

PENENTUAN TINGKAT KETENGIKAN SECARA SPEKTROFOTOMETRI PADA PRODUK PANGAN BERWARNA MELALUI METODE THIOBARBITURIC ACID

SPECTROPHOTOMETRICALLY DETERMINATION OF RANCIDITY LEVEL IN COLORED FOOD PRODUCT THROUGH THIOBARBITURIC ACID METHOD

Umi Laila^{1)*}, Sri Indriani²⁾, Rifa Nurhayati¹⁾

¹ Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jalan Jogja-Wonosari km 31.5 Desa Gading, Kecamatan Playen,
Kabupaten Gunungkidul, Yogyakarta 55861

² Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Jenderal Soedirman,

Jl. Dr. Soeparno No.61 Karangwangkal, Purwokerto, Jawa Tengah 53123

* Nomor telepon: 085747237466

e-mail: umilaila38@gmail.com

ABSTRAK

Warna produk pangan merupakan salah satu faktor pengganggu pada penentuan bilangan TBA. Metode preparasi sampel yang mampu meminimalisir warna sampel adalah distilasi, namun metode tersebut membutuhkan waktu dan tenaga yang lebih dalam prosesnya. Metode preparasi lain berupa ekstraksi asam cair yang memiliki efektivitas waktu dan tenaga belum teruji dalam mengkoreksi keberadaan warna. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan investigasi keakuratan metode ekstraksi asam cair dalam mengkoreksi warna produk pangan. Sampel yang dianalisis adalah tempe bacem dalam kaleng, empal gentong dalam kaleng, dan kacang oven. Hal yang dikaji dalam penelitian ini adalah reproduktifitas dan pengulangan. Pengkajian reproduktifitas dilakukan melalui analisis bilangan TBA kacang oven yang dilakukan sesegera setelah sampel terekstrak (*intraday*). Sementara itu, pengkajian pengulangan dilakukan melalui analisis bilangan TBA empal gentong yang juga dilakukan sesegera setelah sampel terekstrak (*intraday*). Pengkajian beda waktu analisis terhadap angka TBA yang dihasilkan juga dilakukan pada tempe bacem dalam kaleng dan empal gentong dalam kaleng yang meliputi analisis yang dilakukan sesegera setelah sampel terekstrak (*intraday*) serta analisis yang dilakukan sehari setelah sampel terekstrak (*interday*). Untuk evaluasi, bilangan TBA yang didapat melalui ekstraksi asam cair dibandingkan dengan bilangan TBA yang didapat melalui distilasi. Penelitian menunjukkan bahwa metode ekstraksi asam cair memberikan parameter pengulangan dan reproduktifitas yang baik jika analisis bilangan TBA dilakukan langsung setelah sampel terekstrak (*intraday*). Akurasi metode ekstraksi asam cair tersebut didukung oleh nilai TBA yang dihasilkan dalam kisaran yang hampir sama dengan metode distilasi.

Kata kunci: akurasi, bilangan TBA, ekstraksi, malonaldehid

ABSTRACT

Color of food is one of interfering factors in TBA number determination. Sample preparation method which can minimize sample's color is distillation, but it spends more time and labour. Other method, namely aqueous acid extraction, which has effectiveness in time and labour has yet to be tested. Therefore, this study aimed to investigate accuracy of aqueous acid extraction in correcting food's color. Samples analyzed were coconut sugar-sweetened and seasoned tempeh "tempe bacem" in can packaging, curry-like beef soup "empal gentong" in can packaging, and salted-roasted peanut. Evaluated objects included

reproducibility and repeatability. The assessment of reproducibility was carried out through analysis of the TBA of salted-roasted peanut conducted as soon as the samples had been extracted (intraday). Meanwhile, the repeatability was assessed through analysis of TBA of empal gentong conducted as soon as the samples had been extracted (intraday). The influence of time difference was also carried out on tempe bacem and empal gentong including analysis as soon as the samples had been extracted (intraday) and analysis conducted at the day after sample being extracted (interday). For evaluation, TBA numbers obtained through the aqueous acid extraction were compared to that of distillation. The research showed that aqueous acid extraction provided good repeatability and reproducibility if the analysis of TBA was conducted as soon as the samples had been extracted (intraday). The accuracy of the aqueous acid extraction was supported by its TBA values in a range which were almost the same as the distillation.

Keywords: accuracy, TBA number, extraction, malonaldehyde

PENDAHULUAN

Pada produk pangan yang mengandung lemak, ketengikan merupakan salah satu parameter kerusakan yang ditandai dengan bau tidak enak pada produk. Bau tidak enak tersebut disebabkan oleh adanya senyawa-senyawa karbonil (aldehid dan keton) yang merupakan hasil pemecahan komponen lemak. Ketengikan disebabkan oleh beberapa proses, antara lain oksidasi dan hidrolisis⁽¹⁾. Ketengikan oksidatif disebabkan oleh reaksi oksidasi antara asam lemak tidak jenuh dan oksigen atmosferis. Reaksi oksidasi tersebut merupakan reaksi radikal bebas dengan peroksida sebagai produk primer yang memiliki sifat tidak stabil, serta malonaldehid sebagai produk sekunder yang merupakan indikator tingkat oksidasi lemak.

Salah satu metode untuk menentukan tingkat ketengikan adalah metode bilangan TBA (*2-thiobarbituric acid*) secara spektrofotometri. Prinsipnya adalah mereaksikan sampel yang mengandung malonaldehid dengan pereaksi TBA. Dalam reaksi tersebut, 1 mol TBA bereaksi dengan 2 mol malonaldehid dan dihasilkan senyawa kromogen berwarna merah muda yang memiliki absorbansi maksimum pada

panjang gelombang 532-535 nm. Namun perlu diketahui bahwa TBA tidak hanya reaktif terhadap malonaldehid saja tetapi senyawa tersebut juga reaktif terhadap senyawa-senyawa penginterferensi, seperti gula, asam amino, protein terlarut, peptida, droplet lemak, dan lain lain⁽²⁾. Senyawa-senyawa lain selain malonaldehid yang reaktif terhadap pereaksi TBA disebut *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS). Reaksi senyawa penginterferensi dan TBA menghasilkan kromogen kuning dengan absorbansi maksimum 420-460 nm yang juga menyebabkan *overlapping* puncak pada absorbansi 532-535 nm⁽³⁾.

Malonaldehid merupakan senyawa yang reaktif. Dalam matriks makanan, selain dalam bentuk bebas, malonaldehid berikatan dengan senyawa-senyawa lain, seperti protein, asam amino, glikogen, ataupun lemak melalui proses aldol kondensasi⁽⁴⁾. Namun perlu diketahui bahwa hanya malonaldehid dalam bentuk bebas saja yang dapat dikuantifikasi secara kolorimetri (spektrofotometri)⁽⁵⁾. Pemanasan dan perlakuan asam merupakan cara untuk membebaskan malonaldehid dari ikatan⁽⁶⁾. Terdapat beberapa metode preparasi sampel pangan sebelum dilakukan

kuantifikasi bilangan TBA. Salah satunya adalah metode pemanasan langsung yaitu mereaksikan secara langsung sampel dan pereaksi TBA yang disertai proses pemanasan, kemudian hasil reaksi disaring untuk mendapatkan pigmen merah yang selanjutnya dilakukan proses kuantifikasi. Preparasi juga dapat dilakukan dengan metode distilasi yaitu sampel didistilasi melalui pemanasan untuk mendapatkan distilat malonaldehid. Selanjutnya distilat direaksikan dengan TBA untuk selanjutnya diukur absorbansinya. Pada metode ini malonaldehid yang didapat secara distilasi berada dalam keadaan larutan bening, sehingga produk reaksi berwarna merah muda mudah diukur secara akurat. Kelemahan metode pemanasan langsung dan metode distilasi adalah adanya proses pemanasan yang menyebabkan timbulnya komponen TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) sehingga nilai ketengikan yang didapatkan menjadi *overestimate*. Ekstraksi lemak dengan kloroform juga dapat dilakukan sebagai metode preparasi, yang selanjutnya ekstrak lemak direaksikan dengan TBA. Metode lainnya adalah metode ekstraksi asam cair dimana malonaldehid diekstrak dari protein menggunakan pelarut *trichloroacetic acid* (TCA). Kelebihan metode ekstraksi asam cair adalah mudah dan cepat dilakukan, namun memiliki kelemahan yaitu terdapat kemungkinan tidak semua produk malonaldehid dapat terekstrak. Hal tersebut menyebabkan nilai ketengikan menjadi *underestimate*⁽⁷⁾.

Diketahui warna produk pangan juga merupakan faktor penginterferensi (pengganggu) pada penentuan bilangan

TBA. Warna pada produk pangan dapat berasal dari produk pangan (*endogenous colour*), warna yang ditambahkan, ataupun warna yang terjadi karena proses pengolahan pangan, misalnya proses *browning*. *Endogenous colour* maupun warna yang ditambahkan dapat berupa pigmen buah, ataupun senyawa polifenol dan flavonoid lainnya⁽⁸⁾. Metode distilasi direkomendasikan sebagai metode pengambilan malonaldehid pada sampel berwarna yang mana warna produk pangan umumnya merupakan senyawa non volatil⁽³⁾. Namun, kelemahan metode distilasi adalah metode ini kurang akurat serta membutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaan.

Metode ekstraksi asam cair dinyatakan tidak cocok untuk sampel yang mengandung senyawa yang menghasilkan kromogen kuning, sampel berwarna, ataupun sampel yang memiliki turbiditas tinggi (misalnya kadar lemak yang tinggi)⁽⁹⁾. Namun, beberapa peneliti telah mengkoreksi keberadaan turbiditas, gula, senyawa lain yang menginterferensi bilangan TBA⁽¹⁰⁾. Turbiditas non spesifik dikoreksi melalui absorbansi pada 600 nm sebagai pengurang absorbansi sampel. Keberadaan gula sebagai salah satu senyawa TBARS dikoreksi menggunakan absorbansi pada panjang gelombang 440 nm⁽¹¹⁾. Sementara itu, koreksi terhadap komponen warna pada sampel (misalnya antosianin) dilakukan melalui pengukuran absorbansi sampel tanpa penambahan TBA pada panjang gelombang 532 nm. Absorbansi sampel yang diinkubasi tanpa penambahan TBA tersebut digunakan sebagai faktor pengurang⁽¹²⁾.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan investigasi mengenai peluang penentuan bilangan TBA pada produk pangan berwarna dengan metode preparasi sampel berupa ekstraksi asam cair dengan pertimbangan efisiensi biaya, kecepatan, dan kemudahannya. Penelitian ini bukan untuk menghasilkan suatu metode baru, namun mengaplikasikan metode preparasi sampel ekstraksi asam cair pada produk yang memiliki kandungan warna, yaitu tempe bacem dalam kaleng, empal gentong dalam kaleng, kacang oven. Pada penelitian ini, formula yang dikembangkan untuk mengkoreksi gula dan antosianin diadopsi untuk menentukan bilangan TBA⁽¹²⁾. Pigmen kuning pada produk empal gentong kaleng merepresentasikan warna yang ditambahkan, sementara warna coklat pada produk kacang oven dan tempe bacem dalam kaleng merepresentasikan warna yang dihasilkan dari proses pengolahan (*browning*). Bilangan TBA yang didapat melalui metode ekstraksi asam cair dievaluasi dengan membandingkannya dengan metode distilasi. Keakuratan metode ekstraksi asam cair juga dievaluasi melalui parameter *repeatability* (pengulangan) dan *reproducibility* (reproduktifitas).

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *2-Thiobarbituric acid* (TBA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Trichloroacetic acid* (TCA), asam asetat glasial, HCl, dan *1,1,3,3-Tetraethoxypropane* yang masing-masing didapatkan dari Merck-Millipore. Akuades diperoleh dari CV General Labora.

Sementara itu, sampel yang digunakan dalam analisis meliputi tempe bacem dalam kaleng, empal gentong dalam kaleng, dan kacang oven.

Peralatan Penelitian

Peralatan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah, *vortex mixer*, sentrifuse, neraca analitik, *hot plate stirrer*, spektrofotometer UV-Vis (Dynamica HALO RB-10), penangas air (*waterbath*), pelumat (Philips HR 2115), *shaker inkubator*, oven, desikator, serangkaian alat distilasi dll.

Metode Penelitian

Pembuatan Kurva Standar Malonaldehid (MDA)

Pembuatan kurva standar malonaldehid bertujuan untuk mendapatkan nilai absorptivitas molar MDA. Malonaldehid (MDA) merupakan senyawa reaktif yang tidak bisa diamati dalam bentuk murni. Oleh karena itu, MDA diperoleh melalui reaksi hidrolisis *1,1,3,3-Tetraethoxypropane* (TEP) pada kondisi asam dengan temperatur 40°C⁽¹³⁾. Reaksi tersebut bersifat ekuimolar. Larutan induk 3,2 mM MDA sebanyak 100ml dibuat dengan cara melarutkan 83,5 µl TEP dengan larutan HCl 0,1 M sehingga volum total menjadi 100 ml. Selanjutnya larutan tersebut diinkubasi selama 2 jam pada temperatur 40°C dengan kondisi gelap guna mengkonversi TEP menjadi MDA.

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan mengencerkan larutan induk MDA 3,2 mM dalam beberapa konsentrasi, yaitu 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 µM menggunakan pelarut TCA 7,5%. Larutan MDA dengan masing-masing konsentrasi direaksikan dengan larutan TBA 0,8% dengan rasio volume 1:1 (v/v). Reaksi dilakukan pada suhu 90°C selama 30 menit dengan kondisi gelap.

Selanjutnya dilakukan pendinginan selama 15 menit. Selanjutnya absorbansi larutan diukur secara spektrofotometri menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm. Larutan blangko yang digunakan berupa campuran larutan TCA 7,5% dan akuades pada rasio volume 1:1. Sementara itu, larutan blangko reagen berupa campuran larutan TCA 7,5% dan larutan TBA 0,8% dengan rasio volume 1:1 juga digunakan dalam penelitian ini. Inkubasi blangko dan larutan blangko reagen dilakukan dengan pada kondisi dan cara yang sama dengan larutan standar. Larutan blangko digunakan sebagai blangko pada saat pengukuran absorbansi dengan spektrotometer. Sementara itu, absorbansi larutan blangko reagen diukur dengan tujuan untuk melakukan koreksi terhadap adanya kemungkinan kekeruhan pelarut ataupun pengaruh warna dari reagen. Pengukuran absorbansi larutan blangko reagen dilakukan dengan cara yang sama dengan larutan standar. Absorbansi setiap konsentrasi standar dikoreksi dengan cara mengurangkannya dengan absorbansi larutan blangko reagen. Nilai absorbansi standar terkoreksi ini digunakan untuk membuat kurva standar yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi masing-masing standar dan absorbansi terkoreksinya. Sementara, nilai absorptivitas malonaldehid ditentukan dengan Hukum Lambert-Beer sebagai berikut:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

dengan:

A = absorbansi terukur

ε = absorptivitas molar (L/mol/cm)

b = lebar kuvet (1 cm)

C = konsentrasi larutan (molar atau mol/L)

Uji Ketengikan dengan Ekstraksi Asam Cair

Uji ketengikan dengan metode preparasi sampel berupa ekstraksi asam cair merujuk pada metode yang telah dikembangkan dengan beberapa modifikasi⁽¹²⁾. Uji ketengikan dilakukan terhadap produk makanan, yaitu empal gentong dalam kaleng, tempe bacem dalam kaleng, dan kacang oven. Sampel yang akan dianalisis dilumatkan sampai halus dan homogen. Sebanyak 4,5 gram sampel yang telah halus dan homogen dicampur dengan 13,5 ml TCA 7,5% dan 75 μ L BHT 7,2% dalam etanol. Penggunaan BHT berfungsi untuk mencegah oksidasi lemak (minyak) yang belum teroksidasi selama proses esktraksi malonaldehid, penyimpanan ekstrak, ataupun analisis. Selanjutnya homogenisasi dilakukan terhadap campuran tersebut selama 1 menit menggunakan pelumat dengan skala kecepatan 6. Tujuan dari homogenisasi tersebut adalah untuk mengekstrak malonaldehid dari sampel. Hasil homogenisasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000-6000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dari proses sentrifugasi kemudian difiltrasi menggunakan kertas saring whatman 41. Filtrat kemudian dicampur dengan reagen TBA 0,8% dengan rasio volume 1:1. Campuran ini disebut larutan sampel. Selanjutnya dibuat larutan blangko sampel dengan mencampurkan filtrat sampel dan akuades dengan perbandingan volume 1:1. Larutan ini merupakan larutan sampel tanpa penambahan reagen TBA. Larutan blangko juga dibuat dengan cara mencampurkan

TCA 7,5% dan akuades dengan rasio volume 1:1. Larutan sampel, blangko sampel, dan blangko diinkubasi dalam penangas air pada suhu 90°C selama 30 menit pada kondisi gelap. Selanjutnya dilakukan pendinginan selama 15 menit dengan cara direndam dalam air kran. Kemudian absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 440nm, 532nm dan 600nm. Pada pengukuran absorbansi ini, larutan blangko digunakan sebagai blangko pada saat pengukuran. Perhitungan bilangan TBA mengadopsi formula yang telah dikembangkan⁽¹²⁾, yaitu :

$$A = [(Abs\ 532_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})] \dots\dots\dots(1)$$

$$B = [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA})] \times 0.0571 \dots\dots\dots(2)$$

$$C_{MDA} (nmol.\ ml^{-1}) = [(A - B) / Absorptivitas\ Molar] \times 10^6 \dots\dots\dots(3)$$

$$C_{MDA\ sebelum\ reaksi} (\mu mol.\ ml^{-1}) = 2 \times C_{MDA} / 1000 \dots\dots\dots(4)$$

$$Bilangan\ TBA \left(\frac{\mu g\ MDA}{1000\ g\ sampel} \right) = (C_{MDA\ sebelum\ reaksi} \times V_{total} \times Mr_{MDA}) / (1000 \times M_s) \text{ akuades.} \dots\dots\dots(5)$$

dengan:

$$\begin{aligned} Mr_{MDA} &= 72.063\ g/mol \\ M_s &= \text{berat sampel (g)} \\ V_{total} (ml) &= Volume\ TCA + Volume\ BHT \\ &+ Volume\ air\ pada\ sampel \\ &Volume\ air\ pada\ sampel \\ &\frac{100\% - \%berat\ kering}{100\%} \times M_s \\ &= \frac{1\ g/ml} \end{aligned}$$

Uji Ketengikan dengan Distilasi

Uji ketengikan dengan metode preparasi sampel berupa distilasi merujuk pada metode yang telah dikembangkan⁽¹⁴⁾. Pengukuran bilangan TBA diawali dengan destruksi oleh HCl dan dilanjutkan dengan distilasi. Sebanyak 50 ml akuades dicampurkan dengan 10 gram sampel yang sebelumnya telah dilumatkan dan dihomogenisasi. Campuran yang telah dihomogenisasi kemudian ditransfer ke dalam labu distilasi dan kemudian ditambahkan 47,5 ml akuades, serta ditambahkan 2,5 ml HCl 4M dan 100 µl BHT. Selanjutnya dilakukan proses distilasi. Hasil distilat ditampung hingga didapatkan volum 50 ml. Dengan rasio volum 1:1, larutan distilat dicampur dengan reagen TBA dengan konsentrasi 0,02 M dalam 90% asam asetat glasial. Larutan ini disebut larutan sampel. Larutan blangko dibuat dengan cara mencampurkan 90% asam asetat glasial dan akuades dengan rasio volum 1:1. Larutan blangko ini nantinya digunakan sebagai blangko dalam pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer. Sementara itu, larutan blangko reagen dibuat dengan mencampurkan reagen TBA dengan akuades. Larutan blangko reagen digunakan sebagai koreksi terhadap adanya kemungkinan kekeruhan pelarut ataupun pengaruh warna dari reagen. Larutan sampel, larutan blangko, dan larutan blangko reagen diinkubasi pada suhu 90° C selama 30 menit dengan kondisi gelap. Setelah itu dilakukan pendinginan dan dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi masing-masing larutan sampel dan larutan blangko reagen pada panjang gelombang

528 nm. Bilangan TBA diestimasi dengan formula sebagai berikut⁽¹⁴⁾:

$$\text{Angka TBA} = A \times 7,8$$

.....
.....(6)

dengan:

A = Absorbansi sampel yang terkoreksi oleh absorbansi reagen blangko

TBA = Jumlah malonaldehid (g) per kilogram sampel

Penentuan Kadar Air

Determinasi kadar air bahan dilakukan secara termogravimetri menurut AOAC, 950.46⁽¹⁵⁾. Agar homogen, sampel terlebih dahulu dilumatkan dengan blender. Sampel yang sudah lembut dan homogen dimasukkan ke dalam krus porselen, yaitu sebanyak 1 gram. Sebelumnya, krus porselen tersebut telah dioven pada suhu 105°C selama 3 jam dan ditimbang berat kosongnya. Krus porselen berisi sampel kemudian dioven pada suhu 105°C selama sehari semalam, kemudian ditimbang setelah didinginkan pada desikator selama 15 menit. Pengovenan dan penimbangan dilanjutkan sampai krus porselen berisi sampel tersebut memiliki bobot konstan yang ditandai dengan selisih antar penimbangan sebesar ± 0,002 gram dimana selisih waktu antar penimbangan adalah 3 jam.

Analisis Hasil

Analisis statistik menggunakan SPSS 12 merupakan salah satu cara untuk mengolah data yang didapatkan⁽¹⁶⁾. Pada penelitian ini, uji T dua sampel independen digunakan untuk mengetahui signifikansi hasil (bilangan TBA) dengan adanya variasi

dua perlakuan. Taraf kepercayaan yang digunakan sebesar 95%.

Selain signifikansi bilangan TBA, hal yang perlu dipertimbangkan dalam menganalisis hasil adalah % *Relative Standard Deviation* (%RSD) yang dirumuskan sebagai berikut⁽¹⁷⁾:

$$\% \text{ Relative Standard Deviation} = \frac{\text{Simpangan Baku}}{\text{Rata-rata}}$$

.....(7)

Uji akurasi

Salah satu aspek yang berperan dalam pengembangan suatu metode agar dapat diaplikasikan secara general adalah akurasi. Akurasi meliputi parameter pengulangan (*repeatability*) dan reproduktifitas (*reproducibility*). Pengulangan dan reproduktifitas merepresentasikan sejauh mana pengukuran pada sampel (material) yang sama dan dalam kondisi yang tidak berubah mendapatkan hasil yang sama⁽¹⁸⁾. Pengulangan dilakukan pada material yang sama, peralatan yang sama, serta analisis yang sama. Sementara, reproduktifitas dilakukan pada material yang sama, peralatan yang sama, namun menggunakan analisis yang berbeda.

Pengkajian reproduktifitas metode preparasi sampel dilakukan melalui analisis sampel kacang oven yang mana analisis bilangan TBA dilakukan sesegara setelah sampel terekstrak (*intraday*). Dalam hal ini, analisis dilakukan langsung setelah sampel terekstrak tanpa melakukan penyimpanan ekstrak terlebih dahulu.

Pengkajian beda waktu analisis terhadap angka TBA yang dihasilkan dengan metode preparasi sampel berupa

metode ekstraksi asam cair juga dilakukan pada sampel tempe bacem dalam kaleng dan empal gentong dalam kaleng. Beda waktu analisis tersebut meliputi analisis sesegera setelah sampel terekstrak, yaitu dilakukan pada hari yang sama dengan ekstraksi (*intraday*) serta analisis dilakukan sehari setelah sampel terekstrak (*interday*). Pada analisis yang dilakukan secara *interday*, sampel yang telah terekstrak malonaldehidnya disimpan pada suhu 4°C dengan kondisi gelap.

Pengkajian pengulangan (*repeatability*) dilakukan terhadap produk empal gentong yang berbeda kemasan, namun memiliki kode produksi yang sama. Hal tersebut mengindikasikan bahwa produksi empal gentong untuk dua kemasan tersebut dilakukan pada waktu yang sama sehingga diasumsikan bahwa komponen dalam dua kemasan empal gentong tersebut juga sama. Pengkajian pengulangan metode preparasi sampel juga dilakukan melalui

analisis bilangan TBA yang juga dilakukan sesegera setelah sampel terekstrak (*intraday*). Dalam penelitian ini juga dilakukan investigasi perbandingan metode ekstraksi asam cair dan metode distilasi terhadap angka TBA pada sampel empal gentong dalam kaleng.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengkajian akurasi yang mencakup pengulangan dan reproduktifitas dari metode preparasi sampel berupa ekstraksi asam cair ditampilkan pada Tabel 1 dan 2. Tabel 1 mencakup kajian pengaruh beda analisis pada sampel yang sama terhadap bilangan TBA yang didapatkan. Reprodutifitas dapat dilihat pada analisis sampel kacang oven. Sementara analisis sampel tempe bacem dalam kaleng dan empal gentong dalam kaleng ditujukan untuk melihat pengaruh waktu pengerjaan analisis setelah sampel diekstrak.

Tabel 1. Perbandingan bilangan TBA pada suatu produk dengan faktor beda analisis menggunakan metode ekstraksi asam cair

Sampel	Analisis	Waktu pengerjaan analisis setelah sampel diekstrak	Bilangan TBA yang didapatkan ($\mu\text{g MDA} / 1000 \text{ g sampel}$)	%RSD
Kacang Oven	Analisis 1	<i>hari yang sama (intraday)</i>	0,86 ± 0,08 ^a	8,92
	Analisis 2	<i>hari yang sama (intraday)</i>	0,84 ± 0,07 ^a	8,11
Tempe Bacem dalam Kaleng	Analisis 1	<i>hari yang sama (intraday)</i>	0,74 ± 0,05 ^a	7,26
	Analisis 2	<i>beda hari (interday)</i>	0,63 ± 0,02 ^b	2,42
Empal Gentong dalam Kaleng	Analisis 1	<i>hari yang sama (intraday)</i>	0,27 ± 0,02 ^a	6,22
	Analisis 2	<i>beda hari (interday)</i>	0,21 ± 0,03 ^b	12,63

Keterangan: Pengulangan analisis dilakukan secara triplikate. Nilai menunjukkan rata-rata dan standar erornya. Superskrip yang berbeda pada jenis sampel dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) berdasar hasil uji T.

Pada Tabel 1, tepatnya pada analisis produk kacang oven, terlihat bahwa analisis bilangan TBA oleh analisis (teknisi) yang berbeda menghasilkan bilangan TBA yang tidak berbeda signifikan. Hal ini karena

analisis 1 dan analisis 2 masing-masing melakukan analisis sesegera mungkin setelah selesainya proses pengestrakan malonaldehid dari sampel (*intraday*). Hasil tersebut menunjukkan bahwa preparasi sampel melalui metode asam cair akan menghasilkan reproduktifitas yang tinggi jika analisis dilakukan secara *intraday*, yaitu langsung dilakukan analisis TBA setelah ekstraksi malonaldehid selesai (tanpa proses jeda yang panjang). Sementara itu, pada analisis produk tempe bacem dan empal gentong dihasilkan bilangan TBA yang berbeda signifikan oleh analisis yang berbeda. Hal ini dikarenakan analisis 2 melakukan analisis TBA secara *interday* yaitu analisis TBA dilakukan selang sehari setelah sampel diekstrak malonaldehidnya dimana penyimpanan ekstrak malonaldehid dilakukan pada suhu 4°C, sementara analisis 1 melakukan analisis secara *intraday*. Penundaan analisis TBA setelah pengestrakan malonaldehid dari sampel kemungkinan menyebabkan terdapatnya kehilangan malonaldehid dari larutan ekstrak. Hal tersebut diperkuat dengan lebih rendahnya bilangan TBA pada analisis *interday* daripada pada analisis *intraday*. Kecenderungan tersebut merujuk pada sifat malonaldehid yang tidak stabil⁽¹⁹⁾. Ketidakstabilan malonaldehid tersebut meliputi mudah mengalami dekomposisi oleh enzim, mengalami polimerisasi, dan bertransformasi menjadi garam sodium⁽²⁰⁾.

Akurasi suatu metode juga dapat dilihat dari nilai % *Relative Standard Deviation* (%RSD). Dari sisi waktu pengerjaan analisis, %RSD yang didapat pada waktu pengerjaan *intraday* rata-rata kurang dari 10% baik untuk analisis 1 ataupun analisis 2. Sementara pada analisis produk empal gentong oleh analisis 2 dengan waktu pengerjaan analisis *interday* diperoleh %RSD dengan nilai lebih dari 10%. Penelitian serupa dilakukan untuk menganalisis bilangan TBA pada produk daging dengan waktu pengerjaan analisis *intraday* serta menggunakan metode analisis berupa metode HPLC secara langsung⁽¹³⁾. Pada penelitian tersebut didapatkan %RSD berkisar 2-6%. Sementara itu, pada analisis angka ketengikan produk daging dengan metode analisis HPLC MDA-DNPH *adduct* didapatkan %RSD sebesar 11,4%⁽²⁾. Dari pembahasan ini terlihat bahwa metode ekstraksi asam cair memberikan reproduktifitas yang tinggi jika waktu pengerjaan analisis TBA dilakukan secara *intraday*.

Repeatability (pengulangan) merupakan salah satu parameter akurasi selain reproduktifitas. Pengkajian parameter pengulangan ditunjukkan oleh Tabel 2.

Tabel 2. Pengulangan analisis bilangan TBA oleh analis 1 menggunakan metode preparasi berupa ekstraksi asam cair

Sampel	Kadar air (%)	Waktu pengerjaan analisa setelah sampel diekstrak	Bilangan TBA yang didapatkan ($\mu\text{g MDA} / 1000 \text{ g sampel}$)	%RSD
Empal Gentong	83,00	<i>hari yang sama (intraday)</i>	$0,27 \pm 0,02^a$	6,22
	81,17	<i>hari yang sama (intraday)</i>	$0,27 \pm 0,01^a$	4,04

Keterangan: Pengulangan analisis dilakukan secara triplikate. nilai menunjukkan rata-rata dan standar erornya. Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) berdasar hasil uji T

Dari Tabel 2 terlihat bahwa analisis TBA pada sampel yang sama, analis yang sama, serta pengerjaan analisis secara *intraday* menghasilkan bilangan TBA yang tidak berbeda signifikan. Nilai %RSD yang didapatkan juga dalam kisaran yang sama. Hal tersebut merepresentasikan bahwa metode ekstraksi asam cair sebagai metode

ekstraksi malonaldehid memberikan parameter pengulangan yang tinggi.

Sementara itu, pengaruh metode ekstraksi asam cair dan metode distilasi sebagai metode preparasi sampel terhadap bilangan TBA ditunjukkan oleh Tabel 3.

Tabel 3. Hasil analisis bilangan TBA pada produk empal gentong dengan faktor beda metode preparasi sampel

Sampel	Metode Preparasi Sampel	Bilangan TBA yang didapatkan ($\mu\text{g MDA} / 1000 \text{ g sampel}$)	% RSD
Empal Gentong	Ekstraksi Asam Cair dengan analisis <i>intraday</i>	$0,27 \pm 0,02^a$	4,04
	Distilasi	$0,21 \pm 0,03^b$	12,92

Seperti yang ditunjukkan oleh Tabel 3, metode ekstraksi asam cair memberikan nilai bilangan TBA dalam kisaran nilai yang hampir sama dengan bilangan TBA yang dihasilkan oleh metode distilasi, walaupun nilai yang didapat berbeda signifikan. Hal tersebut dimungkinkan karena pigmen makanan terikat pada cairan ekstrak jika menggunakan metode ekstraksi cair. Namun, dengan merujuk bahwa tidak ada pigmen yang terikat dalam cairan distilat pada metode distilasi, maka dapat dikatakan bahwa formula yang diadopsi pada penelitian ini mampu mengoreksi

penginterferensi (warna pigmen makanan) dengan cukup akurat. Hal tersebut merepresentasikan bahwa metode ekstraksi asam cair yang dipadukan dengan formula yang diadopsi layak digunakan dalam penentuan bilangan TBA pada produk pangan berwarna.

KESIMPULAN

Metode ekstraksi asam cair layak digunakan sebagai metode preparasi sampel dalam penentuan bilangan TBA pada beberapa produk pangan berwarna, yaitu tempe bacem dalam kaleng, empal gentong dalam kaleng, dan kacang oven. Hal tersebut dapat

dilihat bahwa metode tersebut memberikan parameter *repeatability* (pengulangan) dan *reproducibility* (reproduktifitas) yang baik jika analisis bilangan TBA dilakukan secara *intraday*, yaitu langsung (sesegera) dilakukan setelah terselesaikannya ekstraksi malonaldehid menggunakan metode ekstraksi asam cair. Kelayakan metode preparasi sampel menggunakan metode ekstraksi asam cair yang dilanjutkan dengan analisis TBA secara *intraday* tersebut didukung oleh data nilai TBA yang dihasilkan dalam kisaran yang hampir sama dengan metode distilasi yang mana metode distilasi telah teruji dalam mengkoreksi warna sampel namun memiliki kelemahan dalam hal efektivitas waktu dan tenaga. Metode ekstraksi asam cair dapat dijadikan pilihan sebagai metode preparasi sampel dalam analisis TBA berkaitan dengan efektivitas waktu dan tenaga yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh program Prioritas Nasional BPTBA LIPI 2018. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Arbianti Restuti dalam membantu teknis penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Lai P. Shelf Life of Goat Infant Formula Powder. Thesis. Palmerston North: Chemical and Bioprocess Engineering at Massey University; 2015.
- Mendes R, Cardoso C, Pestana C. Measurement of malonaldehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chem.* 2009;112:1038-1045.
- Díaz P, Linares MB, Egea M, Auqui SM, Garrido MD. TBARs distillation method: revision to minimize the interference from yellow pigments in meat products. *Meat Sci.* 2014;98:569-573.
- Vandermoortele A, Meulenaer BD. Behavior of malondialdehyde in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem.* 2015;63:5694–5701.
- Wang C, Zhu L, Brewer MS. Comparison of 2-thiobarbituric acid reactive substances determination methods in various types of frozen, fresh meat. *J Food Lipids.* 1997;4(2):87-96.
- Ulu H. Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. *Meat Sci.* 2004;67:683–687.
- Wang B, Pace RD, Dessai AP, Bovell-Benjamin A, Phillips B. Modified extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity. *J Food Sci.* 2006;67(8):2883-2836.
- Raharjo S, Sofos JN. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Sci.* 1993;35:145–169.
- Ganhão R, Estévez M, Morcuende D. Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chem.* 2011;126:772-778.
- Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1968;125:180–198.
- Du Z, Bramlage WJ. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J Agric Food Chem.* 1992;40:1566–1570.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and

- other interfering compounds. *Planta*. 1999;207:604–611.
13. Jung S, Nam KC, Jo C. Detection of malondialdehyde in processed meat products without interference from the ingredients. *Food Chem*. 2016;209:90–94.
 14. Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MN. A distillation method for quantitative determination malonaldehyde in rancid food. *J Am Oil Chem Society*. 1960;37:44-48.
 15. AOAC Methods: 965.33, 940.28. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. The Association of Analytical Chemists; 1995.
 16. Wijaya T, Budiman S. Analisis Data Kuantitatif. Yogyakarta: Percetakan Pohon Cahaya; 2017.
 17. Shintawati, Rina O, Zulkarnain I. Validasi metode analisis piperin dalam lada hitam secara spektrofotometri. *Majalah Teknologi Agro Industri (Tegi)*. 2018;10(2):53-58.
 18. Mandel J. Repeatability and reproducibility. *J Qual Technol*. 1972;4(2):74-85.
 19. Marnett LJ, Tuttle MA. Comparison of the mutagenicities of malondialdehyde and the side products formed during its chemical synthesis. *Cancer Res*. 1980;40:276-282.
 20. Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *Biol Impacts*. 2015;5(3):123-127.