

EKSTRAKSI PIGMEN KAROTENOID LABU KABOCHA MENGGUNAKAN METODE ULTRASONIK (KAJIAN RASIO BAHAN: PELARUT DAN LAMA EKSTRAKSI)

Carotenoid Pigment Extraction Of Kabocha Using Ultrasound Assisted Extraction (Study of Material: Solvent Ratio and Extraction Time)

Arina Manasika^{1*}, Simon Bambang Widjanarko¹

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya, Malang
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, Email: manasikaaa@ymail.com

ABSTRAK

Kabocha termasuk varietas labu Jepang yang sudah marak dibudidayakan petani Indonesia. Selain cita rasanya yang lebih enak, Kabocha mengandung senyawa karotenoid tinggi mencapai 285.91 mg/100g. Karotenoid memiliki sifat fungsional sebagai antioksidan. Karotenoid dapat diambil melalui proses ekstraksi. Ekstraksi konvensional umumnya memakan waktu lama dan melibatkan proses termal yang dapat merusak karotenoid. sehingga diperlukan metode yang lebih efisien, yaitu menggunakan metode ultrasonik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi menggunakan metode ultrasonik sehingga dihasilkan ekstrak pigmen karotenoid Kabocha yang terbaik. Penelitian disusun menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor yaitu rasio bahan:pelarut (1:5, 1:7, 1:9) dan lama ekstraksi (5, 15, 25 menit). Perlakuan terbaik diperoleh dari rasio bahan:pelarut 1:9 dan lama ekstraksi 25 menit dengan total karoten 254.77 mg/100g, nilai IC_{50} 84.28 ppm, pH 6.45, rendemen 30.25%, kecerahan (L^*) 19.30, kemerahan (a^*) 13.40 dan kekuningan (b^*) 15.

Kata Kunci: Kabocha, Karotenoid, Metode Ultrasonik

ABSTRACT

Kabocha is variety of Japanese squash which widespread cultivated by farmers in Indonesia. It has delicious taste and contain high carotenoid compounds that reached 285.91 mg/100g. Carotenoids have functional properties as an antioxidant. Carotenoids can be taken through the extraction process. Conventional extraction generally takes a long time and involves a thermal process. Ultrasonic is one of the efficient method to extract a carotenoid. The aim of research was to determine the effect of material:solvent ratio and time extraction using ultrasonic methods to produce best carotenoid extracts. The research arranged using Randomized Block Design with 2 factors which is the ratio of material:solvent (1:5, 1:7, 1:9) and extraction time (5, 15, 25 minutes). The best treatment was obtained from 1:9 ratio of material:solvent and 25 minutes time extraction with 254.77 mg/100g caroten total, the value of IC_{50} 84.28 ppm, pH 6.45, yield 30.25%, brightness (L^) 19.30, redness (a^*) 13.40 and yellowness (b^*) 15.*

Keywords: Carotenoids, Kabocha, Ultrasound Assited Extraction

PENDAHULUAN

Jenis dan varietas labu kuning yang ada di Indonesia sangat beragam, salah satunya Labu Kabocha. Kabocha (*Cucurbita maxima*. L.) merupakan varietas labu kuning dari negara Jepang yang sudah marak dibudidayakan oleh petani di Indonesia. Kabocha umumnya dimasak dan dikonsumsi. Selain cita rasanya yang lebih enak, Kabocha diketahui

mengandung senyawa karotenoid yang tinggi yakni mencapai 285.91 mg/100g dibanding labu kuning biasa yang hanya sebesar 24.62 mg/100g [1]. Senyawa karotenoid merupakan pigmen larut lemak yang bertanggung jawab pada berbagai warna merah, oranye, hingga kuning. Senyawa karotenoid dikenal sebagai provitamin A. Sifat fungsional karotenoid yang lain adalah kemampuannya sebagai antioksidan sehingga dapat menangkap radikal bebas di dalam tubuh [2].

Pengeluaran senyawa karotenoid dalam Kabocha, dapat dilakukan melalui proses ekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi sangat penting dilakukan karena hasil ekstraksi akan mencerminkan tingkat keberhasilan metode tersebut [3]. Ekstraksi konvensional umumnya membutuhkan waktu yang cukup lama dan melibatkan proses termal yang dapat merusak karotenoid sehingga dibutuhkan ekstraksi dengan metode terbaru salah satunya menggunakan gelombang ultrasonik. *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) merupakan metode alternatif ekstraksi non-termal yang lebih efisien, lebih cepat, dan memungkinkan pengurangan pelarut, sehingga menghasilkan ekstrak murni dan *yield* yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstraksi konvensional. Metode ini telah diterapkan untuk mengekstrak komponen makanan seperti komponen aroma, pigmen, dan antibakteri [4]. Parameter penting dalam suatu ekstraksi diantaranya adalah jenis dan rasio penggunaan pelarut, pengecilan ukuran bahan, dan waktu ekstraksi. Penelitian sebelumnya mengenai optimasi ekstraksi oleoresin pada jahe menggunakan UAE dan mendapatkan hasil oleoresin sebanyak 11.026% dalam rasio jahe:etanol 1:4.68 g/ml dan selama 29 menit [5].

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi terhadap ekstrak karotenoid pada Kabocha yang dihasilkan dari ekstraksi menggunakan metode ultrasonik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan untuk ekstraksi meliputi buah Kabocha (*Cucurbita maxima L.*) yang diperoleh dari petani kabocha di Magelan dengan karakteristik kulit labu berwarna hijau dengan rata-rata berat 1-2kg, pelarut Petroleum Eter dan Aseton dengan kemurnian teknis untuk ekstraksi dan kemurnian PA untuk analisis, HCl, NaOH, Etanol 96%, Alumina, Na₂SO₄ anhidrat dan Aquades yang didapatkan dari Toko Makmur Sejati Malang. Gas N₂ dan DPPH 0.2 mM dalam etanol yang didapat dari Laboratorium Biokimia dan Analisis Pangan Universitas Brawijaya.

Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan bubuk kabocha meliputi meliputi pisau, *slicer*, pengering kabinet otomatis (OVG-12), loyang, ayakan 60 mesh (ATE-126, 0.250 mm), blender kering (Panasonic), termometer, sendok, baskom dan plastik

Alat yang digunakan dalam ekstraksi pigmen karotenoid Kabocha neraca analitik (Denver Instrument M-310), alat ekstraksi ultrasonik tanduk getar (Cole Palmer/CPX 130), *beaker glass* (Pyrex), corong kaca (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), spatula, penyaring vakum (Buchi V500), *vacuum rotary evaporator* (Buchi B-490), alat semprot nitrogen (Pego-M78), botol sampel, corong plastik, pipet tetes dan *freezer* (Gea AB-396-T-X).

Alat yang digunakan dalam analisis ekstrak karotenoid meliputi *glassware* (Pyrex), desikator, kolom kromatografi, pH meter (PHS-3CB), bola hisap, pipet volume (Pyrex), termometer, lampu (Phillip 23 watt), corong kaca (Pyrex), oven listrik (Mettler U.30), *colorreader* (Minolta CR-100), spektrofotometer dan kuvet (Unico UV-2100), *Vortex mixer* (LW Scientific), *shaker waterbath* (Mettler WNB 14 W/Ring), rak tabung reaksi dan statif.

Desain Penelitian

Penelitian disusun menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor yaitu rasio bahan:pelarut (1:5, 1:7, 1:9) dan lama ekstraksi (5, 15, 25 menit). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 27 satuan percobaan. Data dianalisis dengan menggunakan metode analisis ragam (*Analysis of Variant* atau

ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji lanjut BNT atau DMRT dengan selang kepercayaan 5%. Pemilihan perlakuan terbaik dilakukan dengan metode *Multiple Attribut* [6].

Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian dilakukan dengan dua tahapan yaitu pembuatan bubuk labu Kabocha dan pembuatan ekstrak karotenoid dari labu Kabocha menggunakan gelombang ultrasonik.

Metode

Analisis bahan baku Kabocha segar dan bubuk meliputi analisis kadar air [7], warna [8], total karoten [7] dan aktivitas antioksidan IC₅₀ [9]. Analisis ekstrak karotenoid labu Kabocha meliputi total karoten [7], aktivitas antioksidan IC₅₀ [9], pH [7], rendemen [8] dan warna [8] yang meliputi tingkat kecerahan (L*), tingkat kemerahan (a*) dan tingkat kekuningan (b*). Perlakuan terbaik dicari dengan menggunakan metode *multiple attribute* [6]. Hasil perlakuan terbaik kemudian diuji stabilitas warnanya terhadap suhu, cahaya dan pH [10].

Prosedur Analisis

1. Analisis Kadar Air

Cawan petri dimasukkan ke dalam oven (105°C) selama 24 jam setelah itu dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang. Sampel yang telah dihaluskan ditimbang 2 gram dalam wadah yang telah diketahui berat konstannya kemudian dioven pada suhu 100°C-105°C selama 5 jam. Setelah itu didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang beratnya. Lalu dipanaskan lagi dalam oven 30 menit kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Perlakuan ini diulang sampai tercapai berat konstan.

$$\frac{\text{berat awal}-\text{berat akhir}}{\text{berat awal}}\% \text{ Kadar air} = \quad \times 100 \%$$

2. Analisis Warna

Sampel ditempatkan dalam wadah plastik bening kemudian *color reader* dihidupkan. Tombol pembacaan diatur pada L* a* b* dimana L* untuk parameter kecerahan (lightness), a* dan b* untuk koordinat kromatisitas. Warna diukur dengan menekan tombol target

3. Analisis pH

Sampel ditempatkan pada botol kaca. pH meter dikalibrasi dengan menggunakan buffer pH 4 dan pH 7, kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan tissue. Dilakukan pengukuran pH sampel dan dicatat hasilnya. Setiap kali akan mengukur pH sampel yang lain, sebelumnya probe dibersihkan dengan aquades terlebih dahulu dan dikeringkan dengan tissue.

4. Analisis Rendemen

Ekstrak pekat hasil evaporasi yang telah disemprot gas nitrogen, ditimbang dalam wadah yang telah diketahui beratnya kemudian berat ekstrak pekat dibandingkan dengan berat awal bubuk.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat bubuk labu kuning}} \times 100 \%$$

5. Analisis Total Karoten

a. Mengekstrak Pigmen dalam Bahan

Sampel yang telah dihaluskan ditimbang 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan petroleum eter (PE) dan aseton (1:1 v/v). Lalu dishaker selama 4 jam, kemudian disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Prosedur tersebut diulangi hingga warna kekuningan sampel hilang. Filtrat yang dihasilkan

dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan PE:aseton (1:1) hingga tanda batas 25 ml. Lalu filtrat dimasukkan ke erlenmeyer dan ditambahkan 25 ml aquades. Terbentuk lapisan air-aseton dan lapisan eter. Lapisan air-aseton dibuang. Hasil lapisan eter dicuci sebanyak 2 kali dengan 25 ml aquades. Filtrat hasil pencucian, ditambahkan natrium sulfat anhidrit 1.25 g per 25 ml. Filtrat yang dihasilkan dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan PE:aseton hingga tanda batas.

b. Menyiapkan Kolom Kromatografi

Bagian bawah kolom disumbat dengan kapas 1.5 cm. Dalam kolom melalui bagian atas diisi campuran alumina 10 cm (± 15 g) dan natrium sulfat anhidrit setinggi 2 cm (± 3 g). Kolom tersebut dipasang vertikal pada statif kemudian disiapkan dibagian bawah kolom sebuah labu ukur 10 ml. Kemudian ekstrak pigmen dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Setelah ekstrak pigmen dalam kolom habis, masukkan PE:aseton kedalam kolom, sampai larutan keluar dari kolom menjadi tidak berwarna. Eluat dalam labu ukur diencerkan dengan petroleum eter-aseton (10:1) sampai tanda tera. Eluat yang mengandung karoten dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

c. Membuat Kurva Standar β -Karoten

Dibuat larutan β -karoten (5 mg/ml) dengan cara melarutkan 10 mg beta karoten standar dalam 2 ml PE-aseton (1:1). Larutan tersebut diencerkan sampai 25 ml dengan menambahkan pe-aseton (10:1) kemudian diambil masing-masing 0, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml kosong. Masing-masing diencerkan dengan PE:aseton (10:1) sampai tanda batas. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm. Dibuat kurva regresi antara konsentrasi beta karoten dan absorbansi.

$$\%karoten = \frac{Xmg/100ml}{berat\ sampel\ x\ 1000mg} \times volume\ larutan \times fp \times 100\%$$

6. Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Sampel diencerkan menggunakan etanol 96% pada konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 ppm dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel yang telah diatur konsentrasinya kemudian ditambahkan *1.1-diphenil-2-picryllhydrazil*(DPPH) 0.2 mM sebanyak 1 ml dan didiamkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm setelah diukur absorbansi blanko. Blanko dibuat dengan cara membuat larutan 4 ml etanol 96% dengan 1 ml larutan *1.1-diphenil-2-picryllhydrazil*(DPPH) 0.2 mM. Aktivitas *scavenging* terhadap radikal DPPH dinyatakan sebagai % penghambatan terhadap radikal DPPH. Persen penghambatan dihitung sesuai rumus : $[(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$, A_0 = **absorbansi tanpa penambahan sampel/standar**

Persen penghambatan masing-masing konsentrasi sampel diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan segresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan $y = a + bx$ digunakan untuk mencari nilai IC_{50} (*inhibitor concentration 50%*) dari masing-masing sampel dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Bahan Baku

Data analisis karakteristik bahan baku labu Kabocha segar dan bubuk labu Kabocha ditunjukkan dalam Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil analisis berbeda dengan literatur. Perbedaan tersebut dimungkinkan karena suhu dan waktu yang digunakan saat proses pengeringan, metode pengeringan, dan metode analisis yang dilakukan berbeda. Faktor yang mempengaruhi kandungan di dalam buah labu diantaranya varietas labu kuning, lokasi geografis, tingkat kematangan dan perlakuan yang diiberikan [12]. Perbedaan kandungan karoten pada Kabocha segar dan Kabocha bubuk yang dianalisis disebabkan pada proses analisis total karoten terdapat tahapan ekstraksi dimana Kabocha segar ketika diekstrak masih memiliki kadar air yang tinggi sehingga adanya air dalam bahan

menghambat proses ekstraksi. Sedangkan bubuk Kabocha yang sudah dihilangkan kadar airnya dan luas permukaannya meningkat, total karoten yang dihasilkan jauh lebih besar. Bahan yang mengandung kadar air tinggi lebih sulit diekstraksi karena keberadaan air akan mengganggu proses ekstraksi sehingga perlu dikeringkan terlebih dahulu [13].

Tabel 1. Data Analisis Bahan Baku

Parameter	Labu Kabocha Segar		Bubuk Labu Kabocha	
	Hasil Analisis	Literatur	Hasil Analisis	Literatur
Kadar Air (%)	89.62	87.60*	6.28	10.96**
Tingkat Kecerahan (L*)	59.40	57.60*	50.78	-
Tingkat Kemerahan (a*)	19.21	22.60*	22.54	-
Tingkat Kekuningan (b*)	32.32	33.70*	38.32	-
Total Karoten (mg/100g)	17.44	-	214.72	285.91*
Aktivitas Antioksidan (ppm)	286.15	-	98.32	-
Rendemen (%)			18.23	-

Sumber : * [1], ** [11]

2. Total Karoten dan Nilai Aktivitas Antioksidan IC₅₀ Ekstrak Karotenoid Labu Kabocha

Hasil analisis rerata total karoten dan nilai aktivitas antioksidan IC₅₀ ekstrak karotenoid labu Kabocha dengan metode ultrasonik akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2. Perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi memberikan pengaruh dan interaksi nyata terhadap total karoten dan aktivitas antioksidan IC₅₀.

Tabel 2. Rerata Total Karoten dan Aktivitas Antioksidan IC₅₀ Ekstrak Karotenoid Labu Kabocha Akibat Pengaruh Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Ekstraksi

Rasio Bahan: Pelarut	Lama Ekstraksi (menit)	Total Karotenoid (mg/g)	Aktivitas Antioksidan IC ₅₀ (ppm)
1:5	5	201.75 a	210.97 d
	15	228.77 b	162.43 c
	25	239.32 bcd	119.81 b
1:7	5	232.73 bc	160.45 c
	15	240.84 cd	144.96 c
	25	250.25 de	99.88 a
1:9	5	237.06 bc	152.00 c
	15	244.04 cde	126.76 b
	25	254.77 e	84.28 a
DMRT 5%		10.79-12.32	16.27-18.57

Keterangan :

- Data merupakan rerata 3 ulangan
- Nilai yang didampingi huruf yang tidak sama menunjukkan berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstraksi metode ultrasonik dengan menggunakan rasio bahan:pelarut 1:9 dan lama ekstraksi 25 menit menghasilkan total karoten dan nilai aktivitas antioksidan IC₅₀ tertinggi. Semakin banyaknya rasio bahan:pelarut dan bertambahnya waktu ekstraksi akan memberikan peningkatan kadar total karoten dan diikuti dengan nilai aktivitas antioksidan IC₅₀ yang kecil, dimana semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidannya [14]. Karoten termasuk dalam golongan karotenoid yang dapat berperan sebagai antioksidan [15]. Adanya interaksi yang signifikan pada parameter total karoten dan nilai aktivitas antioksidan IC₅₀ disebabkan adanya perbedaan perilaku yang dilakukan pada masing-masing perlakuan terhadap parameter yang diuji.

3. pH Ekstrak Karotenoid Labu Kabocha

Hasil analisis rerata pH ekstrak karotenoid labu Kabocha dengan gelombang ultrasonik akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rerata Nilai Ph Ekstrak Karotenoid Kabocha dengan Perlakuan Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Ekstraksi

Rasio Bahan:Pelarut	Lama Ekstraksi (menit)	pH
1:5	5	6.43
	15	6.42
	25	6.45
1:7	5	6.46
	15	6.45
	25	6.44
1:9	5	6.43
	15	6.43
	25	6.45

Keterangan: - Data merupakan rerata 3 ulangan

Kedua perlakuan tersebut tidak memberikan pengaruh nyata terhadap pH. Karotenoid pada labu Kabocha masih cenderung stabil. pH labu kuning berkisar antara 5.40-6.40 yang menunjukkan bahwa pH bersifat asam lemah dan mendekati pH netral [16]. pH karotenoid bersifat antara asam hingga basa dimana kestabilan pH akan berpengaruh pada warna yang dihasilkan oleh karotenoid [17].

4. Rendemen Ekstrak Karotenoid Labu Kabocha

Hasil analisis rerata rendemen ekstrak karotenoid labu Kabocha dengan gelombang ultrasonik akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 4. Perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi memberikan pengaruh dan interaksi nyata terhadap rendemen ekstrak karotenoid.

Tabel 4. Rerata Rendemen Ekstrak Karotenoid Labu Kabocha Akibat Pengaruh Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Ekstraksi

Rasio Bahan:Pelarut	Lama Ekstraksi (menit)	Total Rendemen (%)
1:5	5	14.08 a
	15	15.19 a
	25	16.76 ab
1:7	5	18.70 bc
	15	23.08 de
	25	26.53 f
1:9	5	21.16 cd
	15	25.07 ef
	25	30.25 g
DMRT 5%		2.98-3.40

Keterangan :

- Data merupakan rerata 3 ulangan
- Nilai yang didampingi huruf yang tidak sama menunjukkan berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Tabel 4. menunjukkan bahwa rerata rendemen tertinggi diperoleh pada perlakuan ekstrak karotenoid dengan rasio bahan:pelarut 1:9 dan lama ekstraksi 25 menit yaitu 30.25%. Adanya komponen lain selain karoten yang ikut terlarut dalam pelarut serta residu pelarut yang masih tersisa juga bisa mempengaruhi tingginya rendemen. Pelarut non-polar akan melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat non-polar juga misalnya lemak [18].

5. Warna (L*, a*, b*) Rendemen Ekstrak Karotenoid Labu Kabocha

Nilai L dinyatakan sebagai tingkat kecerahan dengan nilai 0 untuk hitam (gelap) dan 100 untuk putih (terang). Nilai a* menunjukkan intensitas warna merah (nilai +) dan hijau (nilai -), dimana semakin tinggi nilai a* maka kecenderungan warna merah pada produk atau bahan semakin kuat. Nilai b* menunjukkan intensitas warna kuning (nilai+) dan biru (nilai-), dimana semakin tinggi nilai b* maka kecenderungan warna kuning pada produk atau bahan semakin kuat [19]. Rerata tingkat kecerahan (L*), tingkat kemerahan (a*) dan tingkat kekuningan (b*) dapat dilihat pada Tabel 5 dan 6.

Tabel 5. Rerata Tingkat Kecerahan Kemerahan dan Kekuningan Ekstrak Pigmen Karotenoid Akibat Pengaruh Rasio Bahan:Pelarut

Rasio Bahan:Pelarut	Rerata Tingkat Kecerahan (L*)	Rerata Tingkat Kemerahan (a*)	Rerata Tingkat Kekuningan (b*)
1:5	21.40 c	8.10 a	10.50 a
1:7	20.60 b	10 b	10.80 a
1:9	19.90 a	11.70 c	13 b
BNT 5%	0.40	0.67	1.90

Keterangan:

- Data merupakan rerata 3 ulangan
- Nilai yang didampingi huruf yang tidak sama menunjukkan berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Berdasarkan Tabel 5 terlihat bahwa semakin tinggi rasio bahan:pelarut menyebabkan rerata tingkat kecerahan semakin tinggi namun rerata tingkat kemerahan (a*) dan tingkat kekuningan (b*) nya cenderung menunjukkan nilai yang meningkat. Semakin tinggi konsentrasi pigmen menyebabkan turunnya tingkat kecerahan dan warna akan menjadi lebih gelap dan pekat yang menyebabkan nilai a* dan b* nya meningkat [20].

Tabel 6. Rerata Tingkat Kecerahan Kemerahan dan Kekuningan Ekstrak Pigmen Karotenoid Akibat Pengaruh Lama Ekstraksi

Rasio Bahan:Pelarut	Rerata Tingkat Kecerahan (L*)	Rerata Tingkat Kemerahan (a*)	Rerata Tingkat Kekuningan (b*)
1:5	21.50 c	8.30 a	8.60 a
1:7	20.70 b	9.90 b	11.90 b
1:9	19.70 a	11.50 c	13.70 c
BNT 5%	0.40	0.67	1.90

Keterangan:

- Data merupakan rerata 3 ulangan
- Nilai yang didampingi huruf yang tidak sama menunjukkan berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Berdasarkan Tabel 6. terlihat bahwa semakin lama waktu ekstraksi menyebabkan rerata tingkat kecerahan semakin menurun namun rerata tingkat kemerahan (a*) dan tingkat kekuningan (b*) nya cenderung menunjukkan nilai yang meningkat. Semakin banyak pigmen yang terekstrak menyebabkan warna ekstrak akan semakin gelap dan pekat, sehingga nilai kecerahan menjadi turun namun nilai kemerahan dan kekuningan bahan semakin meningkat karena ekstrak yang dihasilkan warnanya semakin pekat [20].

6. Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik akibat pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi dipilih dengan menggunakan metode *Multiple Attribute* [6]. Penilaian meliputi parameter fisik dan kimia dari ekstrak karotenoid labu Kabocha. Perlakuan terbaik dipilih berdasarkan tingkat kerapatannya, dimana perlakuan yang memiliki tingkat kerapatan paling kecil dinyatakan sebagai perlakuan terbaik. Berdasarkan perhitungan tersebut, ditemukan perlakuan terbaik adalah perlakuan rasio bahan:pelarut 1:9 (b/v) dan lama ekstraksi 25 menit.

Sebagai perlakuan kontrol, dilakukan ekstraksi pigmen karotenoid labu Kabocha menggunakan metode konvensional dengan maserasi. Ekstraksi dilakukan menggunakan *shaker waterbath* bersuhu 36°C selama 2 jam. Suhu ini disesuaikan dengan suhu ekstrak saat diekstrak menggunakan ultrasonik tanduk getar selama 25 menit. Rasio bahan:pelarut sama dengan perlakuan terbaik (1:9 b/v). Nilai parameter perlakuan terbaik dan perlakuan kontrol dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Karakteristik Kimia dan Fisik Ekstrak Pigmen Karotenoid Labu Kabocha Berdasarkan Perlakuan Terbaik dan Perbandingannya dengan Perlakuan Kontrol

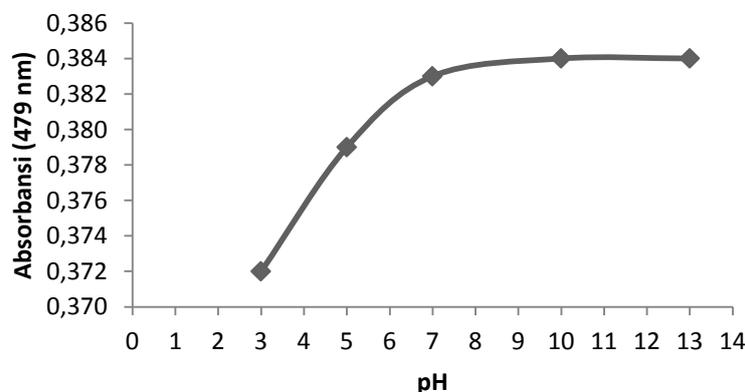
Parameter	Perlakuan Terbaik (Ultrasonik Tanduk Getar, 25 menit, 36°C, rasio bahan:pelarut 1:9 b/v)	Kontrol (Maserasi, 2 jam, 36°C, rasio bahan:pelarut 1/9 b/v)	Uji t (5%)
Total Karoten (mg/100g)	254.77	215.01	*
Aktivitas Antioksidan IC50 (ppm)	82.14	99.07	*
pH	6.44	6.45	tn
Rendemen (%)	30.88	23.03	*
Tingkat Kecerahan (L)	19.49	22.92	*
Tingkat Kemerahan (a*)	12.78	9.8	*
Tingkat Kekuningan (b*)	16.23	11.92	*

Keterangan : tn = tidak berbeda nyata, * = berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Dari Tabel 7. dapat terlihat bahwa ekstrak karotenoid hasil perlakuan terbaik memiliki nilai parameter yang lebih baik dibandingkan ekstrak karotenoid hasil ekstraksi metode meserasi. Hasil statistik dengan uji t menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha=0,05$) pada semua parameter kecuali pH. Hal ini membuktikan bahwa teknik ekstraksi ultrasonik dapat digunakan sebagai alternatif yang lebih efisien dan cepat dalam mengekstrak pigmen karotenoid dari bahan alami. Keuntungan metode ultrasonik adalah untuk mempercepat proses ekstraksi dan memperbesar hasil ekstraksi[17].

7. Uji Stabilitas Warna Ekstrak Karotenoid Terhadap pH

Stabilitas warna ekstrak karotenoid labu Kabocha terhadap pH dilakukan dengan pengujian dengan beberapa titik pH yaitu pH 3, 5, 7, 10 dan 13 pada suhu ruang dan kondisi gelap. Grafik stabilitas warna ekstrak karotenoid labu Kabocha terhadap pengaruh pH dapat dilihat pada Gambar 1.



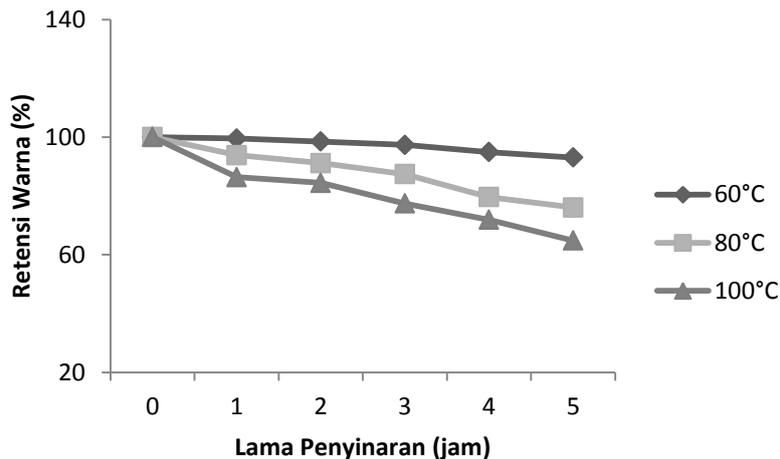
Gambar 1. Persentase Retensi Warna Ekstrak Karotenoid Akibat Pengaruh pH

Berdasarkan Gambar 1. dapat diketahui bahwa nilai absorbansi pigmen karotenoid labu Kabocha pada pH 7, 10, dan 13 tidak berpengaruh secara signifikan terhadap

degradasi pigmen karotenoid. Tetapi pada pemberian pH asam yaitu pH 3 dan 5 mengalami sedikit penurunan nilai absorbansi pada gelombang 470 nm yang artinya warna pigmen karotenoid dari labu Kabocha tersebut sedikit memudar pada pH asam. pH karotenoid pada labu kuning berkisar antara 5,4-6,4 yang menunjukkan bahwa pH bersifat asam lemah dan mendekati pH netral [16]. Senyawa karoten stabil pada pH netral ataupun alkali, tetapi tidak stabil pada pH asam, oksigen, cahaya dan panas [15].

8. Uji Stabilitas Warna Ekstrak Karotenoid Terhadap Suhu dan Lama Pemanasan

Stabilitas warna ekstrak karotenoid labu Kabocha terhadap suhu dilakukan dengan pemanasan ekstrak pada suhu 60, 80 dan 100°C selama 5 jam. Grafik persentase retensi warna ekstrak karotenoid dapat dilihat pada Gambar 2.



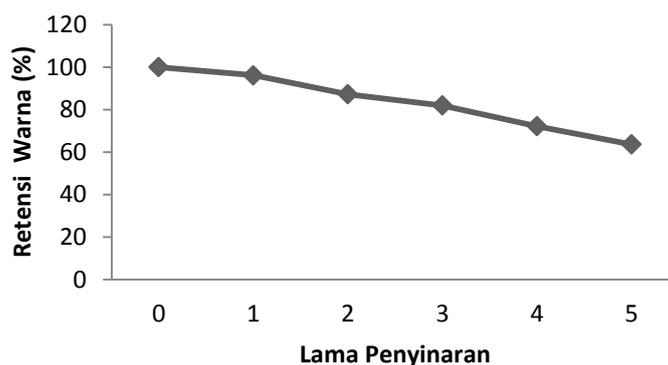
Gambar 2. Persentase Retensi Warna Ekstrak Karotenoid Akibat Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan

Gambar 2. menunjukkan bahwa nilai absorbansi karotenoid pada panjang gelombang maksimal mengalami penurunan seiring dengan semakin meningkatnya suhu dan lama pemanasan. Pemanasan suhu 60°C, penurunan persentase retensi warna tidak begitu signifikan. Pada suhu 80 dan 100°C, penurunan retensi warna terjadi cukup tinggi, dimana retensi warna terendah terdapat pada perlakuan dengan suhu 100°C selama 5 jam yaitu sebesar 64,85%. Penurunan tersebut menandakan bahwa warna karotenoid mengalami degradasi akibat pemanasan. Pigmen karotenoid diketahui mudah terkena cis trans isomerisasi [21]. Intensitas warna karotenoid menghilang pada bentuk produk degradasi oksidatif seperti turunan-turunan epoksidanya [22].

9. Uji Stabilitas Warna Ekstrak Karotenoid Terhadap Cahaya

Stabilitas warna ekstrak karotenoid labu Kabocha terhadap cahaya dilakukan dengan penyinaran secara sederhana menggunakan lampu pada ruangan tertutup selama 5 jam. Grafik persentase retensi warna ekstrak karotenoid dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3, persentase retensi warna ekstrak karotenoid mengalami penurunan seiring dengan semakin meningkatnya lama penyinaran menggunakan cahaya lampu. Penurunan persentase retensi akibat nilai absorbansi pada gelombang maksimum yang juga menurun menandakan pigmen karotenoid mengalami degradasi karena adanya iradiasi cahaya. Penurunan retensi pada jam ke 5 cukup tinggi yaitu sebesar 63,61%. Cahaya menyebabkan molekul terdegradasi lebih cepat, yang ditunjukkan dengan penurunan absorbansi dan pemucatan warna ekstrak karotenoid setelah iradiasi cahaya dari orange pekat menjadi kuning muda akibat putusnya ikatan rangkap pada struktur karotenoid sehingga struktur dan sifat-sifat karotenoid menjadi berubah [21]. Kerusakan karotenoid dapat terjadi akibat adanya reaksi enzimatis, non-enzimatis (cahaya dan oksigen), dan isomerisasi [23].



Gambar 3. Persentase Retensi Warna Ekstrak Karotenoid Akibat Pengaruh Cahaya dan Lama Penyinaran

SIMPULAN

Perlakuan terbaik diperoleh dari rasio bahan:pelarut 1:9 dan lama ekstraksi 25 menit dengan total karoten 254.77 mg/100g, nilai IC_{50} 84.28 ppm, pH 6.45, rendemen 30.25%, kecerahan (L^*) 19.30, kemerahan (a^*) 13.40 dan kekuningan (b^*) 15. Hasil uji t antara perlakuan terbaik dan kontrol menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha=0,05$) pada semua parameter selain pH yang tidak berbeda nyata. Uji stabilitas warna karotenoid menunjukkan bahwa ekstrak pigmen karotenoid labu kabocha cenderung stabil terhadap perlakuan kondisi pH netral hingga basa. Pengaruh suhu $60^\circ C$ retensi penurunan warna karotenoid masih stabil namun pada suhu $80^\circ C$ dan $100^\circ C$, retensi perubahan warnanya terlihat signifikan. Pengaruh iradiasi cahaya dengan lama penyinaran 5 jam terhadap stabilitas karotenoid menyebabkan degradasi sebesar 36.39%.

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Kim Sung-Ran., Ha Tae-Youl., Song Hyo-Nam., Kim Yoon-Suk., and Park Yong-Kon. 2005. Comparison of Nutritional Composition and Antioxidative Activity for Kabocha Squash and Pumpkin. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 4:171-172
- 2) Palozza P, Krinsky NI (1992) Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*:An overview. *Methods Enzymol* 213:403-420
- 3) Salas, P. G. 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*. 15: 8813-8826
- 4) Vinatoru, M. 2001. An Overview Of The Ultrasonically Assisted Extraction Of Bioactive Principles From Herbs. *Ultrason Sonochem Journal*. 8:303–313
- 5) Hartuti Sri, Dani S (2012) Optimasi Proses Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale* Rosc) Menggunakan Ultrasonik: *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan* Vol 9: 30-35
- 6) Zeleny, M. 1982. Multiple Criteria Decision Making. Mc Graw Hill Book Company, New York
- 7) AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official Analysis Chemistry. Washington
- 8) Yuwono, S.S. dan T. Susanto. 1998. Pengujian Fisik Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya
- 9) Godow, A V., C.F. Hansman and E. Joubet. 1997. Comparison of the Antioksidant Activity of A Spalathin with Other Plant Phenol of Roubos Tea of *Aspalathus linieris*, α -tocopherol, BHT and BHA. *J.Agric Food Chem* 45 (3) : 632-638

- 10) Dimara.L., Ferdy S. Rondonuwu dan Leenawaty Limantara. 2008. Uji Fisika Kimia Stabilitas Pigmen Karotenoid pada Ekstrak Kasar Buah Merah Papua (*Pandanus conoideus lam.*): Potensi Sebagai Pewarna Alami. UK Satya Wacana: Salatiga
- 11) Yuliani, S., E. Y. Purwani, H. Setiyanto, S. Usmiati dan P. Raharto. 2003. Pengembangan Agroindustri Aneka Tepung dari Bahan Pangan Sumber Karbohidrat Lokal: Kegiatan Penelitian Labu Kuning. (Laporan Akhir). Balai Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian
- 12) Sudarto, Y. 1993. Budidaya Waluh. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- 13) Hongmin, *et.al.*, 1996. Orange-flesh Sweet Potato, a Potential Source for β -Caroten Production. In.E.t. Rasco and V.R Amante (Eds) Selected Research Paper. July 1995-June 1996. Vol. 2: p 128-130: Manila-Philippines
- 14) Widyastuti, N. 2010. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Metode CUPRAC, DPPH, Dan FRAP Serta Korelasinnya Dengan Fenol Dan Flavonoid Pada Enam Tanaman. Mekanisme Kerja Antioksidan. www.medikaholistik.com
- 15) Mortensen A. 2006. Carotenoids and Other Pigments as Natural Colorants. *Pure Appl. Chem* Vol. 78 No. 8. pp 1477–1491
- 16) Whang HJ, Park YK, Seog HM. 1999. Carotenoid Pigment Of Pumpkin Cultivated In Korea. *Korean J Food Nutr.* 12: 508–512
- 17) Mason, T.J. 2000. Chemistry With Ultrasound. Critical Report on Applied Chemistry. 28. Elsevier New York: Applid Science
- 18) Countrymen, S. 2007. Undersanding the Revision to USP Monograph 467; Residual Solvents. Phenomenex Inc. Torrance. CA. USA
- 19) Pomeranz, S.Y and C.E. Meloand. 1994. Food Analysis, Theory and Practice. The AVI Publishing Company Inc. Wesport Connecticut
- 20) Hulshof PJM, Xu C, van de Bovenkamp P, et al. 1997. Application Of A Validated Method For The Determination Of Provitamin A Carotenoids In Indonesian Foods Of Different Maturity And Origin. *J Agric Food Chem* 45:1174-1179
- 21) Button, G., Liaaen-Jensen, S., and Fanden, H.P. 2008. *Carotenoids*: vol 4. Berlin: Binkhausen Inc
- 22) Setiawan, M.B. 2003. Perubahan Warna, Kadar dan Aktivitas Antioksidatif Ekstrak Karotenoid Wortel (*Daucus carota L.*) yang Dienkapsulasi. Skripsi Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian. FTP. UGM. Yogyakarta
- 23) Sajilata and Singhal. 2006. Isolation and Stabilization of Natural Pigment for Food Aplication. *Stewart Postharvest. A Review.* 2006. 5:1