

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia termasuk negara yang menempati peringkat 5 besar populasi penduduk terbanyak di dunia dengan urutan keempat setelah India, Tiongkok, dan USA. Hal ini menunjukkan bahwa Indonesia memiliki potensi besar dalam pengembangan berbagai sektor industri, termasuk industri pangan, yang berperan penting dalam memenuhi kebutuhan masyarakat (Amalia et al., 2023). Industri pangan tidak hanya menjadi pilar ketahanan pangan, tetapi juga berkontribusi pada pertumbuhan ekonomi nasional. Perkembangan sektor ini didukung oleh kekayaan sumber daya alam yang melimpah dan inovasi yang terus dilakukan oleh produsen untuk memenuhi kebutuhan konsumen, salah satunya melalui penggunaan kemasan pangan (Ropikoh et al., 2024).

Selain industri pangan, Industri kemasan pangan di Indonesia juga menunjukkan perkembangan pesat. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS, 2022), nilai produksi industri kemasan meningkat dari Rp 87,6 triliun pada tahun 2022 menjadi Rp 93,2 triliun pada tahun 2023. Kementerian Perindustrian (Kemenperin) memperkirakan angka ini akan terus naik hingga mencapai Rp 100 triliun pada akhir tahun 2024. Pertumbuhan ini didorong oleh peningkatan konsumsi masyarakat, kemajuan teknologi pengemasan, serta berkembangnya industri farmasi dan *e-commerce* (KEMENPERIN, 2024).

Makanan yang dikonsumsi haruslah sehat dan aman dari segala kontaminasi. Salah satu pendukung faktor tersebut yaitu kemasan makanan (Yani et al., 2021). Kemasan makanan merupakan suatu unsur yang penting dan tidak boleh terlupakan ketika memproduksi suatu makanan. Kemasan makanan digunakan sebagai pelindung makanan dan untuk memastikan makanan yang ada di dalamnya aman untuk dikonsumsi. Ada banyak kemasan makanan yang beredar di pasaran seperti plastik, kertas, *styrofoam*, dan daun. Namun kemasan makanan yang paling banyak digunakan saat ini yaitu plastik.

Namun, terdapat isu lingkungan dan kesehatan terkait penggunaan plastik sebagai bahan utama kemasan pangan. Plastik banyak digunakan karena sifatnya yang ringan, serbaguna, tahan panas, dan murah (Ismaya et al., 2021). Kemasan plastik yang terbuat dari *polypropilena* (PP) digunakan dalam berbagai aplikasi seperti kantong plastik, gelas plastik, ember dan botol (Yani et al., 2021). Jenis plastik seperti polipropilena (PP) dan polietilen (PE) umum digunakan sebagai kemasan makanan. Meskipun demikian, plastik memiliki kelemahan utama, yaitu kemampuannya yang rendah untuk terdegradasi secara biologis (*nonbiodegradable*), sehingga mencemari lingkungan. Selain itu, plastik berpotensi menyebabkan kontaminasi bahan pangan melalui migrasi senyawa dari polimer atau residu pelarut, yang dapat menimbulkan risiko toksik (Ismaya et al., 2021; Yani et al., 2021).

Sebagai alternatif ramah lingkungan, *edible film* menjadi solusi yang menjanjikan. *Edible film* adalah lapisan tipis berbasis biopolimer yang dapat dikonsumsi, berfungsi sebagai pelindung makanan, serta memiliki kemampuan untuk mengurangi kehilangan kelembapan dan memperlambat migrasi gas tertentu (Ismaya et al., 2021). Bahan baku *edible film* umumnya menggunakan polisakarida, yang memiliki sifat penghalang terhadap uap air dan gas, serta ramah lingkungan karena dapat terurai secara biologis (Nesic et al., 2019). Polisakarida sebagai bahan dasar *edible film* dapat dimanfaatkan untuk mengatur udara di sekitarnya dan memberikan ketebalan atau kekentalan pada larutan *edible film*. Pemanfaatan dari senyawa berantai panjang ini sangat penting karena tersedia dalam jumlah banyak, harganya murah dan bersifat non toksik (Ismaya et al., 2021). Polisakarida dapat diperoleh dari berbagai bahan alami, salah satunya adalah rumput laut.

Indonesia, sebagai negara kepulauan, memiliki kekayaan rumput laut yang melimpah. Rumput laut kaya dengan berbagai polisakarida. Rumput laut juga memiliki aktivitas antimikroba, antiinflamasi, antidiabetes, antikanker, dan antioksidan. Kemampuan rumput laut untuk menghasilkan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai senyawa bioaktif disebabkan oleh kondisi lingkungan ekstrim tempat tumbuhnya, seperti salinitas yang tinggi (Juno, 2023).

Salah satu jenis rumput laut yang potensial adalah *Eucheuma cottonii*. Rumput laut *Eucheuma cottonii* digunakan sebagai bahan utama dalam penelitian ini karena merupakan salah satu hasil laut yang melimpah di provinsi Sulawesi Selatan. Nelayan hingga industri pengolahan *Eucheuma cottonii* tersebar di berbagai wilayah di provinsi Sulawesi Selatan, beberapa diantaranya yaitu adalah Takalar, Bulukumba dan Pangkep. Berdasarkan data dari Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia (2022), Sulawesi Selatan menjadi salah satu penyumbang terbesar untuk produksi perikanan budidaya nasional, bahkan Sulawesi Selatan menjadi produsen nomor satu untuk komoditas udang dan rumput laut dengan Kabupaten Takalar menjadi produsen nomor satu sebagai penghasil rumput laut *Eucheuma cottonii* di Sulawesi Selatan. Namun, produksi yang melimpah diikuti pula dengan melimpahnya limbah *Eucheuma cottonii* yang terkadang menjadi sumber pencemaran apabila tidak di kelola dengan baik. Maka limbah ini sudah selayaknya harus dapat dioptimalkan.

Dalam penelitian ini, dilakukan pengoptimalan limbah *Eucheuma cottonii* dengan cara pemanfaatan polisakaridanya sebagai bahan utama pembuatan *edible film*. *Eucheuma cottonii* mengandung polisakarida jenis kappa karagenan. Kappa karagenan adalah galaktan tersulfasi yang mampu membentuk gel stabil, kaya serat, serta memiliki aktivitas antioksidan (Radosavljević et al., 2022). Kappa karagenan dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut basa, seperti KOH dan NaOH. Karagenan dapat membentuk gel yang menjadi matriks utama *edible film*, sehingga karagenan dipilih berdasarkan kekuatan gel tertinggi. Menurut Asikin dan Kusumaningrum (2019), karagenan dari rumput laut dengan umur panen 40 hari memiliki kekuatan gel tertinggi. Selain umur simpan, pelarut ekstraksi karagenan juga menjadi faktor penting untuk menghasil karagenan dengan kekuatan gel yang baik. Menurut penelitian Amin et al. (2022), pelarut KOH menghasilkan kekuatan gel yang lebih baik dibanding pelarut alkali lainnya.

Karagenan memiliki sifat hidrofilik yang menjadi kelemahan sebagai material pembentuk *edible film* dengan kemampuan yang rendah sebagai penghambat transfer uap air (Handito, 2011), sehingga perlu ditambahkan *plasticizer* untuk memperbaiki sifat fisik dan mekanik *edible film*. *Plasticizer* adalah bahan tambahan yang berfungsi meningkatkan fleksibilitas dan kelenturan *edible film* (Zhang et al., 2016). Beberapa jenis *plasticizer* yang umum digunakan dalam pembuatan *edible film* meliputi gliserol, sorbitol, propilen glikol, dan jenis poliol lainnya. Keberhasilan *plasticizer* dalam membentuk *film* yang baik bergantung pada kompatibilitasnya dengan biopolimer, jumlah yang sesuai untuk plastisisasi, serta keberadaan gugus hidroksil bebas yang memadai (Indriani et al., 2021).

Selain *plasticizer*, formulasi *edible film* pada penelitian ini juga ditambahkan komponen aktif yaitu berupa ekstrak bahan alam. Penambahan ini dilakukan bertujuan untuk menambah nilai fungsional *edible film* agar dapat lebih maksimal menghambat terjadinya proses oksidasi. Salah satu sumber bahan alam yang memiliki sifat antioksidan yaitu buah naga (*Hylocereus* sp.) yang memiliki komponen bioaktif seperti flavonoid, fenolik, betasianin, dan antosianin. Kandungan betasianin dan antosianin pada buah naga dapat bermanfaat bagi kesehatan. Komponen betasianin dapat melawan diabetes, hiperlipidemia, obesitas, dan kanker. Sedangkan kandungan antosianin dapat menekan stres oksidatif dan gula darah pada tikus diabetes tipe 2 non-obesitas, dan menekan enzim inhibitor alfa-glukosidase (Puspita et al., 2022). Kandungan antosianin buah naga terdapat pada kulitnya yang berwarna merah. Menurut Niah dan Helda (2016), aktivitas antioksidan pada kulit buah naga lebih besar dibandingkan aktivitas antioksidan pada daging buahnya, sehingga berpotensi untuk dikembangkan menjadi sumber antioksidan alami. Antosianin yang terkandung dalam kulit buah naga mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol (Nizori et al., 2020).

Aktivitas antioksidan pada *edible film* dapat diuji menggunakan metode ABTS. Prinsip dari metode ini yaitu penghilangan warna kation ABTS dengan mengukur kapasitas antioksidan yang bereaksi langsung dengan radikal ABTS. Semakin pudar warna radikal ABTS, semakin besar peredaman aktivitas antioksidan dalam sampel. Kemampuan antioksidan dapat dilihat dari nilai % peredaman dengan parameter IC_{50} (Wulan et al., 2016; Yuli et al., 2022). Kekuatan aktivitas antioksidan dikategorikan kuat jika memiliki nilai IC_{50} dibawah 50 ppm dan dikategorikan sedang jika nilainya diantara 50-100 ppm (Juno, 2023) Semakin rendah nilai IC_{50} yang diperoleh maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya.

Meskipun *edible film* berbasis karagenan memiliki banyak potensi, penggunaannya masih terbatas dibandingkan *edible film* berbasis selulosa yang lebih umum di pasaran. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan *edible film* berbasis kappa karagenan dari *Eucheuma cottonii* yang difortifikasi dengan ekstrak kulit buah naga. Ekstrak karagenan akan dikarakterisasi menggunakan FTIR untuk analisis gugus fungsional, kemudian disintesis menjadi *edible film*. *Edible film* yang dihasilkan akan diuji sifat fisik dan kimianya melalui berbagai metode, termasuk uji aktivitas antioksidan, uji aktivitas antibakteri, ketebalan, daya serap air, elongasi, kuat tarik, FTIR, SEM-EDS dan XRD.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. bagaimana proses optimasi ekstraksi polisakarida karagenan dari *Eucheuma cottonii* dengan menggunakan metode RSM dapat memengaruhi kualitas dan karakteristik umum karagenan yang dihasilkan?
2. bagaimana karakteristik dari karagenan pada kondisi optimum yang dihasilkan?
3. bagaimana profil fitokimia ekstrak etanol kulit buah naga (*Hylocereus* sp.)?
4. bagaimana pengaruh penambahan ekstrak etanol kulit buah naga (*Hylocereus* sp.) terhadap karakteristik, aktivitas antioksidan dan aktivitas antibakteri pada *edible film* berbasis polisakarida karagenan?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menyintesis *edible film* berbasis polisakarida dengan menggunakan kondisi optimal selama proses pembuatan, serta menganalisis pengaruh penambahan ekstrak bahan alam terhadap karakteristik fisik, kimia, dan biologis dari *edible film* tersebut.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. mensintesis *edible film* berbasis polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut *Eucheuma cottonii* melalui optimasi kondisi proses pembuatan
2. Menganalisis pengaruh penambahan ekstrak bahan alam, yaitu kulit buah naga, terhadap karakteristik fisik, kimia, dan biologis dari *edible film* yang dihasilkan.
3. Mengevaluasi sifat fungsional *edible film* yang meliputi aktivitas antioksidan, aktivitas antibakteri, ketebalan, daya serap air, elongasi, kuat tarik, dan sifat termal melalui berbagai metode uji, termasuk FTIR, SEM-EDS dan XRD.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi ilmiah bagi pembaca dan peneliti dalam bidang biosintesis *edible film*, khususnya yang menggunakan ekstrak karagenan dari *Eucheuma cottonii* yang difortifikasi dengan ekstrak kulit buah naga. Hasil penelitian ini juga dapat memperluas wawasan tentang inovasi pemanfaatan bahan alami untuk pengembangan kemasan pangan ramah lingkungan.
2. Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pemahaman masyarakat tentang pemanfaatan sumber daya alam, khususnya rumput laut *Eucheuma cottonii*, serta mendorong penggunaan limbah kulit buah naga sebagai bahan yang bernilai tambah dalam pembuatan *edible film*. Dengan demikian, penelitian ini turut berkontribusi pada peningkatan kesadaran masyarakat akan pentingnya inovasi produk berbasis bahan alami yang ramah lingkungan.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah rumput laut *Eucheuma cottonii*, kulit buah naga, padatan KOH (merck), etanol (merck), gliserol (Kimia Farma), akuades, FeCl₃(merck), HCl (merck), pereaksi Dragendorff, H₂SO₄(merck), serbuk Mg (merck), padatan ABTS (SMARTLAB), padatan KBr (merck), padatan K₂S₂O₈ (merck), padatan C₆H₈O₆ (merck), *Nutrient Agar* (Sinar Mas), kertas saring (whatman), kain saring, *tissue roll* dan kertas label.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan porselen, cawan petri, batang pengaduk, corong kaca, oven, neraca tiga lengan, neraca analitik (ohaus), *hotplate stirrer* (JoanLAB), *magnetic bar* (JoanLAB), desikator (Shimadzu), spektrofotometer FTIR Prestige-21 (Shimadzu), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), *sentrifuge* (Eppendorf), *freeze dryer* (Thermo Fisher Technology), *tensile testing machine* (Shimadzu), SEM-EDS (Hitachi), difraktometer sinar-X (Rigaku) dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan dari bulan Maret hingga Desember 2024 di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Laboratorium Kimia Terpadu Departemen Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Laboratorium Kimia Analitik Departemen Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Laboratorium Terpadu Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Laboratorium Pangan Teknik Kimia PNUP, Laboratorium SEM-EDS Jurusan Fisika FMIPA Universitas Negeri Makassar, Laboratorium Forensik, LPPS FMIPA Universitas Hasanuddin, dan Laboratorium Penguji BBSPJIHPM.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel *Eucheuma cottonii*

Preparasi sampel *Eucheuma cottonii* dilakukan di Takalar, Makassar, Sulawesi Selatan. Langkah-langkah preparasi adalah sebagai berikut:

- a) Pencucian Sampel. *Eucheuma cottonii* sebanyak 6 kg dicuci menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran, pasir, dan residu lainnya. Proses pencucian dilakukan dengan cara manual, menggunakan air yang mengalir untuk memastikan kebersihan maksimal tanpa merusak struktur fisik rumput laut (Setyawati et al., 2022)

- b) Pengeringan Awal. Setelah dicuci, sampel diangin-anginkan pada suhu ruang selama kurang lebih 6 jam. Proses ini bertujuan untuk mengurangi kadar air awal tanpa menggunakan pemanasan langsung agar tidak merusak kualitas bahan aktif yang terkandung dalam rumput laut (Mulyani & Suparmi, 2023).

2.4.2 Optimasi Ekstraksi Polisakarida Karagenan dengan *Response Surface Methodology (RSM) Box-Behnken*

Tahap pertama dari prosedur ini yaitu membuat rancangan formulasi dan respon menggunakan aplikasi Minitab 2.1 untuk menentukan variabel bebas dan variabel tetap (Nurmiah et al., 2013). Variabel tetap adalah variabel yang nilainya dibuat konstan dalam setiap perlakuan karena tidak dianggap memengaruhi hasil yang diukur. Sebaliknya, variabel bebas adalah variabel yang dimanipulasi atau diubah dalam penelitian untuk melihat pengaruhnya terhadap respon yang dihasilkan. Pada penelitian ini, jumlah rumput laut yang digunakan sebagai bahan baku dipilih sebagai variabel tetap, sehingga nilainya dibuat sama pada setiap perlakuan. Sementara itu, variabel bebas meliputi konsentrasi KOH, suhu, dan waktu pengolahan, yang masing-masing divariasikan untuk mengamati pengaruhnya terhadap hasil penelitian. Penentuan variabel bebas didasarkan pada peneliti sebelumnya yaitu Rizal et al. (2015) dan Jaya et al. (2019).

Nilai batas minimum dan maksimum dimasukkan ke dalam program Minitab RSM *Box-Behnken Design* untuk diacak. Setelah dilakukan pengacakan kombinasi, didapatkan 15 perlakuan yang akan dianalisis dan respon yang diukur dan dioptimasi adalah rendemen hasil optimasi. Berikut data dari 15 perlakuan ekstraksi RSM.

Tabel 1. Data 15 *run order* ekstraksi polisakarida karagenan

<i>Run Order</i>	Konsentrasi (% I_v)	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (menit)
1	6	88	70
2	10	88	70
3	8	120	70
4	8	55	70
5	8	120	35
6	10	55	53
7	10	88	35
8	8	88	53
9	6	120	53
10	8	88	53
11	20	120	53
12	6	55	53
13	6	88	35
14	8	88	53
15	8	55	35

Selanjutnya dilakukan tahap formulasi menggunakan data pada tabel 1 dengan variabel tetap 20 gram *Eucheuma cottonii* dan volume pelarutnya sebanyak 300 mL. Selanjutnya dihitung % rendemen berdasarkan dari data hasil tahap formulasi dan

dilanjutkan dengan tahap analisis respon yang dianalisa ANOVA. Hasil ANOVA memberikan kondisi optimum pada ekstraksi polisakarida karagenan berdasarkan data % rendemen. Data optimum yang dihasilkan kemudian digunakan untuk prosedur selanjutnya.

2.4.3 Ekstraksi Polisakarida Karagenan dari *Eucheuma cottonii*

Proses ekstraksi karagenan dilakukan melalui beberapa tahapan. Sampel kering *Eucheuma cottonii* sebanyak 20 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas kimia berkapasitas 500 mL. Kemudian, ditambahkan 300 mL larutan KOH 9,5% ke dalam gelas kimia tersebut. Campuran ini dipanaskan pada suhu 86 °C selama 44 menit sambil diaduk secara kontinu menggunakan *hotplate stirrer*. Metode ini mengikuti prosedur yang diuraikan oleh Distantina et al. (2012) yang menyatakan bahwa pemanasan pada suhu optimal dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi.

Setelah pemanasan, campuran disaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 3:1 (etanol:filtrat) untuk mengendapkan karagenan. Campuran ini didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang untuk memastikan pembentukan endapan karagenan, sebagaimana diungkapkan oleh Distantina et al. (2010) dalam penelitian mereka tentang proses ekstraksi karagenan menggunakan metode pelarut alkali.

Endapan yang terbentuk kemudian dipisahkan dari supernatan melalui proses sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Endapan karagenan yang diperoleh selanjutnya dikeringkan menggunakan metode pengeringan beku (*freeze-drying*), yang menurut Desiana dan Hendrawati (2015), efektif untuk menjaga kualitas karagenan tanpa merusak struktur kimianya. Rendemen karagenan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{massa karagenan (g)}}{\text{massa rumput laut kering (g)}} \times 100\%$$

2.4.4 Uji Karakteristik Bubuk Karagenan

Uji FTIR. Prosedur uji FTIR dilakukan untuk menganalisis karakteristik gugus fungsi dalam bubuk karagenan, mengikuti teknik yang dijelaskan oleh Smith (2018) dalam kajiannya tentang spektroskopi inframerah. Sampel karagenan sebanyak 0,5 gram digerus bersama kalium bromida (KBr) menggunakan mortar dengan perbandingan massa 1:10 (sampel:KBr) untuk menghasilkan campuran yang homogen dan transparan terhadap radiasi inframerah (Coates, 2000). Campuran yang telah digerus dimasukkan ke dalam wadah berbentuk bulat, kemudian divakumkan untuk menghilangkan molekul air yang tersisa, sebagaimana direkomendasikan oleh Stuart (2004) untuk mencegah gangguan spektral dari air. Selanjutnya, campuran dipres dengan tekanan sebesar 72 Torr (8–20 ton per satuan luas) selama 10 menit hingga terbentuk bulatan tipis yang seragam. Spektra inframerah (IR) kemudian diperoleh menggunakan perangkat FTIR pada rentang bilangan gelombang 4500–350 cm^{-1} , dengan resolusi 4 cm^{-1} dan jumlah *scan* sebanyak 300 kali untuk memastikan akurasi pengukuran (Smith, 2018). Teknik ini memungkinkan identifikasi dan analisis presisi

terhadap gugus fungsi dalam senyawa karagenan, sebagaimana dijelaskan oleh Coates (2000).

Uji Kadar Air. Prosedur uji kadar air dilakukan dengan memanaskan cawan porselen kosong dalam oven pada suhu 170 °C selama 2 jam untuk memastikan tidak ada kandungan air tersisa. Setelah itu, cawan dipindahkan ke dalam desikator selama 30 menit untuk menyesuaikan suhu dan menghindari penyerapan uap air dari lingkungan. Bobot cawan yang telah dipanaskan dicatat sebagai bobot awal (B). Sampel bubuk karagenan sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam cawan tersebut, kemudian cawan beserta sampel dimasukkan kembali ke dalam oven pada suhu 105 °C selama 24 jam. Proses ini dilakukan untuk menghilangkan kandungan air dalam sampel, sebagaimana disarankan dalam metode pengeringan standar untuk analisis kadar air (AOAC *International*, 2019). Setelah pengeringan, cawan dipindahkan kembali ke dalam desikator selama 30 menit untuk mendinginkan sebelum penimbangan. Bobot cawan setelah proses ini dicatat sebagai bobot akhir (C). Kadar air sampel dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{B-C}{A} \right)$$

A adalah massa awal sampel bubuk karagenan dalam gram, B adalah bobot awal (cawan + sampel sebelum pengeringan), dan C adalah bobot akhir (cawan + sampel setelah pengeringan). Prosedur ini memastikan hasil yang akurat dan sesuai dengan metode standar pengukuran kadar air pada bahan biologis (AOAC *International*, 2019).

Uji Kadar Abu. Prosedur pengujian kadar abu pada karagenan dilakukan berdasarkan metode yang dirujuk oleh *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). Cawan porselen yang akan digunakan terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam untuk memastikan tidak ada kelembaban yang tersisa. Setelah itu, cawan didinginkan di dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang beratnya sebagai bobot awal (B). Sampel karagenan sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam cawan porselen tersebut. Cawan berisi sampel kemudian ditempatkan di dalam tanur listrik (*furnace*) dan dipanaskan pada suhu 600 °C selama 6 jam untuk mengoksidasi bahan organik hingga hanya tersisa abu. Setelah selesai, cawan didinginkan di dalam desikator selama 30 menit untuk menghindari penyerapan uap air, lalu ditimbang beratnya untuk mendapatkan bobot akhir (C). Kadar abu sampel dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Kadar abu (\%)} = \left(\frac{C-B}{a} \right) \times 100\%$$

A adalah massa awal sampel karagenan (gram), B adalah bobot awal cawan (gram), dan C adalah bobot akhir cawan setelah pemanasan. Metode ini digunakan untuk menentukan kandungan mineral dalam sampel dan merupakan teknik yang banyak digunakan dalam analisis bahan pangan dan biologi (AOAC, 1995).

2.4.5 Ekstraksi Kulit Buah Naga dengan Etanol

Prosedur ekstraksi kulit buah naga dilakukan untuk memperoleh senyawa bioaktif menggunakan pelarut etanol 70%. Sampel kulit buah naga sebanyak 150 gram dicuci bersih menggunakan akuades untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Setelah

itu, sampel dipotong kecil-kecil dengan ukuran sekitar 4–5 cm untuk memperluas permukaan kontak selama proses ekstraksi. Sampel yang telah dipotong kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 60 °C selama 2 jam untuk mengurangi kadar air tanpa merusak kandungan senyawa bioaktif. Setelah proses pengeringan, sampel kering direndam dalam etanol 70% dengan perbandingan 1:1 (150 mL etanol untuk 150 gram sampel) dan didiamkan selama 12 jam pada suhu ruang untuk memungkinkan senyawa larut ke dalam pelarut. Selanjutnya, campuran disaring untuk memisahkan filtrat dari residu, dan filtrat yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak. Metode ini mengacu pada teknik yang umum digunakan dalam ekstraksi senyawa bioaktif dengan pelarut organik untuk memastikan efisiensi dan kestabilan senyawa (Harborne, 1998; Setiawan et al., 2020).

2.4.6 Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Buah Naga

Uji Tanin. Uji tanin dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa tanin dalam ekstrak kulit buah naga menggunakan metode reaksi warna. Sebanyak 2 mL ekstrak kulit buah naga dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan akuades secukupnya untuk mengencerkan larutan. Selanjutnya, beberapa tetes larutan FeCl_3 1% ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Reaksi positif terhadap tanin ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi biru tua atau hijau kehitaman. Warna tersebut menunjukkan terbentuknya kompleks antara ion besi (Fe^{3+}) dan tanin, sebagaimana dijelaskan oleh Harborne (1998). Kombinasi penggunaan larutan FeCl_3 dengan akuades sebagai pengencer telah terbukti memberikan sensitivitas tinggi dalam mengidentifikasi keberadaan tanin secara kualitatif (Widowati, 2009).

Uji Alkaloid. Uji alkaloid dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa alkaloid dalam ekstrak kulit buah naga menggunakan metode reaksi presipitasi. Sebanyak 2 mL ekstrak kulit buah naga dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan HCl 1% secukupnya untuk menciptakan kondisi asam yang optimal bagi reaksi. Selanjutnya, beberapa tetes pereaksi Dragendorff ditambahkan ke dalam campuran. Hasil uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna kuning hingga oranye, yang merupakan hasil interaksi antara ion logam dalam pereaksi Dragendorff dengan gugus alkaloid bermuatan negatif. Metode ini mengacu pada panduan analisis alkaloid yang dijelaskan oleh Harborne (1998), pereaksi Dragendorff digunakan sebagai indikator selektif untuk mendeteksi senyawa alkaloid dalam berbagai ekstrak tumbuhan. Teknik ini juga digunakan secara luas dalam analisis kualitatif alkaloid untuk tujuan penelitian dan farmakologi, sebagaimana dilaporkan oleh Widowati (2009).

Uji Steroid. Uji steroid dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa steroid dalam ekstrak kulit buah naga menggunakan metode Liebermann-Burchard. Sebanyak 2 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL asam asetat anhidrida. Selanjutnya, 2 mL H_2SO_4 pekat ditambahkan secara perlahan melalui dinding tabung untuk menghindari reaksi yang terlalu cepat. Reaksi positif terhadap steroid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin berwarna hijau kebiruan pada lapisan campuran. Interaksi ini terjadi karena gugus steroid bereaksi dengan asam asetat anhidrida dan H_2SO_4 pekat. Teknik ini mengacu pada metode yang dijelaskan oleh Harborne (1998), yang banyak digunakan untuk analisis kualitatif senyawa steroid dalam ekstrak tumbuhan. Penelitian terbaru oleh Syafitri (2014) mendukung bahwa

hasil positif uji steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan, yang menegaskan keakuratan metode Liebermann-Burchard dalam mendeteksi steroid.

Uji Flavonoid. Uji flavonoid dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa flavonoid dalam ekstrak kulit buah naga menggunakan metode reaksi reduksi magnesium. Sebanyak 1 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mg serbuk magnesium (Mg). Selanjutnya, beberapa tetes HCl pekat ditambahkan secara perlahan ke dalam campuran. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah jingga, yang menunjukkan terbentuknya kompleks flavonoid sebagai hasil reduksi oleh magnesium dalam suasana asam. Metode ini sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh Harborne (1998), yang telah lama digunakan untuk analisis kualitatif flavonoid. Penelitian terbaru oleh Syafitri et al. (2014) juga menunjukkan bahwa metode ini efektif untuk mendeteksi flavonoid dalam berbagai ekstrak tumbuhan dengan sensitivitas tinggi.

Uji Saponin. Uji saponin dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa saponin dalam ekstrak kulit buah naga menggunakan metode pembentukan busa. Sebanyak 2 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan akuades secukupnya. Campuran ini dikocok secara kuat selama beberapa detik dan dibiarkan selama 30 detik untuk mengamati pembentukan busa. Setelah itu, ditambahkan satu tetes larutan HCl 2% untuk menguji kestabilan busa yang terbentuk. Hasil positif terhadap saponin ditandai dengan adanya busa yang stabil dan tidak segera hilang setelah penambahan asam. Metode ini sesuai dengan prosedur analisis kualitatif yang dijelaskan oleh Harborne (1998), dan penelitian terbaru oleh Syafitri (2014) menunjukkan bahwa metode ini efektif untuk mendeteksi saponin dalam berbagai ekstrak tumbuhan dengan sensitivitas tinggi.

2.4.7 Sintesis *Edible Film* dengan Fortifikasi Ekstrak Kulit Buah Naga

Sintesis *edible film* dilakukan dengan menggunakan karagenan sebagai matriks utama dan fortifikasi ekstrak kulit buah naga untuk meningkatkan sifat fungsionalnya. Pada penelitian ini dibuat 3 jenis variasi *edible film* dengan konsentrasi penambahan ekstrak kulit Buah Naga (EKBN) 0%, 2% dan 8%. Sebanyak 3 gram bubuk karagenan dilarutkan ke dalam 29, 28 dan 27 mL akuades untuk konsentrasi 0%, 2% dan 8%. secara berturut-turut menggunakan *hotplate stirrer* pada suhu 85 °C hingga larut sempurna. Setelah larutan homogen, ditambahkan 1 mL gliserol sebagai *plasticizer* yang dilanjutkan penambahan 1 dan 2 mL EKBN untuk konsentrasi 2% dan 8% sambil diaduk selama 30 menit untuk memastikan distribusi yang merata. Larutan yang dihasilkan dituangkan ke dalam cawan petri dan dikeringkan dalam oven pada suhu 55 °C selama 12 jam hingga terbentuk *film* tipis. Prosedur ini mengacu pada teknik yang dijelaskan oleh Budianto (2023), yang menunjukkan bahwa kombinasi bahan tambahan seperti gliserol, *carboxymethyl cellulose* (CMC) dan *soy protein isolate* (SPI) dapat meningkatkan sifat fisik dan mekanik *edible film* berbasis ekstrak kulit buah naga. Penelitian oleh Purwati dan Putri (2023) juga mendukung bahwa penggunaan serbuk kulit buah naga merah dengan rasio konjak glukomanan yang optimal menghasilkan *edible film* dengan karakteristik mekanik dan *barrier* yang baik.

2.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan *Edible Film*

Pembuatan Larutan ABTS 0,004 M. Prosedur pembuatan larutan ABTS dimulai dengan menimbang 7,1 mg padatan ABTS menggunakan neraca analitik untuk

memastikan akurasi jumlah. Padatan tersebut kemudian dilarutkan dalam 5 mL akuades di dalam gelas kimia. Larutan dihomogenkan menggunakan pengaduk hingga seluruh padatan ABTS larut sempurna dan larutan tampak jernih. Larutan ini selanjutnya digunakan untuk proses pembuatan reagen ABTS. Prosedur ini mengacu pada metode yang dijelaskan oleh Re et al. (1999), yang telah digunakan secara luas dalam analisis aktivitas antioksidan menggunakan radikal ABTS.

Pembuatan Larutan $K_2S_2O_8$ 0,002 M. Larutan $K_2S_2O_8$ 0,002 M dibuat dengan menimbang 3,5 mg padatan $K_2S_2O_8$ menggunakan neraca analitik untuk memastikan ketelitian jumlah. Padatan tersebut kemudian dilarutkan dalam 5 mL akuades di dalam gelas kimia. Larutan diaduk secara perlahan menggunakan batang pengaduk kaca hingga homogen dan semua padatan larut sempurna. Larutan yang dihasilkan digunakan sebagai komponen utama dalam pembuatan reagen ABTS. Prosedur ini mengacu pada metode standar analisis aktivitas antioksidan sebagaimana dijelaskan oleh Re et al. (1999), yang sering digunakan untuk menguji kapasitas antioksidan berbasis radikal ABTS.

Pembuatan Reagen ABTS. Reagen ABTS dibuat dengan mencampurkan larutan ABTS 0,004 M dan larutan $K_2S_2O_8$ 0,002 M dalam labu ukur berkapasitas 25 mL. Campuran ini ditutup rapat menggunakan aluminium foil untuk melindunginya dari paparan cahaya, yang dapat memengaruhi stabilitas reagen. Labu yang berisi campuran kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 38 °C selama 12 jam untuk memastikan terbentuknya radikal ABTS[•]. Setelah inkubasi, larutan ditambahkan metanol p.a hingga mencapai tanda batas pada labu ukur, lalu dihomogenkan dengan pengadukan ringan. Reagen ini siap digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan. Prosedur ini mengacu pada metode standar yang dijelaskan oleh Re et al. (1999), yang sering digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan berbasis radikal ABTS.

Pembuatan Larutan Pembanding Asam Askorbat 10 ppm. Larutan pembanding asam askorbat dibuat dengan menimbang 0,2 gram padatan asam askorbat menggunakan neraca analitik untuk memastikan akurasi massa. Padatan asam askorbat kemudian dilarutkan dalam 50 mL akuades di dalam gelas kimia, sambil diaduk hingga larut sempurna. Larutan ini disiapkan untuk menghasilkan konsentrasi tertentu sesuai kebutuhan analisis, biasanya dalam rentang konsentrasi yang digunakan sebagai standar dalam uji aktivitas antioksidan. Larutan pembanding ini digunakan untuk menghitung aktivitas antioksidan relatif dari sampel yang diuji. Prosedur ini mengacu pada metode yang banyak digunakan dalam analisis kapasitas antioksidan sebagaimana dijelaskan oleh Re et al. (1999), yang menempatkan asam askorbat sebagai pembanding standar.

Pembuatan Larutan Induk Sampel *Edible Film* 10 ppm. Sebanyak masing-masing 0,5 gram sampel *edible film* ditimbang menggunakan neraca analitik untuk memastikan akurasi massa. Sampel kemudian dilarutkan dalam 50 mL akuades di dalam gelas kimia. Larutan dihomogenkan menggunakan pengaduk hingga seluruh sampel terdispersi secara merata, menghasilkan larutan dengan konsentrasi akhir sebesar 10 ppm. Larutan ini siap digunakan dalam uji aktivitas antioksidan, sesuai dengan prosedur yang banyak digunakan dalam analisis senyawa bioaktif pada *film* berbasis biopolimer (Re et al., 1999).

Pengujian Aktivitas Antioksidan. Larutan sampel konsentrasi 0% dibuat dalam seri 0,5; 1; 2; 4 dan 8 ppm dengan memipet larutan induk 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 dan 0,8 mL. Larutan sampel konsentrasi 2% dibuat dalam seri 0,25; 0,5; 1; 2 dan 4 ppm dengan memipet larutan induk 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; dan 0,4 mL. Larutan sampel konsentrasi 8% dibuat dalam seri 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 dan 1,6 ppm dengan memipet larutan induk 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; dan 0,16 mL. Kemudian masing-masing larutan dicukupkan menggunakan akuades hingga volumenya masing-masing 1 mL. Kemudian dicampurkan dengan 1 mL reagen ABTS di dalam tabung reaksi. Digunakan larutan asam askorbat sebagai pembanding dengan seri konsentrasi 0,5; 1; 2; 4 dan 8 ppm. Kedua campuran larutan tersebut diinkubasi selama 15 menit dalam inkubator untuk memungkinkan reaksi antara radikal ABTS⁺ dan senyawa antioksidan dalam sampel terjadi. Setelah inkubasi, absorbansi campuran diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 733 nm. Metode ini mengacu pada prosedur yang dikembangkan oleh Re et al. (1999), yang telah digunakan secara luas untuk analisis kapasitas antioksidan berbasis radikal ABTS. Metode ini memberikan hasil yang presisi dalam mengukur kemampuan senyawa antioksidan untuk menetralkan radikal bebas. Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel}) \times 100\%}{\text{Absorbansi Blanko}}$$

2.4.9 Uji Aktivitas Antibakteri *Edible Film*

Uji aktivitas antibakteri *edible film* dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan *film* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (gram-negatif). Sampel *edible film* dipotong berbentuk melingkar dengan diameter 6 mm menggunakan punch steril, kemudian diletakkan di atas media Nutrient Agar (NA) yang telah diinokulasi dengan 0,2 mL inokulum bakteri berkonsentrasi 10⁵–10⁶ CFU/mL. Inokulum disebar secara merata menggunakan swab steril hingga cairan terserap ke dalam media. Setelah itu, media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24–48 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar *edible film* diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm), termasuk diameter cakram *film*. Metode ini mengacu pada prosedur standar difusi cakram sebagaimana dijelaskan oleh Bauer et al. (1966) dan telah dimodifikasi untuk pengujian bahan *film*, serta merupakan metode umum dalam evaluasi aktivitas antibakteri bahan alami dan polimer berbasis biopolimer.

2.4.10 Uji Mekanik *Edible Film*

Uji Daya Serap Air. Cawan porselin dikeringkan di dalam oven selama 20 menit pada suhu 105 °C kemudian didinginkan selama 15 menit di dalam desikator dan ditimbang bobotnya sebagai bobot awal. Sampel yang telah dipotong 1x1 cm ditimbang beratnya dan dicatat dan dimasukkan ke dalam cawan porselin. Kemudian cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105 °C selama 3 jam lalu didinginkan pada desikator selama 15 menit dan ditimbang kembali. Setelah itu, cawan kembali dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam lalu didinginkan di desikator selama 15 menit kemudian ditimbang dan dicatat hingga mencapai bobot konstan. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang berisi akuades

25 mL dan didiamkan selama 24 jam. Kemudian sampel diambil dari wadah dan ditepuk-tepuk menggunakan kertas saring dengan hati-hati lalu ditimbang. Daya larut sampel dihitung menggunakan persamaan (5):

$$S \text{ (Daya serap air)} = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

Uji Ketebalan. Uji ketebalan dilakukan untuk mengukur ketebalan *film* yang dihasilkan. Pengujian ketebalan pada *edible film* diukur menggunakan mikrometer digital dengan ketelitian 0,001 mm (Salsabila dan Ulfah, 2017). Nilai ketebalan yang didapat merupakan rata-rata dari pengukuran pada lima titik yang berbeda.

Uji Elongasi. Uji elongasi dilakukan untuk mengukur kemampuan *edible film* meregang sebelum putus. Sampel *edible film* dipotong dengan ukuran 5×2 cm menggunakan alat pemotong yang tajam dan presisi untuk memastikan ukuran yang konsisten. Sampel yang telah dipotong kemudian diuji menggunakan alat uji tarik (*tensile tester*) dengan kecepatan tarik tertentu sesuai standar ASTM D882-18. Panjang awal sampel dicatat sebelum dilakukan penarikan. Selama pengujian, sampel ditarik hingga putus, dan panjang akhirnya dicatat. Elongasi dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Elongasi (\%)} = \left(\frac{\text{Panjang Akhir} - \text{Panjang Awal}}{\text{Panjang Awal}} \right) \times 100\%$$

Uji Kuat Tarik. Uji kuat tarik dilakukan untuk mengukur kekuatan maksimum yang dapat ditahan oleh *edible film* sebelum mengalami kerusakan atau putus. Sampel *edible film* dipotong dengan ukuran 5×2 cm menggunakan alat pemotong yang tajam untuk memastikan ukuran yang seragam. Sampel yang telah dipotong diuji menggunakan alat uji tarik (*tensile tester*) sesuai standar ASTM D882-18. Kedua ujung sampel dijepit pada alat uji tarik, dan beban diterapkan secara bertahap hingga sampel mengalami kerusakan. Kuat tarik dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kuat Tarik (\%)} = \left(\frac{\text{Gaya Maksimum (N)}}{\text{Luas Penampang Sampel (mm}^2\text{)}} \right)$$

2.4.11 Uji Karakteristik *Edible Film*

Uji FTIR. Uji FTIR dilakukan untuk menganalisis gugus fungsi dalam *edible film* menggunakan teknik spektroskopi inframerah. Sebanyak 0,5 gram sampel *edible film* digerus bersama kalium bromida (KBr) dalam mortar dengan perbandingan massa 1:10 (sampel:KBr) untuk menghasilkan campuran yang homogen dan transparan terhadap radiasi inframerah. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam cetakan berbentuk bulat dan divakumkan untuk menghilangkan molekul air yang dapat memengaruhi spektrum. Campuran tersebut kemudian dipres pada tekanan 72 Torr (setara 8 hingga 20 ton per satuan luas) selama 10 menit hingga terbentuk cakram tipis. Spektrum inframerah diperoleh dengan mengukur sampel pada rentang bilangan gelombang 4500–350 cm⁻¹ menggunakan resolusi 4 cm⁻¹ dan jumlah *scan* sebanyak 300 kali untuk meningkatkan sensitivitas data. Teknik ini memungkinkan identifikasi gugus fungsi seperti hidroksil, karbonil, dan ester yang memberikan informasi tentang struktur kimia *edible film*.

Prosedur ini mengacu pada metode analisis FTIR yang dijelaskan oleh Coates (2000) dan Stuart (2004), yang umum digunakan untuk karakterisasi material berbasis polimer.

Uji SEM-EDS. Uji SEM-EDS (*Scanning Electron Microscopy - Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) dilakukan untuk menganalisis morfologi dan komposisi unsur pada permukaan *edible film*. Sampel *edible film* ditempelkan pada *set holder* menggunakan perekat ganda untuk memastikan kestabilan selama pengamatan. Selanjutnya, sampel dilapisi dengan lapisan tipis logam emas menggunakan metode pelapisan sputtering dalam kondisi vakum untuk meningkatkan konduktivitas listriknya. Sampel kemudian ditempatkan di dalam ruang SEM, dan pengamatan topografi permukaan dilakukan pada berbagai tingkat perbesaran, yaitu 2000×, 5000×, 8000×, dan 10.000×, guna memperoleh detail morfologi permukaan *film*. Analisis ini memberikan informasi tentang struktur fisik serta distribusi partikel pada permukaan *edible film*, yang penting untuk mengevaluasi sifat mekanik dan fungsional material. Prosedur ini mengacu pada teknik standar SEM-EDS sebagaimana dijelaskan oleh Goldstein et al. (2018), yang merupakan metode umum untuk karakterisasi material berbasis polimer dan bioplastik.

Uji XRD. Uji XRD (X-ray Diffraction) dilakukan untuk menganalisis struktur kristal pada *edible film*. Sampel *edible film* dipotong kecil dengan ukuran 2×2 cm, kemudian ditempatkan ke dalam *holder* khusus untuk pengujian. Difraktometer diatur pada panjang gelombang radiasi Cu K α ($\lambda=1.5406$ Å) yang dioperasikan pada tegangan 40 kV dan arus 40 mA. Pengukuran dilakukan pada suhu kamar dengan kisaran sudut 2θ antara 0,5° hingga 10°, menggunakan kecepatan *scan* 0,02°/s. Instrumen yang digunakan adalah Bruker AXS, yang dilengkapi dengan detektor beresolusi tinggi untuk memastikan akurasi data. Analisis ini bertujuan untuk mengidentifikasi pola difraksi yang menggambarkan tingkat kekristalan dan struktur amorf pada *edible film*, yang berpengaruh terhadap sifat mekanik dan fungsional material. Prosedur ini mengacu pada metode standar analisis XRD sebagaimana dijelaskan oleh Cullity dan Stock (2001), yang merupakan pendekatan umum dalam karakterisasi material berbasis polimer.