

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kemasan makanan adalah bahan yang digunakan untuk menyimpan, atau membungkus makanan (Genisa et al., 2023). Menurut Gaspar dan Braga (2023) peranan kemasan makanan diantaranya untuk menjaga keamanan makanan, melindungi makanan dari kontaminasi, mencegah pemborosan atau kehilangan makanan dan peranan utamanya seperti yang dilaporkan oleh Hasan et al. (2022) yaitu untuk mengawetkan dan memperpanjang umur simpan buah-buahan, sayuran, dan makanan olahan. Hal ini dapat mencegah terjadinya kekurangan nilai mutu gizi makanan serta memungkinkan kualitas makanan agar tetap terjaga. Kemasan pangan yang umum digunakan dan terus meningkat yaitu plastik.

Plastik sering digunakan sebagai bahan utama dengan tujuan pengemasan yang lebih praktis (Sariningsih et al., 2018). Groh et al. (2019) melaporkan bahwa produksi plastik global telah mencapai 380 juta ton dan meningkat tajam dalam beberapa dekade terakhir. Penggunaan plastik yang diproduksi telah mencapai sekitar 40% untuk aplikasi pengemasan. Menurut Rusman (2021) produksi plastik di Makassar pada tahun 2015 berkisar 968,56 ton lalu naik menjadi 1.434,86 ton pada tahun 2016, menunjukkan konsumsi plastik masyarakat masih tinggi. Bahan kemasan plastik sangat praktis dan banyak digunakan dengan pertimbangan ekonomis seperti harganya yang terjangkau, kuat, mudah dicetak, tahan panas dan lebih ringan (Dehghani et al., 2018). Namun penggunaan plastik sebagai bahan kemasan makanan telah menimbulkan berbagai dampak buruk bagi lingkungan disebabkan oleh karena ketidakmampuannya untuk terurai secara alami oleh mikroba dan sifatnya yang tidak dapat didaur ulang (Utami et al., 2018). Salah satu bentuk usaha yang dikembangkan sebagai alternatif masalah tersebut adalah pembuatan kemasan bahan pangan berbasis bioaktif seperti *edible film*.

Edible film adalah lapisan tipis yang melapisi bahan pangan, aman untuk dikonsumsi dan bersifat mudah terurai di lingkungan (Ningrum et al., 2020). *Edible film* berfungsi sebagai pencegah perpindahan oksigen, kelembaban, dan zat terlarut antara makanan dengan lingkungannya serta meningkatkan karakteristik fisik dan pembawa nilai aditif (Montero et al., 2017). Komponen penyusun *edible film* berpengaruh secara langsung pada morfologi dan karakteristik pengemas pangan yang dihasilkan. Biopolimer penyusun *edible film* dibagi menjadi tiga kategori yaitu hidrokoloid, lipid dan komposit. Komponen yang termasuk hidrokoloid antara lain pektin, pati, protein dan polisakarida.

Polisakarida adalah makromolekul dengan berat molekul tinggi yang terdapat dalam sistem kehidupan, termasuk rumput laut. Berdasarkan kelompoknya rumput laut *phaeophyta* (cokelat), mengandung alginat yang dimanfaatkan untuk berbagai aplikasi komersial. Polisakarida yang diisolasi dari sumber laut, memiliki karakteristik khusus dan istimewa yang semacam tidak dapat dijumpai pada tanaman darat (Chudasama et al., 2021). Alginat adalah istilah umum senyawa yang

merupakan garam dan turunan dari asam alginat, pertama kali ditemukan pada tahun 1880 oleh ahli kimia Inggris, E.C.C. Stanford (Pereira dan Cotas, 2020). Alginat dapat diperoleh dari rumput laut *sargassum* sp., karena 40% dari berat kering rumput laut cokelat mengandung alginat (Wibowo et al., 2013). Oleh karena itu, industri pangan, farmasi, bahan kosmetik, tekstil, memanfaatkan bahan alam tersebut sebagai agen pembuat gel, pengemulsi, penstabil, pensuspensi (Ariani et al., 2023).

Alginat yang terletak pada dinding rumput laut cokelat dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Pada dasarnya, ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat yang memungkinkan pelarut berdifusi ke dalam matriks, memungkinkan senyawa bioaktif larut dalam pelarut sehingga dapat diisolasi. Jenis ekstraksi terbagi menjadi dua cara yaitu ekstraksi padat-cair dan cair-cair. Sebagian besar proses ekstraksi alginat murni dari rumput laut cokelat menggunakan cara ekstraksi padat-cair dengan pelarut air (*aqueous phase*). Pada prinsipnya ekstraksi alginat, hanya berupa bentuk Na-alginat, sehingga bentuk garam lain perlu dikonversi menjadi natrium alginat larut air. Proses ekstraksi alginat rumput laut coklat terdiri dari tiga langkah utama, yaitu tahap pra-ekstraksi, perendaman dan ekstraksi Na-alginat murni (Bojorges et al., 2023). Hasil ekstraksi dioptimalkan dengan metode *Response Surface Method* (RSM). Metode RSM digunakan untuk mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap respon, mendapatkan model hubungan antara variabel bebas dan respon serta mendapatkan kondisi optimal dari proses yang dilakukan untuk menghasilkan respon terbaik (Rahmawati et al., 2022). Adanya bantuan metode ini, maka dapat diperoleh kondisi ekstraksi serta hasil natrium alginat yang optimal untuk selanjutnya dapat digunakan dalam sintesis *edible film*.

Natrium alginat adalah garam dasar dari asam alginat yang digunakan sebagai bahan dasar pembuatan *edible film* dalam penelitian ini karena sifat yang dimiliki diantaranya biokompatibel, *biodegradable*, tidak beracun dan kemampuannya menjadi *film* natrium alginat lebih mudah, serta permukaan *edible film* halus dan juga transparan (Liah et al., 2023). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Khasanah et al. (2019) menyatakan *film* alginat yang dihasilkan memiliki sifat penghalang oksigen yang baik pada suhu rendah, dapat menghambat oksidasi lipid dalam produk kemasan, dan dapat memperhalus tekstur produk. Di sisi lain, apabila alginat murni sebagai penyusun *edible film* cenderung memiliki kelemahan seperti mudah rusak saat dikeringkan, permeabilitas uap yang kurang, kelarutannya tinggi dalam air, serta elongasi rendah, akan tetapi hal tersebut dapat diatasi dengan penambahan *plasticizer* (Kong et al., 2022). Salah satu jenis *plasticizer* adalah gliserol. Gliserol cukup efektif digunakan untuk meningkatkan sifat plastis *film* dikarenakan memiliki berat molekul yang kecil dan daya penghalang efektif terhadap uap air (Nisa dan Huri, 2014).

Penelitian terkait sintesis *edible film* telah dilaporkan oleh Hayati et al. (2020), yaitu *film* dibuat dengan menggunakan natrium alginat, gliserol, dengan penambahan serbuk *spirulina platensis*. Penelitian lainnya mengenai *edible film* juga telah dilaporkan oleh Auliyaur (2021), dengan menggunakan bahan natrium alginat yang dikombinasikan dengan gliserol dan pati tepung sagu. Menurut Rosida et al. (2021) suhu pemanasan serta penambahan *plasticizer* atau bahan aditif lainnya ke dalam formula *edible film* menjadi faktor yang berpengaruh terhadap sifat mekanik edible

film yang terbentuk. Sifat suatu *edible film* dapat diukur melalui pengujian karakterisasi. Beberapa karakterisasi *film* diantaranya seperti ketebalan, kuat tarik dan elongasi (Park dalam Jacob et al., 2014). Ketebalan berpengaruh pada laju transmisi uap air, kekuatan tarik dan persen pemanjangan *edible film* yang dihasilkan, sehingga ketebalan menjadi parameter penting lainnya yang mempengaruhi penggunaan *film* sebagai pengemas produk pangan yang *edible*. Ketebalan *edible film* sangat dipengaruhi oleh sifat dan komposisi bahan yang digunakan, selain itu luas cetakan, volume larutan, dan banyaknya total padatan dalam larutan turut mempengaruhi ketebalan suatu *film* (Saputro et al., 2017).

Kuat tarik merupakan gaya tarik maksimum yang dapat ditahan oleh film sebelum putus, yang menggambarkan kekuatan film (Kanani et al., 2017). Pengukuran kuat tarik berguna untuk mengetahui besarnya gaya yang dicapai untuk mencapai tarikan maksimum pada setiap satuan luas area film untuk meregang atau memanjang (Handayani dan Nurzanah, 2018). Menurut Anandito et al. (2012) elongasi *edible film* merupakan keadaan ketika film patah setelah mengalami perubahan panjang dari ukuran yang sebenarnya pada saat terjadi peregangan. Pengukuran kuat tarik dan pemanjangan *edible film* dilakukan dengan mencetak *edible film* membentuk tapal kuda kemudian pengujiannya menggunakan alat *Universal Testing Machine* (Gontard dalam Utami et al., 2017). Selain itu, fortifikasi bahan alam yang mengandung senyawa-senyawa antioksidan ke dalam *edible film* perlu dilakukan.

Senyawa antioksidan banyak diaplikasikan dalam bidang kesehatan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Wypch, 2020). Senyawa antioksidan seperti enzim superoksida dismutase glution dapat diproduksi dalam tubuh manusia, namun jumlahnya tidak mencukupi. Oleh sebab itu diperlukan sumber antioksidan alami yang banyak mengandung antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, β -karoten (Artanti dan Lisnasari, 2018). Sumber alami antioksidan dapat pula diperoleh pada berbagai jenis tanaman salah satunya ketapang.

Ketapang (*Terminalia catappa* L.) termasuk salah satu tanaman yang tumbuh di tanah yang kurang unsur hara dan persebarannya hampir diseluruh wilayah Indonesia sehingga mudah untuk dibudidayakan. Pohon ketapang merupakan salah satu tanaman serbaguna yang terdiri atas beberapa bagian seperti dari akar, batang, daun dan buah dapat dimanfaatkan (Walidah dan Takwanto, 2023). Namun pada kenyataannya, selama ini masyarakat hanya memanfaatkan tanaman ini sebagai tanaman peneduh kota dan belum dimanfaatkan secara luas, sehingga nilai ekonomisnya rendah (Pasanda et al., 2022). Tanaman ketapang terutama pada bagian daunnya diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder yang berpotensi antioksidan, anti-inflamasi, analgesik, antikanker, hepatoproteksi, antidiabetes, antijamur dan antioksidan (Silalahi, 2022).

Daun ketapang dimanfaatkan dengan cara diseduh untuk melarutkan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya umumnya hal ini disebut mengekstraksi. Ekstraksi adalah metode awal yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah pelarut. Parameter yang mempengaruhi laju ekstraksi diantaranya ialah persiapan

sampel, waktu ekstraksi, jumlah sampel, suhu, rasio pelarut dan padat dan jenis pelarut (Popa et al., 2023). Selama proses ekstraksi suatu senyawa berlangsung, senyawa akan terlarut pada pelarut dengan sifat yang sama.

Senyawa metabolit sekunder pada tanaman dapat diidentifikasi dengan skrining fitokimia. Pada daun ketapang skrining fitokimia yang pernah dilakukan dinyatakan positif mengandung metabolit sekunder flavonoid, saponin, fenolik, terpenoid dan tanin. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Nugroho et al. (2016) dan Maharadingga et al. (2021) menunjukkan adanya kandungan flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid, fenolik dan alkaloid pada ekstrak etanol daun ketapang. Penelitian Oyeniran et al. (2020) melaporkan pada bagian daun ketapang mengandung senyawa fenolik, seperti flavonoid yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Penelitian terkait aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun ketapang yang diperoleh melalui metode ekstraksi maserasi yang dilanjutkan dengan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder telah berhasil dilakukan oleh Salimi et al. (2022). Beberapa literatur ilmiah lain juga telah menunjukkan bahwa tanaman ketapang mengandung senyawa metabolit sekunder, seperti kandungan saponin, tanin, terpenoid dan alkaloid (Purwaningsih et al., 2020).

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan biosintesis *edible film* berbasis natrium alginat dengan fortifikasi daun ketapang dan pengujian karakterisasi serta entitas antioksidan yang diharapkan dapat memberi informasi alternatif bahan pengemas selain berbahan dasar plastik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka rumusan masalah pada penelitian ini, sebagai berikut:

1. bagaimana proses optimasi ekstraksi polisakarida natrium alginat dari rumput laut (*Sargassum* sp.) menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dapat memengaruhi kualitas dan karakteristik natrium alginat yang dihasilkan?
2. bagaimana karakteristik dari ekstrak natrium alginat pada kondisi optimum yang dihasilkan dari metode RSM?
3. bagaimana profil fitokimia ekstrak etanol daun ketapang (*Terminalia catappa* L.)?
4. bagaimana efektivitas penambahan ekstrak daun ketapang dalam meningkatkan aktivitas antioksidan pada *edible film* yang diukur melalui persen inhibisi?
5. bagaimana pengaruh penambahan ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) terhadap karakteristik fisik *edible film* berbasis polisakarida natrium alginat?
6. bagaimana perubahan struktur kimia pada *edible film* sebelum dan sesudah penambahan ekstrak daun ketapang berdasarkan analisis FTIR?
7. bagaimana pengaruh ekstrak daun ketapang dalam meningkatkan keunggulan *edible film* sebagai kemasan ramah lingkungan ditinjau dari segi kekuatan mekanik dan aktivitas antioksidan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. melakukan optimasi proses ekstraksi polisakarida natrium alginat menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) guna memperoleh kondisi ekstraksi optimal.
2. melakukan karakterisasi terhadap natrium alginat yang diekstraksi pada kondisi optimum, berupa analisis kadar air, kadar abu, dan struktur kimia menggunakan FTIR.
3. mengetahui profil fitokimia ekstrak etanol daun ketapang (*Terminalia catappa* L.)
4. menentukan efektivitas ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) sebagai antioksidan yang diukur melalui persen inhibisi
5. mengevaluasi pengaruh penambahan ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L.) variasi konsentrasi 0%, 2% dan 8% terhadap karakteristik fisik *edible film*, termasuk kuat tarik, elongasi, ketebalan, dan daya serap air
6. menganalisis perubahan struktur kimia pada *edible film* sebelum dan sesudah penambahan ekstrak daun ketapang berdasarkan analisis FTIR.
7. mengidentifikasi potensi peningkatan keunggulan *edible film* sebagai kemasan ramah lingkungan yang ditinjau dari segi kekuatan mekanik dan aktivitas antioksidan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi terkait entitas dan karakteristik dari *edible film* berbahan dasar natrium alginat dengan penambahan ekstrak daun ketapang, memperoleh alternatif pengemas alami dengan penambahan antioksidan.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu rumput laut cokelat *sargassum* sp., daun ketapang (*Terminalia catappa* L.), akuades, gliserol 98% (Merck), HCl p.a (Merck), Na₂CO₃ p.a (Merck), etanol 70% p.a, etanol teknis 96%, NaOH (Merck), pereaksi Mayer, H₂SO₄ p.a (Merck), 3,5-Dinitrosalisiklik (DNS) (Nitra, anhidrida asetat, reagen 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat) (ABTS) (Sigma-Aldrich), kalium persulfat (K₂S₂O₈) (Merck), asam askorbat p.a, asam asetat p.a, metanol p.a (Merck), kalium bromida (KBr), *aluminium foil*, *plastic wrap* dan sabun.

2.2 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan yaitu *hotplate* (Joanlab MHS4Pro), neraca analitik (OHAUS), *rotary evaporator* (HS-2005V), pH meter (Lutron 208), corong (Iwaki), blender (Miyako), shaker water bath (WBS-18), oven (Gen Lab Ltd), desikator, tanur (Nabertherm), *grinder mill* (BSU-20), *vortex* (Maxi Mixx II), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1780), mikropipet (*servicebio*), *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) (Shimadzu 820 IPC), *freeze dryer* (Christ Alpha 1-4 I.D plus), SEM-EDS (Bruker) *Tensile strength* ZP recorder 50 N Imada, sentrifuge (TOMY MX-305), mikrometer sekrup (Mitutoyo), cawan petri ukuran 10x10 cm, cawan porselen, desikator, rak tabung dan alat-alat gelas umumnya.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret – November 2024 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Kimia Terpadu, Laboratorium Kimia Analitik, Laboratorium Kimia Organik, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Laboratorium Kimia Pangan PNUP, Laboratorium Mikrostruktur Universitas Negeri Makassar, Laboratorium Forensik Makassar, dan Balai Besar Industri Hasil Perkebunan, Makassar.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel Rumput Laut

Pengambilan sampel rumput laut cokelat *sargassum* sp. dilakukan di Takalar, Makassar, Sulawesi Selatan. Sampel rumput laut cokelat *sargassum* sp. sebanyak 6 kg dicuci dengan menggunakan air laut hingga bersih, lalu diangin-anginkan sekitar 6 jam. Kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 3 hari dan dihaluskan menggunakan *grinder mill* (Modifikasi dari Wibowo et al., 2013).

2.4.2 Ekstraksi Natrium Alginat

Serbuk sampel ditimbang sebanyak 16 gram lalu direndam dalam larutan etanol 96% perbandingan 1:10 (b/v) dan *dishaker* selama 3 jam, sesudah itu disaring dan residu dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Kemudian residu direndam dalam HCl 0,1 M dan *distirrer* selama 2 jam, sambil diukur pH asam, setelah itu disaring lalu dicuci residu dengan akuades. Selanjutnya, diekstraksi dengan menggunakan larutan Na₂CO₃ 2% pada variasi pH (8, 9, dan 10), suhu (55, 68 dan 80°C) dan waktu (90, 145 dan 200 menit), lalu diukur pH hingga mencapai 10 (Modifikasi Nogueira et al., 2022).

Ekstrak natrium alginat disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Kemudian supernatan ditambahkan dengan etanol 96% perbandingan 1:2 (v/v), lalu disimpan dengan suhu 4°C selama 24 jam, dilakukan kembali sentrifugasi. Lalu dicuci dengan akuades dan dibilas menggunakan etanol dingin kemudian dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* selama 48 jam. Setelah itu dihaluskan dan ditimbang serbuk alginat (Lorbeer et al., 2015). Nilai rendemen alginat yang dihasilkan dihitung dengan menggunakan persamaan (1).

$$\text{Berat rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat kering alginat}}{\text{Berat bahan baku sargassum sp}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.3 Optimalisasi Ekstrak Alginat dengan *Response Surface Methodology* (RSM)

Desain respon dilakukan dengan menggunakan metode *Box-Behken Design* (BBD) yang dijalankan dalam program minitab versi 20. Variabel independen yaitu suhu (X₁), waktu (X₂) dan pH (X₃) (Tabel 1). Terdapat 15 titik percobaan, termasuk 3 ulangan titik tengah. Penentuan variabel bebas berdasarkan faktor-faktor yang berpotensi mempengaruhi respons, dan rentangnya ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya tentang ekstraksi alginat (Fawzy et al., 2017).

Tabel 1. Penentuan Variabel Independen dan Kode Perlakuan pada Penelitian

Variabel Independen	Simbol	Range dan Level		
		-1	0	+1
Suhu ekstraksi alginat	X ₁	55	68	80
Waktu ekstraksi alginat	X ₂	90	145	200
pH ekstraksi alginat	X ₃	8	9	10

Data eskperimental yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan persamaan polimomial orde dua yang direpresentasikan dengan menggunakan persamaan (2).

$$Y_n = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (2)$$

keterangan:

Y_n = estimasi variabel dependen (respon)
 β_o = variabel independen
 x_i, x_j = range dan level variabel independen
 β_i = variabel independen linier
 β_{ii} = variabel independen kuadrat
 β_{ij} = interaksi
 ε = *random error*

2.4.4 Karakterisasi Ekstrak Natrium Alginat

Kadar Air. Sampel serbuk natrium alginat ditimbang sebanyak 0,5 gram ke dalam cawan porselein yang telah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan di dalam oven dengan suhu 105°C, lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang, diulang hingga tercapai bobot konstan (AOAC, 2000). Kadar air natrium alginat dihitung dengan persamaan (3).

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (3)$$

Keterangan:

m_1 = Bobot cawan porselein
 m_2 = Bobot cawan porselein dan sampel sebelum dikeringkan
 m_3 = Bobot cawan porselein dan sampel sesudah dikeringkan

Kadar Abu. Cawan krus dipanaskan dalam tanur pada suhu 600°C selama satu jam, kemudian didinginkan dalam desikator, dan ditimbang sebagai berat cawan kosong (m_1). Setelah itu, serbuk natrium alginat sebanyak 0,5 gram diarsangkan. Kemudian dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 650°C selama 6 jam atau hingga mencapai bobot konstan (m_3) (AOAC, 2000). Kadar abu natrium alginat dihitung dengan persamaan (4).

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (4)$$

Keterangan:

m_1 = Bobot cawan krus
 m_2 = Bobot sampel
 m_3 = Bobot cawan krus dan sampel

FTIR. Analisis spektrum FTIR sampel dilakukan dengan menggunakan alat *fourier transform infrared spectroscopy* FTIR Shimadzu 820 IPC. Pengukuran dilakukan pada daerah spektra 4000-600 cm^{-1} data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* Omnic 8.1 (Park et al., 2024).

2.4.5 Preparasi Sampel Daun Ketapang

Daun ketapang (*Terminalia catappa*) diperoleh dari tiga area yaitu lingkungan kampus FMIPA, Universitas Hasanuddin, Universitas Muslim Indonesia, Makassar dan area PT. Berlian Bosowa, Makassar, dicuci terlebih dahulu dengan air bersih, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka terlindung dari sinar matahari selama $\pm$ 14 hari. Daun ketapang kering dihaluskan menggunakan *grinder mill* hingga menjadi serbuk halus (Sari et al., 2018).

2.4.6 Ekstraksi Daun Ketapang dengan Etanol 70%

Serbuk daun ketapang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% perbandingan (1:4) selama 3x24 jam dan diaduk sekali setiap 6 jam. Selanjutnya, disaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Lalu, pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dioven untuk menguapkan sisa pelarut (Madhavan et al., 2023). Nilai rendemen ekstrak kental diperoleh dengan persamaan (5).

$$\text{Berat rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak etanol daun ketapang}}{\text{Berat bahan baku daun ketapang}} \times 100 \quad (5)$$

2.4.7 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Ketapang

Uji Flavonoid. Ekstrak daun ketapang dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL. Selanjutnya ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Hasil uji positif ditunjukkan dengan warna merah jingga (Kafelau et al., 2022).

Uji Saponin. Ekstrak daun ketapang dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL. Ditambahkan akuades, sambil dikocok, ditunggu hingga 30 detik lalu ditambahkan dengan 1 tetes HCl 2%. Hasil uji positif ditandai dengan busa stabil (Kafelau et al., 2022).

Uji Steroid. Ekstrak daun ketapang sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 1 mL asam asetat anhidrida dan 2 mL H₂SO₄ pekat secara perlahan. Terbentuknya cincin berwarna kehijauan menandakan positif mengandung steroid (Kafelau et al., 2022).

Uji Alkaloid. Ekstrak daun ketapang sebanyak 2 mL ditambahkan dengan HCl 1% dan pereaksi *dragendroff* ke dalam tabung reaksi. Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya endapan kuning (Iqbal et al., 2015).

Uji Tanin. Ekstrak daun ketapang sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan akuades dan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif ditandai dengan adanya warna biru tua atau hijau kehitaman (Iqbal et al., 2015).

2.4.8 Sintesis *Edible Film* Natrium Alginat dengan Penambahan Ekstrak Daun Ketapang

Formulasi *edible film* dilakukan dengan konsentrasi natrium alginat 1% (b/v) dalam 30 mL. Serbuk natrium alginat ditimbang sebanyak 0,3 gram, dilarutkan dengan akuades sambil diaduk selama 1 jam, lalu ditambahkan gliserol 0,75% (v/v) dan ekstrak daun ketapang dengan variasi konsentrasi 0%; 2%; dan 8% (v/v). Kemudian dipanaskan sambil diaduk kembali menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 70°C selama 15 menit. Selanjutnya campuran *film* tersebut dituang pada cawan petri dan dikeringkan menggunakan oven 40°C selama 36 jam (Mun et al., 2020).

2.4.9 Pembuatan Larutan Stok ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid))

Serbuk ABTS ditimbang 0,0071 gram dan serbuk kalium persulfat ($K_2S_2O_8$) sebanyak 0,0035 gram. Kedua bubuk dilarutkan terpisah dengan etanol sebanyak 5 mL dalam labu ukur. Larutan dicampur kedalam labu ukur 25 mL dan ditutup sehingga tidak ada intervensi dari cahaya atau ruangan dalam keadaan gelap. Selanjutnya, diinkubasi selama 16 jam, lalu dicukupkan hingga mencapai tanda batas dengan etanol p.a dan dihomogenkan (Modifikasi dari Jatav et al., 2022).

2.4.10 Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS untuk Asam Askorbat

Pembuatan Larutan Asam Askorbat 500 ppm. Asam askorbat ditimbang sebanyak 0,025 gram. Lalu dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50 mL. Sehingga diperoleh larutan asam askorbat pada konsentrasi 500 ppm (Modifikasi dari Ezra et al., 2023).

Pembuatan Larutan Asam Askorbat 5 ppm. Larutan asam askorbat 500 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya, dicukupkan volume dengan metanol p.a, sehingga diperoleh larutan asam askorbat 5 ppm (Modifikasi dari Ezra et al., 2023).

Pembuatan Larutan Deret Asam Askorbat. Larutan asam askorbat 5 ppm dipipet sebanyak 0,05 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; dan 0,8 mL ke dalam masing-masing tabung, sehingga diperoleh deret konsentrasi asam askorbat 0,25 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 2 ppm dan 4 ppm. Selanjutnya ditambahkan 1 mL larutan ABTS, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator. Setelah itu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 731 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) (Modifikasi dari Ezra et al., 2023).

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat. Larutan deret asam askorbat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 731 nm. Dilakukan sebanyak 3 kali (triplo). Nilai persen inhibisi (%) diperoleh dari rumus persentase inhibisi:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \quad (6)$$

2.4.11 Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS untuk 0% *Edible Film*

Pembuatan Larutan Blanko. Larutan akuades dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan larutan stok abts sebanyak 1 mL dan dihomogenkan. Kemudian larutan diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 731 nm (Modifikasi Hayati et al., 2020).

Pembuatan Larutan Induk *Edible Film* Kontrol (0%) 5000 ppm. *Edible film* 0% (kontrol) ditimbang sebanyak 0,25 gram. Kemudian, dilarutkan dengan menggunakan akuades hingga 50 mL dalam labu ukur. Dihomogenkan dan dihasilkan larutan induk 5000 ppm (Modifikasi Hayati et al., 2020).

Pembuatan Larutan Deret Sampel *Edible Film* Kontrol. Larutan sampel kontrol 5000 ppm dipipet sebanyak 0,02 mL; 0,04 mL; 0,08 mL; 0,16 mL dan 0,32 mL ke dalam masing-masing tabung, sehingga diperoleh deret konsentrasi sampel 100 ppm; 200 ppm; 400 ppm; 800 ppm dan 1600 ppm. Selanjutnya, reagen ABTS ditambahkan ke dalam masing-masing tabung sebanyak 1 mL, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator. Setelah itu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 731 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) (Modifikasi Hayati et al., 2020). Nilai persen inhibisi (%) diperoleh dari rumus persentase inhibisi

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \quad (7)$$

2.4.12 Uji Aktivitas Antioksidan *Edible Film* 2% dan 8% dengan Reagen ABTS

Pembuatan Larutan Blanko. Akuades dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan larutan stok abts sebanyak 1 mL dan dihomogenkan. Kemudian larutan diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 731 nm (Modifikasi Hayati et al., 2020).

Pembuatan Larutan Induk *Edible Film* 2% dan 8% 5000 ppm. *Edible film* 2% dan 8% ditimbang sebanyak 0,25 gram. Kemudian, dilarutkan dengan menggunakan akuades hingga 50 mL dalam labu ukur. Dihomogenkan dan dihasilkan larutan induk dengan konsentrasi 5000 ppm (Modifikasi Hayati et al., 2020).

Pembuatan Larutan Deret Sampel *Edible Film* 2% dan 8%. Larutan sampel *edible film* 2% dan 8% 5000 ppm dipipet sebanyak 0,01 mL; 0,02 mL; 0,04 mL; 0,08 mL dan 0,16 mL ke dalam masing-masing tabung, sehingga diperoleh deret konsentrasi sampel 50 ppm; 100 ppm; 200 ppm; 400 ppm dan 800 ppm. Selanjutnya, reagen ABTS ditambahkan ke dalam masing-masing tabung sebanyak 1 mL, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator. Setelah

itu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 731 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) (Modifikasi Hayati et al., 2020). Nilai persen inhibisi (%) diperoleh dari rumus persentase inhibisi.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \quad (8)$$

2.4.13 Karakterisasi *Edible Film*

Uji Kuat Tarik. Analisis kuat tarik *edible film* dilakukan dengan cara menjepit bagian ujung sampel pada bagian mesin uji tarik. Lalu, dicatat ketebalan dan panjang awal sampel. Kemudian ditekan tombol *start* pada komputer, selanjutnya alat akan menarik sampel dengan kecepatan 100 mm/menit hingga sampai sampel putus (Setiani et al., 2013). Kekuatan kuat tarik dihitung dengan persamaan (9).

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (9)$$

keterangan:

τ = kuat tarik sampel (MPa)

F = beban pada saat putus (N)

A = Luas penampang (mm²)

Uji Perpanjangan. Metode pengukuran elongasi *edible film* dilakukan sama dengan cara pengujian kuat tarik (Setiani et al., 2013). Nilai perpanjangan dinyatakan dalam persentase, dihitung dengan persamaan (10).

$$\text{Elongasi (\%)} = \frac{\text{regangan saat putus (mm)}}{\text{panjang awal (mm)}} \times 100 \quad (10)$$

Uji Ketebalan. Pengukuran ketebalan *film* menggunakan mikrometer sekrup dengan ketelitian mencapai 0,01 mm (Rusli et al., 2017). Nilai ketebalan yang diperoleh merupakan rata-rata dari pengukuran pada enam titik yang berbeda.

$$\text{Ketebalan} = \frac{\text{Titik 1} + \text{Titik 2} + \dots}{\text{Jumlah Titik}} \quad (11)$$

Uji Daya Serap Air. Sampel *film* 0%, 2% dan 8% dipotong dengan ukuran 10 x 10 cm², lalu ditimbang, dan kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C sampai tercapai bobot konstan (m_1). Selanjutnya, film (m_1) direndam dalam 25 mL akuades pada suhu 25°C selama 24 jam. Setelah itu, *film* dikeringkan dengan kertas saring dan ditimbang ulang (m_2) (Asiri et al., 2024). Daya serap air *edible film* dapat dihitung dengan persamaan (12).

$$\text{Daya Serap Air} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (12)$$

keterangan:

m1 = bobot awal

m2 = bobot akhir

Uji SEM-EDS. Sampel lembaran *edible film* dipotong dengan lebar 1 cm x 1 cm dan ditempelkan pada set holder, kemudian dilapisi dengan logam emas dalam keadaan vakum. Selanjutnya, sampel dimasukkan pada tempat di dalam SEM lalu diamati gambar topografi dan dilakukan perbesaran 1000 kali, 3000 kali, 5000 kali dan 10.000 kali. Kemudian, sinyal EDS direkam pada tegangan 20 kV. Analisis dilakukan di 6 titik sampel acak (Modifikasi Ramadhani et al., 2023).

Uji XRD. Analisis XRD sampel dilakukan dengan menggunakan alat X-ray diffraktometer. Pengukuran difraktogram dilakukan pada sudut difraksi 2θ dari 0° hingga 100° dengan kecepatan pemindaian $2^\circ/\text{mn}$ (Modifikasi Tan et al., 2024).

Uji FTIR. Analisis spektrum FTIR sampel dilakukan dengan menggunakan alat *fourier transform infrard spectroscopy* FTIR Shimadzu 820 IPC. Pengukuran dilakukan pada daerah spektra $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* Omnic 8.1 (Park et al., 2024).

Uji Antimikroba. Aktivitas antimikroba *edible film* dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Strain bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan suspensi bakteri. Suspensi diencerkan 10^2 kali lipat. Kemudian dipipet suspensi bakteri sebanyak $100\text{ }\mu\text{L}$ dan diinokulasikan pada media luria bertani (LB) padat. Setelah itu, sampel *film* berbentuk cakram berukuran 6 mm disterilkan dengan etanol dan dikeringkan di bawah lampu UV. Cakram *film* steril ditempelkan pada agar LB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama sehari. Dilakukan pengukuran zona hambat untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba *film* (Li et al., 2023).