



**OPTIMASI EKSTRAKSI ANTOSIANIN DARI ROSELA MERAH (*Hibiscus
sabdariffa* L) METODE VACUUM MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION
(VMAE) DENGAN KAJIAN KONSENTRASI ASAM SITRAT DAN LAMA
WAKTU EKSTRAKSI**

SKRIPSI

Oleh:
JOVITA SERAPHINE SIRAIT
NIM. 155100107111005



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**



DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
RIWAYAT HIDUP.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR.....	Error! Bookmark not defined.
RINGKASAN.....	Error! Bookmark not defined.
SUMMARY.....	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR TABEL.....	Error! Bookmark not defined.
I. PENDAHULUAN.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Perumusan Masalah.....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan.....	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
1.5 Hipotesa.....	Error! Bookmark not defined.
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Rosela.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Morfologi Rosela.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Karakteristik Rosela.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.1 Struktur Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.2 Stabilitas Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Ekstraksi Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Metode Ekstraksi <i>Vacuum Microwave Assisted Extraction (VMAE)</i>	Error! Bookmark not defined.
2.5. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekstraksi Metode VMAE.....	Error! Bookmark not defined.
2.6 Bahan Pengekstrak.....	Error! Bookmark not defined.
2.6.1 Etanol.....	Error! Bookmark not defined.
2.6.2 Asam Sitrat.....	Error! Bookmark not defined.
2.7 <i>Respon Surface Methodology (RSM)</i>	Error! Bookmark not defined.
III. METODE PENELITIAN.....	Error! Bookmark not defined.
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Alat dan Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1 Alat.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.2 Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
3.3 Metode Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.



3.4 Pelaksanaan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
3.4.1 Penelitian Pendahuluan.....	Error! Bookmark not defined.
3.4.2 Penelitian Utama.....	Error! Bookmark not defined.
3.5 Pengamatan dan Analisis data.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.1 Pengamatan.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.2 Analisis Data.....	Error! Bookmark not defined.
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1 Karakteristik Bahan Baku.....	Error! Bookmark not defined.
4.2 Optimasi Proses Ekstraksi Antosianin dari Bunga Rosela	Error! Bookmark not defined.
4.3 Rendemen Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.1 Pemilihan Model Respon Rendemen Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.2 Pengaruh Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat Terhadap Respon Rendemen.....	Error! Bookmark not defined.
4.4 Tingkat Kecerahan Antosianin (L).....	Error! Bookmark not defined.
4.4.1 Pemilihan Model Respon Tingkat Kecerahan Antosianin (L).	Error! Bookmark not defined.
4.4.2 Pengaruh Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat Terhadap Respon Tingkat Kecerahan.....	Error! Bookmark not defined.
4.5 Total Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.1 Pemilihan Model Respon Total Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.2 Pengaruh Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat Terhadap Respon Total Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
4.6 Solusi Optimasi Respon Rendemen, Tingkat Kecerahan (L), dan Total Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
4.7 Verifikasi Data Hasil Optimasi.....	Error! Bookmark not defined.
4.8 Karakterisasi Antosianin.....	Error! Bookmark not defined.
V. PENUTUP.....	Error! Bookmark not defined.
5.1 Kesimpulan.....	Error! Bookmark not defined.
5.2 Saran.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.
LAMPIRAN.....	Error! Bookmark not defined.

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produk makanan yang memiliki warna menarik akan menimbulkan daya tarik tersendiri bagi konsumen, sehingga dilakukan penambahan warna makanan dengan menggunakan pewarna makanan. Pemakaian pewarna pada makanan sering disalahgunakan oleh produsen dengan menggunakan pewarna yang bukan untuk pangan, dikarenakan pewarna alami memiliki harga yang relatif mahal sehingga dapat meningkatkan biaya produksi. Pemakaian warna sintesis yang bersifat *food grade* pun seharusnya dihindari karena dapat memiliki efek samping bagi konsumen seperti ruam merah atau gatal pada kulit, gangguan jantung, sesak nafas, serta memiliki sifat karsinogenik (Mardiah, 2010). Oleh karena itu, sumber-sumber pewarna alami harus lebih dimanfaatkan agar dihasilkan pewarna alami yang baik untuk kesehatan. Salah satu sumber pewarna alami adalah bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn).

Bunga rosela mengandung pigmen merah yaitu antosianin. Selain dapat dijadikan pewarna alami, antosianin dapat memberikan efek kesehatan karena merupakan sumber antioksidan yang dapat melindungi tubuh dengan menangkal radikal bebas. Menurut Tsai (2002), bunga rosela memiliki kadar antosianin yang tinggi sebesar 51% dan 24% antioksidan lainnya. Antosianin bersifat mudah larut dalam air, atau bersifat polar.

Senyawa antosianin diperoleh dengan melakukan proses ekstraksi terlebih dahulu. Proses ekstraksi antosianin biasa dilakukan dengan metode konvensional, seperti maserasi, soxhletasi, dan refluks. Metode ekstraksi konvensional membutuhkan waktu yang lama, sehingga penggunaan metode ekstraksi konvensional ini kurang efisien (Widyasanti, dkk., 2008). Salah satu metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah *Microwave Assisted Extraction* (MAE). Metode ekstraksi dengan gelombang mikro lebih efisien dalam mengekstrak senyawa-senyawa fenolik pada bunga rosela dibandingkan dengan ekstraksi metode konvensional (Purbowati, 2016). Ekstraksi dengan MAE memanfaatkan energi yang dihasilkan dari gelombang mikro, sehingga penggunaan lebih luas karena dapat mengekstrak senyawa yang labil terhadap panas. Pada penelitian ini proses ekstraksi antosianin dari bunga rosela dilakukan dengan menggunakan MAE modifikasi yaitu *Vacuum Microwave Assisted Extraction* (VMAE). Pada penggunaan VMAE terdapat pompa *vacuum* yang berfungsi untuk menghisap udara di ruang oven sehingga tekanan menjadi



lebih rendah. Pada penggunaan VMAE, titik didih pelarut lebih rendah sehingga pelarut dapat mendidih pada temperatur yang lebih rendah dan dapat meminimalisir risiko degradasi senyawa aktif sehingga baik digunakan untuk senyawa thermolabil seperti antosianin. Suhu didih yang rendah dapat diperoleh dengan menggunakan tekanan yang rendah. Selain itu titik didih pelarut lebih rendah sehingga dapat meminimalisir risiko degradasi senyawa aktif sehingga baik digunakan untuk senyawa thermolabil seperti antosianin (Kamaluddin, 2014). Keunggulan lain dari VMAE adalah penggunaan pelarut lebih rendah, waktu ekstraksi lebih singkat, kualitas produk lebih baik, dan selektivitas pada molekul target lebih tinggi (Li Hua *et al.*, 2009).

Proses ekstraksi dengan MAE dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah jenis pelarut. Penggunaan pelarut yang tepat dapat memaksimalkan ekstraksi antosianin. Proses ekstraksi antosianin lebih optimal digunakan pelarut polar yang memiliki jenis polar sama seperti antosianin, seperti etanol, air, dan etil asetat (Mardiah, 2010). Pada penelitian Siregar dan Nurlala (2011) pelarut etanol 96% merupakan pelarut terbaik dalam ekstraksi antosianin karena memiliki kepolaran hampir sama dengan antosianin. Etanol merupakan pelarut organik yang biasa digunakan untuk mengekstraksi pewarna alami dari berbagai macam tumbuhan (Basito, 2011). Selama proses ekstraksi kestabilan antosianin perlu diperhatikan agar tidak terjadi degradasi antosianin. Penambahan suasana asam saat ekstraksi antosianin dilakukan untuk menjaga kestabilan antosianin karena pada pH asam mendekati satu antosianin akan berada pada bentuk dominan kation flavillium. Pada bentuk ini, antosianin sangat berwarna dan memiliki kondisi paling stabil. Selain itu penambahan asam dalam proses ekstraksi dapat melarutkan pigmen lebih banyak, karena asam mendenaturasi membran sel dan pigmen akan keluar dari sel. Salah satu jenis asam yang dapat ditambahkan pada ekstraksi antosianin adalah asam sitrat. Pada penelitian Setyaningrum (2010) ekstraksi pigmen antosianin kulit manggis dengan pelarut aseton 60% yang ditambahkan asam sitrat memiliki kadar antosianin sebesar 0,11 mg/100 gr dan intensitas warna merah sebesar 35,67, sedangkan pada etanol 60% yang ditambahkan asam asetat didapatkan kadar antosianin sebesar 0,08 mg/100 gram dan intensitas warna merah sebesar 18,64. Pada penelitian Putri (2015), kadar antosianin tertinggi sebesar 4627,46 ppm didapat dengan menggunakan pelarut aquades yang diasamkan dengan asam sitrat 2% dengan rasio bahan:pelarut 1:20 (b/v).



Ekstraksi antosianin dengan metode MAE telah dilakukan dalam penelitian sebelumnya, namun lebih mengkaji daya gelombang, dan konsentrasi etanol, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap faktor lain yang berpengaruh seperti lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat. Pemilihan penambahan konsentrasi asam dan waktu ekstraksi perlu ditelaah lebih lanjut sehingga didapatkan kandungan antosianin yang tinggi. Oleh karena itu berdasarkan latar belakang diatas, diperlukan penelitian berkaitan dengan optimasi ekstraksi antosianin pada rosela menggunakan VMAE dengan kajian waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka didapatkan perumusan masalah pada penelitian ini, yaitu:

1.2.1 Bagaimana pengaruh waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat terhadap karakteristik fisik dan kimia ekstrak antosianin rosela yang dihasilkan dengan metode VMAE?

1.2.2 Bagaimana kondisi optimal lama waktu dan konsentrasi asam sitrat yang sesuai pada ekstraksi antosianin dari rosela dengan metode VMAE untuk menghasilkan rendemen, kadar antosianin, dan tingkat kecerahan antosianin yang terbaik?

1.3 Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu:

1.3.1 Mengetahui pengaruh waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat terhadap karakteristik antosianin rosela menggunakan metode ekstraksi VMAE

1.3.2 Mengetahui kondisi optimal waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat untuk mendapatkan rendemen, kadar antosianin yang tinggi, dan tingkat kecerahan antosianin yang terbaik

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu:

1.4.1 Informasi mengenai pemanfaatan rosela sebagai sumber antosianin



1.4.2 Informasi mengenai optimasi lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat terbaik pada ekstraksi antosianin rosela dengan metode VMAE untuk mendapatkan rendemen, kadar antosianin yang tinggi, dan tingkat kecerahan antosianin yang terbaik

1.5 Hipotesa

Hipotesa penelitian ini yaitu:

1.5.1 Diduga lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat berpengaruh pada proses ekstraksi antosianin rosela metode VMAE menghasilkan rendemen, kadar antosianin, dan tingkat kecerahan antosianin terbaik



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rosela

2.1.1 Morfologi Rosela

Rosela dengan nama ilmiah *Hibiscus sabdariffa* Linn merupakan tanaman sejenis bunga sepatu (*Hibiscus rocasinensis*) yang pada dahulu kala hanya dijadikan tanaman hias bagi masyarakat. Namun seiring berjalannya waktu, kesadaran manusia untuk mengkonsumsi makanan sehat semakin meningkat, dan telah banyak dilakukan penelitian mengenai kandungan rosela sehingga saat ini rosela merupakan tanaman berkhasiat. Rosela mempunyai dua tipe utama yaitu *Hibiscus sabdariffa* var. *altissima* Webster dan *Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*. Perbedaan varietas *altissima* Webster dan varietas *sabdariffa* adalah pada varietas *altissima* Webster memiliki kandungan tinggi serat sehingga biasa dimanfaatkan sebagai serat pada pembuatan pulp. Varietas ini memiliki kelopak berwarna kuning sedangkan varietas *sabdariffa* memiliki kelopak berwarna merah cerah. Varietas *sabdariffa* biasa dimanfaatkan bunganya sebagai pewarna alami, dan bahan tambahan pada makanan atau minuman (Sari, 2011).

Rosela memiliki ketinggian 0,5 – 3 meter, dengan batang bulat, berwarna merah, tegak, dan berkayu. Rosela memiliki daun tunggal berbentuk bulat menyerupai telur, dengan tepi bergerigi, pertulangan menjari, dan pangkal berlekuk. Panjang daun rosela 6 – 15 cm dengan lebar 5 – 8 cm. Setiap tangkai rosela hanya terdapat satu bunga, sehingga rosela merupakan bunga tunggal. Terdapat 8 – 11 helai kelopak pada satu bunga. Bagian kelopak inilah yang dimanfaatkan sebagai pewarna alami, atau bahan makanan dan minuman (Widyanto dan Nelistya, 2009).



Gambar 2.1 Tanaman Rosela (Maryani dan Kristiana, 2005)

Rosela dapat tumbuh dengan baik di daerah beriklim tropis maupun subtropis. Habitat asli tanaman ini di daerah yang terbentang dari India hingga Malaysia. Namun saat ini rosela telah tersebar luas di seluruh dunia, baik di daerah tropis maupun subtropis salah satunya di Indonesia. Kondisi penanaman rosela yang optimal dilakukan 900 m diatas permukaan laut dengan curah hujan yang cukup tinggi. Waktu yang diperlukan tanaman ini untuk tumbuh sekitar 4 hingga 8 bulan dengan temperatur minimum 20°C dan terpapar sinar matahari hingga 13 jam agar menghasilkan kualitas rosela yang baik. Berdasarkan kondisi diatas, Indonesia merupakan salah satu tempat yang memiliki kondisi baik untuk melakukan budidaya tanaman rosela (Da-Costa-Rocha, et al., 2014).

2.1.2 Karakteristik Rosela

Tanaman rosela memiliki banyak manfaat, mulai dari semak hingga kelopak bunganya. Semak rosela dapat digunakan untuk hiasan dekorasi, biji dan petal rosela dapat dikonsumsi oleh manusia. Namun secara umum tanaman rosela dibudidayakan untuk mendapatkan kelopak bunga yang dapat menghasilkan minuman untuk dikonsumsi seperti dijadikan menjadi teh (Aurelio et al., 2008). Selain dapat dikonsumsi menjadi minuman teh, kelopak bunga



rosela yang mengandung antosianin, dapat dimanfaatkan sebagai pewarna alami pada produk makanan seperti selai, *jelly*, dan minuman buah (Bridle and Timberlake, 1996). Pemanfaatan daun rosela yang dihaluskan dapat digunakan sebagai pembalut luka.

Kelopak bunga rosela memiliki rasa masam yang khas dan memberi efek menyegarkan saat dikonsumsi. Rasa masam disebabkan oleh komponen-komponen asam yang terlibat yaitu asam askorbat (vitamin C), vitamin A, asam malat, dan asam sitrat. Campuran asam malat dan asam sitrat yang terkandung sebesar 13%, dan vitamin C 260-289 mg dalam 100 gr (Paruntu dan Ranti, 2015). Kandungan vitamin dapat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit. Selain mengganggu vitamin, rosela mengandung mineral yang dibutuhkan oleh tubuh seperti kalsium, zat besi, phosphor, dan potassium. Karakteristik kimia rosela ditunjukkan pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Kandungan Gizi dalam 100 gram Kelopak Rosela

Zat	Kandungan Gizi
Air	86,2 g
Protein	1,6 g
Lemak	0,1 g
Serat	2,5 g
Karbohidrat	11,1 g
Abu	1,0 g
Kalsium	160 mg
Fosfor	60 mg
Zat Besi	3,8 mg
Betakaroten	285 mg
Vitamin C	214,8 mg
Tiamin	0,04 mg
Riboflavin	0,6 mg
Niasin	0,5 mg
Kalori	44 kal

Sumber: Maryani, (2008).

Rosela dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, antibakteri, antiseptik, antikanker, menurunkan asam urat, dan dapat menurunkan kolesterol. Antosianin pada rosela menjadi sumber antioksidan yang penting bagi kesehatan untuk menangkal radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel-sel tubuh yang sehat (Suzery, dkk., 2010). Hal ini disebabkan karena rosela memiliki kandungan bahan aktif seperti flavonoid, fenol, tannin, antioksidan, dan asam



sitrat. Flavonoid dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein, melalui ikatan hidrogen sehingga mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Tannin mampu menghambat mikroba untuk memproduksi enzim, berikatan dengan dinding sel, serta menghancurkan membran (Suwandi, 2012).

2.2 Antosianin

2.2.1 Struktur Antosianin

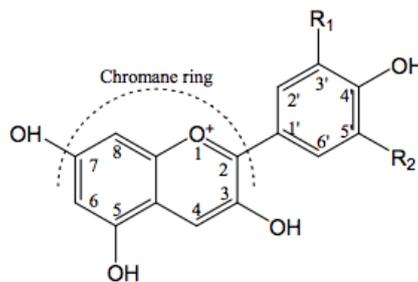
Antosianin adalah senyawa berwarna yang membentuk warna warna biru, ungu, dan merah pada sayur, buah, dan tanaman hias (Kidmose et al., 2002). Antosianin termasuk golongan flavonoid. Pigmen antosianin mempunyai sifat larut dengan air. Antosianin mempunyai struktur utama berupa dua cincin aromatik benzena (C_6H_6), dan dihubungkan dengan tiga atom karbon yang membentuk cincin (Jackman and Smith, 1992).

Antosianin merupakan pigmen berwarna merah. Penggunaan antosianin sebagai pewarna alami oleh industri digunakan untuk menggantikan penggunaan pewarna sintetik *carmoisine*, rhodamin B, dan *amaranth* sebagai pewarna merah pada produk pangan. Antosianin dapat digunakan sebagai pewarna alami pada kembang gula, *jelly*, kue, sirup, dan roti (Bridle and Timberlake, 1996). Selain sebagai pewarna alami, antosianin juga memiliki fungsi yang bermanfaat oleh tubuh seperti kandungan *cyanidin* yang terdapat di ubi jalar ungu jepang sebagai antimutagen (Yoshimoto et al., 1999).

Zat warna antosianin disusun oleh aglikon atau biasa disebut dengan antosianidin yang teresterifikasi dengan satu atau lebih gugus gula. Gugus gula pada antosianin bervariasi, namun gula monosakarida yang biasa ditemui adalah dalam bentuk glukosa, galaktosa, xilosa, ramnosa, dan arabinosa (Tranggono dkk, 1990). Dalam bentuk di- dan trisakarida yang biasa ditemui adalah soporosa, sambubiosa, rutinosa, dan glukorutinosa. Antosianin merupakan turunan dari kation flavium. Terdapat 17 senyawa antosianidin yang diketahui di alam, tetapi hanya enam yang berada dalam jumlah besar dalam tanaman, yaitu *pelargonidin* (pg), *penoidin* (pn), *cyanidin* (cy), *delphynidin* (dp), *maldivin* (mv), dan *petunidin* (pt) (Delgado-vargas and Paredes-lopez, 2000). Sedangkan antosianidin yang berada dalam jumlah kecil pada tanaman adalah *aurantinidin*, 8- *Hydroxycyanidin*, *triacetidin*, *luteolinidin*, *europenidin*, *rosinidin*, 5- *Methylcyanidin*, *capesinidin*, *pulchellidin*, *apigenidin*, dan *hirsutidin*.



Perbedaan struktur kimia pada keenam antosianidin yang berada dalam jumlah besar dalam tanaman dapat ditunjukkan dengan adanya perbedaan pada posisi 3' dan 5' (**Gambar 2.2**). Antosianin menjadi sangat berwarna pada kondisi asam karena kromopore panjang dari delapan ikatan ganda terkonjugasi membawa perubahan positif. Pada daerah tampak absorbansi maksimum antara 465 dan 550 nm, sementara yang lain jangkauan absorbansi di daerah UV diantara 270 dan 280 nm (Eder, 2000).



Name	Substitution		Visible color	Visible max. (nm) in MeOH-HCl
	R ₁	R ₂		
Cyanidin (Cy)	OH	H	} magenta	535
Peonidin (Pn)	OCH ₃	H		532
Pelargonidin (Pg)	H	H	red	520
Malvidin (Mv)	OCH ₃	OCH ₃	} purple	542
Delphinidin (Dp)	OH	OH		546
Petunidin (Pt)	OCH ₃	OH		543

Gambar 2.2 Struktur Dasar Antosianin (He, 2004)

Warna yang dihasilkan oleh antosianin dapat dipengaruhi oleh jumlah antara gugus hidroksil dan gugus metoksil. Apabila mengandung lebih banyak gugus hidroksil, maka warna akan cenderung ke tingkatan berwarna biru dan relatif tidak stabil. Sebaliknya, apabila mengandung gugus metoksil lebih banyak, maka warna akan cenderung ke tingkatan berwarna merah dan relatif stabil. Warna antosianin dapat berubah seiring dengan perubahan nilai pH. Nilai pH tinggi pada antosianin akan cenderung ke arah biru atau tidak berwarna, sedangkan pada pH rendah cenderung membentuk warna merah.



2.2.2 Stabilitas Antosianin

Pewarna alami seperti antosianin memiliki stabilitas yang dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, temperatur, cahaya, ion logam, enzim, pengaruh sulfur dioksida dan penyimpanan. Menurut James (1995), pH dan temperatur adalah faktor yang paling mempengaruhi intensitas warna antosianin.

Berikut adalah faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas antosianin:

a. pH

pH berpengaruh pada stabilitas antosianin. Antosianin akan lebih stabil pada kondisi asam dibanding pada kondisi basa, dimana kestabilan strukturnya dari rentang berwarna hingga tidak berwarna. Warna antosianin akan berubah seiring dengan perubahan pH. Terdapat empat spesies antosianin yaitu basa kuinonoidal (A), kation flavilium (AH^+), karbinol atau pseudobasa (B), dan kalkon (C).

Di dalam larutan asam dengan pH berkisar 1 hingga 3, antosianin akan berada pada bentuk dominan kation flavilium. Pada bentuk ini, antosianin sangat berwarna dan memiliki kondisi paling stabil. Saat terjadi kenaikan pH hingga menjadi pH 4 sampai 5 atau terjadi peningkatan pH, akan terjadi deprotonisasi atau hidrasi kation flavium (Farida, 2015). Pada peningkatan pH, kation flavium akan membentuk dua reaksi yang mungkin akan terjadi yaitu reaksi hidrasi pada kation flavium yang akan membentuk struktur karbinol tidak berwarna dan membentuk kesetimbangan dengan struktur kalkon, atau deprotonisasi yang menghasilkan struktur kuinonoidal membentuk warna ungu. Pada pH 6,5 hingga 9 antosianin akan dominan membentuk warna biru dan dominan membentuk warna kuning pada pH diatas 9 (Brouillard, 1982). **Gambar 2.3** menunjukkan perubahan warna akibat pengaruh pH pada antosianin ubi ungu dari tiga daerah yaitu cilembu, banjaran, dan parkembangan (Mahmudatussa'adah, 2014).



Gambar 2.3 Perubahan Warna Antosianin Ubi Jalar Ungu pada pH 1-14
(Mahmudatuss'adah, 2014)

b. Temperatur

Temperatur dapat mempengaruhi stabilitas dan tingkat degradasi antosianin. Semakin tinggi suhu yang digunakan untuk pemanasan, warna merah pada antosianin akan semakin berkurang dan meningkatkan warna coklat yang terbentuk akibat degradasi pigmen (Fathinatullabibah, 2014).

Pada proses pemanasan semakin meningkatnya suhu, jumlah pigmen antosianin akan semakin berkurang. Dengan waktu pemanasan selama 13 menit suhu 30°C, pengurangan antosianin sebesar 17,4% sedangkan pada waktu yang sama dengan suhu 100°C pengurangan antosianin sebesar 95,5%.

Reaksi kerusakan antosianin akibat pemanasan dapat terjadi akibat dua tahap. Tahap pertama yaitu terjadinya reaksi hidrolisis pada ikatan glikosidik sehingga aglikon tidak stabil. Tahap kedua yaitu cincin aglikon terbuka membentuk karbinol dan kalkon tidak berwarna. Cincin aglikon yang terbuka menyebabkan degradasi terus berlanjut membentuk produk berwarna coklat (Brouillard, 1982). Karena stabilitas antosianin dipengaruhi oleh temperatur, aplikasi antosianin pada pangan digunakan saat tahap akhir saat temperatur sudah tidak terlalu tinggi, sehingga meminimalisir degradasi antosianin (Andarwulan, 2012).



c. Cahaya

Cahaya dapat menyebabkan degradasi pada antosianin. Penyinaran pada lampu *fluorescent* dapat menyebabkan degradasi antosianin akibat energi hasil proses penyinaran menghasilkan reaksi fitokimia. Reaksi ini merusak antosianin dan membentuk struktur kalkan tidak berwarna (Sari dkk, 2005). Degradasi antosianin oleh cahaya memiliki produk akhir seperti degradasi antosianin oleh temperatur. Menurut Furtado et al (1983), mekanisme reaksi fotokimia melibatkan langsung kation flavium menjadi produk degradasi, sedangkan menurut Maccarone et al (1987) mekanisme reaksi fotokimia melalui senyawa tidak berwarna terlebih dahulu, dilanjutkan melalui kation flavium lalu produk degradasi.

d. Ion Logam

Antosianin reaktif terhadap ion logam. Antosianin dan logam seperti Ca, Al, Fe, dan Sn membentuk kompleks yang dapat menstabilkan warna antosianin pada produk pangan, sehingga diaplikasikan pada *canberry juice* untuk memberikan perlindungan terhadap antosianin (Von Elbe and Schwartz, 1996). Antosianin yang berikatan dengan logam Fe^{3+} atau Al^{3+} akan merusak antosianin dan biasa terdapat pada pengalengan persik.

e. Pengaruh sulfur dioksida

Antosianin yang berikatan dengan senyawa asing dapat menyebabkan kerusakan warna. Sulfur dioksida (SO_2) merupakan salah satu jenis pengawet yang sering digunakan oleh industri pangan. Penggunaan SO_2 dapat mempengaruhi warna antosianin. Reaksi antara antosianin dengan SO_2 membentuk asam flaven-4-sulfonih yang tidak berwarna. Sifat dari reaksi ini adalah *reversible*, apabila SO_2 mengalami penguapan akibat panas maka warna antosianin akan kembali menjadi berwarna (Andarwulan, 2012).

f. Penyimpanan

Stabilitas antosianin dapat juga dipengaruhi oleh kondisi penyimpanan. Penyimpanan dengan suhu rendah seperti di dalam lemari es, kondisi antosianin masih baik hingga 106 hari, sedangkan bila disimpan dengan suhu tinggi kondisi antosianin hanya bertahan sampai 19 hari. Degradasi antosianin dapat berlanjut membentuk warna coklat apabila terdapat oksigen (Von Elbe and Schwartz, 1996). Menurut Budiarto (1991), tinggi rendahnya suhu dan ada tidaknya cahaya dapat mempengaruhi stabilitas antosianin pada saat penyimpanan.



2.3 Ekstraksi Antosianin

Ekstraksi adalah suatu proses untuk memisahkan senyawa kimia atau zat aktif tertentu dari jaringan hewan atau tumbuhan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan kemudian diuapkan hingga didapatkan baku yang ditetapkan. Proses ekstraksi didasarkan dengan perpindahan komponen zat ke dalam pelarut, dimana zat masuk melalui lapisan antar muka lalu berdifusi ke dalam pelarut. Laju ekstraksi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah persiapan sampel, jumlah atau kuantitas pelarut, waktu ekstraksi, tipe pelarut, dan suhu pelarut (Ali, 2013).

Menurut Umar (2008), terdapat dua macam pemisahan secara ekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair atau ekstraksi pelarut dan ekstraksi padat-cair. Pada ekstraksi cair-cair, proses pemisahan antara zat terlarut dan zat pelarut menggunakan *solvent* cair. Pada ekstraksi cair-cair biasa dilakukan dua tahap. Tahap pertama adalah pencampuran pelarut dengan bahan ekstraksi, tahap kedua adalah pemisahan fase cair. Sedangkan proses ekstraksi padat-cair merupakan pemisahan antara zat terlarut berupa padatan dari zat pelarut berupa cairan. Terdapat tiga tahapan ekstraksi, yaitu pelarut berdifusi ke pori-pori zat terlarut, kemudian pelarut berdifusi dari dalam pori padatan ke luar partikel, lalu larutan dari partikel berdifusi masuk ke dalam larutan ekstrak.

Antosianin pada bunga rosela didapatkan dengan metode ekstraksi. Pada penelitian Djaeni (2017), kandungan antosianin rosela dengan berbantu ultrasonik sebesar 115,353 mg / 100 g. Kandungan ini didapat dengan waktu ekstraksi 60 menit dan rasio bahan: pelarut aquades sebesar 1:13 b/v. Hasil penelitian yang didapat bahwa kandungan antosianin hasil ekstraksi metode sonikasi memiliki kandungan antosianin kurang lebih 12 kali lebih besar dibanding metode maserasi. Kandungan antosianin hasil metode maserasi sebesar 9,360 mg/100 g dengan rasio bahan : pelarut 1:13 dan waktu ekstraksi 8 jam. Terdapat persamaan suhu ekstraksi yang digunakan yaitu suhu ruang sebesar 30°C.

Antosianin dapat diekstraksi dengan beberapa jenis pelarut seperti etanol, methanol, atau air. Ketiga pelarut tersebut merupakan pelarut polar disebabkan antosianin memiliki sifat larut dengan air sehingga merupakan senyawa polar. Ekstraksi antosianin akan optimal apabila menggunakan jenis pelarut yang memiliki sifat polar relatif sama dengan antosianin. Pelarut yang paling efektif untuk ekstraksi antosianin adalah methanol, namun senyawa ini



bersifat toksik sehingga pelarut yang biasa digunakan adalah air dan etanol yang diasamkan dengan HCl (Ali, 2013). Selain itu, dalam ekstraksi antosianin dianjurkan pada kondisi asam. Asam organik yang sering digunakan untuk ekstraksi antosianin adalah asam asetat, asam sitrat, dan asam klorida. Pada penelitian Basito (2011), penambahan variasi asam pada ekstraksi antosianin kulit manggis memberikan pengaruh terhadap hasil ekstraksi.

Metode ekstraksi antosianin berbagai macam, seperti metode konvensional seperti maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik pada suhu ruang. Metode ini memakan waktu yang cukup lama serta dibutuhkan jumlah pelarut yang relatif banyak, sehingga kurang efisien. Pada penelitian ini ekstraksi menggunakan *microwave assisted extraction* (MAE). MAE merupakan metode ekstraksi yang ekonomis dan efisien (Purbowati, 2016).

2.4 Metode Ekstraksi Vacuum Microwave Assisted Extraction (VMAE)

Microwave Assisted Extraction (MAE) merupakan teknik yang dapat digunakan untuk mengekstraksi zat terlarut di dalam bahan tanaman dengan berbantu gelombang mikro. Gelombang mikro yang dihantarkan oleh *microwave* dapat menghancurkan sel bahan sehingga senyawa target dapat terekstrak dengan baik. Prinsip pemanasan energi gelombang mikro didasarkan pada energi yang dihasilkan memiliki efek langsung pada molekul yang dituju oleh konduksi ion dan rotasi dipol. Kedua fenomena ini biasanya berjalan secara simultan. Konduksi ion merupakan migrasi ion elektroforetik ketika terjadi perubahan medan listrik. Resistensi larutan terhadap aliran ion akan menghasilkan gesekan sehingga menghasilkan panas. Molekul-molekul dipol yang terus berubah akibat medan listrik diatur kembali, dimana peristiwa ini disebut rotasi dipol. Pada frekuensi 2450 MHz, dipol akan bergerak sebesar $4,9 \times 10^9$ kali per detik, gerakan molekul ini akan menghasilkan panas (Eskilsson and Erland, 2000).

Gelombang *microwave* dapat masuk ke dalam bahan tertentu dan berinteraksi dengan komponen-komponen polar untuk menghasilkan panas. Panas yang berasal dari gelombang *microwave* bekerja langsung pada molekul dengan konduksi ion dan rotasi dipol. Dengan demikian, metode ekstraksi dengan MAE tergantung dengan konstanta dielektrik dari pelarut yang digunakan. Konstanta dielektrik merupakan gaya tolak menolak dua partikel yang

bermuatan listrik dalam suatu molekul. Apabila konstanta dielektrik semakin tinggi maka pelarut bersifat semakin polar (Chan et al, 2011).

Metode ekstraksi dengan MAE merupakan pengambilan senyawa berbantu gelombang mikro sehingga cocok digunakan untuk mengekstrak senyawa yang bersifat thermolabil atau tidak tahan terhadap panas seperti senyawa antosianin. Metode ini memiliki kontrol suhu lebih baik dibanding metode ekstraksi konvensional. Hal ini disebabkan karena pada metode konvensional, diperlukan periode waktu tertentu untuk memanaskan wadah terlebih dahulu sebelum panas ditransfer ke bahan, sedangkan *microwave* memanaskan bahan secara langsung sehingga mempercepat kecepatan pemanasan. Selain itu menurut Farida (2015), penggunaan jumlah pelarut dalam metode MAE lebih sedikit dibandingkan dengan metode konvensional, serta pengurangan waktu ekstraksi sehingga lebih efisien. Menurut penelitian Wicaksono (2015), dilakukan ekstraksi antosianin ubi jalar ungu varietas Antin-3 dengan metode yang berbeda yaitu MAE, UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*), dan konvensional. Hasil perbandingan kadar antosianin dari ketiga metode dapat dilihat pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2.2 Perbandingan Kadar Antosianin dari Ketiga Metode

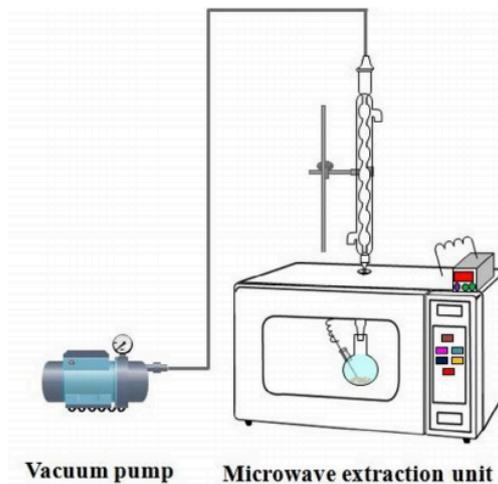
Metode Ekstraksi	Kadar Antosianin (ppm)
Konvensional	467,99
MAE	687,58
UAE	532,69

Sumber: Wicaksono, (2015)

Pada penelitian ini, MAE yang digunakan merupakan MAE modifikasi *microwave* domestik. Teknologi ini dinamakan *vacuum microwave assisted extraction* (VMAE). MAE modifikasi *microwave* domestik ini dilengkapi dengan labu, pendingin, pompa vakum, dan *thermocouple*. Pompa vakum berfungsi untuk menghisap udara di ruang oven sehingga tekanan menjadi lebih rendah. Pada penggunaan VMAE, titik didih pelarut lebih rendah sehingga pelarut dapat mendidih pada temperatur yang lebih rendah dan dapat meminimalisir risiko degradasi senyawa aktif sehingga baik digunakan untuk senyawa thermolabil seperti antosianin. Suhu didih yang rendah dapat diperoleh dengan menggunakan tekanan yang rendah. Menurunkan titik didih pelarut atau cairan



dilakukan dengan cara menurunkan tekanan di atas permukaan cairan menjadi lebih rendah dari tekanan atmosfer atau disebut vakum (Kamaluddin, 2014). Alat ekstraksi VMAE dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4 Alat *Vacuum Microwave Assisted Extraction* (VMAE) (Kala, et al, 2016)

2.5. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekstraksi Metode VMAE

a. Jenis Pelarut

Penggunaan pelarut merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi agar didapatkan hasil ekstraksi yang optimal. Pemilihan pelarut berdasarkan pada interaksi bahan dengan pelarut, kelarutan senyawa pada pelarut, dan kemampuan pelarut dalam menyerap energi gelombang mikro. Apabila pelarut tidak dapat menyerap energi dari gelombang mikro maka tidak terjadi panas dan proses ekstraksi tidak berjalan secara optimal (Wicaksono, 2015). Pelarut yang digunakan pada ekstraksi diharapkan memiliki selektifitas tinggi terhadap senyawa target dan senyawa lain yang tidak diinginkan.

b. Volume Pelarut

Volume pelarut dapat menjadi parameter penting agar proses ekstraksi berjalan secara efisien. Volume pelarut harus cukup untuk merendam seluruh sampel, terutama ketika matriks sampel dapat membengkak selama proses ekstraksi. Dalam ekstraksi metode konvensional, semakin banyak volume pelarut



yang digunakan akan menghasilkan hasil ekstrak yang lebih besar. Namun pada MAE dalam beberapa kasus apabila volume pelarut lebih banyak, maka hasil rendemen ekstrak yang diperoleh dapat semakin sedikit dikarenakan pengadukan pelarut oleh gelombang mikro tidak memadai (Eskilsson, 2000).

c. Waktu Ekstraksi

Waktu ekstraksi pada metode MAE seringkali lebih singkat dibandingkan dengan metode konvensional. Seringkali waktu sekitar 10 menit dapat memberikan hasil yang baik, namun waktu ekstraksi juga tergantung pada bahan yang akan diekstrak. Secara umum semakin lama waktu ekstraksi, maka jumlah ekstrak yang dihasilkan akan semakin tinggi. Namun waktu pemaparan yang terlalu tinggi dapat memberikan resiko pada senyawa yang tidak tahan terhadap panas (Eskilsson, 2000).

d. Suhu Ekstraksi

Suhu ekstraksi merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi. Suhu tinggi pada ekstraksi dapat merusak sel sehingga senyawa target dapat keluar dari bahan. Ketika proses ekstraksi dilakukan di dalam wadah yang tertutup, suhu ekstraksi akan meningkat secara signifikan di atas titik didih pelarut. Peningkatan suhu ini akan meningkatkan efisiensi proses karena desorpsi senyawa dalam matriks akan meningkat. Selain itu, pelarut akan lebih baik melarutkan senyawa target pada suhu yang tinggi. Namun penggunaan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan degradasi senyawa aktif yang bersifat termolabil. Suhu pada ekstraksi antosianin sekitar 30-50°C karena antosianin tidak tahan terhadap suhu terlalu tinggi.

2.6 Bahan Pengekstrak

2.6.1 Etanol

Etanol atau etil alkohol adalah salah satu turunan dari senyawa hidroksil dengan rumus kimia C_2H_5OH . Etanol merupakan cairan tidak berwarna, mudah terbakar dan menguap, tidak berasa, dan memiliki bau yang khas. Etanol dapat bercampur dengan air dalam segala perbandingan. Etanol memiliki titik didih 78,32°C dan titik beku -117,3°C. Sifat-sifat fisik etanol dapat dilihat pada **Tabel**

2.3.

**Tabel 2.3** Sifat-Sifat Fisik Etanol

Keterangan	Nilai
Titik didih normal, °C, 1 atm	78,32
Suhu kritis, °C	243,1
Tekanan kritis, kPa	6383,48
Volume kritis, L/mol	0,167
Viskositas pada 20°C, mPa.s (=cP)	1,17
Kelarutan dalam air pada 20°C	Saling larut

Sumber: Kirk, (1951)

Dalam industri, pembuatan etanol dibagi menjadi dua macam, yaitu cara non fermentasi atau sintetis, dimana proses pembuatan etanol tidak menggunakan enzim atau jasad renik, dan cara fermentasi dimana terjadi perubahan kimia dalam substrat karena adanya aktivitas enzim yang dihasilkan mikroba. Etanol banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari karena tidak beracun dan ramah lingkungan karena memiliki emisi karbondioksida rendah. Etanol memiliki beberapa kegunaan seperti dapat digunakan sebagai pelarut bahan organik, sebagai sintesa bahan kimia, sebagai bahan campuran pada minuman, dan sebagai bahan campuran pada bahan bakar (Utami, 2010). Etanol dapat melarutkan senyawa flavonoid, glikosida, kurkumin, minyak atsiri, dan klorofil.

Etanol merupakan pelarut organik tidak beracun sehingga aman digunakan sebagai pelarut pada bahan pangan. Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol 96%. Menurut Siregar dan Nurlala (2011), etanol 96% merupakan pelarut terbaik dalam ekstraksi antosianin karena memiliki kepolaran hampir sama dengan antosianin. Hasil penelitian Moeksin (2009), etanol 96% menghasilkan warna ekstrak antosianin rosela lebih cerah dan menarik dibandingkan menggunakan pelarut aquades, selain itu kadar antosianin dan rendemen yang dihasilkan lebih tinggi. Perbandingan kadar antosianin dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan aquades dapat dilihat pada **Tabel 2.4**

2.4

Tabel 2.4 Perbandingan Pelarut Terhadap % Yield Antosianin

Pelarut	Kondisi Sampel	Perlakuan Sampel	Berat Sampel (gr)	% Yield Antosianin
Aquades	Kering	Gerus	25	42,745
Etanol 96%	Kering	Gerus	25	60,184

Sumber: Moeksin, (2009)



Pada penelitian Agustin dan Ismiyati (2015) dilakukan penelitian mengenai pengaruh konsentrasi etanol terhadap kadar antosianin bunga kembang sepatu. Kadar antosianin tertinggi sebesar 48,260 mg/25 gram didapatkan dari pelarut etanol 96%. Hal ini dikarenakan antosianin larut dengan baik dalam pelarut yang memiliki kepolaran hampir serupa sehingga semakin tinggi konsentrasi pelarut etanol maka semakin tinggi pula konsentrasi antosianin yang didapat. Pengaruh konsentrasi pelarut etanol terhadap kadar antosianin dapat dilihat pada **Tabel 2.5**

Tabel 2.5 Data Hasil Ekstraksi Terhadap Kadar Dengan Variabel Konsentrasi Ethanol, Sampel Kelopak Bunga Kembang Sepatu Pada λ 528 nm

Konsentrasi ethanol (%)	Kadar Antosianin (mg / 25 gr bahan baku)
60	42,440
70	45,788
80	46,345
90	47,981
96	48,260

Sumber: Agustin dan Ismiyati, (2015)

2.6.2 Asam Sitrat

Asam sitrat merupakan asam organik yang dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti sari buah lemon, nanas, atau proses fermentasi mikroorganismenya seperti *Aspergillus niger*. Asam sitrat banyak digunakan di kalangan industri makanan, farmasi, dan pertanian. Asam sitrat digunakan oleh industri makanan karena memiliki sifat tidak beracun dan kelarutan tinggi. Asam sitrat berfungsi sebagai pengawet, pengatur pH, pencegah kerusakan aroma dan warna, serta penghambat oksidasi (Sasmitaloka, 2017).

Rumus kimia asam sitrat adalah $C_6H_8O_7$. Asam sitrat memiliki sifat larut dengan air dan etanol. Asam sitrat bersifat higroskopis sehingga disimpan pada tempat kering. Keasaman asam sitrat diperoleh dari tiga gugus karboksil COOH yang melepas proton dalam larutan. Sifat fisik asam sitrat dapat dilihat pada **Tabel 2.6**.

**Tabel 2.6** Sifat-Sifat Fisik Asam Sitrat

Keterangan	Nilai
Berat molekul	192 gr/mol
Titik lebur	153°C
Titik didih	175°C
Kelarutan dalam air	207,7 gr/100 ml (25°C)

Asam sitrat digunakan pada ekstraksi antosianin rosela karena memiliki pH rendah. Pelarut etanol-asam sitrat 2% memiliki pH lebih rendah sebesar 3,6 dibanding pelarut etanol-asam asetat 2% yang memiliki pH 4,1. Pada keadaan asam mendekati pH 1, pigmen antosianin akan berbentuk kation flavium berwarna dan pada pengukuran absorbansi jumlah antosianin yang didapat akan semakin besar (Setyaningrum, 2010). Tingkat keasaman setiap jenis asam berhubungan dengan tetapan disosiasi. Asam sitrat memiliki tetapan disosiasi lebih besar dibandingkan tetapan disosiasi asam asetat. Tetapan disosiasi asam sitrat sebesar $7,21 \times 10^{-4}$ dan tetapan disosiasi asam asetat sebesar $1,75 \times 10^{-5}$. Semakin besar tetapan disosiasi maka suatu asam semakin kuat karena jumlah ion hidrogen yang dilepaskan semakin besar (Tensiska dan Dita, 2007). Pada ekstraksi antosianin yang merupakan senyawa flavonoid, ekstraksi dalam suasana asam akan lebih maksimal karena asam dapat mendenaturasi membran sel tanaman, mengakibatkan larutnya pigmen antosianin sehingga dapat keluar dari sel. Penambahan suasana asam juga dapat mencegah oksidasi flavonoid (Basito, 2011).

Pada penelitian Setyaningrum (2010), pelarut aseton 60% yang ditambahkan asam sitrat memiliki kadar antosianin 0,11 mg/100 gr dan intensitas warna merah sebesar 35,67, sedangkan pelarut aseton 60% yang ditambahkan asam asetat memiliki kadar antosianin sebesar 0,8 mg/100 g dan intensitas warna merah sebesar 18,64.

2.7 Respon Surface Methodology (RSM)

Respon surface methodology (RSM) atau metode permukaan respon merupakan metode gabungan antara teknik matematika dengan statistika, dimana metode ini digunakan untuk menganalisa suatu permasalahan dimana



beberapa variabel independen mempengaruhi variabel respon. Tujuan akhir metode ini adalah mengoptimalkan respon. RSM dapat digunakan untuk melakukan analisis hasil percobaan factorial dan faktor kuantitas yang bersifat kontinu. Analisis ini dapat dilakukan dengan pendekatan regresi, sehingga dapat meminimalkan ragam (Isnaini et al., 2012). RSM biasa digunakan agar didapatkan parameter proses yang optimum.

Terdapat dua tahapan utama dalam analisis RSM. Tahapan pertama yaitu menemukan hubungan variabel x dengan respon y melalui persamaan linear polinomial pada orde satu. Kemudian persamaan linear pada orde satu ditingkatkan pada orde dua. Pada orde dua, model yang didapatkan lebih kompleks, karena merupakan model interaksi antara kedua regresor atau variabel pemrediksi (Nuryanti, 2008). Apabila suatu keadaan jauh dari titik optimum, maka akan digunakan model persamaan linear pada orde satu. Model ini akan menunjukkan daerah optimum melalui *path of improvement* atau jalur pengoptimasian. Ketika daerah optimum didapatkan, maka akan digunakan model pada orde dua yang lebih kompleks. Lalu proses analisis dilanjutkan untuk didapatkan titik optimum.

Kelebihan dari RSM adalah dapat menyajikan data dengan cepat, sehingga biasa diaplikasikan pada industri untuk mendapatkan hasil yang optimum. Pada penelitian Purbowati (2016), metode RSM digunakan untuk mendapatkan kondisi optimum ekstraksi fenolik dari bunga rosela. Faktor yang digunakan pada penelitian yaitu daya gelombang mikro, lama waktu ekstraksi, dan konsentrasi etanol. Hasil verifikasi penelitian didapatkan total phenol pada kondisi optimum sebesar $23,77 \pm 0,25$ mg/g. Kondisi optimum yang digunakan yaitu daya gelombang mikro sebesar 250 watt, lama waktu ekstraksi 4,91 menit, dan konsentrasi etanol sebesar 78,36%.



III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pengolahan dan Rekayasa Pangan, Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan, Laboratorium Instrumen, Laboratorium Nutrisi Pangan, dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Januari 2019 hingga Maret 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *Vacuum Microwave Assisted Extraction* (Sharp R-222-Y), blender, ayakan 60 mesh, penyaring vacuum, oven listrik 220 v (Memmer), kertas saring halus, kertas Whatman no. 01, colour reader (Konica Minolta CR-10 Japan), *shaker* (Orbital Genie), *magnetic stirrer*, refrigerator (Sharp SJ-P571NLV), timbangan digital (Denver instrument M-310), *rotary vacuum evaporator*, corong kaca, berbagai macam *glassware* (labu ukur 10 ml, labu ukur 20 ml, *beaker glass* 500 ml, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, erlenmeyer 250 ml dan 500 ml).

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini, bahan yang digunakan terbagi menjadi tiga, yaitu bahan baku, bahan ekstraksi, dan bahan analisis. Bahan baku pada penelitian ini adalah rosela merah yang diperoleh dari pengepul di Sidoarjo yang nantinya rosela ini akan dikeringkan. Selanjutnya, bahan ekstraksi yang digunakan adalah asam sitrat teknis, etanol 96% teknis, dan hidrobat. Sedangkan bahan yang digunakan untuk analisis adalah aquades, larutan buffer pH 1 dan pH 4,5, HCl pekat, metanol.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah *Response Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan *Central Composite Design* (CCD) melalui *Software Design Expert* 7.1.5. Penelitian ini menggunakan 2 faktor. Tahapan awal pada penelitian dilakukan untuk memasukkan data berupa perancangan



variabel eksperimental (faktor) dimana variabelnya adalah konsentrasi asam sitrat dengan satuan persen (%) dan lama waktu ekstraksi dengan satuan menit.

Proses berikutnya adalah menentukan batas bawah dan batas atas pada kedua faktor. Faktor pertama merupakan konsentrasi asam sitrat dengan batas bawah 2% (-1 level) dan batas atas 6% (+1 level). Faktor kedua merupakan lama waktu ekstraksi dengan batas bawah 5 menit (-1 level) dan batas atas 9 menit (+1 level). *Input numeric factor* dapat dilihat pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 *Input numeric factors* (Konsentrasi Asam Sitrat dan Lama waktu ekstraksi)

	Nama	Units	-1 Level	+1 Level	-alpha	+alpha
A	% Asam Sitrat	%	2	6	1.17157	6.82843
B	Lama Waktu Ekstraksi	Menit	5	9	4.17157	9.82843

Tahapan berikutnya yaitu penentuan respon. Penelitian ini menggunakan tiga respon. Respon pertama yaitu rendemen, respon kedua merupakan total antosianin, dan respon ketiga yaitu tingkat kecerahan. *Input Responses* dapat dilihat pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3.2 *Input responses* (Rendemen, Tingkat Kecerahan, dan Total Antosianin)

Nama	Units
Rendemen	%
Tingkat Kecerahan	-
Total Antosianin	ppm

Setelah melakukan *input numeric factors* dan *input responses Software Design Expert 7.1.5* akan melakukan kombinasi sesuai dengan jumlah kombinasi kedua faktor. Jumlah kombinasi yang didapatkan sebanyak 13 kombinasi yang dapat dilihat pada **Tabel 3.3**.



Tabel 3.3 Kombinasi Perlakuan

Std	Run	Faktor 1 A : % Asam Sitrat (%)	Faktor 2 B : Waktu Ekstraksi (menit)	Response 1 Rendemen (%)	Response 2 Tingkat Kecerahan	Response 3 Total Antosianin (ppm)
1	1	2.00	5.00			
3	2	2.00	9.00			
2	3	6.00	5.00			
13	4	4.00	7.00			
6	5	6.83	7.00			
10	6	4.00	7.00			
9	7	4.00	7.00			
5	8	1.17	7.00			
8	9	4.00	9.83			
12	10	4.00	7.00			
4	11	6.00	9.00			
7	12	4.00	4.17			
11	13	4.00	7.00			

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Penelitian Pendahuluan

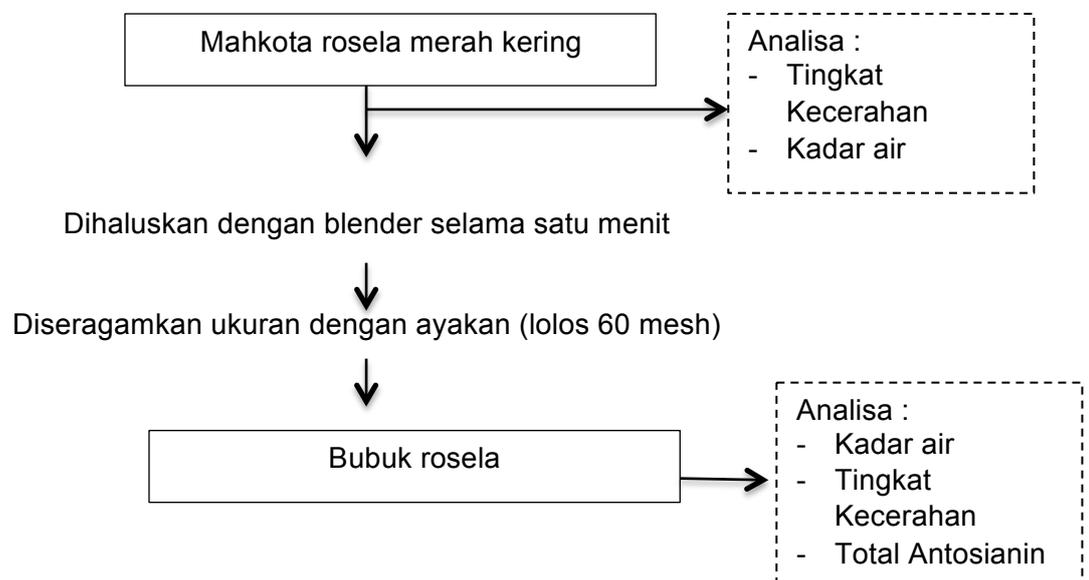
Penelitian pendahuluan menggunakan rosela merah yang diperoleh dari pengepul di Sidoarjo. Pembuatan bubuk rosela dilakukan dengan menghancurkan kelopak bunga rosela merah dengan blender kering selama 1 menit. Kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan 60 mesh, dan didapatkan bubuk rosela. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dan penambahan asam sitrat dengan konsentrasi 1%; 2%; 3%; 4%; dan 5% dengan perbandingan berat sampel dan pelarut 1:20 menggunakan *Vacuum Microwave Assisted Extraction* (VMAE) selama 3, 5, 7, dan 9 menit dengan suhu 32°C. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm, dan disaring dengan kertas saring halus. Lalu dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary vacuum evaporator* agar didapatkan hasil ekstrak pekat, dan ekstrak pekat dilakukan pengehemusan dengan gas nitrogen hingga berat konstan agar ekstrak antosianin tidak lagi

mengandung pelarut. Hasil penelitian pendahuluan yaitu didapatkannya konsentrasi asam sitrat sebesar 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6% serta waktu ekstraksi 5 menit, 7 menit, dan 9 menit.

3.4.2 Penelitian Utama

a. Pembuatan Bubuk Rosela

Tahap pembuatan bubuk ini dilakukan untuk menghasilkan bubuk rosela agar proses ekstraksi lebih efektif. Tahap pertama adalah melakukan sortasi bunga rosela kering sesuai spesifikasi bahan baku yang diinginkan seperti parameter warna, bunga rosela kering yang dipilih berwarna merah. Tahap berikutnya yaitu penghancuran rosela kering dengan blender kering selama 1 menit. Kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan 60 mesh, dan didapatkan bubuk rosela. Pembuatan bubuk rosela dapat dilihat pada **Gambar 3.1**

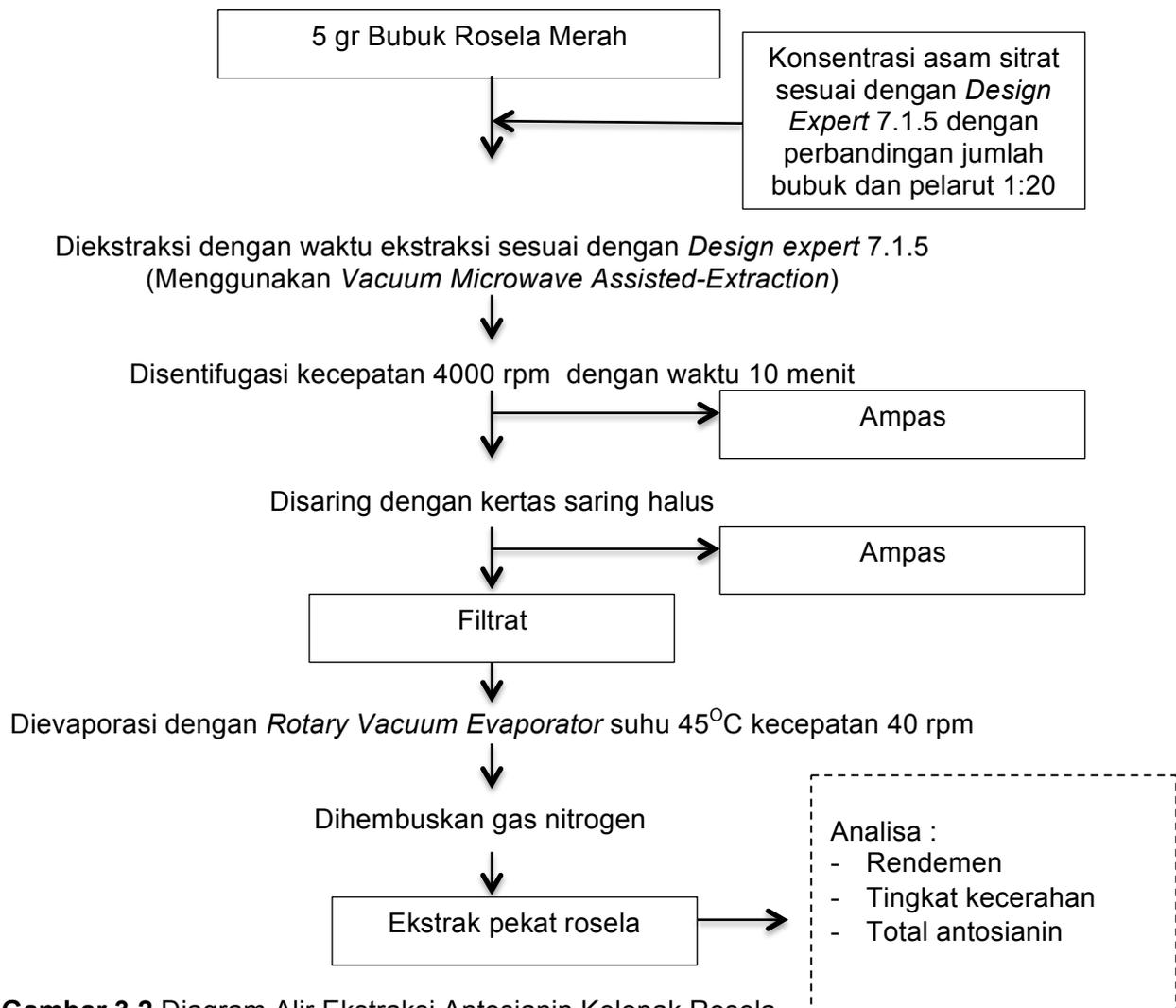


Gambar 3.1 Diagram Alir Pembuatan Bubuk dari Kelopak Rosela (Modifikasi Sari, 2011)

b. Proses Ekstraksi Antosianin dari Bunga Rosela Merah

Proses ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan ekstrak antosianin dari bunga rosela. Tahap pertama yang dilakukan yaitu bubuk rosela merah ditimbang menggunakan timbangan digital sebanyak 5 gram. Kemudian, bubuk rosela merah yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam labu. Kemudian asam sitrat dimasukkan ke dalam labu yang sudah berisi bubuk rosela dengan

konsentrasi sesuai dengan *Design Expert* 7.1.5. Selanjutnya, 100 ml pelarut etanol 96% dimasukkan ke dalam labu (perbandingan jumlah sampel dan pelarut 1:20). Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan *Vacuum Microwave Assisted Extraction* (VMAE) dengan lama waktu ekstraksi sesuai dengan *Design Expert* 7.1.5 dan suhu pada indikator 32°C. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, dan dilakukan penyaringan dengan kertas saring halus untuk didapatkan filtrat murni. Kemudian dilakukan evaporasi dengan *rotary vacuum evaporator* yang bertujuan menguapkan pelarut dan dihasilkan ekstrak pekat. Tahap terakhir yaitu penghambusan gas nitrogen hingga berat konstan yang bertujuan agar pelarut menguap seluruhnya. Proses ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar 3.2**



Gambar 3.2 Diagram Alir Ekstraksi Antosianin Kelopak Rosela (Modifikasi Sari, 2011)

3.5 Pengamatan dan Analisis data

3.5.1 Pengamatan

Pengamatan yang akan dilakukan yaitu analisis pada bahan baku berupa bubuk rosela. Analisis yang dilakukan meliputi kadar air, tingkat kecerahan, dan total antosianin. Analisis lanjutan dilakukan pada ekstrak antosianin dari rosela yaitu pengamatan terhadap presentase rendemen, total antosianin, dan tingkat kecerahan. Analisis atau respon yang dilakukan meliputi:

Analisis bahan baku bubuk rosela meliputi:

- Kadar air metode oven
- Total antosianin metode pH diferensial
- Tingkat kecerahan

Analisis antosianin rosela hasil ekstraksi meliputi:

- Rendemen
- Total antosianin metode pH diferensial
- Tingkat kecerahan

3.5.2 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan menggunakan metodologi permukaan respon untuk mengetahui kondisi optimal pada penelitian yang dilakukan. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *Software Design Expert 7.1.5* dengan rancangan *Central Composite Design (CCD)*. Dua faktor yang digunakan yaitu lama waktu ekstraksi (5 menit, 7 menit, 9 menit) dan konsentrasi asam sitrat (2%, 4%, 6%). Data analisis yang diperoleh akan melalui tiga tahap pemilihan model. Tahap pertama yaitu pemilihan berdasarkan jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*) dengan nilai P kurang dari 5%. Kedua yaitu pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit*) dengan nilai P lebih dari 5%. Ketiga yaitu pemilihan model berdasarkan ringkasan model statistik (*Summary of Statistic*) dengan nilai R^2 mendekati 1,00 untuk mendapatkan titik optimum. Titik optimum hasil optimasi diverifikasi dengan uji T. Uji ini dilakukan menggunakan aplikasi *Minitab 17* untuk melihat perbedaan yang signifikan atau tidak signifikan pada hasil prediksi dengan tingkat kesalahan kurang dari 5%.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga rosela merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang didapatkan dari Siduarjo. Sebelum dilakukan analisis, dilakukan uji karakteristik bahan baku kelopak rosela meliputi kadar air dan tingkat kecerahan (L), sedangkan pada bubuk rosela terlebih dahulu meliputi kadar air, total antosianin, dan tingkat kecerahan (L). Data analisis bahan baku dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Hasil Analisis Bahan Baku Bubuk Rosela

Parameter	Hasil Analisis	Literatur	Hasil Uji T (p value)
Rosela Kering:			
- Kadar Air (%)	13,89 ± 0,07	14,23 ^a	0,013
- Kecerahan (L)	34,57 ± 2,11	22,30 ^b	0,010
Bubuk Rosela:			
- Kadar Air (%)	9,76 ± 0,28	4,50 ^b	0,010
- Kecerahan (L)	44,97 ± 0,51	42,76 ^b	0,018
- Kadar Antosianin (ppm)	31,17 ± 1,93	96,52 ^c	0,000

Sumber: a. Khusna (2010)
b. Sari (2011)
c. Sundarni (2017)

Berdasarkan analisis bahan baku dari literatur yang dibandingkan dengan hasil analisis yang sudah peneliti lakukan terdapat data seperti yang tersaji pada **Tabel 4.1**. Dari hasil analisis bahan baku kelopak rosela didapatkan kadar air kelopak rosela sebesar 13,89%. Analisis kadar air bahan baku ini dilakukan dengan metode oven (Sudarmadji dkk, 1997). Menurut Khusna (2010), kadar air rosela kering sebesar 14,23%, sehingga hasil analisis kadar air kelopak rosela lebih rendah dibanding literatur. Hal tersebut dibuktikan dengan uji T dimana hasil nilai p yang didapatkan sebesar 0,013 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Perbedaan kadar air hasil analisis peneliti dengan literatur disebabkan karena perbedaan metode pengeringan yang dilakukan. Kadar air merupakan jumlah air yang terkandung pada bahan dan dinyatakan dalam satuan persen (%). Kadar air merupakan karakteristik penting karena

mempengaruhi tekstur, penampakan, dan cita rasa pada bahan pangan. Kesegaran dan daya awet suatu bahan pangan juga dapat ditentukan oleh kadar air dalam bahan pangan tersebut (Winarno, 2004). Apabila kandungan kadar air pada suatu bahan masih tergolong tinggi, pertumbuhan mikroba pada bahan akan meningkat disebabkan kadar air tinggi pada bahan merupakan kondisi yang optimal untuk pertumbuhan mikroba sehingga bahan akan lebih cepat rusak dan menurunkan kesegaran bahan. Perbedaan hasil kadar air pada bahan rosela kering disebabkan karena adanya perbedaan metode pengeringan. Suhu pengeringan merupakan salah satu faktor penting saat proses pengeringan. Pengeringan yang belum sempurna dengan menggunakan suhu rendah akan menyebabkan pengeringan berlangsung lambat, dan hasil pengeringan yang belum sempurna dapat mengakibatkan pertumbuhan jamur pada produk dan menyebabkan pembusukan. Namun suhu yang terlalu tinggi dapat merusak kandungan-kandungan pada bahan yang bersifat termolabil atau tidak tahan terhadap panas. Seperti penelitian Yuariski (2012), suhu pengeringan 50°C menghasilkan kandungan antosianin yang lebih tinggi dibandingkan suhu pengeringan 60°C. Hal ini dikarenakan antosianin merupakan senyawa yang bersifat tidak tahan terkena panas, sehingga penggunaan suhu pengeringan yang terlalu tinggi akan menyebabkan degradasi pada antosianin. Menurut Maryani dan Kristiana (2008), rasio pengeringan rosela umumnya 10:1, dimana setiap 10 kg kelopak rosela segar akan menghasilkan 1 kg bahan kering. Setelah dilakukan pengeringan, kelopak bunga rosela yang awalnya segar dan berwarna merah berubah menjadi merah tua dan menjadi kering dan tidak segar lagi karena kadar air yang terdapat pada bunga rosela telah berkurang akibat proses pengeringan.

Pada bubuk rosela hasil analisis didapatkan kadar air sebesar 9,76%, sedangkan pada literatur kadar air yang terkandung pada bubuk rosela sebesar 4,50%. Terdapat perbedaan hasil kadar air antara hasil analisis dan literatur yang dibuktikan dengan uji T dimana hasil nilai p yang didapatkan sebesar 0,010 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan karena nilai p kurang dari 0,05 (<5%). Pembuatan bubuk rosela bertujuan untuk memperluas luas permukaan bahan sehingga kontak antara bahan pelarut lebih maksimal.

Pada data hasil analisis bahan baku didapatkan total antosianin bubuk rosela sebesar 31,17 ppm. Menurut Sundarni (2017), total antosianin bubuk rosela sebesar 96,52 ppm. Terdapat perbedaan hasil antara hasil analisis dan

literatur yang dibuktikan dengan uji T dimana hasil nilai p yang didapatkan sebesar 0,000 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan karena nilai p kurang dari 0,05 (<5%). Hal ini dapat disebabkan adanya perbedaan waktu maserasi yang dilakukan pada penelitian dan literatur. Pada penelitian, bubuk rosela direndam dengan pelarut selama 4 jam sedangkan pada literatur bubuk rosela direndam dengan pelarut selama 24 jam. Semakin lama waktu perendaman bubuk rosela dengan pelarut maka semakin banyak kandungan antosianin yang terekstrak keluar kedalam pelarut. Menurut Wahyuni dan Widjanarko (2015), semakin lama waktu ekstraksi akan memberikan waktu yang cukup bagi pelarut untuk menembus dinding sel dan menarik keluar senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung bahan, sehingga kandungan antosianin akan semakin tinggi dengan meningkatnya lama waktu ekstraksi. Perbedaan kadar antosianin bubuk rosela pada penelitian dan literatur juga dapat disebabkan karena perbedaan rasio bahan:pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi. Pada penelitian rasio bahan:pelarut yang digunakan 1:5 (20 gram bubuk antosianin dilarutkan dalam 100 ml pelarut) sedangkan pada literatur menggunakan rasio bahan:pelarut yang digunakan 1:6 (50 gram bubuk antosianin dilarutkan dalam 300 ml pelarut). Semakin besar perbandingan pelarut terhadap bahan yang diekstrak maka total antosianin yang diperoleh akan semakin besar. Hal ini disebabkan karena semakin meningkatnya jumlah pelarut yang digunakan maka pengeluaran senyawa target kedalam pelarut dapat berjalan lebih optimal. Selain itu semakin besar jumlah bubuk antosianin yang ditambahkan ke dalam pelarut akan meningkatkan distribusi antosianin yang bisa ditransfer ke dalam *solvent*.

Intensitas warna dari rosela dipengaruhi oleh jumlah antosianinnya. Hasil analisis menunjukkan tingkat kecerahan pada rosela kering sebesar 34,57, sedangkan pada literatur tingkat kecerahan pada rosela kering sebesar 22,3. Pada bubuk rosela didapatkan tingkat kecerahan sebesar 44,97 dan pada literatur bubuk rosela memiliki tingkat kecerahan sebesar 42,76. Terdapat perbedaan hasil tingkat kecerahan antara hasil analisis dan literatur yang dibuktikan dengan uji T, dimana hasil nilai p yang didapatkan sebesar 0,018 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan karena nilai p kurang dari 0,05 (<5%). Perbedaan tingkat kecerahan pada data peneliti dan literatur dapat disebabkan karena perbedaan komponen yang ada di dalam bahan, yaitu jumlah antosianin yang terkandung dalam bahan. Semakin tinggi antosianin yang

terkandung maka tingkat kecerahan akan semakin rendah (Sari, 2011). Bubuk bunga rosella memiliki tingkat kecerahan tinggi karena bubuk rosella belum mengalami proses ekstraksi dengan menggunakan suhu tinggi, sehingga antosianin pada bahan belum terdegradasi. Menurut Mardiah (2009) perlakuan pemanasan akan menimbulkan perubahan terhadap tekstur (kekentalan), warna, cita rasa, dan nilai gizi. Pelunakan tekstur dan kehilangan jaringan/sel dapat terjadi sebagai akibat kerusakan oleh pemanasan sehingga zat-zat kimia bahan akan bereaksi dan menimbulkan perubahan warna, flavor dan nilai gizi.

4.2 Optimasi Proses Ekstraksi Antosianin dari Bunga Rosela

Optimasi proses ekstraksi antosianin dari bunga rosela dilakukan dengan variabel bebas berupa lama waktu ekstraksi dengan kisaran waktu 5 menit hingga 9 menit dan konsentrasi asam sitrat dengan kisaran 2% hingga 6%. Respon yang diteliti yaitu rendemen (Y_1), tingkat kecerahan antosianin (Y_2), dan total antosianin (Y_3). Data hasil analisis respon hubungan lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat terhadap respon rendemen, total antosianin, dan tingkat kecerahan dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2 Hasil Analisis Respon Hubungan Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat terhadap Respon Rendemen, Total Antosianin, dan Tingkat Kecerahan Antosianin

Std	Run	Lama Waktu Ekstraksi (menit)	Konsentrasi Asam Sitrat (%)	Rendemen (%)	Tingkat Kecerahan (L)	Total Antosianin (ppm)
1	7	5,00	2,00	19,91 ± 0,2	34,5 ± 0,2	107,71 ± 0,8
2	12	9,00	2,00	10,62 ± 0,1	44,6 ± 0,1	111,60 ± 1,3
3	8	5,00	6,00	14,40 ± 0,8	30,8 ± 0,01	123,40 ± 0,6
4	9	9,00	6,00	19,10 ± 0,2	38,7 ± 0,9	96,30 ± 0,9
5	13	4,17	4,00	15,65 ± 0,7	29,1 ± 1,6	116,89 ± 1,7
6	1	9,83	4,00	13,00 ± 0,8	42,3 ± 0,7	87,39 ± 1,9
7	4	7,00	1,17	18,33 ± 0,8	38,2 ± 0,1	106,87 ± 1,7
8	11	7,00	6,83	25,74 ± 0,8	28,8 ± 0,2	123,57 ± 1,7
9	3	7,00	4,00	30,56 ± 0,3	26,4 ± 0,3	251,60 ± 1,9
10	10	7,00	4,00	26,87 ± 0,3	28,5 ± 0,3	252,04 ± 0,2
11	6	7,00	4,00	28,65 ± 0,6	27,9 ± 0,6	254,38 ± 0,9
12	2	7,00	4,00	28,39 ± 0,5	26,8 ± 1,5	258,28 ± 0,9
13	5	7,00	4,00	27,16 ± 0,5	26 ± 0,7	255,77 ± 1,3

Berdasarkan data hasil analisis pada **Tabel 4.2**, kemudian dilakukan analisis secara statistika dengan menggunakan Software *Design Expert 7.1.5* sehingga didapatkan model yang tepat dan optimasi yang sesuai terhadap variabel lama waktu ekstraksi (menit) dan konsentrasi asam sitrat (%) pada proses ekstraksi. Proses optimasi dengan metode permukaan respon bertujuan untuk mengetahui respon optimum dengan menentukan komposisi taraf perlakuan berdasarkan variabel terbaik (Ningsih, 2007).

Respon pertama yang dipilih pada penelitian ini adalah rendemen. Rendemen merupakan berat sampel akhir ekstrak dibagi berat sampel awal sebelum diekstrak. Nilai respon rendemen pada ekstraksi dengan konsentrasi asam sitrat 4% dengan lama waktu ekstraksi 4,17 menit atau 4 menit 10 detik menghasilkan rendemen sebesar 15,65% nilai tersebut relatif lebih rendah dibandingkan rendemen antosianin pada konsentrasi asam sitrat 4% dengan lama waktu ekstraksi 7 menit yang merupakan perlakuan titik tengah kedua faktor yaitu sebesar 30,56%. Menurut Zhang (2011), semakin lama waktu ekstraksi maka rendemen akan semakin meningkat. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu ekstraksi maka semakin lama juga kontak bahan dengan pelarut sehingga melarutkan senyawa antosianin lebih besar dan dapat meningkatkan rendemen antosianin yang dihasilkan, namun penggunaan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan degradasi senyawa antosianin yang bersifat thermolabil. Pada nilai respon rendemen dengan konsentrasi asam sitrat 1,17% dengan lama waktu ekstraksi 7 menit memiliki nilai 18,33% lebih rendah dibandingkan konsentrai asam sitrat 4% dengan lama waktu ekstraksi 7 menit yang memiliki nilai 30,56%. Menurut Surianti (2012), semakin tinggi konsentrasi asam sitrat rendemen yang dihasilkan semakin tinggi. Asam sitrat memiliki fungsi untuk mendenaturasi sel sehingga membran sel akan semakin banyak terdegradasi dan komponen pigmen akan keluar dari membran dan menghasilkan rendemen lebih banyak. Rendemen akan menurun apabila penambahan konsentrasi asam sitrat terlalu tinggi karena dapat mendegradasi senyawa antosianin. Rendemen akan menurun apabila waktu ekstraksi terlalu lama dan penambahan konsentrasi asam sitrat terlalu tinggi, karena untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang optimal dibutuhkan kesesuaian waktu, pelarut, suhu, dan pH ekstraksi.

Rendemen tertinggi yang dihasilkan pada penelitian ini mencapai 30,56%. Hasil yang didapatkan ini termasuk tinggi mengingat total rendemen

(*yield*) ekstrak antosianin pada penelitian lain sebelumnya cenderung lebih rendah. Pada penelitian Saati (2002), rendemen yang didapat pada penelitian yang dilakukan berkisar 13,07-25,43%. Selain itu Wijaya (2011) mengemukakan rendemen antosianin pada kulit buah rambutan berkisar antara 6,41%-13,67%. Hal ini disebabkan pada penelitian ini masih termasuk ekstrak antosianin kasar. Didukung Giusti dan Jing (2008) menyatakan bahwa ekstraksi antosianin dengan pelarut akan menghasilkan ekstrak antosianin kasar (*crude anthocyanin extract*) karena sistem pelarut yang digunakan untuk ekstraksi pada umumnya tidak spesifik untuk antosianin, sehingga menyebabkan adanya pengotor (*impurity*) yang ikut terekstrak dan terkonsentrasi dalam ekstrak antosianin. Senyawa pengotor ini dapat berupa gula, asam-asam organik, senyawa fenol lain selain antosianin.

Respon kedua pada penelitian ini adalah warna, dalam hal ini warna yang diinginkan adalah tingkat kecerahan (L). Tingkat kecerahan yang dihasilkan berkisar 0 – 100 dimana 0 sangat gelap dan 100 sangat terang. Pada konsentrasi asam sitrat 4% dengan lama waktu ekstraksi 4 menit 10 detik memiliki nilai respon tingkat kecerahan sebesar 29,1 dimana nilai ini relatif lebih tinggi dibandingkan konsentrasi asam sitrat 4% dengan lama waktu ekstraksi 7 menit yaitu sebesar 26,4. Hal ini disebabkan karena semakin lama waktu ekstraksi dapat menyebabkan warna antosianin menjadi gelap sehingga menurunkan tingkat kecerahan (Kalonika, 2018).

Respon ketiga pada penelitian ini adalah total antosianin. Rosela mengandung senyawa antosianin yang merupakan pigmen warna merah. Antosianin dapat digunakan sebagai pewarna alami pada produk makanan atau minuman untuk menggantikan pewarna sintetik. Nilai respon total antosianin pada lama waktu ekstraksi 4 menit 10 detik dengan konsentrasi asam sitrat 4% sebesar 116,89 ppm, dimana nilai ini relatif lebih rendah dibandingkan nilai total antosianin pada lama waktu ekstraksi 7 menit dengan konsentrasi asam sitrat 4% yang merupakan perlakuan titik tengah kedua faktor yaitu sebesar 258,28 ppm. Peningkatan kadar antosianin terjadi karena semakin lama waktu ekstraksi, semakin lama pula bahan terpapar radiasi gelombang mikro yang mengakibatkan pecahnya jaringan bahan sehingga melarutkan zat terlarut (*solute*) ke dalam pelarut (*solvent*), namun penggunaan waktu ekstraksi yang terlalu lama perlu dihindari karena dapat meningkatkan degradasi senyawa antosianin (Navas et al., 2012). Menurut Surianti (2012), semakin tinggi

konsentrasi asam sitrat semakin tinggi pula total antosianin yang didapatkan. Hal ini disebabkan karena asam sitrat dapat menurunkan pH dan membuat kondisi semakin asam, semakin asam pigmen antosianin akan berada dalam bentuk kation flavilium yang berwarna dan pengukuran absorbansi akan menunjukkan jumlah antosianin yang semakin besar.

4.3 Rendemen Antosianin

4.3.1 Pemilihan Model Respon Rendemen Antosianin

Rendemen merupakan perbandingan berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat bahan baku yang digunakan dalam satuan persen. Perhitungan rendemen bertujuan untuk mengetahui jumlah ekstrak yang didapatkan dari berat bahan baku ekstrak. Terdapat dua faktor yang digunakan dalam penentuan nilai rendemen optimal yaitu lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat. Tahapan optimasi dalam penentuan rendemen optimal dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Design Expert 7.1.5* rancangan *Central Composite Design* (CCD) dengan metode *Respon Surface Methodology* (RSM). Pemilihan model terbaik pada respon rendemen didasari oleh analisis jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan (*Lack of Fit Test*), dan ringkasan model statistik (*Model Summary Statistic*). Kesesuaian model diukur dengan nilai p yang dihasilkan.

Analisis model untuk respon rendemen disajikan dalam **Lampiran 4.3**, **Lampiran 4.4**, dan **Lampiran 4.5**. Pada **Lampiran 4.3** hasil analisis jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*) menunjukkan bahwa model kuadratik disarankan dibandingkan model lainnya karena memiliki nilai p terkecil yaitu $<0,0001$ dimana nilai ini bernilai kurang dari 5% (0,05) dengan keterangan informasi pada model ini yaitu disarankan sehingga model ini bersifat signifikan atau memiliki pengaruh yang nyata terhadap respon rendemen. Pemilihan model kuadratik pada respon rendemen didukung oleh hasil uji ketidaktepatan pada **Lampiran 4.4**. Terlihat bahwa model yang disarankan oleh program adalah model kuadratik. Model kuadratik memiliki nilai p tertinggi yakni sebesar 0,1913 dengan keterangan *suggested* atau disarankan yang artinya nilai p tersebut lebih dari 5% atau 0,05. Hal tersebut memiliki arti bahwa model tersebut memiliki ketidaktepatan atau ketidaksesuaian model yang akan memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata atau tidak signifikan

terhadap respon dan dapat dikategorikan bahwa model kuadratik telah sesuai dan merupakan model terbaik yang digunakan dalam proses analisis variabel terhadap respon. Selanjutnya pemilihan model dari segi ringkasan model statistik dapat dilihat pada **Lampiran 4.5**. Model yang disarankan adalah model kuadratik. Model kuadratik disarankan karena memiliki nilai R^2 mendekati satu yaitu sebesar 0,9545. Model kuadratik memiliki nilai *adjusted* R^2 dan *predicted* R^2 tertinggi yaitu sebesar 0,9220 dan 0,7624. Model kuadratik memiliki nilai PRESS (*Prediction Error of Sum of Squares*) dan standar deviasi terendah. Nilai PRESS model kuadratik sebesar 131,38 dan nilai standar deviasi memiliki nilai sebesar 1,90.

Proses analisis yang dilakukan selanjutnya adalah analisis ragam (ANOVA) terhadap model terbaik untuk permukaan respon yaitu model kuadratik. Data proses analisis ragam (ANOVA) terhadap respon rendemen disajikan pada **Lampiran 4.6**. Berdasarkan **Lampiran 4.6** model kuadratik memberikan pengaruh yang signifikan atau berpengaruh nyata terhadap respon rendemen. Hal ini ditunjukkan dengan nilai $p < 5\%$ (0,05) yaitu sebesar $<0,0001$, sehingga model kuadratik memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respon rendemen. Kriteria utama ketepatan model dapat dilihat berdasarkan nilai uji ketidaktepatan (*Lack of Fit*). Hasil ANOVA menunjukkan nilai *Lack of Fit* berpengaruh nyata atau bersifat signifikan jika nilai $p < 5\%$, sedangkan *Lack of Fit* bersifat tidak signifikan atau tidak berpengaruh nyata apabila nilai $p > 5\%$. Nilai *Lack of Fit* yang dihasilkan pada tabel diatas bernilai 0,1913. Nilai yang didapat menunjukkan nilai bersifat tidak signifikan atau tidak berpengaruh nyata sehingga terdapat kesesuaian data dengan model yang disarankan. Nilai *Lack of Fit* harus bersifat tidak signifikan, apabila nilai uji ketidaktepatan bersifat signifikan maka model yang digunakan tidak tepat (Shabbiri et al., 2012). Model kuadratik menunjukkan bahwa faktor konsentrasi asam sitrat dapat mempengaruhi kenaikan nilai respon rendemen hingga mencapai titik optimal, setelah mencapai titik optimal maka terjadi penurunan nilai respon rendemen. Faktor konsentrasi asam sitrat memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon rendemen karena memiliki nilai p kurang dari 0,05 yaitu sebesar 0,0406.

Respon rendemen antosianin (Y_1) ditunjukkan melalui persamaan polinomial berikut:

$$Y_1 = -54,07319 + 22,38585 X_1 + 2,09554 X_2 + 0,87417 X_1X_2 - 1,88596 X_1^2 - 0,92179 X_2^2$$

Keterangan: Y_1 = Rendemen (%); X_1 = Lama Waktu Ekstraksi (menit); X_2 = Konsentrasi asam sitrat (%)

Persamaan diatas merupakan persamaan aktual yang dibutuhkan untuk mengetahui respon rendemen yang akan didapatkan jika nilai variabel lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat yang diperlukan berbeda. Koefisien X menunjukkan besarnya kenaikan pada respon Y setiap kenaikan X sebesar satu satuan. Jika koefisien X bernilai negatif, kenaikan X akan mengakibatkan penurunan pada Y dan jika koefisien X bernilai positif, kenaikan X akan menyebabkan kenaikan pada Y (Edwards, 2009). Sesuai dengan pernyataan tersebut, persamaan diatas menunjukkan bahwa peningkatan lama waktu ekstraksi, peningkatan konsentrasi asam sitrat, dan interaksi lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat akan menaikkan rendemen antosianin.

Pada persamaan juga menunjukkan X_1^2 dan X_2^2 memiliki konstanta negatif, yang mengindikasikan adanya titik stasioner maksimum dari permukaan respon, atau grafik parabola terbuka kebawah (Budiandari dan Widjanarko, 2014). Hal ini sesuai dengan grafik interaksi 3D (**Gambar 4.3**) dimana grafik parabola terbuka kebawah yang menandakan setelah melewati titik optimal maka akan terjadi penurunan nilai respon.

Dari hasil ANOVA yang didapatkan pada **Lampiran 4.6** dapat disimpulkan bahwa faktor konsentrasi asam sitrat bersifat signifikan atau memberikan pengaruh nyata terhadap respon rendemen. Peningkatan konsentrasi asam sitrat berpengaruh terhadap kenaikan konsentrasi asam sitrat. Hal ini juga sesuai pada hasil ANOVA yang didapat bahwa konsentrasi asam sitrat berpengaruh signifikan terhadap respon rendemen antosianin yang ditunjukkan dengan nilai p sebesar 0,0406 (< 5%). Menurut Maharani (2016), konsentrasi asam sitrat memberikan pengaruh signifikan terhadap respon rendemen dikarenakan penambahan asam sitrat saat ekstraksi berfungsi untuk mendenaturasi sel agar keluar dari jaringan, sehingga semakin banyak membran yang terdegradasi maka pigmen akan lebih mudah keluar dan rendemen yang dihasilkan semakin meningkat.

Sesuai pada penelitian Basito (2011) rendemen yang didapatkan pada perlakuan kontrol tanpa penambahan asam menghasilkan rendemen yang

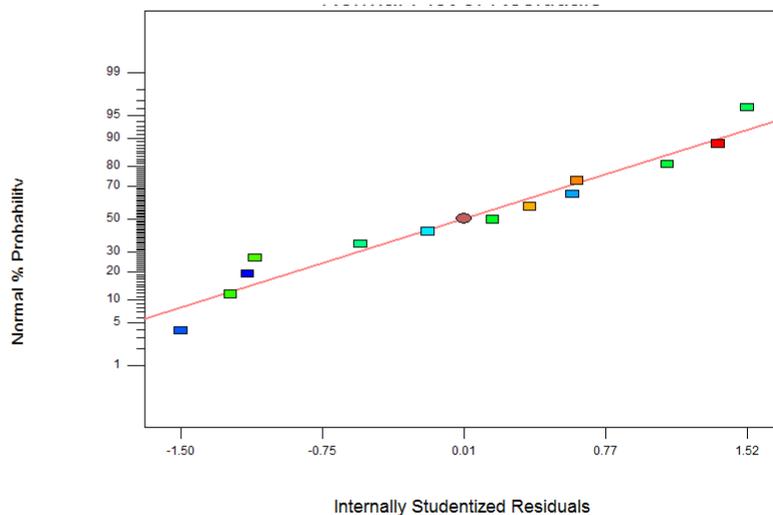
memiliki jumlah lebih kecil dibandingkan hasil rendemen penambahan pelarut yang ditambahkan dengan asam. Hal ini dikarenakan asam dapat berfungsi mendenaturasi membran sel, sehingga pigmen antosianin dapat lebih mudah keluar. Asam pada suatu larutan disebabkan karena memiliki unsur H^+ . Semakin banyak unsur H^+ yang terkandung maka semakin asam pula yang dapat menyebabkan penurunan pH. pH merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi antosianin. Semakin rendah nilai pH maka antosianin akan lebih stabil. Hal ini sesuai dengan pernyataan Abbas (2003), yang mengemukakan bahwa antosianin dapat lebih stabil dalam perlakuan asam dibandingkan pada perlakuan netral atau basa. Keadaan yang semakin asam akan menyebabkan semakin banyak pigmen antosianin berada dalam bentuk kation flavilium atau oxonium yang berwarna dan pengukuran absorbansi akan menunjukkan jumlah antosianin yang semakin besar. Keadaan yang semakin asam menyebabkan semakin banyak dinding sel vakuola yang pecah sehingga pigmen antosianin semakin banyak yang terekstrak (Mardiah, 2010).

Pada penelitian Catrien (2009), nilai konstanta laju degradasi antosianin (k) akibat proses pemanasan pada model minuman kopigmentasi antosianin-*rosmarinic acid* lebih rendah dibandingkan dengan nilai konstanta laju degradasi antosianin (k) akibat proses pemanasan pada model minuman antosianin kontrol (antosianin tunggal). Hal ini menunjukkan bahwa degradasi antosianin rosela dengan kopigmentasi *rosmarinic acid* berlangsung lebih sulit daripada antosianin tunggal (tanpa kopigmentasi *rosmarinic acid*).

Peningkatan konsentrasi asam sitrat berhubungan dengan peningkatan rendemen. Namun penggunaan asam sitrat dengan konsentrasi yang terlalu tinggi tidak dianjurkan pada saat proses ekstraksi. Penggunaan konsentrasi asam sitrat yang terlalu tinggi akan mendegradasi senyawa antosianin, yang menyebabkan terjadinya penurunan pada rendemen. Penurunan ini ditunjukkan dengan konstanta yang dimiliki nilai konsentrasi asam sitrat kuadrat (X_2^2) negatif, dimana semakin tinggi konsentrasi asam sitrat yang ditambahkan maka rendemen yang dihasilkan akan mengalami penurunan.

4.3.2 Pengaruh Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat Terhadap Respon Rendemen

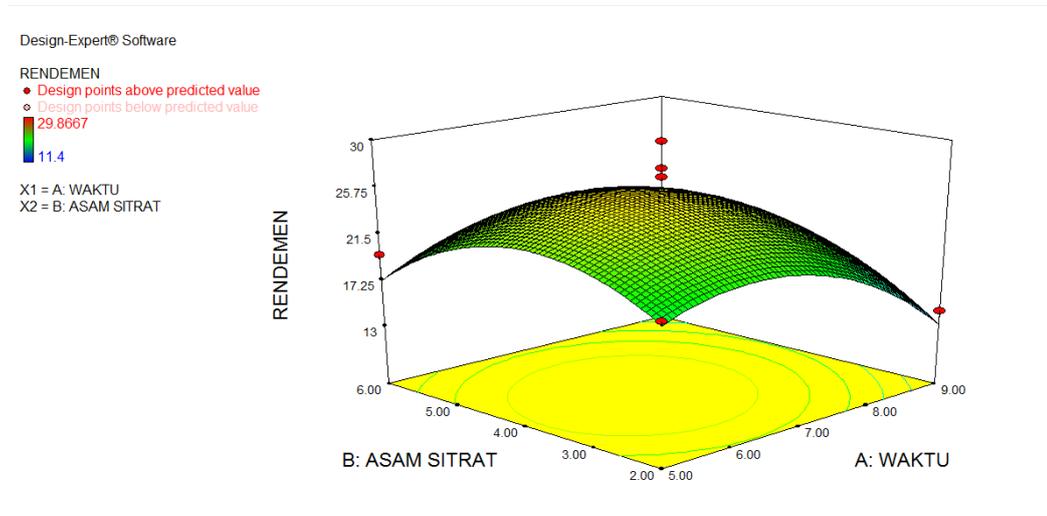
Pemilihan model untuk respon rendemen telah dianalisis dan menunjukkan model yang disarankan adalah model kuadratik. Kurva *Normal Plot Residuals* (**Gambar 4.1**) akan menggambarkan pendistribusian sebaran data. Kurva ini digunakan untuk mengetahui model terpilih telah signifikan. **Gambar 4.1** menunjukkan bahwa tidak semua titik residual berada tepat di sepanjang garis normal (garis tengah), namun residual masih tersebar di sepanjang garis normal antara presentase peluang kenormalan dengan residual. Data yang menyebar normal ditunjukkan dengan titik-titik residual yang mendekati garis kenormalan. Semakin mendekati garis kenormalan maka hasil aktual akan semakin mendekati hasil yang diprediksikan oleh program (Kumari dkk, 2008).



Gambar 4.1 Grafik *Normal Plot of Residuals* terhadap Respon Rendemen

Hubungan antara variabel lama waktu ekstraksi (X_1) dan konsentrasi asam sitrat (X_2) terhadap respon rendemen digambarkan dengan kontur plot dan grafik permukaan respon yang dapat dilihat pada **Lampiran 4.9** dan **Gambar 4.3**. Respon rendemen digambarkan dalam kontur plot yang menunjukkan perwakilan nilai spesifik yang tinggi pada permukaan respon. Selain itu, grafik kontur baik dalam bentuk 2D dan 3D menggambarkan pengaruh dan interaksi kedua faktor terhadap respon. Rakhmi (2013) menunjukkan bahwa grafik kontur

menampilkan kondisi kedua faktor dimana nilai respon maksimal akan ditandai dengan wilayah bertingkat kecerahan merah.



Gambar 4.2 Grafik 3D – *Surface* Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat pada Respon Rendemen

Grafik kontur plot dapat dilihat pada **Lampiran 4.9**. Pada **Gambar 4.3** menunjukkan pengaruh lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat terhadap respon rendemen. Grafik kontur pada **Lampiran 4.9** menunjukkan interaksi kedua faktor yang bersifat kuadratik terhadap respon rendemen, dimana sumbu x menunjukkan lama waktu ekstraksi dan sumbu y menunjukkan konsentrasi asam sitrat. Warna jingga pudar yang melingkar pada tengah grafik semakin melebar diikuti dengan gradasi kuning, hijau, menuju biru. Warna jingga pada grafik kontur menunjukkan hasil rendemen tertinggi, dan warna biru menunjukkan hasil rendemen terendah. Menurut Anugroh (2017), semakin kuat perbedaan warna semakin besar pula perbedaan nilai yang ditunjukkan. Bagian tengah grafik kontur memiliki lima titik merah. Lima titik merah yang terdapat pada grafik menunjukkan lima titik pusat dari percobaan yang dilakukan, sehingga dilakukan lima kali pengulangan dalam kombinasi percobaan pada variabel lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat. Dari grafik kontur dapat juga dilihat titik pusat tidak tepat berada di tengah, yang menandakan nilai respon terbaik akan didapat apabila kedua faktor sedikit bergeser dari titik tengahnya.

Bentuk permukaan dari faktor lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat dapat lebih jelas dilihat pada **Gambar 4.2**. Gambar menunjukkan kurva parabola terbuka kebawah yang menunjukkan bahwa nilai rendemen tertinggi dihasilkan pada sekitaran waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat di titik tengah yang ditentukan. Perbedaan nilai respon digambarkan dari perbedaan ketinggian permukaan. Permukaan yang tinggi menunjukkan nilai respon rendemen lebih besar dibandingkan permukaan rendah yang menunjukkan nilai respon rendemen yang lebih kecil. Gradiasi warna juga menandakan bahwa nilai rendemen yang didapat semakin tinggi sesuai dengan semakin lama waktu ekstraksi dan semakin tinggi konsentrasi asam sitrat. Konsentrasi asam sitrat memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respon rendemen yang menghasilkan nilai semakin tinggi. Menurut Surianti (2015), asam sitrat berfungsi untuk mendenaturasi sel sehingga diduga dengan meningkatkan konsentrasi asam sitrat, membran sel akan lebih banyak terdegradasi dan komponen pigmen akan mudah keluar dari membran dan rendemen yang dihasilkan semakin besar. Hal ini sesuai dengan pernyataan Robinson (1995) dimana ekstraksi flavonoid dianjurkan dengan kondisi asam karena asam akan mendenaturasi membran sel tanaman, serta dapat mencegah oksidasi flavonoid.

4.4 Tingkat Kecerahan Antosianin (L)

4.4.1 Pemilihan Model Respon Tingkat Kecerahan Antosianin (L)

Tahapan optimasi dalam penentuan tingkat kecerahan antosianin (L) terbaik pada hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Software Design Expert 7.1.5* pada rancangan *Central Composite Design* dengan metode *Respon Surface Methodology*. *Software Design Expert* memiliki beberapa jenis model polinomial, diantaranya adalah linear, 2FI (interaksi dua variabel), kuadratik, dan kubik. Penentuan model yang akan digunakan berdasarkan hasil pengolahan data oleh program yang akan diujikan dengan nilai p pada masing-masing model. Pemilihan model terbaik dilihat berdasarkan pada beberapa evaluasi model yaitu analisis jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan (*Lack of Fit Tests*), dan ringkasan model statistic (*Model Summary Statistics*).

Analisis model untuk respon rendemen disajikan dalam **Lampiran 4.10**, **Lampiran 4.11**, dan **Lampiran 4.12**. Pada **Lampiran 4.10** menunjukkan hasil

pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Square*) diantara model linear, kuadratik, dan kubik menunjukkan model kuadratik yang disarankan (*suggested*) oleh program. Hal ini dikarenakan pada model kuadratik nilai p yang dihasilkan sebesar $<0,0001$, yang berarti nilai p kurang dari 5%. Nilai tersebut jauh lebih kecil dibandingkan dengan model lain, sehingga disarankan pada model kuadratik. Model kuadratik menunjukkan Pada uji ketidaktepatan model atau *Lack of Fit* yang disajikan pada **Lampiran 4.11** terlihat bahwa model yang disarankan oleh program adalah model kuadratik. Model kuadratik memiliki nilai p sebesar 0,0598 dengan keterangan *suggested* atau disarankan yang artinya nilai p tersebut lebih dari 5% atau 0,05, yang berarti model kuadratik memiliki ketidaktepatan atau ketidaksesuaian model yang akan memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata atau tidak signifikan terhadap respon dan dapat dikategorikan bahwa model kuadratik telah sesuai dan merupakan model terbaik yang digunakan dalam proses analisis variabel terhadap respon.

Pada **Lampiran 4.12** dapat dilihat bahwa model terbaik yang disarankan untuk respon tingkat kecerahan (L) oleh program adalah model kuadratik. Hal ini dikarenakan model kuadratik telah memenuhi syarat analisis ringkasan model statistik. Berdasarkan evaluasi model, dapat disimpulkan bahwa model kuadratik merupakan model yang tepat untuk menunjukkan hubungan antara lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat dengan respon tingkat kecerahan (L). Model kuadratik menunjukkan bahwa faktor konsentrasi asam sitrat dan lama waktu ekstraksi menyebabkan terjadinya penurunan tingkat kecerahan antosianin hingga tercapai titik optimal, setelah tercapai kondisi optimal terjadi kenaikan nilai respon tingkat kecerahan antosianin.

Hasil analisis ragam (ANOVA) respon tingkat kecerahan dapat dilihat pada **Lampiran 4.13**. **Lampiran 4.13** menunjukkan bahwa faktor lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat pada model kuadratik memberikan pengaruh nyata atau bersifat signifikan terhadap respon tingkat kecerahan. Hal ini terlihat pada nilai p masing-masing faktor yang dihasilkan, dimana nilai p pada faktor lama waktu ekstraksi asam sitrat menghasilkan nilai p sebesar $<0,0001$ dan nilai p pada faktor konsentrasi asam sitrat sebesar 0,0016. Dilihat dari **Lampiran 4.13**, *Lack of Fit* yang dihasilkan dari analisis ragam (ANOVA) menghasilkan nilai p sebesar 0,0598. Sehingga *Lack of Fit* yang dihasilkan bersifat tidak signifikan karena memiliki nilai p lebih besar dari 5%.

Berdasarkan hasil ANOVA respon tingkat kecerahan antosianin, didapatkan persamaan model yang dihasilkan oleh program *Design Expert*. Bentuk persamaan dari model kuadratik terhadap respon tingkat kecerahan antosianin sebagai berikut:

$$Y = 89,35632 - 14,59779 X_1 - 8,19847 X_2 - 0,13563 X_1X_2 + 1,24559 X_1^2 + 0,96434 X_2^2$$

Keterangan: Y = Tingkat Kecerahan (L); X_1 = Lama Waktu Ekstraksi (menit); X_2 = Konsentrasi asam sitrat (%)

Persamaan diatas berfungsi untuk mengetahui nilai respon tingkat kecerahan apabila faktor lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat dilakukan berbeda. Menurut Edwards dan Cable (2009), koefisien X_1 dan X_2 menunjukkan besarnya kenaikan atau penurunan nilai Y. Koefisien X_1 dan X_2 bernilai positif akan meningkatkan nilai Y, sebaliknya apabila Koefisien X_1 dan X_2 bernilai negatif akan menurunkan nilai Y. Pada persamaan diatas koefisien X_1 dan X_2 memiliki nilai negatif, sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu ekstraksi dan semakin tinggi konsentrasi asam sitrat maka akan menurunkan nilai tingkat kecerahan antosianin.

Variabel lama waktu ekstraksi memiliki konstanta negatif, yang mengartikan bahwa semakin lama waktu ekstraksi maka tingkat kecerahan (L) yang dihasilkan pada ekstrak antosianin mengalami penurunan. Lama waktu ekstraksi memberikan pengaruh yang signifikan pada hasil ANOVA pada **Lampiran 4.13**. Nilai p hasil ANOVA respon tingkat kecerahan (L) sebesar $<0,0001$ sehingga bersifat signifikan atau berpengaruh nyata terhadap respon. Menurut Wicaksono (2013), menurunnya tingkat kecerahan seiring meningkatnya lama waktu ekstraksi disebabkan karena jumlah antosianin yang terekstrak semakin banyak. Total antosianin dalam kandungan suatu bahan mempengaruhi nilai tingkat kecerahan (L) ekstrak, dimana semakin banyak jumlah antosianin yang terkandung maka nilai kecerahan menjadi turun dan menyebabkan warna ekstrak menjadi semakin gelap. Pernyataan ini didukung oleh Calvanti et al (2012) yang menjelaskan bahwa bertambahnya konsentrasi antosianin dalam ekstrak akan menyebabkan stabilitas antosianin menjadi meningkat dan membuat warna ekstrak menjadi lebih pekat dan gelap. Hal ini terjadi dikarenakan semakin banyaknya gugus *chromophore* yang terkandung dalam bahan. Gugus *chromophore* adalah gugus pembawa warna pada suatu pigmen

(Delgado-Vargas et al., 2000). Dimana semakin tinggi konsentrasi pigmen antosianin maka jumlah gugus *chromophore* akan semakin banyak dan menyebabkan warna menjadi lebih gelap. Sebaliknya, apabila konsentrasi antosianin yang dihasilkan semakin rendah, nilai L yang dihasilkan akan semakin tinggi (Yang and Zhai, 2010). Waktu ekstraksi yang semakin lama akan menyebabkan peningkatan suhu pada proses ekstraksi. Semakin lama waktu ekstraksi dengan *microwave* maka akan terjadi peningkatan suhu saat proses ekstraksi. Hal ini disebabkan karena energi gelombang mikro menyebabkan pergerakan molekuler dengan cara migrasi ion dan rotasi dipol. Pergerakan yang sangat cepat ini menyebabkan terjadinya friksi atau gesekan dan mengakibatkan terjadinya panas. Panas yang tinggi akan menyebabkan perubahan warna pada ekstrak menjadi kecoklatan yang disebabkan oleh reaksi Maillard. Reaksi Maillard adalah penyebab utama pencoklatan yang terbentuk sewaktu proses pemanasan. Reaksi Maillard ini dapat terjadi karena gula (sukrosa) dan asam amino dalam rosella maupun komponen karbonil dari lemak teroksidasi sehingga terjadinya pencoklatan pada produk (Hayati, 2011).

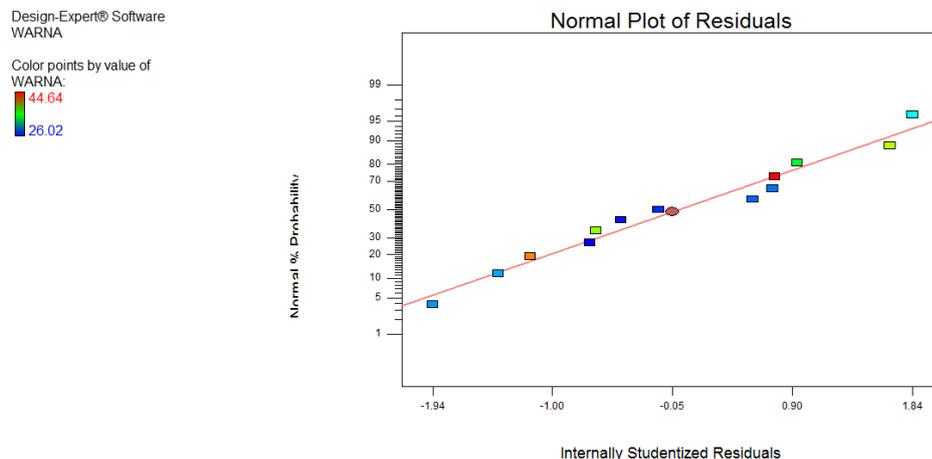
Selain variabel lama waktu ekstraksi, peningkatan konsentrasi asam sitrat memiliki konstanta negatif bila dilihat pada persamaan aktual diatas. Konstanta negatif yang dimiliki pada variabel konsentrasi asam sitrat menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi asam sitrat yang ditambahkan saat proses ekstraksi maka akan menyebabkan penurunan pada tingkat kecerahan (L). Sesuai pada hasil ANOVA pada **Lampiran 4.13** menunjukkan bahwa faktor konsentrasi asam sitrat berpengaruh nyata atau bersifat signifikan pada respon yang ditunjukkan pada nilai p yang dihasilkan kurang dari 5% yaitu sebesar 0,0016. Konsentrasi asam sitrat berhubungan dengan nilai pH pada suatu larutan, dimana semakin tinggi konsentrasi asam sitrat yang ditambahkan maka akan mengalami penurunan nilai pH. Hal ini disebabkan karena asam sitrat berperan sebagai pengasam, sehingga dapat menurunkan nilai pH. Unsur yang menyebabkan rasa asam pada asam sitrat adalah adanya ion H^+ . Apabila asam sitrat yang ditambahkan pada pelarut semakin banyak, semakin besar pula bagian ion H^+ yang dilepaskan sehingga menurunkan nilai pH. Nilai pH yang dihasilkan selama proses ekstraksi berhubungan pada tingkat kemerahan larutan ekstrak yang dihasilkan. Semakin rendah nilai pH suatu larutan akan meningkatkan tingkat kemerahan ekstrak antosianin. Antosianin pada suasana asam mendekati pH 1, akan berbentuk kation flavilium. Saat antosianin berbentuk kation flavilium,

antosianin menghasilkan warna merah pada kesetimbangan antosianin. Hal inilah yang menyebabkan tingkat kemerahan semakin meningkat selama penurunan antosianin. Pada saat antosianin berbentuk kation flavilium, antosianin cenderung akan lebih stabil (He dan Gusti, 2010). Tingkat kemerahan antosianin berhubungan dengan tingkat kecerahan ekstrak antosianin yang dihasilkan. Dimana semakin tinggi nilai tingkat kemerahan pada ekstrak, warna ekstrak yang dihasilkan akan semakin gelap dan pekat, yang menyebabkan penurunan pada tingkat kecerahan (L).

Penelitian Fajarwati (2017), menunjukkan bahwa variasi asam sitrat memberikan pengaruh nyata terhadap nilai L manisan kering labu siam (*Sechium edule* Sw.) dengan pemanfaatan pewarna alami dari ekstrak rosela ungu (*Hibiscus sabdariffa* L.). Dapat disimpulkan dari hasil penelitian bahwa semakin tinggi konsentrasi asam sitrat maka semakin rendah nilai L atau semakin rendah tingkat kecerahan manisan. Hal ini berkaitan dengan adanya reaksi oksidasi asam askorbat yang menghasilkan senyawa furfural membentuk senyawa berwarna coklat. Rosela merah mengandung asam askorbat sebesar 184,98 mg dalam setiap 100 gr kelopak bunga rosela segar (Yuariski, 2014). Asam askorbat yang berinteraksi dengan asam sitrat akan menghasilkan produk berwarna coklat disebabkan asam sitrat memiliki peranan penting pada proses *browning* apabila berinteraksi dengan produk yang mengandung asam askorbat.

4.4.2 Pengaruh Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat Terhadap Respon Tingkat Kecerahan

Pemilihan model yang disarankan oleh program *Design Expert* adalah model kuadratik. Berdasarkan model kuadratik yang telah disarankan, hasil kurva *Normal Plots of Residuals* dapat dilihat pada **Gambar 4.3**.



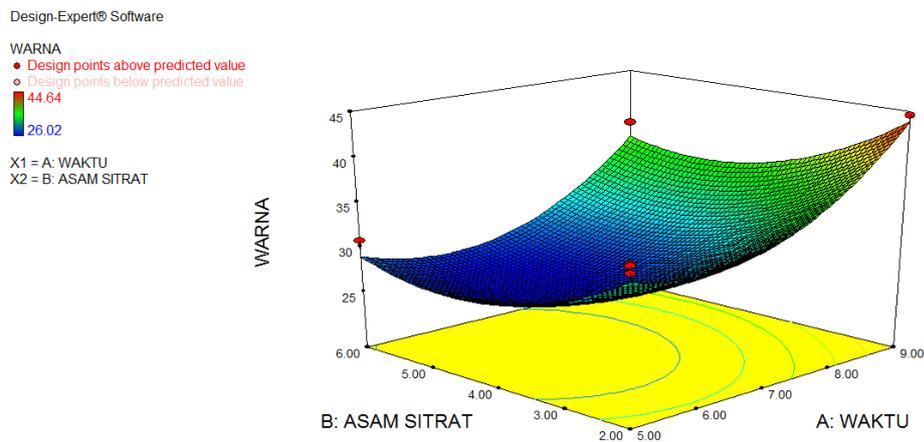
Gambar 4.3 Grafik *Normal Plot of Residuals* terhadap Respon Tingkat Kecerahan Antosianin (L)

Gambar 4.3 menunjukkan persebaran titik-titik residual, dimana titik-titik residual walaupun tidak semua berada tepat di garis tengah namun dapat dilihat dari persebarannya titik-titik residual masih tersebar di sepanjang garis tengah. Data yang mendekati garis tengah atau garis normal plot dianggap memiliki data yang normal dan sebarannya merata (Trihaditia, 2016).

Hubungan antara faktor lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat terhadap respon tingkat kecerahan digambarkan pada grafik kontur plot (**Lampiran 4.16**) dan grafik 3D permukaan respon tingkat kecerahan antosianin (**Gambar 4.4**). Pada grafik kontur plot (**Lampiran 4.16**) sumbu x menunjukkan faktor lama ekstraksi dan sumbu y menunjukkan faktor konsentrasi asam sitrat. Warna yang berbeda pada grafik menunjukkan perbedaan nilai respon tingkat kecerahan antosianin. Grafik terluar dengan warna merah pada grafik menunjukkan nilai respon tingkat kecerahan tertinggi, sedangkan warna biru pada grafik menunjukkan nilai respon tingkat kecerahan terendah. Pada

Lampiran 4.16 garis melingkar menunjukkan hasil respon yang diamati. Hasil respon optimum terletak di tengah dan ditandai dengan titik berwarna merah, sehingga dapat dilihat bahwa pada gambar tersebut titik optimum berada di area berwarna biru dengan data respon terendah. Pada grafik kontur titik pusat tidak tepat berada di tengah, yang menandakan nilai respon terbaik akan didapat apabila kedua faktor sedikit bergeser dari titik tengahnya.

Garis-garis pada grafik kontur plot menunjukkan kombinasi antar faktor dengan permukaan dapat dilihat lebih jelas pada grafik 3D yang ditunjukkan pada **Gambar 4.4**.



Gambar 4.4 Grafik 3D – *Surface* Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat pada Respon Tingkat Kecerahan Antosianin (L)

Pada **Gambar 4.4** menunjukkan kurva berbentuk parabola terbuka keatas, hal ini memperlihatkan bahwa nilai tingkat kecerahan antosianin dihasilkan pada sekitaran titik tengah lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat yang telah ditentukan. Pada **Gambar 4.4** juga terlihat titik optimum berada di permukaan yang lebih rendah menunjukkan nilai respon tingkat kecerahan antosianin yang lebih kecil. Semakin tinggi konsentrasi asam sitrat yang ditambahkan, tingkat kecerahan antosianin akan semakin rendah. Hal ini sesuai dengan penelitian Hermawati (2015), dimana tingkat kecerahan antosianin daun jati semakin rendah seiring dengan penambahan konsentrasi asam sitrat. Penggunaan asam sitrat menyebabkan penurunan kecerahan antosianin ditandai dengan peningkatan warna gelap akibat kenaikan total antosianin yang

terekstrak dengan ditandai kenaikan intensitas warna merah (a). Selain faktor penambahan asam sitrat, faktor lama waktu ekstraksi pada hasil ANOVA bersifat signifikan sehingga faktor ini memberikan pengaruh nyata terhadap respon tingkat kecerahan. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu ekstraksi, tingkat kecerahan antosianin akan semakin menurun dikarenakan jumlah antosianin yang terekstrak semakin banyak. Sebaliknya, tingkat kecerahan antosianin akan semakin meningkat bila jumlah antosianin yang terekstrak sedikit. Diduga hal ini disebabkan oleh banyaknya gugus *chromophore* yang terkandung dalam antosianin. Gugus *chromophore* merupakan gugus pembawa warna pada suatu pigmen, dimana semakin banyak jumlah gugus *chromophore* maka warna yang dihasilkan semakin gelap. Berdasarkan penelitian Putri (2015), semakin lama waktu ekstraksi mengakibatkan semakin menurunnya tingkat kecerahan ekstrak antosianin. Nilai rerata tingkat kecerahan pada waktu ekstraksi selama 3 menit sebesar 21,20 dan nilai rerata tingkat kecerahan pada waktu ekstraksi selama 7 menit sebesar 19,60. Hal ini didukung pada penelitian Cavalcanti (2011), yang menyatakan bahwa konsentrasi antosianin yang terkandung dalam suatu ekstrak semakin tinggi menyebabkan bertambahnya stabilitas antosianin sehingga warna akan semakin pekat dan gelap. Hal ini serupa dengan laporan Yang and Zhai (2010) mengenai ekstraksi antosianin dari tongkol jagung ungu dengan metode MAE. Dimana pada hasil penelitian terdapat korelasi negatif antara total antosianin dengan tingkat kecerahan ($r = -0,899$). Hal ini mengindikasikan bahwa semakin rendah tingkat kecerahan (L), semakin tinggi konsentrasi pigmen antosianin dalam ekstrak.

4.5 Total Antosianin

4.5.1 Pemilihan Model Respon Total Antosianin

Tujuan dilakukannya uji total antosianin adalah untuk mengetahui total antosianin yang terkandung pada suatu sampel. Tahapan optimasi dalam penentuan total antosianin optimal dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Design Expert 7.1.5* rancangan *Central Composite Design* (CCD) dengan metode *Respon Surface Methodology* (RSM). Terdapat dua faktor yang digunakan dalam penentuan total antosianin yaitu konsentrasi asam sitrat dan lama waktu ekstraksi. Pemilihan model yang tepat untuk respon total antosianin didasari oleh beberapa tahapan dan sejumlah kriteria yang harus dipenuhi.

Tahapan pertama ditinjau dari analisis jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan (*Lack of Fit Test*), dan ringkasan model statistik (*Model Summary Statistic*). Tahap pemilihan model selanjutnya dilakukan dengan analisis *Lack of Fit*. Pemilihan model selanjutnya ditinjau dari ringkasan model statistik (*Model Summary Statistics*).

Analisis model untuk respon rendemen disajikan dalam **Lampiran 4.17**, **Lampiran 4.18**, **Lampiran 4.19**. Berdasarkan **Lampiran 4.17**, terdapat satu model yang disarankan oleh program yaitu model kuadrat. Model kuadrat ini dipilih karena memiliki nilai p kurang dari 5% yakni sebesar $<0,0001$, sehingga model kuadrat bersifat signifikan atau memiliki pengaruh nyata terhadap respon total antosianin. Penelitian lain yang dilakukan oleh Marpaung (2012) juga memilih model kuadrat untuk optimasi ekstraksi antosianin dari bunga telang. Model kuadrat disarankan oleh program karena memiliki nilai p yang lebih kecil dibandingkan model kubik.

Selanjutnya dilakukan uji ketidaktepatan model atau *Lack of Fit* yang disajikan pada **Lampiran 4.18**. **Lampiran 4.18** menunjukkan model kuadrat merupakan model yang disarankan oleh program dimana model kuadrat memiliki nilai p lebih dari 5% yang menunjukkan bahwa model ini memiliki ketidaktepatan atau ketidaksesuaian model yang akan memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata atau tidak signifikan terhadap respon dan dapat dikategorikan bahwa model kuadrat telah sesuai dan merupakan model terbaik yang digunakan dalam proses analisis variabel terhadap respon. **Lampiran 4.19** menunjukkan bahwa model yang disarankan atau *suggested* adalah model kuadrat. Berdasarkan evaluasi model, model kuadrat merupakan model terbaik karena memiliki nilai standar deviasi dan PRESS terendah dari model linear dan model 2FI, serta memiliki nilai R^2 , *adjusted* R^2 , dan *predicted* R^2 tertinggi dari kedua model diatas. Model kuadrat menunjukkan bahwa faktor lama waktu ekstraksi memiliki pengaruh nyata untuk meningkatkan nilai total antosianin hingga mencapai titik optimal, setelah melewati titik optimal terjadi penurunan total antosianin yang dapat terlihat pada **Gambar 4.6** grafik berbentuk parabola terbuka kebawah.

Analisis ragam (ANOVA) terhadap model terbaik untuk permukaan respon yaitu model kuadrat ditunjukkan pada **Lampiran 4.20**. Berdasarkan **Lampiran 4.20**, model kuadrat bersifat signifikan, ditunjukkan dengan nilai p yang dihasilkan sebesar $<0,0001$ yang memiliki nilai p kurang dari 5% dan

memiliki arti bahwa model kuadratik memberikan pengaruh yang nyata terhadap respon total antosianin. Ditinjau dari faktor lama waktu ekstraksi memberikan pengaruh nyata atau bersifat signifikan karena memiliki nilai p kurang dari 5% yaitu 0,0014, sedangkan faktor konsentrasi asam sitrat memiliki nilai yang tidak signifikan atau berpengaruh nyata karena menghasilkan nilai p sebesar 0,1204.

Faktor lama waktu ekstraksi memberikan pengaruh nyata karena pada proses ekstraksi dengan berbantu gelombang mikro, semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka semakin lama pula bahan terpapar oleh gelombang mikro yang mengakibatkan pecahnya jaringan bahan dan mengeluarkan senyawa terlarut ke pelarut. Energi gelombang mikro akan memberikan efek terhadap pergerakan molekuler sehingga menghasilkan panas. Panas inilah yang akan merusak dinding sel atau jaringan pada bahan. Dinding sel atau jaringan yang telah rusak karena panas akan mengeluarkan *solute* kedalam *solvent* (Putri, 2015). Pada **Lampiran 4.20 Lack of Fit** bersifat tidak signifikan, dimana nilai p yang ditunjukkan kurang dari 5%. Hal ini menunjukkan bahwa ketidaksesuaian model tidak memberikan pengaruh nyata, sehingga model kuadratik menggambarkan data respon total antosianin dengan baik.

Berdasarkan hasil ANOVA respon total antosianin dengan model kuadratik, didapatkan persamaan model yang diberikan oleh program *Design Expert*. Persamaan ini ditunjukkan agar dapat mengetahui nilai respon total antosianin apabila faktor lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat dilakukan dengan berbeda. Bentuk persamaan dari model kuadratik terhadap respon total antosianin adalah sebagai berikut:

$$Y = -984,12955 + 269,23044 X_1 + 153,71972 X_2 - 1,93777 X_1X_2 - 18,96698 X_1^2 - 17,33188 X_2^2$$

Keterangan: Y = Total Antosianin (ppm); X_1 = Lama Waktu Ekstraksi (menit); X_2 = Konsentrasi asam sitrat (%)

Pada persamaan diatas, koefisien X_1 (lama waktu ekstraksi) dan X_2 (konsentrasi asam sitrat) bernilai positif yang akan meningkatkan nilai Y (total antosianin). Pada persamaan diatas dapat juga terlihat bahwa koefisien X_1^2 dan X_2^2 memiliki koefisien negatif. Hal ini mengindikasikan adanya titik stasioner maksimum dari permukaan respon atau grafik parabola terbuka kebawah (Budiandari dan Widjanarko, 2014). Pernyataan tersebut sesuai dengan grafik interaksi 3D (**Gambar 4.6**) dimana grafik parabola terbuka kebawah.

Pada persamaan menunjukkan lama waktu ekstraksi yang memiliki konstanta positif dan pada **Lampiran 4.20** bahwa faktor lama waktu ekstraksi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respon total antosianin, dimana peningkatan lama waktu ekstraksi akan meningkatkan total antosianin hingga mencapai nilai optimal. Sesuai dengan pernyataan Wicaksono (2013) dimana kadar antosianin ekstrak akan cenderung meningkat dengan semakin lamanya waktu ekstraksi dengan *microwave*. Peningkatan total antosianin dikarenakan bahan yang semakin lama terpapar oleh radiasi gelombang mikro dari *microwave* akan mengakibatkan pecahnya jaringan bahan sehingga meluarkan zat terlarut (*solute*) ke dalam pelarut (*solvent*) (Navas et al., 2012). Mandal et al (2007) mendukung pernyataan ini dengan menjelaskan bahwa secara umum, semakin lama waktu ekstraksi kuantitas bahan yang terekstrak akan semakin meningkat. Energi gelombang mikro menyebabkan pergerakan molekuler dengan cara migrasi ion dan rotasi dipol. Pergerakan yang sangat cepat ini menyebabkan terjadinya friksi atau gesekan dan mengakibatkan terjadinya panas dalam bahan sehingga dinding sel rusak dan jaringan bahan akan rusak yang mengakibatkan keluarnya *solute* semakin banyak (Delazar et al., 2012).

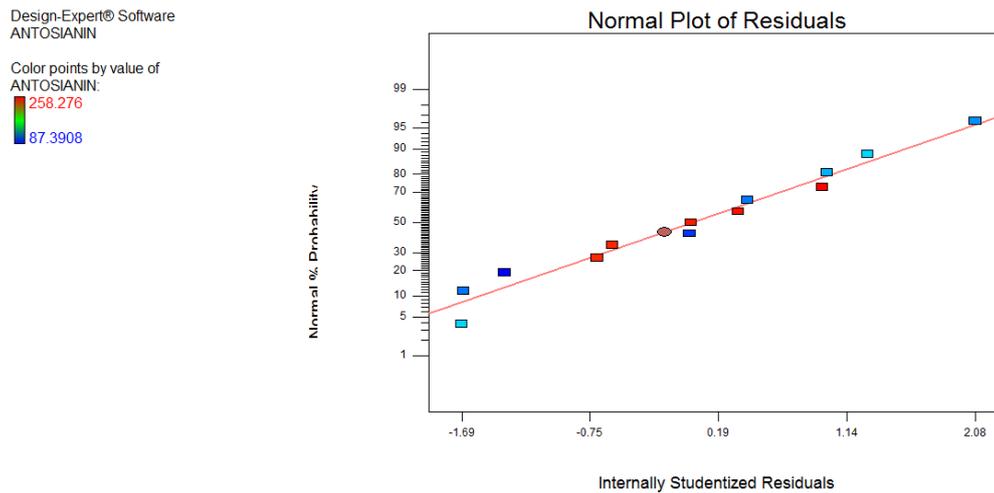
Lama waktu ekstraksi dapat mempengaruhi penurunan nilai pH pada larutan. Routray and Orsat (2012) menyebutkan bahwa nilai pH merupakan salah satu faktor penting yang dapat mempengaruhi efisiensi suatu proses ekstraksi dengan MAE. Nilai pH sendiri berhubungan erat dengan kestabilan antosianin. Antosianin akan lebih stabil pada kondisi asam dibandingkan pada kondisi basa. Di dalam larutan asam dengan pH berkisar 1 hingga 3, antosianin akan berada pada bentuk dominan kation flavilium. Pada bentuk ini, antosianin sangat berwarna dan memiliki kondisi paling stabil. Semakin turunnya nilai pH juga berhubungan dengan semakin lamanya waktu ekstraksi dengan *microwave*. Hal ini diduga berhubungan dengan energi gelombang mikro yang dapat meningkatkan ionisasi asam di dalam pelarut. Li et al (2012) menduga bahwa energi gelombang mikro menyebabkan asam yang digunakan saat proses ekstraksi meng-ion lebih kuat sehingga lebih banyak ion H⁺ (proton) yang dilepaskan. Energi gelombang mikro membuat ion-ion polar bergerak bebas dalam larutan. Semakin banyak ion H⁺ dalam suatu larutan maka akan menurunkan nilai pH menjadi semakin kecil. pH yang rendah bagus untuk kondisi ekstraksi antosianin, dimana antosianin lebih stabil pada pH asam (Castaneda-Ovando et al., 2009). Pernyataan ini didukung oleh Farida (2014) yang

menyebutkan bahwa nilai pH mengalami penurunan seiring meningkatnya lama waktu ekstraksi dengan *microwave*. Peristiwa ini disebabkan karena adanya asam-asam organik yang terkandung pada kelopak rosela ikut terekstrak dengan peningkatan lamanya waktu ekstraksi. Asam-asam organik yang terkandung pada kelopak rosela tersimpan pada organ tanaman. Asam-asam organik ini berperan sebagai cadangan energi yang siap digunakan setelah organ tersebut dipisahkan dari tanaman.

Semakin lama waktu ekstraksi saat proses ekstraksi, semakin lama pula waktu paparan gelombang mikro ke dalam bahan. Hal ini menyebabkan jumlah *solute* yang keluar dari jaringan semakin banyak dikarenakan semakin besar energi yang terserap dari gelombang mikro. Namun waktu paparan yang terlalu lama perlu dihindari karena dapat meningkatkan resiko degradasi senyawa hasil ekstraksi (Chan et al., 2011). Pada ekstraksi antosianin dari buah *mulberry* dengan MAE, lama waktu ekstraksi yang semakin lama juga akan meningkatkan kadar antosianin hingga pada tertentu (Zou et al., 2012).

4.5.2 Pengaruh Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat Terhadap Respon Total Antosianin

Pemilihan model pada respon total antosianin telah dianalisis dan menunjukkan model yang disarankan adalah model kuadrat. Hubungan lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat secara detail dapat dilihat pada **Gambar 4.5** dan **Gambar 4.6**.



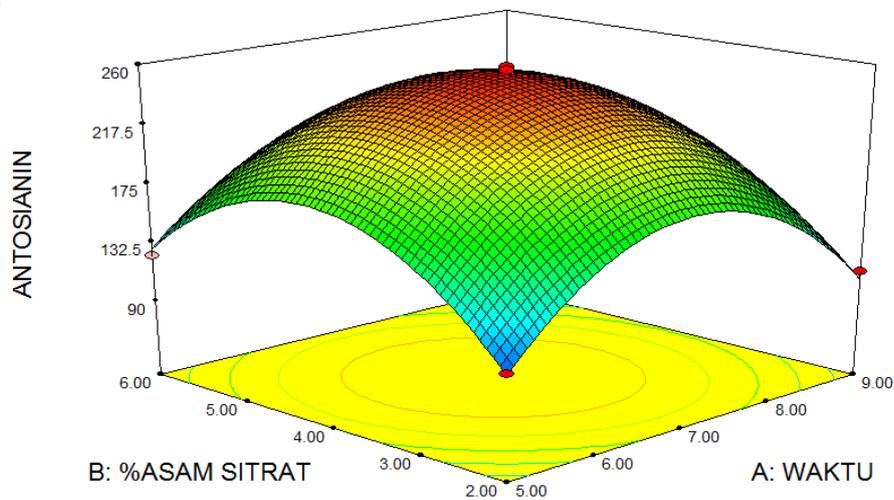
Gambar 4.5 Grafik *Normal Plot of Residuals* terhadap Respon Total Antosianin

Pada **Gambar 4.5** terlihat bahwa tidak semua titik residual berada tepat di sepanjang garis tengah, tetapi residual masih tersebar di sepanjang tengah antara presentasi peluang kenormalan dengan residual. Menurut Trihaditia (2016), data yang mendekati garis normal plot dianggap data memiliki sebaran merata dan data tersebut normal. Dapat disimpulkan bahwa data respon total kadar antosianin memiliki kenormalan data yang berarti hasil aktual akan mendekati hasil yang diprediksi oleh program.

Lampiran 4.23 menunjukkan grafik kontur dua dimensi. Pada faktor x menunjukkan faktor lama waktu ekstraksi dan pada sumbu y menunjukkan faktor konsentrasi asam sitrat. Perbedaan warna pada grafik kontur menunjukkan perbedaan nilai respon total antosianin. Dapat terlihat bahwa titik optimum ditunjukkan dengan titik (*node*) berwarna kemerahan. Titik merah menunjukkan semakin optimum nilai respon, sedangkan warna gradasi kuning menuju biru menunjukkan nilai respon yang semakin rendah. Terdapat lima titik merah pada bagian tengah gambar yang menandakan adanya lima titik tengah pada percobaan yang dilakukan, sehingga adanya lima kali perlakuan kombinasi lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat yang sama.

Gambar 4.6 merupakan grafik tiga dimensi yang menampilkan permukaan model dari kedua faktor. Gambar tersebut menunjukkan bahwa kurva berbentuk parabola kebawah. Hal ini memperlihatkan bahwa nilai total antosianin maksimum dihasilkan pada sekitaran lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam

sitrat pada titik tengah yang ditentukan. Perbedaan ketinggian permukaan menunjukkan nilai respon yang berbeda-beda pada setiap kombinasi antar faktor. Daerah permukaan yang tinggi menunjukkan bahwa jumlah total antosianin yang besar sedangkan daerah permukaan yang rendah menunjukkan jumlah total antosianin yang kecil.



Gambar 4.6 Grafik 3D – *Surface* Lama Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Sitrat pada Respon Total Antosianin

Pada **Gambar 4.6** terlihat bahwa semakin lama waktu ekstraksi dan semakin tinggi konsentrasi asam sitrat maka respon total antosianin yang dihasilkan akan semakin tinggi hingga mencapai kondisi optimum. Setelah mencapai kondisi yang optimum maka akan terjadi penurunan nilai total antosianin yang diikuti dengan semakin lama waktu ekstraksi dan semakin tinggi konsentrasi asam sitrat yang digunakan. Menurut Kurniasari (2008), pemanasan gelombang mikro terjadi melalui interaksi langsung antara material dengan gelombang mikro. Interaksi langsung ini mengakibatkan pergerakan molekul yang menciptakan panas seiring dengan timbulnya gesekan antar molekul. Gesekan ini menyebabkan dinding sel maupun jaringan bahan akan rusak dan *solute* dapat keluar, sehingga semakin lama gesekan molekul terjadi maka semakin banyak pula energi yang terserap oleh bahan sehingga *solute* akan banyak keluar sehingga meningkatkan total antosianin. Namun waktu paparan yang terlalu lama harus dihindari agar mencegah terjadinya degradasi senyawa

hasil ekstraksi (Azmi, 2015). Oleh karena itu, setelah tercapai kondisi optimum terjadi penurunan total antosianin disebabkan oleh terjadinya degradasi antosianin. Selain itu menurut Chan (2011) semakin lama ekstraksi menyebabkan larutan menjadi jenuh dan daya ekstraknya menurun sehingga penambahan waktu tidak akan memberikan konsentrasi nyata.

Selain faktor lama waktu ekstraksi, faktor konsentrasi asam sitrat juga dapat mempengaruhi respon total antosianin. Konsentrasi asam sitrat yang semakin tinggi dapat menurunkan pH pada ekstrak pekat rosela. Hal ini dikarenakan semakin tinggi tingkat keasaman suatu asam pada larutan maka semakin besar tendensi untuk melepaskan proton (ion H^+) sehingga pH menjadi turun. Penambahan jenis asam dapat berpengaruh terhadap lingkungan pH rendah yang dapat merubah pewarna semakin baik dan pH yang tinggi akan membuat pewarna semakin tidak baik. Nilai pH ekstrak pekat rosela berhubungan dengan stabilitas antosianin, semakin rendah pH maka stabilitas ekstrak semakin tinggi sehingga antosianin yang dihasilkan semakin besar. Tingkat keasaman asam organik berhubungan erat dengan tetapan disosiasi. Asam sitrat memiliki tetapan disosiasi yang lebih besar dibandingkan asam asetat. Semakin besar tetapan disosiasi semakin kuat suatu asam karena semakin besar jumlah ion hidrogen yang dilepaskan ke dalam larutan. Keadaan yang semakin asam (mendekati pH 1) akan menyebabkan semakin banyaknya pigmen antosianin berada dalam bentuk kation flavilium yang berwarna dan pengukuran absorbansi akan menunjukkan jumlah antosianin yang semakin besar. Selain itu keadaan yang semakin asam akan menyebabkan banyaknya dinding vakuola yang pecah sehingga pigmen antosianin akan semakin banyak terekstrak (Wulaningrum, 2013). Namun, konsentrasi asam sitrat yang terlalu tinggi tidak disarankan karena akan mendegradasi antosianin sehingga antosianin yang terkandung akan berkurang. Hal ini terlihat pada **Gambar 4.6** bahwa setelah melewati titik optimum, nilai total antosianin mengalami penurunan.

4.6 Solusi Optimasi Respon Rendemen, Tingkat Kecerahan (L), dan Total Antosianin

Solusi kondisi optimum yang telah ditentukan oleh program *Design Expert* 7.1.5 diperoleh dengan menentukan variabel dari respon yang diinginkan, dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4.3 Kriteria Variabel terhadap Respon yang Diinginkan

Nama Variabel	Tujuan	Batas Bawah	Batas Atas	Bobot Atas	Bobot Bawah	Kepentingan
Waktu	In range	5	9	1	1	3
%As. Sitrat	In range	2	6	1	1	3
Rendemen	Maximize	10,6233	30,560	1	1	3
Antosianin	Maximize	87,3908	258,276	1	1	3
Tingkat Kecerahan	Minimize	26,0200	44,640	1	1	3

Berdasarkan **Tabel 4.3** variabel lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat yang diinginkan berada pada rentang yang telah ditentukan batas minimum dan batas maksimumnya, yaitu 5 menit pada batas bawah dan 9 menit pada batas atas lama waktu ekstraksi dan 2% pada batas bawah dan 6% pada batas atas konsentrasi asam sitrat. Kriteria variabel lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat yang dipilih adalah *in range* karena diharapkan pada proses ekstraksi dengan lama waktu ekstraksi dan konsentrasi asam sitrat yang ditentukan didapatkan respon rendemen, tingkat kecerahan, dan total antosianin yang optimal.

Pada respon rendemen dan total antosianin, kriteria yang diinginkan adalah *maximize* dengan batas atas dan bawah untuk respon rendemen sebesar 10,6233% dan 30,56% serta batas atas dan batas bawah untuk respon total antosianin sebesar 87,3908 ppm dan 258,276 ppm. Kriteria kedua respon yang dipilih adalah *maximize* atau maksimum karena ingin mengetahui nilai rendemen dan total antosianin terbesar yang dapat dihasilkan pada ekstraksi rosela dan diharapkan mendekati nilai batas atas pada tiap respon, sedangkan kriteria respon tingkat kecerahan yang dipilih adalah *minimize* atau minimum karena diharapkan tingkat kecerahan mendekati nilai bawah respon. Batas atas pada respon tingkat kecerahan adalah 26,02 dan batas atas pada respon tingkat kecerahan adalah 44,64.

Hasil solusi kondisi optimum ekstraksi antosianin rosela yang disarankan oleh program Design Expert 7.1.5 dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.

Tabel 4.4 Solusi Titik Optimum Ekstraksi terhadap Respon Rendemen, Tingkat Kecerahan, dan Total Antosianin

Waktu	% As. Sitrat	Rendemen	Tingkat Kecerahan	Total Antosianin	Desirability
6,71	4,30	28,4115	26,151	253,054	0,94

Tabel 4.4 menjelaskan bahwa hasil analisis pengolahan data dengan menggunakan model kuadratik dengan lama waktu ekstraksi 6 menit 43 detik dan konsentrasi asam sitrat 4,30% menghasilkan rendemen sebesar 28,4115%, tingkat kecerahan 26,151, dan total antosianin sebesar 253,054 ppm dengan tingkat desirabilitas sebesar 0,94. Menurut Ramadhani (2017), formula yang paling optimal adalah formula dengan nilai desirabilitas maksimum, dimana nilai ini merupakan nilai fungsi untuk tujuan optimasi yang menunjukkan kemampuan program untuk memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang ditetapkan pada produk akhir. Nilai desirabilitas yang semakin mendekati 1 menunjukkan kemampuan program untuk menghasilkan produk yang dikehendaki semakin mendekati nilai target sesuai optimasi (Raissi and Farzani, 2009).

4.7 Verifikasi Data Hasil Optimasi

Verifikasi data hasil optimasi dilakukan untuk membuktikan bahwa solusi titik optimasi yang dihasilkan dari *Design Expert* 7.1.5 menghasilkan nilai respon yang sesuai dengan yang disarankan. Proses verifikasi dilakukan dengan menguji ulang sesuai dengan rancangan optimum yang disarankan program kemudian membandingkan hasil solusi optimum dari program yang disarankan dengan hasil verifikasi yang dilaksanakan secara langsung (aktual). Perhitungan penyimpangan dilakukan dengan membandingkan selisih dari data hasil solusi optimum dari program *Design Expert* 7.1.5 dengan hasil aktual. Hasil verifikasi berdasarkan titik optimasi disajikan pada **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5 Verifikasi Data Titik Optimasi

	Waktu (menit)	Konsentrasi Asam Sitrat (%)	Rendemen (%)	Tingkat Kecerahan	Total Antosianin (ppm)
Prediksi*	6,71	4,30	28,4115	26,151	253,054
Verifikasi**	6,71	4,30	28,74±1,21	26,1±0,35	255,49±1,67
Hasil Uji T (P Value)			0,682 (NS)	0,942 (NS)	0,126 (NS)

Keterangan: *Hasil dari program *Design Expert 7.1.5*
**Hasil data penelitian actual
*** NS = *Not Significant*

Tabel 4.5 menunjukkan bahwa didapatkan nilai verifikasi yang dilakukan yaitu nilai respon rendemen hasil ekstraksi sebesar 28,74%, nilai respon tingkat kecerahan 26,10, dan nilai respon total antosianin sebesar 255,49 ppm. Hasil verifikasi dan prediksi dilakukan uji T dengan *Minitab 17* untuk menentukan kesesuaian hasil prediksi. Nilai *p-value* pada ketiga respon memiliki nilai lebih dari 0,05 (5%) dimana artinya nilai prediksi dan nilai penelitian tidak signifikan atau tidak berbeda nyata. Hal ini mengindikasikan bahwa model sudah sesuai dan solusi variabel bebas yang diberikan program dapat diterima.

4.8 Karakterisasi Antosianin

Hasil verifikasi pada program mendapatkan solusi bahwa lama waktu ekstraksi 6,71 menit dan konsentrasi asam sitrat 4,30% merupakan kondisi optimal untuk menghasilkan rendemen, tingkat kecerahan antosianin, dan total antosianin yang optimal. Kondisi tersebut kemudian dinyatakan sebagai perlakuan terbaik yang kemudian dilakukan uji karakterisasi ekstrak antosianin. Hasil karakterisasi disajikan pada **Tabel 4.6**.

Tabel 4.6 Hasil Karakterisasi Antosianin

Parameter	Ekstrak Antosianin Hasil Optimasi	Literatur	Hasil Uji T (p value)
Total Antosianin (ppm)	255,49±1,67	14800 ^a	0,000
Aktivitas Antioksidan IC ₅₀ (ppm)	76,63 ± 2,16	202,47 ^a	0,000
Tingkat Kecerahan (L*)	26,10±0,35	32,07 ^b	0,001
Tingkat Kemerahan (a*)	41,93±0,64	47,20 ^b	0,005
Tingkat Kekuningan (b*)	15,30±0,62	19,30 ^b	0,008

Keterangan:

1. Setiap data merupakan rerata 3 kali ulangan
2. Angka dibelakang simbol ± merupakan standar deviasi

^a: Maksum, 2017

^b: Sari, 2011

Hasil respon total antosianin pada ekstrak antosianin perlakuan terbaik diperoleh sebesar 255,49 ppm dan menurut Maksum (2017) total antosianin pada perlakuan terbaik diperoleh sebesar 14800 ppm. Terdapat perbedaan total antosianin yang didapat, dimana total antosianin pada hasil analisis lebih tinggi dibandingkan total antosianin yang didapat pada perlakuan terbaik literatur. Perbedaan hasil ini kemudian dilakukan uji T dan didapat bahwa p value sebesar 0,000 sehingga terdapat perbedaan hasil yang signifikan atau berpengaruh nyata. Perbedaan hasil total antosianin dapat disebabkan karena adanya perbedaan daya microwave yang digunakan saat proses ekstraksi. Pada penelitian daya *microwave* yang digunakan sebesar 80 W, sedangkan pada literatur daya *microwave* yang digunakan sebesar 250 W. Hal ini disebabkan karena daya yang tinggi akan menghasilkan panas yang lebih tinggi pula. Menurut Maksum (2017), meningkatnya daya gelombang mikro akan berakibat pada meningkatnya energi gelombang mikro terhadap biomolekul, dengan konduksi ionik dan rotasi dipol yang berakibat disipasi daya didalam bahan dan pelarut yang berakibat pada pergerakan molekul dan pemanasan yang mengakibatkan perpindahan senyawa aktif dari sel tanaman ke dalam pelarut. Gelombang mikro digunakan untuk pemecahan sel dalam tanaman, sehingga senyawa bioaktif dapat diserap oleh pelarut. Peningkatan suhu ekstraksi *microwave* disertai dengan peningkatan daya meningkatkan kekuatan pelarut

untuk penetrasi lebih ke dalam sel sehingga diperoleh senyawa bioaktif yang tinggi.

Aktivitas Antioksidan IC_{50} yang diperoleh pada hasil perlakuan terbaik sebesar 76,63 ppm sedangkan pada penelitian Maksum (2017) aktivitas Antioksidan IC_{50} yang diperoleh sebesar 202,47 ppm. Perbedaan hasil ini kemudian dilakukan uji T dan didapat bahwa p value sebesar 0,000 sehingga terdapat perbedaan hasil yang signifikan atau berpengaruh nyata. Aktivitas Antioksidan IC_{50} yang diperoleh apabila dibandingkan dengan literatur memiliki hasil yang lebih rendah. Menurut Djaeni (2017), suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, antioksidan kuat jika memiliki nilai IC_{50} 50-100 ppm, sedang jika memiliki nilai IC_{50} bernilai 100-150 ppm dan lemah jika memiliki nilai IC_{50} 151-200 ppm. Perbedaan hasil aktivitas antioksidan IC_{50} antara hasil analisis dan literatur dapat disebabkan karena adanya perbedaan daya gelombang yang digunakan saat melakukan proses ekstraksi. Pada penelitian daya *microwave* yang digunakan sebesar 80 W, sedangkan pada literatur daya *microwave* yang digunakan sebesar 250 W. Hal ini disebabkan karena daya yang tinggi akan menghasilkan panas yang lebih tinggi pula. Menurut Maksum (2017), meningkatnya daya gelombang mikro akan berakibat pada meningkatnya energi gelombang mikro terhadap biomolekul, dengan konduksi ionik dan rotasi dipol yang berakibat disipasi daya didalam bahan dan pelarut yang berakibat pada pergerakan molekul dan pemanasan yang mengakibatkan perpindahan senyawa aktif dari sel tanaman ke dalam pelarut. Daya *microwave* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi pada rendemen senyawa fenol. Hal ini dikarenakan fenol merupakan senyawa yang peka terhadap panas dalam daya gelombang mikro yang lebih tinggi, sehingga menyebabkan terjadinya degradasi fenol dan penurunan aktivitas antioksidan (Purbowati, 2016).

Tingkat kecerahan antosianin yang diperoleh pada hasil perlakuan terbaik sebesar 26,10 sedangkan pada penelitian Sari (2011) tingkat kecerahan antosianin yang diperoleh pada hasil perlakuan terbaik sebesar 32,07. Perbedaan hasil ini kemudian dilakukan uji T dan didapat bahwa p value sebesar 0,001 sehingga terdapat perbedaan hasil yang signifikan atau berpengaruh nyata. Perbedaan ini disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi asam sitrat yang ditambahkan pada pelarut. Konsentrasi asam sitrat perlakuan terbaik sebesar 4,30% sedangkan pada literatur tidak ditambahkan dengan asam sitrat.

Penambahan asam sitrat berfungsi untuk memberikan suasana asam saat proses ekstraksi berlangsung. Hal ini disesuaikan oleh sifat antosianin, dimana antosianin akan lebih stabil pada kondisi asam dibanding basa (Robinson, 1995). Konsentrasi asam sitrat berhubungan dengan nilai pH pada suatu larutan, dimana semakin tinggi konsentrasi asam sitrat yang ditambahkan maka akan mengalami penurunan nilai pH. Hal ini disebabkan karena asam sitrat berperan sebagai pengasam, sehingga dapat menurunkan nilai pH. Unsur yang menyebabkan rasa asam pada asam sitrat adalah adanya ion H^+ . Apabila asam sitrat yang ditambahkan pada pelarut semakin banyak, semakin besar pula bagian ion H^+ yang dilepaskan sehingga menurunkan nilai pH. Nilai pH yang dihasilkan selama proses ekstraksi berhubungan pada tingkat kemerahan larutan ekstrak yang dihasilkan. Semakin rendah nilai pH suatu larutan akan meningkatkan tingkat kemerahan ekstrak antosianin. Antosianin pada suasana asam mendekati pH 1, akan berbentuk kation flavilium. Saat antosianin berbentuk kation flavilium, antosianin menghasilkan warna merah pada kesetimbangan antosianin. Hal inilah yang menyebabkan tingkat kemerahan semakin meningkat selama penurunan antosianin. Pada saat antosianin berbentuk kation flavilium, antosianin cenderung akan lebih stabil (He dan Gusti, 2010). Tingkat kemerahan antosianin berhubungan dengan tingkat kecerahan ekstrak antosianin yang dihasilkan. Dimana semakin tinggi nilai tingkat kemerahan pada ekstrak, warna ekstrak yang dihasilkan akan semakin gelap dan pekat karena banyaknya gugus *chromophore* yang terkandung dalam ekstrak, yang menyebabkan penurunan pada tingkat kecerahan (L) (Delgado-Vargas et al., 2000). Dapat disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi asam sitrat yang lebih tinggi pada penelitian menghasilkan tingkat kecerahan yang lebih rendah dibandingkan dengan literatur.

Hasil uji T menunjukkan perbedaan yang signifikan dimana nilai p yang didapatkan kurang dari 5% pada parameter tingkat kemerahan dan tingkat kekuningan yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara hasil analisis dan literatur. Nilai p pada tingkat kemerahan didapatkan sebesar 0,005, dan nilai p pada tingkat kekuningan didapatkan sebesar 0,008. Warna kuning yang terdapat filtrat diduga karena adanya pigmen antosantin yang memberi efek warna kuning pada filtrat. Semakin tinggi konsentrasi antosianin maka tingkat kekuningan ekstrak cenderung semakin meningkat (Putri, 2015).

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Dari proses optimasi diperoleh lama waktu ekstraksi optimum sebesar 6,71 menit dan konsentrasi asam sitrat optimum sebesar 4,30% yang akan menghasilkan rendemen, tingkat kecerahan, dan total antosianin terbaik. Dari hasil penelitian diperoleh hasil rendemen terbaik sebesar 28,4115%, tingkat kecerahan terbaik sebesar 26,151, dan total antosianin terbaik sebesar 253,054.
2. Hasil dari analisis proses ekstraksi antosianin dengan *Vacuum Microwave Assisted Extraction* (VMAE) dari rosela merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) menggunakan Response Surface Methodology (RSM) diperoleh model yang disarankan adalah model kuadratik pada setiap respon. Persamaan yang diperoleh untuk respon rendemen adalah ($Y = -54,07319 + 22,38585 X_1 + 2,09554 X_2 + 0,87417 X_1X_2 - 1,88596 X_1^2 - 0,92179 X_2^2$), persamaan untuk respon tingkat kecerahan adalah ($Y = 89,35632 - 14,59779 X_1 - 8,19847 X_2 - 0,13563 X_1X_2 + 1,24559 X_1^2 + 0,96434 X_2^2$), dan persamaan untuk respon total antosianin adalah ($Y = -984,12955 + 269,23044 X_1 + 153,71972 X_2 - 1,93777 X_1X_2 - 18,96698 X_1^2 - 17,33188 X_2^2$).
3. Karakterisasi ekstrak antosianin optimal diperoleh nilai untuk respon total antosianin sebesar 255,49, tingkat kecerahan sebesar 26,10, dan aktivitas antioksidan sebesar 76,63.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan proses ekstraksi menggunakan *Vacuum Microwave Assisted Extraction* (VMAE) yang lebih stabil saat proses ekstraksi atau menggunakan atau menggunakan alat MAE modifikasi yang telah disempurnakan. Disarankan juga pada penelitian selanjutnya untuk mengaplikasikan hasil ekstraksi antosianin sebagai pewarna pada produk pangan dan melakukan uji stabilitas warna terhadap pH.