



PENENTUAN ANTOSIANIN DARI DAUN BAYAM MERAH (*Alternanthera amoena* Voss.) SERTA ALIKASINYA SEBAGAI PEWARNA MINUMAN

Dini Hariyati Adam

Pendidikan Biologi, STKIP Labuhan Batu,

Jalan SM Raja No 126 A, Aek Tapa, Rantauprapat*email: Dini_adam89@yahoo.com

Info Artikel

Riwayat Artikel:

Diterima November
2016

Disetujui Januari 2017

Dipublikasikan Februari
2017

Abstrak

Penelitian tentang penentuan antosianin dari daun bayam merah dan aplikasinya sebagai pewarna dalam minuman telah dilakukan. Daun segar bayam merah ekstrak etanol ditambahkan 0,1 M HCl dan CH₃COOH 25% dan etanol tanpa penambahan asam. Ekstraksi di tempatkan pada tempat gelap selama 24 jam. Ekstrak diuji stabilitas terhadap pengaruh konsentrasi, pH, suhu, dan kondisi penyimpanan. Kemudian diidentifikasi oleh spektrofotometer UV-Vis dan lapisan tipis chromatografi (TLC). Hasil dari pengaruh konsentrasi menunjukkan bahwa jenis antosianin bayam merah cyanidin, yang didasarkan pada nilai absorbansi maksimum pada 290 nm (UV) dan 536 nm (terlihat). Hasil dari efek asam tipe menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi antosianin. Monomer dan total antosianin berada di 0,1 M HCl, yang memiliki nilai 43,08 mg / L dan 132,76 mg / L. Hasil dari efek pH menunjukkan ekstrak antosianin stabil pada pH 1-3, karena pada pH antosianin ini dalam bentuk kation flavilium. Suhu Efek menunjukkan bahwa antosianin berada di stabil pada suhu 60°C, karena pada suhu ini, degradasi pewarna adalah 25,14%. Kondisi pengaruh penyimpanan, antosianin stabil dalam penyimpanan pada suhu lemari es ($\pm 4^\circ\text{C}$), yang memiliki persentase degradasi adalah 4,91%. Dari TLC nilai R_f adalah 0,38. Ekstrak ini dapat diterapkan minuman dengan pH yang rendah.

Kata Kunci: Antosianin, *Alternanthera amoena* Voss, pewarna minuman.

PENDAHULUAN

yang bukan digunakan untuk pangan dan bersifat karsinogen semakin marak digunakan produsen pangan olahan terutama skala industri rumah tangga mendapatkan sorotan pemerintah (Natalia *et al.*). Oleh karena itu, perlu dicari sumber pewarna alami yang dapat digunakan dalam pengolahan pangan sehingga dihasilkan pewarna yang aman. Pewarna sintetis dapat digantikan penggunaannya dengan pewarna alami, salah satunya berasal dari daun bayam merah (*Alternanthera amoena* Voss.) karena menghasilkan warna merah yang dihasilkan oleh pigmen yang bernama antosianin. Antosianin merupakan senyawa kimia yang tersebar luas di alam sebagai zat warna dalam tumbuhan.

Pigmen antosianin larut dalam air dan memiliki warna merah muda, merah, ungu, biru, dan kuning (Harborne 1987). Secara kimiawi antosianin dapat dikelompokkan ke dalam flavonoid. Antosianin dapat ditemukan diberbagai tanaman di alam (Nazulis, *et al.*, 2002). Antosianin telah banyak digunakan sebagai pewarna khususnya minuman. Menurut JEFCA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food*

Additives) menyatakan bahwa ekstrak yang mengandung antosianin mempunyai efek toksisitas yang rendah, dapat mengurangi resiko penyakit jantung koroner, resiko stroke, aktivitas antikarsinogen, efek anti-inflammatory, memperbaiki ketajaman mata dan memperbaiki perilaku kognitif (Ariviani, 2010) dan dapat diabsorpsi dalam bentuk molekul utuh dalam lambung (santoni, *et al.*, 2013).

Sifat antioksidan dari antosianin yang terkandung dalam ekstrak *mulberry*, dimana aktivitas antioksidan pada spesies *mulberry* secara umum diperankan oleh senyawa fenolik khususnya antosianin. Mayoritas antosianin yang terdapat dalam *mulberry* adalah sianidin-3-O-glukosida dan sianidin-3-O-rutinosida, yang dilaporkan mempunyai efek menghambat terhadap migrasi dan invasi pada sel kanker paruparu, sianidin-3-O-sophorosida (Turkan, 2009).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat distilasi, rotary evaporator Heidolph WB 2000, plat

KLT, spektrofotometer UV-Vis (UV-1700 Series) Shimadzu, kertas saring Whatman No 1, aluminium foil, pH meter, termometer, neraca analitik, serangkaian alat vakum, water bath, aluminium foil, lampu UV, serta peralatan gelas yang umum digunakan dalam laboratorium.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bayam merah segar, dan bahan-bahan kimia berupa pelarut organik seperti $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ teknis yang didistilasi, akuades, CH_3COOH pekat, HCl pekat, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, KCl, I_2 , NH_4Cl , dan NH_4OH .

Ekstraksi

Ekstraksi dimulai dengan menimbang daun bayam merah sebanyak 100 gram lalu sampel dipotong kecil-kecil. Sampel yang telah halus dipindahkan ke dalam botol gelap, lalu ditambahkan pelarut etanol yang dibuat dalam suasana asam hingga pH 3 menggunakan jenis asam yaitu HCl 0,1 M, asam asetat 25% (v/v) serta tanpa menggunakan asam. Kemudian dilakukan proses ekstraksi secara maserasi pada temperatur kamar ($\pm 30^\circ\text{C}$) selama 24 jam dalam keadaan gelap. Kemudian disaring sehingga didapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat lalu dianalisa dengan spektroskopi UV-Vis dan KLT. Untuk keperluan analisis ekstrak pekat tersebut disimpan dalam botol tertutup yang dilapisi dengan aluminium foil pada lemari es dengan suhu -4°C .

Penentuan Kadar Total Antosianin

Menurut Wrolstada, *et al.*, 2005 dan Giusti, *et al.*, 2001 kadar total monomer antosianin dan kadar total antosianin dalam sampel dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$A = (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 5,0}$$

Konsentrasi monomer antosianin (mg/L) =

$$\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Dimana : $A' = (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0}$

Keterangan :

- E = absorpsivitas molar sianidin-3-glukosida = 26900 L/mol.cm
- L = lebar cuvet (1 cm)
- MW = BM sianidin-3-glukosida = 449,2g/mol
- DF = faktor pengenceran

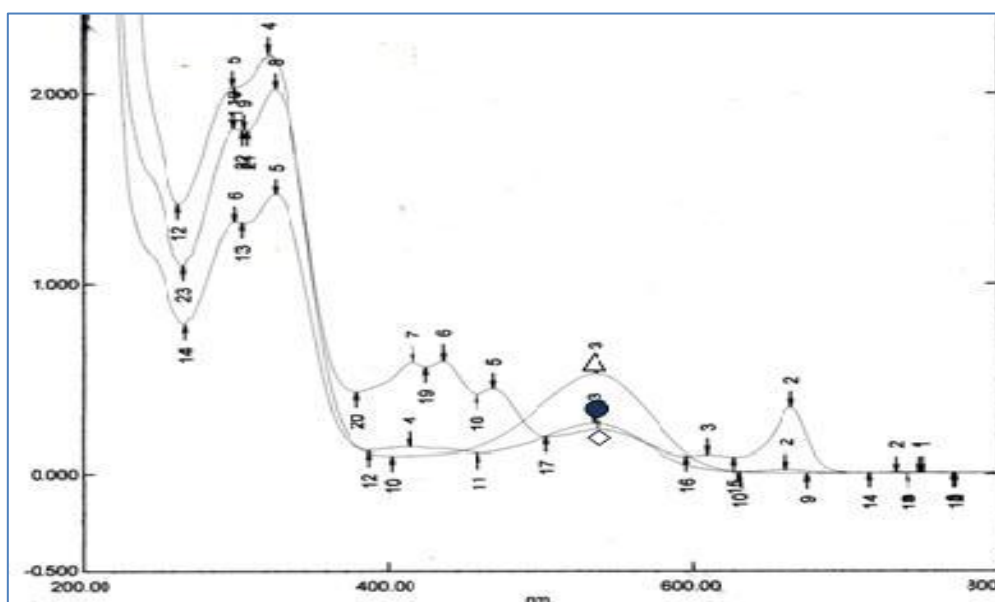
Uji Kestabilan Antosianin

1. Pengaruh Konsentrasi
Ekstrak pekat antosianin divariasikan 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7% dan 0,9% (b/v)
2. Pengaruh pH
Stabilitas ekstrak pekat antosianin dibuat dalam 5 tingkat keasaman (pH : 1, 3, 5, 7, dan 9)
3. Pengaruh Suhu
4. Sampel dipanaskan pada temperatur 40, 60, 80 dan 100°C di water bath selama 30 menit.
5. Pengaruh kondisi penyimpanan
Ekstrak antosianin disimpan pada temperatur kamar ($\pm 30^\circ\text{C}$) dan di kulkas ($\pm 4^\circ\text{C}$) selama 7 hari, masing-masing sampel diletakkan dalam botol gelap.

Kemudian masing-masing ekstrak di analisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 200 - 800 nm. Data yang diperoleh dibandingkan dengan data yang terdapat pada literatur.

Aplikasi pada Minuman

Ekstrak pigmen dicobakan pada minuman bersoda yang tidak berwarna dan susu fermentasi. Dengan cara menambahkan 0,9 g ekstrak pekat pada 100 mL minuman bersoda yang tidak berwarna (aqueous pH asam) dan susu fermentasi. Lalu dilihat perubahan warnanya.



Gambar 2. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan jenis asam. (◇) tanpa asam, (●) asam asetat, (▲) asam HCl 0,1M.

HASIL PENELITIAN

Ekstraksi pigmen dapat dilakukan dengan cara maserasi selama 24 jam dalam keadaan gelap. Ekstraksi senyawa golongan flavonoid termasuk antosianin dianjurkan dilakukan pada suasana asam karena asam berfungsi mendenaturasi membran sel tanaman, kemudian melarutkan pigmen antosianin sehingga dapat keluar dari sel.

Hasil ekstraksi zat warna dari daun bayam merah menggunakan HCl 0,1 M didapatkan ekstrak berwarna merah tua, ekstraksi menggunakan CH₃COOH berwarna ungu-kemerahan, sedangkan ekstraksi tanpa menggunakan asam ekstrak berwarna merah kecoklatan. Lalu ekstrak yang didapatkan dipisahkan dengan pompa vakum yang bertujuan untuk menguapkan pelarut. Sehingga didapatkan ekstrak pekat. Selanjutnya ekstrak pekat di analisis menggunakan spektroskopi UV-Vis dan KLT.

Hasil percobaan pendahuluan menunjukkan bahwa penggunaan asam klorida menghasilkan konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin tertinggi dibandingkan dengan asam asetat dan tanpa menggunakan asam. Hal ini dapat dilihat pada gambar 2 diatas, dimana HCl memberikan serapan tertinggi dibandingkan CH₃COOH dan tanpa asam, ini disebabkan karena pada HCl antosianin lebih banyak terekstrak

dibandingkan dengan asam asetat dan tanpa asam.

Dari hasil di atas dapat dilihat bahwa konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin terbesar yaitu menggunakan jenis HCl 0,1 M dimana konsentrasi monomer antosianin yang didapatkan sebesar 43,08 mg/L sedangkan total antosianin sebesar 132,76 mg/L. Tetapi karena ekstrak antosianin ini akan di aplikasikan sebagai pewarna alami maka digunakan jenis asam asetat.

Perbedaan konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin yang dihasilkan untuk setiap jenis asam berkaitan erat dengan perbedaan tetapan disosiasi dari masing-masing jenis asam. HCl memiliki tetapan disosiasi yang lebih besar dibandingkan CH₃COOH. Tetapan disosiasi untuk HCl 10^{-7} dan CH₃COOH $1,75 \times 10^{-5}$. Semakin besar tetapan disosiasi semakin kuat suatu asam karena semakin besar jumlah ion hidrogen yang dilepaskan ke dalam larutan.

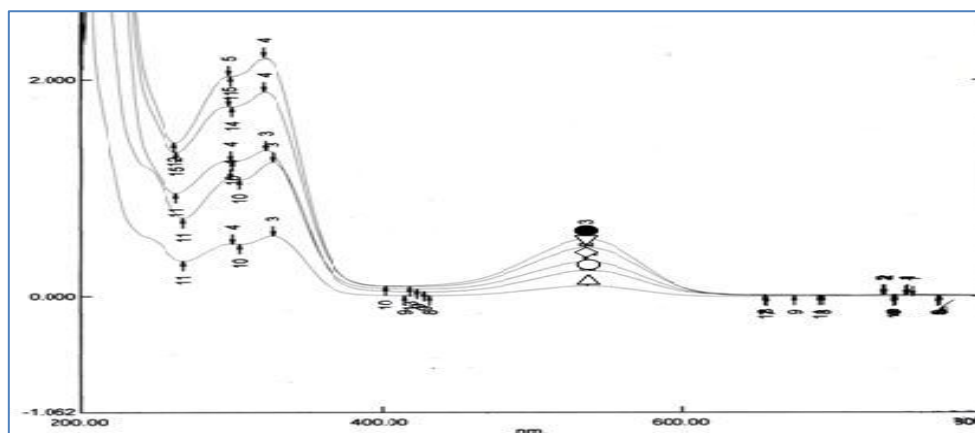
Keadaan yang semakin asam akan menyebabkan semakin banyaknya pigmen antosianin berada dalam bentuk kation flavilium yang berwarna hal ini disebabkan karena terjadinya denaturasi membran sel tanaman yang kemudian melarutkan pigmen antosianin dan dapat keluar dari sel sehingga pengukuran absorbansi akan meningkat.

Kadar Total Antosianin

Tabel 1. Konsentrasi Monomer dan Total Antosianin Daun Bayam Merah dengan Variasi Jenis Asam

Jenis Asam	Konsentrasi monomer antosianin (mg/L)
Tanpa asam	15,69
Etanol + CH ₃ COOH 25%	30,73
Etanol + HCl 0,1 M	43,08

Uji Kestabilan Pigmen Antosianin Pengaruh Konsentrasi



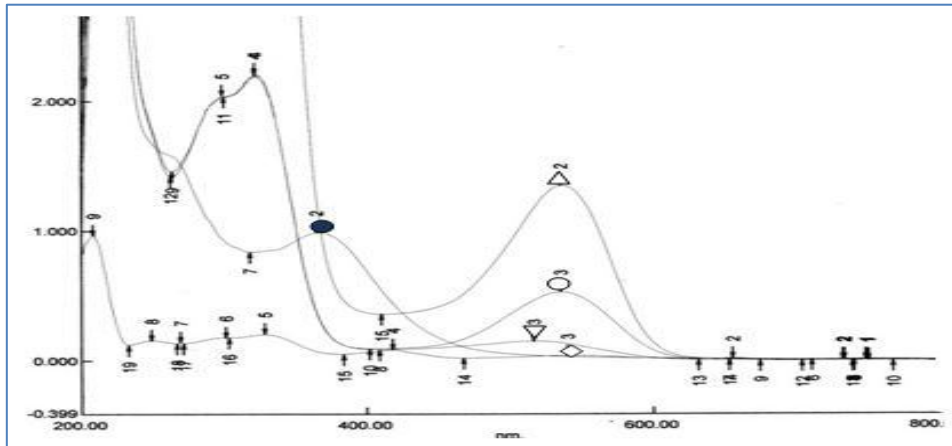
Gambar 7. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan konsentrasi. (▽) 0,1%, (△) 0,3%, (○) 0,5%, (◇) 0,7%, (●) 0,9%

Hasil pengamatan dari data konsentrasi menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi maka absorbansi yang dihasilkan juga akan semakin tinggi. Disini berlaku hukum Lambert-Beer dimana absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi.

Absorbansi tertinggi yaitu pada konsentrasi 0,9% (b/v) sebesar 0,529, yang dapat dilihat pada gambar 3. Menurut Qin, 2010; Anis ;

Markham, 1988, antosianin memiliki nilai λ Maks yaitu 270-290 nm untuk daerah UV dan untuk di daerah tampak yaitu 465-560 nm. Dari spektrum di atas didapatkan nilai λ maksimum yaitu pada daerah UV 290 nm dan pada daerah Vis yaitu 536 nm yang merupakan senyawa antosianin berjenis sianidin dimana untuk antosianin berjenis sianidin memiliki puncak serapan pada λ 290 nm untuk UV dan λ 536 nm untuk daerah tampak.

Pengaruh pH

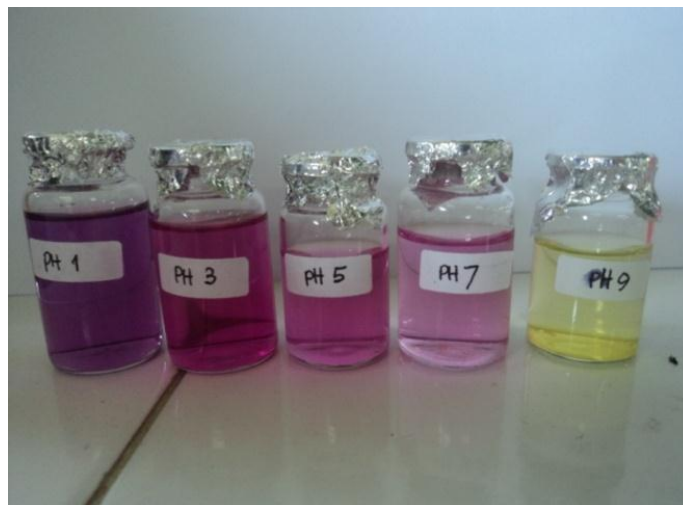


Gambar 8. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan pH. Δ) pH 1, ∇) pH 3, \circ) pH 5, \diamond) pH 7, \bullet) pH 9

Hasil pengamatan pada pH yang berbeda memperlihatkan adanya kenaikan absorbansi dengan menurunnya pH (semakin asam) seperti yang ditunjukkan pada spektrum gambar 8, Kestabilan dari pigmen antosianin sangat dipengaruhi oleh pH. Antosianin lebih stabil pada larutan yang bersifat asam dibandingkan larutan yang bersifat netral maupun basa. Antosianin stabil pada pH 1 – 3 dimana semakin rendah nilai pH maka warna yang dihasilkan semakin pekat,

karena pada keadaan ini antosianin berada dalam bentuk kation flavilium (Samsudin *et al.*, 2008).

Pada pH 5 warna dari antosianin semakin berkurang karena antosianin berubah menjadi bentuk karbinol. Pada pH 7 antosianin berwarna merah muda berbentuk kalkon yang tidak stabil. Serta pada pH 9 antosianin berwarna kuning yang berbentuk kuinoidal yang tidak stabil. Dimana perubahan warna dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



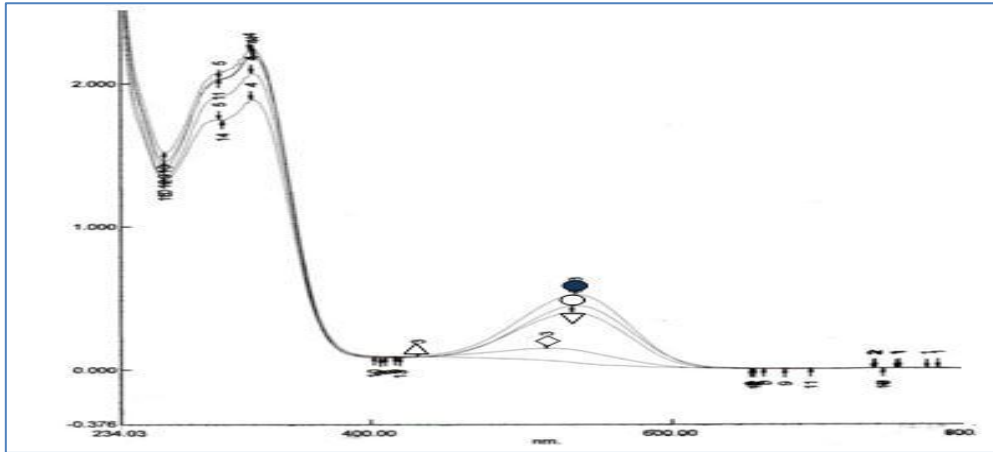
Gambar 5. Perubahan warna karena pengaruh pH.

Pengaruh Temperatur

Pada pengamatan terhadap stabilitas warna antosianin dari daun bayam merah, adanya pengaruh temperatur menyebabkan terjadinya degradasi warna antosianin yang ditunjukkan terjadinya penurunan absorban, dimana perubahan absorban dapat dilihat pada gambar 6.

Pada gambar 7, pemucatan warna disebabkan karena terjadinya perubahan struktur antosianin sehingga bentuk aglikon berubah menjadi karbinol (tidak berwarna).

Warna antosianin pada daun bayam merah relatif stabil pada pemanasan hingga temperatur 60°C. Karena pada suhu ini warna antosianin hanya berkurang sekitar 25,14% selama pemanasan 30 menit. Sedangkan pemanasan pada suhu 80°C – 100°C, warna antosianin berkurang sekitar 58,5% dan 87,52%. Sehingga pigmen antosianin relatif stabil pada suhu rendah, degradasi warna yang terjadi dapat dilihat pada tabel 2.



Gambar 10. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan temperatur. (◻) awal, (△) 40°C, (○) 60°C, (◇) 80°C, (●) 100°C.



Gambar 7. Perubahan warna akibat pengaruh temperatur

Tabel 2. Degradasi warna akibat pemanasan pada berbagai suhu

Temperatur	Absorban (A)	Degradasi warna (%)
30°C	0,529	0
40°C	0,451	14,74
60°C	0,396	25,14
80°C	0,246	53,49
100°C	0,066	87,52

Keterangan : Pada tabel 2, hilangnya pigmen antosianin (degradasi warna) secara bertahap meningkat dengan meningkatnya temperatur.

Pengaruh Kondisi Penyimpanan

Berdasarkan pengamatan terhadap stabilitas antosianin bahwa kondisi penyimpanan juga dapat menyebabkan terjadinya degradasi warna. Kondisi penyimpanan pada temperatur kulkas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) lebih baik dibandingkan dengan penyimpanan pada temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$).

Dari data di atas dapat dilihat bahwa penyimpanan pada temperatur $\pm 4^{\circ}\text{C}$, degradasi warna yang terjadi hanya sebesar 4,91 % sehingga masih mampu mempertahankan warna antosianin sekitar 95,09 % selama penyimpanan 7 hari. Sedangkan penyimpanan pada temperatur $\pm 30^{\circ}\text{C}$ mempercepat terjadinya degradasi antosianin yang mengubah warna antosianin menjadi merah-kecoklatan. Hal ini disebabkan karena adanya faktor cahaya yang dapat mempercepat terjadinya proses degradasi antosianin tersebut. Penyimpanan pada temperatur $\pm 30^{\circ}\text{C}$ degradasi yang terjadi sebesar 19,28 %. Sehingga antosianin lebih baik disimpan di dalam kulkas dibandingkan pada temperatur ruang.

Aplikasi sebagai Pewarna Minuman

Ekstrak pigmen dengan hasil yang terbaik ditambahkan ke dalam minuman bersoda yang tidak berwarna dan susu fermentasi. Pada minuman bersoda ekstrak pigmen larut dengan sempurna. Sementara ekstrak pigmen antosianin pada susu fermentasi menyebabkan susu menggumpal. Hal ini mungkin disebabkan karena

ekstrak pigmen memiliki pH asam sehingga dapat menggumpalkan protein pada susu. Oleh karena itu ekstrak pigmen ini cocok diaplikasikan pada minuman yang memiliki pH asam seperti minuman soda yang tidak berwarna.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa,

1. Berdasarkan pengaruh jenis asam bahwa yang menghasilkan konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin terbesar yaitu HCl 0,1 M sebesar 43,08 mg/L dan 132,76 mg/L.
2. Berdasarkan pengaruh konsentrasi, semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi absorbansi. Absorbansi tertinggi yaitu pada konsentrasi 0,9% (b/v), dengan nilai λ maksimum 536 nm pada daerah tampak dan 290 nm pada daerah UV, dimana nilai λ maksimum ini merupakan antosianin dengan jenis sianidin.
3. Ekstrak pigmen daun bayam merah stabil pada pH 1-3 yang berada dalam bentuk kation flavilium.
4. Berdasarkan pengaruh temperatur, tingkat degradasi warna terbesar yaitu pada suhu 100°C sebesar 87,52 %.
5. Berdasarkan kondisi penyimpanan bahwa antosianin lebih stabil disimpan pada temperatur kulkas karena pada kondisi ini degradasi warna hanya sebesar 4,91 %.
6. Setelah diaplikasikan sebagai pewarna minuman, maka ekstrak antosianin cocok digunakan untuk minuman yang memiliki pH asam.

Tabel 3. Degradasi warna terhadap pengaruh kondisi penyimpanan

Kondisi penyimpanan	Absorban (A)	Degradasi warna (%)
Awal	0,529	0
Temperatur kulkas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)	0,503	4,91 %
Temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$)	0,427	19,28 %



Gambar 8. Aplikasi sebagai pewarna

DAFTAR PUSTAKA

- Anis, Elfi. *Identifikasi dan Uji Kualitas Pigmen Kulit Buah Naga Merah (Hylocareus costaricensis) pada Beberapa Umur Simpan dengan Perbedaan Jenis Pelarut*.
- Ariviani, Setyaningrum. 2010. Kapasitas Anti Radikal Ekstrak Antosianin Buah Salam (Syzygium Polyanthum) Segar Dengan Variasi Proporsi Pelarut. Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan UNS.
- Giusti, M. M. dan R. E. Worlsted.. 2001. *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*. Oregon State University.
- Harborne. J.B., 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB Bandung.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Natalia, Dita. *Ekstraksi Pewarna Alami dari Buah Arben (Rubus ideaus Linn.) dan Aplikasinya pada Sistem Pangan*.UNPAD.
- Samsudin, Asep, M, dkk. 2008. *Ekstraksi, Filtrasi Membran dan Uji Stabilitas Zat Warna dari Kulit Manggis (Garcinia mangostana)*. UNDIP. Semarang.
- Santoni, A, Djaswir Darwis, Sukmaning Syahri. 2013. *Isolasi Antosianin dari Buah Pucuk Merah (syzygium campanulatum korth.) Serta Pengujian Antioksidan dan Aplikasi sebagai Pewarna Alami*. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung.
- Turkan Kutlu, Gokhan Durmaz, Burhan tes, Ismet Yilmaz1, and M. Sevket Cetin. 2009. Antioxidant Properties Of Different Extracts Of Black Mulberry (Morus nigra L.). Turkei. Hal 104-105.
- Wrolstada, Ronald, Robert W. Dursta and Jungmin Leeb.2005. *Tracking color and pigment changes in anthocyanin products*. Department of Food Science and Technology,Wiegand Hall, Oregon State University.
- Nazulis, Z, dkk. 2002. *Kimia Bahan Alam*. Reviewer : Nurhasnah Aliunir. Penerbit UNP. Padang.