



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENENTUAN ANTOSIANIN DARI DAUN BAYAM MERAH
(*Alternanthera amoena* Voss) SERTA APLIKASINYA SEBAGAI
PEWARNA MINUMAN**

SKRIPSI



**DINI HARIYATI ADAM
07932034**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

**PENENTUAN ANTOSIANIN DARI DAUN BAYAM MERAH
(*Alternanthera amoena* Voss.) SERTA APLIKASINYA SEBAGAI
PEWARNA MINUMAN**

Oleh :

DINI HARIYATI ADAM

07932034

**Skripsi Ini Diajukan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas**


**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

LEMBARAN PENGESAHAN

Penentuan Antosianin dari Daun Bayam Merah (*Altenanthera amoena* Voss.) serta Aplikasinya Sebagai Pewarna Minuman. Skripsi ini diajukan oleh **Dini Hariyati Adam** (07 932 034) sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, yang diuji pada tanggal 28 Juli 2011.

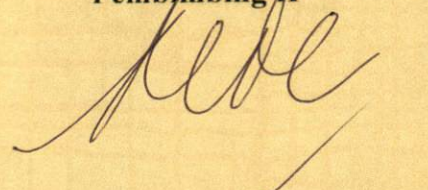
Disetujui oleh :

Pembimbing I



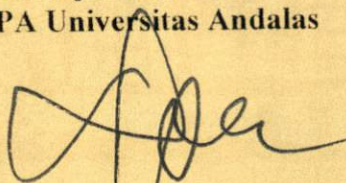
Dr. Adlis Santoni
NIP.196212031988111002

Pembimbing II



Dr. Djaswir Darwis, MS.DEA
NIP. 195012081980031001

Ketua jurusan kimia
FMIPA Universitas Andalas



Dr. Adlis Santoni
NIP 196212031988111002

ABSTRAK

PENENTUAN ANTOSIANIN DARI DAUN BAYAM MERAH (*Alternanthera amoena* Voss.) SERTA APLIKASINYA SEBAGAI PEWARNA MINUMAN

Oleh :

Dini Hariyati Adam (07932034)

Dibimbing oleh Dr. H. Adlis Santoni, M.S dan Dr. Djaswir Darwis, MS.DEA

Telah dilakukan penelitian mengenai penentuan antosianin dari daun bayam merah (*Alternanthera amoena* Voss.) serta aplikasinya sebagai pewarna minuman. Daun bayam merah yang segar diekstraksi dengan pelarut etanol yang telah diasamkan dengan HCl 0,1 M dan CH₃COOH 25 % (v/v) serta dengan pelarut etanol yang tanpa diasamkan, ekstraksi dilakukan dalam keadaan gelap selama 24 jam. Kemudian ekstrak tersebut diuji kestabilannya terhadap konsentrasi, pH, temperatur dan kondisi penyimpanan. Selanjutnya diidentifikasi dengan spektroskopi UV-Vis dan KLT. Dari pengaruh konsentrasi didapatkan bahwa jenis antosianin yang terdapat pada bayam merah yaitu sianidin karena dilihat dari λ maksimum yang didapatkan yaitu sebesar 290 nm (UV) dan 536 (tampak) yang sesuai dengan literatur. Berdasarkan pengaruh jenis asam bahwa didapatkan nilai konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin yang terbesar yaitu pada HCl 0,1 M sebesar 43,08 mg/L dan 132,76 mg/L. Berdasarkan pengaruh pH, antosianin stabil pada pH 1-3, karena pada pH ini antosianin berbentuk kation flavilium. Untuk pengaruh temperatur bahwa antosianin relatif stabil pada temperatur pemanasan hingga 60°C karena pada pemanasan ini degradasi warna yang terjadi hanya sebesar 25,14%, sedangkan untuk pengaruh penyimpanan, antosianin relatif stabil pada penyimpanan temperatur $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dimana degradasi warna sebesar 4,91 %. Berdasarkan hasil Uji KLT didapatkan nilai Rf sebesar 0,38. Ekstrak antosianin baik digunakan untuk minuman yang bersifat asam.

ABSTRACT

Determination of Anthocyanin from leaves of Red Spinach (*Altenanthera amoena* Voss.) and its application as dye in beverages

By :

Dini Hariyati Adam (07932034)

Advised by Dr. H. Adlis Santoni, M.S and Dr. Djaswir Darwis, MS.DEA

The research about determination of anthocyanin from leaves of red spinach and its application as dye in beverages had been done. Fresh leave of red spinach were extract in ethanol that has been added 0,1 M HCl and CH₃COOH 25%, and ethanol without addition of acid. Extraction was in the dark place during 24 hours. The extract were tested its stability to the effect of concentration, pH, temperature, and condition of storage. Then it was identified by UV-Vis spectrophotometer and thin layer chromatografi (TLC). The result from the effect of concentration showed that the type of anthocyanin in these red spinach was cyanidin, that is based on the value of maximum absorbance at 290 nm (UV) and 536 nm (visible). The result from the type acid's effect showed that the highest concentration of anthocyanin monomeric and the total of anthocyanin were in 0,1 M HCl, which has the value 43,08 mg/L and 132,76 mg/L. the result from the pH effect showed extract anthocyanin was stable at pH 1-3, because at this pH anthocyanin was in form of flavilium cations. The effect temperature showed that anthocyanin was in stable at temperature 60°C, because at this temperature, degradation of dye was 25,14%. The effect condition of storage, anthocyanin was stable in storage at refrigerator temperature ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), which has the percentage of degradation was 4,91%. From TLC the value of R_f was 0,38. This extract it can be applied beverages with low pH.

KATA PENGANTAR



Assalamualaikum Wr. Wb.

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT, atas semua rahmat serta karunia yang telah dilimpahkan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Penentuan Antosianin dari Bayam Merah (*Alternanthera amoena* Voss.) serta Aplikasinya Sebagai Pewarna Minuman ”**.

Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam menyelesaikan pendidikan sarjana Strata Satu (S1) pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunianya sehingga penelitian ini bisa berjalan dengan lancar.
2. Kedua orang tua, abang, adik, serta seluruh keluarga atas doa dan kasih sayang yang telah diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini dengan baik.
3. Bapak Dr Adlis Santoni selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Andalas.
4. Bapak Dr. Mai Efdi selaku Koordinator Pendidikan Jurusan Kimia Universitas Andalas.
5. Bapak Dr Adlis Santoni sebagai Dosen Pembimbing I dan Bapak Dr. Djaswir Darwis, MS.DEA sebagai Dosen Pembimbing II yang memberikan ide, pengarahan dan juga nasihat selama studi, penelitian dan penulisan skripsi ini.
6. Bapak Yulizar Yusuf, MS sebagai Pembimbing Akademik.
7. Semua analis laboratorium yang telah memberikan pengarahan selama melakukan penelitian.
8. Teman-teman socha dan sahabat-sahabat ku yang telah memberikan motivasi.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna, karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak.

Akhir kata, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan karunia-Nya dan membalas segala amal budi serta kebaikan pihak-pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini dan semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi pihak-pihak yang membutuhkan. Amin.

Padang, Agustus 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tanaman bayam merah	4
2.1.1 Taksonomi tanaman bayam merah.....	4
2.1.2 Kandungan kimia dan efek farmakologis.....	5
2.2 Antosianin	5
2.2.1 Pengertian antosianin	5
2.2.2 Tinjauan umum antosianin.....	7
2.2.3 Kestabilan antosianin.....	8
2.2.4 Sumber antosianin.....	9
2.2.5 Biosintesis antosianin.....	9
2.2.6 Ekstraksi antosianin.....	11
2.2.7 Fungsi antosianin.....	11
2.3 Spektroskopi UV-Vis	12
2.4 Metoda identifikasi kromatografi.....	13
2.4.1 Kromatografi lapis tipis	13

BAB III. METODA PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan	16
3.3 Pengambilan dan persiapan sampel	16
3.4 Ekstraksi.....	16
3.5 Identifikasi antosianin dari daun bayam merah.....	17
3.5.1 Penentuan jenis asam	17
3.5.1.1 Penentuan total monomer antosianin dan total antosianin.....	17
3.5.2 Pembuatan reagen.....	18
3.5.2.1 Pembuatan Larutan KCl 0,2M, HCl 0,2M, CH ₃ COOH 0,2M, CH ₃ COONH ₄ 0,2M, NH ₄ OH 0,2 M, NH ₄ Cl 0,2M.....	18
3.5.2.2 Pembuatan larutan pH 1.....	19
3.5.2.3 Pembuatan larutan buffer pH 3.....	19
3.5.2.4 Pembuatan larutan buffer pH 5.....	19
3.5.2.5 Pembuatan larutan buffer pH 7.....	19
3.5.2.6 Pembuatan larutan buffer pH 9.....	19
3.5.2.7 Analisa antosianin.....	20
3.5.3 Uji kestabilan antosianin.....	20
3.5.4 Aplikasi pada makanan maupun minuman.....	21

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi zat warna sampel.....	22
4.2 Pengaruh jenis asam.....	22
4.3 Uji kestabilan pigmen antosianin.....	24
4.3.1 Pengaruh konsentrasi.....	24
4.3.2 Pengaruh pH.....	26
4.3.3 Pengaruh temperatur.....	28
4.3.4 Pengaruh kondisi penyimpanan.....	30
4.4 Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT).....	31
4.4.1 Hasil uji KLT terhadap pengaruh pH.....	32
4.4.2 Hasil uji KLT terhadap pengaruh temperatur.....	33

4.5 Aplikasi sebagai pewarna minuman.....	34
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Warna fluoresensi flavonoid yang tersubsitisi dibawah sinar UV	14
Tabel 2.Konsentrasi monomer antosianin daun bayam merah dengan variasi jenis asam.....	23
Tabel 3.Total antosianin daun bayam merah dengan variasi jenis asam.....	24
Tabel 4. Degradasi warna akibat pemanasan dengan berbagai suhu	29
Tabel 5. Degradasi warna akibat pengaruh kondisi penyimpanan	30
Tabel 6. Hasil Uji KLT dengan berbagai komposisi eluen.....	31
Tabel 7. Hasil uji KLT terhadap pengaruh pH.....	32
Tabel 8. Hasil Uji KLT terhadap pengaruh temperatur.....	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman bayam bayam merah.....	4
Gambar 2. Kerangka dasar Antosianin.....	5
Gambar 3. Contoh beberapa struktur antosianin di alam.....	7
Gambar 4. Jalur biosintesis antosianin.....	10
Gambar 5. Kromofor Benzoil A dan Sinamoil B.....	13
Gambar 6. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan jenis asam.....	23
Gambar 7. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan konsentrasi.....	25
Gambar 8. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan pH.....	26
Gambar 9. Perubahan warna karena pengaruh pH.....	27
Gambar 10. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan temperatur.....	28
Gambar 11. Perubahan warna akibat pengaruh temperatur.....	29
Gambar 12. Grafik hubungan pengaruh temperatur dengan degradasi warna.....	30
Gambar 13. Grafik hubungan pengaruh kondisi penyimpanan dengan degradasi warna.....	31
Gambar 14. Aplikasi sebagai pewarna.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penentuan Antosianin dari Daun Bayam Merah.....	38
Lampiran 2. Pembuatan HCl 0,1M dari HCl 37 %.....	39
Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan Buffer.....	40
Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi Monomer Antosianin.....	41
Lampiran 5. Perhitungan Total Antosianin.....	42
Lampiran 6. Perhitungan Degradasi Warna Akibat Pengaruh Temperatur (%)...	43
Lampiran 7. Perhitungan Degradasi Warna Akibat Pengaruh Kondisi Penyimpanan.....	44

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Akhir-akhir ini penggunaan bahan tambahan pangan khususnya pewarna banyak mendapat sorotan karena produsen pangan olahan terutama skala industri rumah tangga banyak menyalahgunakan pewarna yang sebenarnya bukan untuk pangan. Alasan utama penyalahgunaan tersebut adalah karena pewarna *food grade* harganya relatif mahal sehingga biaya produksi juga akan menjadi lebih mahal.¹

Bahan pewarna makanan terbagi dalam kedua kelompok besar yakni pewarna alami dan pewarna buatan. Pewarna alami diperoleh dari tanaman ataupun hewan yang berupa pigmen. Beberapa pigmen alami yang banyak terdapat di sekitar kita antara lain: klorofil, karotenoid dan antosianin. Umumnya, pigmen-pigmen ini bersifat tidak cukup stabil terhadap panas, cahaya, dan pH tertentu. Walau begitu, pewarna alami umumnya aman dan tidak menimbulkan efek samping bagi tubuh.

Pewarna buatan untuk makanan diperoleh melalui proses sintesis kimia yang mengandalkan bahan-bahan kimia, atau dari bahan yang mengandung pewarna alami melalui ekstraksi secara kimiawi. Beberapa contoh pewarna buatan yaitu :

1. Warna kuning : tartrazin, sunset yellow
2. Warna merah : allura, eritrosin, amaranth.
3. Warna biru : biru berlian

Kelebihan pewarna buatan dibanding pewarna alami adalah dapat menghasilkan warna yang lebih kuat dan stabil meski jumlah pewarna yang digunakan hanya sedikit. Warna yang dihasilkan dari pewarna buatan akan tetap cerah meskipun sudah mengalami proses pengolahan dan pemanasan, sedangkan pewarna alami mudah mengalami degradasi atau pemudaran pada saat diolah dan disimpan. Misalnya kerupuk yang menggunakan pewarna alami, maka warna tersebut akan segera pudar ketika mengalami proses penggorengan.

Disamping itu beberapa pewarna sintetik pun ternyata tidak aman digunakan untuk pangan karena sifatnya yang toksik, bahkan beberapa diantaranya bersifat

karsinogenik. Oleh karena itu, perlu dicari sumber pewarna alami yang dapat digunakan dalam pengolahan pangan sehingga dihasilkan pewarna yang aman.

Salah satu pigmen yang dapat diekstrak dari sumber bahan alami adalah antosianin yang termasuk golongan senyawa flavonoid. Pigmen ini berperan terhadap timbulnya warna merah hingga biru pada beberapa bunga, buah dan daun.

Antosianin merupakan pigmen yang bisa larut dalam air. Secara kimiawi antosianin dapat dikelompokkan ke dalam flavonoid. Antosianin dapat ditemukan diberbagai tanaman di alam. Zat tersebut berperan dalam pemberian warna terhadap bunga atau bagian tanaman lain mulai dari merah, biru sampai ke ungu termasuk juga kuning dan tidak berwarna (seluruh warna kecuali hijau).²

Ekstraksi pigmen dapat dilakukan dengan cara mengekstrak bahan dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan kepolarannya dengan zat yang akan diekstrak. Ekstraksi antosianin dianjurkan dilakukan pada suasana asam karena asam berfungsi mendenaturasi membran sel tanaman, kemudian melarutkan pigmen antosianin sehingga dapat keluar dari sel, serta mencegah proses oksidasi flavonoid. Senyawa golongan flavonoid termasuk senyawa polar dan dapat diekstraksi dengan pelarut yang bersifat polar pula.³

1.2 Perumusan Masalah

Pada penelitian ini masalah yang akan diteliti adalah :

1. Mencari sumber pewarna alami yang dapat digunakan sebagai pewarna minuman.
2. Penentuan jenis asam untuk ekstraksi antosianin sehingga dapat ditentukan konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin dari daun bayam merah.
3. Melihat pengaruh konsentrasi terhadap absorbansi yang akan diukur dan menentukan nilai λ maksimum dari spektroskopi UV-Vis sehingga dapat ditentukan jenis antosianin nya.
4. Menentukan kestabilan antosianin terhadap pengaruh pH, temperatur, dan kondisi penyimpanan, serta menentukan degradasi warna.
5. Menentukan eluen yang sesuai untuk memisahkan senyawa dengan baik.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi antosianin dari daun bayam merah (*Alternanthera amoena* Voss.) dan mengaplikasikan zat warna antosianin sebagai alternatif pewarna alami pada minuman.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan masyarakat menghindari pemakaian zat warna sintesis yang bersifat toksik dan beralih ke pewarna alami.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Bayam Merah

Bayam berasal dari Amerika tropis dan sampai sekarang, tumbuhan ini sudah tersebar di daerah tropis dan subtropis seluruh dunia. Di Indonesia, bayam dapat tumbuh sepanjang tahun, tumbuh di daerah panas dan dingin, tetapi tumbuh lebih subur di dataran rendah pada lahan terbuka yang udaranya agak panas. Tingginya mencapai 0,4-1 m dan bercabang. Batangnya lemah dan berair. Daun bertangkai berbentuk bulat telur, lemas dengan panjang 2-8 cm. Ujungnya tumpul, pangkal runcing dan berwarna hijau, merah atau hijau keputihan. Bunganya berbentuk bulir yang berwarna ungu gelap.



Gambar 1. Tanaman bayam merah

2.1.1 Taksonomi Bayam Merah

Bayam merah adalah dari tumbuhan keluarga Amaranthacea. Nama Inggrisnya adalah Red Spinach.

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida

Sub Kelas	: Hamamelidae
Ordo	: Caryophyllales
Famili	: Amaranthaceae
Genus	: Alternanthera
Spesies	: <i>Alternanthera amoena</i> Voss.

2.1.2 Kandungan kimia dan efek farmakologis

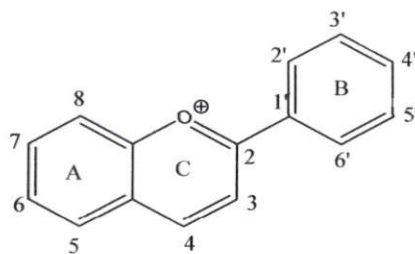
Bayam mengandung protein, lemak, karbohidrat, kalium, zat besi, rutin, purin, dan vitamin (A, B, dan C), serta antosianin yang berjenis sianidin.

Secara umum, tanaman bayam dapat meningkatkan kerja ginjal, melancarkan pencernaan sedangkan bayam merah berkhasiat sebagai obat disentri. Bayam termasuk sayuran berserat yang dapat digunakan untuk memperlancar proses buang air besar. Makanan berserat sangat dianjurkan untuk dikonsumsi oleh penderita kanker usus besar, penderita kencing manis (*diabetes mellitus*), kolesterol tinggi, dan menurunkan berat badan.

2.2 Antosianin

2.2.1 Pengertian Antosianin

Antosianin merupakan senyawa kimia yang tersebar luas di alam sebagai zat warna dalam tumbuhan. Pigmen antosianin larut dalam air dan memiliki warna merah muda, merah, ungu, biru, dan kuning. Kerangka dasar antosianin berasal dari kation flavilium.^{3,4}



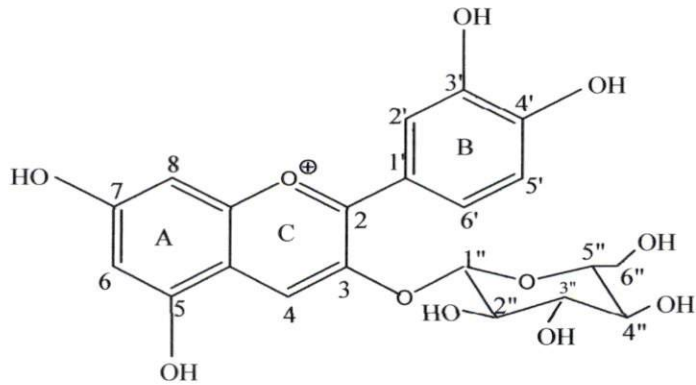
Kation flavilium

Gambar 2. Kerangka dasar Antosianin³

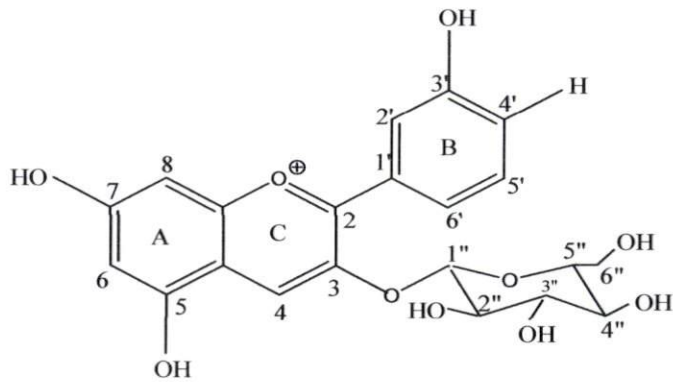
Antosianin terikat dengan molekul gula yang berupa glikosida dan pada umumnya gula yang sering dijumpai seperti glukosa, rutinosa, diantaranya sebagai berikut

4 :

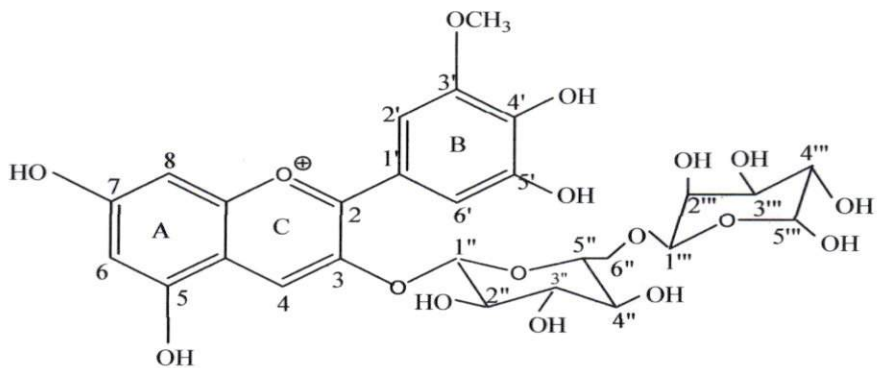
1. Sianidin-3-O-glikosida



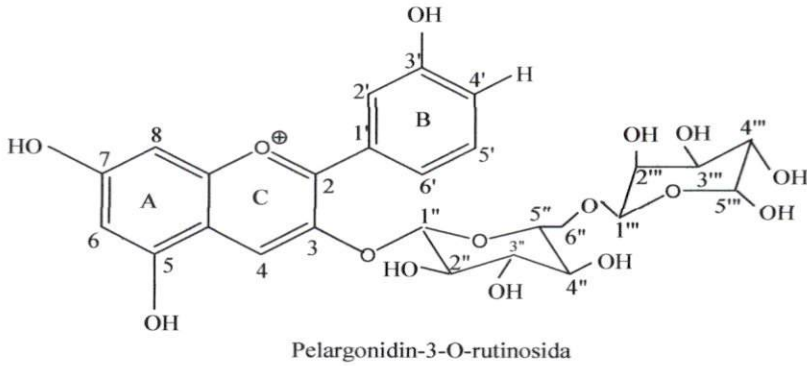
2. Pelargonidin-3-O-glikosida



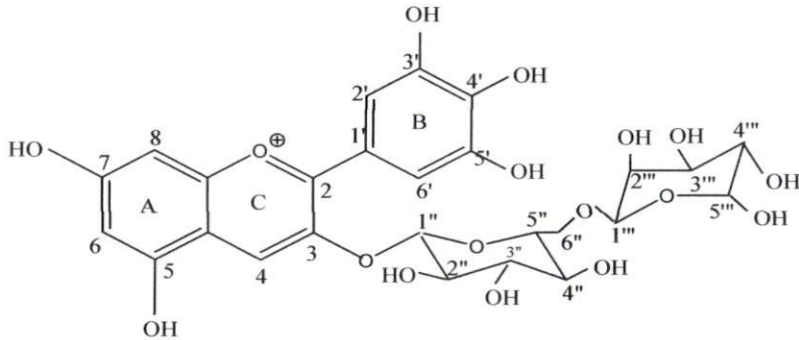
3. Petunidin-3-O-rutinosida



4. Pelargonidin-3-O-rutinosida



5. Delfinidin-3-O-rutinosida



Gambar 3. Contoh beberapa struktur antosianin di alam.³

2.2.2 Tinjauan Umum Antosianin

Menurut beberapa orang yang telah melakukan penelitian mengenai antosianin :

Penelitian yang dilakukan pada tahun 2010 mengenai “Analisis dan Karakterisasi Antosianin pada Buah Murbei” yang dilakukan oleh Cuanguang Qin dimana buah murbei segar di ekstraksi menggunakan pelarut alkohol/HCl 1% (1:1) pada suhu kamar dalam keadaan gelap. Dan diidentifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis, HPLC, LC-MS dan HNMR. Dari hasil uji kestabilan bahwa antosianin stabil pada pH 3 dan temperatur 20-60°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada buah murbei terdapat jenis antosianin yaitu pelargonidin-3-O rutinosida dan sianidin 3-O-glukosida dengan nilai λ maksimum 280 nm (UV) dan 520 nm (visible).⁵

“Identifikasi HPLC-DAD dan ESI/MS dari Antosianin pada Ubi Jalar Ungu (*Dioscorea trifida L.*)” yang dilakukan oleh Fernando Ramos. Penelitian ini dilakukan pada tahun 2010, dimana Fernando Ramos melakukan ekstraksi menggunakan pelarut metanol/TFA 0,5%. Kemudian dilakukan identifikasi menggunakan HPLC dan ESI-MS. Dan didapatkan hasil antosianin berupa peonidin.⁶

Dita Natalia telah melakukan penelitian mengenai “ Ekstraksi Pewarna Alami dari Buah Arben (*Rubus ideaus* (Linn.)) dan Aplikasinya pada Sistem Pangan. Pada penelitian ini ekstraksi dilakukan menggunakan beberapa jenis asam yaitu asam tartarat, asam sitrat dan asam asetat, dimana penggunaan asam tartarat menghasilkan total antosianin yang lebih besar dibandingkan asam sitrat dan asam asetat. Lalu dilakukan variasi pelarut yaitu akuades, etil asetat dan etanol. Berdasarkan hasil variasi pelarut ekstraksi didapatkan akuades sebagai pelarut ekstraksi dengan total antosianin terbesar. Kemudian dilakukan uji kestabilan terhadap ekstrak antosianin, menurut nya antosianin stabil pada pH 2-5 karea pada pH ini antosianin berbentuk kation flavilium. Jenis antosianin yang terkandung dalam buah arben yaitu sianidin dan pelargonidin-3-O-glikosida, 3-rutinosida.¹

Penelitian mengenai Identifikasi dan Uji Kualitas Pigmen Kulit Buah Naga Merah (*Hylocareus costaricensis*) pada beberapa Umur Simpan dengan perbedaan jenis pelarut yang dilakukan oleh Elfis Anis Saati. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kulit buah naga merah mengandung antosianin berjenis sianidin, berdasarkan nilai Rf yaitu 0,36-0,38 dengan serapan maksimum yaitu 536,4 nm.⁷

Pada tahun 2008, Asep Muhammad Samsudin telah melakukan penelitian mengenai Ekstraksi, Filtrasi Membran dan Uji Stabilitas Zat Warna dari Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) yang dilakukan oleh. Pada penelitian ini ekstraksi menggunakan pelarut akuades dengan berbagai suhu. Kemudian dilakukan uji stabilitas dimana pengaruh penyimpanan pada kondisi dingin lebih baik daripada penyimpanan pada suhu kamar, serta pengaruh pH dimana semakin rendah nilai pH maka semakin tinggi absorban yang dihasilkan.⁸

2.2.3 Kestabilan Antosianin

Meskipun antosianin tidak bersifat toksik dan aman dikonsumsi, namun ada keterbatasan dalam aplikasinya pada produk pangan terutama dalam masalah kestabilan. Kestabilan antosianin sangat dipengaruhi oleh :

- Nilai pH

Antosianin relatif stabil dalam suasana asam, dimana dalam keadaan ini antosianin berwarna merah dan pada suasana basa berwarna biru-kuning. Karena sifatnya ini, pewarna dari daun bayam merah ini hanya cocok untuk pewarna makanan maupun minuman dengan pH rendah.

- Temperatur

Temperatur yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terdegradasinya antosianin sehingga dapat menyebabkan struktur berubah dan rusak.

- Cahaya

Efek pencahayaan pada antosianin sangat berpengaruh karena akan menyebabkan terjadinya degradasi warna. Sehingga antosianin lebih baik di simpan dalam keadaan gelap.

- Pengaruh oksidator

Adanya oksidator dalam larutan akan menyebabkan kation flavilium yang berwarna merah kehilangan proton dan berubah menjadi karbinol yang tidak berwarna.^{8,9}

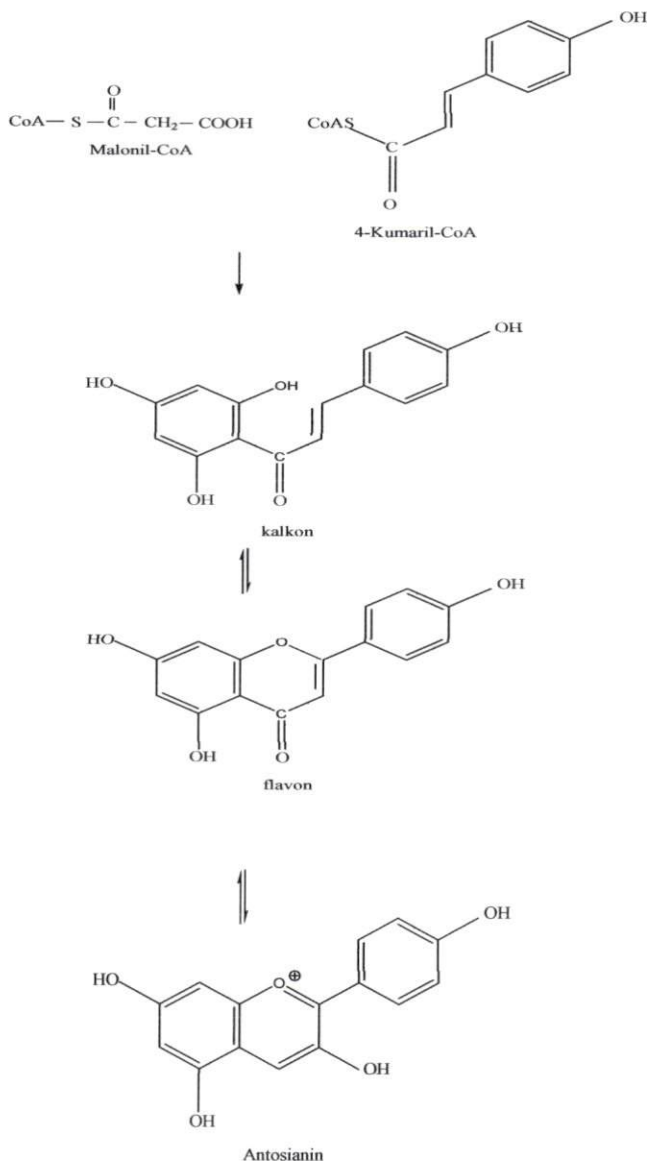
2.2.4 Sumber Antosianin

Antosianin mudah ditemukan pada sayuran dan buah-buahan berwarna merah keunguan. Contoh sumber antosianin adalah blackberry, blueberry, cranberry, redberry, strawberry, plum, murbei, anggur, kismis, kubis merah, lobak merah, bawang merah, terung pirus.¹⁰

2.2.5 Biosintesis Antosianin

Jalur biosintesis antosianin diturunkan dari dua jalur terpisah, yaitu jalur sikimat dan jalur asetat-malonat.³

Jalur Biosintesis Antosianin



Gambar 4. Jalur biosintesis antosianin

2.2.6 Ekstraksi Antosianin

Ekstraksi adalah suatu cara untuk mendapatkan zat dari bahan yang diduga mengandung zat tersebut. Ekstraksi menggunakan pelarut didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran dimana pelarut polar akan melarutkan pelarut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan pelarut yang non polar atau disebut dengan “*like dissolve like*”^{2,11}.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan cara mengekstrak bahan dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan kepolarannya dengan zat yang akan diekstrak. Ekstraksi antosianin dianjurkan dilakukan pada suasana asam karena asam berfungsi mendenaturasi membran sel tanaman, kemudian melarutkan antosianin sehingga dapat keluar dari sel. Senyawa golongan flavonoid termasuk antosianin merupakan senyawa polar dan dapat diekstraksi dengan pelarut yang bersifat polar pula.¹

2.2.7 Fungsi Antosianin

Antosianin mempunyai tiga fungsi, seperti :

a. Fungsi zat warna

Antosianin merupakan kelompok yang sangat penting dari zat warna dalam tumbuhan, mulai dari berwarna merah muda, merah, kuning, biru dan ungu. Warna pada bunga merupakan salah satu faktor yang dapat menarik lebah, kupu-kupu, burung, dan insekta lainnya untuk melakukan penyerbukan.

b. Fungsi Aktivitas Farmakologis

Antosianin dapat digunakan sebagai obat karena mempunyai bermacam-macam bioaktivitas sebagai anti-inflamasi (anti radang), anti-kanker, anti-depressant, anti-mikroba, anti-diabetes, antioksidan, dll.

c. Fungsi Antosianin dalam makanan

Berbagai macam antosianin yang diekstrak dari tumbuhan telah banyak dimanfaatkan sebagai pewarna pada produk minuman ringan, minuman bubuk, minuman beralkohol, produk beku, dll. Penggunaan pewarna alami seperti antosianin semakin diminati karena dapat mengurangi pewarna sintetik yang bersifat toksik. Antosianin juga dimanfaatkan dalam pembuatan suplemen makanan atau nutrisi karena memiliki banyak dampak positif bagi kesehatan manusia. Selain itu antosianin juga dimanfaatkan dalam proses pengawetan buah serta pembuatan selai buah.³

2.3 Spektroskopi UV-Vis

Radiasi elektromagnetik UV-Vis tersebut mempunyai panjang gelombang berkisar 200-800 nm. Sinar UV mulai dari 200-400 nm dan sinar tampak 400-800 nm. Absorpsi radiasi akan menyebabkan terjadinya eksitasi elektron.¹²

Untuk pengukuran secara kuantitatif, metoda spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menentukan konsentrasi larutan, dimana absorpsi sinar oleh larutan merupakan fungsi konsentrasi. Persamaan yang menggambarkan hubungan linier tersebut dikenal dengan hukum Lambert-Beer, yaitu :

$$A = a.b.c$$

Keterangan : A = absorban

a = absorpsivity ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

b = panjang lajur larutan (cm)

c = konsentrasi (M)

Pemakaian spektroskopi UV-Vis dalam penentuan struktur molekul senyawa organik dimana prinsipnya berdasarkan transisi elektron dari orbital yang memiliki tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi. Elektron dalam molekul pada keadaan biasa berada pada tingkat energi dasar.

Adanya energi yang berasal dari energi elektromagnetik dapat berinteraksi dengan molekul organik, akibatnya elektron yang berada pada keadaan dasar dapat berpindah ke orbital yang lebih tinggi atau tereksitasi. Bagian molekul yang dapat menyerap energi untuk melakukan proses eksitasi disebut kromofor. Gugus-gugus yang dapat teridentifikasi antara lain senyawa yang mengandung ikatan rangkap berkonjugasi, senyawa aromatik dan senyawa yang memiliki gugus kromofor. Kromofor merupakan kerangka dasar suatu molekul yang dapat menyerap radiasi dalam daerah ultraviolet atau daerah tampak.¹³

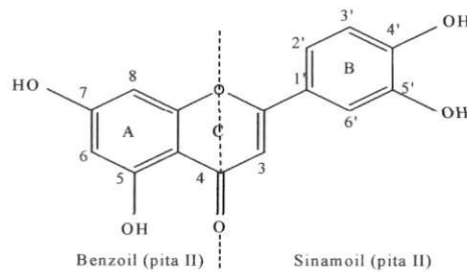
Hubungan antara energi yang diserap dengan frekuensi (ν), panjang gelombang (λ) adalah¹³:

$$E = h \nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Dimana : h = tetapan Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J)

c = kecepatan cahaya (3×10^{10} cm/det)

Spektrum UV-Vis flavonoid umumnya memberikan dua puncak serapan maksimum. Untuk antosianin, spektrum khas terdiri dari dua puncak serapan maksimum: puncak I : pada rentang 270-290 nm (pita II) berasal dari kromofor benzoil A sedangkan puncak II : pada rentang 465-560 nm (pita I) berasal dari kromofor sinamoil B.³



Gambar 5. Kromofor Benzoil A dan Sinamoil B

2.4 Metoda Identifikasi Kromatografi

Metoda identifikasi kromatografi digunakan untuk identifikasi antosianin dengan melihat fluoresensinya dan kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatografi adalah metode analisa senyawa yang didasarkan pada perbedaan migrasi dari komponen-komponen senyawa diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak.

Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, sehingga terpisah dari zat terlarut lainnya yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Fase diam dapat bertindak sebagai penyerap, seperti alumina dan silika gel.

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dapat digunakan untuk mengidentifikasi antosianin yang belum diketahui dengan membandingkannya dengan senyawa antosianin yang sudah diketahui berdasarkan harga Rf nya.

$$R_f = \frac{\text{Jarak perambatan noda}}{\text{Jarak perambatan pelarut}}$$

Jarak yang ditempuh oleh tiap noda dari titik pentotolan diukur dari titik pusat noda. Harga Rf sangat berguna untuk mengidentifikasi suatu senyawa.

Fase gerak yang digunakan biasanya campuran dari suatu pelarut organik dengan tujuan untuk mengatur tingkat kepolaran dari beberapa senyawa atau untuk mengurangi kelarutan yang lainnya.

Fase gerak terdiri dari satu atau beberapa pelarut. Pada pemisahan senyawa organik selalu menggunakan pelarut campuran, tujuannya untuk memperoleh polaritas yang tepat sehingga diperoleh pemisahan senyawa yang baik. Kombinasi pelarut berdasarkan polaritas masing-masing pelarut sehingga dengan demikian diperoleh komposisi pelarut yang sesuai dengan pemisahan yang baik.

Tabel 1. Warna fluoresensi flavonoid yang tersubsitisi dibawah sinar UV¹⁴

Warna bercak dengan sinar UV		Jenis flavonoid yang mungkin
Sinar UV tanpa NH ₃	Sinar UV dengan NH ₃	
Lembayung gelap	Kuning-hijau atau hijau	a. Biasanya 5-OH flavon atau flavanol b. Kadang-kadang 5-OH flavanon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Tanpa perubahan warna	a. Biasanya flavon atau flavanol-3-O yang mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas b. Bebrapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol-3O yang mengandung 5-OH c. Isoflavon, dihidroflavonol, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH d. Kalkon yang mengandung 2'- atau 6'-OH tetapi tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas
	Biru muda	a. Berupa 5-OH flavanon
	Merah atau jingga	b. Kalkon yang mengandung 2-atau 4-OH bebas
Fluorisensi biru muda biru	Fluorisensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon yang tidak mengandung 5-OH b. Flavanol tanpa 5-OH bebas tetapi tersulih pada 3-OH

	Tanpa perubahan Warna	Isoflavon yang tidak mengandung 5- OH bebas
	Fluorisensi biru muda	Isoflavon yang tidak mengandung 5- OH bebas
Merah jingga redup atau merah senduduk	Biru	Antosianin-3-glikosida
Merah jambu atau fluoresensi kuning	Biru	Sebagian besar antosianidin 3,5- diglikosida.

BAB III

METODA PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang. Mulai bulan April sampai Juni 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat distilasi, rotary evaporator Heidolph WB 2000, plat KLT, spektrofotometer UV-Vis (UV-1700 Series) Shimadzu, kertas saring Whatman No 1, aluminium foil, pH meter, termometer, neraca analitik, serangkaian alat vakum, water bath, aluminium foil, lampu UV, serta peralatan gelas yang umum digunakan dalam laboratorium.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bayam merah segar, dan bahan-bahan kimia berupa pelarut organik seperti $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ teknis yang didistilasi, akuades, CH_3COOH pekat, HCl pekat, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, KCl , I_2 , NH_4Cl , dan NH_4OH .

3.3 Pengambilan dan Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan untuk penelitian yaitu bayam merah yang didapatkan di daerah Kota Baru, Padang Panjang, Sumatera Barat. Bagian sampel yang akan diteliti yaitu bagian daun.

3.4 Ekstraksi

Ekstraksi dimulai dengan menimbang daun bayam merah sebanyak 100 gram lalu sampel dipotong kecil-kecil. Sampel yang telah halus dipindahkan ke dalam botol gelap, lalu ditambahkan pelarut ekstraksi yang dibuat dalam suasana asam hingga pH 3. Kemudian dilakukan proses ekstraksi secara maserasi pada temperatur

kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 24 jam dalam keadaan gelap, kemudian disaring sehingga didapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan serangkaian alat vakum sehingga diperoleh ekstrak pekat lalu dianalisa dengan spektroskopi UV-Vis dan KLT.

3.5. Identifikasi Antosianin dari Daun Bayam Merah

Penelitian ini terdiri dari (1) penentuan jenis asam untuk ekstraksi, dimana jenis asam yang digunakan adalah HCl 0,1 M dan CH_3COOH 25% (v/v) serta tanpa asam dimana pada perbedaan jenis asam ini akan ditentukan total antosianin dan konsentrasi monomer antosianin (2) penentuan kestabilan ekstrak pigmen terhadap pengaruh konsentrasi, pH, temperatur, dan kondisi penyimpanan (3) aplikasi ekstrak pigmen pada minuman, serta (4) monitor KLT.

3.5.1. Penentuan Jenis Asam

Penentuan jenis asam bertujuan untuk memberikan suasana asam pada proses ekstraksi. Dimana jenis asam yang digunakan pada penelitian ini yaitu HCl 0,1 M, asam asetat 25% (v/v) serta tanpa menggunakan asam.

3.5.1.1 Penentuan Konsentrasi Monomer Antosianin dan Total Antosianin

15,16

Penetapan konsentrasi monomer antosianin dilakukan dengan metoda perbedaan pH yaitu pH 1,0 dan pH 5,0. Pada pH 1,0 antosianin berbentuk kation flavilium dan pada pH 5,0 berbentuk karbinol yang tidak berwarna. Untuk penentuan konsentrasi antosianin dapat dilakukan dengan membuat suatu larutan antosianin dengan larutan buffer pH 1,0 dan 5,0 kemudian diukur absorbansinya. Untuk penentuan total antosianin dilakukan dengan pengukuran absorban pada pH 1.

Pengukuran Konsentrasi Monomer Antosianin dan Total Antosianin

1. Faktor pengenceran yang tepat untuk sampel harus ditentukan terlebih dahulu dengan cara melarutkan sampel dengan buffer pH 1 dan pH 5 hingga diperoleh absorban kurang dari 1 pada panjang gelombang 536 nm.
2. Selanjutnya digunakan akuades sebagai blanko (536 nm dan 700 nm) untuk mencari titik nol. Panjang gelombang 536 nm adalah panjang gelombang

maksimum untuk sianidin sedangkan panjang gelombang 700 nm untuk mengkoreksi endapan yang masih terdapat pada sampel. Jika sampel benar-benar jernih maka absorbansi pada 700 nm adalah 0.

3. Dua larutan sampel disiapkan, pada sampel pertama digunakan buffer pH 1 dan untuk sampel kedua digunakan buffer dengan pH 5. Masing-masing sampel dilarutkan dengan larutan buffer berdasarkan DF (dilution factor/faktor pengenceran) yang sudah ditentukan sebelumnya.
4. Konsentrasi monomer antosianin pada sampel dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi monomer antosianin (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

Dimana absorbansi dari sampel yang telah dilarutkan (A) ditentukan dengan rumus : $A = (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 5,0}$

Sedangkan pengukuran untuk total antosianin dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Total antosianin (mg/mL)} = \frac{A' \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

Dimana : $A' = (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0}$

Keterangan :

ϵ = absorpsivitas molar sianidin-3-glukosida = 26900 L/mol.cm

l = lebar cuvet (1 cm)

MW = berat molekul sianidin-3-glukosida = 449,2 g/mol

DF = faktor pengenceran

3.5.2 Pembuatan Reagen

3.5.2.1 Pembuatan Larutan KCl 0,2M, HCl 0,2M, CH₃COOH 0,2M, CH₃COONH₄ 0,2M, NH₄OH 0,2 M, NH₄Cl 0,2M.

Larutan KCl 0,2 M dibuat dengan melarutkan 3,725 g KCl dalam labu ukur 250 mL dengan akuades sampai tanda batas. Larutan HCl 0,2 M dibuat dengan melarutkan 4,17 mL HCl pekat ke dalam labu ukur 250 mL dengan akuades sampai tanda batas. Larutan CH₃COOH 0,2 M dibuat dengan mengencerkan 2,9 mL CH₃COOH p.a di dalam labu ukur 250 mL dengan akuades sampai tanda batas. Larutan CH₃COONH₄ 0,2 M dibuat dengan melarutkan 3,85 g CH₃COONH₄ dengan akuades di dalam labu

ukur 250 mL sampai tanda batas. Larutan NH_4OH 0,2 M dibuat dengan mengencerkan 7,8 mL NH_4OH 25 % di dalam labu kur 250 mL dengan akuades sampai tanda batas. Larutan NH_4Cl 0,2 M dibuat dengan melarutkan 2,675 g NH_4Cl di dalam labu ukur 250 mL dengan akuades sampai tanda batas.

3.5.2.2 Pembuatan Larutan pH 1

Larutan buffer pH 1 dibuat dengan mencampurkan 25 mL KCl 0,2 M dan 67 mL HCl 0,2 M, diencerkan dalam labu ukur 250 mL. pH larutan ditepatkan 1 dengan penambahan sedikit demi sedikit HCl 0,2 M atau KCl 0,2 M sambil diukur dengan menggunakan pH meter.

3.5.2.3 Pembuatan Larutan Buffer pH 3

Larutan buffer pH 3 dibuat dengan mencampurkan 50 mL CH_3COOH 0,2 M dan 1 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,2 M, diencerkan dalam labu ukur 500 mL. pH larutan ditepatkan 3 dengan penambahan sedikit demi sedikit CH_3COOH 0,2 M atau $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,2M sambil diukur dengan menggunakan pH meter.

3.5.2.4 Pembuatan Larutan Buffer pH 5

Larutan buffer pH 3 dibuat dengan mencampurkan 7,4 mL CH_3COOH 0,2 M dan 17,6 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,2 M, diencerkan dalam labu ukur 500 mL. pH larutan ditepatkan 5 dengan penambahan sedikit demi sedikit CH_3COOH 0,2 M atau $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,2M sambil diukur dengan menggunakan pH meter.

3.5.2.5 Pembuatan Larutan Buffer pH 7

Larutan buffer pH 7 dibuat dengan mencampurkan 0,5 mL NH_4OH 0,2 M dan 90 mL NH_4Cl 0,2 M, diencerkan dalam labu ukur 500 mL. pH larutan ditepatkan 7 dengan penambahan sedikit demi sedikit NH_4OH 0,2 M atau NH_4Cl 0,2M sambil diukur dengan menggunakan pH meter.

3.5.2.6 Pembuatan Larutan Buffer pH 9

Larutan buffer pH 9 dibuat dengan mencampurkan 25 mL NH_4OH 0,2 M dan 45 mL NH_4Cl 0,2 M, diencerkan dalam labu ukur 500 mL. pH larutan

ditepatkan 9 dengan penambahan sedikit demi sedikit NH_4OH 0,2 M atau NH_4Cl 0,2M sambil diukur dengan menggunakan pH meter.

3.5.2.7 Analisa Antosianin

1. Analisa spektrofotometer UV-Vis

Spektrum serapan UV-VIS di rekam pada panjang gelombang 200-800 nm, menggunakan spektrofotometer UV- 1700 Series.

2. Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT dilakukan dengan berbagai perbandingan pelarut, mulai dari pelarut yang non polar hingga pelarut yang bersifat polar. Yang dimulai dari pelarut n-heksan hingga etanol. Uji KLT bertujuan untuk menentukan jumlah komponen suatu senyawa yang terkandung dalam sampel bayam merah serta untuk menentukan pelarut yang baik untuk memisahkan senyawa-senyawa tersebut. Untuk melihat pola noda yang terbentuk pada plat KLT digunakan lampu UV dengan reagen penampak noda NH_3 dan I_2 .

3.5.3 Uji Kestabilan Antosianin

1. Pengaruh Konsentrasi

Untuk pengaruh konsentrasi, ekstrak pekat antosianin diencerkan dengan larutan buffer pH 3 dengan 5 tingkat konsentrasi yaitu 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7% dan 0,9% (b/v). Lalu dilakukan pengukuran λ maks pada panjang gelombang 200-800 nm.

2. Pengaruh pH

Stabilitas ekstrak pekat antosianin dibuat dalam 5 tingkat keasaman (pH : 1, 3, 5, 7, dan 9). Larutan antosianin dengan konsentrasi terbaik dilarutkan dalam larutan buffer dengan berbagai pH. Kemudian λ maks diukur pada panjang gelombang 200 - 800 nm. Amati perubahan warna.

3. Pengaruh Temperatur

Untuk uji kestabilan berdasarkan pengaruh temperatur, ekstrak pekat antosianin diencerkan dengan larutan buffer pH = 3, kemudian dibagi dan disimpan dalam botol untuk dilakukan pengujian. Satu sampel dibiarkan pada temperatur 30°C (suhu kamar), kemudian beberapa sampel

dipanaskan pada temperatur 40 °C, 60°C, 80 °C dan 100°C di water bath selama 30 menit. Lalu dilakukan pengukuran λ maks pada panjang gelombang 200 - 800 nm. Dan pengukuran absorban pada λ 536 nm untuk menentukan degradasi warna. Amati perubahan warna.

Degradasi warna ditentukan dengan rumus :

$$= \frac{\text{Absorban sebelum percobaan} - \text{setelah percobaan}}{\text{Absorban sebelum percobaan}} \times 100\%$$

4. Pengaruh kondisi penyimpanan

Ekstrak antosianin disimpan pada temperatur kamar ($\pm 30^\circ\text{C}$) dan di kulkas ($\pm 4^\circ\text{C}$) selama 7 hari, masing-masing sampel diletakkan dalam botol gelap . Setelah 7 hari dilakukan pengenceran dengan cara melarutkan 0,9 g ekstrak antosianin ke dalam labu ukur 100 mL dengan buffer pH 3, lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang 536 nm untuk menentukan degradasi warna.

3.5.4 Aplikasi pada Minuman

Ekstrak pigmen dicobakan pada minuman bersoda yang tidak berwarna dan susu fermentasi. Dengan cara menambahkan 0,9 g ekstrak pekat pada 100 mL minuman bersoda yang tidak berwarna (aqueous pH asam) dan susu fermentasi. Lalu dilihat perubahan warnanya.

BAB IV

HASIL DAN DISKUSI

4.1 Ekstraksi zat warna sampel

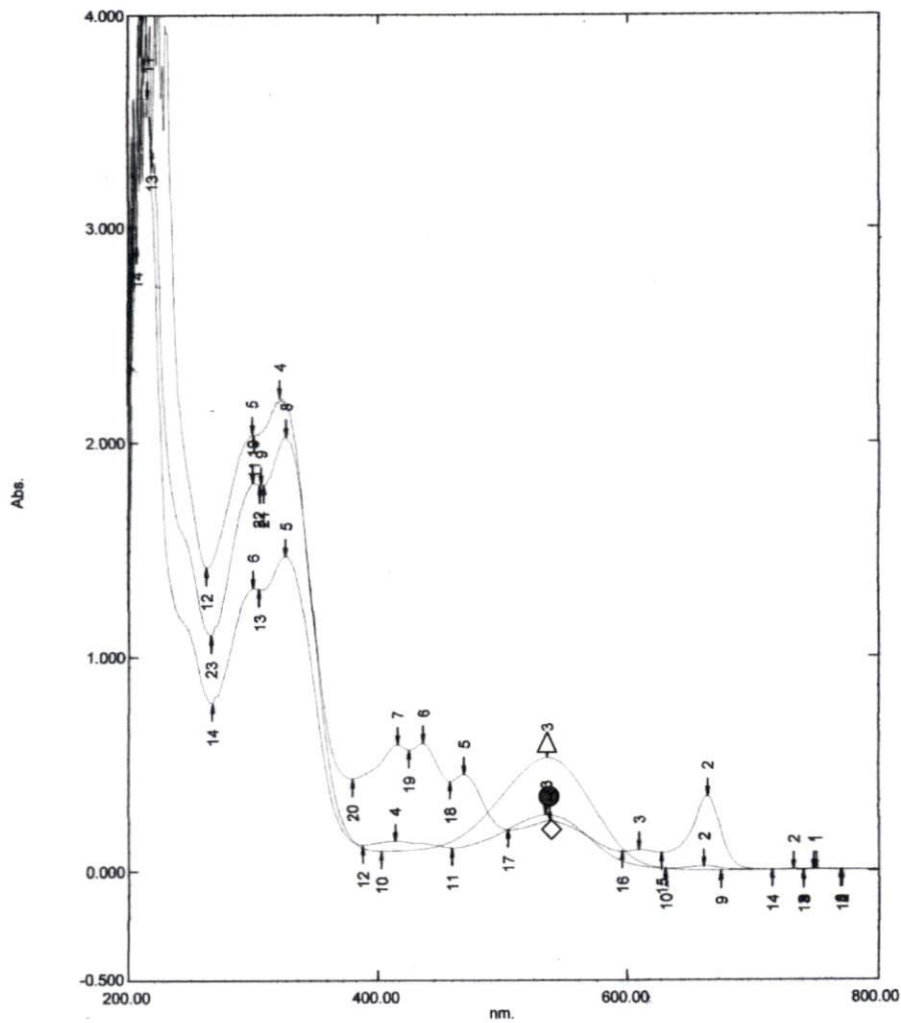
Ekstraksi pigmen dapat dilakukan dengan cara mengekstrak sampel dengan menggunakan pelarut yang sesuai kepolarannya dengan zat yang akan diekstrak. Ekstraksi senyawa golongan flavonoid termasuk antosianin dianjurkan dilakukan pada suasana asam karena asam berfungsi mendenaturasi membran sel tanaman, kemudian melarutkan pigmen antosianin sehingga dapat keluar dari sel. Senyawa golongan flavonoid seperti antosianin termasuk senyawa polar dan dapat diekstraksi dengan pelarut yang bersifat polar pula. Antosianin merupakan senyawa yang tidak stabil dalam larutan netral dan larutan basa, sehingga ekstraksi harus dilakukan pada kondisi asam. Jadi penambahan HCl dan CH₃COOH bertujuan untuk menjaga agar kondisi tetap asam.¹

Bagian yang digunakan sebagai pewarna adalah daun bayam merah segar. Karena pada bagian tersebut mengandung antosianin. Untuk mendapatkan zat warna, terlebih dahulu daun bayam merah segar dipotong-potong hingga daun tersebut halus. Lalu diekstraksi dengan pelarut etanol yang telah diasamkan menggunakan HCl 0,1 M dan Asam asetat 25% (v/v), serta tanpa menggunakan asam. Sampel diekstraksi selama 24 jam dalam keadaan gelap.

Hasil ekstraksi zat warna dari daun bayam merah menggunakan HCl 0,1 M didapatkan ekstrak berwarna merah tua, ekstraksi menggunakan CH₃COOH berwarna ungu-kemerahan, sedangkan ekstraksi tanpa menggunakan asam ekstrak berwarna merah-kecoklatan. Lalu ekstrak yang didapatkan dipekatkan dengan pompa vakum yang bertujuan untuk menguapkan pelarut. Sehingga didapatkan ekstrak pekat. Selanjutnya ekstrak pekat di analisa menggunakan spektroskopi UV-Vis dan KLT.

4.2 Pengaruh Jenis Asam

Hasil percobaan pendahuluan menunjukkan bahwa penggunaan asam klorida menghasilkan konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin tertinggi dibandingkan dengan asam asetat dan tanpa menggunakan asam.



Gambar 6. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan jenis asam. (\diamond) tanpa asam, (\bullet) asam asetat, (Δ) asam HCl 0,1M.

Hal ini dapat di lihat pada gambar 6, dimana HCl memberikan serapan tertinggi dibandingkan CH_3COOH dan tanpa asam, ini disebabkan karena pada HCl antosianin lebih banyak terekstrak dibandingkan dengan asam asetat dan tanpa asam.

Tabel 2. Konsentrasi monomer antosianin daun bayam merah dengan variasi jenis asam

Jenis Asam	Konsentrasi monomer antosianin (mg/L)
Tanpa asam	15,69
Etanol + CH_3COOH 25%	30,73
Etanol + HCl 0,1 M	43,08

Tabel 3. Total antosianin daun bayam merah dengan variasi jenis asam

Jenis Asam	Total Antosianin (mg/L)
Tanpa asam	76,98
Etanol + asam asetat	107,21
Etanol + asam klorida	132,76

Dari hasil di atas dapat dilihat bahwa konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin terbesar yaitu menggunakan jenis HCl 0,1 M dimana konsentrasi monomer antosianin yang didapatkan sebesar 43,08 mg/L sedangkan total antosianin sebesar 132,76 mg/L. Tetapi karena ekstrak antosianin ini akan di aplikasikan sebagai pewarna alami maka digunakan jenis asam asetat.

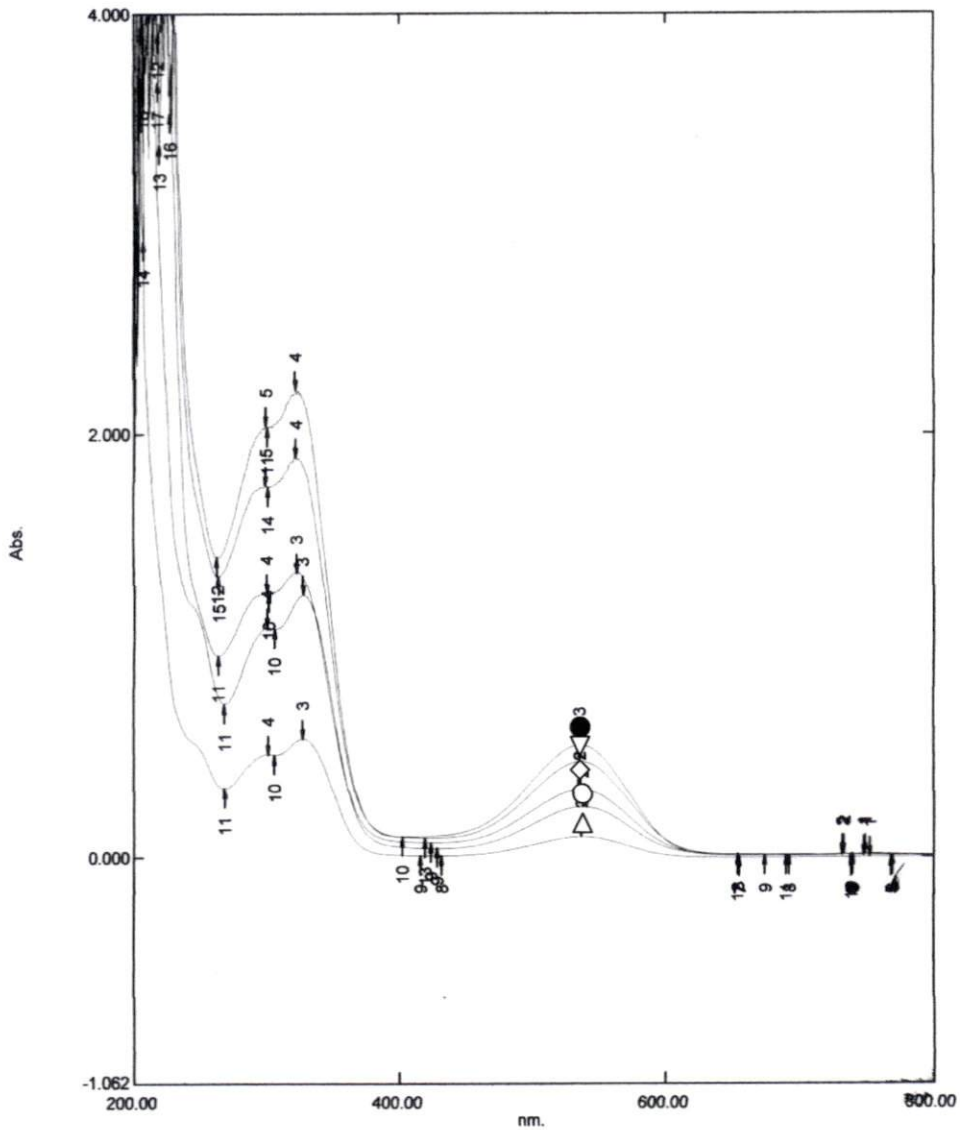
Perbedaan konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin yang dihasilkan untuk setiap jenis asam berkaitan erat dengan perbedaan tetapan disosiasi dari masing-masing jenis asam. HCl memiliki tetapan disosiasi yang lebih besar dibandingkan CH₃COOH. Tetapan disosiasi untuk HCl 10^7 dan CH₃COOH $1,75 \times 10^{-5}$. Semakin besar tetapan disosiasi semakin kuat suatu asam karena semakin besar jumlah ion hidrogen yang dilepaskan ke dalam larutan.¹

Keadaan yang semakin asam akan menyebabkan semakin banyaknya pigmen antosianin berada dalam bentuk kation flavilium yang berwarna hal ini disebabkan karena terjadinya denaturasi membran sel tanaman yang kemudian melarutkan pigmen antosianin dan dapat keluar dari sel sehingga pengukuran absorbansi akan meningkat.

4.3 Uji Kestabilan Pigmen Antosianin

4.3.1 Pengaruh Konsentrasi

Hasil pengamatan dari data konsentrasi menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi maka absorban yang dihasilkan juga akan semakin tinggi. Disini berlaku hukum lamber-beer dimana absorban berbanding lurus dengan konsentrasi. Absorban tertinggi yaitu pada konsentrasi 0,9% (b/v) sebesar 0,529, yang dapat dilihat pada gambar dibawah ini :

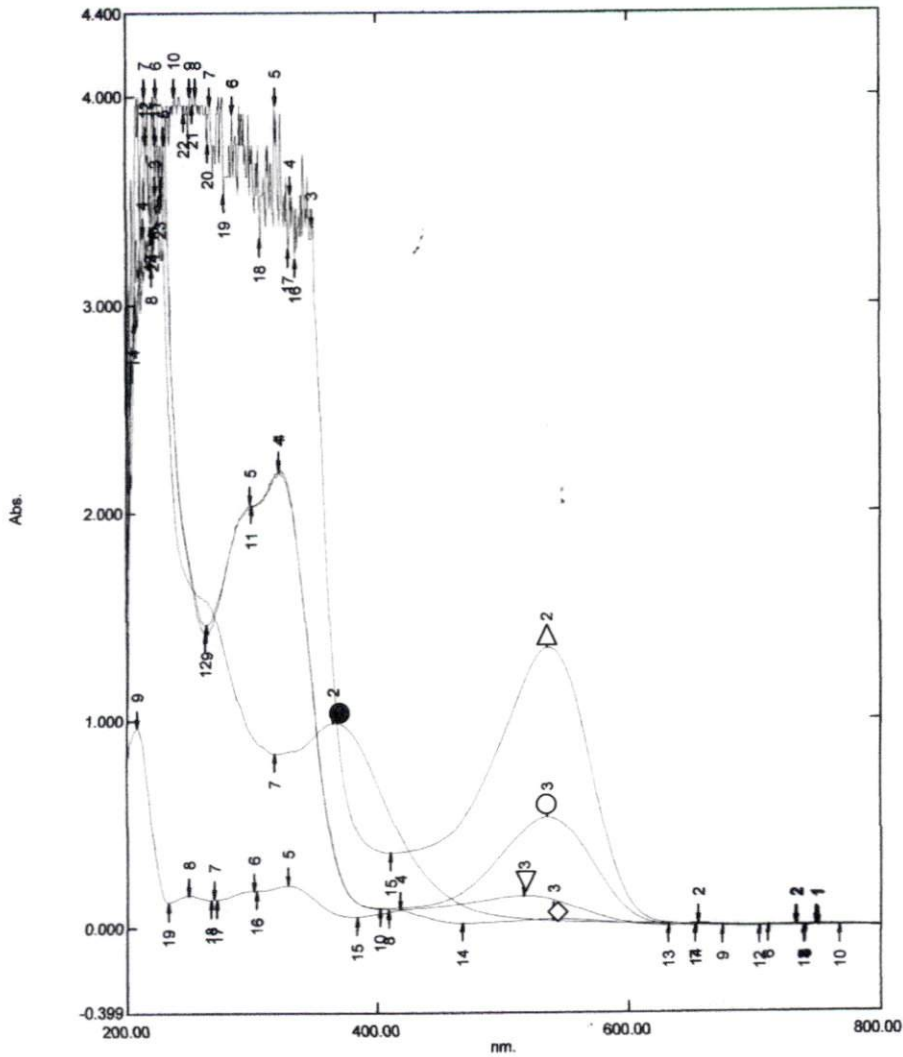


Gambar 7. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan konsentrasi. (Δ) 0,1%, (\circ) 0,3%, (\diamond) 0,5%, (∇) 0,7%, (\bullet) 0,9%.

Berdasarkan literatur bahwa antosianin memiliki nilai λ_{maks} yaitu 270-290 nm untuk daerah UV dan untuk di daerah tampak yaitu 465-560 nm. Dari spektrum di atas didapatkan nilai λ maksimum yaitu pada daerah UV 290 nm dan pada daerah Vis yaitu 536 nm yang merupakan senyawa antosianin berjenis sianidin dimana untuk antosianin berjenis sianidin memiliki puncak serapan pada λ 290 nm untuk UV dan λ 536 nm untuk daerah tampak.^{5,7,14}

4.3.2 Pengaruh pH

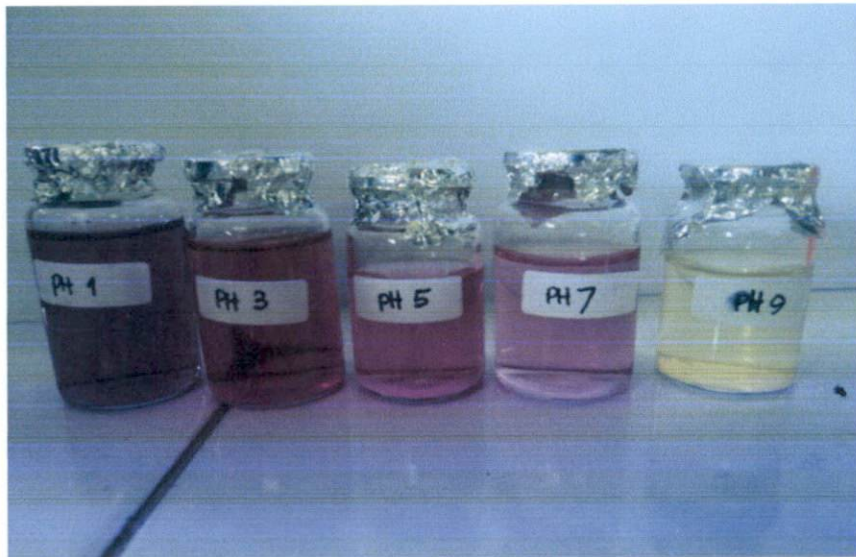
Hasil pengamatan pada pH yang berbeda memperlihatkan adanya kenaikan absorbansi dengan menurunnya pH (semakin asam) seperti yang ditunjukkan pada spektrum di bawah.



Gambar 8. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan pH. (Δ) pH 1, (\circ) pH 3, (\diamond) pH 5, (∇) pH 7, (\bullet) pH 9

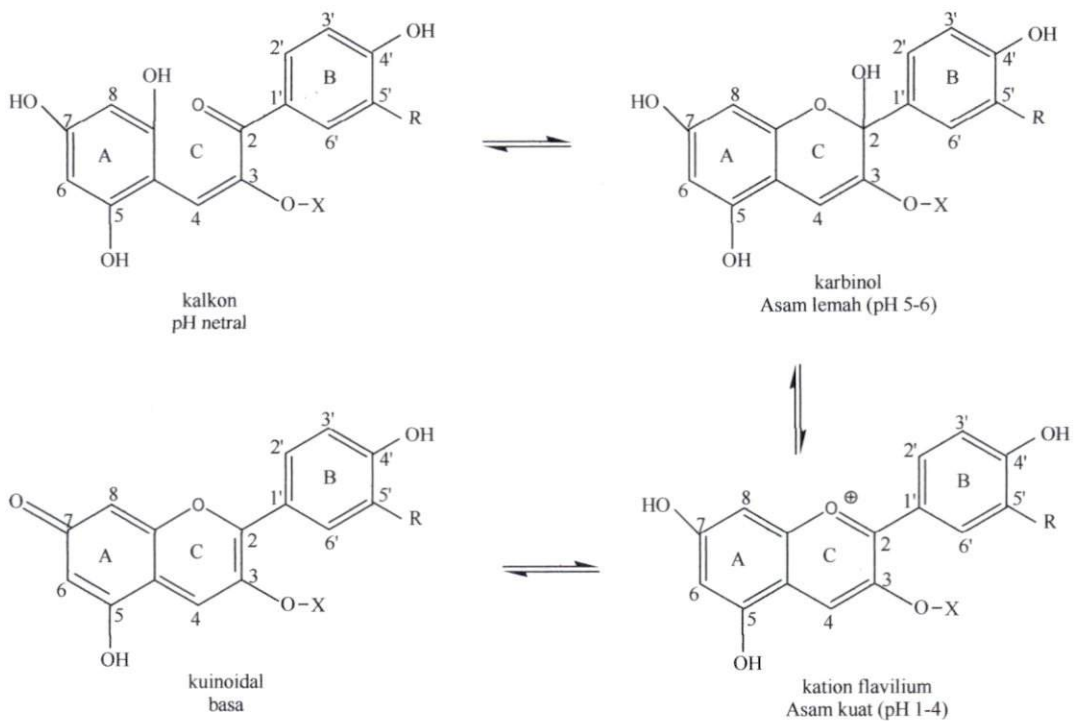
Kestabilan dari pigmen antosianin sangat dipengaruhi oleh pH. Antosianin lebih stabil pada larutan yang bersifat asam dibandingkan larutan yang bersifat netral maupun basa. Antosianin stabil pada pH 1 - 3 dimana semakin rendah nilai pH maka warna yang dihasilkan semakin pekat, karena pada keadaan ini antosianin berada dalam bentuk kation flavilium. Pada pH 5 warna dari antosianin semakin berkurang karena antosianin berubah menjadi bentuk karbinol. Pada pH 7

antosianin berwarna merah muda berbentuk kalkon yang tidak stabil. Serta pada pH 9 antosianin berwarna kuning yang berbentuk kuinoidal yang tidak stabil.^{5,16} Dimana perubahan warna dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



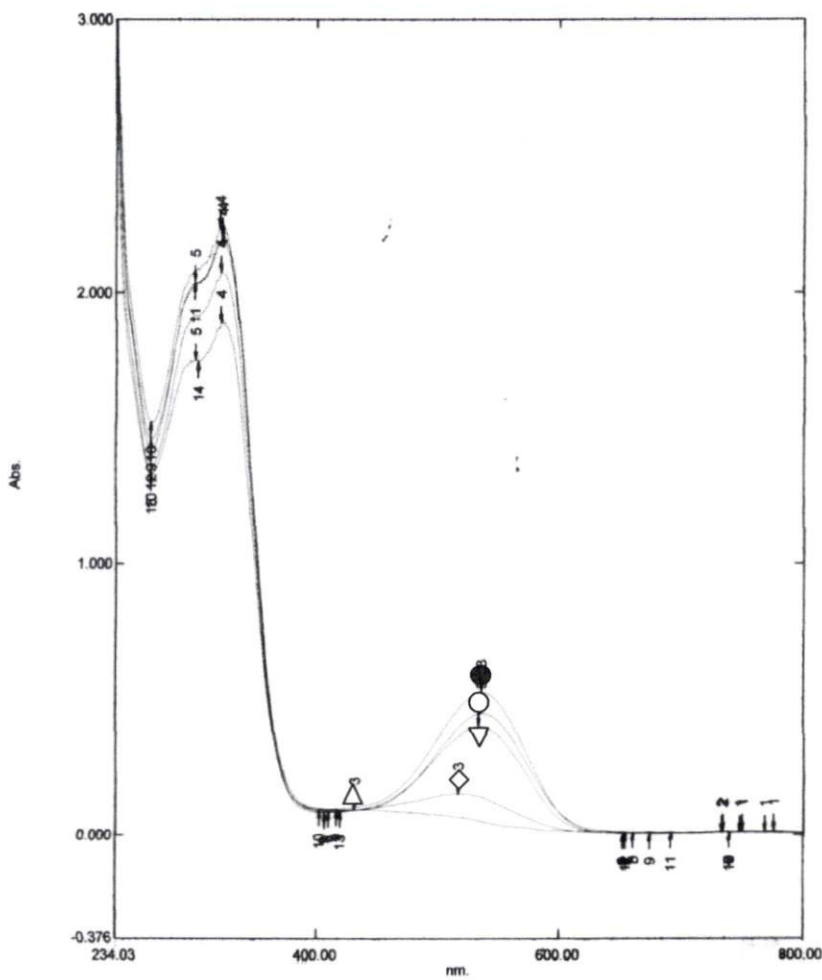
Gambar 9. Perubahan warna karena pengaruh pH.

Perubahan struktur akibat pengaruh pH dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



4.3.3 Pengaruh Temperatur

Pada pengamatan terhadap stabilitas warna antosianin dari daun bayam merah, adanya pengaruh temperatur menyebabkan terjadinya degradasi warna antosianin yang ditunjukkan terjadinya penurunan absorban, dimana perubahan absorban dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Spektrum UV-Vis antosianin dari daun bayam merah, dengan perbedaan temperatur. (●) awal, (○) 40°C, (▽) 60°C, (◇) 80°C, (△) 100°C.

Pada pada gambar 11, pemucatan warna disebabkan karena terjadinya perubahan struktur antosianin sehingga bentuk aglikon berubah menjadi karbinol (tidak berwarna).



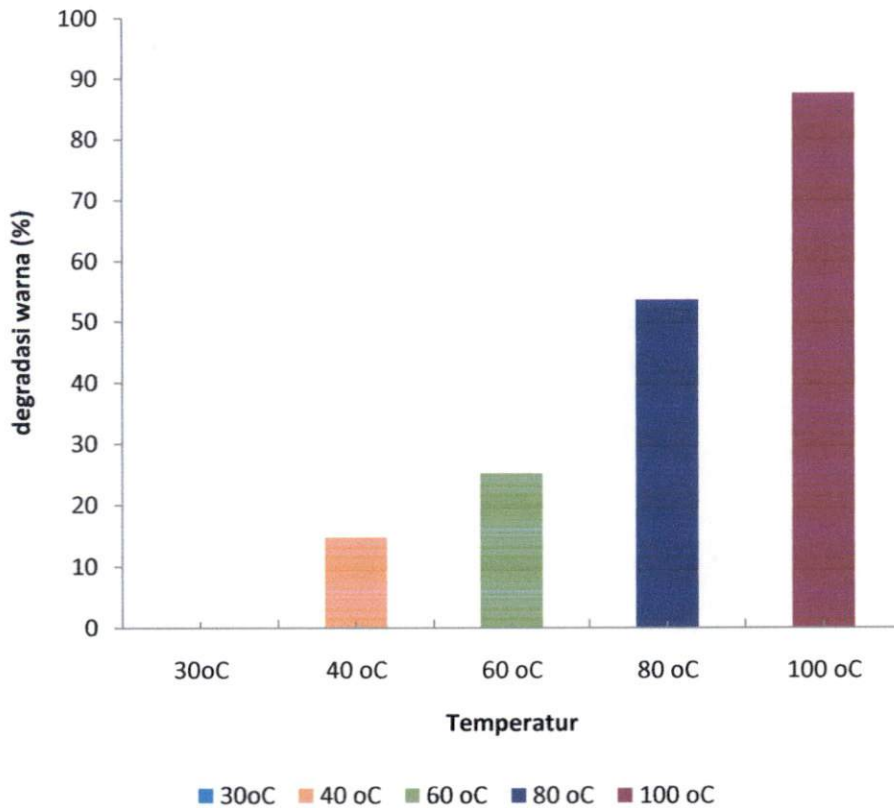
Gambar 11. Perubahan warna akibat pengaruh temperatur

Warna antosianin pada daun bayam merah relatif stabil pada pemanasan hingga temperatur 60°C. Karena pada suhu ini warna antosianin hanya berkurang sekitar 25,14% selama pemanasan 30 menit. Sedangkan pemanasan pada suhu 80°C – 100°C, warna antosianin berkurang sekitar 58,5% dan 87,52%. Sehingga pigmen antosianin relatif stabil pada suhu rendah, degradasi warna yang terjadi dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Degradasi warna akibat pemanasan pada berbagai suhu

Temperatur	Absorban (A)	Degradasi warna (%)
30°C	0,529	0
40°C	0,451	14,74
60°C	0,396	25,14
80°C	0,246	53,49
100°C	0,066	87,52

Pada tabel 4, hilangnya pigmen antosianin (degradasi warna) secara bertahap meningkat dengan meningkatnya temperatur yang dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Grafik hubungan pengaruh temperatur dengan degradasi warna

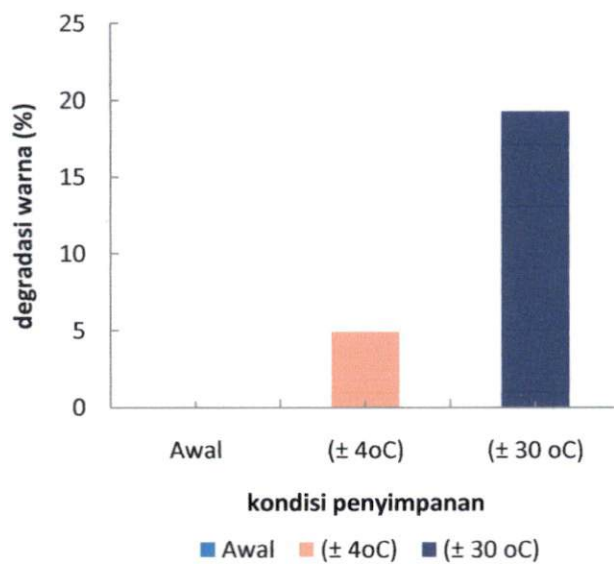
4.3.4 Pengaruh Kondisi Penyimpanan

Berdasarkan pengamatan terhadap stabilitas antosianin bahwa kondisi penyimpanan juga dapat menyebabkan terjadinya degradasi warna. Kondisi penyimpanan pada temperatur kulkas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) lebih baik dibandingkan dengan penyimpanan pada temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$).

Tabel 5. Degradasi warna terhadap pengaruh kondisi penyimpanan

Kondisi penyimpanan	Absorban (A)	Degradasi warna (%)
Awal	0,529	0
Temperatur kulkas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)	0,503	4,91 %
Temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$)	0,427	19,28 %

Dari data di atas dapat dilihat bahwa penyimpanan pada temperatur $\pm 4^{\circ}\text{C}$, degradasi warna yang terjadi hanya sebesar 4,91 % sehingga masih mampu mempertahankan warna antosianin sekitar 95,09 % selama penyimpanan 7 hari. Sedangkan penyimpanan pada temperatur $\pm 30^{\circ}\text{C}$ mempercepat terjadinya degradasi antosianin yang mengubah warna antosianin menjadi merah-kecoklatan. Hal ini disebabkan karena adanya faktor cahaya yang dapat mempercepat terjadinya proses degradasi antosianin tersebut. Penyimpanan pada temperatur $\pm 30^{\circ}\text{C}$ degradasi yang terjadi sebesar 19,28 %. Sehingga antosianin lebih baik disimpan di dalam kulkas dibandingkan pada temperatur ruang.



Gambar 13. Grafik pengaruh kondisi penyimpanan dengan degradasi warna.

4.4 Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Tabel 6. Hasil Uji KLT dengan berbagai komposisi eluen.

Eluen	Noda yang muncul		Rf dengan I ₂
	Dengan NH ₃	Dengan I ₂	
n-Heksan 100 %	Tidak ada noda	Tidak ada noda	-
n-Heksan : etil asetat (8 : 2)	Tidak ada noda	Tidak ada noda	-
n-Heksan : etil asetat (6 : 4)	1 noda tailing	1 noda tailing	0,04
n-Heksan : etil asetat (4 : 6)	1 noda tailing	1 noda tailing	0,06
n-Heksan : etil asetat (2 : 8)	2 noda tailing	2 noda tailing	0,04; 0,06
Etil asetat 100 %	2 noda tailing	2 noda tailing	0,11; 0,06

Etil asetat : etanol (8 : 2)	1 noda tailing	2 noda tailing	0,13; 0,06
Etil asetat : etanol (6 : 4)	1 noda tailing	1 noda naik 2 noda tailing	0,17; 0,06 ; 0,06
Etil asetat : etanol (4 : 6)	1 noda naik, 1 tailing	1 noda naik 2 noda tailing	0,42 0,33; 0,06
Etil asetat : etanol (2 : 8)	2 noda naik	2 noda naik, 1 noda tailing	0,49; 0,38 0,06

Dari KLT awal, diketahui bahwa pada eluen n-heksan 100% dan n-heksan (8 : 2) tidak ada noda yang terelusi. Noda mulai naik pada eluen n-heksan : etil asetat (6 : 4). Noda yang muncul dilihat dengan menggunakan 2 reagen penampak noda yaitu NH_3 dan I_2 , penggunaan kedua reagen ini memberikan hasil yang berbeda, pada reagen NH_3 hanya senyawa yang memberikan fluoresensi yang dapat dilihat di bawah lampu UV sedangkan senyawa yang tidak memberikan noda yang berfluoresensi dapat dilihat menggunakan I_2 , karena senyawa yang tidak memiliki noda yang berfluoresensi diduga bukan golongan antosianin, karena tidak memiliki ikatan rangkap yang berkonjugasi sehingga tidak dapat dilihat di bawah lampu UV.

KLT ini bertujuan untuk menentukan jenis pelarut yang baik sehingga dapat memisahkan senyawa yang terkandung dalam sampel. Dan pelarut yang sesuai yaitu etil asetat : etanol (8 : 2). Berdasarkan literatur Rf untuk golongan antosianin yaitu 0,36 – 0,38.

4.4.1 Hasil uji KLT terhadap pengaruh pH

Tabel 7. Hasil uji KLT terhadap pengaruh pH

pH	Noda yang muncul		Rf dengan I_2
	Dengan NH_3	Dengan I_2	
1	2 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,49 ; 0,38 ; 0,06
3	2 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,49 ; 0,38 ; 0,06
5	2 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,49 ; 0,31 ; 0,06
7	1 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,49 ; 0,27 ; 0,06
9	1 noda naik	1 noda naik, 1 tailing	0,47 ; 0,10

Dari data di atas dapat di lihat bahwa semakin tinggi nilai pH maka semakin rendah nilai Rf yang didapatkan. Pada pH 7 noda antosianin jika dilihat di bawah lampu UV hanya 1 noda yang terbentuk tetapi jika menggunakan penampak noda I₂ terbentuk 2 noda, hal ini disebabkan karena pada pH 7 terjadi perubahan struktur dari bentuk kation flavilium menjadi kalkon yang tidak stabil dan juga warna mulai memudar sehingga ikatan rangkap berkonjugasi hilang dan menyebabkan tidak terlihatnya noda di bawah lampu UV . Sedangkan pada pH 9 tidak terdapat noda yang diidentifikasi sebagai noda antosianin hal ini disebabkan karena pada pH basa antosianin berubah struktur menjadi kuinoidal yang tidak stabil. Sehingga menyebabkan tidak munculnya noda antosianin pada uji KLT.

4.4.2 Hasil uji KLT terhadap pengaruh temperatur

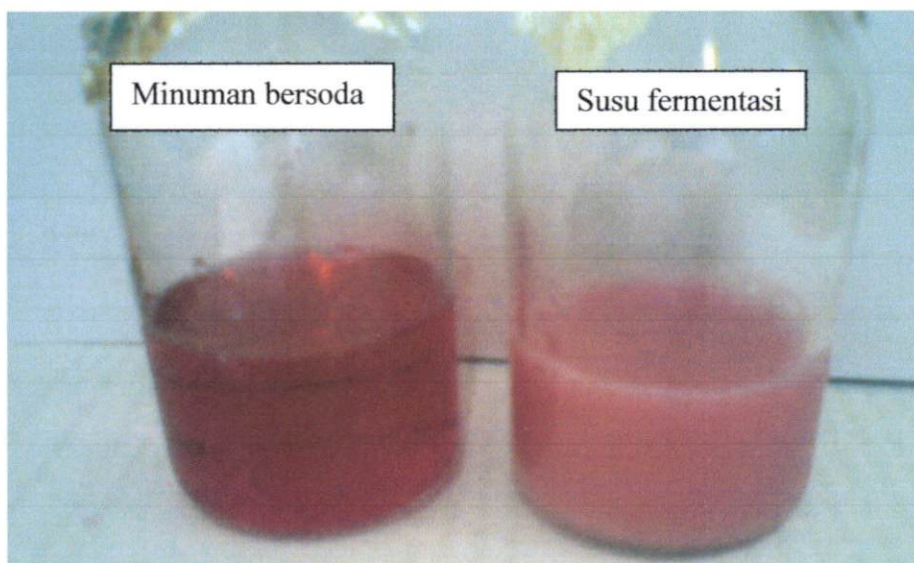
Tabel 8. Hasil Uji KLT terhadap pengaruh temperatur

Temperatur (°C)	Noda yang muncul		Rf dengan I ₂
	Dengan NH ₃	Dengan I ₂	
30°C	2 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,49 ; 0,38 ; 0,06
40°C	2 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,49 ; 0,38 ; 0,06
60°C	2 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,49 ; 0,36 ; 0,06
80°C	2 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,47 ; 0,24 ; 0,06
100°C	1 noda naik	2 noda naik, 1 tailing	0,47 ; 0,20 ; 0,06

Dari tabel 8 dapat dilihat bahwa semakin tinggi temperatur pemanasan maka semakin rendah nilai Rf yang didapatkan pada hasil uji KLT. Pada suhu 80 – 100°C terjadi perubahan Rf yang begitu besar. Pada suhu 100°C dengan menggunakan penampak noda NH₃ hanya 1 noda yang terbentuk sedangkan dengan penampak noda I₂ terbentuk 2 noda hal ini disebabkan karena pada suhu 100°C warna larutan hampir tidak berwarna hal ini menyebabkan hilangnya ikatan rangkap berkonjugasi sehingga noda tidak terlihat di bawah lampu UV.

4.5 Aplikasi sebagai Pewarna Minuman

Ekstrak pigmen dengan hasil yang terbaik ditambahkan ke dalam minuman bersoda yang tidak berwarna dan susu fermentasi. Pada minuman bersoda ekstrak pigmen larut dengan sempurna. Sementara ekstrak pigmen antosianin pada susu fermentasi menyebabkan susu menggumpal. Hal ini mungkin disebabkan karena ekstrak pigmen memiliki pH asam sehingga dapat menggumpalkan protein pada susu. Oleh karena itu ekstrak pigmen ini cocok diaplikasikan pada minuman yang memiliki pH asam seperti minuman soda yang tidak berwarna.



Gambar 14. Aplikasi sebagai pewarna

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Berdasarkan hasil penelitian bahwa daun bayam merah dapat digunakan sebagai sumber pewarna alami untuk minuman.
2. Berdasarkan pengaruh jenis asam bahwa yang menghasilkan konsentrasi monomer antosianin dan total antosianin terbesar yaitu HCl 0,1 M sebesar 43,08 mg/L dan 132,76 mg/L.
3. Berdasarkan pengaruh konsentrasi, semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi absorban. Absorban tertinggi yaitu pada konsentrasi 0,9% (b/v), dengan nilai λ maksimum 536 nm pada daerah tampak dan 290 nm pada daerah UV, dimana nilai λ maksimum ini merupakan antosianin dengan jenis sianidin.
4. Ekstrak pigmen daun bayam merah stabil pada pH 1-3 yang berada dalam bentuk kation flavilium.
5. Berdasarkan pengaruh temperatur, tingkat degradasi warna terbesar yaitu pada suhu 100°C sebesar 87,52 %.
6. Berdasarkan kondisi penyimpanan bahwa antosianin lebih stabil disimpan pada temperatur kulkas karena pada kondisi ini degradasi warna hanya sebesar 4,91 %.
7. Berdasarkan hasil uji KLT bahwa eluen yang sesuai untuk memisahkan noda dengan baik yaitu etil asetat : etanol (8 : 2) dengan nilai Rf sebesar 0,38.
8. Setelah diaplikasikan sebagai pewarna minuman, maka ekstrak antosianin cocok digunakan untuk minuman yang memiliki pH asam.

5.2 Saran

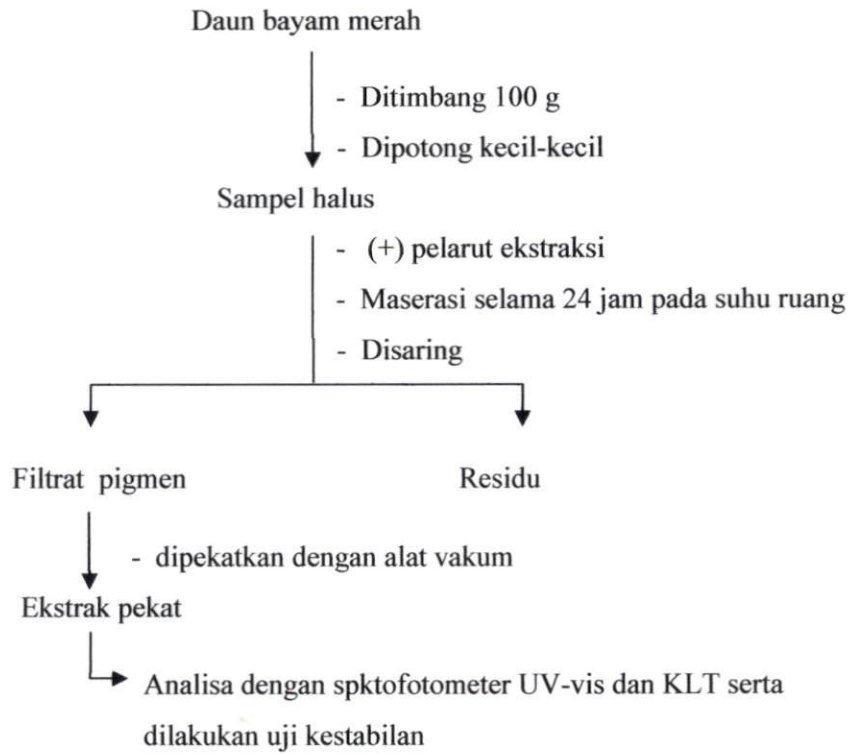
Berdasarkan hasil penelitian ini, maka diharapkan untuk menentukan jenis gula yang terdapat pada bayam merah sehingga dapat ditentukan struktur antosianin. Melakukan identifikasi lebih lanjut menggunakan HPLC. Melakukan pengujian organoleptik terhadap ekstrak antosianin yang didapatkan sebagai pewarna alami. Serta melakukan variasi waktu terhadap kondisi penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Natalia, Dita, dkk. *Ekstraksi Pewarna Alami dari Buah Arben (Rubus ideaus Linn.) dan Aplikasinya pada Sistem Pangan*. UNPAD.
2. J.B, Harborne. J.B., 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB Bandung.
3. Z, Nazulis, dkk. 2002. *Kimia Bahan Alam*. Reviewer : Nurhasnah Aliunir. Penerbit UNP. Padang.
4. Shi, Z. Lin, M. And Francis. F.J 1992. *Stability of Anthosianins from Tradescania pallida*. *Jurnal of Food Science* 57 (3): 758-760.
5. Qin, Cuanguang. 2010. *Analysis and Characterisation of Anthocyanins in Mulberry Fruit*. Vol 28. No.2, 117-126.
6. Brouillard, R. 1982. *Chemical Structure of Anthocyanins. Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P. (ed). Academic Press. New York.
7. Anis, Elfi. *Identifikasi dan Uji Kualitas Pigmen Kulit Buah Naga Merah (Hylocareus costaricensis) pada Beberapa Umur Simpan dengan Perbedaan Jenis Pelarut*.
8. Samsudin, Asep, M, dkk. 2008. *Ekstraksi, Filtrasi Membran dan Uji Stabilitas Zat Warna dari Kulit Manggis (Garcinia mangostana)*. UNDIP. Semarang.
9. Gould. Kevin 2008. *Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications*. Springer.
10. J, Gross. 1987. *Pigment in Fruits*. Academic Press. London.
11. Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke-6. Penerjemah : Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
12. Hendayana, Sumar. 1994. *Kimia Analitik Instrumen*. Edisi I. IKIP Semarang Press. Semarang.
13. Cresswell, C, J. 1982. *Analisis Spektrum Senyawa Organik*, edisi ke-2, ITB. Bandung.
14. Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerjemah : Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.

15. Wrolstada, Ronald, Robert W. Dursta and Jungmin Leeb. 2005. *Tracking color and pigment changes in anthocyanin products*. Department of Food Science and Technology, Wiegand Hall, Oregon State University.
16. Giusti, M. M. dan R. E. Worlstaad.. 2001. *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*. Oregon State University.

Lampiran 1. Skema Kerja Penentuan Antosianin dari Daun Bayam Merah



Lampiran 2. Pembuatan HCl 0,1M dari HCl 37 %

$$\begin{aligned}M &= \frac{\% \times \rho \times 1000}{M_r} \\&= \frac{37 \% \times 1,18 \text{ g/mL} \times 1000}{36,5 \text{ g/mol}} \\&= 12 \text{ M}\end{aligned}$$

Pengenceran HCl 12 M menjadi 0,1 M

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\V_1 \cdot 12 \text{ M} &= 100 \text{ mL} \cdot 0,1 \text{ M} \\V_1 &= \frac{100 \text{ mL} \times 0,1 \text{ M}}{12 \text{ M}} \\V_1 &= 0,83 \text{ mL}\end{aligned}$$

Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan Buffer

1. Pembuatan buffer pH 3

$$\begin{aligned}[\text{H}^+] &= K_a \times \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COONa}]} \\&= 1,85 \times 10^{-5} \times \frac{[10 \text{ mmol}/500\text{mL}]}{[0,2 \text{ mmol}/500\text{mL}]} \\&= 1,85 \times 10^{-5} \times 50 \\&= 9,25 \times 10^{-4} \\ \text{pH} &= -\log [\text{H}^+] \\&= 4 - \log 9,25 \\&= 4 - 0,97 \\&= 3,03\end{aligned}$$

2. Pembuatan Larutan Buffer pH 9

$$\begin{aligned}[\text{OH}^-] &= K_b \times \frac{[\text{NH}_4\text{OH}]}{[\text{NH}_4\text{Cl}]} \\&= 1,85 \times 10^{-5} \times \frac{[5 \text{ mmol}/500\text{mL}]}{[9 \text{ mmol}/500\text{mL}]} \\&= 1,85 \times 10^{-5} \times 0,56 \\&= 1,008 \times 10^{-5} \\ \text{pOH} &= -\log [\text{OH}^-] \\&= 5 - \log 1,008 \\&= 5 - 3,46 \times 10^{-3} \\&= 4,99 \\ \text{pH} &= 14 - \text{pOH} \\&= 14 - 4,99 \\&= 9,01\end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi Monomer Antosianin

a. Tanpa Asam

$$\begin{aligned}A &= (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 5} \\&= (0,569 - 0,108)_{\text{pH } 1,0} - (0,374 - 0,007)_{\text{pH } 5} \\&= (0,461 - 0,367) \\&= 0,094\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi monomer antosianin (mg/L)} &= \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times l} \\&= \frac{0,094 \times 449,2 \text{ g/mol} \times 10 \times 10^3}{26900 \text{ L/mol.cm} \times 1 \text{ cm}} \\&= 15,69 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

b. Asam Asetat 25% (v/v)

$$\begin{aligned}A &= (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 5} \\&= (0,795 - 0,153)_{\text{pH } 1,0} - (0,447 - 0,0191)_{\text{pH } 5} \\&= (0,642 - 0,458) \\&= 0,184\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi monomer antosianin (mg/L)} &= \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times l} \\&= \frac{0,184 \times 449,2 \text{ g/mol} \times 10 \times 10^3}{26900 \text{ L/mol.cm} \times 1 \text{ cm}} \\&= 30,73 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

c. Asam Klorida 0,1M

$$\begin{aligned}A &= (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 5} \\&= (0,974 - 0,179)_{\text{pH } 1,0} - (0,634 - 0,097)_{\text{pH } 5} \\&= (0,795 - 0,537) \\&= 0,258\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi monomer antosianin (mg/L)} &= \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times l} \\&= \frac{0,258 \times 449,2 \text{ g/mol} \times 10 \times 10^3}{26900 \text{ L/mol.cm} \times 1 \text{ cm}} \\&= 43,08 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

Lampiran 5. Perhitungan Total Antosianin

a. Tanpa asam

$$\begin{aligned}A' &= (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} \\ &= (0,569 - 0,108)_{\text{pH } 1,0} \\ &= 0,461\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Total antosianin (mg/L)} &= \frac{A' \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times l} \\ &= \frac{0,461 \times 449,2 \text{ g/mol} \times 10 \times 10^3}{26900 \text{ L/mol.cm} \times 1 \text{ cm}} \\ &= 76,98 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

b. Asam asetat 25 % (v/v)

$$\begin{aligned}A' &= (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} \\ &= (0,795 - 0,153)_{\text{pH } 1,0} \\ &= 0,642\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Total antosianin (mg/L)} &= \frac{A' \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times l} \\ &= \frac{0,642 \times 449,2 \text{ g/mol} \times 10 \times 10^3}{26900 \text{ L/mol.cm} \times 1 \text{ cm}} \\ &= 107,21 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

c. Asam klorida 0,1 M

$$\begin{aligned}A' &= (A_{536} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} \\ &= (0,974 - 0,179)_{\text{pH } 1,0} \\ &= 0,795\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Total antosianin (mg/L)} &= \frac{A' \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times l} \\ &= \frac{0,795 \times 449,2 \text{ g/mol} \times 10 \times 10^3}{26900 \text{ L/mol.cm} \times 1 \text{ cm}} \\ &= 132,76 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

Lampiran 6. Perhitungan Degradasi Warna Akibat Pengaruh Temperatur (%)

$$\text{Degradasi warna} = \frac{\text{Absorban sebelum perlakuan} - \text{setelah perlakuan} \times 100\%}{\text{Absorban sebelum perlakuan}}$$

a. Temperatur 40°C

$$\text{Absorban awal} = 0,529$$

$$\text{Absorban akhir} = 0,451$$

$$\begin{aligned} \text{Degradasi warna (\%)} &= \frac{0,529 - 0,451}{0,529} \times 100\% \\ &= 14,74\% \end{aligned}$$

b. Temperatur 60°C

$$\text{Absorban awal} = 0,529$$

$$\text{Absorban akhir} = 0,396$$

$$\begin{aligned} \text{Degradasi warna (\%)} &= \frac{0,529 - 0,396}{0,529} \times 100\% \\ &= 25,14\% \end{aligned}$$

c. Temperatur 80°C

$$\text{Absorban awal} = 0,529$$

$$\text{Absorban akhir} = 0,246$$

$$\begin{aligned} \text{Degradasi warna (\%)} &= \frac{0,529 - 0,246}{0,529} \times 100\% \\ &= 53,49\% \end{aligned}$$

d. Temperatur 100°C

$$\text{Absorban awal} = 0,529$$

$$\text{Absorban akhir} = 0,066$$

$$\begin{aligned} \text{Degradasi warna (\%)} &= \frac{0,529 - 0,066}{0,529} \times 100\% \\ &= 87,52\% \end{aligned}$$

Lampiran 7. Perhitungan Degradasi Warna Akibat Pengaruh Kondisi Penyimpanan.

$$\text{Degradasi warna} = \frac{\text{Absorban sebelum perlakuan} - \text{setelah perlakuan} \times 100\%}{\text{Absorban sebelum perlakuan}}$$

- a. Temperatur kulkas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)

$$\text{Absorban awal} = 0,529$$

$$\text{Absorban akhir} = 0,503$$

$$\begin{aligned} \text{Degradasi warna (\%)} &= \frac{0,529 - 0,503}{0,529} \times 100\% \\ &= 4,9\% \end{aligned}$$

- b. Temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$)

$$\text{Absorban awal} = 0,529$$

$$\text{Absorban akhir} = 0,427$$

$$\begin{aligned} \text{Degradasi warna (\%)} &= \frac{0,529 - 0,427}{0,529} \times 100\% \\ &= 19,28\% \end{aligned}$$