

Pengkapsulan Ekstrak Antosianin Bunga *Euphorbia milii* Encapsulation Of *Euphorbia milii* Anthocyanin Extract

Husniati

Balai Riset dan Standardisasi Industri Bandar Lampung, Jl. By Pass Soekarno Hatta KM.1 Rajabasa
Bandar Lampung, 35412. Indonesia
e-mail: husniati@kemenperin.go.id

ABSTRAK. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pengkapsulan/enkapsulasi antosianin, pigmen alami dari bunga *Euphorbia milii*. Teknik penyiapan enkapsulasi bahan aktif bertujuan agar terjaga sifat fungsional dan stabilitas antioksidan selama proses produksi dan proses penyimpanan yang penggunaannya tidak terbatas sebagai bahan tambahan pada produk pangan, obat, dan kosmetik. Pembuatan enkapsulasi antosianin menggunakan gelasi ionik dengan kitosan sebagai matriks coating/penyalut. Sebanyak 0,0991 mg antosianin disalut oleh kitosan dan tripoli phosphate (TPP) menghasilkan aktivitas antioksidan sebesar 1,8 kali lebih tinggi dibandingkan dalam keadaan bebasnya.

Kata kunci: antosianin, antioksidan, , *Euphorbia milii*, pengkapsulan mikro

ABSTRACT. This study aims to encapsulate the anthocyanin, a natural pigment from *Euphorbia milii* flowers. The technique for preparing the encapsulation of active ingredients aims to retain the functional properties and antioxidant stability during production and storage process that is not only used as an additive in food, drug, and cosmetic products. The production of anthocyanin encapsulation can be done by using an ionic gelation with chitosan as a matrix coating. The calculated amount of 0.0991 mg of anthocyanins coated by chitosan and tripoly phosphate (TPP) showed that the results of antioxidant activity were 1.8 times higher than its free condition.

Keywords: anthocyanin, antioxidant, *Euphorbia milii*, microencapsulation

1. PENDAHULUAN

Senyawa antosianin terdapat hampir pada semua tanaman (Sreedevi and Pavani, 2012; Baskan, *et al.* 2015), seperti pada buah-buahan, sayur, dan tanaman hias. Antosianin termasuk salah satu golongan flavonoid, yaitu senyawa berwarna yang menyebabkan timbulnya warna merah, biru, dan ungu (Mazza and Minitiati, 1993). Kisaran warna yang bermacam-macam ini menjadi alternatif sebagai senyawa pewarna alami yang biasa digunakan untuk industri pangan, farmasi dan obat (Laleh *et al.*, 2006).

Antosianin memiliki struktur dalam kesetimbangan dengan terjadinya perubahan pH. Perubahan pH berarti perubahan terhadap penyerapan spektra ke arah energi lebih rendah atau lebih tinggi. Stabilitas dan intensitas antosianin sangat dipengaruhi oleh konsentrasi antosianin, pH, suhu, intensitas cahaya, serta keberadaan senyawa lain. Degradasi dan instabilitas senyawa ini dicegah melalui penambahan asam (Mazza and Minitiati, 1993; Francis, 1989, Devi *et al.*, 2012) dalam pelarut polar yang digunakan dalam proses ekstraksi yaitu pada kisaran pH 4 atau kondisi asam adalah

kondisi stabil untuk antosianin (Giusty and Wrolstad, 2001).

Antosianin memiliki fungsi sebagai zat antioksidan (Reyes *et al.*, 2006), mengurangi resiko terkena penyakit penyempitan pembuluh darah, obesitas (Tsuda *et al.*, 2003), dan anti kanker (Roobha *et al.*, 2011).

Bunga *Euphorbia milii* juga mengandung antosianin. Intensitas dan stabilitas dari ekstrak antosianin ini bergantung kepada suhu, cahaya, dan penyimpan (Husniati dkk., 2017). Beberapa penelitian lainnya telah melaporkan bahwa hasil ekstrak bunga *Euphorbia milii* (Divya *et al.*, 2016) mengandung antimikroba dan antitumor. Penelitian ini melaporkan cara menyiapkan sediaan antosianin dalam bentuk enkapsulasi agar dipertahankan aktivitas antioksidannya untuk penggunaan yang lebih luas.

Enkapsulasi antosianin menggunakan kitosan dan tripoly phosphate (TPP) dengan cara gelasi ionik sebagai salah satu teknik yang hampir sama telah dilaporkan oleh Mardliyati dkk. (2012) pada pembuatan nano kitosan-TPP untuk mendapatkan partikel berukuran 200 nano meter sebagai *carrier* penghantar protein

terapeutik. Interaksi ionik terjadi antara gugus amino bermuatan positif dari kitosan membentuk struktur *network* inter (termasuk intra) dengan polianion bermuatan negatif dari TPP (Agnihotri *et al.*, 2004).

2. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk pembuatan bahan penyalut terdiri atas *Chitosan food grade paramedical* (CV. ChiMultiguna), asam asetat glasial (CH₃COOH-Merck), Na-TPP (Merck), dan aqua demineral. Bahan ekstraksi antosianin terdiri dari bagian bunga *Euphorbia milli*, aquadest, HCl (Merck). Antioksidan diuji menggunakan DPPH (1,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *plate stirrer*, sentrifuge, *vortex*, timbangan analitik, spektrofotometer UV/VIS Shimadzu UV-1800, PSA (Beckman Coulter Delsa Nano C Particle analyzer), SEM-EDX ZEISS EVO® MA 10, dan Freeze dryer (LabFreeze Instrument FD-10-MR).

2.2. Prosedur Penelitian

2.2.1. Persiapan Bahan: Ekstraksi Bunga *Euphorbia* dan Isolasi Antosianin

Ekstraksi bunga *Euphorbia* dilakukan menggunakan metoda maserasi dalam pelarut air pada tekanan atmosfer dan suhu kamar selama 24 jam. Bunga dipilih yang segar, dipisahkan bagian putik dan tangkainya, dipotong kecil selanjutnya dicuci dan dikeringkan. Tahap selanjutnya adalah maserasi selama 24 jam menggunakan pelarut HCl 0,01% dalam air. Setelah itu difiltrasi dengan bagian filtrat yang diambil untuk penentuan kadar antosianin pada 530 nm (Husniati dkk., 2016). Antosianin berada dalam filtrat yang dipekatkan menggunakan freeze drying hingga 10 kalinya lebih pekat.

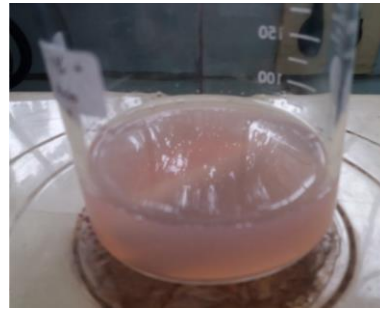
2.2.2. Sintesis Enkapsulasi

Enkapsulasi antosianin disintesis secara gelasi ionik menggunakan material penyalut kitosan dan *cross linker* dari TPP.

Penyiapan jumlah antosianin dari konsentrasi induk 198,2 mg/L pada deret volume (dalam μ L) berikut: 100 (0,0198 mg), 125 (0,0247 mg), 250 (0,0496 mg), 500 (0,0991 mg), 750 (0,1487 mg), dan 1000 (0,1982 mg).

Kitosan dilarutkan dalam asam asetat hingga diperoleh konsentrasi 1%. Selanjutnya diaduk menggunakan *stirrer* selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan *vacuum filter*.

Antosianin dienkapsulasi dalam larutan kitosan sebanyak 250 mg dan ditetesi dengan larutan TPP berkonsentrasi sama dengan kitosannya sebanyak 62,5 mg, ditambahkan secara perlahan dan dibiarkan selama 15 menit (Gambar 1). Sampel pasta diperoleh setelah disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit (Husniati dkk., 2016; modifikasi Bao *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2017). Proses sintesis dilakukan ulangan sebanyak dua kali.



Gambar 1. Sintesis enkapsulasi antosianin dengan bahan penyalut kitosan-TPP

2.2.3. Pengujian

Enkapsulasi antosianin dikarakterisasi berdasarkan ukuran partikel, zeta potensial dan indeks polidispersitas (PI) menggunakan alat PSA, sementara untuk melihat morfologi dan komposisi yang terkandung dalam partikel menggunakan alat SEM-EDX. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan DPPH (Chou *et al.*, 2003; Prakash *et al.*, 2013). Data pengujian dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil karakterisasi mikroenkapsulasi antosianin

Ekstrak antosianin dari bunga *Euphorbia milii* adalah kelompok Sianidin-3-galaktosida dengan panjang gelombang maksimum 530 nm (Setiawati dan Husniati, 2015).

Proses sintesis enkapsulasi berlangsung dengan rasio antara antosianin: kitosan: TPP pada perbandingan berat 0,0991: 250: 62,5. Makin banyak antosianin terkapsulasi maka makin sedikit *recovery* antosianin tidak terikat demikian pula terjadi sebaliknya bila kondisi optimal tersebut tidak tercapai maka makin sedikit persentase terkapsulasi maka makin banyak antosianin yang tidak terikat (Tabel 1).

Berdasarkan Tabel 1 berikut, bahwa antosianin bebas yang telah dienkapsulasi oleh

kitosan-TPP memberikan nilai tertinggi yaitu 80% untuk sebanyak 0,0991 mg antosianin.

Tabel 1. Recovery dan persen enkapsulasi

No.	Antosianin bebas (mg)	Recovery (mg)	Persen enkapsulasi
1.	0,0198	Nihil	Nihil
2	0,0247	0,1481	41
3	0,0496	0,3904	21,2
4	0,0991	0,0194	80
5	0,1487	0,0738	50
6	0,1982	0,12979	Nihil

Konsentrasi antosianin dan konsentrasi recoverys diperoleh dari perhitungan menggunakan rumus berikut :

$$Abs = (A_{max} - A_{700})pH\ 1.0 - (A_{max} - A_{700})pH\ 4.5 \dots (1)$$

$$Antosianin \frac{mg}{L} = \frac{A \times MW \times Df \times 1000x}{\epsilon \times l} \dots (2)$$

Dengan :

MW Cyd-3-gal =467,396,

ϵ =34.300,

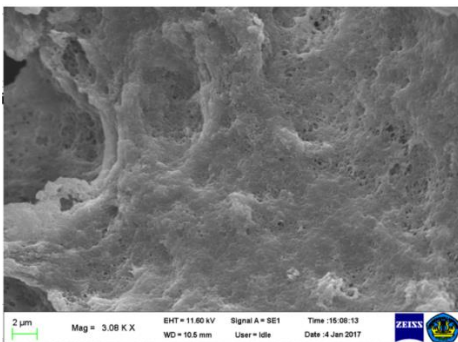
Abs= Absorbans,

A max = Abs pada λ_{max} (530 nm),

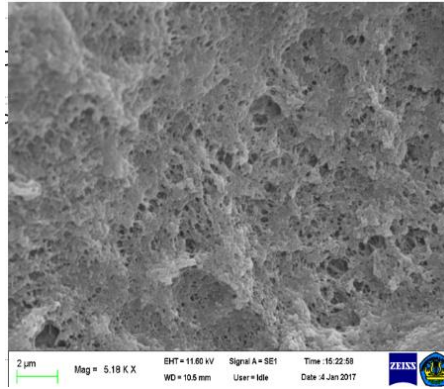
Df= faktor pengenceran

(Giusty and Wrolstad, 2001).

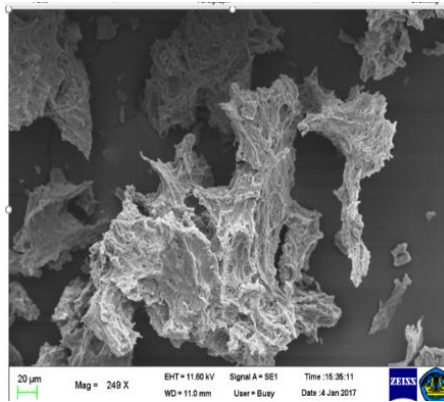
Hal ini juga dapat dibuktikan melalui pengamatan mikrostrukturnya menggunakan peralatan SEM seperti ditunjukkan pada Gambar 2, 3, dan 4 tentang morfologi enkapsulasi antosianin yang dianalisis secara SEM.



Gambar 2. Enkapsulasi 0,4954 mg antosianin



Gambar 3. Enkapsulasi 0,0991 mg antosianin



Gambar 4. Enkapsulasi 0,1487 mg antosianin

Berdasarkan Gambar 2 di atas, bahwa pembentukan *cross link* antara kitosan-TPP yang menjerat antosianin diamati melalui alat SEM terlihat pada pembentukan enkapsulasi 0,0991 mg antosianin memberikan penampang morfologi strukturnya lebih porous, lebih teratur strukturnya dan tidak terputus antara polimer satu dengan yang lainnya. Morfologi struktur yang tampak pada enkapsulasi antosianin sebanyak 0,0991 mg memberikan struktur yang baik dibandingkan jumlah yang lainnya yaitu 0,4954 dan 0,1487 mg antosianin. Pada jumlah yang sedikit dan lebih banyak dari 0,0991 mg menunjukkan morfologi struktur diskontinu dan tak seragam. Kemungkinan besar ada korelasinya dengan proses penyerapan antosianin oleh kitosan-TPP kurang dari 80% yaitu pada kondisi penyerapan antosianin tidak optimal.

Adapun komponen penyusun strukturnya yang terdeteksi oleh EDX terdiri dari unsur-unsur berikut 49,39% C, 37,69% O, 0,45% Na, 12,16% P, dan 0,31% C.

Partikel mikroenkapsulasi dari antosianin kemudian dianalisa ukuran partikelnya menggunakan PSA (*Particel Size Analyzer*) beserta rendemen (*yield*). Hasil

analisa PSA menunjukkan bahwa ukuran rata-rata partikel antosianin enkapsulat ditunjukkan dalam Tabel 2. Partikel enkapsulasi dari antosianin kemudian dianalisa ukuran partikelnya dengan menggunakan PSA (*Particel Size Analyzer*) berserta rendemen (*yield*).

Berdasar Tabel 2 ukuran partikel dalam rentang 298 nm memiliki kestabilan partikel yang lebih baik ditunjukkan dari nilai zeta potensialnya dan polidispersitas index (PI) sebagai representatif tingkat keseragaman partikel. Dari hasil ini dapat diketahui bahwa partikel yang diperoleh pada ukuran tertentu bersifat stabil, karena nilai potensial zeta yang lebih besar dari 30 mV (Mardiyati dkk., 2012). Pada penelitian ini, nilai $PI \leq 0,5$ diperoleh partikel unimodal sementara $PI = 0,6-0,7$ partikel cenderung tidak seragam namun termasuk stabil. Partikel dari penelitian ini cenderung memperoleh ukuran partikel yang besar atau lebih besar dari ukuran 100-200 nano meter. Kecenderungan untuk bergabung antar inti partikel satu dengan yang lainnya setelah reaksi gelasi ionik mencapai kestabilan sebagai ukuran mikro sehingga penyebutannya untuk sintesis enkapsulasi antosianin menggunakan formulasi ini sebagai partikel antosianin mikroenkapsulasi. Sintesis pembentukan enkapsulasi antosianin pada ukuran nano meter telah diperoleh yaitu 183 nm, namun partikel cenderung tidak stabil dengan nilai zeta potensial yang sangat rendah serta nilai PI nya juga tergolong tinggi dan tidak seragam sebagai ukuran unimodal.

Rendemen proses pembuatan enkapsulasi antosianin menggunakan penyalut kitosan-TPP mempunyai kisaran antara 95-96%.

Tabel 2. *Yield*, ukuran partikel, dan stabilitas partikel enkapsulasi antosianin sesuai dengan konsentrasinya

No.	Jumlah enkapsulasi antosianin (mg)	<i>Yield</i> (%)	Poli dispersitas index	Ukuran partikel (nm)	Zeta potensial
1	0,0496	95,8	0,598	183-334,8	-54,74
2	0,0991	95,7	0,515	298	32
3	0,1487	95,5	0,782	331,59-480	34,2
4	0,1982	95,5	0,688	297,6-533,4	34,96

Aktivitas antioksidan dari ekstrak bebas *Euphorbia milli* dan mikroenkapsulasi antosianin diukur menggunakan DPPH (Karamac and Amarowicz, 1997). Nilai IC_{50} ditentukan sebagai konsentrasi ekstrak efektif yang diperlukan untuk menurunkan 50% intensitas serapan DPPH yang

dibandingkan dengan BHT (butil hidroksi toluene), sementara BHT dan BHA (butil hidroksi anisol) adalah senyawa antioksidan sintetis yang penggunaannya telah dibatasi untuk kepentingan penggunaan pangan menuju penguatan konsep penggunaan antioksidan alami (Chou *et al.*, 2003; Li, 2018; Karamac and Amarowicz, 1997).

Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi linier masing-masing sampel sehingga diperoleh hasil berturut-turut ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penghitungan aktivitas antioksidan.

No	Sampel	IC_{50} (ppm)
1	Antosianin bebas	114,68
2	Enkapsulasi antosianin	63,86
3	Kontrol positif (BHT)	5,94

Karakteristik IC_{50} suatu senyawa digolongkan atas sangat kuat, kuat, sedang dan lemah tergantung seberapa besar aktivitasnya menangkap radikal bebas dari DPPH. Suatu senyawa dikatakan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat pada kisaran 51-100 ppm, sedang 101-150 ppm dan lemah pada kisaran 151-200 ppm. Hasil penelitian ini diperoleh aktivitas antioksidan untuk antosianin pada kondisi bebas tergolong sedang yaitu 114,68 ppm jauh dari IC_{50} untuk BHT. Namun kondisi bebas kemungkinan besar terjadi penurunan aktivitasnya selama penyimpanan yang kemungkinan besar aktivitasnya berada pada golongan kuat. Kondisi enkapsulasi dapat mempertahankan aktivitas antioksidannya, sehingga jika dibandingkan terhadap kondisi bebas maka ada selisih 1,8 kali nya. Hal ini bisa menjadi alternatif penggunaan antosianin dari bunga *Euphorbia milli* sebagai sumber antosianin alami dan bentuk enkapsulasi dapat mempertahankan aktivitas antioksidan untuk penyimpanan dan penggunaan yang lebih luas.

KESIMPULAN

Telah dilakukan proses sintesis enkapsulasi antosianin dari bunga *Euphorbia milli* dengan formulasi antara antosianin: kitosan: TPP dalam perbandingan berat 0,0991:250:62,5 dan diperoleh sebanyak 80% antosianin bebas telah terkapsulasi oleh kitosan-TPP. Ukuran partikel enkapsulasi antosianin adalah 298 nm yang teridentifikasi sebagai mikro partikel yang stabil dari nilai zeta potensialnya lebih besar dari

30 mV dan polidispersitas index ($PI \leq 0,5$) yang menunjukkan keseragaman partikel. Teknik enkapsulasi yang telah dilakukan secara gelasi ionik dapat merepresentasikan kestabilan antosianin dalam kitosan dengan aktivitas aktioksidannya sebanyak 1,8 kali dibandingkan dalam keadaan bebas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Kepala Balai Riset dan Standardisasi Industri Bandar Lampung, Kementerian Perindustrian yang telah memberikan dukungan dana penelitian TA 2016. Terima kasih juga disampaikan kepada laboratorium uji di Biomass Universitas Lampung, Nano Herbal Indonesia yang telah berkerjasama dalam pelaksanaan uji. Ucapan terima kasih disampaikan kepada teman sejawat Pejabat Struktural dan Pejabat Fungsional Peneliti Perekayasa di Lampung atas supportnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., & Aminabhavi, T.M. (2004). Recent advances on chitosan - based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100 (1), 5-28.
DOI: [10.1016/j.jconrel.2004.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010).
- Bao, H., Li, L., & Zhang, H. (2008). Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan-TPP nanoparticles in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 328, 270 – 277.
- Baskan, K.S., Tutem, E., Akyuz, E., & Apak, R. (2015). Assessment of the contributions of anthocyanins to the total antioxidant capacities of plant foods. *European Food and Research Technology*, 241, 529-541.
DOI: [10.1007/s00217-015-2482-2](https://doi.org/10.1007/s00217-015-2482-2).
- Chou, S.-T., Chao, W.-W. & Chung, Y.-C. (2003). Antioxidative activity and safety of 50% ethanol red bean extract (*Phaseolus radiatus* L. var. Aurea). *Journal of Food Science*, 68 (1), 21-25.
- Devi, P.S., Saravanakumar, M., & Mohandas, S. (2012). The effects of temperature and pH on stability of anthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. *African Journal of Food Science*, 6 (24): p. 567-573.
- Divya, T.K, Dipen, S.K, Kirtan, S.P, Ashish, S.P., & Avinash, S.K. (2016). Extract of *Euphorbia milii* flower: a natural indicator in acid-base titration. *Journal of Integrated Health Sciences*, 4 (2), 2-6.
- Francis, J.F. (1989). Food colourants: anthocyanins. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 28 (4), 273-314.
DOI:[10.1080/10408398909527503](https://doi.org/10.1080/10408398909527503).
- Giusty, M.M. and Wrolstad, R.E., (2001). Characterization and measurement of anthocyanin by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocol in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1 – F1.2.13. University of Maryland College Park. Maryland, USA.
- Husniati, H., Abdat, M.S., & Suhartati, T. (2016), Characterization and measurement of anthocyanin by UV-Visible spectroscopy). *Prosiding Seminar Nasional Riset dan Industri 2015*, Balai Riset dan Standardisasi Industri Bandar Lampung Indonesia, 2016, Vol. I: pp. 22-31. ISBN :978-602-70870-0-2.
- Husniati, H., Oktiani, D., & Abdullah, K. (2017). Potensi pewarna merah *Euphorbia milii* sebagai indikator pH. *Prosiding Seminar Nasional Riset dan Industri 2016*, Bandar Lampung Indonesia, 2017, Vol 2, pp. 267-283. ISBN :978-602-70870-0-2.
- Karamac, M., & Amarowicz, R., (1997). Antioxidant activity of BHA, BHT and TBHQ examined with Miller's test. *Grasas y Aceites*, 48 (2), 83-86.
- Laleh, G.H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R. & Zare, S., (2006). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four Berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1), 90-92. ISSN 1680-5194.
- Li, Q., Sun, X., Gu, G., & Guo, Z. (2018). Novel water chitosan derivatives with 1,2,3-triazolium and their free radical-scavenging activity. *Marine Drugs*, 16 (107), 1-13.
DOI:[10.3390/md16040107](https://doi.org/10.3390/md16040107).
- Li, Q., Zhang, C., Tan, W., Gu, G., & Guo, G. (2017). Novel amino-pyridine functionalized chitosan quaternary ammonium derivatives: design, synthesis, and antioxidant activity. *Molecules*, 22 (156), 1-10.
DOI: [10.3390/molecules22010156](https://doi.org/10.3390/molecules22010156).
- Mardliyati, E., El Muttaqien, S., & Setyawati, D.R. (2012). Sintesis nanopartikel kitosan-tripolyphosphate dengan metode gelasi ionik: Pengaruh konsentrasi dan rasio volume terhadap karakteristik partikel. *Prosiding*

- Pertemuan Ilmiah Ilmu pengetahuan dan Teknologi Bahan*, p. 90-93.
- Mazza, G. & Minitiati, E. (1993). *Introduction. In anthocyanuun in fruits, vegetables, and grains. Boca raton. FL: CRC Press (Chapter 1)* : p. 1-28.
- Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E. (2013). *Antioxidant activity*. Medallion Labs. Minnesota, USA.
- Reyes, I.F., Miller Jr, J.C. & Cisneros-Zevallos, I. (2006), Antioxidant capacity, anthocyanins and total phenolics in purple and red-fleshed potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *American Journal of Potato Research*, 82, 271-277.
- Roobha, J., Saravanankumar, M., Aravindhan, K.M., & Devi, P.S (2011). In Vitro Evaluation of Anticancer Property of Anthocyanin Extract from *Musa acuminata* Bract. *Journal of Research in Pharmacy*, 1 (4): p. 17-21. ISBN : 2231-539X.
- Setiawati, I., dan Husniati, H., (2015). Identifikasi dan penentuan konsentrasi Anosianin pada bunga euphorbia (*Euphorbia milli*). *Teknologi Agroindustri*, 7 (1) : p. 28-34.
- Sreedevi, A. and Pavani, B. (2012). Effect of anthocyanin fraction on cisplatin-induced nephrotoxicity. *International Journal or Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2012, 3 (4), 587-590.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H. & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside- rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of Nutrition*, 133 (7), 2125-2130. doi.org/10.1093/jn/133.7.212.
- Yehye, W.A., Rahman, N.A., Ariffin, A., Abd Hamid, S.B., Alhadi, A.A., Kadir, F.A., Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 295–312.