

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan selama 5 bulan di Laboratorium Riset Kimia Universitas Pendidikan Indonesia untuk pelaksanaan: ekstraksi bunga *Ruellia simplex*; uji karakteristik ekstrak bunga *Ruellia simplex* (EBRS); pembuatan dan optimasi komposisi film; dan karakterisasi sifat fisik film. Adapun karakterisasi sifat struktur dan mekanik film dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Universitas Pendidikan Indonesia dan Laboratorium FTMD ITB.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca, *hot plate-magnetic stirrer*, oven, *rotary evaporator*, spektrofotometer UV-Vis, FTIR, mikrometer sekrup, lemari pendingin, alat gelas, cawan petri, dan pH meter.

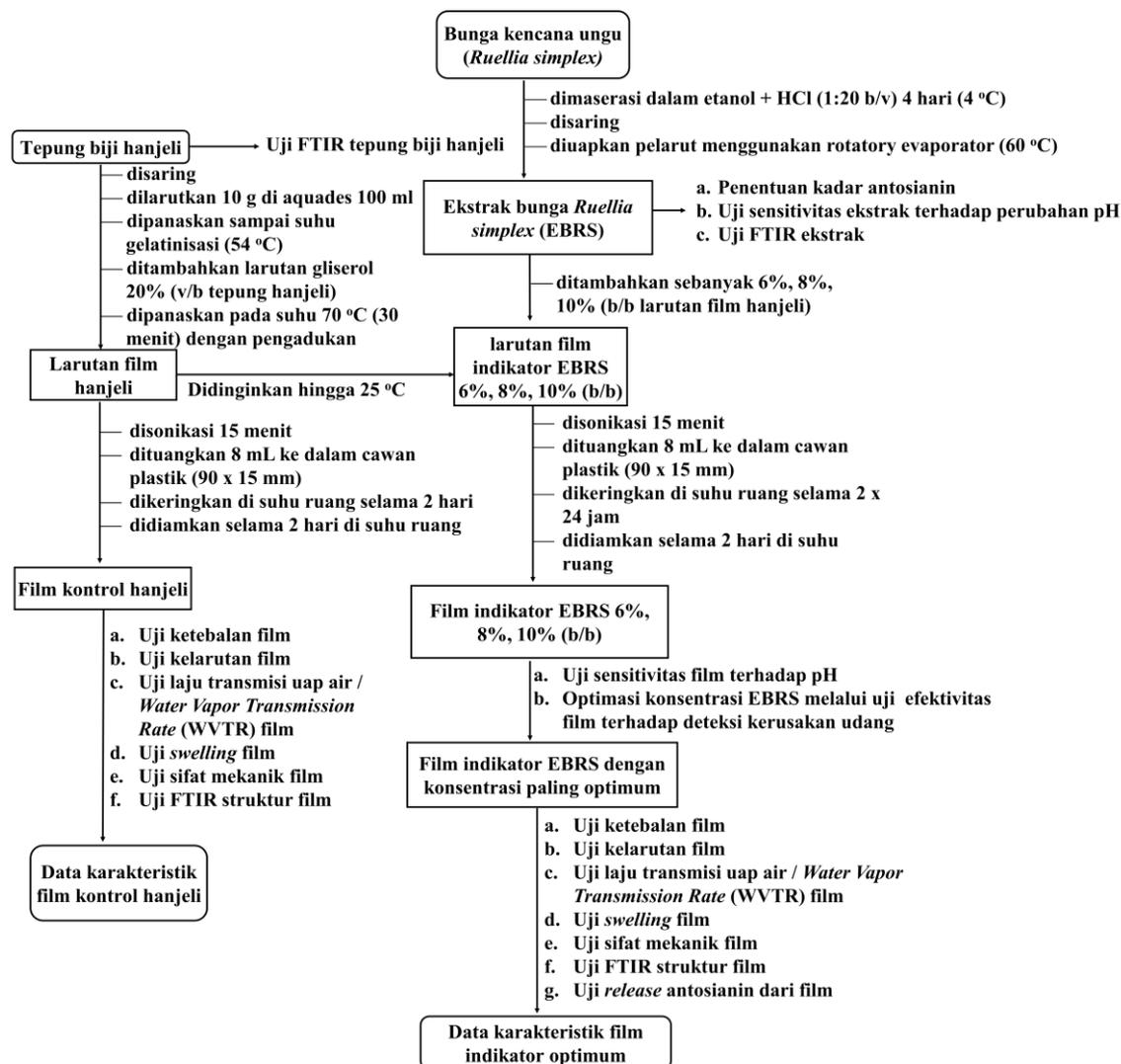
Bahan yang digunakan dalam pembuatan film yaitu tepung biji hanjeli, aquades, gliserol, bunga *Ruellia simplex*. Bahan untuk ekstraksi yaitu etanol 95% dan HCl 0,1 N. Bahan untuk pengujian dan karakterisasi yaitu terdiri dari 1 kg udang, larutan pH 1-12 yang memerlukan aquades, KCl, HCl,  $C_8H_5KO_4$ , NaOH,  $KH_2PO_4$ ,  $C_4H_{11}NO_3$ , dan  $NaHCO_3$ .

#### 3.3 Bagan Alir Penelitian Prosedur Penelitian

Penelitian diawali dengan ekstraksi antosianin dari bunga *Ruellia simplex* dan karakterisasi kadar antosianin pada ekstrak bunga *Ruellia simplex* (EBRS), dan uji sensitivitas EBRS terhadap perubahan pH. Selanjutnya dilakukan pembuatan film berbasis tepung biji hanjeli, dan film indikator.

Pembuatan film indikator berbasis tepung biji hanjeli dan ekstrak bunga *Ruellia simplex* dilakukan dengan menambahkan larutan ekstrak sejumlah tiga konsentrasi berbeda sebagai variabel bebas (EBRS 6%, 8% 10% b/b). Selanjutnya akan ditetapkan jumlah konsentrasi ekstrak antosianin yang paling optimum dalam mendeteksi kerusakan udang melalui perubahan warna film indikator.

Tahapan terakhir yaitu mengkarakterisasi sifat fisik, mekanik, dan struktur film kontrol hanjeli dan film indikator EBRS yang optimum. Secara garis besar, tahapan penelitian dapat dilihat dalam skema bagan alir pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Diagram alir prosedur penelitian

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Ekstraksi dan Karakterisasi Ekstrak Bunga *Ruellia simplex* (EBRS)

Ekstraksi Bunga *Ruellia simplex* dilakukan untuk mendapatkan antosianin dari bunga *Ruellia simplex*. Mengacu pada penelitian Listyarini dkk. (2020) dengan modifikasi, ekstraksi dilakukan dengan maserasi sebanyak 58,66 g bunga *Ruellia simplex* dalam 700 mL pelarut etanol 70% : HCl (1:10). Residu kemudian dipisahkan dari filtrat dengan penyaringan sederhana. Terakhir ekstrak dipekatkan dengan cara dievaporasi pada suhu 60°C hingga volume mencapai 70 mL (Nazaruddin dkk., 2021). Hasilnya disimpan pada wadah gelap dan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

### 3.4.1.1 Penentuan Kadar Antosianin / *Total Anthocyanin Content* (TAC)

Penentuan kadar antosianin/TAC pada EBRS menggunakan Metode pH Diferensial. TAC dinyatakan sebagai ekuivalen cyanidin-3-glukosida. Sebanyak 0,05 ml ekstrak pekat diencerkan menjadi 5 ml dengan larutan buffer pH 1 dan pH 4,5. Setiap absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm menggunakan spektrofotometer. TAC dihitung berdasarkan rumus berikut ini:

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

A: absorbansi ( $A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$ ); MW: berat molekul cyanidin-3-glucoside = 449,29 g/mol; DF: faktor pengenceran;  $\epsilon$  adalah koefisien kepunahan cyanidin-3-glucoside = 26900 L/ (mol.cm), dan  $l$  adalah panjang lintasan = 1 cm (Putri, dkk., 2019).

### 3.4.1.2 Perubahan Warna Ekstrak seiring Perubahan pH

Ekstrak antosianin (0,05 mL) ditambahkan dengan larutan buffer dengan variasi pH 1-12 dengan perbandingan larutan ekstrak: larutan buffer sebanyak 2:8 (v/v). Selanjutnya spektra UV-vis dari larutan ekstrak bunga *Ruellia simplex* berbagai pH diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis (Hitachi, Tokyo, Jepang) dalam kisaran 300-750 nm (Safitri dkk., 2019). Dikutip dari Meelapsom dkk (2022), pembuatan buffer pH 1-12 dilakukan dengan memvariasikan volume bahan baku buffer sebagaimana ditunjukkan pada **Tabel 3.1**.

**Tabel 3.1.**

*Pembuatan Larutan Buffer pH 1-12 (Sumber Meelapsom et.al., 2022)*

Bahan Baku	Volume bahan baku buffer (mL)											
	pH 1	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
0,2 mol L <sup>-1</sup> KCl	100	100										
0,2 mol L <sup>-1</sup> HCl	268	26										
0,1 mol L <sup>-1</sup> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub>			200	200	200							
0,1 mol L <sup>-1</sup> HCl			89,2	0,4					22,8			
0,1 mol L <sup>-1</sup> NaOH					90,4	22,4	116,4	186,8		42,8	90,8	
0,1 mol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>						200	200	200				
0,1 mol L <sup>-1</sup> asam borat									200			

Bahan Baku	Volume bahan baku buffer (mL)											
	pH 1	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
0,05 mol L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub>										200	200	
0,2 mol L <sup>-1</sup> KCl												100
0,2 mol L <sup>-1</sup> NaOH												24
Aquades	32	274	110,8	199,6	109,6	177,6	83,6	13,2	177,2	157,2	109,2	276

### 3.4.2 Pembuatan dan Optimasi Konsentrasi Konsentrasi Ekstrak Bunga

#### *Ruellia simplex* (EBRS) pada Film Indikator

Pembuatan film dari tepung biji hanjeli mengacu pada penelitian Anandito dkk. (2012), yang menambahkan gliserol dalam pembuatan film. Tepung biji hanjeli, 10 gram, dilarutkan dalam aquades 100 ml dan dipanaskan menggunakan hot plate sampai suhu gelatinisasi (54°C). Kemudian larutan gliserol ditambahkan dengan konsentrasi 20% (v/b tepung biji hanjeli) dan dipanaskan pada suhu 70 °C selama 30 menit dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Campuran didinginkan hingga 25°C, lalu ditambahkan ekstrak bunga *Ruellia simplex* (EBRS) ke larutan tersebut 6%, 8%, dan 10% (b/b larutan film hanjeli). Kemudian 8 mL larutan pembentuk film dicetak ke dalam cawan plastik berukuran sama (90 mm × 15 mm), dan dikeringkan pada suhu ruang selama 2 hari. Film disimpan pada suhu ruang selama 2 hari sebelum digunakan. Selanjutnya optimasi konsentrasi EBRS dilakukan dengan menguji sensitivitas film indikator terhadap perubahan pH dan uji efektivitas film indikator dalam memonitor kerusakan udang.

#### 3.4.2.1 Uji Sensitivitas Film Indikator EBRS terhadap Perubahan pH

Sifat sensitivitas film terhadap pH diukur dengan cara sampel film (0,5 cm × 1,5 cm) ditetesi 5 tetes larutan buffer pH 1-12 selama 1 menit. Kemudian, perubahan warna sampel film didokumentasikan oleh kamera *smartphone* (Wang dkk., 2018).

#### 3.4.2.2 Uji Efektivitas Film terhadap Deteksi Pembusukan Udang

Udang diletakan di dalam cawan petri, dan film indikator EBRS 6%, 8%, 10% (ukuran 1,5x1,5 cm) ditempelkan pada tutup cawan petri (Wu dkk., 2021). Pemantauan kualitas udang dilakukan dengan mengukur pH udang secara berkala. Disiapkan udang dalam wadah tertutup untuk diukur pH nya menggunakan pH meter khusus padatan makanan. Diamati kemampuan film indikator dalam merespon perubahan pH udang. Rancangan pengamatan kinerja film indikator

EBRS 6%, 8%, 10% dalam memantau kerusakan udang ditunjukkan pada **Tabel 3.2**, kinerja film indikator EBRS yang paling efektif dalam merespon dan mengomunikasikan kerusakan udang dipilih sebagai konsentrasi EBRS yang optimum.

**Tabel 3.2.**

*Rancangan percobaan uji efektivitas film terhadap deteksi kerusakan udang*

	<b>P<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>2</sub></b>
<b>E<sub>1</sub></b>	E <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> P <sub>2</sub>
<b>E<sub>2</sub></b>	E <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> P <sub>2</sub>
<b>E<sub>3</sub></b>	E <sub>3</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>3</sub> P <sub>2</sub>

Keterangan:

E<sub>1</sub>: 6% ekstrak bunga *Ruellia simplex* (EBRS)      P<sub>1</sub>: Penyimpanan suhu ruang  
 E<sub>2</sub>: 8% ekstrak bunga *Ruellia simplex* (EBRS)      P<sub>2</sub>: Penyimpanan suhu *chiller*  
 E<sub>3</sub>: 10% ekstrak bunga *Ruellia simplex* (EBRS)      4°C

Film yang optimum dilihat berdasarkan kemampuan perubahan warna film seiring kerusakan udang, dengan menunjukkan perubahan warna yang jelas. Kamera *smartphone* digunakan untuk merekam perubahan warna film pada rentang waktu tertentu sampai udang menjadi rusak. Pengambilan gambar dilakukan dengan kondisi cahaya dan latar belakang yang konsisten yaitu dengan menempatkan film dalam kotak gelap (Kuswandi dkk., 2013). Warna film pada gambar dianalisis menggunakan *software* imageJ untuk mengetahui nilai RGB (*Red Green Blue*) dan selanjutnya dikonversi ke nilai CIE L\*a\*b\* untuk memperoleh nilai ΔE (perbedaan warna total).

### 3.4.3 Karakterisasi Sifat Film

#### 3.4.3.1 Ketebalan Film

Uji ketebalan film dilakukan berdasarkan metode yang telah dilaksanakan oleh (Lim dkk., 2021) dengan sedikit modifikasi. Ketebalan film diukur menggunakan mikrometer sekrup dengan rentang 0 – 25 mm. Pengujian dilakukan pada lima titik pada permukaan film kemudian diambil nilai rata-ratanya sebagai hasil. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali.

### 3.4.3.2 Kelarutan Film

Uji kelarutan film dalam air dilakukan berdasarkan metode yang telah dilaksanakan oleh (Pirsa, 2020) dengan modifikasi. Film dipotong dengan ukuran 1,5×1,5 cm kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 2 jam lalu ditimbang untuk mendapatkan berat film awal ( $m_1$ ). Setelah itu, film dilarutkan dalam 40 mL akuades pada suhu ruang (25°C) selama 24 jam. Potongan film yang tidak larut dipisahkan dan dikeringkan kembali menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 2 jam dan ditimbang kembali untuk mendapatkan berat film akhir ( $m_2$ ). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali. Kelarutan film dalam air dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Kelarutan film (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

### 3.4.3.3 Laju Transmisi Uap Air / Water Vapor Transmission Rate (WVTR)

Laju transmisi uap air (WVTR) sampel film diukur menurut metode ASTM E-96. Sampel film uji dipasang di atas botol vial yang berisi 10 g aquades. Cawan ditimbang ditimbang setiap 1 jam selama 7 jam dan WVTR film dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{WVTR (g/m}^2 \text{ jam)} = \frac{w}{A \times \Delta t}$$

Dimana  $w$  adalah berat (g) botol vial + film,  $\Delta t$  adalah interval waktu (jam),  $A$  adalah luas film ( $m^2$ ) yang menutupi cawan (Yang dkk., 2020). Pengujian nilai WVTR dilakukan sebanyak tiga kali.

### 3.4.3.4 Swelling Film

Tingkat *swelling* dilakukan berdasarkan modifikasi dari metode yang dilaporkan oleh Sultan dkk. (2021). Film dipotong menjadi bentuk persegi (1,5 x 1,5 cm) dan ditimbang sebagai  $m_1$ . Kemudian film direndam dalam 15 mL aquades pada suhu 25 °C selama 10 menit dan ditimbang sebagai  $m_2$ . Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali. Tingkat *swelling* dihitung berdasarkan persamaan:

$$\text{Swelling film (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100$$

### 3.4.3.5 Release Antosianin dari Film seiring Penambahan Waktu

Uji *release* bertujuan untuk menyelidiki pelepasan antosianin dari film ke produk makanan berair (makanan berkadar air tinggi), dan aquades (pH 5,8) dipilih

sebagai simulan makanan. Penentuan tingkat *release* antosianin dari film mengikuti cara Sohany dkk. (2021) dengan modifikasi. Film dipotong ( $1,5 \times 1,5$  cm) dan kemudian direndam dalam aquades (10 ml). Setiap 1 jam, aquades dibaca absorbansinya pada 537 nm menggunakan spektrofotometer Uv-Vis (Wu dkk., 2021).

#### **3.4.3.6 Sifat Mekanik Film**

Sifat mekanik film yang dianalisis pada penelitian ini di antaranya adalah sifat kekuatan tarik/ *tensile strength* (TS) dan perpanjangan putus / *elongation at break* (EAB). Uji kekuatan tarik dan perpanjangan putus dilakukan menggunakan alat Universal Testing Machine (UTM) Instron 5985 mengikuti metode standar ASTM D882. Film dipotong ( $6 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ ) dan ditempatkan di antara pegangan. Panjang pengukur awal diatur ke 26,8 mm dan kecepatan crosshead diatur pada 2mm/menit. Panjang awal, gaya dan jarak perpanjangan direkam selama perpanjangan film hingga putus (ASTM, 2010; Wu dkk., 2021).

#### **3.4.3.7 Uji FTIR**

Gugus fungsi dari tepung biji hanjeli, film kontrol hanjeli, film indikator EBRS optimum dan EBRS diidentifikasi menggunakan Spektroskopi *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR). Masing-masing sampel dihancurkan dan dicampurkan dengan serbuk KBr, dihomogenkan dan dikompresi dengan pellet press hingga membentuk pelet. Pelet tersebut dimasukkan ke dalam FTIR, tepatnya di antara 2 celah yang dilewati berkas sinar *infra-red*, dan dianalisis spektrumnya pada rentang  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$  (Subroto dkk., 2022).