

III. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Laboratorium Pengolahan Limbah Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian, dan Laboratorium Biomasa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada bulan Mei 2014 sampai dengan bulan Juli 2014.

B. Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit terung Belanda (*Cyphomandra betacea* Sendtn) diperoleh dari Medan, Sumatera Utara (tingkat kematangan 20-26 berdasarkan Heatherbell *et al.*, 1982) . Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah katekol merk Sigma Aldrich, tanin merk Sigma Aldrich, metanol, larutan *buffer* HCl-KCl pH 1, larutan *buffer* sitrat pH 3,5, larutan *buffer* sitrat pH 4,5 dan air suling.

Alat-alat yang digunakan antara lain *Rotary Vacuum Evaporator*, spektrofotometer merk varian tipe *cary 50 probe*, *centrifuge* merk Hitachi tipe CF16RX II, *shaker*, *waterbath*, pH meter, timbangan, botol coklat 15 mL, pipet

volumetri, pipet tetes, kertas saring Whatman No.42, Erlenmeyer 500 mL, gelas ukur, labu ukur, mortar, dan spatula.

C. Metode Penelitian

Penelitian dirancang dalam dua percobaan terpisah, masing masing menggunakan jenis kopigmen yang berbeda untuk setiap perlakuan, yaitu terdiri dari 2 faktor (3x5) dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah rasio molar kopigmen terhadap antosianin, katekol 0:1 (K0), 50:1 (K1), dan 100:1 (K2) dan tanin 0:1 (T0), 50:1 (T1), dan 100:1 (T2). Faktor kedua adalah lama penyimpanan, yaitu hari ke-0 (L0), hari ke-10 (L1), hari ke-20 (L2), hari ke-30 (L3), dan hari ke-40 (L4). Perlakuan disusun secara faktorial dalam rancangan acak kelompok lengkap (RAKL). Data yang diperoleh diuji kemenambahan datanya dengan menggunakan uji Tuckey dan kesamaan ragam diuji dengan menggunakan uji Bartlet. Data dianalisis untuk mendapatkan penduga ragam galat dan mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan, kemudian pengujian dilanjutkan dengan rasio ortogonal dan polinomial ortogonal pada taraf nyata 5% dan 1% (Steel and Torrie, 1991). Hasil kedua kopigmentasi dengan katekol dan tanin dibandingkan secara deskriptif.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Bahan

a. Pengupasan Kulit Terung Belanda dan Pengukuran Kadar Air

Terung Belanda dikupas dan diambil bagian kulitnya, kemudian dilayukan selama semalam pada ruangan yang tidak terpapar cahaya. Kulit terung Belanda yang

telah layu dipotong kecil-kecil dan diukur kadar airnya, sebagian disiapkan untuk diekstrak antosianinnya. Kadar air kulit terung Belanda dianalisis dengan menggunakan metode oven (AOAC, 1970), yaitu sebanyak 2 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan alumunium yang telah diketahui beratnya. Sampel dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3 jam, lalu dinginkan di dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang. Sampel kemudian dimasukkan kembali ke dalam oven selama 30 menit, lalu didinginkan di dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini dilakukan sampai mencapai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,0002 g). Kadar air dalam bahan didapat dengan perhitungan sebagai berikut :

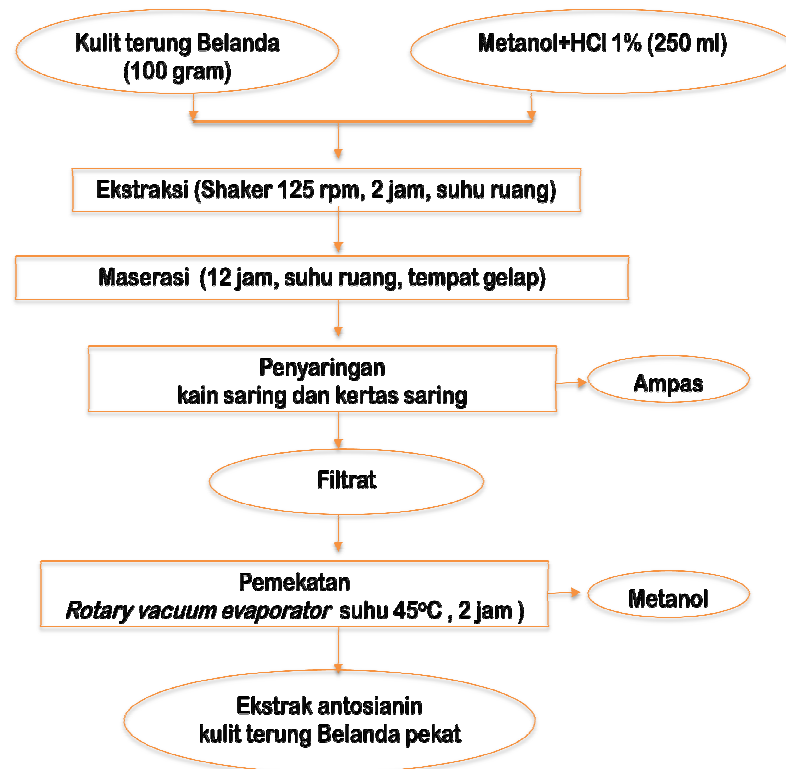
$$\text{Kadar air (BB) (\%)} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

b. Pembuatan Larutan *Buffer* pH 1, pH 3,5 dan pH 4,5

Buffer HCl-KCl pH 1 dibuat dengan cara mencampurkan 50 mL larutan HCl 0,2 M dengan 97 mL larutan KCl 0,2 M, dan kemudian diencerkan dengan menambahkan air suling hingga volume 200 mL (Sudarmadji *et.al.*, 1997). *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, dan kemudian ditambahkan air suling hingga volume 100 mL (Sudarmadji *et al.*, 1997). *Buffer* sitrat pH 4,5 dengan cara mencampurkan 28 mL larutan asam sitrat 0,1 M dengan 23 mL larutan sodium sitrat 0,1 M, dan kemudian ditambahkan air suling hingga volume 100 mL (Sudarmadji *et al.*, 1997).

2. Ekstraksi Pigmen Antosianin Kulit Terung Belanda

Ekstraksi antosianin dari kulit terung Belanda dilakukan dengan mengikuti metode ekstraksi maserasi Gao dan Mazza (1996) yang dapat dilihat pada Gambar 10. Sebanyak 100 g potongan kulit terung Belanda yang sudah diketahui kadar airnya ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmayer 500 mL, kemudian ditambahkan 250 mL metanol yang telah diasamkan dengan 2,5 mL HCl 1%. Selanjutnya campuran kulit terung Belanda – metanol diekstrak dengan bantuan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 2 jam. Larutan kemudian didiamkan selama 24 jam di ruang gelap pada suhu ruang, setelah itu disaring dengan menggunakan kain saring dan kertas saring Whatman No.42 untuk memisahkan padatan dan cairannya. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 45°C selama 2 Jam, dan dihasilkan pekatan ekstrak antosianin kulit terung Belanda. Pekatan ekstrak antosianin kemudian diambil cuplikannya untuk mengukur konsentrasi awal antosianin yang ditentukan secara spektrofotometri.



Gambar 10. Diagram alir ekstraksi antosianin kulit terung Belanda
Sumber : Gao dan Mazza (1996) dan Hanum (2000)

3. Kopigmentasi Antosianin Kulit Terung Belanda

Pekatan ekstrak antosianin yang sudah diukur volumenya sebanyak 5mL diencerkan dengan menambahkan *buffer* sitrat pH 3,5 sebanyak 3 kali volume pekatan untuk mendapatkan larutan yang lebih encer. Larutan dipisahkan dari endapan dengan menggunakan *centrifuge* kecepatan 10.000 rpm pada suhu 5°C selama 10 menit. Jumlah kopigmen (katekol dan tanin) yang akan ditambahkan dihitung sesuai dengan masing-masing perlakuan rasio molar kopigmen terhadap antosianin (50:1 dan 100:1) dengan perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan :

- C = Konsentrasi antosianin awal (mMol/L)
 BM = Berat molekul (BM katekol = 110,11 mg/mMol dan BM tanin = 1701 mg/mMol)
 V = Volume sampel (5 taraf perlakuan, masing-masing perlakuan 5mL)
 R = Rasio molar 50:1 dan 100:1

Kopigmentasi dilakukan dengan cara memasukkan 5 mL ekstrak antosianin kulit terung Belanda ke dalam botol gelap dan kemudian ditambahkan katekol (42,67 mg untuk rasio 50:1 dan 85,33 mg untuk rasio 100:1) atau tanin (659,14 mg untuk rasio 50:1 dan 1318,27 mg untuk rasio 100:1). Botol sampel kemudian ditutup dan homogenkan dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit hingga katekol atau tanin larut dan bercampur dengan ekstrak. Masing-masing sampel disimpan di tempat yang terpapar cahaya dan dianalisis pada hari ke 0, 10, 20, 30, dan 40.

E. Pengamatan

Pengamatan dilakukan untuk melihat: 1) efek batokromik dan hipokromik dengan spektrofotometri, 2) konsentrasi dan retensi warna antosianin selama penyimpanan pada suhu kamar dan terpapar cahaya, 3) stabilitas antosianin terhadap pemanasan pada suhu 65°C.

1. Pengamatan Efek Batokromik dan Hiperkromik

Sampel antosianin yang tidak dikopigmentasi (rasio 0:1) dan antosianin terkopigmentasi (50:1, dan 100:1) masing-masing sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam 6 mL larutan *buffer* sitrat pH 3,5. Kemudian absorban sampel diukur dengan spektrofotometer (*scanning*) pada selang panjang gelombang 450 nm –

600 nm sampai diperoleh Absorban tertinggi ($A_{\lambda_{\max}}$) (Rein, 2005). Analisis *scanning* dilakukan pada hari ke - 10 agar ekstrak antosianin yang terkopigmentasi (katekol dan tanin) sudah stabil. Kurva spektrofotometri hasil *Scanning* menunjukkan pergeseran panjang gelombang maksimum (efek batokromik), peningkatan absorbansi (hiperkromik) dan penurunan absorbansi (hipokromik).

2. Analisis Konsentrasi Antosianin

Penentuan konsentrasi antosianin dilakukan dengan metode perbedaan pH pada Spektrofotometer (Giusti dan Worlstad, 2001). Konsentrasi monomer antosianin dinyatakan sebagai sianidin 3-rutinosida. Sampel sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi yang masing-masing berisi 6 mL larutan buffer pH 1 dan pH 4,5. Nilai absorban setiap sampel diukur dengan spektrofotometer pada λ 525 nm dan λ 700 nm, menggunakan air suling sebagai blanko. Konsentrasi dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Absorban sampel (A)} = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

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

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

Keterangan:

$A_{\lambda_{\max}}$ = Absorban pada panjang gelombang maksimal

MW Sianidin 3-rutinosida = 630,9 g/Mol

DF = Faktor pengenceran

Konstanta absorptivitas molar = $\epsilon = 28.800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3. Retensi Warna

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui retensi warna ekstrak antosianin kulit terung Belanda tidak dikopigmentasi maupun terkopigmentasi selama penyimpanan dengan pengukuran absorbansi pada larutan *buffer* sitrat pH 3,5 dan λ 525 nm. Retensi warna selama penyimpanan dihitung dengan rumus :

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

Keterangan :

A_t : Absorban pada hari ke-t

A_0 : Absorban pada hari ke-0 (Rein dan Heinonen, 2004).

4. Kinetika Degradasi Antosianin pada Suhu 65 °C

Pengujian kinetika degradasi antosianin pada suhu tinggi (65 °C) dilakukan dengan melarutkan 0,5 mL pekatan antosianin kulit terung Belanda ke dalam 6 ml masing-masing larutan *buffer* HCl-KCl pH 1, 3,5 dan 4,5 kemudian dipanaskan menggunakan *waterbath* pada suhu 65°C selama 8 jam dengan interval waktu 2 jam. Larutan diukur absorbansinya pada λ 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:

$$\frac{dc}{dt} = -k c$$

$$\frac{dc}{c} = -k dt$$

$$\int_0^t \frac{dc}{c} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln \frac{ct}{c_0} = -k (t - t_0)$$

$$\ln \frac{ct}{c_0} = -k t$$

$$\text{pada } t = t_{1/2} \quad \ln 0,5 = -k t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k}$$

Keterangan :

c_0 adalah antosianin awal

c_t adalah antosianin setelah pemanasan suhu diberikan terhadap waktu
(Kopjar dan Pilizota, 2009).