

Pembuatan Label indikator Ekstrak Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Menggunakan Carrier Jenis Kitosan, Pati, dan Kertas

Muhammad Fakhri Kurniawan^{1*}, Tiana Fitrilia¹, Nursyawal Nacing¹, Hikmah Nur Chosida¹

¹Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Djuanda Bogor, Jl. Tol Ciawi No.1, 16720

ABSTRAK

Ekstrak secang mengandung senyawa brazilein yang berpotensi sebagai label indikator karena sensitif terhadap perubahan pH. Jenis carrier berpengaruh terhadap kualitas label indikator. Tujuan penelitian ini adalah menentukan jenis carrier terbaik untuk label indikator ekstrak secang. Penelitian ini menggunakan tiga jenis carrier (kitosan, kertas, dan pati). Parameter uji meliputi respon label terhadap NaOH dan NH₃, ketebalan, kadar air, dan stabilitas warna label selama penyimpanan. Data dianalisis dengan ANOVA dengan taraf nyata 5%. Ekstrak secang yang dihasilkan memiliki warna kuning dan nilai pH 5. Respon label indikator terhadap NaOH dan uap NH₃ untuk jenis carrier kertas dan pati lebih baik daripada carrier kitosan dengan perubahan warna kuning menjadi merah. Uji stabilitas ketebalan didapatkan carrier kitosan dan kertas lebih stabil daripada pati. Kadar air label dengan carrier kertas didapatkan paling rendah yaitu berkisar 3,65% sampai 5,60%. Jenis carrier kertas memiliki stabilitas warna paling baik selama penyimpanan lima hari pada suhu ruang

Kata kunci: label indikator; ekstrak secang; kitosan; pati; kertas

ABSTRACT

Sappan extract has brazilein compound that have the potential as indicator labels because they are sensitive to changes in pH. The type of carrier affects the quality of indicator labels. The purpose of this study was to determine the best type of carrier for sappan extracts-based labels. This study used 3 types of carrier (chitosan, paper, and starch). They were then tested for response to NaOH and NH₃, thickness, moisture content, and color stability during storage. Data were analyzed using ANOVA at significant level of 5% . The sappan extract has a yellow color and a pH value of 5. The responses of labels to NaOH and NH₃ for paper and starch carrier types was better than chitosan with color change yellow to red. Thickness stability test showed that chitosan and paper were more stable than starch. The water content of paper labels was the lowest ranging from 3,65% to 5,60%. Paper carrier type has the best color stability during 5 days storage at room temperature.

Keywords: indicator labels; sappan extracts; chitosan; starch; paper

Received: 12-07-2022, **Accepted:** 10-08-2023, **Online:** 27-08-2023

PENDAHULUAN

Kemasan pintar adalah suatu kemasan berindikator yang dapat diletakkan secara internal maupun eksternal dan dapat memberikan informasi mengenai keadaan kemasan dan atau kualitas makanan di dalamnya (Robertson, 2006). Adanya indikator tersebut dapat mempermudah pengawasan kondisi produk terkemas selama transportasi dan penyimpanan. Produk terkemas tersebut dapat berupa makanan, minuman, farmasi, berbagai jenis produk kecantikan, dan produk rumah tangga. Hal yang terpenting dalam sebuah kemasan pintar adalah peran dari label indikator.

Indikator (sensor) adalah zat umumnya pewarna yang mengalami perubahan warna pada interaksi dengan suatu komponen kimia. Label dibuat dari zat pewarna dan material pembawa (*carrier*) yang dapat menahan indikator warna. Penambahan zat warna ini dapat memberikan informasi mengenai kondisi produk selama penyimpanan di luar informasi dari tanggal

***Corresponding author:**

fakhri.kurniawan@unida.ac.id

kadaluarsa. Salah satu bahan yang berpotensi sebagai label indikator alami yaitu senyawa brazilin dari kayu secang. Kayu secang dapat digunakan sebagai label indikator karena sifatnya mudah larut dalam air dan memiliki warna yang khas pada pH tertentu. Adawiyah dan Indriati (2003) telah melakukan penelitian bahwa pada pH asam brazilin berwarna kuning sedangkan pada pH basa berwarna merah keunguan.

Salah satu elemen penting yang berpengaruh terhadap kerja indikator yaitu material pembawa (*carrier*) yang digunakan untuk membawa zat warna. Pemilihan *carrier* dengan reagen memberikan pengaruh yang amat besar dalam proses imobilisasi yang terjadi untuk menghasilkan respon yang baik. Khalil *et al.* (2010) menggunakan *polytetrafluoroethylene* (PFTE) pada indikator yang menunjukkan perubahan karakteristik pada paparan senyawa asam dan basa. Smolander *et al.* (2002) menggunakan agarosa sebagai *carrier* dari *myoglobin* untuk mendeteksi produksi hidrogen sulfida selama masa pembusukan daging ayam potong. Kim *et al.* (2017) menggunakan kertas saring sebagai material pembawa indikator *bromophenol blue* dan *bromocresol purple*. Senyawa polimer alami seperti kitosan juga digunakan sebagai *carrier* untuk indikator kolorimetri berbasis senyawa antosianin yang dapat memonitor perubahan nilai pH (Yoshida *et al.*, 2014). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang penggunaan ekstrak kayu secang sebagai pewarna indikator pada beberapa jenis *carrier* untuk mendeteksi proses busukan daging ayam selama masa penyimpanan tertentu.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah serbuk kayu secang, etanol 96%, kertas saring *Whatman* No. 1, kitosan, asam asetat glasial 1%, akuades, gliserol, tepung tapioka, NH_4OH 2 N, NaOH 20%, dan tisu. Alat-alat yang digunakan adalah software *Image-J*, *hotplate*, *magnetic stirrer*, neraca analitik, *Branson 5800 ultrasonic cleaner bath*, *Memmert UN110 universal oven*, ayakan ukuran 40 mesh, kotak kedap udara, sudip, buret, mortar, desikator, *scanner*, cawan petri, erlenmeyer, pipet, gelas piala, dan gelas ukur.

Metode

Ekstraksi Secang (Modifikasi Azmi dan Nurandriea, 2017)

Serbuk secang yang telah diayak dengan ayakan 40 mesh kemudian dicampur dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan proses ekstraksi secara maserasi menggunakan *Branson 5800 Ultrasonic Cleaning Bath*. frekuensi 20 kHz. Proses maserasi dilakukan selama 60 menit pada tekanan atmosfer. Larutan ekstrak disaring dengan kertas *Whatman* No. 1, kemudian diaplikasikan sebagai pewarna pada proses pembuatan indikator.

Pembuatan Label Indikator

Film kitosan (Modifikasi Iskandar, 2014)

Serbuk kitosan yang dilarutkan dalam asam asetat glasial 2% dan gliserol. Larutan dipanaskan pada suhu 40°C selama 60 menit hingga tersuspensi sempurna. Setelah dingin ditambahkan ekstrak secang dan dicetak pada cawan petri ukuran 160×10 mm. Selanjutnya dikeringkan dalam oven suhu 40°C selama 48 jam. Film yang telah kering didinginkan dan dipotong dengan ukuran 2×2 cm.

Kertas Indikator (Imawan et al., 2018)

Kertas saring *Whatman* No. 1 dipotong ukuran 2×2 cm. Pewarnaan dilakukan perendaman potongan kertas ke dalam ekstrak secang selama 5 menit. Selanjutnya kertas dikeringkan dengan blower pada suhu ruang.

Film Pati (Ismed et al., 2017)

Tapioka dan gliserol dilarutkan dalam air dan dipanaskan pada suhu 75°C sambil diaduk dengan magnetic stirrer selama 20 menit sampai tergelatinisasi. Kemudian dicetak pada cawan petri ukuran 160×10 cm dan dikeringkan dalam oven vakum dengan suhu 60°C selama 10 jam. Setelah kering, sebanyak 5 mL ekstrak secang dioleskan merata di atas *film* dan disimpan dalam freezer selama 3 jam agar pewarna dapat menempel dan menyatu.

Uji Respon dan Stabilitas Label Indikator

Uji Respon NaOH (Warsiki et al., 2012)

Label indikator direndam dalam larutan NaOH 20% dalam cawan petri ukuran 100×15 mm selama 1 jam. Perubahan warna yang terjadi diamati, semakin jelas perubahan yang terjadi maka semakin baik kinerja label indikator.

Uji Respon Uap NH₃ (Riyanto et al., 2014)

Sebanyak 10 mL larutan NH₄OH 1 N ditepatkan dalam gelas piala dan ditutup. Kemudian lembaran label ditempelkan pada bagian sisi atas gelas piala, kemudian ditutup dan dibiarkan selama satu jam.

Uji Warna (Nurfawaidi et al., 2018)

Pengukuran intensitas warna label dilakukan dengan metode analisis gambar (foto) digital menggunakan software ImageJ. Pengambilan gambar dilakukan dengan cara *scanning* menggunakan scanner. Kemudian dilakukan *cropping* untuk mendapatkan sebagian kecil dari sampel tersebut. Langkah selanjutnya adalah mengekstraksi nilai indeks warna RGB untuk tiap-tiap sampel dengan software ImageJ. Label indikator dengan respon perubahan warna terbaik dipilih untuk pengujian selanjutnya.

Uji Ketebalan

Ketebalan label indikator warna diukur dengan mikrometer sekrup. Alat ini memiliki ketelitian 0,01 mm. Pengukuran dilakukan pada lima titik yang berbeda kemudian hasilnya dirata-ratakan sehingga diperoleh nilai ketebalan label rata-rata dalam satuan mm.

Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan program SPSS 25. Seluruh percobaan dilakukan tiga ulangan dan data dianalisis secara one way ANOVA dan uji lanjut Duncan pada taraf nyata 5% untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan terhadap stabilitas ketebalan label, kadar air, dan nilai warna RGB.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak secang yang dihasilkan memiliki warna kuning dengan nilai pH 5. Menurut Azmi dan Nurandriea (2017), ekstrak kayu secang dengan pelarut etanol dalam larutan asam (pH 2-6) berwarna kuning kemerahan, netral (pH 7) memiliki warna merah dan basa (pH 8-12) berwarna merah keunguan. Berdasarkan warna awal masing-masing indikator, maka jenis carrier kertas dan pati dapat menjadi matriks pembawa yang baik untuk pewarna secang (Tabel 1).










Tabel 1. Karakteristik awal label indikator berdasarkan jenis *carrier*

Parameter	Film Kitosan	Kertas Saring	Film Pati
Ketebalan (mm)	0,640	0,188	2,043
Kadar Air (%)	34,07	3,47	24,60
Warna	Merah kecoklatan	Kuning muda	Kuning tua

Hal Ini dikarenakan membran selulosa nitrat merupakan polimer yang bersifat hidrofilik sehingga lebih mudah untuk mengadsorpsi brazilin dari ekstrak secang (Fatriasari *et al.*, 2019). Berbeda dengan film kitosan yang menunjukkan perubahan warna dari warna aktif ekstrak secang yaitu kuning menjadi merah kecoklatan (Tabel 2). Hal ini disebabkan kerusakan brazilin akibat proses pengeringan film dalam oven atau telah terjadi reaksi brazilin dengan kitosan. Namun kertas saring lebih baik dari film pati karena memiliki kadar air yang lebih rendah serta tidak terlalu tebal yang akan berpengaruh saat penyimpanan.

Respon indikator terhadap basa dilihat dengan perendaman dalam larutan NaOH 0,2 M dengan pH 10. Perubahan warna setelah perendaman dapat dilihat dari ketiga jenis media indikator yang digunakan. Pada *film* kitosan dapat dilihat perubahan warna dari merah kecoklatan menjadi merah terang setelah 10 menit perendaman. Pada kertas saring, warna indikator berubah dari kuning menjadi merah keunguan yang dapat diamati langsung sesaat mulai perendaman, sedangkan *film* pati menunjukkan perubahan warna dari kuning menjadi merah setelah 10 menit perendaman. Perubahan warna ini diikuti perubahan nilai total RGB masing-masing indikator (kertas dan pati) setelah direndam dalam NaOH mengalami penurunan, sedangkan pada *film* kitosan mengalami peningkatan (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan penelitian Warsiki *et al.* (2012), yang menyatakan label indikator penurunan mutu produk pangan yang baik menunjukkan perubahan karakteristik warna terhadap senyawa asam dan basa.

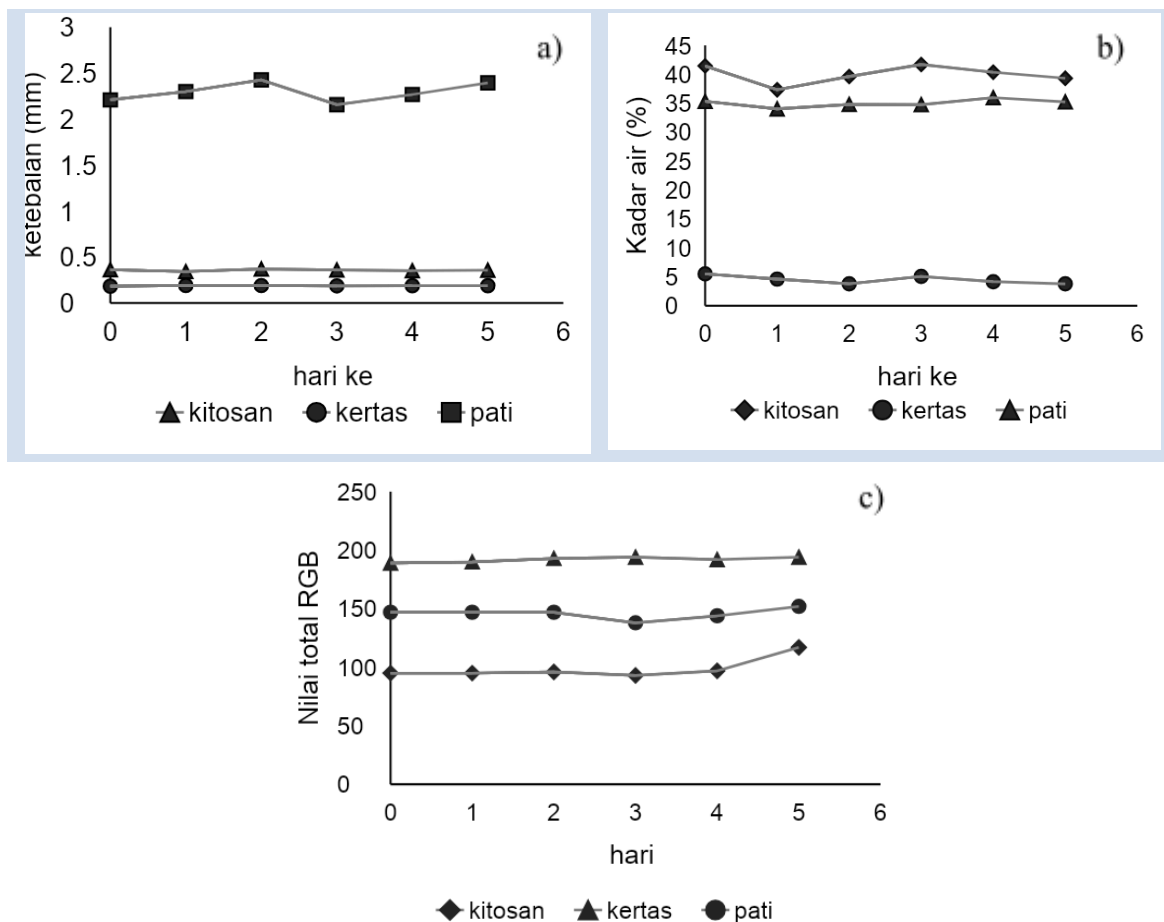
Tabel 2. Respon indikator terhadap larutan NaOH dan uap NH₃

Keadaan	Keterangan	Film Kitosan	Kertas Saring	Film Pati
Awal	Warna			
	Total RGB	82,641	192,855	169,370
Respon NAOH	Warna			
	Total RGB	113,676	109,795	130,780
Respon NH3	Warna			
	Total RGB	93,126	102,668	85,531

Respon indikator terhadap basa dilihat dengan perendaman dalam larutan NaOH 0,2 M dengan pH 10. Perubahan warna setelah perendaman dapat dilihat dari ketiga jenis media indikator yang digunakan (Tabel 2). Pada *film* kitosan dapat dilihat perubahan warna dari merah kecoklatan menjadi merah terang setelah 10 menit perendaman. Pada kertas saring, warna indikator berubah dari kuning menjadi merah keunguan yang dapat diamati langsung sesaat mulai perendaman, sedangkan *film* pati menunjukkan perubahan warna dari kuning menjadi merah setelah 10 menit perendaman. Perubahan warna ini diikuti perubahan nilai total RGB masing-masing indikator (kertas dan pati) setelah direndam dalam NaOH mengalami penurunan, sedangkan pada *film* kitosan mengalami peningkatan (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan penelitian Warsiki *et al.* (2012), yang menyatakan label indikator penurunan mutu produk pangan yang baik menunjukkan perubahan karakteristik warna terhadap senyawa asam dan basa.

Hasil uji respon indikator terhadap uap NH₃ dapat diamati perubahan warna yang jelas ditunjukkan oleh indikator kertas dan *film* pati dengan penurunan total RGB sampel cukup tinggi jika dibandingkan dengan *film* kitosan yang tidak menunjukkan perubahan warna (Tabel 2). Kertas saring menunjukkan perubahan warna langsung saat kontak dengan uap NH₃. Sedangkan *film* pati menunjukkan perubahan warna dari kuning menjadi merah setelah 10 menit perendaman. Meskipun memiliki karakteristik warna dan perubahan yang sama, namun

indikator dari kertas saring memiliki respon perubahan warna lebih cepat dari *film* pati. Hal ini disebabkan oleh indikator yang dihasilkan dari kertas memiliki ketebalan yang jauh lebih kecil daripada *film* pati. Menurut Panjaitan *et al.* (2019), semakin tebal *film* maka permeabilitas uap atau gas akan semakin rendah sehingga proses mobilisasi analat untuk dapat bereaksi dengan gugus aktif brazilin dari ekstrak secang makin lambat. Jika dilihat dari ukuran pori-pori seharusnya *film* pati dapat menunjukkan reaksi yang lebih baik karena memiliki ukuran pori $14,60 \mu\text{m} \pm 0,03 \mu\text{m}$ (Pramasari *et al.*, 2020), lebih besar dari kertas selulosa nitrat *Whatman no 1* yang memiliki ukuran pori-pori $11 \mu\text{m}$ (Lemon, 2018).





















Gambar 1. Stabilitas label indikator selama penyimpanan berdasarkan a) ketebalan, b) kadar air, c) nilai total RGB

Hasil uji stabilitas ketebalan label indikator menunjukkan bahwa carrier kitosan dan kertas memiliki stabilitas terbaik selama lima hari penyimpanan (Gambar 1a). Film pati yang dibuat dari campuran tapioka, air dan gliserol memiliki ketebalan paling besar. Ketebalan label akan mempengaruhi respon indikator terhadap analit yang diujikan, hal ini berkaitan dengan laju transmisi uap air dan gas pada label atau *film*. Menurut Distantina *et al* (2009), semakin tebal *film* maka laju transmisi uap air dan gas akan semakin rendah. Hal ini berpengaruh pada proses pembacaan (respon) kehadiran analit oleh indikator lebih lambat.

Label indikator dengan carrier kertas memiliki kadar air lebih rendah dibanding kitosan dan pati berkisar 3,65% sampai 5,60% (Gambar 1b). Perbedaan ini dipengaruhi oleh ketebalan *film* yang bersangkutan. Ketebalan *film* dalam satu cetakan tidak merata besarnya. Setiap sisi pada lembaran *film* yang sama belum tentu memiliki ketebalan yang sama sehingga berpengaruh pula pada susut bobot *film* tersebut (Setiautami, 2013). Proses pengeringan setelah pewarnaan indikator juga dapat mempengaruhi nilai kadar air yang

dihasilkan. Proses pengeringan yang tidak merata pada seluruh bagian indikator, dapat menjadi penyebab perbedaan kadar air pada beberapa sisi indikator yang sama. Secara stabilitas, label dari kertas dan pati memiliki kestabilan kadar air lebih baik daripada kitosan (Gambar 1b).

Tabel 3. Stabilitas warna label indikator ekstrak secang dalam suhu ruang

Jenis <i>carrier</i>	Warna pada hari ke-					
	0	1	2	3	4	5
Kitosan						
Kertas						
Pati						

Selama pengamatan yang dilakukan terjadi perubahan karakteristik warna yang berbeda di beberapa titik pengamatan. Hal ini dapat disebabkan metode pemberian warna pada label juga mempengaruhi kepekatan warna pada indikator. Metode oles yang digunakan untuk memberi warna pada *film* pati dilakukan secara manual, kemungkinan ketidakrataan olesan sangat tinggi. Selain itu, adanya perubahan tingkat kecerahan pada indikator ini diakibatkan oleh ketidakstabilan pigmen yang terdapat dalam pewarna yang digunakan. Pigmen warna kuning brazilin dalam secang sangat mudah teroksidasi menjadi bentuk brazilein yang memberikan warna kemerahan. Kestabilan pigmen betasianin ini dipengaruhi oleh pH, paparan cahaya, oksigen, dan suhu. Jenis dan ketebalan media yang digunakan turut berpengaruh terhadap perubahan warna yang dihasilkan. Jenis *carrier* kertas saring memiliki nilai ketebalan paling rendah dengan ukuran pori cukup besar sehingga memungkinkan kontak brazilein dengan cahaya lebih cepat.

SIMPULAN

Ekstrak secang memiliki warna kuning dengan nilai pH 5. Hasil respon label indikator terhadap NaOH dan uap NH₃ didapatkan jenis *carrier* kertas dan pati lebih baik daripada *carrier* kitosan. Uji stabilitas ketebalan didapatkan *carrier* kitosan dan kertas lebih stabil daripada pati, sedangkan pada uji kadar air didapatkan *carrier* kertas memiliki kadar air paing rendah dibandingkan kitosan dan pati. Jenis *carrier* kertas memiliki stabilitas warna paling baik selama penyimpanan lima hari pada suhu ruang. Secara keseluruhan *carrier* jenis kertas paling bagi digunakan pada aplikasi ekstrak secang sebagai label indikator

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Djuanda Bogor yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Dana Internal Perguruan Tinggi Universitas Djuanda Bogor Tahun Anggaran 2021 Nomor 150/LPPM/K-X/VIII/2021

DAFTAR RUJUKAN

- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International 18th edition*. Maryland: AOAC International.
- Adawiyah, D. R., & Indriati. (2003). Color stability of natural pigment from secang woods (*Caesalpinia sappan L.*). Di dalam Prosiding 8th Asean Food Conference. 8–11 Oktober 2003. Agriculture Publishing House, Hanoi.
- Azmi, D. D., & Nurandriana, E. (2017). Ekstraksi zat warna alami dari kayu secang (*Caesalpinia sappan Linn*) dengan metode ultrasound assisted extraction untuk aplikasi produk pangan [Skripsi]. Fakultas Teknik Industri, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Fatriasari, W., Mascruhin, N. & Hermiati, E. (2019). *Selulosa: Karakteristik dan Pemanfaatannya*. Jakarta: LIPI Press.
- Distantina, S.Y.C., Fadilah, Danarto, Wiratni, & Fahrurrozi, M. (2009). Pengaruh kondisi proses pada pengolahan *Eucheuma cottonni* terhadap rendemen dan sifat gel karagenan. *Ekulilibrium*, 8(1): 35-40.
- Imawan, C., Fitriana, R., Listyarini, A., Sholihah, W., & Pudjiastuti, W. (2018). Kertas label kolorimetrik dengan ekstrak ubi ungu sebagai indikator pada kemasan pintar untuk mendeteksi kesegaran susu. *Jurnal Kimia dan Kemasan*, 40(1): 25-32.
- Iskandar, A. Y. S. (2014). Label indikator besi (II) sulfat (FeSO₄) pendeteksi kebusukan daging. [SKRIPSI] Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ismed, Sayuti, K., & Andini, F. (2017). Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap indikator alami film dari ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) sebagai smart packaging untuk mendeteksi kerusakan daging ayam. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 6(4): 167-172.
- Khalil, G. E., Putnal, D. L., & Hubbard, T. W. (2010). Ammonia detection and measurement device. *US Patent Application* 330: 692.
- Kim, D. S., Nam, I. B., Sei, R. O., Keun, Y. J., Im, S. L., & Hyeong, K. L. (2017). NMR assignment of brazilein. *Phytochem Journal* 46:177-178.
- Lemon, K. (2018). Whatman No 1 filter paper-s why are they so frequently used?.[Internet]. Tersedia pada <https://camblab.info/whatman-no-1-filter-paper-why-are-they-so-frequently-used/> [24 Januari 2021]
- Nurfawaidi, A., Kuswandi, B., & Wulandari, L. (2018). Pengembangan label pintar untuk indikator kesegaran daging sapi pada kemasan. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan* 6(20): 199-204.
- Panjaitan, N., Ulyarti, U., Mursyid, M., & Nazarudin, N. (2019). Modifikasi pati uwi kuning (*Dioscorea alata*) menggunakan metode presipitasi serta aplikasinya untuk edible film. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas* 23(2):197-203.
- Pramasari, D.A., Sondari, D., Sudarwoko, D., Widyaningrum, B.A., Fajar, A., Putri, R., Restu, W.K., & Putri, E. H. (2020). Karakteristik pati berpori mikro dari tapioca hasil perlakuan amylase sebagai agen penyerapan minyak. *Jurnal Teknologi dan Industri Hasil Pertanian* 25(2):71-80.
- Setiautami, A. (2013). Pembuatan kemasan cerdas indikator warna dengan pewarna bit (*B. vulgaris L. var cicla L.*) [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Smolander, M., Hurme, E., Latva-Kala, K., Louma, T., Alakomi, H. L. & Ahvenainen, R. (2002). Myoglobin based indicator sensor for the evaluation of freshness of unmerinated broiler cuts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies Journal* 3: 277-285.

- Riyanto, R., Hermana, I., & Wibowo, S. (2014). Karakteristik plastik indikator sebagai tanda peringatan dini tingkat kesegaran ikan dalam kemasan plastik. *Jurna Pascapanen dan Bioteknologi Perikanan* 9(2) : 153-163.
- Robertson, G. L. (2006). *Food Packaging – Principles and Practice*. Florida : CRC Press.
- Warsiki, E., & Putri, C. D. W. (2012). Pembuatan label/film indikator warna dengan pewarna alami dan sintesis. *E-Jurnal Agroindustri Indonesia* 1(2): 82-87.
- Yashoda, K., Sachindra, N., & Sakhare. P. (2001). Microbiological quality of broiler chicken carcasses processed hygienically in a small scale poultry processing unit. *Journal of food quality* 24(3): 249-259.