

Pengaruh pH dan Temperatur pada Ekstraksi Antioksidan dan Zat Warna Buah Stroberi

H. Maria Ingrid, Albertus Reynaldi Iskandar

Program Studi Teknik Kimia, FTI, UNPAR, Jalan Ciumbuleuit 94, Bandung

E-mail: inggrid@unpar.ac.id

Abstract

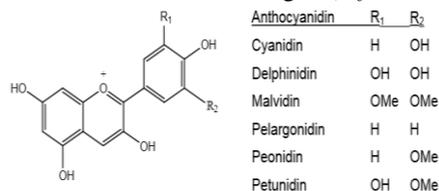
Indonesia is one of the tropical country that is potential to cultivate different types of plants, include strawberry. The use of synthetic dyes in foods are harmful to body health. Therefore, natural dyes can be used as alternative substitutes that can reduce harmful effects to the body. Dyeing capability of strawberry is caused by anthocyanin that gives red color. Furthermore, strawberry contains antioxidant that prevents free radicals in the human tissue. The purpose of this experiment is to study the effect of pH and temperature in the extraction of anthocyanin from strawberry towards total content of anthocyanin, antioxidant activity and total content of phenolic compound. The strawberry were extracted at the temperature variation of 5°C, 30°C and 60°C, and pH variation of 2, 7 and 12 respectively using water as solvent. The highest total anthocyanin content in the strawberry is 44.4mg/100grsample that obtained at 5°C and pH of 2. The highest antioxidant activity and total phenolic content in the strawberry are 91.2% and 218.7 ppm respectively.

Keywords : Anthocyanin , Antioxidant , Strawberry , Extraction

Pendahuluan

Tanaman stroberi banyak dibudidayakan di dataran tinggi seperti di Lembang, Ciwidey, Sukabumi, dan Cianjur. Buah stroberi memiliki potensi untuk dikembangkan karena mengandung aktivitas antioksidan yang tinggi, selain itu dapat juga berfungsi sebagai sumber pewarna alami yang memberikan pigmen berwarna merah. Pemakaian zat pewarna alami akan lebih baik untuk kesehatan dibandingkan dengan zat pewarna sintetis seperti karmoisin dan amaran. Zat pewarna sintetis seperti karmoisin dapat berdampak negatif bagi kesehatan tubuh karena bersifat karsinogenik yang dapat menyerang organ vital hati dan ginjal (Basu dan Kumar, 2015).

Stroberi mengandung senyawa golongan fenol seperti flavonoid, antosianin, dan tannin (Vermerris dan Nicholson, 2007). Antosianin dapat berperan sebagai antioksidan dan dapat juga sebagai sumber pewarna alami yang memberikan pigmen berwarna merah. Jenis antosianin yang paling dominan di dalam stroberi adalah pelargonidin-3-glukosida (83% dari total antosianin), setelah itu terdapat pelargonidin-3-rutinosida (8%) dan Sianidin-3-glukosida (7%) (Silva,dkk., 2005). Warna merah cerah dan menarik pada stroberi adalah pelargonidin-3-glukosida. Struktur antosianin dapat dilihat pada gambar 1. Zat warna alami umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti temperatur, pH, cahaya, dan oksigen. Zat warna antosianin dapat diaplikasikan pada makanan dan minuman, sebagai contoh adalah yogurt, susu, dan minuman ringan (*soft drink*), (Sukarminah dan Natalia, 2006).



Gambar 1. Struktur Antosianin (Bhagwat dan Holden, 2014)

Pada penelitian ini, untuk memperoleh kadar antosianin, aktivitas antioksidan, dan total fenol yang tinggi perlu mempelajari kondisi ekstraksi pada berbagai pH dan temperatur. Buah stroberi akan diekstraksi pada F:S sebesar 1:20 dengan kondisi temperatur dan pH yang berbeda-beda, sehingga pada variasi tersebut ditemukan kadar antosianin, aktivitas antioksidan dan kadar fenol yang tinggi. Kemudian hasil dari semua percobaan akan dianalisa menggunakan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang yang ditentukan.

Metode Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah stroberi segar yang telah dipotong tipis dan dikeringkan pada temperatur 40°C untuk mengurangi kadar air.

Ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan dalam ekstraktor *batch* pada rasio massa umpan terhadap pelarut sebesar 1:20 dengan pelarut akuades dalam waktu 5 jam. Kecepatan pengadukan yang digunakan adalah 200 rpm dengan kondisi pH dan temperatur yang berbeda-beda. Kondisi pH yang digunakan adalah pH 2, 7 dan 12. Pengaturan pH 2 digunakan HCl 1M, untuk pH 7 menggunakan larutan buffer fosfat dan pH 12 menggunakan larutan NaOH 1M. (Tonutare, T.dan U. Moordkk., 2014). Temperatur ekstraksi yang digunakan masing-masing adalah 5°C, 30°C dan 60°C. Pengaturan temperatur 5°C menggunakan *chiller*, sedangkan pengaturan temperatur lain menggunakan *thermostat*. Ekstrak stroberi kemudian disaring menggunakan pompa vakum untuk memisahkan rafinat dan filtrat. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan menggunakan evaporator vakum untuk memisahkan pelarut dan *solute*.

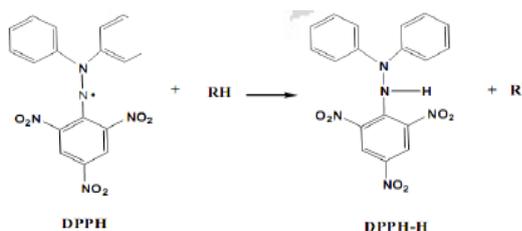
Analisis. Ekstrak stroberi dianalisis kadar antosianin, aktivitas antioksidan dan kadar fenol.

Metode yang digunakan untuk menentukan kadar antosianin adalah metode *pH differential*, menggunakan larutan buffer KCl pada pH 1 dan buffer Na-Asetat pada pH 4,5. Kemudian ekstrak stroberi yang telah diencerkan dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum pelargonidin-3-glukosida 502nm dan 700nm. Panjang gelombang 700nm dilakukan untuk mengoreksi larutan sampel (Sutharut dan Sudarat, 2000). Penentuan nilai absorbansi suatu sampel dapat dihitung dengan persamaan 1 dan untuk menentukan total antosianin menggunakan persamaan 2. (Sutharut dan Sudarat, 2000)

$$A = (A_{502} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{502} - A_{700})_{pH 4.5} \quad (1)$$

$$\text{Total Antosianin (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (2)$$

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (1,1 difenil-2,2-pikrilhidrazil). Prinsip reaksi yang digunakan adalah mendonorkan atom hidrogen untuk menetralkan radikal DPPH yang berwarna ungu, sehingga pada saat pengukuran absorbansi akan berkurang dan warnanya menjadi kuning pucat (Molyneux, 2003). Reaksi tersebut menghasilkan senyawa DPPH-Hidrazin seperti pada gambar 2

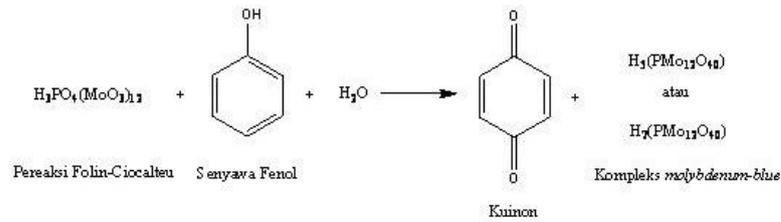


Gambar 2. Reaksi Penetralan DPPH (Molyneux, 2003)

Penentuan aktivitas antioksidan dapat dihitung menggunakan persamaan 3. (Miksusanti,dkk.,2012)

$$\% \text{Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\% \quad (3)$$

Analisis kadar fenol dilakukan dengan menggunakan reagen Folin Ciocalteu. Folin Ciocalteu mengoksidasi ion fenolat dalam sampel membentuk kompleks *molybdenum*, absorbansi diukur pada panjang gelombang 765 nm. Warna yang dihasilkan antara sampel dengan reagen folin ciocalteu adalah warna kuning, setelah bereaksi dengan larutan Na₂CO₃ maka warna larutan akan berubah menjadi biru. Reaksi yang terjadi disajikan pada gambar 3. Mula-mula standar asam galat dibuat untuk menentukan kurva standar. Ekstrak stroberi yang telah diencerkan direaksikan dengan 5% pereaksi folin, 7% Na₂CO₃ dan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur ruang. Perhitungan kadar fenol menggunakan persamaan kurva standar asam galat yang diperoleh.

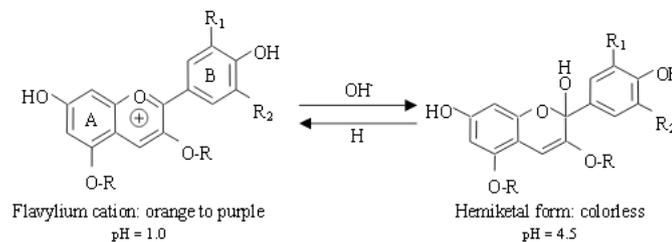


Gambar 3. Reaksi Pembentukan Senyawa Molybdenum (Edhisambada, 2011)

Hasil dan Pembahasan

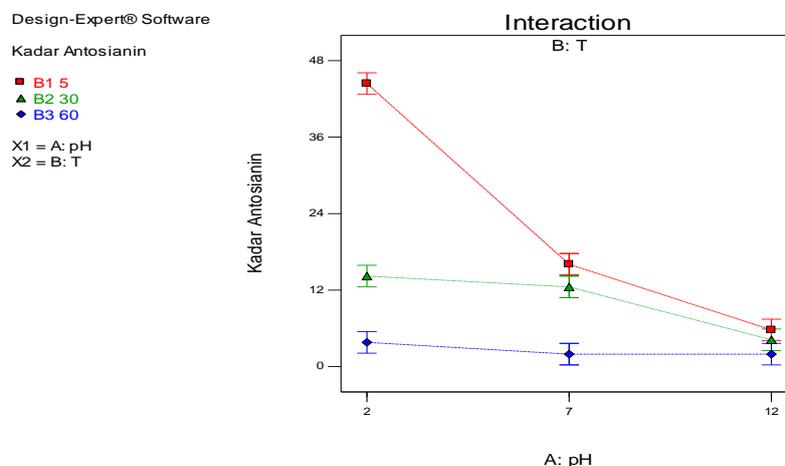
Buah stroberi yang digunakan dikeringkan hingga kadar air sampai dibawah 10%. Pengeringan ini bertujuan untuk mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama serta untuk menghentikan reaksi enzimatik. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut akuades karena antosianin yang terdapat pada stroberi bersifat relatif polar, penggunaan akuades diharapkan mampu mengekstraksi antosianin lebih banyak.

Antosianin termasuk golongan senyawa flavonoid yang merupakan zat warna alami pada buah stroberi. Kestabilan antosianin dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH dan temperatur. Adapun struktur dan perubahan warna pada antosianin karena perbedaan tingkatan pH, dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Struktur Antosianin pada Kondisi pH 1,0 dan pH 4,5 (Wrolstad R,dkk., 2005)

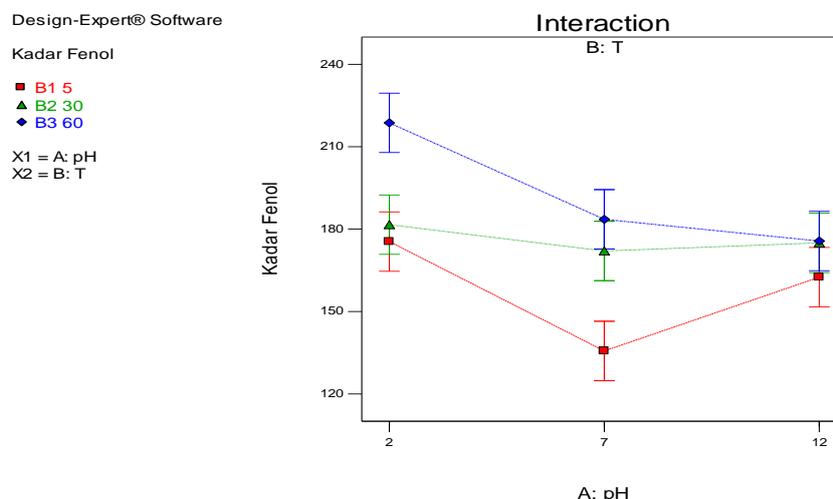
Analisis kadar antosianin yang terdapat pada stroberi menggunakan metode *pH differential* dengan larutan buffer pH 1 dan pH 4,5 karena pada pH 1 merupakan bentuk paling stabil dari antosianin yaitu bentuk *red flavylium ion* dan pada pH 4,5 merupakan bentuk hemiketal yang kurang stabil. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, pada pH 2 dan temperatur 5°C menghasilkan kadar antosianin yang paling besar yaitu mencapai 44,4 mg/100gr. Sedangkan hasil terendah terdapat pada pH 12 dengan temperatur 60°C yaitu mencapai 1,9mg/100gr. Pada gambar 5 disajikan pengaruh pH dan temperatur terhadap kadar antosianin.



Gambar 5. Pengaruh pH dan Temperatur Terhadap Kadar Antosianin

Pada grafik diatas dapat dilihat bahwa semakin tinggi pH dan temperatur kadar antosianin yang diperoleh semakin kecil, karena pada temperatur yang tinggi antosianin mengalami degradasi menjadi produk keton. Pada temperatur lebih dari 70°C degradasi antosianin cukup signifikan (Dai dan Mumper, 2010). Kerusakan akibat pemanasan dapat terjadi melalui dua tahap, pertama terjadi hidrolisis ikatan glikosidik antosianin sehingga menghasilkan aglikon-aglikon yang tidak stabil, kemudian cincin aglikon terbuka membentuk gugus *carbinol* dan *chalcone*. (SEAFASCenter,2012). Pada pH yang tinggi seperti yaitu pada pH 12 kesetimbangan antosianin bergeser membentuk struktur *carbinol* dan *chalcone* yang tidak stabil, sehingga pada hasil analisis absorbansi yang dihasilkan pada pH 12 menurun dibandingkan pH 2. Pada pH 2 merupakan pH paling stabil dari struktur antosianin sehingga kandungan antosianin lebih tinggi dibandingkan dengan pH 7 dan pH 12 pada temperatur yang sama. Pada rancangan percobaan dengan ANOVA menggunakan *design expert*, pH dan temperatur ternyata berpengaruh signifikan terhadap kadar antosianin, dan interaksi antara pH dan temperatur berpengaruh signifikan terhadap kadar antosianin. *R-squared* dan *adj R-squared* yang dihasilkan berturut-turut adalah 0,9930 dan 0,9868.

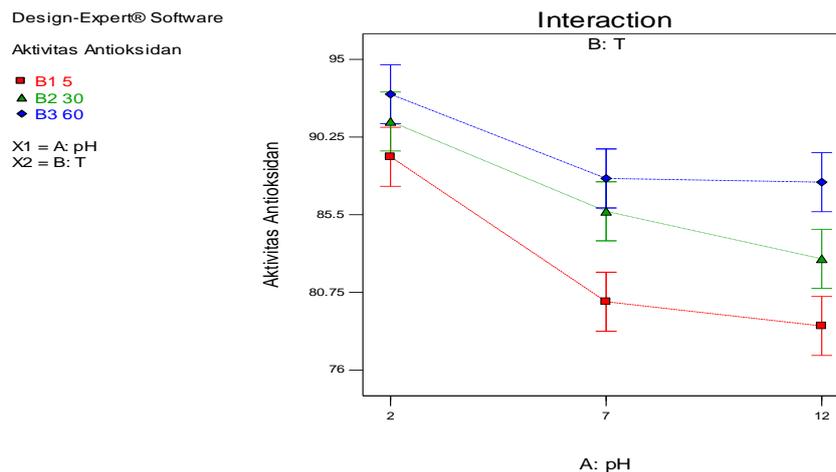
Buah stroberi mengandung golongan senyawa fenol yang mampu berperan sebagai antioksidan. Senyawa fenol merupakan senyawa yang cenderung mudah larut dalam air karena mengandung gugus hidroksil yang dapat meningkatkan kelarutan dalam air. Pengujian kadar fenol menggunakan reagen folin ciocalteu. Dari hasil percobaan diperoleh kurva standar asam galat adalah $y=0,0013x + 0,0637$. Dimana y adalah absorbansi sampel dan x adalah konsentrasi fenol. Dari hasil percobaan diperoleh kadar fenol tertinggi terdapat pada kondisi pH 2 dan temperatur 60°C sebesar 218,7 ppm, hasil terendah diperoleh pada pH 7 dan temperatur 5°C sebesar 135,7ppm. Pada gambar 6 disajikan grafik pengaruh pH dan temperatur terhadap kadar fenol.



Gambar 6. Pengaruh pH vs Temperatur Terhadap Kadar Fenol

Pada grafik diatas, semakin tinggi temperatur (dari 5°C sampai 60°C) akan meningkatkan kecepatan difusi dan kelarutan ,sehingga kadar fenol yang terekstraksi meningkat. Pada pH 2 diperoleh kadar fenol tertinggi, hal ini mungkin terjadi karena dalam keadaan yang semakin asam dinding sel vakuola akan lebih mudah pecah sehingga senyawa fenol lebih mudah terekstraksi oleh pelarut akuades (Sukarminah dan Natalia, 2006). Pada rancangan percobaan pengaruh pH dan temperatur berpengaruh signifikan terhadap kadar fenol. *R-squared* dan *adj R-squared* yang dihasilkan berturut-turut adalah 0,9009 dan 0,8129.

Buah stroberi memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Senyawa flavonoid, tannin, dan antosianin yang merupakan golongan fenol mampu berperan sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas dalam tubuh. Pengujian antioksidan dilakukan menggunakan radikal DPPH (Molyneux, 2003). Aktivitas antioksidan yang tinggi menunjukkan kemampuan sampel mereduksi radikal bebas yang lebih kuat. Dari data penelitian diperoleh bahwa aktivitas antioksidan berkisar antara 78,7% - 92,9%, aktivitas tertinggi diperoleh pada pH 2 dan temperatur 60°C. Pada gambar 7 disajikan pengaruh pH dan temperatur terhadap aktivitas antioksidan.



Gambar 7. Pengaruh pH dan Temperatur Terhadap Aktivitas Antioksidan

Pada grafik diatas dapat dilihat bahwa pada pH 2 dan temperatur 60°C menghasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi, apabila kadar fenol tinggi maka aktivitas antioksidan akan meningkat. Pada pH 2 senyawa antosianin pada stroberi yang berperan sebagai antioksidan memiliki tingkat kestabilan pada keadaan asam (SEAFASCenter,2012). Pada temperatur 5°C pH 12 diperoleh aktivitas antioksidan terendah karena pada temperatur rendah dinding sel buah akan sulit ditembus sehingga senyawa antioksidan yang terekstrak hanya sedikit. Pada rancangan percobaan diperoleh pengaruh pH dan temperatur berpengaruh signifikan terhadap aktivitas antioksidan. Selain itu *R-squared* dan *adj R-squared* yang dihasilkan berturut-turut adalah 0,9420 dan 0,8904.

Kesimpulan

Pada ekstraksi antioksidan dan zat warna buah stroberi diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Buah stroberi mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi yaitu 92,9%.
2. Kadar antosianin dan kadar fenol tertinggi berturut-turut adalah 44,7 mg/100gr bahan dan 218,7ppm.
3. Pada ekstraksi antioksidan buah stroberi, pH dan temperatur berpengaruh signifikan terhadap kadar antosianin, kadar fenol, dan aktivitas antioksidan. Terdapat interaksi yang signifikan antara pH dan temperatur kadar antosianin.

Daftar Pustaka

- Basu, A. dan G.S. Kumar, *Interaction of toxic azo dyes with heme protein: Biophysical insights into the binding aspect of the food additive amaranth with human hemoglobin*. Journal of Hazardous Materials, 2015. **289**: p. 204-209.
- Bhagwat, S., D. B.Haytowitz, dan J. M.Holden, *USDA Database for the flavonoid content of selected foods*. 2014, U.S. Department of Agriculture. p. 1-176.
- Dai, J. dan R. J.Mumper (2010). "Plant Phenolics: Extraction, ANalysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties." *Molecules* **15**.
- Edhisambada, 2011. <https://edhisambada.wordpress.com/2011/02/18/metode-folin-ciocalteu/> (diakses 5 September 2015)
- Mikusanti, Elfita and Hotdelina (2012). "Aktivitas Antioksidan dan Sifat Kestabilan Warna Campuran EKstrak Etil ASetat Kulit Buah Manggis dan Kayu Secang." *Jurnal Penelitian Sains***15**(2).
- Molyneux, P., *The Use of The Stable Free Radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin Journal of Science Technology, 2003. **26**(2): p. 211-219.
- SEAFASCenter, 2012. <https://seafast.ipb.ac.id/tpc-project/wp-content/uploads/2013/03/10-kuning-merah-karotenoid.pdf> (diakses 10 Oktober 2015)
- Silva, F.L.d., et al., *Anthocyanin pigments in strawberry*. Food Science and Technology, 2005. **40**: p. 374-382.
- Sukarminah, T.E. dan D. Natalia, *Ekstraksi pewarna alami dari buah arben dan aplikasinya pada sistem pangan*. 2006: p. 1-16.
- Sutharut dan Sudarat (2012). "Total Anthocyanin Content and Antioxidant Activity of Germinated Colored Rice." *International Food Research Journal* **19**(1): 215-221.
- Tonutare, T., U. Moor and L. Szajdak (2014). "Strawberry Anthocyanin Determination by pH Differential Spectroscopic Method- How To Get True Results." *ACTA* **13**(3): 35-47.



- Vermerris, W. dan Nicholson, *Phenolic Compound Biochemistry*. 2007, Gaineville: Springer Science and Business Media.
- Wrolstad, R. E., R. W. Durst and J. Lee (2005). "Tracking Color and Pigment Changes In Anthocyanin Products." Elsevier 16: 423-428.





Lembar Tanya Jawab

Moderator : Dewi Triastanti (Universitas Indonesia)

Notulen : Renung R. (UPN "Veteran" Yogyakarta)

1. Penanya : Yohana (UPN)
Pertanyaan : Berdasarkan apa pengovenan pada $\pm 40^{\circ}\text{C}$?
Jawaban : Untuk mencegah degradasi antosianin pada temperatur $> 40^{\circ}\text{C}$ dikhawatirkan rusak karena pengovenan ± 1 hari.
2. Penanya : Izon (UPN)
Pertanyaan : Mana yang lebih berpengaruh, pH atau temperatur?
Jawaban : Temperatur dan pH berpengaruh terhadap kadar antosianin
3. Penanya : Kartika (UPN)
Pertanyaan : Apakah pH dibawah 2 sudah dicoba?
Jawaban : Antosianin stabil pada pH 1 - 3.
4. Penanya : Dewi T. (UPN)
Pertanyaan : Antioksidan dari kembang Telang?
Antosianin dari kembang Telang dengan ekstraksi dengan air, bisa dengan suhu 80°C ?
Apakah dalam strawberi, apakah sudah dicoba tanpa asam?
Jawaban : Belum. pH 2 akan memicu untuk pecahnya dinding sel
Di saran, asam bisa merusak antioksidannya, sehingga dicoba tanpa asam.
5. Penanya : Ingrid
Pertanyaan : Antioksidan dari kembang Telang?
Antosianin dari kembang Telang dengan ekstraksi dengan air, bisa dengan suhu 80°C ?
Apakah dalam strawberi, apakah sudah dicoba tanpa asam?
Jawaban : Belum. pH 2 akan memicu untuk pecahnya dinding sel
Di saran, asam bisa merusak antioksidannya, sehingga dicoba tanpa asam. Pernah dicoba tanpa asam suhu 50°C namun menurun

