

**KAPASITAS ANTIOKSIDAN DAN STABILITAS  
EKSTRAK PIGMEN ANTOSIANIN KULIT KACANG GUDE HITAM  
(*Cajanus cajan* [Linn.] Millsp.) DENGAN VARIASI PELARUT**

**Skripsi**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
guna memperoleh derajat Sarjana Teknologi Pertanian  
di Fakultas Pertanian  
Universitas Sebelas Maret**



**Oleh :**

**MUHAMMAD UMAR SYARIFUDDIN AL-LAWI**

**H0606055**

**Pembimbing Utama : Setyaningrum Ariviani, STP., M.Sc.**

**Pembimbing Pendamping : Ir. Kawiji, MP.**

**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET**

**SURAKARTA**

*commit to user*  
**2011**

**KAPASITAS ANTIOKSIDAN DAN STABILITAS  
EKSTRAK PIGMEN ANTOSIANIN KULIT KACANG GUDE HITAM  
(*Cajanus cajan* [Linn.] Millsp.) DENGAN VARIASI PELARUT**

yang dipersiapkan dan disusun oleh  
**MUHAMMAD UMAR SYARIFUDDIN AL-LAWI**  
**H0606055**

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
pada tanggal : 10 Maret 2011  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Susunan Tim Penguji**

**Ketua,**

**Anggota I,**

**Anggota II,**

**Setyaningrum Ariviani, STP., M.Sc.**  
NIP. 197604292002122002

**Ir. Kawiji, MP.**  
NIP. 196112141986011001

**Dian Rachmawanti A., STP, MP.**  
NIP. 197908032006042001

**Surakarta, Maret 2011**

**Mengetahui**

**Universitas Sebelas Maret**

**Fakultas Pertanian**

**Dekan,**

**Prof. Dr. Ir. H. Suntoro, MS.**  
NIP. 19551217 198203 1 003

*commit to user*

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “**KAPASITAS ANTIOKSIDAN DAN STABILITAS EKSTRAK PIGMEN ANTOSIANIN KULIT KACANG GUDE HITAM (*Cajanus cajan* [Linn.] Millsp.) DENGAN VARIASI PELARUT**” dengan baik. Penelitian dan penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian dari Jurusan/Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini penulis tidak lepas dari bantuan, arahan, dan masukan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. H. Suntoro, MS., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta.
2. Bapak Ir. Kawiji, MP., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta sekaligus sebagai pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran, serta dukungan selama penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Setyaningrum Ariviani, STP, M.Sc., selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran, serta dukungan selama penulisan dan penyusunan skripsi ini.
4. Ibu Dian Rachmawanti Affandi, STP, MP., selaku penguji skripsi yang telah memberikan arahan, masukan dan saran demi kesempurnaan skripsi penulis.
5. Bapak dan Ibu Dosen serta seluruh staf Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta atas ilmu yang telah diberikan dan bantuannya selama masa perkuliahan penulis.
6. Laboran dan staf administrasi Jurusan Teknologi Hasil Pertanian atas bantuannya selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

*commit to user*

7. Bapak, Ibu, Mbak Elva, Mas Adesta serta segenap keluarga yang senantiasa memberikan doa, nasehat, semangat, bantuan, serta dukungan kepada penulis.
8. Teman-teman seperjuangan “The Bunda’s Crew” ( Yogie, Ratih, Dian, dan Christiva ), Enny, Intan, Tri Utami “Mbak Iik”, Nantri, Elis, Dela, Rizki Chu’, Lela, Ratna, Ningrum, Tika, Mita, Sigit, Jere, serta teman-teman angkatan 2006 THP yang telah banyak membantu, memberi doa dan dukungan serta semangat selama menempuh kuliah, penelitian, dan penyusunan skripsi.
9. *Special thanks to* sobatku Rully, Soleh, Prima, Erna, Ayu, Totok “Agil”, Dhimas ’07, dan Nora ’07 yang tak pernah lelah memberikan doa, dukungan, dan semangat selama penelitian dan penyusunan skripsi, serta kepada *Dc’07* dan *De’08* yang pernah mengisi hari-hari penuh warna dan memberikan dorongan semangat tersendiri kepada penulis.
10. “Tim YAMAHA” ( AD 5853 QS, AD 2473 AS, AD 2824 PN, BE 7649 CI ) dan “Tim TOYOTA” ( AD 8360 GA ) yang setia mengantar kemana saja demi kelancaran jalannya penelitian dan penyusunan skripsi ini.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna pada penulisan skripsi ini. Saran, kritik, dan masukan membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Akhirnya, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca.

Solo, Maret 2011

Penulis

*commit to user*

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	v
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	viii
<b>RINGKASAN</b> .....	ix
<b>SUMMARY</b> .....	x
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
<b>II. LANDASAN TEORI</b> .....	4
A. Tinjauan Pustaka .....	4
1. Kacang Gude ( <i>Cajanus cajan</i> ) .....	4
2. Antosianin.....	5
2.1. Antosianin sebagai Pewarna .....	7
2.2. Antosianin sebagai Antioksidan.....	7
3. Ekstraksi Antosianin.....	10
4. Stabilitas Antosianin.....	11
B. Kerangka Berfikir.....	13
C. Hipotesis.....	13
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	14
A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	14
B. Bahan dan Alat .....	14
1. Bahan.....	14
2. Alat.....	14
C. Tahapan Penelitian .....	16
D. Rancangan Percobaan .....	18
E. Metode Analisis .....	18
1. Analisis Total Antosianin.....	18
2. Kapasitas Antioksidan.....	20
3. Stabilitas Ekstrak.....	21

*commit to user*

<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	22
A. Pengaruh Jenis Pelarut yang Digunakan untuk Ekstraksi terhadap Kadar Total Antosianin dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Kulit Kacang Gude Hitam .....	23
A.1. Kadar Total Antosianin .....	23
A.2. Kapasitas Antioksidan.....	25
A.2.1. Kadar Total Fenol .....	26
A.2.2. Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH .....	28
B. Stabilitas Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam terhadap Perlakuan pH dan Suhu Pasteurisasi Ditinjau dari Kadar Total Antosianin dan Kualitas Warna .....	30
B.1. Kadar Total Antosianin .....	31
B.2. Kualitas Warna .....	35
C. Korelasi antara Kadar Total Antosianin dengan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Kulit Kacang Gude Hitam yang Dihasilkan.....	40
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	41
A. Kesimpulan .....	41
B. Saran.....	41
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	42
<b>LAMPIRAN</b> .....	48



## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Daftar Antosianidin dan Substitusinya .....	6
Tabel 4.1	Kadar Total Antosianin Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam dengan Variasi Jenis Pelarut .....	24
Tabel 4.2.1	Kadar Total Fenol Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam dengan Variasi Jenis Pelarut .....	26
Tabel 4.2.2	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam dengan Variasi Jenis Pelarut .....	28
Tabel 4.3.1.1	Kadar Total Antosianin Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan pH.....	32
Tabel 4.3.1.2	Kadar Total Antosianin Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan Suhu Pasteurisasi.....	33
Tabel 4.3.2.1	Pengukuran Kualitas Warna Ekstrak Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan pH.....	35
Tabel 4.3.2.2	Pengukuran Kualitas Warna Ekstrak Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan Suhu Pasteurisasi .....	38
Tabel 4.4	Nilai Korelasi Pearson antara Kadar Total Antosianin dan Kadar Total Fenol dengan Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam...	40

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Biji Kacang Kacang Gude Hitam .....	4
Gambar 2.2 Struktur Umum Antosianin.....	6
Gambar 2.3 Kerangka Berpikir Penelitian .....	13
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian.....	16



*commit to user*



**KAPASITAS ANTIOKSIDAN DAN STABILITAS  
EKSTRAK PIGMEN ANTOSIANIN KULIT KACANG GUDE HITAM  
(*Cajanus cajan* [Linn.] Millsp.) DENGAN VARIASI PELARUT**

**MUHAMMAD UMAR SYARIFUDDIN AL-LAWI  
H0606055**

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta

**RINGKASAN**

Antosianin merupakan pigmen yang menghasilkan warna merah, ungu dan biru, serta diketahui memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Dewasa ini perkembangan industri pengolahan pangan serta terbatasnya jumlah dan mutu zat pewarna alami, menyebabkan penggunaan zat warna sintetik meningkat. Namun penggunaan pewarna sintetik sebagai pewarna makanan atau minuman dapat berdampak negatif karena bersifat toksik dan karsinogenik. Di Indonesia biji kacang gude hitam digunakan sebagai bahan pembuatan tempe dan kecap mempunyai hasil samping berupa kulit biji yang belum dimanfaatkan. Kulit kacang gude yang berwarna hitam diduga mengandung pigmen antosianin.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui teknik ekstraksi pigmen antosianin kulit kacang gude hitam yang paling baik ditinjau dari kadar total antosianin (metode *pH different*), kapasitas antioksidan meliputi kadar total fenol (metode follin ciocalteau) dan aktivitas penangkapan radikal (metode DPPH), serta stabilitasnya terhadap perlakuan pH dan suhu pasteurisasi ditinjau dari kadar total antosianin (metode *pH different*) dan kualitas warna ( $L^*a^*b$ ). Ekstraksi antosianin kulit kacang gude hitam dilakukan dengan variasi jenis pelarut yaitu aquades, etanol 70 % yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 % atau asam sitrat 3 %. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari satu faktor, yaitu perbedaan jenis pelarut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi pigmen antosianin kulit kacang gude hitam dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % merupakan teknik ekstraksi paling baik ditinjau dari kadar total antosianin, kadar total fenol dan aktivitas penangkapan radikal DPPH. Stabilitas terhadap perlakuan pH dan suhu terlihat dari kestabilan warna yang semakin menurun dan degradasi antosianin yang semakin tinggi seiring dengan peningkatan pH dan suhu yang diberikan. Aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam memiliki nilai korelasi yang lebih tinggi terhadap kadar total antosianin dibandingkan dengan kadar total fenol. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam berpotensi dijadikan pewarna alami pada pengolahan pangan sekaligus sebagai antioksidan.

*commit to user*

**ANTIOXIDANT CAPACITY AND STABILITY OF  
ANTHOCYANIN PIGMENT EXTRACT OF BLACK PIGEONPEA SHELL  
(*Cajanus cajan* [Linn.] Millsp.) WITH VARIOUS SOLVENTS**

**MUHAMMAD UMAR SYARIFUDDIN AL-LAWI  
H0606055**

Agriculture Product Technology Department  
Faculty of Agriculture Sebelas Maret University Surakarta

**SUMMARY**

Anthocyanin is pigment that produce red, purple and blue color, wellknown for its ability as antioxidant. Nowadays, the development of food processing industry and the limited number and quality of natural dyes, lead to increase the use of synthetic dyes. However, synthetic dye application cause negative impact due to its toxic and carcinogenic characteristic. In Indonesia, black pigeonpea seed which is used in making tempeh and soy sauce has by-product of the seed shell that has not been utilized. Black color of pigeonpea shell has presumed that it contain of anthocyanin pigment.

This study aimed : (1) to determine the best anthocyanin pigment extract of black pigeonpea shell related to total anthocyanin content, (2) to examine antioxidant capacity included total phenols (follin ciocalteau method) and radical scavenging activity (DPPH method), (3) to evaluate the pigment stability toward pH and temperature of pasteurization treatment observed from content of total anthocyanin (different pH method) and color quality ( $L * a * b$ ). Extraction of anthocyanin pigment of black pigeonpea shell was conducted by varying the types of solvent. They were water and 70 % ethanol, each acidified with HCl 1% or 3% citric acid. The experimental design used Completely Randomized Design (CRD) consists of one factor; differences in solvent.

The results showed that the anthocyanin pigment extraction of black pigeonpea shell used 70 % ethanol acidified with HCl 1% as solvent was the best extraction technique observed from content of total anthocyanin, total phenolic content and DPPH radical scavenging activity. The stability of pH and temperature could be seen from the diminishing of color stability and anthocyanin degradation a long with the increasing of pH and temperature treatment. DPPH radical scavenging activity of black pigeonpea shell extract had higher correlation value to total anthocyanin content rather than total phenol content. Therefore could be concluded that the extract of black pigeonpea shell was potentially used as natural dye in food processing and also used as antioxidant.

*commit to user*

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Antosianin diketahui memiliki berbagai manfaat bagi kesehatan, seperti mengurangi resiko penyakit jantung koroner, resiko stroke, dan aktivitas antikarsinogen. Selain itu juga dapat berperan sebagai agensia antiinflamasi yang dapat menurunkan resiko alergi dan resiko gangguan otak yang disebabkan oksidasi jaringan lemak akibat trauma dan gangguan sistem saraf. Hal ini terkait dengan kapasitas antosianin sebagai antioksidan.

Dewasa ini perkembangan industri pengolahan pangan serta terbatasnya jumlah dan mutu zat pewarna alami, menyebabkan penggunaan zat warna sintetik meningkat. Namun penggunaan pewarna sintetik sebagai pewarna makanan atau minuman dapat berdampak negatif karena bersifat toksik dan karsinogenik. Oleh karenanya, penggunaan zat pewarna alami khususnya untuk makanan, perlu lebih dikembangkan karena lebih aman dari segi kesehatan (Samun, 2008).

Anonim (2010<sup>a</sup>) menyatakan bahwa kacang gude adalah tanaman leguminosa penting yang biasa ditanam di daerah tropis semi kering. Kulit bijinya bervariasi warnanya dari kuning ke merah, coklat atau hitam. Agron (2009) melaporkan bahwa di India kacang gude utuh, tanpa kulit, dan kacang gude hijau telah banyak dimanfaatkan, sebagai pangan manusia maupun pakan ternak. Di negara tersebut, kacang gude digiling, diambil patinya, dibuat mie, difermentasi menjadi tempe, kecap manis dan kecap asin. Sedangkan di Indonesia kacang gude hitam tanpa kulit dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan tempe dan kecap serta ditepungkan. Namun, masih ada potensi lain dari kacang gude hitam yang belum dimanfaatkan yaitu kulit bijinya yang berwarna hitam diduga mengandung senyawa antosianin yang berpotensi dijadikan sebagai pewarna alami sekaligus berperan sebagai antioksidan.

Peneliti dari Michigan State University menyatakan bahwa aktivitas antioksidan kedelai hitam paling tinggi dibandingkan jenis kedelai lainnya

(kedelai merah, coklat, kuning dan putih), dan diketahui hal tersebut terkait kandungan flavonoid yang lebih tinggi pada kulit kedelai hitam yang berwarna lebih gelap (hitam). Antosianin merupakan senyawa antioksidan yang paling aktif pada kedelai hitam (Anonim, 2009<sup>a</sup>). Penelitian Radix (2007) juga melaporkan bahwa kulit kedelai hitam varietas Mallika dan Cikuray memiliki kandungan fenolik dan antosianin dalam jumlah tinggi serta memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi untuk menangkap radikal DPPH dan menghambat oksidasi LDL.

Ekstraksi antosianin dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, polaritas pelarut, keasaman, ketersediaan oksigen, suhu, dan waktu ekstraksi (Robinson, 1995 dalam Tensiska *et al.*, 2006; Kalt *et al.*, 2000 dalam Ariviani, 2008; dan Francis, 1989). Tensiska *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa ekstraksi senyawa golongan flavonoid termasuk di dalamnya antosianin yang merupakan senyawa polar, dapat diekstraksi dengan pelarut yang bersifat polar, seperti air, etanol, etil asetat, dan metanol.

Pokorny (2001) menyatakan bahwa pH suatu sistem akan sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan antosianin. Antosianin kurang efektif sebagai *metal chelators* pada kondisi pH rendah (asam), tetapi kemampuan mendonorkan hidrogen (*hydrogen-donating activity*) meningkat. pH juga akan mempengaruhi stabilitas antosianin dan warna dari antosianin tersebut. Antosianin lebih stabil pada pH asam dibanding dalam pH netral atau basa (Markakis, 1982).

Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi pigmen antosianin kulit kacang gude hitam dengan variasi pelarut, ditentukan kapasitas antioksidannya, serta stabilitasnya terhadap perlakuan pH dan suhu pasteurisasi, ditinjau dari warna dan kadar total antosianin. Ekstraksi antosianin kulit kacang gude hitam dilakukan dengan variasi jenis pelarut yaitu aquades, etanol 70 % yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 % dan asam sitrat 3 %.

## B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, dapat disusun rumusan masalah berikut ini :

1. Bagaimana pengaruh jenis pelarut yang digunakan untuk ekstraksi terhadap kadar total antosianin, kadar total fenol, dan aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak kulit kacang gude hitam?
2. Bagaimana stabilitas ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan pH dan suhu pasteurisasi ditinjau dari kadar total antosianin dan kualitas warna?
3. Bagaimana korelasi antara kadar total antosianin dengan kapasitas antioksidan ekstrak kulit kacang gude hitam yang dihasilkan?

## C. Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui teknik ekstraksi antosianin kulit kacang gude hitam yang terbaik ditinjau dari kapasitas antioksidan dan stabilitasnya terhadap perlakuan pH dan suhu pasteurisasi.

Tujuan umum ini dicapai dengan beberapa tujuan khusus sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh jenis pelarut yang digunakan untuk ekstraksi terhadap kadar total antosianin, kadar total fenol, dan aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak kulit kacang gude hitam.
2. Mengetahui stabilitas ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan pH dan suhu pasteurisasi ditinjau dari kadar total antosianin dan kualitas warna.
3. Mengetahui korelasi antara kadar total antosianin dengan kapasitas antioksidan ekstrak kulit kacang gude hitam yang dihasilkan.

## D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan mampu meningkatkan nilai guna dan nilai ekonomi kulit kacang gude hitam dan memberikan alternatif pewarna alami yang aman dan dapat diaplikasikan dalam pengolahan pangan serta dapat mengurangi dampak negatif akibat penggunaan pewarna sintetik.



## II. LANDASAN TEORI

### A. Tinjauan Pustaka

#### 1. Kacang Gude (*Cajanus cajan* [Linn.] Millsp.)

Kacang gude adalah spesies kacang-kacangan yang berasal dari India. Biasa dimanfaatkan sebagai penghasil bahan pangan dan bahan pupuk hijau. Buahnya berbentuk polong sepanjang 4-10 cm, berbulu, pipih dan berwarna hijau. Biji dalam polongnya berbentuk bulat dan berukuran kecil; dengan jumlah per polong berkisar 4-9 butir biji. Bentuk polongnya ada yang lurus dan ada yang berbentuk sabit. Warna kulit bijinya ada yang putih keabu-abuan, krem, kuning, coklat keunguan, sampai hitam. Kulit bijinya mulus dan mengkilap (Messakh, 2004). Warna kulit biji kacang gude yang berwarna coklat keunguan atau hitam diduga mengandung antosianin.



Gambar 2.1 Biji Kacang Gude Hitam

Sumber : Dokumentasi Penelitian

Berikut ini klasifikasi ilmiah dari kacang gude :

Kingdom : Plantae  
Subkingdom : Tracheobionta  
Superdivision : Spermatophyta  
Division : Magnoliophyta  
Class : Magnoliopsida  
Subclass : Rosidae  
Order : Fabales  
Family : Fabaceae  
Genus : *Cajanus* Adans.  
Species : *Cajanus cajan* (L.) Millsp.  
(Anonim, 2009<sup>b</sup>).

Tanaman kacang gude dapat ditemukan dari dataran rendah sampai 2.000 m dpl. Pertumbuhannya memerlukan banyak cahaya matahari dan

tidak tahan terhadap kondisi lembab (Kazuma, 2009). Selain itu, tanaman ini cukup toleran terhadap kekeringan atau pada temperatur tinggi dan dapat tumbuh baik pada daerah yang kurang subur (Harian Pikiran Rakyat, 2001 dalam Kunia, 2008). Odeny (2007) menyatakan bahwa kelebihan kacang gude dibandingkan jenis kacang-kacangan lain ialah karena memiliki kombinasi gizi yang optimal dan unik, mudah sekali tumbuh dan sangat produktif, mempunyai toleransi tinggi terhadap lingkungan yang buruk, menghasilkan biomassa yang tinggi, dan berkontribusi pada kelembaban dan nutrisi tanah.

Torres *et. al.* (2007) melaporkan bahwa kacang gude memiliki Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) sebesar 33,2  $\mu\text{mol}$  trolox/gram dalam setiap 100 gram bahan kering.

Saat ini kacang gude dibudidayakan di negara-negara tropis dan telah dimanfaatkan pula di negara Argentina, Brazil, China, Cuba, Dominican, Republik Haiti, Malaysia, Meksiko, Peru, dan Trinidad. Sedangkan di Indonesia, kacang gude sudah dikenal di pulau Sumatera, Jawa, Bali, hingga kepulauan Maluku (Taylor, 2005).

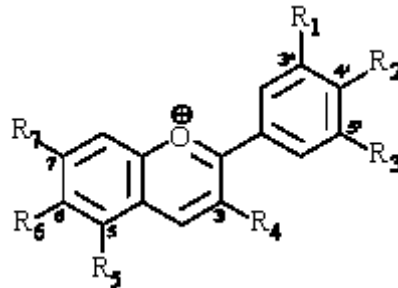
Oboh (2006) melaporkan bahwa sifat antioksidan dari beberapa jenis kacang yang umum dikonsumsi diantaranya kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), kacang gude (*Cajanus cajan*), dan biji yam Afrika (*Sphenostylis sternocarpa*) dinilai berkaitan dengan kandungan Vitamin C, total fenol, dan asam fitat, serta kemampuan biji-bijian tersebut mengurangi radikal bebas.

## 2. Antosianin

Antosianin adalah pigmen vakuolar yang berwarna merah, ungu, atau biru menurut pH. Antosianin termasuk golongan senyawa flavonoid yang disintesis melalui fenilpropanoid, tidak berbau dan hampir tidak berasa, berkontribusi untuk menciptakan sensasi astringen yang ringan. Antosianin terdapat pada semua jaringan-jaringan tumbuhan tingkat tinggi, termasuk daun, cabang/batang, akar, bunga dan buah. Antoksantin adalah termasuk antosianin yang berwarna putih hingga kuning cerah yang



terdapat pada tumbuhan (Anonim, 2010<sup>b</sup>). Struktur umum antosianin dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Umum Antosianin  
Sumber : Anonim, 2010<sup>b</sup>

Tabel 2.1 Daftar Antosianidin dan Substitusinya

Antosianidin	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Aurantidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Cyanidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH
Luteolinidin	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidin	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>

Sumber : Anonim, 2010<sup>b</sup>

Wrolstad (2004) melaporkan bahwa antosianin merupakan pigmen yang bertanggung jawab terhadap warna merah, ungu dan biru pada buah-buahan, sayuran, dan beberapa sereal. Substitusi dengan H, OH, dan OCH<sub>3</sub> pada cincin B menghasilkan 6 macam antosianin, yaitu pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin, dan malvidin. Substitusi glikosida dapat terjadi pada posisi 3, 5, atau 7 dan mono, di atau trisakarida mungkin diasilasi dengan asam cinnamat atau asam alifatik.

Antosianin memiliki sejumlah peranan yang dapat dimanfaatkan dalam proses pengolahan pangan, baik untuk produk makanan maupun

minuman. Peran tersebut antara lain dapat dijadikan sebagai salah satu sumber pewarna alami dan mempunyai kapasitas antioksidan (Satyatama, 2008).

## 2.1 Antosianin sebagai Pewarna

Burdock (1997) dalam Tensiska *et al.* (2006) melaporkan bahwa antosianin dapat menggantikan penggunaan pewarna sintetik Carmoisin dan Amaranth sebagai pewarna merah pada produk pangan. Antosianin dapat digunakan sebagai pewarna dalam minuman penyegar, kembang gula, produk susu, roti dan kue, produk sayuran, produk ikan, lemak dan minyak, selai, jelly, manisan, produk awetan dan sirup buah

Jackman *et al.* (1987) menyatakan bahwa di dalam media asam, warna antosianin sebagian besar tergantung pada jumlah gugus hidroksil pada cincin B. Semakin banyak hidroksilasi cincin B maka warna anthosianin semakin biru, oleh karena itu delphinidin lebih biru daripada cyanidin dan pelargonidin. Penambahan jumlah gugus metoksil pada cincin B akan menyebabkan pergeseran warna pigmen ke arah warna merah. Ekstrak pigmen yang mengandung pelargonidin dan/atau sianidin cenderung berwarna merah muda, peonidin berwarna merah gelap sedangkan delphinidin, petunidin dan atau malvidin berwarna merah kebiruan.

pH juga akan mempengaruhi stabilitas dari antosianin disamping berpengaruh terhadap warna dari antosianin tersebut. Antosianin lebih stabil pada pH asam dibanding dalam pH netral atau basa (Markakis, 1982).

## 2.2 Antosianin sebagai Antioksidan

Menurut Kong *et al.* (2003) dalam Ariviani (2008), peranan antosianin tergantung pada struktur kimia molekulnya, seperti derajat glikolisasi dan jumlah gugus hidroksi pada cincin B. Peran antosianin sebagai antioksidan karena adanya gugus hidroksi pada cincin B (pada

posisi 3' dan 4') dan pada cincin C (posisi 3) sehingga memungkinkan chelating logam seperti  $\text{Cu}^{2+}$  dan  $\text{Fe}^{3+}$ .

Kalt *et al.* (2000) dalam Ariviani (2008), melaporkan bahwa total antosianin, total senyawa fenolik dan kapasitas antioksidan ekstrak *puree* (bubur buah) blueberry sangat dipengaruhi oleh waktu dan suhu ekstraksi. Jumlah ekstrak antosianin dan kapasitas antioksidan pada suhu 60 °C lebih tinggi hasilnya dibandingkan ekstraksi pada suhu 25 °C. Sedangkan ekstraksi pada kondisi pH 1 menghasilkan kapasitas antioksidan lebih tinggi dibanding pada kondisi pH 4 dan pH 7.

Gaulejac *et al.* (1999) dalam Ariviani (2008) melaporkan bahwa antosianin dan ekstrak polifenolik dari tanaman dapat berperan sebagai penangkap radikal bebas, dan sebagai antilipoperoxidants (Saija *et al.*, 1995), serta degradasi kolagen yang disebabkan oleh radikal superoksida anion (Wang and Jio 2000). Senyawa-senyawa tersebut dilaporkan juga dapat menghambat enzim yang menghasilkan radikal superoksida, seperti xanthine oxidase (Costantino *et al.* 1992).

Sebuah penelitian yang dilakukan di Universitas Michigan Amerika Serikat menunjukkan bahwa antosianin dapat menghancurkan radikal bebas lebih efektif daripada vitamin E yang selama ini dikenal sebagai antioksidan kuat. *USDA Human Nutrition Center* menyatakan bahwa blueberry yang kaya antosianin memiliki efek antioksidan yang paling baik di antara 40 jenis buah-buahan yang telah diuji. Kandungan antosianin diyakini dapat menghambat berbagai radikal bebas seperti radikal superoksida dan hidrogen peroksida (Anonim, 2009<sup>c</sup>).

Chang *et al.* (2006) mengevaluasi kegiatan antioksidatif dari antosianin ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dengan mengukur pengaruhnya terhadap oksidasi LDL (dalam sistem sel-bebas). Hasilnya dalam studi tersebut, ekstrak bunga *Hibiscus* mampu

mencegah oksidasi LDL dan kematian makrofag karena kontribusi komponen antosianinnya.

Made dan Andreas (2008) dalam Anonim<sup>c</sup> (2009) melaporkan bahwa banyak faktor yang mempengaruhi kekuatan antioksidan pada buah berwarna ungu, antara lain adalah tingkat kematangan buah, kekuatan antioksidan blueberry yang sudah matang lebih tinggi daripada yang belum matang

Menurut Astuti dalam Anonim (2010<sup>c</sup>) kedelai hitam memiliki kandungan antosianin yang merupakan antioksidan potensial untuk mencegah proses oksidasi secara dini dan mencegah suatu penyakit degeneratif. Antosianin dari kulit kedelai hitam mampu menghambat oksidasi *LDL cholesterol* yang merupakan awal terbentuknya plak dalam pembuluh darah yang akan memicu berkembangnya penyakit tekanan darah tinggi dan berkembangnya penyakit jantung koroner.

Antosianin berperan sebagai penangkap radikal bebas yang sangat efektif dan telah diuji dengan metode *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) berkaitan dengan manfaatnya bagi kesehatan yaitu dapat mengurangi resiko penyakit jantung koroner, resiko stroke, dan aktivitas antikarsinogen. Selain itu juga dapat berperan sebagai agensia antiinflamasi yang dapat menurunkan resiko alergi dan resiko gangguan otak yang disebabkan oksidasi jaringan lemak akibat trauma dan gangguan sistem saraf (Wrolstad, 2004).

Menurut Pokorny (2001), pH suatu sistem akan sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan pada antosianin dimana antosianin kurang efektif sebagai *metal chelators* pada kondisi pH rendah (asam), tetapi kemampuan mendonorkan hidrogen (*hydrogen-donating activity*) meningkat.

### 3. Ekstraksi Antosianin

Antosianin merupakan senyawa polar, sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut yang bersifat polar, seperti air, etanol, dan metanol.

Menurut Francis (1982), metode ekstraksi antosianin yang paling sering digunakan ialah dengan menggunakan metanol atau etanol yang diasamkan dengan HCl 1 %, namun yang paling efektif adalah dengan menggunakan metanol yang diasamkan dengan HCl. Akan tetapi, karena sifat toksik dari metanol, biasanya dalam sistem pangan digunakan etanol yang diasamkan dengan HCl seperti yang juga dilaporkan oleh Gao dan Cahoon (1998).

Menurut Gao and Mazza (1996) dalam Anonim (2004) ekstraksi pigmen antosianin dari bahan nabati umumnya menggunakan larutan pengestrak HCl dalam etanol. HCl dalam etanol akan mendenaturasi membran sel tanaman kemudian melarutkan pigmen antosianin keluar dari sel. Pigmen antosianin dapat larut dalam etanol karena antosianin merupakan senyawa polar sedangkan etanol merupakan pelarut yang bersifat polar (Broillard, 1982 dalam Saati, 2009).

Lapornik *et al.* (2005) melaporkan hasil ekstraksi yang dilakukan pada *redcurrant* dan *blackcurrant* menggunakan pelarut etanol dan metanol mengandung antosianin dua kali lebih banyak daripada menggunakan pelarut air. Dalam pelarut air kadar polifenol menurun, sedangkan dalam pelarut metanol dan etanol kandungannya meningkat seiring meningkatnya waktu ekstraksi. Buah *redcurrant* dan *blackcurrant* mengandung banyak senyawa polifenol, terutama antosianin yang bertindak sebagai antioksidan.

Lapornik *et al.* (2005) juga menyatakan ekstraksi antosianin dengan pelarut air menghasilkan yield dan aktivitas antioksidan yang lebih kecil dibanding dengan ekstraksi menggunakan methanol dan etanol, yield dan aktivitas antiradikal tertinggi menggunakan etanol 70 %. Selain pelarut, menurut Pifferi and Vaccari (1998) dalam Anonim (2004), faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi antosianin adalah waktu ekstraksi, pH dan temperatur ekstraksi.

Vanini *et al.* (2009) mengekstraksi pigmen antosianin dari kulit buah anggur menggunakan pelarut metanol dan etanol dengan variasi



konsentrasi. Hasilnya, pelarut etanol 70 % dengan perlakuan pH 2,0 adalah sistem yang paling efisien dalam ekstraksi antosianin. Pelarut seperti metanol dan etanol digunakan pada konsentrasi 60, 70 dan 80 % dalam air, yang diasamkan dengan 0,1 % asam klorida (HCl) sampai dengan nilai pH 2,0 dan 4,0, dan dengan asam sitrat 3 % sampai dengan nilai pH 3,0 dan 3,5.

#### 4. Stabilitas Antosianin

Hartati (2007) dalam penelitiannya melaporkan bahwa stabilitas antosianin dipengaruhi oleh pH, radiasi sinar, logam, reduktor oksidator dan suhu. Hasil analisis deskriptif yang telah dilakukan menyebutkan stabilitas antosianin ekstrak buah buni (*Antidesma bunius*) menurun jika diberi perlakuan suhu tinggi (72,66 °C) dan penambahan reduktor Na-Thiosulfat. Keseluruhan kondisi stabilitas maksimum diperoleh dengan menggunakan pH larutan buffer yang asam (pH 0,6–1,2) dengan panjang gelombang spektrofotometer 370 – 720 nm.

Nollet (1996) dalam Mar'atusshalihah (2007) menyatakan bahwa antosianin merupakan pewarna alami yang paling penting dan paling tersebar luas dalam tumbuhan. Kestabilan antosianin sangat dipengaruhi oleh faktor fisik maupun kimia seperti pH, temperatur, sinar/ cahaya, dan oksigen serta faktor lainnya seperti enzim dan logam, dan umumnya antosianin lebih stabil dalam kondisi asam, media bebas oksigen dan dalam kondisi suhu dingin dan gelap.

Pada pH 2 atau di bawahnya, pigmen antosianin didominasi oleh kation flavilium yang berwarna merah tetapi setelah pH dinaikkan menjadi 7 maka menjadi tak berwarna karena dominasi pseudobase kalkon. Formasi kalkon juga dipengaruhi oleh temperatur tinggi dan kontak yang terlalu lama dimana dapat meningkatkan degradasi antara cincin B dan C dan mengakibatkan rusaknya kromofor antosianin (Strack dan Wray, 1993; Clifford, 2000 dalam McDougall *et al.* 2007).

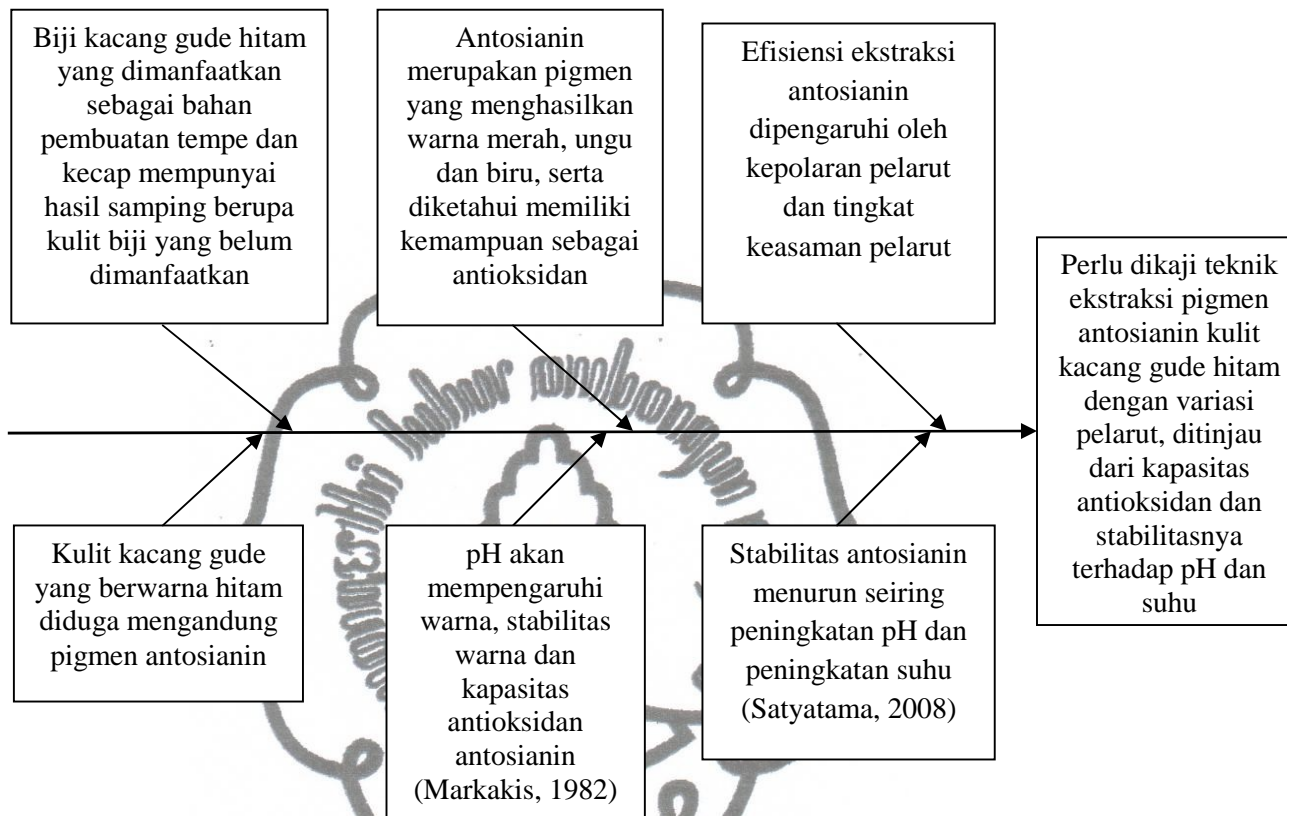
Abbas (2003) meneliti pengaruh perlakuan pH dan suhu pemanasan terhadap pigmen antosianin bunga kana. Perlakuan suhu 40 °C dan 70 °C pada media yang memiliki pH 3 masih stabil, sedangkan pada media pH 4 dan pH 5 mengalami kerusakan pigmen (tidak stabil). Pemanasan dengan suhu dan waktu yang semakin meningkat akan menyebabkan pigmen antosianin semakin berkurang jumlahnya.

Pemanasan sangat berpengaruh pada stabilitas warna pigmen antosianin dan dapat menyebabkan menjadi pucat. Markakis (1982) menjelaskan bahwa penurunan stabilitas warna akibat suhu yang tinggi karena terjadi dekomposisi antosianin dari bentuk aglikon menjadi kalkon (tidak berwarna) dan akhirnya membentuk alfa diketon yang berwarna coklat. Pendapat ini didukung oleh penelitian Wijaya (2001) yang menyatakan bahwa pemanasan pada suhu 70 °C selama 1 jam ternyata menyebabkan penurunan absorbansi maksimal ekstrak antosianin kulit buah rambutan dari 0,95 menjadi 0,73.

Luiz *et al.* (2007) melaporkan bahwa suhu mempengaruhi stabilitas warna antosianin ekstrak kulit anggur Isabel (*Vitis labrusca L.*) dan pengendalian suhu penyimpanan merupakan faktor penting dalam menjaga stabilitas antosianin. Hasil tersebut diperkuat oleh penelitian Dyrby *et al.* (2001) yang mengevaluasi stabilitas termal antosianin kulit anggur vinifera (*Vitis L.*) dalam larutan buffer pH 3,0 pada suhu yang berkisar antara 25 °C – 80 °C. Hasilnya terjadi peningkatan degradasi warna antosianin yang signifikan sehubungan dengan peningkatan suhu. Efek suhu terhadap stabilitas antosianin buah *black currant* juga dievaluasi oleh Rubinskiene *et al.* (2005), dimana perlakuan suhu tinggi (85 °C dan 95 °C) dapat meningkatkan degradasi pigmen antosianin.



## B. Kerangka Berpikir



Gambar 2.3 Kerangka Berpikir Penelitian

## C. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Rendemen antosianin dipengaruhi oleh polaritas dan pH pelarut yang digunakan untuk ekstraksi.
2. Polaritas dan keasaman (pH) pelarut mempengaruhi kapasitas antioksidan dan stabilitas ekstrak antosianin terhadap perlakuan pH dan suhu.
3. Warna dan kadar ekstrak antosianin menurun seiring peningkatan pH dan suhu.

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses dan Pengolahan Hasil Pertanian dan Laboratorium Pangan dan Gizi, Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta dan Laboratorium Sistem Produksi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – Desember 2010.

#### B. Bahan dan Alat

##### 1. Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah kulit kacang gude hitam yang berasal dari pasar lokal di Solo. Pelarut yang digunakan adalah aquades dan etanol 70 %, yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 % atau asam sitrat 3 %. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis sebagai berikut :

- a. Total Antosianin :
  - i. Buffer pH 1,0 = KCl dan HCl, aquades
  - ii. Buffer pH 4,5 = potassium asetat dan HCl, aquades
- b. Kapasitas Antioksidan : larutan DPPH (*Diphenyl picrylhydrazyl*), etanol.
- c. Total Fenol :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Reagen Folin ciocalteu, standar fenol murni, aquades.

Semua bahan kimia yang digunakan merupakan bahan kimia yang standar untuk analisis (p.a).

##### 2. Alat

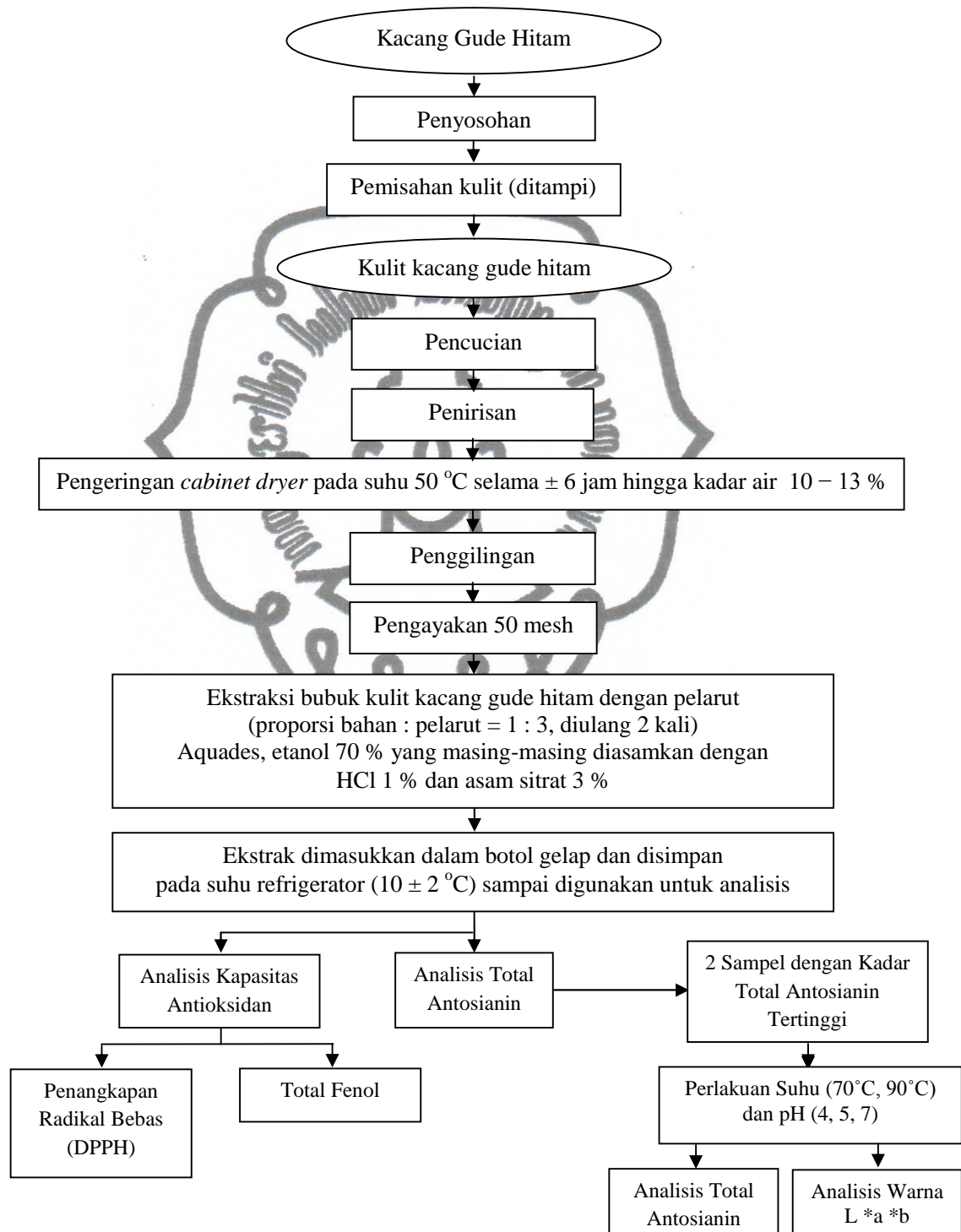
Alat-alat yang digunakan untuk membuat ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam antara lain alat penyosoh, tampah, loyang, *cabinet dryer* Memmert, penggiling, ayakan, gelas beker, pengaduk, corong, pompa vakum, serta *hot plate magnetic stirrer*

Heidolph MR 3001K. Alat-alat yang digunakan untuk analisis sebagai berikut :

- a. Kadar total antosianin : spektrofotometer UV-Vis 1240, tabung reaksi, labu takar, vortex Heidolph Reax Control, propipet, pipet ukur.
- b. Kapasitas antioksidan :
  - i) Penangkapan Radikal Bebas (DPPH) : spektrofotometer UV-Vis 1240, tabung reaksi, propipet, pipet ukur, vortex Heidolph Reax Control.
  - ii) Total Fenol : spektrofotometer UV-Vis 1240, tabung reaksi, gelas ukur, vortex Heidolph Reax Control, pipet ukur.
- c. Stabilitas warna :
  - i.) Perlakuan suhu : *water bath* Memert, tabung reaksi, pipet ukur.
  - ii.) Perlakuan pH : pH meter digital Ecoscan Eutech Instrument, gelas beker, pipet ukur.
  - iii.) Pengukuran  $L^*a^*b$  : *Colorimeter CR-400* Konica Minolta.

### C. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian dapat digambarkan melalui diagram berikut ini :



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

Tahap-tahap penelitian yang dilakukan meliputi :

1. Persiapan Alat dan Bahan

Tahap penelitian yang pertama ini bertujuan untuk menyiapkan tempat, semua peralatan dan bahan-bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak antosianin serta mempersiapkan pula peralatan dan bahan untuk pengujian sampel atau uji laboratorium.

2. Pembuatan Ekstrak Antosianin

- a. Kacang gude hitam disosoh untuk mengupas kulit bijinya, kemudian ditampi agar mudah diambil kulit yang sudah terpisah dari bijinya.
- b. Kulit biji kacang gude hitam tersebut kemudian dicuci bersih dan ditiriskan selama beberapa saat, kemudian dikeringkan dalam *cabinet dryer* pada suhu 50 °C selama  $\pm 6$  jam sampai kadar air 10 – 13 %.
- c. Kulit kacang gude hitam yang sudah kering kemudian digiling dan diayak menggunakan ayakan ukuran 50 mesh.
- d. Dilakukan ekstraksi dengan proporsi bahan dan pelarut = 1 : 3 dengan menggunakan alat *hot plate magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 30 menit. Pelarut yang digunakan meliputi aquades yang diasamkan dengan HCl 1 %, aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %, etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % dan etanol 70 % yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %.
- e. Hasil ekstrak dari masing-masing pelarut dituang dan disimpan dalam botol gelap dan ditutup rapat, kemudian disimpan pada suhu refrigerator ( $10 \pm 2$  °C) sampai akan digunakan untuk analisis.
- f. Pada perlakuan pH, ekstrak diambil sebanyak masing-masing 5 ml kemudian dimasukkan ke dalam media pH buffer asam sitrat (4, 5, 7), lalu distirer selama  $\pm 5$  menit. Sedangkan pada perlakuan suhu, ekstrak diambil masing-masing sebanyak 15 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 70°C dan 90°C selama 15 menit. Setelah semua proses selesai dilakukan, ekstrak hasil kedua perlakuan tersebut dimasukkan ke dalam botol gelap ukuran 15 ml dan disimpan pada suhu

refrigerator ( $10 \pm 2$  °C) sampai akan digunakan untuk analisis kadar total antosianin dan L \*a \*b.

#### D. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari satu faktor yaitu jenis pelarut yang terdiri dari 4 taraf : aquades yang diasamkan dengan HCl 1 %, aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %, etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % dan etanol 70 % yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %. Perlakuan pH dan suhu terhadap kestabilan antosianin dan kualitas warna juga menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari satu faktor yaitu jenis pelarut yang terdiri dari 4 taraf (untuk perlakuan pH) : tanpa perlakuan, perlakuan pH 4, perlakuan pH 5, dan perlakuan pH 7, serta 3 taraf (untuk perlakuan suhu) : tanpa perlakuan, perlakuan suhu 70 °C, dan perlakuan suhu 90 °C. Semua taraf dilakukan tiga kali ulangan sampel dan tiap-tiap sampel dilakukan dua kali ulangan analisis.

Data hasil analisis pada penelitian ini diuji secara statistik menggunakan sidik ragam ANOVA dengan SPSS. Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada  $\alpha=0,05$ . Sedangkan untuk mengetahui kontribusi antosianin terhadap aktivitas antioksidan dilakukan analisis nilai korelasi Pearson pada  $p < 0,01$ .

#### E. Metode Analisis

##### 1. Analisis Total Antosianin (Giusti dan Worlstad, 2001)

Kandungan antosianin dianalisis dengan metode *pH differential*. Prinsip dari metode ini adalah antosianin mengalami perubahan warna berdasarkan perubahan pH. Pada kondisi pH 1 antosianin berada dalam bentuk *oxonium* atau *flavylium* yang memiliki intensitas warna kuat, sedangkan pada kondisi pH 4,5 antosianin dalam bentuk *carbinol* yang tidak berwarna. Ekstrak ditambah buffer pH 1 sampai *dilution faktor* (DF)



yang diinginkan. Ekstrak ditambah buffer pH 4,5 sampai *dilution faktor* (DF) yang diinginkan. Pengukuran absorbansi 510 nm dan 700 nm.

a. Pembuatan larutan buffer pH 1,0 dan pH 4,5

Untuk membuat larutan buffer pH 1,0 digunakan KCl sebanyak 1,86 g dicampur dengan 980 ml air suling (aquades) dan diatur pH-nya hingga mencapai 1 dengan menggunakan HCl pekat. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 1 L dan ditambahkan air suling sampai volume larutan 1L. Sedangkan untuk larutan buffer pH 4,5 digunakan  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 54,43 g dicampur dengan 960 ml air suling. Kemudian pH diukur dan diatur dengan HCl pekat hingga diperoleh larutan dengan pH 4,5. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 1 L dan diencerkan dengan air suling sampai volume 1 L.

b. Pengukuran dan perhitungan konsentrasi antosianin total

i.) Faktor pengenceran yang tepat untuk sampel harus ditentukan terlebih dahulu dengan cara melarutkan sampel dengan buffer KCl pH 1 hingga diperoleh absorbansi kurang dari 1,2 pada panjang gelombang 510 nm.

ii.) Selanjutnya diukur absorbansi akuades pada panjang gelombang yang akan digunakan (510 dan 700 nm) untuk mencari titik nol. Panjang gelombang 510 nm adalah panjang gelombang maksimum untuk sianidin-3-glukosida sedangkan panjang gelombang 700 nm untuk mengoreksi endapan yang masih terdapat pada sampel. Jika sampel benar-benar jernih maka absorbansi pada 700 nm adalah 0.

iii.) Dua larutan sampel disiapkan, pada sampel pertama digunakan buffer KCl dengan pH 1 dan untuk sampel kedua digunakan buffer Na-asetat dengan pH 4,5. Masing-masing sampel dilarutkan dengan larutan buffer berdasarkan DF (*dilution factor*/faktor pengenceran) yang sudah ditentukan sebelumnya. Sampel yang dilarutkan menggunakan buffer pH 1 dibiarkan selama 15 menit sebelum diukur, sedangkan untuk sampel yang dilarutkan dengan buffer pH 4,5 siap diukur setelah dibiarkan bercampur selama 5 menit.



- iv.) Absorbansi dari setiap larutan pada panjang gelombang 510 dan 700 nm diukur dengan buffer pH 1 dan buffer pH 4,5 sebagai blankonya.
- v.) Absorbansi dari sampel yang telah dilarutkan (A) ditentukan dengan rumus :

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

Kandungan pigmen antosianin pada sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Total Antosianin (mg/ 100 gr bahan db)} = \frac{A}{\epsilon \times L} \times \text{MW} \times \text{DF} \times \frac{V}{Wt}$$

Keterangan :

- A = absorbansi  
 $\epsilon$  = absorbtivitas molar Cyanidin-3-glukosida = 26900 Lt/(mol.cm)  
 L = lebar kuvet = 1 cm  
 MW = berat molekul Sianidin-3-glukosida = 449,2 g/mol  
 DF = faktor pengenceran  
 V = volume akhir atau volume ekstrak pigmen (Lt)  
 Wt = berat bahan awal (gr)

## 2. Kapasitas Antioksidan

- a. Analisis Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas dengan Metode DPPH (Molyneux, 2004)

Sampel diambil 1 ml dan ditambahkan 1 ml DPPH 0,5mM ke dalam tabung reaksi bertutup. Kemudian ditambahkan 4 ml etanol kedalamnya dan divortex. Setelah itu disimpan dalam ruang gelap pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian ditera absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis 1240 pada panjang gelombang 517 nm.

Aktivitas penangkapan radikal :

$$\% \text{ penangkapan DPPH} = \frac{\text{absorbansikontrol} - \text{absorbansisampel}}{\text{absorbansikontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ DPPH (per mg bahan db)} = \frac{\% \text{ penangkapan DPPH} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat a pex 1 ka x 1}}$$

Kontrol = 5 ml etanol + 1 ml DPPH 0,5 mM.

b. Penentuan Kadar Total Fenol dengan Metoda Folin–Ciocalteu (Orak, 2006)

Dipipet 1 ml larutan ekstrak ke dalam labu takar 50 ml, ditambahkan aquades untuk ekstrak dengan pelarut aquades dan etanol untuk ekstrak dengan pelarut etanol sampai tanda tera, kemudian dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 % didiamkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen Folin – Ciocalteu dan divortex lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis 1240 pada panjang gelombang 750 nm.

$$\text{Total Fenol (mg/100gr bahan db)} = \frac{\text{faktor pengenceran}}{\text{berat} \cdot a \cdot \text{pe}/1 \cdot x \cdot 1 \cdot \text{ka}}$$

### 3. Stabilitas Ekstrak

Pada pengujian stabilitas ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan pH dan suhu ditinjau dari kadar total antosianin dan kualitas warna, terlebih dahulu dipilih 2 sampel ekstrak dengan kadar total antosianin terbaik. Kemudian dari kedua sampel tersebut dilakukan :

- a. Sampel ekstrak masing-masing dipipet sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam 3 buah gelas beker ukuran 100 ml kemudian ditambahkan larutan buffer asam sitrat pH 4, 5, dan 7 sebanyak masing-masing 5 ml lalu distirer selama ± 5 menit untuk perlakuan pH.
- b. Sampel ekstrak masing-masing dipipet sebanyak 15 ml dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi tertutup kemudian dipanaskan dalam *water bath* Memert pada suhu 70 °C dan suhu 90 °C untuk perlakuan suhu.
- c. Dari perlakuan suhu dan pH tersebut masing-masing dilakukan pengukuran kadar total antosianin dengan metode *pH differential* dan pengukuran kualitas warna L \*a \*b menggunakan *Colorimeter CR-400* Konica Minolta untuk mengetahui kestabilannya terhadap perlakuan pH dan suhu.

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dewasa ini perkembangan industri pengolahan pangan serta keterbatasan jumlah dan mutu zat pewarna alami, menyebabkan penggunaan zat warna sintetik meningkat. Namun penggunaan pewarna sintetik sebagai pewarna makanan atau minuman dapat berdampak negatif karena bersifat toksik dan karsinogenik. Oleh karenanya, penggunaan zat pewarna alami khususnya untuk makanan, perlu lebih dikembangkan karena lebih aman dari segi kesehatan (Samun, 2008).

Kacang gude adalah tanaman leguminosa penting yang biasa ditanam di daerah tropis semi kering. Kulit bijinya bervariasi warnanya dari kuning ke merah, coklat atau hitam. Di Indonesia kacang gude hitam tanpa kulit dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan tempe dan kecap serta ditepungkan (Anonim, 2010<sup>a</sup>). Namun, masih ada potensi lain dari kacang gude hitam yang belum dimanfaatkan yaitu kulit bijinya yang berwarna hitam diduga mengandung senyawa antosianin yang berpotensi dijadikan sebagai pewarna alami sekaligus berperan sebagai antioksidan.

Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi pigmen antosianin kulit kacang gude hitam dengan variasi pelarut, kemudian diuji kadar total antosianin dan kapasitas antioksidannya serta kestabilannya terhadap perlakuan suhu dan pH ditinjau dari kadar total antosianin dan kualitas warnanya. Ekstraksi pigmen antosianin kulit kacang gude hitam dilakukan dengan variasi jenis pelarut yaitu aquades, etanol 70 % yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 % dan asam sitrat 3 %.

Antosianin adalah zat warna yang bersifat polar dan akan larut dengan baik pada pelarut-pelarut polar (Budiarto, 1991; Hanum, 2000 dalam Samsudin, 2009). Menurut Jackman dan Smith (1996) dengan keadaannya yang polar, antosianin lebih mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol. Menurut Francis (1982), pelarut metanol atau etanol yang diasamkan dengan HCl 1 % paling sering digunakan untuk mengekstrak antosianin. Meskipun yang paling efektif adalah dengan menggunakan metanol yang diasamkan dengan HCl, akan tetapi dalam

*commit to user*

sistem pangan digunakan etanol yang diasamkan dengan HCl mengingat sifat toksik dari metanol (Gao dan Cahoon 1998).

Penelitian Vanini *et al.* (2009) melaporkan bahwa etanol 70 % adalah sistem yang paling efisien dalam ekstraksi antosianin pada sampel anggur. Pada penelitian itu digunakan pelarut metanol dan etanol pada konsentrasi 60, 70 dan 80 % yang diasamkan dengan 0,1 % asam klorida (HCl) sampai dengan nilai pH 2,0 dan 4,0; dan dengan asam sitrat 3 % sampai dengan nilai pH 3,0 dan 3,5. Penelitian Sari (2003) melakukan ekstraksi antosianin pada bunga kana dengan pelarut aquades, etanol 95 %, dan aseton 60 % yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 %, asam sitrat 3 %, dan asam asetat 3 %. Sedangkan Saati (2009) mengekstrak pigmen antosianin kulit buah naga dengan pelarut aquades dan etanol yang masing-masing diasamkan dengan asam sitrat. Kombinasi perlakuan pelarut air dan asam sitrat menghasilkan pigmen antosianin kulit buah naga merah dengan kualitas terbaik. Penggunaan asam sitrat sebagai pengasam dalam penelitian ini karena diarahkan pada aplikasi pengolahan pangan dimana asam sitrat dikategorikan aman digunakan pada makanan oleh semua badan pengawasan makanan baik nasional maupun internasional (Anonim, 2010<sup>d</sup>).

## **A. Pengaruh Jenis Pelarut yang Digunakan untuk Ekstraksi terhadap Kadar Total Antosianin dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Kulit Kacang Gude Hitam**

### **A.1. Kadar Total Antosianin**

Menurut Gao and Mazza (1996) dalam Anonim (2004), ekstraksi pigmen antosianin dari bahan nabati umumnya menggunakan larutan pengestrak HCl dalam etanol. HCl dalam etanol akan mendenaturasi membran sel tanaman kemudian melarutkan pigmen antosianin keluar dari sel. Pigmen antosianin dapat larut dalam etanol karena antosianin merupakan senyawa polar sedangkan etanol merupakan pelarut yang bersifat polar (Broillard, 1982 dalam Saati, 2009).

Antosianin adalah pewarna alami yang berasal dari familia flavonoid yang larut dalam air yang menimbulkan warna merah, biru, ungu/ violet dan tersebar sangat luas pada tanaman. Antosianin terdapat pada semua jaringan tumbuhan tingkat tinggi, termasuk daun, cabang/batang, akar, bunga dan buah. Dalam penelitian ini kadar total antosianin dengan variasi jenis pelarut disajikan pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1** Kadar Total Antosianin Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam dengan Variasi Jenis Pelarut

Jenis Pelarut	Kadar Total Antosianin (mg/ 100 gr db)
As.sitrat 3 % dalam aquades (pH 2,29)	0,38 ± 0,00 <sup>a</sup>
HCl 1 % dalam aquades (pH 1,44)	0,67 ± 0,01 <sup>c</sup>
As.sitrat 3 % dalam etanol 70 % (pH 1,93)	0,62 ± 0,01 <sup>b</sup>
HCl 1 % dalam etanol 70 % (pH 1,37)	1,30 ± 0,01 <sup>d</sup>

Keterangan : *Superscript* yang berbeda menunjukkan beda nyata pada taraf  $\alpha$  0,05.

Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa jenis pelarut yang digunakan untuk ekstraksi berpengaruh terhadap kadar total antosianin ekstrak yang dihasilkan. Kadar total antosianin ekstrak kulit kacang gude hitam dari yang terbesar berturut-turut ialah sampel dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % sebesar 1,30 mg/ 100 gr bahan db, sampel dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan HCl 1 % sebesar 0,67 mg/ 100 gr bahan db, sampel dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan asam sitrat 3 % sebesar 0,62 mg/ 100 gr bahan db, dan sampel dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 3 % sebesar 0,38 mg/ 100 gr bahan db. Hasil ini sejalan dengan penelitian Lapornik *et al.* (2005) yang melaporkan bahwa perbedaan pelarut mempengaruhi hasil ekstraksi antosianin pada buah *redcurrant* dan *blackcurrant* dimana pelarut etanol lebih banyak menghasilkan kadar total antosianin dibanding pelarut air. Meskipun faktanya pelarut aquades lebih polar daripada pelarut etanol, tetapi hal ini membuktikan bahwa pelarut etanol lebih efisien dalam mendegradasi dinding sel yang memiliki karakter



nonpolar dan menyebabkan pigmen antosianin dan senyawa polifenol lainnya mudah dikeluarkan dari vakuola. Satyatama (2008), Cacace dan Mazza (2003) melaporkan bahwa etanol merupakan pelarut yang efektif untuk ekstraksi antosianin dari buah duwet dan *black currant* pada suhu ruang.

Dari Tabel 4.1 juga dapat diketahui bahwa kadar total antosianin tertinggi adalah sampel dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % dan yang terendah ialah sampel dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %. Jika dibandingkan pelarut dengan polaritas yang sama dan memiliki keasaman yang berbeda berpengaruh terhadap kadar total antosianin yang dihasilkan. Pelarut yang diasamkan dengan HCl 1 % memiliki nilai pH lebih rendah daripada pelarut yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %, sehingga lebih memberikan suasana asam dan lebih efektif mengekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam. Menurut Turker dan Erdogdu (2006), pH mempengaruhi efisiensi ekstraksi antosianin dan koefisien difusinya, semakin rendah pH maka koefisien difusinya semakin tinggi. Keadaan yang semakin asam juga menyebabkan semakin banyak dinding sel vakuola yang pecah sehingga pigmen antosianin semakin banyak yang terekstrak (Tensiska *et al.*, 2006).

## A.2. Kapasitas Antioksidan

Antosianin termasuk golongan senyawa flavonoid yang merupakan bagian dari senyawa polifenol yang bersifat antioksidan kuat. Pelarut air menghasilkan aktivitas antioksidan lebih kecil dibandingkan menggunakan metanol dan etanol, sedangkan aktivitas antiradikal tertinggi menggunakan pelarut etanol 70 % (Lapornik *et al.* 2005). Gaulejac *et al.* (1999) dalam Ariviani (2008) melaporkan bahwa antosianin dan ekstrak polifenolik dari tanaman dapat berperan sebagai penangkap radikal bebas.

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian kapasitas antioksidan yang meliputi pengujian kadar total fenol dan aktivitas penangkapan radikal DPPH dengan variasi jenis pelarut.

#### A.2.1. Kadar Total Fenol

Pengujian kadar total fenol dengan metode Folin Ciocalteu digunakan untuk mengetahui kadar senyawa fenol dalam ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam. Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu, walaupun bukan penangkap radikal (antiradikal) efektif (Huang *et al.*, 2005 dalam Pratimasari, 2009). Kadar total fenol ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam dengan variasi jenis pelarut dapat dilihat pada Tabel 4.2.1.

**Tabel 4.2.1** Kadar Total Fenol Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam dengan Variasi Jenis Pelarut

Jenis Pelarut	Kadar Total Fenol (mg/ 100 gr bahan db)
As.sitrat 3 % dalam aquades (pH 2,29)	21,19 ± 0,51 <sup>a</sup>
HCl 1 % dalam aquades (pH 1,44)	30,41 ± 0,39 <sup>c</sup>
As.sitrat 3 % dalam etanol 70 % (pH 1,93)	23,74 ± 0,37 <sup>b</sup>
HCl 1 % dalam etanol 70 % (pH 1,37)	36,97 ± 0,73 <sup>d</sup>

Ket. : *Superscript* yang berbeda menunjukkan beda nyata pada taraf  $\alpha$  0,05.

Berdasarkan Tabel 4.2.1 menunjukkan hasil yang sejalan dengan kadar total antosianin bahwa kadar total fenol ekstrak kulit kacang gude hitam dari yang terbesar berturut-turut ialah sampel dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % sebesar 36,97 mg/ 100 gr bahan db, sampel dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan HCl 1 % sebesar 30,41 mg/ 100 gr bahan db, sampel dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan asam sitrat 3 % sebesar 23,74 mg/ 100 gr



bahan db, dan sampel dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 3 % sebesar 21,19 mg/ 100 gr bahan db.

Dalam penelitian ini ekstrak dengan pelarut etanol 70 % memiliki kadar senyawa fenolik yang lebih tinggi daripada ekstrak dengan pelarut aquades. Zhang *et al.* (2001) dalam Lapornik *et al.* (2005) menyebutkan adanya aktivitas enzim polifenol oksidase yang mampu mendegradasi senyawa fenolik dalam ekstrak air, sedangkan dalam media alkoholik enzim ini tidak aktif sehingga menyebabkan kandungan senyawa fenolik pada sampel yang diekstrak dengan pelarut etanol 70 % lebih tinggi daripada sampel yang diekstrak dengan aquades.

Secara umum, pelarut yang diasamkan dengan HCl 1 % menghasilkan kadar total fenol lebih tinggi dibandingkan pelarut yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %. Hal itu dikarenakan pH dari larutan HCl 1 % lebih rendah daripada pH larutan asam sitrat 3 %. Selain berpengaruh pada kadar total antosianin yang dihasilkan, pH rendah juga mempengaruhi kadar total fenol yang dihasilkan. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Kikugawa *et al.* (1990) dan Chen *et al.* (1996) dalam Tensiska (2003) yang menyatakan bahwa pada pH rendah densitas ion hidrogen meningkat sehingga dapat menekan pelepasan ion hidrogen dari senyawa fenolik. Selain itu, HCl dalam pelarut etanol juga memiliki kemampuan untuk mendenaturasi membran sel tanaman (Gao dan Mazza, 1996 dalam Anonim, 2004). Jika membran sel terdenaturasi maka akan lebih memudahkan keluarnya komponen fenolik yang terdapat dalam vakuola.

Senyawa fenol dapat berfungsi sebagai antioksidan karena memiliki kemampuan menghilangkan radikal-radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipida (Kinsella *et al.*, 1993 dalam Sukardi, 2002). Efek

antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid (antosianin) (Agestia *et al.*, 2009).

### A.2.2. Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH

Antosianin bertindak sebagai antioksidan dengan menyumbang hidrogen yang sangat reaktif sehingga mencegah pembentukan radikal lebih lanjut (Iversen, 1999 dalam Lapornik *et al.*, 2005). Kulit kacang gude hitam diduga mengandung senyawa fenolik (antosianin) yang memiliki kapasitas antioksidan primer dengan cara menyumbangkan atom hidrogen. Pokorny *et al.* (2001) menyatakan bahwa antioksidan jenis ini mampu menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan kemudian mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil.

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) adalah radikal bebas stabil berwarna ungu yang digunakan secara luas untuk pengujian kemampuan penangkapan radikal bebas dari beberapa komponen alam seperti komponen fenolik, antosianin atau ekstrak kasar (Pezzuto, 2002 dalam Yuswantina, 2009). Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti transfer hidrogen sekaligus untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas (Yuswantina, 2009). Aktivitas ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam dalam menangkap radikal DPPH dengan variasi jenis pelarut dapat dilihat pada Tabel 4.2.2.

**Tabel 4.2.2** Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam dengan Variasi Jenis Pelarut

Jenis Pelarut	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (% radikal per mg bahan db)
As.sitrat 3 % dalam aquades (pH 2,29)	7,73 ± 0,06 <sup>a</sup>
HCl 1 % dalam aquades (pH 1,44)	17,16 ± 0,13 <sup>c</sup>
As.sitrat 3 % dalam etanol 70 % (pH 1,93)	14,39 ± 0,12 <sup>b</sup>
HCl 1 % dalam etanol 70 % (pH 1,37)	44,34 ± 0,25 <sup>d</sup>

Ket. : *Superscript* yang berbeda menunjukkan beda nyata pada taraf  $\alpha$  0,05.

Tabel 4.2.2 menunjukkan hasil yang sejalan dengan kadar total antosianin dan kadar total fenol bahwa aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak kulit kacang gude hitam dari yang terbesar berturut-turut ialah sampel dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % sebesar 44,34 % radikal per mg bahan db, sampel dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan HCl 1 % sebesar 17,16 % radikal per mg bahan db, sampel dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan asam sitrat 3 % sebesar 14,39 % radikal per mg bahan db, dan aktivitas terkecil ialah sampel dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 3 % sebesar 7,73 % radikal per mg bahan db. Sejalan dengan penelitian Mardawati *et. al.* (2008) yang melaporkan bahwa sampel ekstrak pigmen kulit buah manggis yang semakin banyak terekstrak, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga berdampak juga pada tingkat penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh zat antioksidan tersebut. Hal itu diperkuat dengan penelitian Mustafa *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak 21 tanaman tropis pilihan yang dihasilkan maka semakin tinggi aktivitas penangkapan radikal DPPH.

Lapornik *et al.* (2005) menyatakan bahwa ekstraksi antosianin pigmen kulit buah *redcurantt* dan *blackcurrant* dengan pelarut air menghasilkan aktivitas antioksidan (DPPH) yang lebih kecil dibanding dengan ekstraksi menggunakan metanol dan etanol, aktivitas antiradikal tertinggi menggunakan etanol 70 %. Meskipun faktanya pelarut aquades lebih polar daripada pelarut etanol, tetapi hal ini membuktikan bahwa pelarut etanol lebih efisien dalam mendegradasi dinding sel yang memiliki karakter nonpolar dan menyebabkan pigmen antosianin dan senyawa polifenol lainnya mudah dikeluarkan

dari dalam vakuola (Indeks Merck, 2001 dalam Lapornik *et al.*, 2005).

Dari Tabel 4.2.2 dapat diketahui bahwa teknik ekstraksi dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH paling besar yaitu sebesar 44,34 % radikal per mg bahan db, sedangkan yang paling kecil yakni sampel yang diekstrak dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 3 % yaitu sebesar 7,73 % radikal per mg bahan db. Hal ini menunjukkan bahwa pengasam HCl 1 % dalam pelarut yang memiliki kepolaran yang sama lebih efektif mengekstrak pigmen kulit kacang gude hitam dan diketahui memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut yang diasamkan dengan asam sitrat 3 %. Hal itu dikarenakan nilai pH pada pelarut dengan pengasam HCl 1 % lebih rendah daripada pelarut dengan pengasam asam sitrat 3 %. Kikugawa *et al.* (1990) dan Chen *et al.* (1996) dalam Tensiska (2003) menyatakan bahwa pada pH rendah densitas ion hidrogen dalam medium meningkat sehingga menekan pelepasan ion hidrogen dari senyawa fenolik yang akan menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan kemudian menstabilkannya. Antioksidan dari kelompok senyawa fenolik berfungsi sebagai donor hidrogen yang menstabilkan senyawa radikal (Shahidi dan Naczk, 1995 dalam Tensiska *et al.*, 2003).

#### **B. Stabilitas Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam terhadap Perlakuan pH dan Suhu Pasteurisasi Ditinjau dari Kadar Total Antosianin dan Kualitas Warna**

Dalam penelitian ini ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam yang ditentukan stabilitasnya adalah ekstrak yang memiliki kadar total antosianin 2 terbaik (Tabel 4.1), yaitu sampel yang diekstrak dengan pelarut

aquades dan etanol 70 % yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 %. Dari kedua sampel tersebut ditentukan stabilitasnya terhadap perlakuan pH (4, 5, dan 7) dan terhadap perlakuan suhu pasteurisasi (70 °C dan 90 °C), ditinjau dari kadar total antosianin dan kualitas warna.

Perlakuan pH 4, 5, dan 7 digunakan untuk menggambarkan pH suatu bahan pangan dimana pH 4 untuk produk berasam tinggi seperti olahan buah-buahan, yoghurt, vinegar dan asinan, pH 5 untuk produk pangan berasam rendah seperti produk olahan sayuran, daging, dan susu, sedangkan pH 7 untuk produk pangan dengan pH netral seperti minuman ringan (Aprilandini, 2010). Adapun perlakuan suhu pasteurisasi (70 °C dan 90 °C) untuk mengetahui sejauh mana ketahanan ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan pemanasan. Hal tersebut mengingat ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam ini akan diaplikasikan sebagai alternatif pewarna alami dalam pengolahan pangan yang menuntut kestabilan pada berbagai perlakuan termasuk diantaranya terhadap pH dan suhu.

### **B.1. Kadar Total Antosianin**

Stabilitas antosianin dipengaruhi oleh pH, radiasi sinar, logam, reduktor oksidator, dan suhu (Hartati, 2007). Kestabilan ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan pH ditinjau dari kadar total antosianinnya tersaji dalam Tabel 4.3.1.1.

Dari Tabel 4.3.1.1 dapat diketahui bahwa stabilitas antosianin dipengaruhi oleh perlakuan pH dimana semakin tinggi pH maka stabilitasnya semakin menurun. Hal itu dapat dilihat dari persentase penurunan kadar total antosianin yang semakin meningkat seiring perlakuan pH yang semakin tinggi. Pada sampel yang diekstrak dengan pelarut aquades yang diasamkan dengan HCl 1 % persentase penurunan dari yang terkecil berturut-turut adalah sebesar 50,75 % pada perlakuan pH 4, kemudian pH 5 sebesar 58,21%, dan paling besar pada perlakuan pH 7 sebesar 64,18 %. Pada pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % persentase penurunan terkecil terjadi pada perlakuan



pH 4 yaitu sebesar 43,08 %, kemudian pH 5 sebesar 46,92 % dan yang paling besar penurunannya pada perlakuan pH 7 sebesar 51,54 %.

**Tabel 4.3.1.1** Kadar Total Antosianin Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan pH

Jenis Pelarut	Perlakuan	Kadar Total Antosianin (mg/ 100 gr db)	% Penurunan
HCl 1 % dalam aquades	Tanpa perlakuan (pH 1,75)	0,67 ± 0,01 <sup>c</sup>	–
	pH 4	0,33 ± 0,02 <sup>b</sup>	50,75
	pH 5	0,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	58,21
	pH 7	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	64,18
	Tanpa perlakuan (pH 1,46)	1,30 ± 0,01 <sup>c</sup>	–
HCl 1 % dalam etanol 70 %	pH 4	0,74 ± 0,01 <sup>b</sup>	43,08
	pH 5	0,69 ± 0,02 <sup>ab</sup>	46,92
	pH 7	0,63 ± 0,03 <sup>a</sup>	51,54

Keterangan : *Superscript* yang berbeda menunjukkan beda nyata pada taraf  $\alpha$  0,05.

Menurut Abbas (2003) yang melakukan penelitian terhadap stabilitas pigmen antosianin bunga Kana (*Canna coccinea* Mill.) melaporkan bahwa akibat perlakuan pH 3 pigmen antosianinnya masih stabil, sedangkan pada media pH 4 dan pH 5 telah mengalami kerusakan pigmen (tidak stabil). Artinya semakin tinggi pH yang diberikan semakin tidak stabil kadar antosianinnya atau semakin tinggi kerusakan pigmennya.

Dengan perlakuan pH yang sama, pelarut etanol 70 % lebih mampu menjaga kestabilan ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam yang dibuktikan dengan persentase penurunan kadar total antosianin yang lebih kecil dibandingkan sampel yang diekstrak dengan pelarut aquades yang sama-sama diasamkan dengan HCl 1 %. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut etanol 70 % lebih mampu mempertahankan stabilitas ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam dari degradasi antosianin karena perlakuan pH yang semakin meningkat. Hal ini diduga karena pH ekstrak pigmen antosianin dalam masing-masing sistem uji dengan pelarut aquades lebih tinggi dibandingkan

pada pelarut etanol 70 % sehingga menyebabkan semakin tidak stabil kadar antosianinnya. Antosianin bersifat stabil pada kondisi (pH) yang lebih asam yaitu pada kisaran pH 1-4 atau dengan menggunakan pelarut asam (Shi *et al.*, 1994 dalam Saati *et al.*, 2009).

Satyatama (2008) melaporkan bahwa perlakuan suhu mempengaruhi kestabilan antosianin. Semakin tinggi suhu pemanasan akan semakin mempercepat penurunan kadar antosianinnya. Kestabilan ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan suhu pasteurisasi ditinjau dari kadar total antosianinnya tersaji dalam Tabel 4.3.1.2.

**Tabel 4.3.1.2** Kadar Total Antosianin Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan Suhu Pasteurisasi

Jenis Pelarut	Perlakuan	Kadar Total Antosianin (mg/ 100 gr db)	% Penurunan
HCl 1 % dalam aquades	Tanpa Perlakuan (T 28 ± 2 °C, pH 1,75)	0,67 ± 0,01 <sup>c</sup>	–
	Suhu 70 °C (pH 1,75)	0,60 ± 0,00 <sup>b</sup>	10,45
	Suhu 90 °C (pH 1,75)	0,48 ± 0,00 <sup>a</sup>	28,36
HCl 1 % dalam etanol 70 %	Tanpa Perlakuan (T 28 ± 2 °C, pH 1,46)	1,30 ± 0,01 <sup>c</sup>	–
	Suhu 70 °C (pH 1,46)	1,12 ± 0,01 <sup>b</sup>	13,85
	Suhu 90 °C (pH 1,46)	0,78 ± 0,03 <sup>a</sup>	40,00

Keterangan : *Superscript* yang berbeda menunjukkan beda nyata pada taraf  $\alpha$  0,05.

Abbas (2003) melakukan pengujian terhadap stabilitas pigmen antosianin bunga Kana (*Canna coccinea* Mill.), melaporkan bahwa akibat suhu pemanasan 40 °C dan 100 °C menyebabkan pigmen antosianin semakin berkurang jumlahnya. Pada suhu 40 °C selama 30 menit sebesar 17,4 % dan pada suhu 100 °C berkurang sebesar 95,5 %. Pendapat itu diperkuat dengan penelitian Wijaya (2001) yang melaporkan bahwa pemanasan pada suhu 70 °C selama 60 menit menyebabkan penurunan absorbansi maksimal ekstrak antosianin kulit

buah rambutan dari 0,95 menjadi 0,73. Markakis dan Palamidis (1975) yang melakukan ekstraksi pigmen antosianin dengan pelarut aquades pada buah anggur yang dibuat minuman berkarbonasi menyebutkan bahwa perlakuan suhu rendah (3,5 °C) menyebabkan pigmen antosianin lebih stabil dibandingkan dengan perlakuan suhu yang lebih tinggi (38 °C). Selain itu, perlakuan suhu tinggi juga mempercepat degradasi pigmen antosianin.

Berdasarkan Tabel 4.3.1.2 dapat diketahui bahwa terjadi penurunan kadar total antosianin pada sampel ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam dengan perlakuan suhu pasteurisasi dibandingkan sampel ekstrak sebelum diberikan perlakuan suhu pasteurisasi. Jika dilihat persentase penurunan kadar total antosianin terkecil yaitu sampel ekstrak dengan perlakuan suhu 70 °C sebesar 10,45 % pada pelarut aquades yang diasamkan dengan HCl 1 %. Perlakuan suhu yang semakin meningkat pada kedua jenis pelarut menyebabkan tingkat degradasi antosianin yang semakin tinggi. Pada perlakuan suhu 70 °C dan 90 °C, sampel ekstrak dengan pelarut etanol 70 % mengalami kerusakan pigmen antosianin yang lebih besar dibandingkan pada pelarut aquades. Hal ini menunjukkan bahwa pada perlakuan suhu pasteurisasi pelarut aquades lebih mampu menjaga kestabilan kadar total antosianin dibandingkan pelarut etanol 70 %. Hal itu diduga terkait dengan titik didih etanol yang lebih rendah dari air (aquades) yaitu 79 °C, sehingga saat dipanaskan sampai suhu 90 °C pigmen antosianin dalam sampel dengan pelarut etanol 70 % lebih banyak terdegradasi. Hal ini sejalan dengan penelitian Samsudin *et al.* (2009) yang mengekstrak pigmen antosianin kulit buah manggis dengan pelarut aquades dimana suhu 70 °C – 90 °C adalah kondisi paling baik untuk melarutkan pigmen antosianin.

## B.2. Kualitas Warna

Dalam penelitian ini, untuk mengetahui kestabilan ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap berbagai perlakuan pH dan suhu pasteurisasi ditinjau dari kualitas warnanya, dilakukan pengukuran L \*a \*b menggunakan alat *Colorimeter CR-400*. Notasi L menyatakan parameter kecerahan (*Lightness*) dimana mempunyai nilai 0–100 (hitam–putih). Notasi a (positif) menyatakan warna kromatik campuran merah–hijau dengan nilai 0–100 untuk warna merah dan nilai a (negatif) dari 0 sampai -80 untuk warna hijau. Sedangkan notasi b menyatakan warna kromatik campuran biru–kuning dengan nilai 0 sampai +70 untuk warna kuning dan nilai b (negatif) dari 0 sampai -70 untuk warna biru.

Markakis (1982) menyatakan bahwa pH akan mempengaruhi stabilitas antosianin dan juga warna dari antosianin tersebut. Dengan meningkatnya nilai pH menunjukkan adanya pengurangan kualitas warna merah dan perubahan warna pada pigmen antosianin (Satyatama, 2008). Data pengukuran L \*a \*b ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam dengan berbagai perlakuan pH dan suhu pasteurisasi tersaji dalam Tabel 4.3.2.1 dan Tabel 4.3.2.2.

**Tabel 4.3.2.1** Pengukuran Kualitas Warna Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan pH

Jenis Pelarut	Warna	Tanpa Perlakuan *	Perlakuan		
			pH 4	pH 5	pH 7
HCl 1 % dalam aquades	L	11,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,16 ± 0,11 <sup>b</sup>	12,89 ± 0,04 <sup>c</sup>	13,15 ± 0,06 <sup>d</sup>
	a	3,78 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,43 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,30 ± 0,09 <sup>a</sup>
	b	0,83 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,69 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,77 ± 0,05 <sup>bc</sup>
HCl 1 % dalam etanol 70 %	L	11,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,32 ± 0,04 <sup>b</sup>	12,63 ± 0,04 <sup>c</sup>	12,84 ± 0,02 <sup>d</sup>
	a	2,40 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,75 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,66 ± 0,04 <sup>ab</sup>	1,62 ± 0,04 <sup>a</sup>
	b	0,72 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,51 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,01 <sup>c</sup>

Keterangan : *Superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan beda nyata pada taraf  $\alpha$  0,05.

\* pH ekstrak dengan pelarut HCl 1 % dalam aquades adalah 1,75.

pH ekstrak dengan pelarut HCl 1 % dalam etanol 70 % adalah 1,46.

Berdasarkan Tabel 4.3.2.1 dapat dilihat bahwa nilai L (tingkat kecerahan/ *Lightness*) dipengaruhi oleh perlakuan pH, nilai L semakin naik seiring perlakuan pH yang semakin tinggi. Penelitian Saati *et al.* (2009) melaporkan bahwa nilai L ekstrak dengan pelarut etanol 70 % maupun dengan pelarut aquades pigmen kulit buah naga semakin meningkat seiring perlakuan pH yang semakin tinggi. Satyatama (2008) melaporkan bahwa peningkatan nilai L disebabkan oleh penurunan konsentrasi atau jumlah kation flavilium dan meningkatnya pembentukan kalkon yang tidak berwarna dengan semakin meningkatnya pH. Bolivar dan Luis (2004) yang juga diperkuat oleh Kjell dan Oyvind (2005) dalam Satyatama (2008) melaporkan bahwa dengan meningkatnya nilai pH menyebabkan peningkatan nilai L dari pigmen antosianin *red sweet potato* dan *purple corn*, serta nilai L sianidin-3-glukosa pada buffer pH 1.1 sampai 10.5 meningkat seiring dengan meningkatnya nilai pH.

Peningkatan pH berpengaruh terhadap kestabilan nilai a (*Redness*) pada pelarut aquades dan etanol 70 % yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 %. Namun jika dibandingkan, pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % lebih mampu menjaga kestabilan nilai a daripada pelarut aquades. Hal itu terbukti dengan persentase penurunan nilai a pada pelarut etanol 70 % lebih kecil daripada pelarut aquades yang sama-sama diasamkan dengan HCl 1 %. Hasil ini sejalan dengan kestabilan antosianin ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan pH dimana persentase penurunan kadar antosianin ekstrak dengan pelarut etanol 70 % juga lebih kecil dibandingkan pelarut aquades (Tabel 4.3.1.1).

Satyatama (2008) melaporkan bahwa warna merah larutan antosianin kulit buah duwet semakin berkurang dengan meningkatnya pH. Penurunan nilai derajat kemerahan (nilai a) disebabkan karena terjadinya reaksi transformasi struktural kation flavilium menjadi kalkon, dan semakin tinggi nilai pH akan menstimulasi hidrasi lanjutan



membentuk senyawa pseudobasa dalam bentuk keto, anhidro basa hingga anhidrobasa terionisasi (Markakis, 1982). Hal ini juga diperkuat oleh penelitian Bolivar dan Luis (2004) dalam Satyatama (2008) yang melaporkan bahwa dengan meningkatnya nilai pH menyebabkan penurunan derajat kemerahan (nilai a) dari pigmen antosianin *red sweet potato* dan *purple corn*.

Pada pH rendah warna antosianin ditentukan oleh substitusi pada struktur cincin B flavonoid. Pada kondisi asam struktur antosianin yang semula quinonoidal basa (A) dengan cepat bertransformasi menjadi bentuk kation flavilium ( $AH^+$ ), dimana pada struktur bentuk ini akan menimbulkan warna kemerahan, dan kationnya cenderung reaktif dan mudah terdegradasi menuju bentuk karbinol pseudobasa (B) dan akhirnya menjadi kalkon yang tidak berwarna (C) (Jackman dan Smith dalam Hendry dan Houghton, 1992 dalam Tensiska, 2007).

Pada penelitian ini perlakuan pH menunjukkan pengaruh terhadap nilai b (*Yellowness*) dimana semakin menurun seiring diberikannya perlakuan pH pada ekstrak dengan pelarut etanol 70 % dan aquades yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 %. Hal tersebut diduga terkait dengan nilai L yang semakin naik akibat pembentukan kalkon yang tidak berwarna dengan semakin meningkatnya pH menyebabkan intensitas warna kuning pigmen antosianin semakin berkurang.

Perlakuan suhu dapat mempengaruhi stabilitas antosianin. Satyatama (2008) menyatakan bahwa peningkatan waktu dan suhu pemanasan dapat menstimulasi akumulasi senyawa hasil degradasi antosianin seperti kalkon dan turunannya yang tidak berwarna. Suhu pemanasan berpengaruh nyata terhadap peningkatan degradasi antosianin. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan pengukuran  $L^*a^*b$  untuk mengetahui kestabilan warna ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam terhadap perlakuan suhu, datanya dapat dilihat pada Tabel 4.3.2.2.

*commit to user*

**Tabel 4.3.2.2** Pengukuran Kualitas Warna Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam pada Berbagai Perlakuan Suhu Pasteurisasi

Jenis Pelarut	Warna	Tanpa Perlakuan *	Perlakuan Suhu	
			70 °C	90 °C
HCl 1 % dalam aquades	L	11,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	11,84 ± 0,04 <sup>b</sup>	11,65 ± 0,05 <sup>a</sup>
	a	3,78 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,24 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,04 <sup>a</sup>
	b	0,83 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,72 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>a</sup>
HCl 1 % dalam etanol 70 %	L	11,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,84 ± 0,02 <sup>b</sup>	12,46 ± 0,01 <sup>c</sup>
	a	2,40 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,34 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,05 ± 0,02 <sup>a</sup>
	b	0,72 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,03 <sup>a</sup>

Keterangan : *Superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan beda nyata pada taraf  $\alpha$  0,05.

\*Suhu ruang (28 ± 2) °C

Berdasarkan Tabel 4.3.2.2 dapat dilihat bahwa tingkat kecerahan (nilai L) pigmen antosianin semakin naik seiring diberikannya perlakuan suhu yang semakin meningkat pada pelarut aquades maupun pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 %. Artinya perlakuan suhu pasteurisasi memberikan dampak yang signifikan terhadap tingkat kecerahan ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam. Namun, peningkatan nilai L pada suhu 90 °C tidak sebesar pada suhu 70 °C. Hal itu diduga terjadi karena pada suhu 70 °C antosianin masih dalam bentuk kalkon yang tidak berwarna, sedangkan pada suhu 90 °C sudah terbentuk alfa diketon yang berwarna coklat sehingga menurunkan tingkat kecerahan. Suhu yang tinggi menyebabkan dekomposisi antosianin dari bentuk aglikon menjadi kalkon (tidak berwarna) dan akhirnya membentuk alfa diketon yang berwarna coklat (Markakis, 1982).

Nilai a (*Redness*) semakin menurun seiring diberikannya perlakuan suhu yang semakin tinggi pada pelarut etanol 70 % maupun aquades yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 %, meskipun persentase penurunannya lebih kecil pada pelarut aquades. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut aquades lebih dapat menjaga kestabilan nilai a ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam dengan perlakuan suhu

pasteurisasi. Sejalan dengan hasil kadar total antosianin (Tabel 4.3.1.2) yang menunjukkan bahwa pelarut aquades lebih mampu menjaga kestabilan kadar total antosianin dibandingkan pelarut etanol 70 %. Diduga hal tersebut terkait dengan titik didih etanol yang lebih rendah dari air (aquades) yaitu 79 °C, sehingga saat dipanaskan sampai suhu 90 °C sampel ekstrak dengan pelarut etanol 70 % telah rusak pigmen warnanya. Sejalan dengan penelitian Cacace dan Mazza (2003) dalam Turker dan Erdogdu (2005) yang melakukan ekstraksi antosianin dari *blackcurrant* dengan pelarut etanol dimana penggunaan suhu tinggi mempengaruhi degradasi pigmen antosianin. Dyrby *et al.* (2001) dalam Luiz *et al.* (2007) yang mengevaluasi stabilitas termal antosianin dari kulit anggur vinifera (*Vitis L.*) pada suhu yang berkisar antara 25 °C – 80 °C, dimana terjadi peningkatan yang signifikan degradasi warna antosianin sehubungan dengan peningkatan suhu.

Pemanasan sangat berpengaruh pada stabilitas warna pigmen antosianin dan dapat menyebabkan menjadi pucat. Mar'atusshalihah (2007) dalam penelitiannya menguji stabilitas pigmen antosianin bunga Kana (*Canna coccinea Mill*) Merah Muda melaporkan bahwa perlakuan pasteurisasi menunjukkan tingkat penurunan absorbansi dan kualitas warna (nilai a). Hal itu diperkuat dengan hasil penelitian Rohmawati (2007) yang juga melakukan pengujian stabilitas pigmen antosianin bunga Kana (*Canna coccinea Mill*) Merah Muda melaporkan bahwa pigmen antosianin bunga kana merah dengan perlakuan pemanasan suhu 50 °C selama 60 menit menunjukkan tingkat penurunan absorbansi dan kualitas warna (nilai a) sebesar 13,2 %. Temperatur tinggi dan kontak yang terlalu lama mempengaruhi formasi kalkon dimana dapat meningkatkan degradasi antara cincin B dan C dan mengakibatkan rusaknya kromofor antosianin (Strack dan Wray, 1993; Clifford, 2000 dalam McDougall *et al.* 2007).

Pada penelitian ini perlakuan suhu memberikan pengaruh terhadap nilai b (*commit to user* *Yellowness*) yang semakin menurun seiring

peningkatan suhu yang diberikan pada ekstrak dengan pelarut etanol 70 % maupun aquades yang masing-masing diasamkan dengan HCl 1 %. Hal itu diduga terkait dengan semakin meningkatnya nilai L seiring peningkatan suhu yang diberikan mengakibatkan semakin turunnya intensitas warna kuning pigmen antosianin.

### C. Korelasi antara Kadar Total Antosianin dengan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Kulit Kacang Gude Hitam yang Dihasilkan

Kontribusi antosianin sebagai antioksidan telah banyak diteliti. Salah satunya adalah penelitian Tsai, *et al.* (2001) yang melaporkan bahwa sumber kapasitas antioksidan dalam ekstrak kelopak rosella adalah antosianin.

**Tabel 4.4** Nilai Korelasi Pearson antara Kadar Total Antosianin dan Kadar Total Fenol dengan Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam

Parameter	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH
Kadar Total Antosianin	0,995
Kadar Total Fenol	0,932

Signifikan pada  $p < 0,01$

Aktivitas penangkapan radikal DPPH lebih dipengaruhi oleh kadar total antosianin dibandingkan kadar total fenol yang terkandung dalam ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam. Nilai korelasi pearson antara aktivitas penangkapan radikal DPPH dengan kadar total antosianin sebesar 0,995 lebih tinggi dibandingkan kadar total fenol yang mempunyai nilai korelasi 0,932.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstraksi pigmen antosianin kulit kacang gude hitam dengan pelarut etanol 70 % yang diasamkan dengan HCl 1 % merupakan teknik ekstraksi paling baik ditinjau dari kadar total antosianin, kadar total fenol dan aktivitas penangkapan radikal DPPH.
2. Stabilitas antosianin dipengaruhi oleh perlakuan pH dan suhu dimana seiring dengan peningkatan pH dan suhu yang diberikan menyebabkan kestabilan warna semakin menurun dan degradasi antosianin semakin tinggi.
3. Aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam memiliki nilai korelasi yang lebih tinggi terhadap kadar total antosianin dibandingkan dengan kadar total fenol.

### B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengaplikasikan ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam ini sebagai pewarna alami yang berpotensi sebagai antioksidan dalam pengolahan pangan serta diperlukan studi *in vivo* terkait fungsionalnya bagi kesehatan.