

EKSTRAKSI ANTOSIANIN DARI BUAH MURBEI (*Morus alba. L*) METODE MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION (KAJIAN WAKTU EKSTRAKSI DAN RASIO BAHAN: PELARUT)

Extraction Of Anthocyanin From Mulberry Fruit (*Morus alba. L*) With Microwave Assisted Extraction (Study of Extraction Time and Solid: Liquid Ratio)

Aliefa Nur Azmi^{1*}, Yunianta¹

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, Email: ifa_mamy26@yahoo.com

ABSTRAK

Terbatasnya kualitas dan sumber pewarna alami menyebabkan penggunaan pewarna sintetis berkembang pesat, sehingga diperlukan pencarian alternatif pewarna alami seperti antosianin. Antosianin memiliki efek baik bagi tubuh. Antosianin banyak terdapat di buah salah satunya yakni buah murbei (*Morus alba L.*). Kadar antosianin pada buah murbei cukup tinggi berkisar antara 147.68 hingga 2725.46 mg/100gr. Ekstraksi pada umumnya menggunakan ekstraksi konvensional yang memakan banyak waktu dan tidak efektif. Oleh karena itu, diperlukan teknik ekstraksi yang cepat dan efisien yaitu MAE (*Microwave Assisted Extraction*). Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor perlakuan yaitu faktor I adalah waktu ekstraksi (40, 60, 80 detik) dan faktor II adalah rasio bahan:pelarut (1:4, 1:5, 1:6 b/v). Perlakuan terbaik diperoleh dari perlakuan waktu ekstraksi selama 80 detik dan rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v) dengan kadar antosianin 2434.74 ppm, aktivitas antioksidan IC_{50} 227.80 ppm, pH 3.32, rendemen 32.78%, tingkat kecerahan (L) 18, tingkat kemerahan (a^*) 8.70, dan tingkat kekuningan (b^*) 15.20. Perbandingan ekstraksi konvensional dengan pelarut menunjukkan ekstraksi dengan MAE menghasilkan nilai yang lebih baik pada semua parameter yang diuji.

Kata Kunci: Antosianin, Buah Murbei, MAE

ABSTRACT

*The limited quality and sources of natural dyes led to the use of synthetic dyes developed rapidly, so that the necessary search for an alternative natural dyes such as anthocyanin. Anthocyanins has a good effect on the body. Anthocyanins are common fruits. One of them is mulberry fruits (*Morus alba L.*). Anthocyanin levels in mulberry fruit is quite high ranging from 147.68 to 2725.46 mg/100gr. Extraction generally uses conventional extraction. Conventional extraction using a long time and are not effective. Therefore, the required extraction techniques that is fast and efficient microwave assisted extraction. The research was carried out using Randomized Block Design with 2 treatment namely extraction time (W) which is made up of three levels (40, 60, 80 seconds) and the ratio of solid:liquid (P) which is made up of three levels (1:4, 1:5, 1:6 w/v). The best treatment was obtained from the extraction time for 80 seconds and the ratio of solid:liquid 1:6 (w/v), with the levels of anthocyanin reached 2434.74 ppm, antioxidant activity IC_{50} 227.80 ppm, pH 3.32, yield 32.78%, the level brightness (L) 18, the degree of redness (a^*) 8.70, yellowish level 15.20 (b^*). Comparison with conventional extraction with solvent extraction showed that MAE has a better grades on all parameters tested.*

Keyword: Anthocyanin, MAE, Mulberry Fruit

PENDAHULUAN

Pada era modern ini penggunaan zat warna dalam makanan sangat populer. Terbatasnya kualitas dan sumber pewarna alami menyebabkan penggunaan pewarna sintetis berkembang pesat. [1] mengungkapkan bahwa penggunaan pewarna sintetis makanan secara berkesinambungan dapat menyebabkan kerusakan pada organ hati. Untuk itu diperlukan pencarian alternatif pewarna alami seperti antosianin [2]. Menurut [3] menyatakan bahwa ekstrak yang mengandung antosianin mempunyai efek toksisitas yang rendah, dapat mengurangi resiko penyakit jantung koroner, resiko stroke, aktivitas antikarsinogen, efek *anti-inflammatory*, dan dapat memperbaiki ketajaman mata. Antosianin terdapat pada sejumlah buah-buahan, salah satunya yakni buah murbei (*Morus alba L.*). Pemanfaatan tanaman murbei di Indonesia masih sangat terfokus pada daun murbei yang digunakan untuk pakan ulat sutera padahal buah memiliki kadar antosianin cukup tinggi berkisar antara 147.68 hingga 2725.46 mg/100 g [4].

Ekstraksi biasanya dilakukan dengan metode konvensional yang memakan banyak waktu dan tidak efektif. Namun, beberapa tahun terakhir telah dikembangkan beberapa teknik ekstraksi yang cepat dan efisien. Salah satunya yaitu MAE. MAE (*Microwave Assisted Extraction*) atau ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro merupakan proses ekstraksi yang memanfaatkan energi yang ditimbulkan oleh gelombang mikro dengan frekuensi 0.30-300 GHz dalam bentuk radiasi non-ionisasi elektromagnetik [5]. Keuntungan MAE yakni aplikasinya yang luas dalam mengekstrak berbagai senyawa termasuk senyawa yang labil terhadap panas. Selain itu, laju ekstraksi yang lebih tinggi, konsumsi pelarut yang lebih rendah, dan pengurangan waktu ekstraksi yang signifikan dibanding ekstraksi konvensional [6].

Oleh karena itu perlu berdasarkan latar belakang diatas perlu dilakukan penelitian mengenai ekstraksi antosianin dari buah murbei (*Morus alba L.*) dengan metode MAE dengan kajian waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah murbei yang diperoleh dari petani murbei Pak Painu daerah Bumiaji Desa Pandanrejo Batu Jawa Timur. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi antosianin antara lain etanol dengan kemurnian teknis 96%, asam sitrat teknis yang diperoleh dari toko kimia Makmur Sejati Malang. Bahan kimia untuk analisis menggunakan grade PA (*Pro Analysis*) meliputi HCl pekat, asam asetat, KCl, buffer pH1, buffer pH 4.50, dan aquades yang diperoleh dari toko kimia Makmur Sejati Malang. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) dan Na-Asetat diperoleh dari toko kimia Makmur Sejati Malang.

Alat

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi antosianin antara lain pengering kabinet, blender ("Panasonic"), ayakan 60 mesh, sentrifuge ("Universal PLC-012E"), neraca analitik ("Denver Instrument M-310"), *microwave oven* ("Aowa", 2450 MHz, max 800 watt), corong kaca, botol kaca, kertas saring, aluminium foil, dan berbagai macam *glassware* (gelas *beaker*, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur), spatula, baskom plastik, sendok, dan pisau.

Alat yang digunakan untuk analisis antara lain tabung reaksi, corong kaca, bola hisap, erlenmeyer, spatula, cawan petri, labu ukur, gelas ukur, pipet tetes, pipet ukur, gelas *beaker*, desikator, oven ("Mettler U.30"), spektrofotometer dan kuvet ("Unico UV-2100"), color reader ("Minolta CR-100"), vortex mixer ("LW Scientific"), pH meter ("Ezido"), sentrifuge ("Universal PLC-012E").

Tahapan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian lanjutan. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan waktu ekstraksi dan variasi rasio bahan:pelarut. Penelitian lanjutan dilakukan untuk mengetahui waktu ekstraksidan pengaruh rasio bahan:pelarut terhadap karakteristik kimia dan fisik ekstrak antosianin.

Metode

Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan 2 faktor perlakuan yaitu Waktu Ekstraksi (W) yang terdiri dari 3 level (40, 60, 80 detik) dan faktor kedua yaiturasio bahan:pelarut (P) yang terdiri atas 3 level(1:4,1:5,1:6 b/v). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 27 satuan percobaan.

Prosedur Analisis

Analisis bahan baku awal meliputi :

1. Kadar air
2. Kadar antosianin
3. Aktivitas antioksidan

Analisis ekstrak antosianin buah murbei meliputi :

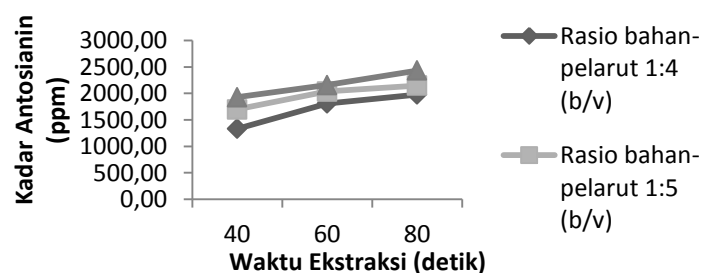
1. Kadar antosianin
2. Aktivitas antioksidan
3. Rendemen
4. pH
5. Warna (L,a,b).

Perlakuan terbaik menggunakan metode *zeleny*. Data hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam atau ANOVA (*Analysis of Variance*) metode Rancangan Acak Kelompok dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*)jika terdapat interaksiatau dilakukan uji lanjut BNT jika tidak terdapat interaksi dengan selang kepercayaan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kadar Antosianin Ekstrak Antosianin Buah Murbei

Hasil analisis rerata kadar antosianin ekstrak antosianin buah murbei dengan metode *microwave* akibat perlakuan waktu ekstraksi dan rasio bahan : pelarut berkisar antara 1333.21-2434.74 ppm. Rerata kadar antosianin antosianin tertinggi terdapat pada perlakuan waktu ekstraksi 80 detik yaitu sebesar 2188.32 ppm, sedangkan rerata kadar antosianin terendah terdapat pada perlakuan waktu ekstraksi 40 detik sebesar 1653.35 ppm.



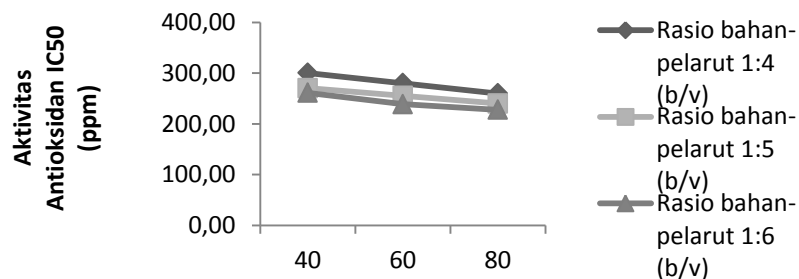
Gambar 1. Grafik Rerata Kadar Antosianin Ekstrak Antosianin Buah Murbei Akibat Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan:Pelarut (b/v)

Gambar 1 menunjukkan kadar antosianin mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi dengan *microwave*. Menurut [7] bahwa pemanasan gelombang mikro terjadi melalui interaksi langsung antara material dengan gelombang mikro. Interaksi langsung ini mengakibatkan pergerakan molekul yang menciptakan panas seiring dengan timbulnya gesekan antar molekul. Gesekan ini menyebabkan dinding sel maupun jaringan bahan akan rusak dan *solute* dapat keluar, sehingga semakin lama gesekan molekul terjadi maka semakin banyak pula energi yang terserap oleh bahan sehingga *solute* akan banyak keluar. Namun waktu paparan yang terlalu lama harus dihindari agar mencegah terjadinya degradasi senyawa hasil ekstraksi [8].

Rerata kadar antosianin berbanding lurus dengan rasio bahan : pelarut. Kadar antosianin tertinggi terdapat pada perlakuan rasio bahan : pelarut 1:6 (b/v) sebesar 2174.28 ppm, sedangkan rerata kadar antosianin paling rendah yakni perlakuan dengan rasio bahan : pelarut 1:4 (b/v) sebesar 1708.11 ppm. Volume pelarut harus mencukupi untuk memastikan bahwa bahan telah tercelup seluruhnya ke dalam pelarut selama proses iradiasi. Namun, menurut [10] dalam ekstraksi gelombang mikro volume pelarut yang lebih banyak dapat menghasilkan rendemen yang lebih rendah. Hal ini dikarenakan energi gelombang mikro lebih banyak terserap oleh pelarut sebelum sampai ke matriks bahan [9]. Selain berakibat pada turunnya rendemen, dari segi ekonomis jumlah pelarut yang berlebihan akan berakibat tingginya biaya bahan baku dan pemurnian.

2. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Antosianin Buah Murbei

Parameter yang digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan dari buah murbei ini yakni IC_{50} yaitu bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas suatu radikal bebas sebesar 50% [10]. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Hasil analisis rerata aktivitas antioksidan IC_{50} ekstrak antosianin buah murbei akibat perlakuan waktu ekstraksi dengan *microwave* dan rasio bahan : pelarut berkisar antara 300.40-227.87 ppm. Grafik rerata aktivitas antioksidan IC_{50} berbagai perlakuan waktu ekstraksi dan rasio bahan : pelarut dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Grafik Rerata Aktivitas Antioksidan Ekstrak Antosianin Buah Murbei Akibat Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan: Pelarut (b/v)

Gambar 2 menunjukkan rerata aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada perlakuan waktu ekstraksi 80 detik yaitu sebesar 242.66 ppm, sedangkan rerata aktivitas antioksidan terendah terdapat pada perlakuan waktu ekstraksi 40 detik sebesar 277.32 ppm. Menurut [11] tingkat kekuatan antioksidan terdiri dari empat bagian yakni kuat $IC_{50} < 50$ ppm, Aktif IC_{50} 50-100 ppm, Sedang IC_{50} 250-500 ppm, dan tidak aktif $IC_{50} > 500$ ppm. Terlihat bahwa hasil rerata aktivitas antioksidan akibat pengaruh waktu ekstraksi dengan *microwave* termasuk dalam kekuatan antioksidan sedang dan lemah. Hal ini diduga pada ekstrak antosianin murbei ini masih dalam ekstrak yang tidak murni.

Menurut [12] senyawa flavonoid dalam bentuk ekstrak yang tidak murni kemungkinan masih berikatan dengan gugus glikosida karena gugus glikosida yang berikatan dengan flavonoid dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Hal tersebut mengakibatkan flavonoid

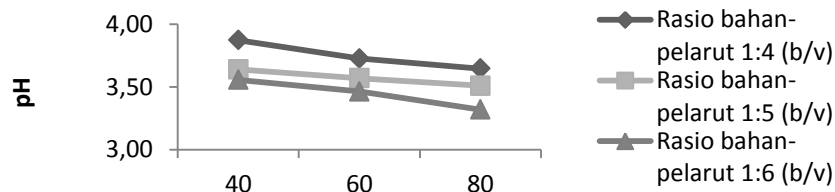
tidak dapat mendonasikan hidrogen dan elektron untuk menangkal radikal bebas dikarenakan terjadinya halangan sterik [13].

Rerata aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada perlakuan rasio bahan : pelarut 1:6 (b/v) sebesar 242.66 ppm, sedangkan rerata aktivitas antioksidan terendah diperoleh pada perlakuan rasio bahan : pelarut 1:4 (b/v) sebesar 280.15 ppm. Namun, terlihat bahwa hasil rerata aktivitas antioksidan akibat pengaruh rasio bahan:pelarut ekstrak antosianin murbei termasuk dalam kekuatan antioksidan sedang dan lemah. Hal ini disebabkan pada ekstrak murbei ini masih tergolong ekstrak kasar.

Adanya senyawa protein atau lemak pada ekstrak dapat mengganggu proses penangkapan radikal bebas oleh senyawa fenolik atau flavonoid [14]. Protein atau lemak pada tumbuhan dapat memberikan atom hidrogen yang dimilikinya sehingga akan berikatan dengan radikal hidroksil pada DPPH [15]. Oleh karena itu DPPH tetap berwarna ungu dan perubahannya pun agak lama sehingga mengganggu pengukuran serapan absorbansi ekstrak.

3. Nilai pH

Hasil analisis rerata pH ekstrak antosianin buah murbei akibat perlakuan waktu ekstraksi dengan microwave dan rasio bahan:pelarut berkisar antara 3.87-3.32. Grafik rerata pH berbagai perlakuan waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut dapat dilihat pada gambar 3.



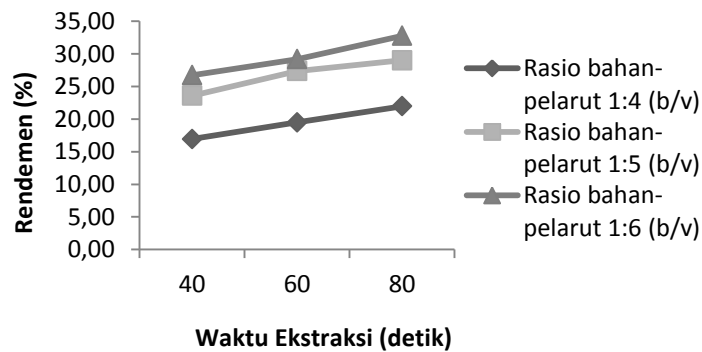
Gambar 3. Grafik Rerata pH Ekstrak Antosianin Buah Murbei Akibat Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan:Pelarut (b/v)

Rerata pH tertinggi terdapat pada perlakuan waktu ekstraksi 40 detik yaitu sebesar 3.69, sedangkan rerata pH terendah diperoleh pada perlakuan waktu ekstraksi 80 detik sebesar 3.49. Nilai pH mengalami penurunan seiring meningkatnya waktu ekstraksi dengan *microwave*. Menurut [16] ion H^+ yang terdapat didalam pelarut memiliki peranan dalam proses ekstraksi. Semakin banyak ion H^+ yang dilepaskan maka derajat keasaman atau pH larutan akan semakin rendah. Penggunaan asam yang ditambahkan ke dalam etanol ini berfungsi agar pelarut dalam keadaan asam dan ion H^+ yang dilepaskan oleh asam bersama dengan etanol akan mendenaturasi membran sel dari partikel-partikel buah murbei kemudian melarutkan pigmen antosianin keluar dari sel.

Rerata pH tertinggi terdapat pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:4 (b/v) yaitu sebesar 3.75, sedangkan rerata pH terendah diperoleh pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v) sebesar 3.45. Nilai pH mengalami penurunan seiring meningkatnya waktu ekstraksi dengan *microwave*. Perbandingan rasio bahan:pelarut yang lebih tinggi akan menghasilkan volume ekstrak yang lebih besar [17]. Larutan dengan volume yang lebih besar menyebabkan konsentrasi asam lebih rendah dibandingkan dengan larutan yang volumenya sedikit walaupun jumlah asamnya sama [17]. Hal ini diduga karena banyaknya ion H^+ yang dilepas oleh asam bersama etanol seiring semakin besarnya volume pelarut.

4. Rendemen

Hasil analisis rerata rendemen ekstrak antosianin buah murbei akibat perlakuan waktu ekstraksi dengan *microwave* dan rasio bahan:pelarut berkisar antara 16.94-32.78%. Grafik rerata rendemen ekstrak berbagai perlakuan waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar4. Grafik Rerata Rendemen Ekstrak Antosianin Buah Murbei Akibat Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan:Pelarut (b/v)

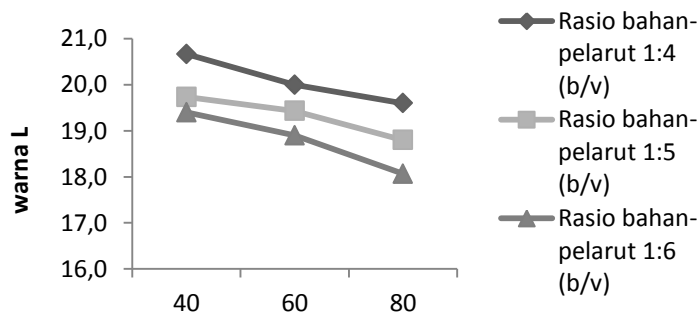
Gambar 4 menunjukkan bahwa semakin lama waktu ekstraksi, semakin tinggi pula rendemennya, sedangkan rasio bahan:pelarut yang semakin besar juga akan meningkatkan rendemen ekstrak. Rerata rendemen tertinggi didapat pada perlakuan waktu ekstraksi 80 detik yakni sebesar 27.92%, sedangkan rerata rendemen terendah didapat pada perlakuan waktu ekstraksi 40 detik sebesar 22.42%. Rendemen mengalami peningkatan seiring meningkatnya waktu ekstraksi dengan *microwave*.

Secara umum dengan semakin meningkatnya waktu ekstraksi, maka jumlah analit terekstrak akan semakin tinggi [9]. Hal ini disebabkan oleh gesekan antar molekul material dengan gelombang mikro. Gesekan ini menyebabkan dinding sel maupun jaringan bahan akan rusak dan *solute* dapat keluar, sehingga semakin lama gesekan molekul terjadi maka semakin banyak pula energi yang terserap oleh bahan sehingga *solute* akan banyak keluar [7].

Rerata rendemen tertinggi diperoleh dari perlakuan rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v) sebesar 29.57%, sedangkan rerata rendemen terendah diperoleh pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:4 (b/v) sebesar 19.47%. Hal ini diduga bahwa penggunaan volume pelarut yang lebih banyak menyebabkan terjadinya pembengkakan sel (*swelling*) dan tekanannya mendorong dinding sel dari dalam, meregangkan, dan memecahkan sel tersebut [18], Rusaknya matrik bahan mempermudah senyawa target keluar dan terekstraksi [19], sehingga semakin banyaknya volume pelarut menyebabkan rendemen semakin tinggi.

5. Tingkat Kecerahan (L)

Rerata tingkat kecerahan (L) ekstrak antosianin buah murbei akibat pengaruh waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut berkisar antara 18.10-20.70. Grafik pengaruh perlakuan waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut terhadap tingkat kecerahan (warna L) ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar5. Grafik Rerata Tingkat Kecerahan (L) Ekstrak Antosianin Buah Murbei Akibat Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan:Pelarut (b/v)

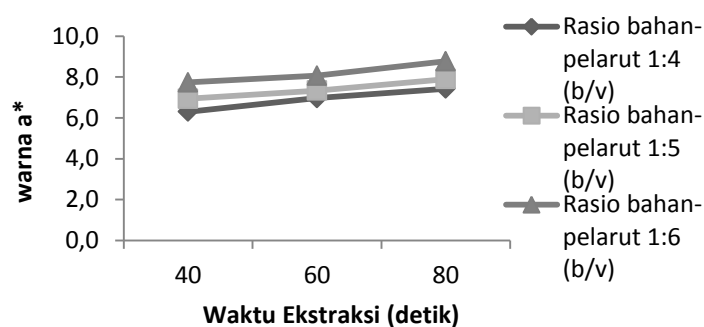
Perlakuan pada waktu ekstraksi 40 detik memiliki rerata tingkat kecerahan yang paling tinggi yakni sebesar 19.90, sedangkan rerata tingkat kecerahan paling rendah didapat pada perlakuan waktu ekstraksi 80 detik sebesar 18.80. [20] melaporkan bahwa peningkatan nilai L disebabkan penurunan konsentrasi atau jumlah kation flavilium dan meningkatnya pembentukan kalkon yang tidak berwarna dengan semakin meningkatnya pH.

Pada perlakuan rasio bahan:pelarut, nilai rerata tingkat kecerahan paling tinggi diperoleh pada rasio bahan:pelarut 1:4 (b/v) sebesar 20.10, sedangkan rerata tingkat kecerahan paling rendah pada rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v) sebesar 18.80. Penurunan tingkat kecerahan disebabkan banyaknya antosianin yang terekstrak seiring dengan besarnya volume pelarut yang digunakan.

Volume pelarut yang digunakan semakin banyak menyebabkan pembengkakan sel (*swelling*) dan tekanannya mendorong dinding sel dari dalam, meregangkan, dan memecahkan sel tersebut [18]. Antosianin akan banyak keluar dari sel yang mana akan menyebabkan pula tingkat kecerahan warna ekstrak antosianin yang semakin gelap. Hal ini diduga berkaitan dengan banyaknya gugus *chromophore*. Gugus *chromophore* sendiri merupakan gugus pembawa warna pada suatu pigmen [21] yang mana semakin tinggi konsentrasi pigmen maka jumlah gugus *chromophore* semakin banyak yang mengakibatkan warna menjadi lebih gelap.

6. Tingkat Kemerahan (a)

Rerata tingkat kemerahan (a^*) ekstrak antosianin buah murbei akibat pengaruh waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut berkisar antara 6.30-8.80. Grafik pengaruh perlakuan waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut terhadap tingkat kemerahan (a^*) ekstrak antosianin buah murbei dapat dilihat pada Gambar 6.



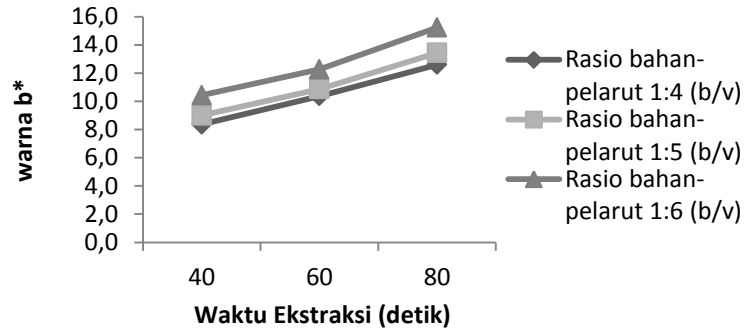
Gambar 6. Grafik Rerata Tingkat Kemerahan (a^*) Ekstrak Antosianin Buah Murbei Akibat Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan:Pelarut (b/v)

Perlakuan pada waktu ekstraksi 80 detik memiliki rerata tingkat kemerahan yang paling tinggi yakni sebesar 8, sedangkan rerata tingkat kemerahan paling rendah didapat pada perlakuan waktu ekstraksi 40 detik sebesar 7. Tingkat kemerahan pada ekstrak antosianin ini dipengaruhi oleh antosianin dan pH. Semakin tinggi kadar antosianin ekstrak, maka semakin naik tingkat kemerahan pada ekstrak. Sama halnya pada pH, pH semakin turun tingkat kemerahan pada ekstrak antosianin semakin meningkat. Hal ini sesuai dengan [20] yang menyebutkan bahwa warna merah larutan antosianin kulit buah duwet semakin berkurang dengan meningkatnya pH.

Nilai rerata tingkat kemerahan paling tinggi diperoleh pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v) sebesar 8.20, sedangkan rerata tingkat kemerahan paling rendah pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:4 (b/v) sebesar 6.90. Hasil ini sama seperti pengaruh waktu ekstraksi yang mana semakin besar rasio bahan:pelarut menyebabkan peningkatan tingkat kemerahan. Hal ini sama seperti yang dikemukakan [20] dan penelitian [22] yang menyatakan tingkat kemerahan ini dipengaruhi oleh pH.

7. Tingkat Kekuningan (b)

Rerata tingkat kekuningan (b^*) ekstrak antosianin buah murbei akibat pengaruh waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut berkisar antara 8.40-15.20. Grafik pengaruh pelakuan waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut terhadap tingkat kekuningan (b^*) ekstrak antosianin buah murbei dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar7. Grafik Rerata Tingkat Kekuningan (b^*) Ekstrak Antosianin Buah Murbei Akibat Pengaruh Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan:Pelarut (b/v)

Nilai rerata tingkat kekuningan paling tinggi diperoleh pada perlakuan waktu ekstraksi 80 detik sebesar 13.80, sedangkan rerata tingkat kekuningan paling rendah diperoleh pada perlakuan waktu ekstraksi 40 detik sebesar 9.30. Nilai rerata tingkat kekuningan paling tinggi diperoleh pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v) sebesar 12.60 sedangkan rerata tingkat kekuningan paling rendah diperoleh pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:4 (b/v). Meningkatnya tingkat kekuningan baik akibat dari pengaruh waktu ekstraksi maupun pengaruh rasio bahan:pelarut disebabkan kemungkinan semakin banyaknya kadar antosianin yang terekstrak. Menurut [23] menyatakan bahwa warna antosianin yang terlihat secara visual merupakan interaksi berbagai komponen warna antara lain L, a^* , b^* sehingga tingkat kekuningan berperan dalam menyusun warna antosianin. Hal ini diperkuat juga oleh [24] dan [25] yang menyatakan bahwa peningkatan nilai a^+ (tingkat kemerahan) dan b^+ (tingkat kekuningan/yellowness) yang cukup tinggi dari pigmen kulit buah naga merah, menunjukkan adanya sumbangan warna pigmen dominan merah dan sebagian cenderung kearah merah oranye yang merupakan ciri warna dari pigmen antosianin.

8. Pemilihan Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik akibat pengaruh waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut dipilih dengan menggunakan *Multiple Attribute* [26]. Penilaian meliputi parameter fisik dan kimia dari ekstrak antosianin buah murbei. Perlakuan terbaik dipilih berdasarkan tingkat kerapatannya, dimana perlakuan yang memiliki tingkat kerapatan paling kecil dinyatakan sebagai perlakuan terbaik. Berdasarkan, perlakuan terbaik diperoleh pada perlakuan dengan waktu ekstraksi 80 detik dan rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v).

Pada perlakuan kontrol dilakukan ekstraksi antosianin buah murbei menggunakan metode konvensional dengan maserasi [27]. Ekstraksi menggunakan *shaker waterbath* bersuhu 42°C selama 45 menit. Pelarut digunakan etanol yang diasamkan dengan asam sitrat 2% dengan rasio bahan:pelarut sama dengan perlakuan terbaik (1:6 b/v). Nilai parameter perlakuan terbaik dan perlakuan kontrol dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Kimia dan Fisik Ekstrak Antosianin Buah Murbei Berdasarkan Perlakuan Terbaik dan Perbandingannya dengan Perlakuan Kontrol

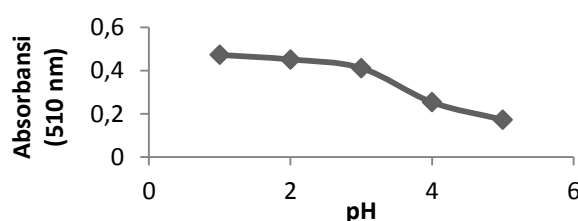
Parameter	Perlakuan Terbaik (MAE, 80 detik, rasio bahan:pelarut 1:6 b/v)	Kontrol (Maserasi, 45 menit, rasio bahan:pelarut 1:6 b/v)	Uji t (5%)
Kadar Antosianin (ppm)	2434.74	1762.87	*
Antioksidan IC ₅₀ (ppm)	227.80	300.08	*
pH	3.32	3.64	*
Rendemen (%)	32.78	29.26	*
Tingkat	18	20.30	*
Kecerahan (L)			
Tingkat	8.70	7.40	*
Kemerahan (a*)			
Tingkat	15.20	14.50	*
Kekuningan (b*)			

Keterangan : tn = tidak berbeda nyata, * = berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Pada tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak antosianin hasil perlakuan terbaik memiliki nilai parameter yang lebih baik dibandingkan ekstrak antosianin hasil ekstraksi konvensional. Hasil analisis statistik dengan uji t menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha=0,05$) pada semua parameter yang diuji antara ekstraksi MAE dengan ekstraksi konvensional (maserasi). Hal ini membuktikan bahwa teknik ekstraksi MAE dapat menjadi alternatif lain yang lebih baik dalam mengeskrak antosianin dari bahan alam. Ekstraksi konvensional membutuhkan pelarut yang lebih banyak dan waktu yang lebih lama. Selain itu, pada ekstraksi konvensional membutuhkan panas yang digunakan untuk memicu laju transfer massa di dalam system ekstraksi. Namun, MAE memberikan waktu ekstraksi yang lebih singkat, konsumsi energi dan pelarut yang lebih sedikit, *yield* yang lebih tinggi, akurasi, dan presisi yang lebih tinggi [28].

9. Uji Stabilitas Warna Ekstrak Antosianin Perlakuan Terbaik Terhadap pH

Uji stabilitas warna antosianin dari buah murbei terhadap pH maka dilakukan pengujian dengan berbagai titik pH yaitu dari pH 1 sampai dengan pH 5. Grafik stabilitas warna antosianin terhadap pengaruh pH dapat dilihat pada Gambar 9.

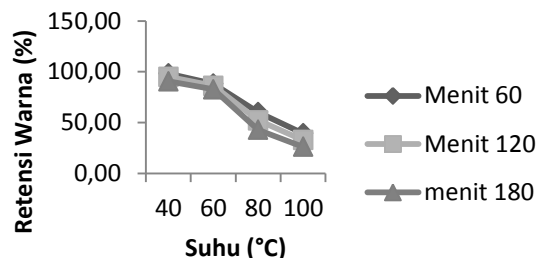


Gambar 9. Stabilitas Warna Ekstrak Antosianin Buah Murbei Terhadap Pengaruh pH

Grafik terlihat bahwa intensitas warna yang ditunjukkan oleh nilai absorbansi, nilainya semakin menurun dengan meningkatnya nilai pH. Pada pH 1 sampai dengan 3 terjadi penurunan tetapi kurang signifikan. Penurunan sangat tajam terjadi pada pH 3 menuju pH 4 dan pH 5. Hasil yang sama ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan [29] pada antosianin *cranberry*, dimana sekitar pH 1 antosianin *cranberry* menunjukkan intensitas warna paling bagus sedangkan pada pH 4.50, antosianin *cranberry* mendekati tidak berwarna (sedikit biru).

10. Uji Stabilitas Warna Ekstrak Antosianin Perlakuan Terbaik Terhadap Suhu

Pengujian Stabilitas warna antosianin buah murbei terhadap suhu dilakukan dengan pemanasan ekstrak antosianin pada suhu 40, 60, 80, dan 100°C selama 3 jam. Data absorbansi dan persentase retensi akibat pengaruh pemanasan ekstrak antosianin pada suhu 40, 60, 80, dan 100°C selama 3 jam. Grafik persentase retensi warna antosianin akibat pengaruh suhu dan lama pemanasan dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Persentase Retensi Warna Antosianin Akibat Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan

Pada gambar 10 menunjukkan bahwa secara umum absorbansi antosianin pada panjang gelombang maksimum mengalami penurunan dengan semakin meningkatnya suhu dan waktu pemanasan. Terlihat penurunan ini disebabkan degradasi antosianin karena panas. Pada pemanasan suhu 40 dan 60°C, penurunan nilai retensi warna tidak begitu signifikan. Namun dari suhu 60°C ke 80°C dan 100°C mengalami penurunan retensi warna yang cukup tinggi, dimana retensi warna terendah pada suhu 100°C selama 3 jam mencapai 26.21%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh [30] yang melakukan ekstraksi antosianin dari *blackcarrot* dengan pelarut etanol dimana penggunaan suhu tinggi mempengaruhi degradasi antosianin.

Suhu yang tinggi menyebabkan dekomposisi antosianin dari bentuk aglikon menjadi kalkan (tidak berwarna) dan akhirnya membentuk alfa diketon yang berwarna coklat [31]. Keberadaan O₂ pada suhu tinggi menyebabkan antosianin berubah menjadi coklat. Hal ini diperkuat oleh pernyataan [32], bahwa suhu dan lama pemanasan menyebabkan dekomposisi dan perubahan struktur sehingga terjadi pemucatan.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan waktu ekstraksi dengan microwave dan rasio bahan:pelarut memberikan pengaruh nyata ($\alpha=0,05$) terhadap kadar antosianin, aktivitas antioksidan, pH, rendemen, tingkat kecerahan, tingkat kemerahan, dan tingkat kekuningan ekstrak antosianin buah murbei. Namun tidak terjadi interaksi antara kedua perlakuan tersebut.

Perlakuan terbaik pada penelitian ini diperoleh pada perlakuan waktu ekstraksi dengan microwave selama 80 detik dan rasio bahan:pelarut 1:6 (b/v) dengan kadar antosianin 2434.74 ppm, aktivitas antioksidan 227.86 ppm, pH 3.32, rendemen 32.78%, tingkat kecerahan (L) 18, tingkat kemerahan (a^*) 8.70, dan tingkat kekuningan (b^*) 15.20. Perbandingan dengan ekstraksi konvensional dengan pelarut menunjukkan ekstraksi dengan MAE memiliki nilai yang lebih baik dari semua parameter yang diuji.

Hasil uji stabilitas menunjukkan bahwa ekstrak antosianin buah murbei mengalami penurunan stabilitas yang dipengaruhi oleh pH, suhu, dan waktu pemanasan. Peningkatan pH menyebabkan nilai absorbansi ekstrak makin kecil, sedangkan semakin tinggi suhu dan waktu pemanasan menyebabkan penurunan retensi warna yang semakin besar, hingga mencapai 26.21% pada suhu 100°C dan waktu 180 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Depkes RI. 2012. Pewarna Makanan. <http://depkes.go.id/index.php/berita/press-release/923-bahaya-penggunaan-pewarna-makanan.html>. Tanggal akses : 20/01/2014
- 2) Hanum, T. 2000. Ekstraksi dan Stabilitas Zat Pewarna Alami dari Katul Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa glutinosa*). *Buletin Teknologi Pangan XI* (1) : 17-23
- 3) JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2006. Consideration of maximum residue limits (MRL) for veterinary drugs. 66th JEFCA meeting. CX/RV DF 06/16/7, add 1. Food Standards Programme Codex Committee on Residues of veterinary Drugs in Foods
- 4) Liu, X. G., Xiao, W., Chen, Y., Xu, and Wu, J. 2004. Quantification and Purification of Mulberry Anthocyanins with Macroporous Resins. *J. Biomed Biotechnol.* 2004(5): 326-331
- 5) Delazer, A., Nahar, L., Hamedeyazden, S., and Sarker, S. D. 2012. Microwave-Assisted Extraction in Natural Product Isolation. *Di dalam* Satyajit D. Sarker and Lutfun Nahar (eds.) *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, vol. 864. Springer Science. New York
- 6) Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., and Gonzalez-Paramas, A. M. 2012. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. *Di dalam* Satyajit D. Sarker and Lutfun Nahar (eds), *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, vol. 864. Springer Science. New York
- 7) Kurniasari, L., dkk. 2008. Kajian Ekstraksi Minyak Jahe menggunakan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE). *Momentum* Vol 4 No.2
- 8) Chan, C., Yusoff, R., Ngoh G., and Kung, F. W. 2011. Microwave Assisted Extractions of Active Ingredients from Plants. *Journal of Chromatography A*, 1218:6213-6225
- 9) Mandal, V., Mohan Y., and Hemalatha, S. 2007. Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacoonosy Reviews* 1:7-18
- 10) Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radikal Diphenyl Picrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal Science of Technology* 26(2):211-219
- 11) Jun, M. H., Yu., J., Fong., X., Wan., C.S, Yang., C. T. and Ho. 2003. Comparison of antioxidant activities of isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria labata Ohwl*). *J. Food Sci. Institute of Technologist.* 68:211â€“2122
- 12) Ery, A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (*Cayratia trifolia*) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). (Skripsi) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya
- 13) Widyo, B., Sri, W., dan Andhi, F. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksana Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus lemairei* Britton dan Rose) menggunakan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil). *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Tanjung Pura.* Vol 1, No. 1 (2014)
- 14) Elsha, U. 2012. Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolik, dan Flavonoid Total Tumbuhan Suruhan (*Peperomia peluucida L. Kunth*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor
- 15) Pine, S. H., Hendrickson, J. B., Cram, D. J., and Hammond, G. S. 1988. *Kimia Organik I Terbitan Keempat.* Penerbit ITB. Bandung
- 16) Rene, N. M. 2010. Mempelajari Ekstraksi Pigmen Antosianin dari Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dengan Berbagai Jenis Pelarut. Jurusan Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan Bandung
- 17) Lailatul, I. 2010. Ekstraksi Pewarna Merah Cair Alami berantioksidan dari Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L*) dan aplikasinya pada Produk Pangan. *Jurnal Teknologi Pertanian* Vol. 11 No. 1 (April 2010) 18-28
- 18) Calinescu, I., Ciuculescu, C., Popescu, M., Bajenaru, S., and Epure, G. 2001. Microwave Assisted Extraction of active Principles from Vegetal Material. *Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, 12:1-6

- 19) Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., and Shukla, S. S. 2009. Microwave Assisted Extraction for Photocontituens – An Overview. *Asian Journal Research Chemistry*, 1(2):19-25
- 20) Jackman, R. L. and Smith, J. L. 1996. Anthocyanin and Betalanins. Di dalam *Natural Food Colorants*, Hendry, G. A. dan J. D. Houghton (ed). Blackie Academic & Professional. London
- 21) Delgado-Vargaz, F., Jimenez, A. R., and Paredes-Lopez, O. 2000. Natural Pigments : Carotenoids, Anthocyanins, and Betalanins – Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40 (3) : 173-289
- 22) Bolivar, A. C. and Luis, C. 2004. Stability of Anthocyanin-Based Aqueous Extracts of Andean Purple Corn and Red-Flashed Sweet Potato Compared to Synthetic And Natural Volorants. *J Food Chem* 86:69-77
- 23) Gonnet, J. 1998. Colour Effects of Co-Pigmentation of Anthocyanins Revisited-1 A Calorimetric Definition Using The Cielab Scale. *Food Chemistry*, 63(3):409-415
- 24) Nollet, L. M. 1996. Hand Book of Food Analysis Two Edition. Marcel Dekker Inc. New York
- 25) Fennema, O. R. 1976. Principle of Food Science. Marcell Dekker Inc. New York
- 26) Zeleny, C. 1982. Multiple Criteria Decision Making. Mc Graw-Hill Book Company. New York
- 27) Huang, C., Liao, W., Chan, C., and Lai, Y. 2010. Optimization for the Anthocyanin Extraction from Purple Sweet Potato Roots Using Response Surface Methodology. *J. Taiwan Agric. Res* 59 (3):143-150
- 28) Helmy, P. 2010. Pengembangan *Microwave Assisted Extractor* (MAE) pada Produksi Minyak Jahe dengan Kadar Zingiberene Tinggi. *Momentum* Vol.6 No. 2 : 9-16
- 29) Francis, F. J. 1985. Analysis of Anthocyanin. Di dalam Markakis, P., (ed). *Anthocyanin as Food Colour*. Academic Press. New York
- 30) Cacace, J. E. and Mazza, G. 2003. Extraction of anthocyanin and other Phenolic from Black Currants. Di dalam Jahangiri, Y., H. Ghahremani, J. A. Torghabeh, S. M. Hassani. 2012. The Effects of Operational Conditions on The Total Amount of Anthocyanins Extracted from Khorasan's Native Fig Fruit "Ficus carica". *Annals og biological research*, 2012, 3(5):2181-2186
- 31) Markakis, P. 1982. Food Chemistry. Di dalam Santi, W. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Antosianin Dari Kulit Buah Anggur (*Vitis Vinifera* Var. Prabu Bestari). Marcel Dekker Inc. New York
- 32) Sutrisno, A. D. 1987. Pembuatan dan Peningkatan Kualitas Zat Warna Alami yang dihasilkan oleh *Monascus purpureus* sp. Di dalam: Risalah Seminar Bahan Tambahan Kimiawi. Pau Pangan dan Gizi. Yogyakarta