

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian (Ruang Analisis Pati dan Karbohidrat), Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian dan Laboratorium Biomassa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan April sampai dengan Juni 2015.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer Varian tipe *cary 50 probe*, sentrifius merk Hitachi tipe CF16RX II, *shaker*, pH meter, timbangan, botol gelap, mikropipet, pipet tip, baskom, *juice extractor* merk *Cosmos*, dan alat-alat gelas.

Bahan baku yang digunakan adalah terung Belanda (*Cyphomandra betacea* Sendtn) sebagai bahan baku jus, asam galat, dan tanin. Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk keperluan analisis seperti larutan *buffer* HCl-KCl pH 1, larutan *buffer* sitrat pH 3,5 dan 4,5, air suling, serta bahan pembantu seperti kain saring, kertas saring, dan aluminium foil.

3.3 Metode Penelitian

Percobaan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial (2 x 4) dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah jenis kopigmen (K) yaitu tanin (K1) dan asam galat (K2). Faktor kedua adalah rasio molar kopigmen terhadap antosianin (R), yaitu Kontrol (R0), 50 (R1), 100 (R2) dan 150 (R3).

Data yang diperoleh diuji kemenambahan datanya dengan menggunakan uji Tuckey dan kesamaan ragam data diuji dengan menggunakan uji Bartlet. Data dianalisis dengan analisis ragam untuk mendapatkan penduga ragam galat dan mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan, kemudian untuk mengetahui perlakuan terbaik pengujian dilanjutkan dengan BNT pada taraf uji 5% (Steel dan Torrie, 1991).

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pembuatan larutan *buffer* pH 1, pH 3,5 dan pH 4,5

Pembuatan *buffer* pH 1, pH 3,5 dan pH 4,5 menggunakan metode Sudarmadji *et al.* (1997). *Buffer* HCl-KCl pH 1 dibuat dengan cara mencampurkan 50 mL larutan HCl 0,2 M dengan 97 mL larutan KCl 0,2 M, kemudian diencerkan dengan menambahkan air suling hingga volume 200 mL. *Buffer* sitrat pH 3,5 dibuat dengan cara mencampurkan 40 mL larutan asam sitrat 0,1 M dengan 11 mL larutan natrium sitrat 0,1 M, kemudian ditambahkan air suling hingga volume 100 mL. *Buffer* sitrat pH 4,5 dibuat dengan cara mencampurkan 28 mL larutan

asam sitrat 0,1 M dengan 23 mL larutan natrium sitrat 0,1 M, dan kemudian ditambahkan air suling hingga volume 100 mL.

3.4.2 Pembuatan jus terung Belanda

Jus terung Belanda dibuat dengan cara mengambil sebanyak 3 kg terung Belanda dicuci, dipotong delapan, kemudian diambil sarinya dengan menggunakan *juice extractor*. Sari buah yang di dapat kemudian di saring dengan menggunakan kain saring, lalu disentrifius dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 5°C selama 10 menit. Jus kemudian diambil cuplikannya untuk mengukur pH dan konsentrasi awal antosianin yang ditentukan secara spektrofotometri. Jus yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam botol dan di simpan dalam refrigerator untuk perlakuan selanjutnya.

3.4.3 Kopigmentasi antosianin jus terung Belanda

Kopigmentasi dilakukan dengan mengambil sebanyak 18 mL jus, kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap, lalu ditambahkan kopigmen yaitu tanin dan asam galat. Jumlah kopigmen tanin dan asam galat yang akan ditambahkan dihitung sesuai dengan masing-masing perlakuan rasio molar kopigmen terhadap antosianin (50, 100, dan 150) dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Jumlah kopigmen} = C \times \text{BM} \times V/1000 \times R$$

Keterangan :

C = Konsentrasi antosianin awal (mMol)

BM = Berat molekul (BM tanin = 1701 mg/mMol dan BM asam galat = 170 mg/mMol)

V = Volume sampel

R = Rasio molar 50, 100, dan 150

Botol sampel berisi jus yang telah ditambahkan tanin (315,11 mg, 630,21 mg, 945,32 mg) dan asam galat (31,49 mg, 62,98 mg, 94,47 mg) untuk masing-masing rasio (50, 100, dan 150) ditutup dan homogenkan dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit hingga tanin dan asam galat bercampur dengan jus. Masing-masing sampel disimpan di refrigerator selama ± 7 hari, waktu yang diperkirakan cukup untuk berlangsungnya kopigmentasi.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan untuk melihat efek batokromik dan hiperkromik dengan spektrofotometri, konsentrasi antosianin, retensi warna dan kinetika reaksi.

3.5.1 Pengamatan efek batokromik dan hiperkromik

Sampel antosianin yang tidak dikopigmentasi dan antosianin terkopigmentasi masing-masing sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam 3 mL larutan *buffer* pH 3,5. Absorban sampel diukur dengan spektrofotometer pada berbagai panjang gelombang 450 nm – 600 nm (*scanning*) sampai diperoleh Absorban tertinggi (A_{max}) (Rein, 2005). Analisis *scanning* dilakukan pada hari ke – 7 (diperkirakan sudah terjadi kopigmentasi) untuk mengamati peningkatan absorbansi maks (hiperkromik) dan pergeseran maks (batokromik).

3.5.2 Analisis konsentrasi antosianin

Penentuan kadar antosianin yang dinyatakan sebagai delphinidin-3-rutinosida dilakukan dengan metode perbedaan pH pada spektrofotometer (Giusti dan Worlsted, 2001). Sebanyak 1 mL jus yang tidak dikopigmentasi maupun

terkopigmentasi dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi yang berisi larutan *buffer* pH 1 dan 4,5 masing-masing 3 mL. Masing-masing sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada 525 nm dan 700 nm menggunakan air suling sebagai blanko. Konsentrasi antosianin dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Absorban sampel (A)} = (A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH4,5}}$$

$$\text{Total antosianin (mMol)} = (A \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

$$\text{Total antosianin (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Keterangan :

A_{max} = Absorban pada panjang gelombang maksimal

MW Delphinidin-3-rutinosida = 647,0 g/mol

DF = Faktor pengenceran

Konstanta absorptivitas molar = $\epsilon = 26.900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.5.3 Retensi warna

Perubahan warna antosianin jus terung Belanda tidak dikopigmentasi maupun terkopigmentasi dilakukan dengan pengukuran absorbansi pada larutan *buffer* sitrat pH 3,5 dan 525 nm. Retensi warna dihitung dengan rumus :

$$\text{Retensi Warna (\%)} = (A_t/A_0) \times 100\%$$

Keterangan :

A_0 : absorban pada hari ke-0

A_t : absorban pada hari ke-t (Rein dan Heinonen, 2004).

3.5.4 Kinetika reaksi antosianin

Pengujian kinetika degradasi antosianin dilakukan pada suhu 60°C dengan melarutkan 1 mL jus terung Belanda ke dalam 3 mL larutan *buffer* untuk masing-masing pH (1 dan 4,5) kemudian dipanaskan menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C selama 8 jam dengan interval waktu 2 jam, selanjutnya larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 525 nm (Shi *et al.*, 1992). Konstanta laju reaksi ordo pertama (k) ditentukan dari kemiringan garis, sedangkan waktu paruh ($t_{1/2}$) dihitung dengan menggunakan persamaan laju reaksi ordo satu sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \frac{dc}{dt} &= -k c \\ \frac{dc}{c} &= -k dt \\ \int_0^t \frac{dc}{c} &= -k \int_0^t dt \\ \ln \frac{c_t}{c_0} &= -k (t-0) \\ \ln \frac{c_t}{c_0} &= -k t \\ \text{pada } t &= t^{1/2} \quad \ln 0,5 = -k t^{1/2} \\ t^{1/2} &= -\frac{\ln 0,5}{k} \end{aligned}$$

Keterangan :

C_0 adalah konsentrasi awal antosianin

C_t adalah konsentrasi antosianin setelah pemanasan waktu t (Kopjar dan Pilizota, 2009).