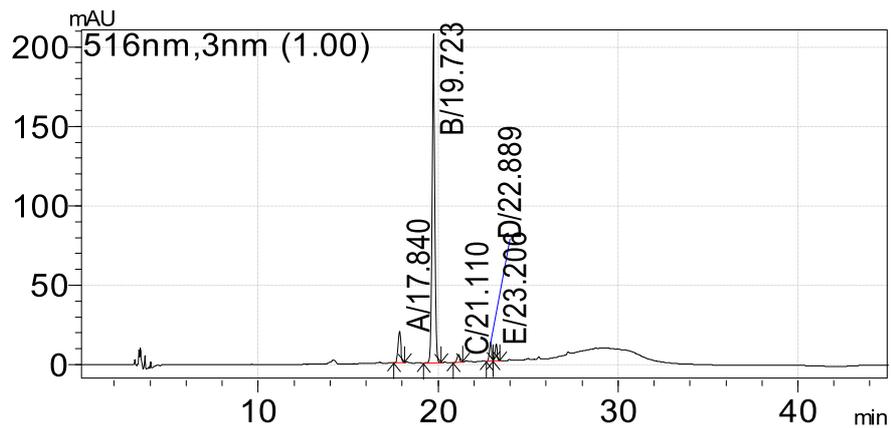
Dari data kromatogram yang didapat, senyawa antosianin utama yang terkandung dalam ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f dapat dipisahkan dengan baik menggunakan komposisi fase gerak berdasarkan metoda yang dikutip dari literatur (8). Pola gradient dari komposisi fase gerak yang digunakan terhadap pemisahan antosianin dari ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f memberikan hasil yang cukup bagus yang ditunjukkan pada Gambar 1 dengan didapatkannya nilai resolusi antara puncak B dengan puncak A yang bernilai besar dari 5 (lima), dan resolusi puncak C dengan puncak B dengan nilai besar dari 6 (enam). Berdasarkan data ini pemisahan puncak B sangat mungkin untuk dilakukan karena pemisahan puncak B tidak akan terganggu oleh puncak-puncak lainnya. Nilai resolusi yang besar sangat menguntungkan dalam penerapan teknik isolasi dengan menggunakan KCKT tipe standar ini, karena akan memudahkan dalam melakukan isolasi antosianin yang diinginkan dengan menampung larutan fase ge-

rak yang keluar setelah lewat dari detektor.

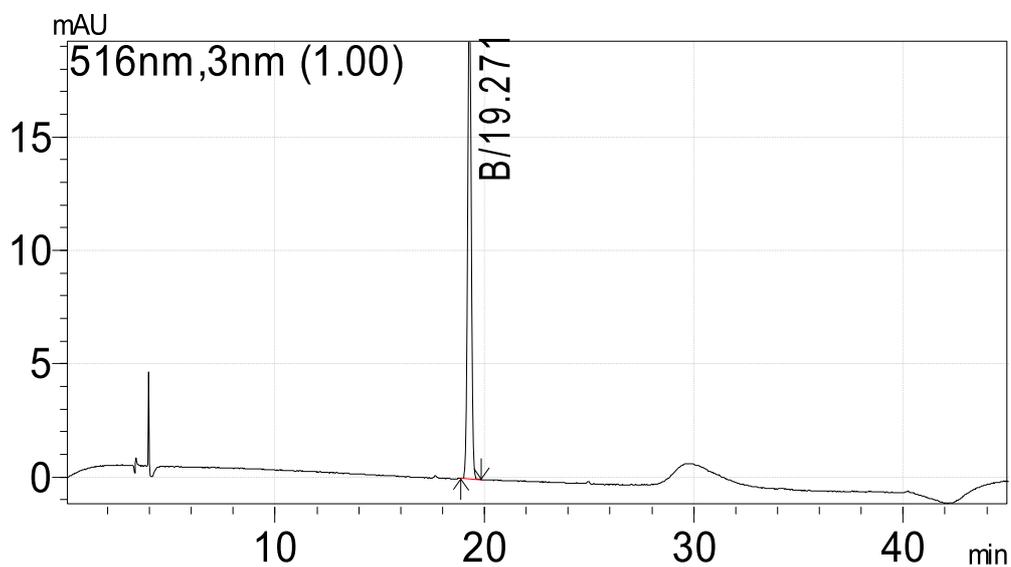
Perhitungan waktu dalam melakukan pemotongan puncak dari senyawa yang akan diisolasi merupakan kondisi yang sangat diperhatikan karena hal ini akan mempengaruhi kemurnian dari senyawa yang diisolasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan penulis, waktu yang baik dalam melakukan pemotongan puncak yang berkaitan dengan proses pengumpulan larutan yang mengandung senyawa yang akan diisolasi adalah ketika kemiringan puncak kromatogram sudah sangat terlihat jelas dan diakhiri ketika puncak kromatogram sudah didapat. Ketika kemiringan puncak kromatogram sudah terlihat dengan jelas dapat diperkirakan bahwa senyawa yang diisolasi sudah melewati detektor dan sudah dapat ditampung. Tetapi ketika kemiringan puncak baru muncul, pada kondisi ini diperkirakan bahwa senyawa yang diisolasi masih berada di-detektor dan apabila langsung ditampung dikawatirkan larutan belum mengandung senyawa yang kita inginkan dan apabila ada pengotor yang berada sangat dekat dengan senyawa yang diisolasi akan terambil ketika proses pengumpulan dilakukan.

Puncak B merupakan hasil serapan terhadap sinar Visibel (516 nm) dari senyawa antosianin utama yang terkandung di dalam ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f. Waktu pemotongan puncak B yang sejalan dengan pengumpulan larutan fase gerak setelah keluar dari detektor yang diperkirakan mengandung isolat senyawa B dapat dilakukan mulai setelah menit 19,200 dan diakhiri pada menit 19,723. Karena pada waktu inilah senyawa B terdeteksi oleh detektor dan mengalir keluar dari detektor tersebut. Pada waktu 19,723 ke 20,167 merupakan keadaan pengkondisian sinyal kembali ke kondisi *baseline*, pada waktu ini senyawa B sudah tidak ada lagi, dan apabila fase gerak tetap ditampung kemungkinan senyawa lain/pengotor yang ada sesudah senyawa B tersebut akan ikut terambil juga.

Pada Gambar 1 diperlihatkan kromatogram dari ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f yang mengandung campuran antosianin dengan data



Gambar 1. Kromatogram antosianin dari ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f



Gambar 2. Kromatogram isolat antosianin hasil isolasi dengan KCKT tipe standar

Tabel 1. Data beberapa puncak hasil pengamatan KCKT dari ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f

Name	Ret Time	Peak Start	Peak End	Area	% Area	Resolution
A	17.840	17.533	18.133	209099	7.8528	--
B	19.723	19.200	20.167	2224394	83.5386	5.746
C	21.110	20.833	21.367	50498	1.8965	4.343
D	22.889	22.667	23.067	93771	3.5216	6.504
E	23.206	23.067	23.433	84953	3.1905	1.297

waktu dalam satuan menit (Tabel 1), yang dapat dijadikan sebagai pedoman pada waktu pengumpulan larutan fase gerak yang mengandung isolat setelah keluar dari detektor. Sedangkan Gambar 2 merupakan kromatogram dari isolat yang sudah dipisahkan dari Gambar 1. Gambar 2

memperlihatkan suatu puncak tunggal dari kromatogram yang didapatkan dari hasil tumpang larutan fase gerak yang keluar dari detektor yang ditumpang berdasarkan pemotongan kromatogram yang dilakukan pada Gambar 1. Munculnya puncak tunggal memperlihatkan bahwa isolasi

telah dilakukan dengan baik, tidak didapatkan komponen lain yang ikut terambil pada saat pengumpulan fase gerak yang dilakukan.

KESIMPULAN

Isolasi dari senyawa antosianin utama yang terdapat dalam ekstrak buah *Ficus padana* Burm.f dapat dilakukan secara sederhana dan cepat de-

ngan teknik isolasi secara preparatif menggunakan KCKT tipe standar dengan meniru aplikasi dari prinsip instrumentasi KCKT-preparatif. Kemurnian dari isolat yang didapat, dikonfirmasi dengan analisa KCKT secara analitik, didapatkan kromatogram dengan satu puncak tunggal menunjukkan bahwa isolat yang didapatkan merupakan suatu senyawa murni. Konfirmasi lebih lanjut dengan KCKT-MS akan lebih memperkuat data tentang kemurnian dari isolat yang di dapat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Garzon, G.A. dan Wrolstad, R.E. Major anthocyanins and antioxidant activity of *Nasturtium* flowers (*Tropaeolum majus*). *Journal of Food Chemistry* 2009;114: 44-49.
2. Rice-Evans, C.A. Miller N.J. and Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997;2: 152-159.
3. Moyer, R.A. Hummer, K. E. Finn, C. E. Frei, B. Wrolstad, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 2003;50: 519-525.
4. Vinson, J. A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N. and Proch, J. Dried fruits: Excellent in vitro and in vivo antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* 2005; 24 (1): 44-50.
5. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem* 2005; 53: 1841-1856.
6. Faria A, Oliveira J, Neves P, Gameiro P, Santos-Buelga C, de Freitas V, Mateus N. Antioxidant properties of repared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *J Agric Food Chem* 2005; 53(17): 6896-902.
7. Joshi, Y. And Goyal, B. Anthocyanins: a lead for anticancer drugs. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry.* 2011; 1(4): 1119-1126.
8. Huang W, Shao-ling Zhang, Gai-hua Qin, Le Wen-quan, Jun Wu. Isolation and determination of mayor anthocyanin pigments in the pericarp of *P. Communis* L. Cv' Red Du Comines' and their association with antioxidant activity. *African Journal of Agricultural Research.* 2012; 7(26): 3772-3780.
9. Liu, Y. Nobutoshi, M. Lishu, W. Zhang Si. Preparative High-Performance Liquid Chromatography for the Purification of Natural Acylated Anthocyanins from Red Radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Chromatographic Science.* 2008; 46: 743-746.
10. Fuleki, T. and Francis, J. F,1968. Quantitative methods for anthocyanins.2. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci* 1968;33: 78-83.
11. Nicoueä , E., Sylvian S, Khaled B, 2007, Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55: 5626-5635.
12. Nicole Bridgers, E., Mari S. Chinn, Van-Den Truong. Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products.* 2010; .32: 613-620.
13. Jackman R. L. dan J. L. Smith. Anthocyanins and Betalains, in Hendry. G. A. P dan J. D. Houghton (eds). *Natural Food Colorants*, Second Edition. Chapman and Hall, London. 1996.
14. Welch,C.R., Qingli Wu, dan James E. Simon, Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization,*Curr Anal Chem.* 2008 : 4(2): 75-101.