

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan secara luring selama 5 bulan, mulai bulan Maret hingga Juli 2023. Ekstraksi antosianin, uji karakteristik antosianin dan tepung biji jali, pembuatan film indikator dan sebagian karakterisasi film dilaksanakan di Laboratorium Riset Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Adapun sebagian karakterisasi film yang menggunakan instrumen tertentu dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknik Mesin dan Dirgantara (FTMD) ITB Bandung.

3.2. Alat

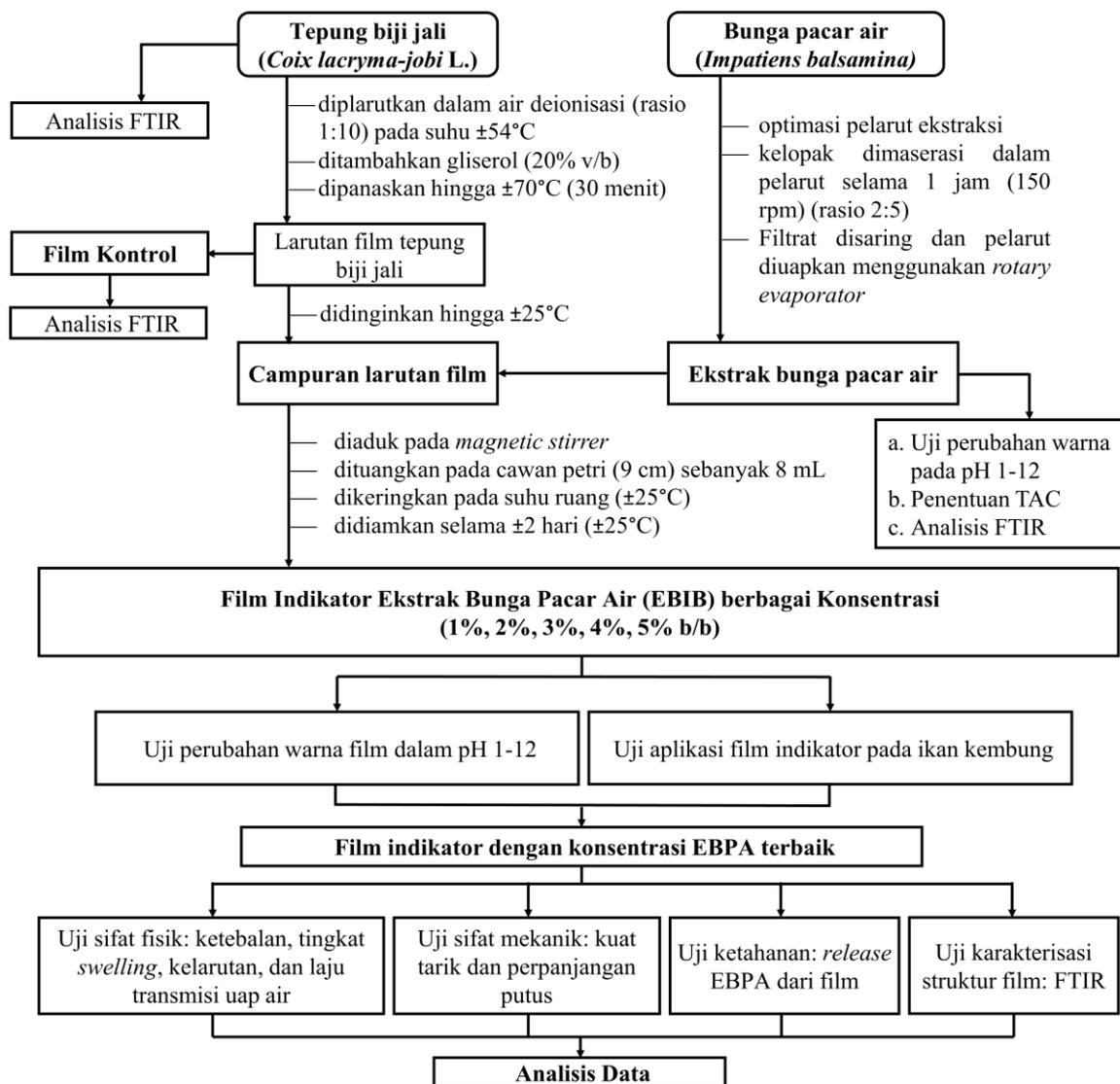
Hot plate-magnetic stirrer, *homogenizer*, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR, spektrofotometer *spectronic 20+*, alat *Universal Testing Machine* (UTM) instron 5985, kamera *smartphone*, desikator, mikrometer sekrup, oven, lemari pendingin, alat gelas, cawan petri, dan pH meter.

3.3. Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan film yaitu tepung biji jali (*Coix lacryma-jobi* L.) yang dibeli dari *online shop*, bunga pacar air (*Impatiens balsamina*) yang diambil dari daerah Jawa Tengah, aquades, dan gliserol. Bahan untuk pengujian dan karakterisasi yaitu ikan kembung segar (*Rastrelliger sp.*) yang didapat dari pasar lokal, larutan *buffer* pH 1-12, dan natrium hidroksida.

3.4. Bagan Alir Penelitian

Rangkaian prosedur penelitian yang dilaksanakan untuk mencapai tujuan ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Bagan alir penelitian.

3.5. Tahapan Penelitian

3.5.1. Karakterisasi ekstrak bunga pacar air (*Impatiens balsamina*)

3.5.1.1. Ekstraksi antosianin bunga pacar air

Ekstraksi antosianin dari kelopak bunga pacar air merah dilakukan berdasarkan metode yang telah dilaksanakan oleh Pires dkk (2021), dengan modifikasi. Pada awal ekstraksi, dilakukan metode optimasi ekstraksi terlebih dahulu dengan menggunakan 4 pelarut, yaitu; aquades, etanol 95%, HCl 0,1 M, dan CH₃COOH 0,1 M. Optimasi dilakukan sesuai prosedur ekstraksi (Pires dkk, 2021) dengan memperkecil skala ekstrak hingga 10%. Hasil ekstrak kemudian dianalisis menggunakan nilai L^* , a^* , b^* untuk mengidentifikasi perubahan warna ekstrak

Rahmahani Alfathia Fadhilah, 2023

KARAKTERISASI FILM INDIKATOR BERBASIS TEPUNG BIJI JALI (*Coix lacryma-jobi L.*) DAN EKSTRAK BUNGA PACAR AIR (*Impatiens balsamina*) SEBAGAI SMART PACKAGING UNTUK PEMANTAUAN KESEGERAN IKAN KEMBUNG

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

pada berbagai pH menggunakan nilai perbedaan warna total (ΔE). Pelarut yang terpilih kemudian digunakan untuk ekstraksi skala besar.

Sampel kelopak bunga pacar air merah segar sebanyak 50 gram dicuci bersih, dihaluskan, dan dimaserasi pada suhu kamar dengan penambahan pelarut terpilih dengan rasio 2:5 sampel dan pelarut, selama 1 jam dengan pengadukan (150 rpm). Selanjutnya, campuran disaring menggunakan kertas saring (Whatman No. 4), dan kandungan yang tersisa diekstrak kembali dengan prosedur yang sama. Filtrat yang dihasilkan disimpan dalam *rotary evaporator* pada suhu 35°C dan tekanan vakuum untuk menghilangkan etanol sampai volume akhir kurang dari 1/3 volume awal. Hasil ekstrak ditimbang untuk menghitung hasil rendemen ekstrak antosianin yang didapat.

3.5.1.2. Karakterisasi antosianin bunga pacar air

3.5.1.2.1. Uji perubahan warna antosianin pada pH 1-12

Karakterisasi dilakukan untuk mendapatkan informasi warna antosianin pada berbagai pH sebagai acuan ketika diterapkan pada film indikator. Ekstrak antosianin sebanyak 1 mL dituangkan ke dalam botol vial 10 mL. Ekstrak kemudian disesuaikan dengan nilai pH yang diinginkan (pH 1-12) dengan menambahkan larutan *buffer* sebanyak 5 mL (Safitri dkk, 2019). Selanjutnya spektra UV-vis dari larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dalam kisaran panjang gelombang sinar tampak, yaitu 400–800 nm.

3.5.1.2.2. Penentuan *total anthocyanin content* (TAC)

Penentuan TAC dilakukan berdasarkan metode yang telah dilaksanakan oleh Anggriani dkk. (2017) dengan sedikit modifikasi untuk mengetahui kadar antosianin yang berhasil diekstrak dari kelopak bunga pacar air. Ekstrak antosianin sebanyak 1 mL ditambahkan dengan larutan penyangga pH 1 (kalium klorida) sebanyak 4,95 mL dan pH 4,5 (natrium asetat) sebanyak 4,95 mL. Larutan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai absorbansi yang didapatkan kemudian digunakan untuk menghitung kadar antosianin dengan persamaan berikut.

$$\text{Kadar Antosianin (\%)} = (A \times MW \times DF) / (\epsilon \times L)$$

$$A = [(A_{520} - A_{700}) \text{ pH 1} - (A_{520} - A_{700}) \text{ pH 4,5}]$$

dimana A adalah absorbansi, MW adalah berat molekul antosianin (g/mol), DF adalah faktor pengenceran, ϵ adalah absorptivitas molar antosianin (L/mol.cm), dan L adalah lebar kuvet (cm).

3.5.2. Aplikasi dan Penentuan Film Indikator dengan Konsentrasi EBPA Terbaik

3.5.2.1. Pembuatan Film

Pembuatan film dari tepung biji jali (*Coix lacryma-jobi* L.) mengacu pada metode yang dilakukan oleh Anandito dkk (2012) dengan sedikit modifikasi. Tepung jali sebanyak 10 gram, dilarutkan dalam aquades 100 mL dan dipanaskan menggunakan *hot plate* sampai suhu 54°C. Kemudian gliserol ditambahkan dengan konsentrasi 20% (v/b tepung jali) dan dipanaskan pada suhu $\pm 70^\circ\text{C}$ selama 30 menit dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Campuran didinginkan hingga $\pm 30^\circ\text{C}$, lalu ditambahkan ekstrak bunga pacar air (EBPA) ke larutan pati untuk mendapatkan konsentrasi akhir 0% untuk film kontrol, 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (b/b) untuk film indikator. Kemudian, larutan film dituangkan ke dalam cawan petri (diameter 9 cm) sebanyak ± 8 mL untuk mencetak film. Larutan dikeringkan pada suhu ruang selama ± 24 jam. Hasil film yang telah kering dikondisikan (suhu ruang: $\pm 25^\circ\text{C}$) selama 2 hari sebelum dimulainya pengujian.

3.5.2.2. Penentuan Film Indikator dengan Konsentrasi Antosianin Ekstrak Bunga pacar air (EBPA) Terbaik

3.5.2.2.1. Uji perubahan warna film indikator terhadap perubahan pH 1-12

Sifat respon film terhadap perubahan pH diukur dengan cara sampel film (1 cm \times 1 cm) ditetesi larutan *buffer* pH 1-12 selama 1 menit. Kemudian, perubahan warna sampel film didokumentasikan oleh kamera *smartphone* untuk melihat perubahan warna yang kemudian dibandingkan dengan perubahan warna antosianin bunga pacar air (Wang dkk, 2018). Hasil perubahan warna diukur menggunakan ImageJ untuk mendapatkan nilai RGB dan dikonversi menjadi L^* , a^* , b^* untuk menghitung nilai perbedaan warna total (ΔE) dan menentukan film indikator dengan konsentrasi EBPA terbaik.

3.5.2.2.2. Uji aplikasi film pada ikan kembung

Uji aplikasi film pada bahan pangan dilakukan untuk menganalisis efektivitas film indikator dalam mendeteksi pembusukan sampel ikan kembung. Hasil pengujian dilakukan analisis terkait film yang paling efektif dalam memberikan informasi kesegaran ikan kembung melalui perubahan warna. Film berbagai konsentrasi dipotong sebesar 1x1 cm dan ditempelkan pada masing-masing tutup cawan petri. Sampel ikan kembung yang telah ditimbang diletakan pada cawan petri dan ditutup dengan tutup cawan petri yang telah dilekatkan pada film. Analisis dilakukan selama 7 hari pada suhu *chiller* ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) dan 24 jam pada suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) (Amalia dkk., 2021). Kamera *smartphone* digunakan untuk merekam warna film dengan pengaturan serupa, kondisi cahaya, dan latar belakang untuk nilai warna yang dapat direproduksi (secara praktis dapat dicapai dengan menempatkan film dalam kotak dengan cahaya stabil) (Kuswandi dkk, 2013). Pengambilan gambar dilakukan setiap 24 jam sekali pada suhu *chiller* ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) dan setiap 3 jam sekali pada suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Hasil gambar dianalisis warna menggunakan software imageJ untuk mengetahui nilai RGB dan dikonversi menjadi nilai L^* , a^* , b^* untuk menghitung nilai perbedaan warna total (ΔE) dan menentukan film indikator dengan konsentrasi EBPA terbaik.

3.5.2.2.3. Uji pH sampel ikan kembung

Uji pH terhadap sampel ikan kembung dilakukan berdasarkan metode yang telah dilaksanakan oleh (Nuroniyah dkk, 2022) dengan sedikit modifikasi. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kadar kebusukan ikan kembung selama masa penyimpanan bersama dengan film indikator. Sampel ikan kembung diambil dan ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dihaluskan dan dilarutkan dalam 10 mL akuades hingga homogen. Setelah itu, pH sampel daging diukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan *buffer* asam pH 4, netral pH 7, dan basa pH 10. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali dan diambil nilai rata-ratanya. Pengujian dilakukan setiap 3 jam sekali suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) dan setiap 24 jam sekali pada suhu *chiller* ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Hasil film yang paling berkorelasi positif antara warna antosianin film dengan perubahan pH ikan kembung dipilih sebagai film yang paling efektif dan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

7.5.2.2.4. Uji amonia

Keberadaan amonia dapat diuji dengan mereaksikan larutan ikan yang telah membusuk dengan reagen Nessler. Sebanyak 2 mL larutan ikan busuk ditambahkan 1 mL reagen Nessler berwarna kuning pucat, dan dihomogenkan. Keberadaan amonia ditandai dengan berubahnya warna larutan menjadi kuning kecoklatan dan endapan coklat pada konsentrasi amonia yang sangat tinggi (Jeong dkk, 2013).

3.5.3. Karakterisasi Film

3.5.3.1. Karakterisasi sifat fisik film

3.5.3.1.1. Ketebalan

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 secara acak pada permukaan *film* kemudian diambil nilai rata-ratanya sebagai hasil.

3.5.3.1.2. Tingkat *swelling*

Tingkat *swelling* dilakukakan berdasarkan modifikasi dari metode yang dilaporkan oleh Alfian dkk (2020). Film dipotong menjadi bentuk persegi panjang (1x1 cm²) dan ditimbang (sebagai m₁). Kemudian film direndam dalam 15 mL akuades pada suhu 25°C selama 10 menit. Hasil film yang telah direndam dikeringkan dengan tisu untuk mendapatkan massa konstan (ditimbang sebagai m₂). Tingkat *swelling* dihitung berdasarkan persamaan berikut.

$$\text{Tingkat } swelling = \frac{(m_2 - m_1)}{m_1} \times 100\%$$

3.5.3.1.3. Kelarutan

Uji kelarutan *film* dalam air dilakukan berdasarkan metode yang telah dilaksanakan oleh Pirsá (2020) dengan sedikit modifikasi. *Film* dipotong dengan ukuran 2×2 cm kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 5 jam lalu ditimbang untuk mendapatkan berat *film* awal (m₁). Setelah itu, *film* dilarutkan dalam 50 mL akuades pada suhu ruang (25°C) selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Potongan *film* yang tidak larut dipisahkan dan dikeringkan kembali menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang kembali untuk

mendapatkan berat *film* akhir (m_2). Kelarutan *film* dalam air dihitung menggunakan persamaan berikut.

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

dimana m_1 adalah berat awal *film* dan m_2 adalah berat *film* setelah dilarutkan dalam air.

3.5.3.1.4. Laju transmisi uap air

Laju transmisi uap air atau *Water Vapour Transmission Rate* (WVTR) sampel film diukur menurut metode yang dilaporkan oleh Hu dkk (2001) dengan modifikasi. Sampel film uji dipasang secara rapat di atas cawan yang berisi 10 g air deionisasi. Cawan ditimbang secara berkala dan WVTR film dihitung dengan persamaan berikut:

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

dimana w adalah penurunan berat (g) cawan, Δt adalah interval waktu (s), A adalah luas film (m^2) yang menutupi cawan.

3.5.3.2. Karakterisasi sifat mekanik film

3.5.3.2.1. Kekuatan tarik (*Tensile strength*/TS)

Pengujian kekuatan tarik film dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknik Mesin dan Dirgantara (FTMD) ITB Bandung. Film dipotong menjadi potongan berbentuk persegi panjang (10 x 2,6 cm) dan diukur menggunakan alat *Universal Testing Machine* (UTM) instron 5985 dengan kecepatan 2 mm/min. Gaya dan jarak direkam selama perpanjangan film hingga putus (ASTM, 2010; Wu dkk, 2021a). TS digunakan untuk mengetahui kekuatan mekanik dari film kontrol dan film indikator terbaik..

3.5.3.2.1. Perpanjangan putus (*Elongation at break*/EAB)

Pengujian perpanjangan putus film dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknik Mesin dan Dirgantara (FTMD) ITB Bandung. Film dipotong menjadi potongan berbentuk persegi panjang (10 x 2,6 cm) dan diukur menggunakan alat *Universal Testing Machine* (UTM) instron 5985 dengan kecepatan 2 mm/min. Gaya dan jarak direkam selama perpanjangan film hingga putus (ASTM, 2010; Wu dkk, 2021a). EAB film dihitung sebagai berikut:

$$\text{EAB (\%)} = \Delta L / L_0 \times 100$$

dimana ΔL dan L_0 masing-masing adalah perpanjangan dan panjang awal (mm) dari sampel film. EAB digunakan untuk mengetahui perpanjangan putus dari film kontrol dan film indikator terbaik (Wang dkk, 2019).

3.5.3.3. Karakterisasi struktur film dengan analisis FTIR

Analisis FTIR tepung biji jali dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen UPI. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil potongan film yang kering, kemudian dihaluskan dan ditekan menjadi pelet dengan bubuk KBr murni. Hasil pelet dianalisis menggunakan FTIR, dan dianalisis spektrumnya pada rentang 4000-400 cm^{-1} . Analisis FTIR dilakukan untuk melihat perubahan gugus fungsi film indikator terhadap film kontrol.

3.5.3.4. Tingkat *release* antosianin

Penentuan tingkat *release* antosianin dari film mengikuti cara (Kang dkk, 2018) dengan modifikasi. Film dipotong (2×2 cm) dan kemudian direndam dalam air deionisasi (10 ml). Larutan film diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan instrumen *spectronic 20+* setiap 1 jam sekali selama 9 jam. Kurva absorbansi terhadap waktu diplot untuk mengetahui kestabilan *release* antosianin yang menunjukkan ketahanan film. Konsentrasi antosianin yang *release* dihitung menggunakan persamaan dalam hukum lambert beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

dimana A adalah absorbansi, ϵ adalah absorptivitas molar antosianin (26900 L/mol.cm), b adalah lebar kuvet (1 cm), dan c adalah konsentrasi.