

## Majalah Sainstekes

ISSN: 2085-6237 (Print) ISSN: 2685-6794 (Electronic)

Journal homepage <https://academicjournal.yarsi.ac.id/sainstekes>

### Identifikasi Senyawa Kelompok Antosianin dalam Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dengan menggunakan uHPLC-MS/MS

### Identification of Anthocyanins Compounds in Butterfly Flower Extract (*Clitoria ternatea*) using uHPLC-MS/MS

Lusy Indranita<sup>1</sup>, Nunung Ainur Rahmah<sup>1</sup>, Juniarti<sup>1</sup>, Moch Abdussalam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Sains Biomedis, Sekolah Pascasarjana, Universitas YARSI

<sup>2</sup>Lembaga Penelitian, Universitas YARSI

#### Article Info

##### History of article:

Received: 17-10-2023

Accepted: 02-05-2024

##### Keywords:

*anthocyanins, clitoria ternatea, uhplc-ms/ms*

#### Abstract

Butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L) is a plant that has many good pharmacological effects. This plant has purple flowers which are compounds from the anthocyanin group. This research aims to identify anthocyanin group compounds in butterfly pea flower extract using ultra high performance liquid chromatography – mass spectroscopy/mass spectroscopy (uHPLC-MS/MS). Measurements using uHPLC-MS/MS can show that the anthocyanin group compounds in sea cucumber extract are Delphinidin-3-(6"- p -coumaroyl)-rutinoside, Cyanidin 3-(6"- p -coumaroyl)-rutinoside, Delphinidin-3-( cis - p -coumaroyl-glucoside) and Cyanidin-3- (p -coumaroyl) glucose. Therefore, butterfly pea flower extract has been successfully proven to contain anthocyanin group compounds.

#### Abstrak

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L) merupakan tanaman yang banyak memiliki efek farmakologis yang cukup baik. Tanaman ini memiliki bunga dengan warna ungu yang menarik yang diduga mengandung senyawa kelompok antosianin. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi senyawa kelompok antosianin dalam ekstrak bunga telang dengan menggunakan ultra high performance liquid chromatography – mass spectroscopy/mass spectroscopy (uHPLC-MS/MS). Pengukuran dengan uHPLC-MS/MS dapat diketahui senyawa kelompok antosianin dalam ekstrak telang adalah Delphinidin-3-(6"-p-coumaroyl)-rutinosida, Sianidin 3-(6"-p-coumaroyl)-rutinosida, Delphinidin-3-(cis-p-coumaroyl-glukosida) dan Cyanidin-3-(p -coumaroyl) glukosa. Oleh karena itu, ekstrak bunga telang telah berhasil dibuktikan mengandung senyawa kelompok antosianin.

##### Kata kunci:

*antosianin, clitoria ternatea, uhplc-ms/ms*

## PENDAHULUAN

Bunga telang atau yang disebut *Clitoria ternatea* L, merupakan tanaman yang tergolong istimewa karena memiliki senyawa yang penting dalam pengobatan tradisional. Berdasarkan kandungan senyawa fitokimianya *Clitoria ternatea* L memiliki berbagai manfaat penting bagi kesehatan manusia, karena seluruh bagiannya dari akar sampai bunga dapat dimanfaatkan bagi kesehatan.

Beberapa efek farmakologis yang ada pada *Clitoria ternatea* L antara lain sebagai antimikroba, antiparasit, anti inflamasi, antikanker, antioksidan, antidepresan, antidiabetes, antihistamin, antimikroorganisme, antihiperlipidemik, dan regulasi kolesterol, anti asma, antikatarak dan lainnya (Rizal, 2023). Berikut adalah taksonomy dari *Clitoria ternatea* L:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Tracheophyta  
Infrodivisi : Angiospermae  
Kelas : Magnoliopsida  
Ordo : Fabales  
Familia : Fabacea  
Genus : *Clitoria*  
Spesies : *Clitoria Ternatea* L

Bagian dari kembang telang yang biasanya digunakan sebagai obat adalah daun, biji, kulit, kecambah, batang, bunga, dan akar. Kandungan fitokimia dari kembang telang yaitu tanin, flobatanin, saponin, triterpenoid, karbohidrat, flavonoid, flavonol glikosida, protein alkaloid, atrakuinon, antosianin, stigmasit 4-ena-3, 6 dion, minyak atsiri, dan steroid (Jeyaraj, Yau dan Wee, 2021). Biji bunga telang mengandung asam sinamat, finotin, dan beta sitosterol. Mahkota bunga telang mengandung flavonoid, antosianin, flavanol glikosida, kaempferol glikosida, quersetin glikosida, dan mirisetin glikosida.

Laporan hasil berbagai penelitian *Clitoria ternatea* L memiliki pengaruh farmakologis sebagai antimikroba, antiparasit, anti inflamasi, antikanker, antioksidan, antidepresan, antidiabetes, antihistamin, immonomodulator, dan potensi berperan dalam susunan syaraf (Zahara, 2022).

Identifikasi senyawa antosianin pada bunga telang dilakukan secara UPLC ditambah dengan instrumen spektrometer UV dan Massa. Kromatogram MS/MS elektro spray ion positif dan negatif serta spektrum senyawa antosianin ditentukan. Dengan menganalisis kromatogram dan spektrum untuk setiap ion, lima antosianin diidentifikasi dalam ekstrak bunga telang. Karena penelitian yang terbatas mengenai bioaktivitas fraksi kaya antosianin dari bunga *Clitoria ternatea* L, penelitian ini bertujuan untuk menentukan metode kromatografi kolom yang efisien untuk mendapatkan fraksi kaya antosianin dari bunga ini dan mengkarakterisasi komposisinya, antioksidan, antibakteri, dan aktivitas sitotoksik. Antosianin hadir dalam tanaman sebagai glikosida di mana antosianidin terikat pada gugus gula, dengan glukosa, galaktosa, rhamnosa, xilosa, atau arabinosa terikat pada aglikon. Enam jenis utama antosianidin yang paling banyak terdapat pada tumbuhan yaitu sianidin, delphinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin, dan malvidin (Gamage, 2021)

Antosianin merupakan pigmen penting yang larut dalam air termasuk dalam keluarga flavonoid. Ada lebih dari 600 antosianin berbeda telah dikarakterisasi. Secara struktural, antosianin merupakan turunan polihidroksi dan polietoksi terglukosilasi dari garam flavylum dan juga memiliki bentuk aglikon yang disebut antosianidin (Widowati, 2023).

Senyawa kelompok Cyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, malvidin, dan petunidin adalah antosianin yang paling umum ada pada tanaman yang berpigmen. Struktur yang berbeda bergantung pada jumlah, posisi gugus hidroksil dan metoksil pada cincin flavilium. Antosianidin sering terikat pada gula dan memberikan stabilitas serta kelarutan dalam air. Di antara gula, yang paling umum yaitu glukosa, galaktosa, arabinosa, rhamnosa dan xilosa, yang biasanya hadir dalam bentuk 3-monoglikosida dan 3,5-diglikosida (Gupta, 2015).

Aktivitas antioksidan yang dilakukan oleh Jelantik dan Cahyaningsih (2022) dengan ekstrak etanol kemudian diukur dengan uji pendahuluan fitokimia didapatkan kandungan flavonoid, saponin, terpenoid, tanin dengan menunjukkan hasil positif, sedangkan alkaloid dan antrakuinon menunjukkan hasil negatif, dan didapatkan hasil IC<sub>50</sub> antioksidan yang kuat. Hal tersebut juga dilakukan oleh Cahyaningsih, Sandhi dan Santoso (2019) bahwa senyawa yang terkandung pada *Clitoria ternatea* L merupakan senyawa yang diduga termasuk dalam kelompok antosianin (Andriani dan Murtisiwi, 2018).

Berdasarkan hal tersebut di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa spesifik dari jenis antosianin yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya.

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat dan bahan**

Bunga *Clitoria ternatea* L, Etanol 96%, Metanol grade HPLC (Merck), H<sub>2</sub>O ultrapure (Milli-Q) Rotary evaporator (Buchi), Ultra High Performance Liquid Chromatography – Mass spectroscopy/ Mass spectroscopy (uHPLC-MS/MS) Triple Sigle Quadropole (TSQ) Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific).

### **Cara Kerja**

Sebanyak satu kilogram simplisia *Clitoria ternatea* L dikeringanginkan pada suhu kamar sehingga kadar air pada serbuk menjadi minimal. Serbuk kering diekstraksi dengan menggunakan etanol dengan campuran HCl 0,3% dengan metode maserasi selama 1 hari, kemudian filtrat dikeringkan dengan menggunakan rotary evaporator. Hasilnya didapatkan ekstrak pekat dengan massa 216 gram.

Sebanyak 10 mg ekstrak tersebut dilarutkan dalam 10 metanol dengan campuran asam formiat 0,1 % untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 mg/L. Larutan tersebut difiltrasi ulang dengan syringe filter 0.22 µm sehingga didapatkan larutan siap diukur menggunakan uHPLC-MS/MS.

Sebanyak 2 µL larutan dimasukkan kedalam uHPLC MS/MS dengan menggunakan eluen pembawa kombinasi A (H<sub>2</sub>O + HCOOH 0,1%) dan B (CH<sub>3</sub>CN HCOOH 0,1%) dengan komposisi pada 0-1 menit (95:5) kemudian diubahkan secara bertahap hingga pada menit ke-15

(5:95) dan ditahan hingga menit ke 17. Komposisi pelarut dikembalikan pada keadaan awal dari menit ke-17 hingga menit ke 20 (95 : 5).

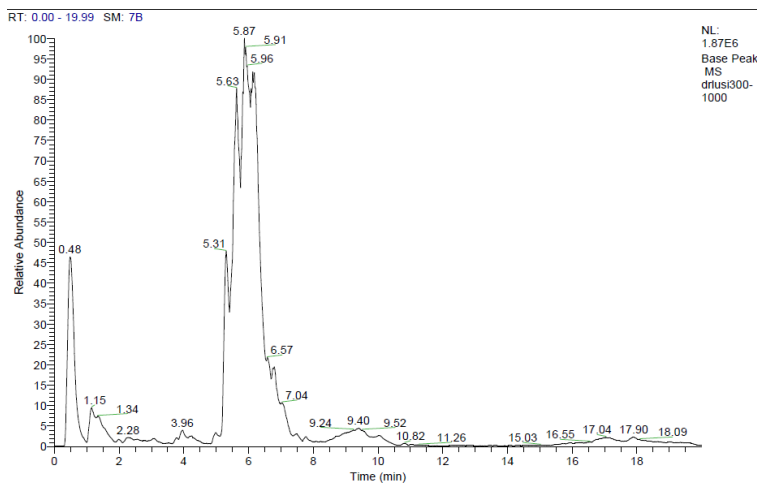
Pengukuran massa dilakukan dengan Quadrupole pertama (Q1) dan Quadrupole ketiga (Q3) diatur parameter spray voltage 3500 V, vaporizer temperature 325°C, sheath gas pressure 30 psi, aux gas pressure 5 psi, capillary temperature 270°C. Pada Collision Cell (Q2) diatur energi tumbukan sebesar 30 V dan tekanan gas argon 1,5 psi. Sehingga didapatkan spektrum massa parent peak dari Q1 dan spektrum massa fragmentasi yang dihasilkan dari Q3.

## HASIL

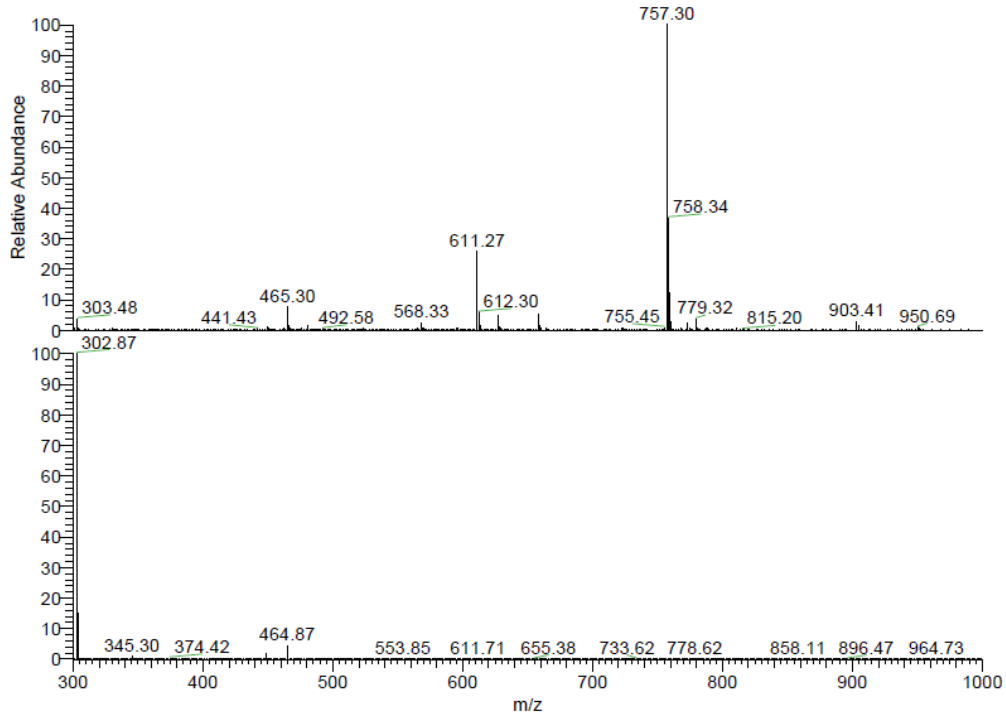
Pengukuran dengan menggunakan uHPLC-MS/MS pada ekstrak bunga telang dihasilkan kromatogram uHPLC sebanyak empat senyawa diduga antosianin seperti yang ditampilkan pada Tabel 1. Sinyal MS1 merupakan hasil pengukuran molekul tanpa mengalami proses fragmentasi. Pengukuran dilakukan pada mode positif sehingga sinyal yang muncul ditafsirkan sebagai  $[M+H]^+$ , Sementara MS2 merupakan sinyal fragmen molekul yang telah lakukan collision dengan energi 30 Volt.

**Tabel 1. Senyawa antosianin pada ekstrak telang**

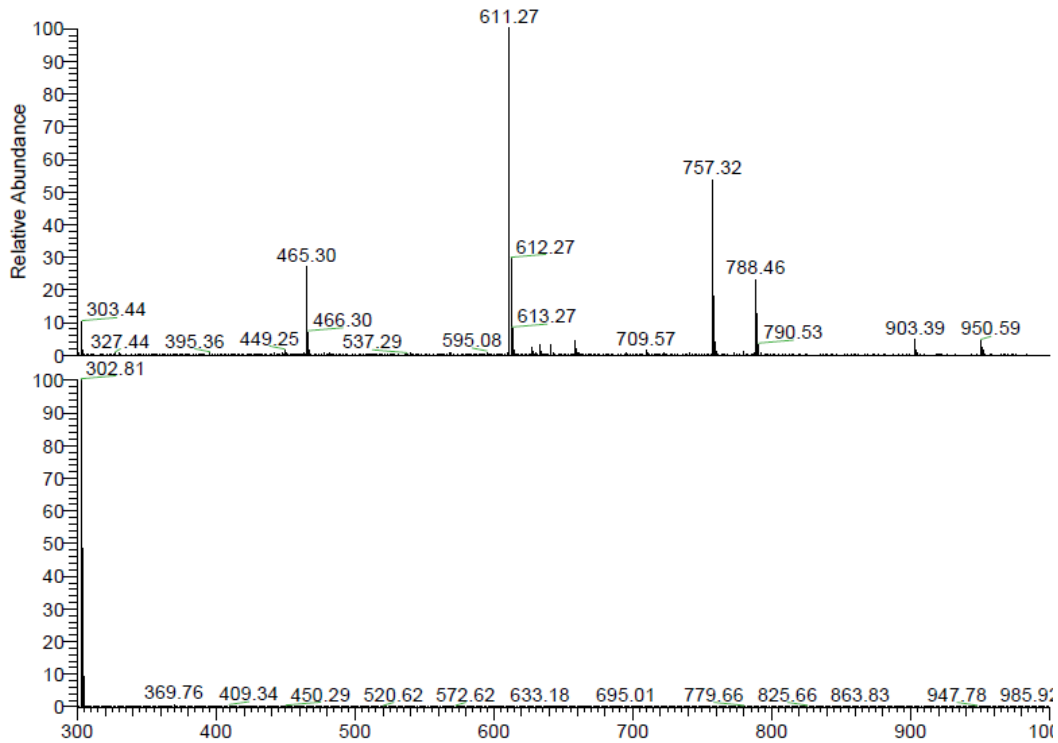
Waktu retensi (menit)	M+H (MS <sup>1</sup> )	Massa molekul	Fragmentasi (MS <sup>2</sup> )	Dugaan senyawa
5.31	757	756	464, 301	Delphinidin-3-(6"- <i>p</i> - coumaroyl)-rutinoside
5.53	611	610	302	Sianidin 3-(6"- <i>p</i> - coumaroyl)-rutinosida
5.63	741	740	449, 433, 328	Delphinidin-3-( <i>cis</i> - <i>p</i> - coumaroyl)-glukosida)
5.87	595	594	433, 395, 328	Cyanidin-3-( <i>p</i> - coumaroyl)glukosa



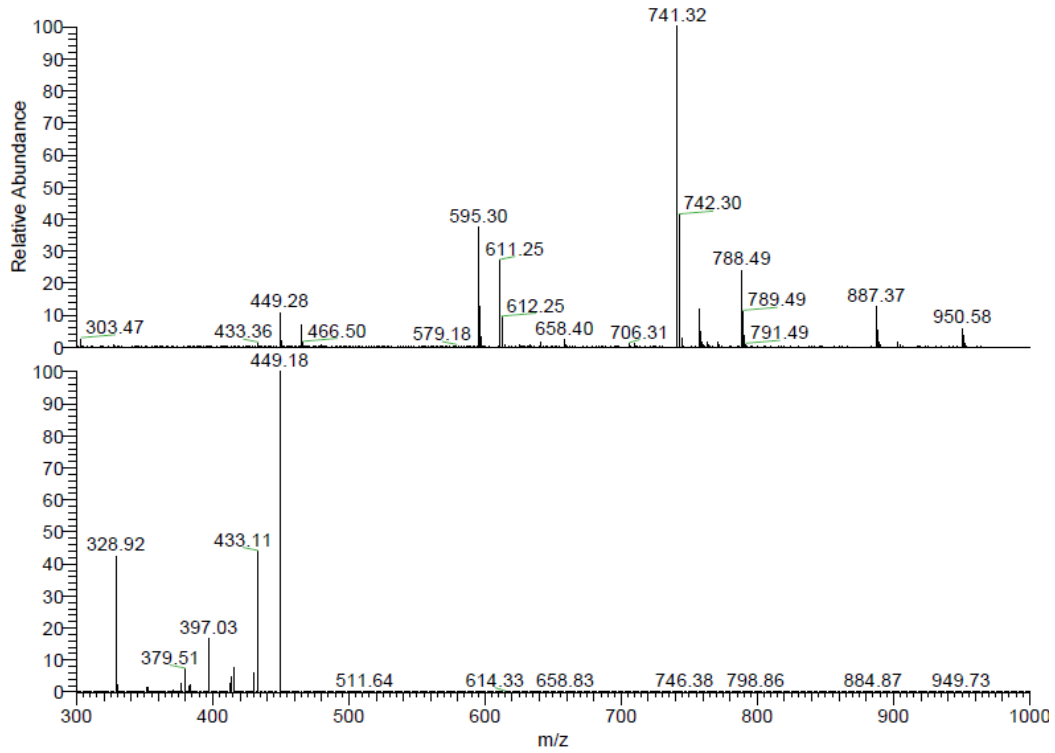
**Gambar 1. Kromatogram uHPLC yang menunjukkan kelompok antosianin**



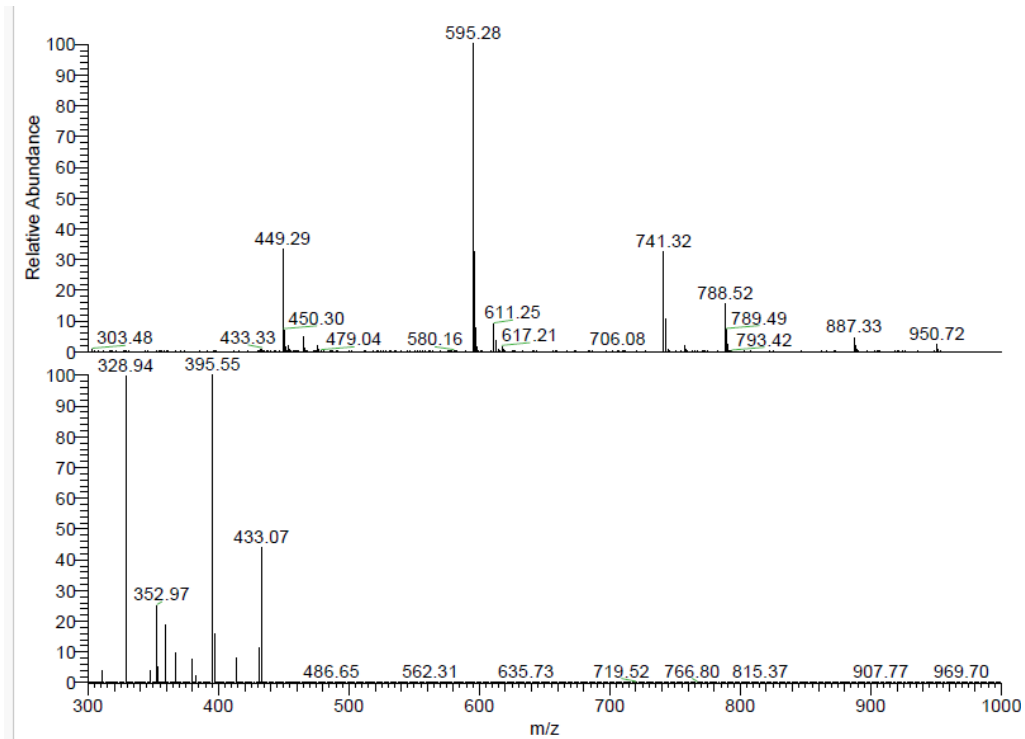
Gambar 2. Spektrum massa puncak 5.31 menit (atas) spektrum MS 1 (bawah) spektrum MS2



Gambar 3. Spektrum massa puncak 5.53 menit (atas) spektrum MS 1 (bawah) spektrum MS2



Gambar 4. Spektrum massa puncak 5.63 menit (atas) spektrum MS 1 (bawah) spektrum MS2



Gambar 5. Spektrum massa puncak 5.87 menit (atas) spektrum MS 1 (bawah) spektrum MS2

## PEMBAHASAN

Ekstraksi kelompok senyawa antosianin dalam bunga telang dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol dengan campuran HCl 0,1 %. Penggunaan HCl dalam proses ekstraksi ini diharapkan dapat membantu solvasi pelarut terhadap antosianin sehingga proses ekstraksi akan semakin maksimal. Antosianin merupakan kelompok flavonoid yang bermuatan positif pada atom oksigen. Oleh karena itu suasana diharapkan akan membantu ekstraksi lebih selektif terhadap antosianin.

Pemisahan pelarut menggunakan bantuan rotary evaporator bertujuan untuk dapat menguapkan pelarut secara cepat pada suhu lebih rendah. Instrumen rotary evaporator bekerja pada tekanan lebih rendah sehingga menurunkan titik didih pelarut etanol. Pada suhu operasi 50°C penguapan etanol dalam filtrat secara maksimal telah menghasilkan ekstrak kasar yang kaya antosianin. Pengukuran menggunakan uHPLC MS/MS bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa kelompok antosianin berdasarkan massa molekul dan fragmentasi setelah diberikan energi pada collision cell.

Kromatogram uHPLC dari ekstrak telang menunjukkan ada empat puncak senyawa antosianin, yaitu pada waktu retensi 0.48; 5.31; 5.53 dan 5.63 menit seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Pada puncak sinyal 5.31 menit terukur senyawa dengan  $m/z$  757 (M+H)<sup>+</sup> yang mengindikasikan molekul dengan massa 756. Fragmentasi terbentuk pada 303 yang menunjukkan molekul induk Delphinidin. Sementara gugus sisanya adalah coumaroyl dan rutosida yang ditunjukkan pada fragmentasi 464. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa tersebut adalah Delphinidin-3-(6"- p -coumaroyl)-rutosida. Spektrum dengan sinyal pada waktu retensi 5.31 menit ditunjukkan pada Gambar 2.

Pada puncak sinyal 5.53 menit terukur senyawa dengan  $m/z$  611 (M+H)<sup>+</sup> yang mengindikasikan molekul dengan massa 610. Fragmentasi molekul terdeteksi pada 302. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa tersebut adalah Sianidin 3-(6"- p-coumaroyl)-rutosida. Spektrum massa senyawa pada waktu retensi 5.53 ini ditunjukkan oleh Gambar 3. Pada puncak sinyal 5.63 menit terukur senyawa dengan  $m/z$  741 (M+H)<sup>+</sup> yang mengindikasikan molekul dengan massa 470. Fragmentasi terbentuk pada 449, 433 dan 328 yang menunjukkan terdapat gugus Coumaroyl dan glukosa. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa tersebut adalah Delphinidin-3-( cis - p -coumaroyl-glukosida). Kemungkinan senyawa ini bercampur dengan Delphinidin-3-(trans- p -coumaroyl-glukosida). Pada puncak sinyal 5.87 menit terukur senyawa dengan  $m/z$  595 (M+H)<sup>+</sup> yang mengindikasikan molekul dengan massa 594. Fragmentasi terbentuk pada 433, 395 dan 328. Fragmen 328 menunjukkan gugus Cyanidin, sementara gugus 433 menandakan hilangnya gugus glukosa. Keterangan tersebut mengindikasikan bahwa senyawa tersebut adalah Cyanidin-3-( p -coumaroyl) glukosa.

## KESIMPULAN

Jenis senyawa antosianin dalam bunga telang telah diidentifikasi menggunakan metode uHPLC-MS/MS pada ekstrak etanol dengan HCl 0,1 % terbukti dapat menarik senyawa kelompok antosianin dalam bunga telang. Senyawa antosianin yang teridentifikasi pada antara waktu retensi antara lima hingga tujuh menit. Senyawa antosianin yang teridentifikasi

Delphinidin-3-(6"- p -coumaroyl)-rutinosida, Sianidin 3-(6"- p -coumaroyl)-rutinosida, Delphinidin-3-( cis - p -coumaroyl)-glukosida) dan Cyanidin-3-( p -coumaroyl)glukosa.

## SARAN

Untuk penelitian berikutnya disarankan memisahkan senyawa antosianin tersebut dan menguji aktivitas biologisnya.

## Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada laboratorium Herbal Universitas YARSI dalam penyediaan fasilitas penelitian dan pengukuran uHPLC-MS/MS.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andriani D dan Murtisiwi L 2018. Penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria Ternatea* L.) dengan spektrofotometri Uv Vis. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 2(1), 32–38. Tersedia pada: <https://doi.org/10.31596/cjp.v2i1.15>.
- Cahyaningsih E, Sandhi PE dan Santoso P 2019. Skrinning fitokimia dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan metode spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 5(1), 51–57. Tersedia pada: <https://doi.org/10.36733/medicamento.v5i1.851>.
- Escher GB, Wen M, Zhang L, Rosso ND, & Granato D 2020. Phenolic composition by UHPLC-Q-TOF-MS/MS and stability of anthocyanins from *Clitoria ternatea* L.(butterfly pea) blue petals. *Food chemistry*, 331, 127341.
- Fikayuniar L *et al.*, 2023. Skrinning Fitokimia serta uji karakteristik simplisia dan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan berbagai metode. *Jurnal Ilmiah Wabana Pendidikan*, 9(15), 308–320. Tersedia pada: <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.8208374>.
- Gupta GK, Chahal J dan Bhatia M 2015. *Clitoria ternatea* (L.): Old and new aspects. *Journal of Pharmacy Research*, 3(11), 2610–2614.
- Jelantik RCANP dan Cahyaningsih, E 2022. Potensi antioksidan bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai penghambat hiperpigmentasi akibat paparan sinar ultraviolet. *Scientific Journal of Pharmacy*, 18(1), 45–54. Tersedia pada: <https://doi.org/https://doi.org/10.20885/jif.vol18.iss1.art5>.
- Jeyaraj EJ, Lim YY, & Choo WS 2022. Antioxidant, cytotoxic, and antibacterial activities of *Clitoria ternatea* flower extracts and anthocyanin-rich fraction. *Scientific Reports*, 12(1), 14890
- Jeyaraj JE, Yau YL dan Wee SC 2021. Extraction methods of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) flower and biological activities of its phytochemicals. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2054–2067. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04745-3>
- Jeyaraj JE, Yau YL dan Wee SC 2022. Antioxidant, cytotoxic, and antibacterial activities of *Clitoria ternatea* flower extracts and anthocyanin-rich fraction. *Scientific Reports*, 12(1), 1–12. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19146-z>.
- Kazuma K, Noda N, & Suzuki M 2003. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, 64(6), 1133-1139.



- Kazuma K, Noda N, & Suzuki M 2003. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, 62(2), 229-237
- Marpaung AM 2020. Tinjauan manfaat bunga telang (*clitoria ternatea l.*) bagi kesehatan manusia. *Journal of Functional Food and Nutraceutical*, 1(2), 63–85. Tersedia pada: <https://doi.org/10.33555/jffn.v1i2.30>.
- Muntaha FM 2019. *Analisis bunga telang (Clitoria ternatea) dengan variasi pH metode high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)* (Doctoral dissertation, Universitas Pasundan).
- Nair V, Bang WY, Schreckinger E, Andarwulan N, & Cisneros-Zevallos L 2015. Protective role of ternatin anthocyanins and quercetin glycosides from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) blue flower petals against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(28), 6355-6365.
- Sumartini S 2020. Analisis bunga telang (*Clitoria ternatea*) dengan variasi ph metode liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (lc-ms/ms). *Pasundan Food Technology Journal (PFTJ)*, 7(2), 70-77.
- Susanti E, & Sari MI 2022. The LC-MS/MS Profile and Total Phenolic Content of Telang Flower Extract and Roselle as NPC1L1 Inhibitor Candidate. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 8(3), 164-169.
- Thuy NM, Minh VQ, Ben TC, Thi Nguyen MT, Ha HTN, & Tai NV 2021. Identification of Anthocyanin Compounds in Butterfly Pea Flowers (*Clitoria ternatea L.*) by Ultra Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet Coupled to Mass Spectrometry. *Molecules*, 26(15), 4539. <https://doi.org/10.3390/molecules26154539>
- Tripathi S, Annapureddy SR, & Sahoo S 2023. Intra-specific pharmacognostic biochemical screening of various populations of *Clitoria ternatea L.* using liquid chromatography/tandem mass spectrometry product ion scanning (LC-MS2 PIS). *Industrial Crops and Products*, 203, 117063.
- Vidana Gamage GC, Lim YY, & Choo WS 2021. Anthocyanins from *Clitoria ternatea* flower: Biosynthesis, extraction, stability, antioxidant activity, and applications. *Frontiers in Plant Science*, 12, 792303.
- Widowati W, Darsono L, Lucianus J, Setiabudi E, Obeng SS, Stefani S, & Rizal R 2023. Butterfly pea flower (*Clitoria ternatea L.*) extract displayed antidiabetic effect through antioxidant, anti-inflammatory, lower hepatic GSK-3 $\beta$ , and pancreatic glycogen on Diabetes Mellitus and dyslipidemia rat. *Journal of King Saud University-Science*, 35(4), 102579.
- Zahara M 2022. Deskripsi kembang telang dan manfaatnya. *Jurnal Jeumpa*, 9(2), 719–728. Tersedia pada: <https://doi.org/https://doi.org/10.33059/jj.v9i>
- Zona AHA 2021. Analisis anti inflamasi senyawa aktif bunga *Clitoria ternatea L* dengan pendekatan quantitative structure-activity relationship dan in silico. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. Akademi Analis Farmasi dan Makanan Putra Indonesia Malang. Tersedia pada: <http://www.ufrgs.br/actavet/31-1/artigo552.pdf>