

4. PEMBAHASAN

4.1. Keberadaan Pustaka

Literatur yang didapatkan total berjumlah 70 literatur, 21 literatur berbahasa Indonesia dan 49 literatur berbahasa Inggris,. Jenis literatur yang paling banyak digunakan dimulai dari 43 *research article*, 17 buku, 9 *review article*, dan 1 jenis *website* ilmiah. Tahun terbit literatur berkisar dari tahun 2009 hingga 2021. Sumber yang paling sering digunakan berasal dari tahun 2017 dan 2016 dengan ranking kualitas literatur yaitu Q1.

4.2. Hasil Keberadaan Limbah

Anggur merupakan tanaman yang bernilai tinggi di dunia dan umumnya digunakan sebagai bahan dalam pembuatan *wine*. Jenis anggur yang digunakan dalam industri *wine* yaitu anggur hitam seperti Alvarelhao, Barbera, Bastardo, Biancone, Bourboulenc, Cabernet Franc, Carbenet Sauvignon, Calitor, Canocazo, Carignan, Pinot Noir, Syrah (Shiraz), Merlot dan lain sebagainya (Kerridge & Antcliff, 1999). *Wine* menjadi bagian dalam gaya hidup masyarakat saat ini. *Trend* ini ditandai dengan banyaknya *wine lounge* yang berada di beberapa kota besar di Indonesia maupun luar negeri. Hal ini menandakan bahwa pasar *wine* merupakan pasar potensial yang mana peminatnya semakin bertambah (Rais, 2017). Semakin meningkat ketertarikan konsumen terhadap *wine* dapat dikatakan bahwa semakin tinggi juga tingkat produksi *wine* tersebut. Dalam industri *wine*, diperlukan sumber daya yang tidak sedikit seperti air, bahan organik dan zat aditif untuk menghasilkan *wine* dengan kualitas yang baik. Produksi *wine* juga tidak dapat lepas dari keterkaitannya dalam menghasilkan sejumlah besar limbah organik (kulit, biji dan tangkai anggur), anorganik (tanah diatom, lempung bentonit dan perlit) dan emisi gas rumah kaca (CO₂, senyawa organik yang mudah menguap) (Maicas & Mateo, 2020). Dalam industri *wine* limbah organik padat dari anggur diperoleh dari proses pengepresan atau fermentasi (Beres *et al.*, 2017). Jika merujuk pada informasi dari Rajabi *et al.*, (2015), proses produksi berkontribusi dalam menyumbangkan limbah anggur sebesar 19%, diikuti dengan *agricultural production* sebesar 17,6%, *postharvest* sebesar 9%, dan distribusi sekitar 7% Dhekney (2016).

Limbah anggur yang tidak ditangani dengan baik dapat memberikan dampak negatif terhadap lingkungan seperti pencemaran lingkungan, air, tanah, dan udara (bau busuk). Tumpukan limbah anggur yang tidak tertangani dapat menarik lalat dan hama sehingga

dapat dengan mudah menularkan berbagai macam penyakit pada manusia. Saat ini, terdapat penanganan yang sering dilakukan untuk mengatasi permasalahan limbah anggur dari industri *wine* seperti pengomposan. Pengomposan adalah metode yang digunakan oleh petani selama bertahun-tahun dimana sampah organik yang dihasilkan akan diubah menjadi pupuk yang dapat menyuburkan tanah dan tanaman (Arvanitoyannis *et al.*, 2006). Prinsip pengomposan adalah dengan menurunkan rasio C/N bahan organik hingga setara dengan C/N tanah (<20) (Simanungkalit *et al.*, 2006). Limbah anggur akan diinkubasi dalam *composting simulator* selama 10 hari hingga kadar C/N sesuai standard dan dapat dimanfaatkan sebagai kompos (Arvanitoyannis *et al.*, 2006). Selain itu, pemanfaatan limbah anggur sebagai pakan ternak juga merupakan alternatif lain dalam mengurangi jumlah limbah.

Pemanfaatan limbah anggur sebagai bahan pangan masih sulit untuk dijumpai, berbeda dengan pemanfaatan sebagai pakan ternak dan kompos (Hogervorst *et al.*, 2017). Berdasarkan informasi pada penelitian Beres *et al.*, (2017), sebanyak 3% limbah yang dihasilkan dari industri *wine* akan dijadikan sebagai pakan hewan, kompos dan bahan pembangunan. Dengan memanfaatkan limbah anggur tersebut, tentunya akan menawarkan dan meningkatkan nilai ekonomis serta meningkatkan prospek valorisasi. Hal tersebut dikarenakan, dalam kulit, biji dan juga tangkai dari limbah anggur masih terdapat banyak sekali senyawa bioaktif yang bermanfaat, salah satunya adalah sebagai antioksidan.

Merujuk pada penelitian Spigno *et al.*, (2017), kulit anggur mewakili 50% dari limbah anggur. Kandungan dalam limbah kulit anggur kering terdiri dari lemak (0,5%), karbo (8,1%), pectin (8,5%), selulosa (26,57%), lignin (11,6%), hemiselulosa (5,6%), dan protein (12,5%) (Kosseva, 2020), protein pada kulit buah anggur terdiri dari 5% hingga 12%, abu 2% hingga 8%, gula larut 1% hingga 70% (tergantung pada proses yang diterapkan) dan kandungan serat dan senyawa fenolik (Spigno *et al.*, 2017). Polifenol yang dapat diekstraksi mewakili hanya 21% dari total senyawa fenolik yang terkandung dalam sampel menjadi komponen utama katekin (46,8%), benzoat asam (16%), flavonol (14%) dan antosianidin (16,2%). Polifenol anggur memiliki potensi yang cukup besar sebagai antioksidan, berdasarkan aksi gabungan dari polifenol yang dapat diekstraksi (antosianin, flavonol, flavan-3-ol dan asam fenolik) dan tidak dapat diekstraksi

polifenol (proanthocyanidins polimer dan tanin terhidrolisis berat molekul), keduanya mampu mengais radikal yang penting dalam mencegah ketengikan dalam makanan. Keberadaan senyawa fenolik dalam limbah anggur berpotensi dalam dunia kesehatan karena menunjukkan kapasitas antioksidan (Ayerdi et al., 2009). Antosianin merupakan golongan fenolat pada kulit anggur, flavan-3-ols dapat ditemukan di kulit dan biji anggur. Persentase kandungan antosianin pada anggur hitam sebesar 30% dari total kandungan polifenol (Paramita *et al.*, 2016). Malvidin-3-O-glukosida merupakan antosianin yang paling banyak ditemukan pada kulit anggur diikuti oleh Peonidin-3-O-glukosida (Hogervorst *et al.*, 2017). Stabilitas antosianin dipengaruhi oleh beberapa hal seperti cahaya, pH, enzim, senyawa dan suhu (Paramita *et al.*, 2016). Antosianin berfungsi sebagai anti kanker, antioksidan dan anti-inflamasi. Karakteristik fenolat non-antosianin dalam kulit anggur terdiri dari katekin, proantosianidin, glikosida flavonol, asam fenolat, dan stilbene (Schieber A, 2019).

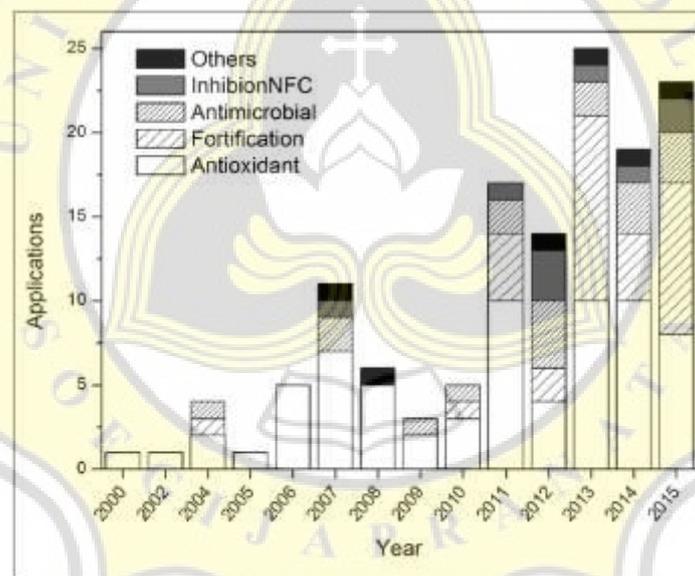
Menurut Beres *et al.*, (2017), biji anggur mewakili sekitar 2-5% dari berat anggur dan 38-52% dari limbah anggur yang dihasilkan pada industri anggur. Sekitar 52% dari limbah anggur merupakan biji anggur. Dibandingkan dengan komponen lainnya, biji anggur memiliki kandungan fenolik lebih dari 70% dari total senyawa, asam lemak omega-6 dan vitamin. Antioksidan pada biji anggur terdiri tokoferol dan tokotrienol (Hogervorst *et al.*, 2017). Kandungan dalam biji anggur terdiri dari 40% serat, 10-20% lemak, 10% protein dan beberapa senyawa kompleks fenolik lainnya, gula dan mineral (Beres *et al.*, 2017). Sedangkan menurut Davila *et al.*, (2017), biji anggur mengandung serat, protein, lipid (lemak dan minyak), karbohidrat, mineral dan antara 5-8% senyawa polifenol seperti tanin. Ekstrak dari biji anggur kaya akan proantosianidin, resveratrol dan senyawa polifenol lain yang berfungsi sebagai fitokimia kardioprotektif (Iriti & Varoni, 2016). Nutrisi dalam biji anggur dapat dijadikan sebagai minyak karena memiliki asam lemak tidak jenuh (oleat dan linoleat) serta senyawa fenolik (Beres *et al.*, 2017).

Merujuk pada informasi Davila *et al.*, (2017), tangkai anggur merupakan kerangka yang diperoleh selama proses pengupasan anggur dengan menyumbang sekitar 3-6% limbah yang dihasilkan. Tangkai anggur dibentuk oleh senyawa lignoselulosa seperti selulosa, hemiselulosa, tanin (6-7%) dan lignin yang tinggi (22-47%). Menurut penelitian

Hogervorst *et al.*, (2017) tangkai anggur terdiri dari 6% senyawa fenolik per berat kering dan digunakan sebagai sumber antioksidan dan serat makanan (*dietary fiber*) yang baik. Kandungan fenolik utama pada tangkai anggur adalah flavan-3-Ols, asam hydroxycinnamic, flavonol, dan stilbener. Flavonol utama dalam tangkai anggur adalah turunan kuersetin yaitu glukuronida.

4.3. Hasil Status Valorisasi:

Pangan fungsional telah menjadi sebuah tren konsumsi masyarakat karena dapat memberikan nutrisi dan manfaat yang baik serta menawarkan rasa dan penampilan yang menarik. Tidak semua makanan mengandung bahan yang bersifat fungsional, sehingga diperlukan penambahan bahan dari luar untuk meningkatkan sifat fungsional makanan tersebut (Kandylis, 2021). Kandungan bioaktif dalam limbah anggur yang tinggi dapat dimanfaatkan sebagai bahan yang berpotensi untuk meningkatkan sifat fungsional beberapa jenis makanan.



Gambar 13. Tren Pemanfaatan Limbah Anggur di Dunia Pangan
Sumber: Lomillo & Sanjose, (2016)

Berdasarkan informasi dari penelitian Lomillo & Sanjose, (2016), sejumlah penelitian telah dilakukan untuk mengetahui pemanfaatan limbah anggur di beberapa jenis makanan. Pada tahun 2010, menunjukkan peningkatan aplikasi limbah anggur sebagai antioksidan, yang disajikan pada Gambar 13. Jenis produk atau aplikasi limbah anggur paling banyak berturut-turut adalah antioksidan, fortifikasi, antimikroba, *inhibionNC* dan lain lain.

Ekstrak limbah anggur telah diakui secara umum oleh U.S. Food and Drug Administration (FDA) dalam pemanfaatannya untuk meningkatkan kualitas dan umur simpan makanan. Ekstrak limbah anggur juga telah banyak diperjual belikan secara komersial sebagai suplemen makanan di *website* 'Everything Added to Food in the United States (EAFUS)' (Perumalla & Hettiarachey, 2011). Oleh karena itu, pembahasan kali ini akan lebih berfokus pada pemanfaatan limbah anggur sebagai bahan fortifikasi, *edible film* dan antioksidan.

4.3.1. Food fortification

Pengertian fortifikasi pangan adalah penambahan satu atau beberapa jenis mikronutrien ke dalam pangan yang bertujuan untuk meningkatkan nilai gizi, kesehatan dan mencegah defisiensi (Astuti *et al.*, 2014). Menurut Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (2004), pengayaan atau fortifikasi merupakan penambahan zat gizi yang hilang atau kurang secara alami akibat proses pengolahan atau penyimpanan. Penambahan mikronutrien seperti vitamin dan mineral maupun asam amino pada produk pangan dipercaya dapat memberikan efek positif pada produk. Saat ini tidak hanya mikronutrien yang dapat dijadikan sebagai fortifikan melainkan 'senyawa' selain vitamin, mineral serta asam amino yang dapat difortifikasi pada produk pangan. Fortifikasi pangan tidak terbatas pada zat-zat gizi tertentu tetapi senyawa non gizi seperti polifenol, antosianin dan antioksidan (Muchtadi, 2006).

Penggunaan bahan fortifikasi dapat berupa bubuk dan ekstrak yang diaplikasikan dalam beberapa jenis produk seperti *jelly drink* (Setiawati *et al.*, 2017), *muffin* (Bender *et al.*, 2016), roti (Hoye *et al.*, 2011), dan *cheese* (Torii *et al.*, 2016). Persyaratan fortifikasi limbah anggur pada produk pangan masih belum ditemukan di beberapa jenis peraturan ataupun ketentuan perundang-undangan tetapi terdapat beberapa jenis persyaratan dalam fortifikasi pangan secara umum seperti pada Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan Mutu dan Gizi Pangan Bab III Pasal 35 menyatakan bahwa 1). Jika terjadi kekurangan dan/atau penurunan status gizi maka diperlukan upaya perbaikan pangan, 2). Menteri bidang kesehatan bertanggung jawab dalam menetapkan jenis dan jumlah zat gizi yang ditambahkan, 3). Menteri bidang perindustrian menetapkan jenis pangan yang wajib difortifikasi, 4). Setiap orang yang memproduksi pangan fortifikan yang diedarkan wajib memenuhi ketentuan dan

standarisasi tata cara fortifikasi, dan 5). Pangan fortifikasi wajib memiliki surat persetujuan pendaftaran dari Kepala Badan. Sedangkan menurut Peraturan Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) No. 22 Tahun 2019 tentang Informasi Nilai Gizi pada Label Pangan Olahan Bab II Pasal 6 dalam ayat 2 dan 4 menyatakan bahwa pangan olahan yang wajib fortifikasi harus dicantumkan per 100 gram atau per 100 mililiter dalam label dan pasal 15 ayat 3 menyatakan bahwa batas toleransi hasil analisis zat gizi yang dimaksud dalam pasal 13 untuk pangan fortifikasi paling sedikit sama dengan persyaratan fortifikan sesuai dengan ketentuan perundang-undangan.

4.3.1.1. Limbah Kulit Anggur

Bubuk dan ekstrak fortifikasi dibuat dengan menggunakan berbagai jenis metode yang berbeda-beda. Pada penelitian Setiawati *et al.*, (2017), peneliti menggunakan jenis metode ekstraksi maserasi, dimana kulit anggur dicampur dengan 100 ml air dan dikocok menggunakan *shaker* selama ± 2 menit. Selanjutnya campuran antara kulit anggur dan air diperas dan disaring menggunakan kain saring sehingga didapatkan filtrat kulit anggur. Filtrat yang telah diperoleh dipanaskan hingga suhu 70 °C dan ditambahkan 0,1 gr konyaku dan 12 gr gula pasir sambil diaduk-aduk. Kemudian larutan *jelly* yang telah homogen dibiarkan dan didinginkan hingga suhu 50°C. Larutan yang telah dingin dituang ke dalam *cup* plastik berukuran 50 ml dan didinginkan pada suhu kamar hingga dianalisis. Penambahan ekstrak kulit anggur berpengaruh terhadap karakteristik *jelly*. Semakin banyak ekstrak yang ditambahkan akan meningkatkan total antosianin, vitamin C, total fenolik dan aktivitas antioksidan pada *jelly drink*. Warna, aroma dan rasa yang dihasilkan juga semakin meningkat.

Berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Bender *et al.*, (2016), limbah kulit anggur yang didapat dari industri *wine* akan dilakukan *pre-treatment* terlebih dahulu. Limbah anggur akan mengalami proses *dried* menggunakan *air-forced* pada suhu 55 °C selama 24 jam. Pada proses *pre-treatment* ini, limbah dari kulit dan biji anggur akan dipisahkan menggunakan saringan. Ukuran saringan yang digunakan berbeda-beda, untuk ukuran pertama yaitu 3 mm digunakan untuk mengurangi ukuran partikel, dan untuk ukuran kedua yaitu 0,2 mm digunakan untuk memisahkan antara kulit dan biji anggur. Setelah kulit dipisahkan, dilakukan proses penggilingan (*ground to a fine powder*) pada kecepatan 27.000 rpm untuk mendapatkan ukuran partikel sebesar <1

mm. Bubuk yang telah dikumpulkan akan dimasukkan ke dalam kantong plastik dan disimpan pada suhu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bubuk akan digunakan sebagai salah satu bahan dalam pembuatan *muffin*. Bahan *muffin* lainnya terdiri dari tepung terigu (12.2g/10g RH, 9.1g/100 gr protein), kuning dan putih telur yang telah dipasteurisasi, gula, minyak kedelai olahan, dan *baking powder*. Pertama-tama putih telur dikocok selama 5 menit menggunakan *mixer* dengan kecepatan tinggi, selama proses pengocokan ditambahkan gula secara perlahan. Pengocokan dengan kecepatan tinggi dilakukan selama 1 menit, setelah itu kuning telur, susu dan minyak ditambahkan secara bertahap. Campuran tepung terigu beserta bubuk limbah anggur diayak, ditambahkan pada adonan dan terakhir, *baking powder* dimasukkan kedalam adonan. Adonan diaduk hingga homogen dan setelah homogen, adonan dimasukkan kedalam cetakan berukuran 45 gr. Adonan dimasukkan kedalam *oven* selama 25 menit pada suhu $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan setelah matang, *muffin* didinginkan. Proses ekstraksi senyawa fenolik pada *muffin* dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi reflus dengan merendam sampel menggunakan etanol 80% selama 30 menit. Setelah mencapai kesetimbangan (pada waktu 30 menit), supernatan akan dibuang dan endapan direndam lagi sebanyak 2 kali menggunakan etanol. Kemudian supernatan dibuang kembali dan endapan berserat dikeringkan menggunakan *air-forced* pada suhu $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Hasil dari ekstraksi ini akan dianalisis untuk mengetahui keberadaan dari senyawa bioaktif dalam limbah anggur. Penambahan bubuk limbah kulit memberikan pengaruh terhadap karakteristik sensori *muffin*, dimana tekstur semakin keras dan warna semakin gelap.

Menurut Torii *et al.*, (2016), limbah kulit anggur yang diperoleh dari industri *wine* harus dipisahkan terlebih dahulu dari bijinya kemudian dilanjutkan dengan dikeringkan (*dried oven*) pada suhu $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam. Kulit yang telah kering digiling menggunakan *grinder* hingga bubuk berukuran $<250\text{ }\mu\text{m}$. Bubuk yang telah kering dikemas dalam kemasan vakum dan disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk digunakan. Bubuk dari penelitian Torii *et al.*, (2016) akan digunakan sebagian bahan fortifikasi pada keju. Bahan dalam pembuatan keju terdiri dari susu sehat (3,5% protein, 3,6% lemak, dan 5,1% laktosa) yang dipasteurisasi pada suhu $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 detik. Pasteurisasi adalah proses pemanasan yang bertujuan untuk membunuh bakteri patogen. Pasteurisasi dibagi menjadi 2 jenis yaitu *low temperature long time* (LTLT) dan *high temperature short time* (HTST). Perbedaan dari kedua jenis pasteurisasi ini adalah LTLT membutuhkan

waktu sekitar 30 menit pada suhu 62 °C untuk mematikan bakteri pathogen sedangkan HTST hanya membutuhkan waktu 15 detik pada suhu 72 °C (Rahmawati *et al.*, 2014). Susu kemudian ditambahkan 0,1% b/b CaCl dan *starter* mesophilic bakteri Lyofast MOSO60D. Susu terkoagulasi pada suhu 38 °C dengan rennet sapi, dan setelah 30-40 menit susu diistirahatkan. Koagulasi diartikan sebagai proses penggumpalan protein pada susu yang membentuk dadih dan *whey* sebagai produk akhirnya. Koagulasi dapat dilakukan dengan menggunakan *starter* dalam bentuk bakteri asam laktat, enzim, dan asam (Wardhani *et al.*, 2018). Dari proses istirahat tersebut akan terbentuk dadih, dadih akan dipotong dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu 37 °C. Proses pematangan (pengasinan) keju akan dilakukan secara manual, dimana perlakuan dari ekstrak limbah kulit anggur akan ditambahkan pada dadih (*curd*) selama proses pembuatan keju. Proses ini dicampur secara manual dan setelah matang, keju yang diperoleh (250±10) gr dipotong-potong dengan ukuran 5 x 3 x 15 cm pada suhu kamar (20±1 °C) sekitar 20 menit sebelum dianalisis. Keju yang diberi tambahan bubuk kulit anggur akan memiliki tekstur yang kasar dan berpasir serta rasa yang ditimbulkan menjadi *bitterness* atau *astringency*.

4.3.1.2. Limbah Biji Anggur

Pengaplikasian fortifikasi tepung limbah biji anggur pada roti pada penelitian Hoye *et al.*, (2011) dimulai dengan mempersiapkan bahan yang diperlukan seperti 100 gr *hard red spring wheat*, 4 jenis berat tepung limbah biji anggur yang berbeda yaitu 0; 2,5; 7,5; dan 10 gr/100 gr *hard red spring wheat*, 1,8% ragi kering, 1,5% garam, 6% gula, 0,3% ekstrak malt, 4% susu bubuk, dan 3% *shortening*. Semua bahan dicampur dan adonan diistirahatkan selama 10 menit pada suhu 22 °C. Adonan yang telah diistirahatkan dibekukan dalam *blast freezer* pada suhu -20 °C hingga -7 °C. Setelah itu disimpan pada suhu -20 °C selama 2 hingga 6 minggu. Sampel dipanggang di *oven* berputar selama 21 menit pada suhu 218 °C dan roti yang telah matang dievaluasi dan dianalisis dari segi massa, tinggi dan volumenya. Penambahan bubuk limbah biji anggur menyebabkan tekstur roti menjadi keras, porositas menjadi meningkat, *bread brightness* menurun, *volume* roti yang menurun dan rasa yang sedikit manis.

Bubuk ataupun ekstrak limbah anggur tidak hanya diaplikasikan dalam dunia pangan, melainkan sudah diaplikasikan dalam dunia kosmetik dan kesehatan. Beberapa

produsen yang berkontribusi dalam menghasilkan bubuk atau ekstrak limbah anggur sebagai bahan fortifikasi terdiri dari Jinan Zhuo Gao Building Materials co. LTD, Nanjing Huang Professor Food Technology co. LTD dan Jiangsu Chuzhiyu Biotechnology Development co. LTD, Shenzhen Chun Rui Technology Development co. LTD (Chen *et al.*, 2020). Salah satu produsen seperti Shenzhen Chun Rui Technology Development co. LTD menghasilkan produk *Health Product and Beverages* yang memiliki manfaat untuk membentuk tubuh, meningkatkan metabolisme, mencegah penyakit sembelit, dan meningkatkan efek kesehatan pada tubuh.

4.3.2. Edible film

Edible film merupakan kemasan pada produk pangan yang dapat dimakan (*food grade*) yang memiliki sifat tidak beracun, ramah lingkungan dan *biodegradable* (Chen *et al.*, 2020). *Edible film* berperan sebagai barrier terhadap transfer massa seperti oksigen, kelembaban, zat terlarut, dan lipid. Komponen atau bahan penyusun *edible film* yaitu komposit, lipid dan hidrokoloid (Wattimena *et al.*, 2016). Hidrokoloid dapat berupa protein dan karbohidrat sedangkan lipid berupa lilin/*wax* dan asam lemak. Limbah kulit anggur dijadikan sebagai salah satu bahan yang digunakan dalam pembuatan *edible film*. Senyawa yang berperan penting dalam *edible film* ini adalah senyawa fenolik alami salah satunya senyawa yang berasal dari *grape seed extraction* yang dapat meningkatkan sifat fungsional tertentu pada membran *edible film*. Kemasan ini biasanya dapat diaplikasikan langsung pada permukaan makanan dan bertujuan untuk menjaga kualitas serta memperpanjang umur simpan dari makanan tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemanfaatan limbah anggur sebagai *edible film* dapat menghambat proses oksidasi daging dan pembusukan mikroba dengan meningkatkan aktivitas antioksidan (Xiong *et al.*, 2020; Sogut & Seydim, 2018; Munir *et al.*, 2019).

4.3.2.1. Limbah Biji Anggur

Pada penelitian Sogut & Seydim, (2018), bahan berupa 10 gr limbah biji anggur di ekstrak menggunakan air suling secara terus menerus selama 6 jam pada suhu 25 °C. Proses ekstraksi ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa fenolik dari biji anggur giling. Setelah itu larutan divakum untuk memekatkan larutan, dan disaring. Kemudian dilanjutkan dengan di *freeze drying* untuk mengkonsentrasikan senyawa fenolik akhir.

Dalam penelitian Sogut & Seydim, (2018), bahan utama lain dalam pembuatan *edible film* adalah kitosan. Pertama, kitosan (1,5% b/b) dilarutkan dalam larutan asam asetat (1% b/b). Selanjutnya, gliserol 0.3% (b/b). ekstrak limbah biji anggur (5, 10, 15% b/b) ditambahkan ke dalam larutan *film* dan dihomogenkan selama 5 menit. Proses pembuatan *film* dilakukan dengan metode *casting*. *Casting method* adalah metode pembuatan *film*. (Siregar & Irna, 2012).. Larutan *film* dituang pada pelat PTFE (*polytetrafluorethylene*) atau *casting plate* yang telah dibingkai dan diratakan. Hal tersebut sesuai dengan teori Siregar & Irna, (2012), yang menyatakan bahwa protein dan polisakarida didispersikan pada campuran air dan *plasticizer*, kemudian diaduk. Setelah diaduk, dilakukan pengaturan pH dan sesegera mungkin campuran dipanaskan dalam beberapa waktu dan dituang pada *casting plate*. Larutan yang telah dituang akan dikeringkan dalam kondisi suhu 25 °C, RH 50% selama 48 jam (kondisi pertama) dan 20 °C, RH 54% selama seminggu pada kondisi kedua. Setelah dituang, dibiarkan mengering dengan sendirinya pada kondisi lingkungan dan waktu tertentu. *Film* akan mengering dan dilepaskan dari cetakan dan kemudian dilakukan pengujian terhadap karakteristik yang dihasilkan (Siregar & Irna, 2012). Dari penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak limbah biji anggur 5% menunjukkan aktivitas antioksidan dan antimikroba yang lebih rendah, tetapi pada konsentrasi 15% menunjukkan hilangnya struktur jaringan limbah pada *film*. Karakteristik *film* yang dihasilkan adalah transparansi *film* menurun serta fleksibilitas meningkat bersamaan dengan terjadinya penurunan kekuatan tarik (*tensile strength*) pada *film*. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya *cross-linking*.

Penelitian yang dilakukan oleh Munir *et al.*, (2019), menunjukkan bahwa proses dalam pembuatan *edible film* dilakukan dengan mencampurkan air suling, NaCl (2,5% dari ikan surimi), larutan Tween 80 (0,25%). Campuran tersebut dihomogenkan selama 90 detik pada kecepatan 13.000 rpm menggunakan *homogenizer*. Selanjutnya, gliserol dengan 60% protein (sebagai *plasticizer*) ditambahkan dalam campuran tersebut dan diaduk selama 50 menit pada suhu 10 °C. Dalam proses pengadukan ini, pH larutan harus dikontrol dan disesuaikan menjadi 3 dengan 1 mol/L HCl. Selanjutnya ekstrak biji anggur dengan konsentrasi 0, 2, 4, dan 6% ditambahkan dalam larutan pembentuk *film*. Larutan diaduk pada suhu kamar (20-25 °C) selama 1 jam. Pengontrolan pH harus dilakukan kembali. Setelah itu, larutan disentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm selama

10 menit untuk menghilangkan udara gelembung dalam larutan. Supernatant disaring menggunakan 1 lapisan kain kasa yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran. Sebanyak 50 ml larutan *film* dituang pada *casting plate* berukuran 10 x 15 cm dan dikeringkan dalam pengering udara panas pada suhu 37 °C selama 12 jam. Disini, *film* dikupas secara manual, dikondisikan pada lingkungan dengan suhu ruang (25±1 °C) dan RH sebesar 55±1% selama 3 hari dan kemudian dilakukan pengujian terhadap karakteristik *film*. Interaksi antara protein ikan dengan senyawa fenolik pada limbah biji anggur mengakibatkan terjadinya *cross-linking* yang membuat kualitas dan umur simpan makanan menjadi meningkat, dan menjadi pelindung dari lingkungan luar. Tetapi efek lain yang ditimbulkan yaitu mengurangi efek *plasticizer* dalam *film* sehingga mengakibatkan *film* menjadi kaku, kekuatan daya tarik rendah.

Penelitian dari Xiong *et al.*, (2020) dan Duran *et al.*, (2016), menggunakan kitosan sebagai bahan dasar dalam pembuatan *film*. Kitosan (1,5% b/b) dilarutkan dalam asetat dan gelatin direndam dan didiamkan dalam air suling selama semalaman (Xiong *et al.*, 2020). Ekstrak limbah biji anggur dilarutkan dalam air suling dan menghasilkan larutan ekstrak limbah biji anggur 5%. Selanjutnya larutan kitosan dan gelatin dicampur pada suhu 70 °C, diaduk selama 10 menit dan didinginkan hingga suhu kamar. Ekstrak limbah biji anggur ditambahkan, diaduk hingga pH larutan mencapai 5,6±0,1 dengan natrium karbonat untuk mencapai *final coating*. Kemudian larutan dituang pada *casting plate*, ditunggu hingga kering. Pada penelitian Duran *et al.*, (2016), kitosan (1,5% b/b) dilarutkan dalam air suling, diaduk dan ditambahkan asam asetat (1% b/b) dan glikol (0,5% b/b). Semua campuran tersebut diaduk dan dipanaskan pada suhu 40 °C selama 6 jam. Ekstrak limbah biji anggur ditambahkan pada larutan dan diaduk. Setelah larutan pembentuk *film* homogen, stroberi yang digunakan sebagai bahan aplikasi dimasukkan ke dalam larutan (dibaluri larutan pelapis) dan ditunggu hingga kering. Setelah kering, ditempatkan pada nampan asam polilaktat (PLA) dan dianalisis. *Film* memiliki fungsi dalam menghambat oksidasi daging dan pembusukan mikroba, meningkatkan aktivitas antioksidan dan meningkatkan efek pengawet.

4.3.2.2. Limbah Kulit dan Biji Anggur

Proses pembuatan *edible film* yang diberi penambahan bubuk dan ekstrak limbah anggur dimulai dengan mempersiapkan bahan serta alat yang digunakan. Bahan utama

yang digunakan selain hidrokoloid, lipid dan komposit, terdapat limbah dari kulit dan biji anggur. Sebanyak 1 kg limbah kulit dan biji anggur diberi perlakuan awal (*pre-treatment*) *crushing* dalam gelas *beaker*. *Crushing* ini bertujuan untuk mereduksi ukuran dari besar dan kasar menjadi ukuran yang lebih kecil. Setelah melalui proses *crushing* atau penghancuran, sampel disaring dan didapatkan bubuk limbah anggur sebanyak 200 gr (Gutierrez *et al.*, 2018). Bubuk limbah yang diperoleh diberi 2 jenis perlakuan yaitu *post-treatment*. Sebanyak 100 gr limbah anggur (bahan A) akan diberi perlakuan *post-treatment* dan 100 gr (bahan B) sisanya tidak akan mengalami *post-treatment*. *Post-treatment* dimulai dengan mencuci bahan A dengan menggunakan 100 ml etanol, setelah selesai dicuci, bahan akan dikeringkan pada suhu 100 °C selama 24 jam. Pengeringan bertujuan mengurangi kadar air pada sampel sehingga dapat mencegah pertumbuhan bakteri, fungi dan menghambat proses enzimatik. Semakin tinggi suhu yang digunakan, maka proses transpirasi akan berlangsung lebih cepat (Widarta & Wiadnyani, 2019). Setelah melalui proses pengeringan, dilanjutkan dengan menghancurkan jaringan dalam bahan (*crushing fresh tissue*). Bahan yang telah hancur akan disaring dalam penyaring berukuran 60 mesh (16,43 µm) dan didapatkan bubuk seberat 22,4 gram.

Bahan B yang tidak mengalami *post-treatment* akan langsung dilakukan proses ekstraksi. Sebanyak 100 gr bahan akan disonikasi selama 30 menit menggunakan 25 ml pelarut etanol yang mengandung 0,01% HCl dalam gelas *beaker*. Setelah itu, dilakukan proses penyaringan, supernatant yang telah dikumpulkan akan dikeringkan dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40 °C. Ekstrak yang sudah kering disuspensikan kembali dengan air deionisasi dan disaring dengan kertas saring berukuran 20-25 µm dan dilakukan liofilisasi untuk mendapatkan *anthocyanin-containing extract* (ACE) kering. Liofilisasi adalah metode *freeze drying*, yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam ekstrak (Reubun *et al.*, 2020). Setelah itu, ekstrak yang telah diperoleh disimpan pada suhu -80 °C untuk diaplikasikan pada produk.

Ekstrak disimpan dalam refrigerator dibawah 5 °C (dalam wadah gelap), selanjutnya bahan lain seperti pati dan *plasticizer* dipersiapkan dengan perbandingan 1:1,4. Sebanyak 4 gr bubuk dan 4 ml ekstrak ditambah ke dalam 100 gr sampel, *diblending*

selama 30 min pada kecepatan 60 rpm suhu 130 °C. Sampel sebanyak 100 gr itu bertujuan untuk mempertahankan rasio gliserol yang digunakan. *Film* dituang ke dalam *casting plate* dan dipanaskan selama selama 5 min pada suhu 130°C. Kemudian *film* akan di *press* dengan tekanan 100 bar selama 15 menit pada suhu 130°C dan setelah selesai, *film* didinginkan pada suhu 30 °C. Senyawa fenolik pada ekstrak atau bubuk limbah anggur telah melakukan *cross-linking* agent dengan TPS sehingga dapat melindungi pigmen selama *blending/processing* sehingga *film* akan lebih tahan pada perubahan pH.

Saat ini, ditemukan beberapa instansi yang telah memanfaatkan limbah anggur sebagai bahan dalam pembuatan *edible film* seperti Guanxi Gaoyuan Starch co. LTD, Wuxi Chunyu Environmental Protection Products co. LTD dan Jiangnan University. Wuxi Chunyu Environmental Protection Products co. LTD memiliki hak paten terhadap produknya yang berbasis limbah anggur sebagai *edible film*. Produk yang dihasilkan memiliki karakteristik *food grade* dan ramah lingkungan sehingga dapat terdegradasi secara alami. Manfaat yang diperoleh dari *edible film* ini antara lain sebagai antibakteri, antioksidan, tahan terhadap temperatur yang tinggi, dan memiliki daya tarik yang tinggi (Chen *et al.*, 2020).

4.3.3. Antioksidan

Limbah buah anggur dapat diaplikasikan sebagai *food preservation* yang ditambahkan dalam makanan sebagai pengawet alami, antioksidan serta memiliki sifat fungisida pada makanan (Chen *et al.*, 2020). Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat memberikan gugus hidrogen radikal dalam menjaga integritas fungsi lipid membran, asam nukleat, protein seluler dan mengatur ekspresi gen dalam mencegah penyakit kanker (Pristiana, 2017 dalam Asmira *et al.*, 2020). Dengan memanfaatkan limbah anggur menjadi *food preservation* pada makanan, hal ini tentunya akan membuat makanan menjadi lebih awet dan tahan lama. Zat-zat yang terbukti memiliki sifat sebagai antioksidan terdiri dari vitamin C, polifenol, flavonoid dan vitamin E (Asmira *et al.*, 2020). Polifenol anggur memiliki potensi yang cukup besar sebagai antioksidan, berdasarkan aksi gabungan dari polifenol yang dapat diekstraksi (antosianin, flavonol, flavan-3-ol dan asam fenolik) dan tidak dapat diekstraksi polifenol (proanthocyanidins polimer dan tanin terhidrolisis berat molekul), keduanya mampu mengais radikal yang

penting dalam mencegah perkembangan ketengikan dalam makanan (Ayerdi *et al.*, 2009). Kandungan *grape seed extraction* pada pengawet alami dapat menghambat produksi PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbons*) yang diakibatkan dari hasil proses pemanggangan daging dan mencegah reaksi radikal bebas dalam daging yang dipanggang (Nie, 2019 dalam Chen *et al.*, 2020). Selain itu *grape seed extraction* tidak hanya dapat diaplikasikan pada daging, melainkan juga pada buah dan sayuran.

4.3.3.1. Limbah Kulit dan Biji Anggur

Dalam aplikasinya sebagai antioksidan di beberapa jenis makanan, limbah anggur harus melalui proses ekstraksi. Menurut Selani *et al.*, (2011), limbah kulit dan biji anggur harus melalui *pre-treatment* sebelum memasuki proses ekstraksi, dimana limbah kulit dan biji akan dikeringkan dalam *air-circulation oven* pada suhu 40 °C selama 24 jam. Limbah yang telah kering akan digiling menjadi bubuk menggunakan *analytical mill* hingga berukuran diameter < 0,5 µm. Bubuk yang telah diperoleh, akan dimaserasi menggunakan 100 ml etanol 80% pada suhu kamar selama 48 jam dibawah pengadukan konstan dan terlindung dari cahaya. Maserasi adalah metode tradisional dalam melakukan ekstraksi (Ilyas *et al.*, 2021) dengan merendam bahan dalam pelarut pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya (Damayanti & Fitriana, 2012). Ekstrak disaring pada kertas saring berukuran 12.5 mm dan filtrat yang diperoleh akan dipekatkan dalam *rotary vacuum evaporator* pada suhu 65 °C hingga pelarut teruap. Dalam metode maserasi, biasanya menggunakan pelarut penguap hal tersebut dikarenakan maserasi dapat menguapkan pelarut dibawah titik didih dan lebih menguntungkan dibandingkan menggunakan penyulingan, karena proses maserasi dapat mengatasi proses hidrolisis ester yang terkandung dalam minyak atsiri pengaruh air dan panas (Damayanti & Fitriana, 2012). Setelah itu, residu dilarutkan dalam air hingga volume akhir mencapai 50 ml, dimasukkan ke dalam botol kaca dan disimpan dalam lemari pendingin (6±2°C).

Ekstrak yang telah diperoleh dari proses ekstraksi akan dijadikan sebagai antioksidan dan diaplikasikan pada *cooked chicken meat*. Sampel ayam diberi perlakuan ekstrak, ditambahkan NaCl 1,5% dan dihomogenkan. Campuran daging yang berisi ekstrak dibentuk menjadi bakso dan direbus dalam *hot plate* dengan suhu internal 72 °C selama 5 menit. Sampel yang telah direbus kemudian dimasak, di vakum dan disimpan pada lemari pendingin dibawah titik beku pada suhu -18 °C selama 9 bulan. Setelah itu,

sampel diuji dan dilihat karakteristiknya. Keberadaan antioksidan sebagai *food preservation* dapat mempertahankan stabilitas oksidatif produk ayam selama proses penyimpanan, sehingga umur simpan menjadi lebih lama (Selani *et al.*, 2011).

Hal serupa terjadi pada metode dalam penelitian Garrido *et al.*, (2011), dimana sebanyak 10 gr sampel limbah kulit dan biji anggur kering mengalami proses *grinding* atau penggilingan. Setelah itu, bubuk dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 500 ml dan ditambah 100 ml etanol. Larutan tersebut diaduk pada suhu ruang selama 10 menit dan disaring. Endapan dicuci dengan 100 ml methanol pada suhu kamar selama 10 menit. Endapan yang telah mengalami proses pencucian akan dilakukan ekstraksi kembali sebanyak 2 kali. Pada ekstraksi ketiga, ditambah 100 ml methanol dan dikocok pada suhu kamar selama 10 menit dan disaring. Seluruh volume dari ketiga proses ekstraksi dicampur bersamaan dalam sebuah Erlenmeyer dan di *rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan kecepatan 200 rpm untuk menguapkan metanol dan mendapatkan sampel kering.

Antioksidan dari ekstrak ini akan diaplikasikan pada *pork burger*. Formulasi *burger* terdiri dari 70/100 gr daging babi tanpa lemak + 30/100 gr lemak punggung dan 2/100 gr garam). Daging yang telah dipersiapkan, dicincang pada suhu 12 °C di ruang pendingin menggunakan *cutter*. Ekstrak limbah anggur ditambahkan pada campuran daging dan di *mixer* selama 10 menit. Daging yang telah dicampur, akan dibentuk menjadi bulat dan dikemas dalam kemasan *polystyrene* bening BA-85. Setelah itu, ditutupi dengan *film polipropilen* dengan permeabilitas oksigen 6000-8000 cm³/m² pada suhu dan tekanan yang standar. Sampel disimpan pada suhu 4 °C selama 0, 3 dan 6 hari di lemari yang diterangi dengan cahaya putih *fluorescent* (620 lux).

Berdasarkan metode dari penelitian Iora *et al.*, (2014) limbah kulit dan biji anggur akan mengalami proses *pre-treatment* sebelum memasuki proses ekstraksi untuk mendapatkan antioksidan. *Pre-treatment* yang dilalui oleh limbah kulit dan biji anggur adalah harus di *press* dan di *dried* pada suhu 50 °C menggunakan *air-circulation oven* selama 12 jam. Setelah kering, limbah anggur akan digiling hingga menjadi bubuk menggunakan *knife mill* dan dikemas vakum serta disimpan pada suhu 18 °C untuk diaplikasikan pada produk. Tahap ini dilakukan dengan metode refluks dengan sedikit

modifikasi. Setelah melalui proses *pre-treatment*, bubuk limbah anggur akan diberi tambahan sebanyak 400 ml larutan *buffer* fosfat sitrat dengan pH 3 dan diinkubasi dalam *shaker* dengan pengadukan konstan 250 rpm pada suhu 80 °C selama 2 jam. Suspensi disaring dan cairan disentrifugasi pada 6000 gal selama 30 menit. Etanol 95% ditambahkan sehingga polisakarida dapat diekstraksi dan didapatkan endapannya. Endapan pektin kemudian disaring dan dicuci sebanyak 3 kali menggunakan etanol dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 50, 75 dan 100%. Endapan dicuci sampai ditandai dengan tidak adanya endapan putih pada etanol bekas pencucian. Kemudian disaring untuk menghilangkan mono dan disakarida. Polisakarida pektin yang diekstraksi dikeringkan pada suhu 50 °C hingga berat menjadi konstan dan disimpan pada suhu kamar untuk dianalisis. Antioksidan yang dihasilkan dapat berfungsi mengurangi oksidasi lipid dalam daging ataupun makanan lain. Merujuk pada penelitian Roikah *et al.*, (2016), pektin adalah suatu zat yang banyak digunakan dalam dunia industri seperti pangan, minuman dan farmasi. Pektin dapat diaplikasikan pada bahan pembuat *jelly*, pemberi tekstur, pengental dan penstabil minuman sari buah. Harga jual pektin pada tahun 2016 berkisar Rp 450.000/kg yang termasuk mahal.

Di sisi lain, terdapat metode yang berbeda dari pengaplikasian antioksidan pada produk pangan (*pasta*) seperti dilakukan *pre-treatment* distilasi dan *dried* pada suhu tertentu (Balli *et al.*, 2021). Hal yang harus dipersiapkan dalam metode ini adalah bahan limbah kulit dan biji anggur yang nantinya akan diberi 3 *pre-treatment* yang berbeda seperti sebelum distilasi, setelah distilasi dan pengeringan (*dried*). Perlakuan pertama (bahan A) tidak akan mengalami proses distilasi dan pengeringan sedangkan untuk perlakuan kedua (bahan B) akan diberi perlakuan distilasi. Bahan B akan didestilasi pada suhu 100 °C selama 30-40 menit dari proses penyulingan dan setelah itu akan dilanjutkan dengan *freeze dried*. Untuk bahan C akan di *dried* pada suhu 65 °C menggunakan *ventilated rotating electric oven* hingga berat menjadi konstan. Kemudian, semua bahan atau sampel akan digiling untuk mendapatkan bubuk yang homogen dan disimpan dalam keadaan vakum hingga digunakan.

Sampel bubuk anggur yang telah diperoleh harus dihilangkan terlebih dahulu kandungan lemaknya menggunakan pelarut heksana (1:10 b/b) sebanyak 2 kali sebelum dimasukkan ke dalam adonan pasta. Setelah itu sebanyak 2 gr bubuk kering akan

diekstraksi sonikasi sebanyak 2 kali dengan menggunakan 20 ml larutan asam EtOH:H₂O 7:3 b/b (1% HCOOH) selama 30 menit dan diaduk selama 12 jam. Kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit, supernatant yang telah terkumpul akan dilarutkan dalam air hingga volume akhir mencapai 50 ml dan dianalisis. Bubuk limbah anggur dari proses *freeze dried* lebih cocok ditambahkan sebagai *nutraceutical value* pada pasta dibandingkan bubuk dari distilasi karena total fenolik tidak terlalu banyak hilang (<20% *lossnya*).

Menurut Paramita *et al.*, (2016), valorisasi limbah anggur menjadi antioksidan dapat dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi soxhlet. Sejumlah 5 gr serbuk biji anggur dilarutkan menggunakan pelarut 500 ml etanol. Filtrat yang diperoleh dari penyaringan akan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-50 °C hingga kering. Ekstrak yang diperoleh akan diuji aktivitas antioksidan dan antimikroba. Karakteristik antioksidan yang dihasilkan adalah belum mampu menghambat bakteri *P. acnes* pada 5 variasi konsentrasi yang dipakai.

Saat ini, terdapat beberapa instansi yang telah memproduksi limbah anggur sebagai antioksidan seperti Nantong Dazheng Animal Husbandry co. LTD, Jiangsu Suhai Industry and Trade co. LTD, Weihai Lily Biotechnology co. LTD, dan Zhejiang Huakang Pharmaceutical co. LTD. Antioksidan diaplikasikan pada produk daging sehingga dapat memperpanjang umur simpan yang disebabkan adanya aktivitas antioksidan dan anti korosi pada daging (Chen *et al.*, 2020).

4.4. Tantangan dalam Implementasi Valorisasi Limbah Anggur

Tantangan yang ditemukan dari pemanfaatan limbah anggur terdiri dari keberadaan limbah, metode atau teknologi yang digunakan dalam proses valorisasi, karakteristik produk dan keamanan pangan produk yang dilihat dari senyawa bioaktif limbah anggur.

4.4.1. Keberadaan Limbah

Anggur yang diperoleh dari pertanian akan diproses untuk mendapatkan ekstrak jus anggur (*wine*) yang bernilai ekonomis. Jika merujuk pada informasi dari Rajabi *et al.*, (2015), proses produksi berkontribusi dalam menyumbangkan limbah anggur sebesar 19%, diikuti dengan *agricultural production* sebesar 17,6%, *postharvest* sebesar 9%, dan distribusi sekitar 7%. Anggur yang telah diproses tidak dapat disimpan dengan baik

dalam silo, hal itu dikarenakan anggur akan mengalami proses fermentasi terus menerus. Oleh karena itu, perlakuan yang harus dilakukan setelah anggur diproses menjadi *wine* adalah dengan cara pengeringan dan pendinginan untuk mendapatkan umur simpan yang lebih lama (Christman, 2018). Anggur yang telah terkumpulkan dari proses produksi akan dimanfaatkan menjadi produk lain. Mudahnya aksesibilitas inilah yang menyebabkan terjadinya pemanfaatan limbah anggur.

4.4.2. Teknologi

Metode atau teknologi yang digunakan dalam proses valorisasi limbah anggur sangat beragam yaitu ekstraksi konvensional seperti maserasi, refluks, soxhlet, serta ekstraksi non-konvensional sonikasi. Metode ekstraksi sangat bergantung terhadap proses *pre-treatment* sehingga hal tersebut membuat ekstraksi relatif lebih rumit. *Pre-treatment* yang biasanya dilakukan sebelum melakukan ekstraksi terdiri dari pencucian (*washing*), pengeringan (*freeze dried*, *air-dried*, *vacuum dried* dan *oven dried*, pemotongan (*chopping*), penggilingan (*grounding*), dan sentrifugasi (*centrifugation*) (Fontana *et al.*, 2013 & Soto *et al.*, 2015). Pencucian bertujuan untuk membersihkan bahan atau sampel dari kotoran. Pemotongan bertujuan untuk memperkecil ukuran sampel sedangkan penggilingan bertujuan mendapatkan bubuk dari sampel sehingga memudahkan proses homogenisasi. Luas permukaan sampel yang semakin kecil akan memperluas kontak dan meningkatkan interaksi dengan pelarut (Susanty & Bachmid, 2016). Pengeringan bertujuan mengurangi kadar air pada sampel sehingga dapat mencegah pertumbuhan bakteri, fungi dan menghambat proses enzimatik. Semakin tinggi suhu yang digunakan, maka proses transpirasi akan berlangsung lebih cepat (Widarta & Wiadnyani, 2019). Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan endapan dari suspensi menggunakan kecepatan dalam rpm. Semakin tinggi kecepatannya maka semakin sedikit waktu yang dibutuhkan untuk memisahkan cairan dari padatnya (Sebayang *et al.*, 2020). Jika sampel telah melalui proses *pre-treatment* maka sampel dapat diekstraksi sesuai dengan metode dan senyawa yang diinginkan.

Maserasi merupakan proses perendaman sampel untuk mendapatkan komponen dengan kondisi dingin diskontinyu (Putra *et al.*, 2014). Metode ini menggunakan proses pengadukan pada suhu kamar dan tidak membutuhkan pemanasan, sehingga kecil kemungkinan senyawa bioaktif dalam anggur menjadi rusak atau terurai. Pengerjaannya

yang lama dan dalam keadaan diam memungkinkan banyak senyawa yang terekstraksi (Susanty & Bachmid, 2016). Keuntungan maserasi adalah lebih praktis, jumlah pelarut (nonpolar) yang digunakan lebih sedikit dibandingkan refluks dan tidak ada proses pemanasan (Putra *et al.*, 2014). Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan sehingga kemungkinan akan kehilangan senyawa bioaktif semakin kecil, berbeda dengan metode refluks, dimana metode ini memanfaatkan bantuan pemanasan sehingga kehilangan senyawa bioaktif semakin besar (Susanty & Bachmid, 2016). Kekurangan maserasi adalah memungkinkan beberapa senyawa memiliki kelarutan yang terbatas dalam pelarut ekstraksi suhu kamar sehingga rendemen yang dihasilkan pun menjadi sedikit (Anam *et al.*, 2014) dan membutuhkan yang waktu lebih lama dari refluks dan soxhlet serta ekstrak air yang dihasilkan menjadi cepat bau dan rusak (Putra *et al.*, 2014). Maserasi yang terlalu lama akan mengakibatkan senyawa fitokimia yang diekstrak menjadi rusak sedangkan jika terlalu singkat maka tidak semua senyawa akan terlarut dalam pelarut (Kemit *et al.*, 2016). Pada proses ekstraksi dingin, hasil rendemen yang rendah diakibatkan hanya dilakukannya proses perendaman sehingga tidak ada gaya lain yang ikut membantu dan membuat osmosis pelarut ke dalam padatan berlangsung secara statis.

Ekstraksi dengan bantuan pemanasan dibagi menjadi 2 macam yaitu refluks dan soxhlet. Refluks adalah proses ekstraksi konvensional yang memanfaatkan bantuan pemanasan. Prinsip dari metode ini adalah pelarut akan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan menggunakan kondensor sehingga pelarut yang tadinya berbentuk uap akan mengembun dan turun ke wadah sehingga pelarut akan tetap ada selama proses ekstraksi berlangsung (Susanty & Bachmid, 2016) dan kejenuhan pelarut dapat dihindari (Muslich *et al.*, 2020). Metode refluks dilakukan dalam kondisi panas diskontinyu dan waktu yang dibutuhkan lebih singkat dibandingkan maserasi serta pelarut yang digunakan lebih sedikit dari soxhlet (Putra *et al.*, 2014) sedangkan soxhlet merupakan metode ekstraksi dengan menggunakan pemanasan kontinyu. Prinsip dari proses ini adalah penyaringan yang dilakukan berulang-ulang untuk mendapatkan hasil yang sempurna dan penggunaan pelarut yang sedikit. Proses ekstraksi soxhlet dapat menghasilkan rendemen yang lebih banyak dan besar jika dibandingkan dengan maserasi. Hal itu disebabkan perlakuan panas yang meningkatkan kemampuan pelarut dalam mengekstraksi senyawa yang tidak larut dalam kondisi suhu kamar serta adanya

penarikan senyawa yang lebih maksimal oleh pelarut yang selalu bersirkulasi dalam proses kontak dengan simplisa sehingga meningkatkan rendemen (Anam *et al.*, 2014). Selain itu juga, proses ekstraksi secara soxhlet dilakukan dengan pelarut yang sedikit, waktu lebih cepat, sampel yang diekstraksi sempurna karena dilakukan berulang-ulang.

Sonikasi merupakan metode ekstraksi non-konvensional dengan sensor ultrasonic yang tidak bersentuhan langsung dengan larutan yang diekstraksi (Sholihah *et al.*, 2017). Prinsip dari metode ini adalah dengan pemberian perlakuan ultrasonic pada suatu bahan pada kondisi tertentu, yang menyebabkan bahan mengalami reaksi kimia akibat perlakuan yang telah diberikan. Gelombang *ultrasonic* yang digunakan berada pada rentang frekuensi 20KHz-10MHz yang dikenal sebagai istilah *ultrasonic* (Candani *et al.*, 2018).

Senyawa bioaktif dalam tumbuhan memiliki kestabilan terhadap panas yang berbeda-beda, sehingga senyawa yang diekstrak memiliki kadar fenolik yang berbeda-beda. Pada penelitian Damar *et al.*, (2014) dalam Safitri *et al.*, (2018), flavonoid dari daun kapur kayu yang diekstraksi secara maserasi memiliki kadar lebih tinggi dibandingkan soxhlet. Hal tersebut berbanding terbalik dengan penelitian dari Verawati *et al.*, (2016) dalam Safitri *et al.*, (2016), menyatakan bahwa kandungan fenolik pada daun piladang memiliki kadar lebih tinggi yang diekstraksi secara soxhlet dibandingkan maserasi.

Penelitian dari Safitri *et al.*, (2018), menunjukkan bahwa proses pemanasan baik secara langsung maupun tidak langsung akan berpengaruh terhadap kadar senyawa dalam ekstrak. Suhu tinggi dan durasi pemanasan dapat merusak dan mengganggu kestabilan fragmen dalam jaringan tumbuhan sehingga mengakibatkan berkurangnya kadar flavonoid dan fenolik. Suhu yang semakin tinggi akan mempercepat perpindahan massa dan meningkatkan hasil ekstraksi. Menurut Haslina *et al.*, (2019) dalam Setyantoro *et al.*, (2019) suhu tinggi dapat meningkatkan kelarutan fenol dan melepaskan sel-sel dinding fenil yang disebabkan adanya kerusakan pada elemen sel sehingga menyebabkan lebih banyak senyawa fenolik yang diekstrak Hal tersebut juga sesuai dengan teori dari Muslich *et al.*, (2020), semakin tinggi suhu maka penetrasi pelarut ke dalam bahan akan semakin cepat dan mudah sehingga sampel yang terekstrak semakin banyak.

Penggunaan pelarut akan menentukan senyawa bioaktif yang dihasilkan selama proses ekstraksi (Anam *et al.*, 2014). Pelarut polar terdiri dari etanol, metanol, dan air (Kemit *et al.*, 2016 & Leksono *et al.*, 2018). Sedangkan pelarut non polar terdiri dari eter, kloroform dan n-heksana (Leksono *et al.*, 2018). Semakin polar pelarut maka semakin tinggi konstanta dielektriknya. Konstanta dielektrik pelarut mengindikasikan gaya tolak menolak antara dua partikel bermuatan listrik dalam satu molekul. Konstanta dielektrik air, metanol dan etanol berturut-turut yaitu 80, 33 dan 24 (Verdiana *et al.*, 2018). Senyawa bioaktif dalam kulit anggur umumnya diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik seperti etanol 80%, etanol 70%, metanol, yang mana penggunaannya tersebut memiliki tingkat toksisitas yang tinggi. Flavonoid bersifat polar oleh karena itu butuh pelarut yang bersifat polar. Suatu senyawa akan larut dalam pelarut yang sama (memiliki kepolaran yang sama) atau dikenal sebagai *like dissolves like*.

Pelarut *aquades* memiliki tingkat kepolaran paling tinggi dibandingkan dengan pelarut organik lainnya sehingga komponen bersifat polar seperti karbohidrat dalam ekstrak ikut terekstrak dan menyebabkan total flavonoid yang dihasilkan menjadi sedikit (Verdiana *et al.*, 2018). Metanol adalah pelarut polar karena memiliki gugus (hidroksil: -OH) dan nonpolar (metil: -CH₃), memiliki titik didih rendah (65°C) dan mengandung asam sehingga memudahkan proses pemekatan ekstrak. Oleh karena itu, metanol bersifat universal sehingga dapat menarik senyawa polar dan nonpolar pada sampel. Metanol dapat menarik senyawa seperti tanin, saponin, flavonoid, dan terpenoid (Verdiana *et al.*, 2018). Penggunaan metanol sebagai pelarut memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan *aquades* (Ramdani *et al.*, 2017).

Etanol merupakan salah satu pelarut yang sering digunakan dalam laboratorium karena memiliki kelarutan yang tinggi dan bersifat inert (tidak mudah bereaksi dengan komponen lain) (Susanti *et al.*, 2012). Etanol mampu melarutkan senyawa yang bersifat kurang polar hingga polar, salah satunya fenolik. Etanol mampu mendegradasi dinding sel sehingga senyawa bioaktif dalam sel menjadi lebih mudah keluar (Suhendra *et al.*, 2019). Etanol 70% disebut sebagai pelarut yang lebih non polar dibandingkan etanol 50% dan lebih polar dibandingkan etanol 95% sehingga senyawa flavonoid dengan sifatnya yang polar cenderung terlarut dalam etanol 70% (Riwanti *et al.*, 2020). Etanol

memiliki kemampuan penyari senyawa kimia yang lebih baik dibandingkan dengan metanol dan air (Riwanti *et al.*, 2020). Harga jual pelarut organik baik dari metanol, etanol dan air berturut-turut adalah Rp 6.062.452,00 – Rp 6.450.334,00 / MT (chemanalyst.com), Rp 13.791.360,00 – Rp 17.239.200,00 / MT, dan Rp 193.941,00 – Rp 243.934,68 / liter (alibaba.com).

Metode ekstraksi yang menggunakan pelarut paling sedikit berturut-turut sonikasi (Ilyas *et al.*, 2021), maserasi, refluks dan soxhlet (Putra *et al.*, 2014). Jika dilihat dari efisiensi waktu, metode sonikasi berada di urutan pertama diikuti oleh refluks, soxhlet dan maserasi. Hal tersebut sesuai dengan teori dari Ilyas *et al.*, (2021), yang menyatakan bahwa ekstraksi non-konvensional membutuhkan waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan ekstraksi konvensional. Menurut Sagar *et al.*, (2018) & Soto *et al.*, (2015), metode maserasi dan sonikasi sangat cocok untuk ekstraksi dalam skala kecil, tetapi tidak dalam skala industri.

4.4.3. Produk

Beberapa senyawa bioaktif dan sifat bahan dalam limbah anggur yang dipercaya memberikan pengaruh terhadap produk limbah anggur terdiri dari *particle size*, antosianin, inulin, tanin, flavonoid, proantosianidin, dan senyawa fenolik lainnya.

Karakteristik dari bahan fortifikasi limbah anggur seperti *particle size* yang diaplikasikan memberikan sensasi *granularity*, kasar dan berpasir pada roti (Sporin *et al.*, 2017) dan keju (Torii *et al.*, 2016). Tekstur berpasir dikarenakan *particle size* bubuk yang digunakan berukuran < 250 µm. Bubuk dengan ukuran partikel yang besar dapat memberikan tekstur berpasir yang disebabkan proses penggilingan dan proses penyaringan (*filtering*) yang tidak optimal. Keberadaan antosianin sebagai bahan fortifikasi yang diaplikasikan pada produk pasta memberikan pengaruh warna terhadap produk. Pasta memiliki tingkat *a* value (redness)* tinggi (Anna *et al.*, 2014). Hal tersebut sesuai dengan teori (Iriti & Varoni, 2016) yang menyatakan bahwa antosianin merupakan pigmen pada tumbuhan berwarna merah keunguan. Faktor lain yang menyebabkan *a* value* meningkat adalah terjadinya degradasi termal ataupun reaksi Maillard selama proses ekstraksi sehingga mengakibatkan warna menjadi lebih gelap / keunguan. Antosianin yang diaplikasikan sebagai antioksidan pada *pork burger* tidak memberikan efek antimikroba terhadap produk. Penelitian Garrido *et al.*, (2011),

menunjukkan bahwa senyawa yang berperan dalam menghambat pembusukan dari 3 kelompok bakteri yaitu antosianin, tetapi setelah dilakukannya penelitian ini, antosianin masih belum dapat menghambat pembusukan *pork* selama proses penyimpanan.

Hal serupa juga terjadi pada penelitian Paramita *et al.*, (2016), dimana antosianin tidak dapat memberikan respon hambatan terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* dan *S. aureus*. Ini mungkin dapat terjadi karena dosis ekstrak yang sedikit sehingga efek antimikroba dari limbah anggur ini kurang efektif dalam menghambat pembusukan (Garrido *et al.*, 2011). Menurut Balli *et al.*, (2021) dan Iora *et al.*, (2015), antosianin dalam limbah anggur yang dijadikan sebagai antioksidan memberikan efek seperti penurunan aktivitas antioksidan yang diindikasikan dengan banyaknya senyawa fenol yang hilang (>60%) dan tidak cocok ditambahkan sebagai nilai gizi pada pasta. Senyawa fenol yang hilang disebabkan adanya proses *pre-treatment* distilasi (100 °C selama 30-40 menit) yang dilakukan sebelum proses ekstraksi dan perlakuan pemanasan yang berlebihan. Hal tersebut sesuai dengan teori Paramita *et al.*, (2016), stabilitas antosianin dipengaruhi oleh beberapa hal seperti cahaya, pH, enzim, senyawa dan suhu. Semakin tinggi suhu maka antosianin akan mengalami proses degradasi, sama halnya dengan *pre-treatment* distilasi yang menggunakan suhu yang tinggi.

Senyawa inulin dalam ekstrak limbah anggur memberikan pengaruh terhadap tekstur pasta (Anna *et al.*, 2014) dan *muffin* (Bender *et al.*, 2016). Keberadaan inulin sebagai bahan fortifikasi akan mengurangi *firmness* pasta dan meningkatkan kekerasan pada pasta dan *muffin*. Hal tersebut diduga karena pembentukan gel yang tidak stabil dimana inulin belum mampu mensubstitusi lemak sepenuhnya sehingga dapat meningkatkan kekerasan pasta (Pratiwi *et al.*, 2016).

Tanin merupakan salah satu polifenol dalam limbah anggur yang tidak dapat diekstraksi (Ayerdi *et al.*, 2009). Tanin memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Semakin banyak kandungan tanin maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Bestari *et al.*, 2018). Keberadaan tanin sebagai bahan fortifikasi yang diaplikasikan pada pasta dan *cookie* memberikan rasa *astringent* / *aftertaste* pada pasta (Anna *et al.*, 2014) dan memberikan rasa pahit (*bitterness*) pada *cookie* (Theagrajan *et al.* 2019). Rasa pahit / *astringent* pada produk disebabkan oleh sifat tanin yang memiliki rasa sepat dan asam dari gugus

polifenolnya yang dapat menyusutkan atau mengendapkan protein kaya protein di saliva. Zat *astringent* menyebabkan rasa *pucker* (kerutan) dan kering dalam mulut setelah mengkonsumsi anggur (Bestari *et al.*, 2018).

Flavonoid yang terdiri dari flavan-3-Ols, katekin, epikatekin dan proantosianidin) dalam limbah anggur dalam pemanfaatannya sebagai bahan fortifikasi memberikan rasa pahit (*bitterness*) atau *astringent* pada roti yang mengakibatkan intensitas rasa manis pada roti menjadi menurun dan membuat konsumen menjadi tidak tertarik (Hoye *et al.*, 2011 & Sporin *et al.*, 2017). Rasa pahit yang terjadi dipengaruhi oleh peningkatan waktu penyimpanan sehingga roti mengalami dehidrasi dan memekatkan senyawa polifenol. Selain itu juga, flavan-3-ols termasuk ke dalam antioksidan utama dalam anggur dan memiliki karakteristik mengendapkan protein kaya prolin (*salivary proline-rich protein*). *Astringency* didefinisikan sebagai sensasi kering, kasar, mengerut atau mencengkeram yang dirasakan taktil dalam mulut dimana intensitasnya dapat meningkat tergantung pada laju aliran air liur (Azevedo *et al.*, 2020).

Proantosianidin dalam limbah anggur yang dimanfaatkan sebagai antioksidan pada *raw* dan *cooked chicken* belum dapat menghambat ketengikan oksidatif. Senyawa oksidatif pada *frozen chicken* semakin meningkat selama proses penyimpanan dan menimbulkan bau tak sedap / tengik (Selani *et al.*, 2011). Ketengikan selama proses penyimpanan dapat dikarenakan adanya zat pengotor yang terdapat dalam ekstrak sehingga menghambat dan menurunkan aktivitas antioksidan dan tidak dapat mencegah reaksi oksidatif (Leksono *et al.*, 2018).

Senyawa fenolik dalam limbah anggur yang dimanfaatkan sebagai bahan fortifikasi roti (Sporin *et al.*, 2017) dan *edible film* (Sogut *et al.*, 2018 & Munir *et al.*, 2019) memberikan efek terhadap produk. Kelompok terbesar dari senyawa fenolik yaitu flavonoid. Pada produk roti, senyawa fenolik dalam limbah anggur membuat volume roti menjadi berkurang. Rendahnya volume roti diakibatkan karena senyawa fenolik menghambat kinerja enzim amilase yang memecah pati menjadi gula sederhana dalam proses pembuatan roti. Enzim amilase akan memutuskan ikatan amilosa (α 1,4 glukosida) dan amilopektin (α 1,6 glukosida) menjadi glukosa, maltotriosa dan maltosa. Maltosa (substrat) yang diproduksi menjadi tidak cukup sehingga ragi roti

(*Saccharomyces cerevisiae*) yang mengonsumsi substrat menghasilkan gas yang terbatas (sedikit) (Kurniawan *et al.*, 2014). Senyawa fenolik dari limbah anggur yang diaplikasikan pada *edible film* menunjukkan penurunan efek *plasticizer* dalam *film* sehingga *film* menjadi kaku, kekuatan daya tarik rendah (Munir *et al.*, 2019). Keberadaan senyawa fenolik mengakibatkan terjadinya *cross-linking* pada kitosan dan membuat transparansi *film* bernilai rendah. Hal ini dapat terjadi karena adanya senyawa antosianin dalam ekstrak yang menyebabkan produk menjadi tidak transparan.

Beberapa senyawa bioaktif dalam limbah anggur telah banyak dimanfaatkan sebagai produk lebih tinggi. Hal tersebut dibuktikan dengan banyaknya produsen yang memperjual belikan senyawa tersebut seperti bubuk antosianin, bubuk tanin, bubuk inulin dan bubuk proantosianidin (Alibaba.com). Saat ini, harga jual bubuk antosianin adalah Rp 285.445,00 / kg, bubuk tanin berkisar Rp 215.160,00 – Rp 258.192,00 / kg, bubuk inulin Rp 71.720,00 – Rp 117.620,80 / kg, bubuk flavonoid Rp 200.816,00 dan bubuk proantosianidin sebesar Rp 315.568,00 (Alibaba.com). Bubuk yang diperoleh dari senyawa limbah anggur yang telah banyak diperjualbelikan dapat dijadikan sebagai sebuah peluang untuk perkembangan produk dimasa mendatang. Bubuk tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan produksi seperti bahan fortifikasi, antioksidan dan *edible film* dalam dunia pangan ataupun kesehatan yang tentunya bermanfaat bagi tubuh. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Lomillo & Sanjose, (2016), yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aplikasi limbah anggur sebagai antioksidan, yang ditunjukkan pada Gambar 13., yaitu antioksidan, fortifikasi, antimikroba, *inhibionNC* dan lain lain.

4.4.4. Keamanan Pangan

Limbah anggur yang terdiri dari kulit, biji dan tangkai memiliki senyawa bioaktif yang tinggi yang dapat dimanfaatkan dalam industri pangan ataupun kesehatan. Dengan tingginya senyawa bioaktif dalam limbah anggur, hal tersebut berpotensi untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Ochratoxin A (OTA) merupakan toksin alami yang bersifat karsinogenik, imunotoksin, genotoksik, nefrotoksik dan teratogenik yang dapat ditemukan di beberapa jenis komoditas pangan seperti biji-bijian, buah-buahan hingga anggur (Senaye *et al.*, 2015). Mikotoksin ini diproduksi oleh *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, dan *A. carbonarius*. Kontaminasi anggur oleh jamur ini berkaitan dengan praktik pertanian seperti penggunaan fungisida,

penanganan sebelum dan sesudah panen (Yu *et al.*, 2020). Spesies OTA ini dapat tumbuh dalam *water activity* sekitar 0,900 – 0,996. Selain itu, kandungan gula yang tinggi pada limbah anggur dapat menjadi sumber karbon yang mendorong pertumbuhan jamur.

Beberapa negara telah menetapkan batasan OTA seperti Uni Eropa dengan batas OTA sebesar 5 µg/kg untuk sereal, 3 µg/kg untuk produk sereal, 10 µg/kg untuk anggur kering, sedangkan untuk negara China sebesar 5 µg/kg untuk biji-bijian dan kacang-kacangan (Yu *et al.*, 2020). Makanan yang terpapar OTA dan dikonsumsi oleh manusia akan menyebabkan beberapa jenis penyakit seperti tumor saluran kemih, nefropati endemic balkan (BEN), nefropati interstisial kronis (CIN) dan penyakit ginjal lainnya (Yu *et al.*, 2020). Penelitian Klimke & Wu, (2015) mengungkapkan bahwa efek yang ditimbulkan terhadap manusia masih kurang meyakinkan dibandingkan dengan efek samping dari OTA pada hewan. Hal tersebut dibuktikan dengan beberapa peneliti seperti Krogh, (1974); Hagelberg *et al.*, (1989); Kuiper Goodman & Scott, (1989); World Health Organization (WHO), (2002) dalam Klimke & Wu, (2015) yang menyatakan bahwa OTA menunjukkan tingkat toksisitas dan sifat karsinogenik pada hewan. Saat ini, Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA) belum menetapkan pedoman peraturan mengenai OTA dalam makanan atau pakan. Oleh karena itu, diperlukan pertimbangan dalam mengembangkan metode yang lebih efektif untuk mencegah pertumbuhan jamur pada limbah anggur dan mengubah OTA menjadi senyawa yang kurang atau tidak beracun yang dapat ditambahkan ke dalam formula makanan sehingga masyarakat atau konsumen akan merasa lebih aman dan percaya untuk mengonsumsi produk tersebut.

4.5. Peluang dalam Implementasi Valorisasi Limbah Anggur

Peluang yang ditemukan dari pemanfaatan limbah anggur terdiri dari perbaikan metode atau teknologi dalam valorisasi, perbaikan karakteristik produk dan keamanan pangan produk yang dilihat dari senyawa bioaktif limbah anggur.

4.5.1. Perbaikan Teknologi

Perbaikan teknologi dalam pemanfaatan limbah anggur dapat dilakukan dengan mensubstitusi metode konvensional dengan metode non-konvensional. Hal tersebut dikarenakan ekstraksi konvensional sangat bergantung pada penggunaan pelarut

organik, lamanya waktu pemrosesan, suhu tinggi dan pengeluaran energi yang besar yang mungkin berdampak negatif terhadap kesehatan manusia dan lingkungan Carpentieri *et al.*, (2021). Selain itu, menurut Sagar *et al.*, (2018), ekstraksi konvensional memerlukan waktu yang lebih lama, penggunaan pelarut organik yang mahal, hasil *recovery* lebih sedikit serta lebih mudah terjadinya proses degradasi senyawa bioaktif. Ekstraksi non-konvensional dikenal sebagai ekstraksi yang lebih efisien dan ramah lingkungan jika dibandingkan dengan ekstraksi konvensional (Sagar *et al.*, 2018). Ekstraksi non-konvensional hanya membutuhkan waktu sekitar 1 hingga 60 menit dan jumlah pelarut yang sedikit yaitu sekitar 50 ml dibandingkan dengan konvensional yaitu 100 hingga 200 ml (Ilyas *et al.*, 2021). Ekstraksi non-konvensional terdiri dari *ultrasound-assisted extraction* (UAE), *microwave-assisted extraction* (MAE), *pulsed electric field* (PEF), *supercritical fluid extraction* (SFE), *high voltage electrical discharge* (HVED), *high-pressure homogenization* (HPH) dan sonikasi (Ilyas *et al.*, 2021; Sagar 2018 & Carpentieri *et al.*, 2021). Dalam pembahasan kali ini, penulis hanya akan membahas mengenai 3 jenis metode non-konvensional yaitu *ultrasound-assisted extraction* (UAE), *microwave-assisted extraction* (MAE) dan *pulsed electric field* (PEF).

Ultrasound-assisted extraction (UAE) adalah salah satu teknik ekstraksi non-konvensional yang memanfaatkan energi gelombang ultrasonik. Prinsip dari metode ini yaitu gelombang ultrasonik akan memecah dinding sel dan melepaskan isi sel ke media ekstraksi pada saat ekstraksi sonikasi (Sasongko *et al.*, 2018). Faktor yang mempengaruhi proses UAE antara lain daya, suhu dan waktu. Frekuensi ultrasonik yang digunakan berkisar antara 20 hingga 120 KHz. Pelarut yang digunakan terdiri dari air (yang telah diasamkan), etanol dan alkohol (Carpentieri *et al.*, 2021). Ekstraksi UAE cocok digunakan untuk ekstraksi antosianin, fenol, antioksidan dari biji anggur (Ilyas *et al.*, 2021).



Gambar 14. Mekanisme Pemecahan Sel pada Ekstraksi *Ultrasound-assisted Extraction*
Sumber: (Carpentieri *et al.*, 2021)

Gambar 14., memperlihatkan proses pemecahan sel pada ekstraksi UAE. UAE memanfaatkan efek kavitasi seperti pembentukan, pertumbuhan dan pecahnya gelembung mikro yang melepaskan energi yang disebut *hotspot* (Sasongko *et al.*, 2018). Gelembung mikro yang pecah menghasilkan suhu dan tekanan yang tinggi yang akan menyebabkan terjadinya *microjet* dan *shockwave*, selanjutnya dinding sel padatan pecah dan mendorong pelepasan senyawa intraseluler pada medium. Kelebihan dari UAE adalah energi dan daya yang dibutuhkan sedikit, biaya peralatan rendah, suhu pemrosesan rendah, hasil ekstraksi yang tinggi, waktu pemrosesan singkat, bahan kimia yang digunakan lebih sedikit sedangkan untuk kelemahan UAE adalah diperlukan *pre-treatment* seperti separasi dan purifikasi, kurangnya keseragaman dalam distribusi energi ultrasonic, konsumsi pelarut yang tinggi (Carpentieri *et al.*, 2021 & Sagar *et al.*, 2018).

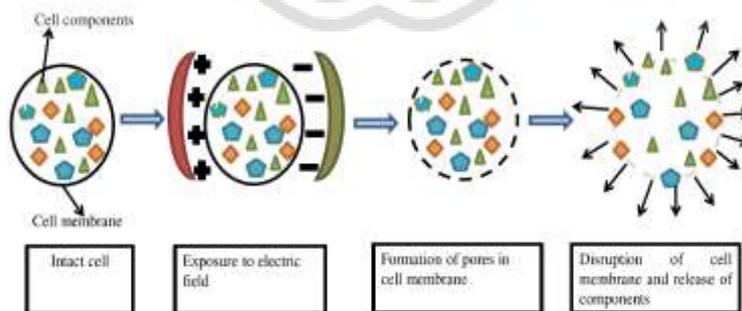
Microwave-assisted extraction (MAE) adalah salah satu metode non-konvensional yang memanfaatkan gelombang elektromagnetik untuk menembus produk, menghasilkan panas didalam matriks dan menyebabkan kerusakan pada dinding sel (Carpentieri *et al.*, 2021). Ekstraksi ini cocok untuk pengambilan senyawa termolabil. Gelombang elektromagnetik pada MAE berkisar 300 MHz hingga 300 GHz (Sagar *et al.*, 2018). Faktor terpenting yang mempengaruhi efisiensi pada ekstraksi MAE adalah suhu, diikuti sifat pelarut, matriks, waktu, dan daya gelombang mikro. Walaupun suhu tinggi dapat meningkatkan proses ekstraksi MAE, tetapi suhu yang berlebihan juga dapat merusak ekstraksi termolabil komponen (Carpentieri *et al.*, 2021). Pelarut harus memiliki kemampuan dalam menyerap radiasi gelombang elektromagnetik yang menyebabkan pelarut menjadi panas. Kemampuan pelarut dinyatakan dalam *dielectric constant*, semakin tinggi *dielectric constant* maka pelarut semakin mudah/cepat panas (Sasongko *et al.*, 2017). Panas yang dipaparkan oleh gelombang mikro akan menyebabkan terjadinya kenaikan suhu dan tekanan uap air dalam sel sehingga mengakibatkan sel menjadi bengkak, pecah dan senyawa intraseluler dalam sel menjadi keluar. Mekanisme pemecahan sel dapat dilihat pada Gambar 15., dibawah ini:



Gambar 15. Mekanisme Pemecahan Sel pada Ekstraksi *Microwave-assisted Extraction*
 Sumber: (Carpentieri *et al.*, 2021)

Kelebihan MAE antara lain menghasilkan jumlah ekstrak yang tinggi, ukuran peralatan yang kecil, durasi ekstraksi sebentar dibandingkan UAE, penggunaan pelarut yang sedikit, eskalasi industri yang mudah, dan penggunaan daya yang rendah sedangkan kekurangannya adalah biaya peralatan yang mahal, diperlukan pemisahan ekstraksi non-selektif dan proses pemurnian, pengoperasiannya yang sulit dibandingkan UAE, kurang ramah lingkungan karena menggunakan pelarut organik, hasil ekstraksi yang buruk untuk senyawa nonpolar (Carpentieri *et al.*, 2021 & Sagar *et al.*, 2018).

Pulsed electric field (PEF) merupakan teknologi pemrosesan non-termal yang melibatkan pelepasan tegangan tinggi pulsa listrik dalam sampel, yang ditempatkan antara dua elektroda selama beberapa mikrodetik (Ilyas *et al.*, 2021). Prinsip PEF yaitu meningkatkan ekstraksi dengan memecah struktur membran sel (Sagar *et al.*, 2018 atau *electroporation* (Ilyas *et al.*, 2021). Muatan listrik memecah molekul membran sel berdasarkan muatan sifat dipolnya (Sagar *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian Ilyas *et al.*, (2015), muatan listrik bertegangan tinggi diterapkan pada materi yang ditempatkan antara 2 elektroda sehingga dinding sel dapat rusak lebih mudah dan proses ekstraksi menjadi lebih cepat. Faktor yang mempengaruhi PEF terdiri dari kekuatan medan listrik, total input energi dan suhu (Carpentieri *et al.*, 2021).



Gambar 16. Mekanisme Pemecahan Sel pada Ekstraksi *Pulsed Electric Field*
 Sumber: (Ilyas *et al.*, 2021)

Kelebihan PEF terdiri dari hemat energi baik saat *pre-treatment* ataupun *processing*, tingkat selektivitas yang tinggi, tidak ada efek termal, tidak merusak senyawa, pengoperasian yang dilakukan secara terus menerus hingga 10.000 kg/jam, waktu ekstraksi singkat, ramah lingkungan (Carpentieri *et al.*, 2021). Kelemahan dari PEF yaitu biaya peralatan yang tinggi, bergantung pada konduktivitas (media komposisi). Metode PEF merupakan salah satu metode non-konvensional yang telah digunakan dalam industri makanan (Soto *et al.*, 2015). Tantangan yang diperkirakan muncul dalam penerapan PEF sebagai teknologi ekstraksi di skala industri antara lain pengembangan sistem pembangkit *pulsed* yang lebih terjangkau dan baik dilihat dari kekuatan medan listrik dan daya, serta optimalisasi desain sistem PEF (Carpentieri *et al.*, 2021).

4.5.2. Perbaikan Produk

Perbaikan produk yang dapat dilakukan untuk menghasilkan produk dengan kualitas yang baik dapat dilakukan dengan mengontrol dan menggunakan bubuk ekstrak dibawah ambang batas 25 μ m (Torri *et al.*, 2016) sebagai bahan fortifikasi dalam pengaplikasiannya pada roti. Efek yang ditimbulkan dari senyawa antosianin sebagai bahan fortifikasi dan antioksidan pada produk dapat dicegah dengan mengontrol proses yang memanfaatkan pemanasan seperti pengeringan ataupun pemasakan sehingga dapat meminimalisir kehilangan beberapa senyawa fenolik dalam ekstrak. Hal tersebut sesuai dengan teori Paramita *et al.*, (2016) yang menunjukkan bahwa stabilitas antosianin dipengaruhi oleh cahaya, pH, enzim, senyawa dan suhu. Semakin tinggi suhu maka antosianin akan mengalami proses degradasi, sehingga aktivitas antioksidan dalam ekstrak berkurang. Keberadaan inulin yang mengurangi *firmness* pasta dan memberikan tekstur kekerasan terhadap pasta dan *muffin*. Perbaikan yang dapat dilakukan yaitu membentuk karakteristik inulin sehingga dapat dijadikan sebagai substitusi lemak. Hal tersebut sesuai dengan teori Pratiwi *et al.*, (2016) inulin belum mampu menggantikan lemak sepenuhnya, sehingga meningkatkan kekerasan produk. Untuk mendapatkan karakteristik inulin sebagai substitusi lemak, inulin harus dicampur dengan bahan cair atau air maka akan terbentuk partikel gel berwarna putih krem yang mudah menyatu dalam bahan pangan dan berfungsi sebagai pengganti lemak.

Polifenol dalam limbah anggur yang dapat diekstraksi berkisar 21% dari total senyawa fenolik yang mana komponen utamanya yaitu katekin (46,8%), asam benzoate (16%),

flavonol (14%) dan antosianidin (16,2%). Di sisi lain, polifenol yang tidak dapat diekstraksi mewakili sekitar 17,5% yang terdiri dari tanin dan proantosianidin (Ayerdi *et al.*, 2009). Tanin dalam limbah anggur yang dijadikan sebagai bahan fortifikasi pada pasta dan *cookie* yang memberikan rasa sepat / pahit atau *astringency* dapat dikurangi dengan melakukan *pre-treatment* sampel seperti perendaman dalam air selama beberapa jam yang dilakukan secara berulang kali sehingga jumlah tanin dalam sampel akan larut dalam air rendaman. Pada beberapa produk pangan, kandungan tanin masih dipertahankan dalam jumlah tertentu karena berfungsi sebagai antioksidan (Muryati *et al.*, 2015).

Keberadaan proantosianidin belum dapat menghambat proses ketengikan oksidatif sehingga menimbulkan bau tak sedap atau tengik. Ketengikan pada produk dapat terjadi karena belum dilakukannya proses *pre-treatment* purifikasi. Oleh karena itu, untuk mencegah bau tak sedap tersebut, perlu dilakukannya purifikasi. Purifikasi dikenal sebagai metode untuk mendapatkan komponen bahan dalam keadaan murni yang terbebas dari komponen kimia lain. Suatu senyawa dapat dikatakan murni jika kemurniannya diantara 95-100% dan terbebas dari komponen kimia yang tidak dibutuhkan seperti lemak, tanin, pigmen, pelumas, dan *plasticizer* (Malik *et al.*, 2017).

Senyawa fenolik dalam ekstrak anggur yang diaplikasikan sebagai antioksidan pada *edible film* membuat *film* memiliki kekuatan daya tarik yang rendah dan efek *plasticizer* menurun sehingga *film* menjadi kaku. Efek negatif pada tingkat kekakuan dan kekuatan daya tarik pada *film* dapat dicegah dengan melakukan penambahan kitosan dapat meningkatkan sifat mekanik yang disebabkan adanya interaksi hidrogen (amilosa dan amilopektin) dalam *film* sehingga *film* menjadi semakin kuat dan sulit untuk diputus karena memiliki kekuatan daya tarik yang tinggi Setiani *et al.*, (2013),. Penambahan ekstrak limbah anggur >15% akan merusak struktur ikatan antar senyawa, jika penambahan <15% tidak menunjukkan adanya perubahan yang signifikan dari segi antioksidan dan antibakteri sedangkan penambahan =15% akan menghasilkan kekuatan daya tarik yang rendah (semakin menurun) (Sogut & Seydim *et al.*, 2018).

Tingkat pengurangan OTA dalam limbah anggur bergantung pada pH, waktu pemrosesan dan suhu. Keberadaan senyawa toksin pada limbah anggur seperti

Ochratoxin A (OTA) dapat dicegah dengan melakukan proses *pre-treatment* seperti pengeringan dan pendinginan (Christman, 2018) dan dengan melakukan kombinasi perlakuan seperti *thermal pressure processing* pada suhu 121°C selama 10-30 menit menggunakan *autoclave*, *acid treatment* menggunakan beberapa jenis asam seperti asam hidroklorida, asam asetat, asam sitrat, asam laktat dan *enzyme treatment* yang menggunakan karboksipeptidase A (CPA), alkalasem, protease, lipase, dan pepsin (Yu *et al.*, 2020). *Thermal pressure* mampu mengurangi keberadaan OTA pada limbah anggur sekitar 19-80% tergantung dari waktu *treatment* nya. Waktu 20 menit merupakan waktu yang paling optimal untuk mengurangi OTA yaitu sekitar 37,64-79,88% berbeda dengan waktu 10 dan 30 menit. Kandungan OTA dalam proses *thermal pressure* dengan waktu 30 menit sangat tinggi hal tersebut dikarenakan adanya interaksi atau gangguan senyawa lain yang terbentuk selama proses pemanasan.

Penggunaan asam organik seperti asam asetat, asam sitrat, asam laktat dengan konsentrasi 0.01 M (pH 2 dan 4) efektif dalam mengurangi OTA dalam limbah anggur dibandingkan dengan asam hidroklorida. Selain itu juga, perlakuan limbah anggur dibawah kondisi asam ini dapat menonaktifkan bakteri dan jamur serta mencegah adanya produksi toksin dalam limbah anggur. Kondisi basa dalam pengurangan OTA dapat menyebabkan adanya konversi dari OTA menjadi lakton OTA (OP-OTA) yang mana ditemukan lebih beracun daripada OTA itu sendiri. OTA berkurang sekitar 90% pada suhu 200°C dalam semua perlakuan (pH 7 dan pH 10) dan sekitar 50% pada pH 10 selama 10 menit (Yu *et al.*, 2020).

Enzymatic treatment menggunakan beberapa jenis enzim seperti karboksipeptidase A (CPA), alkalasem, protease, lipase, dan pepsin untuk mereduksi OTA. Terdapat 1 enzim yang efektif untuk mereduksi OTA berturut-turut yaitu CPA (100%), protease (60%) dan lipase (30%). Proses enzimatik ini dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Persentase yang rendah disebabkan oleh gangguan polifenol, polifenol limbah anggur berfungsi sebagai inhibitor dalam menghambat aktivitas berbagai enzim hidrolitik seperti protease, lipase dan karbohidrat. Setiap perlakuan yang diberikan pada limbah anggur mungkin tidak efektif dalam mengurangi OTA, oleh karena itu diperlukan kombinasi perlakuan seperti *thermal pressure*, *acid* dan *enzymatic treatment* untuk mengurangi OTA (Yu *et al.*, 2020).

4.6. *Trend dan Implikasi*

Perkembangan produk dari bahan alami yang bernilai tinggi semakin banyak beredar dipasaran. Salah satunya adalah bahan yang berasal dari pemanfaatan limbah buah anggur yang dijadikan sebagai ekstrak dan bubuk anggur. Limbah buah anggur yang terdiri dari kulit, biji dan tangkai anggur memiliki banyak sekali senyawa fenolik yang sangat bermanfaat. Senyawa-senyawa tersebut tentunya dapat dipisahkan dengan menggunakan metode ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan terdiri dari konvensional dan non-konvensional. Metode konvensional merupakan metode ekstraksi yang paling sering/umum digunakan dibandingkan dengan metode non-konvensional. Setiap metode tentunya memiliki beberapa kelemahan dan kelebihan. Salah satu kelemahan dari metode konvensional adalah tidak ramah lingkungan. Berbeda dengan metode non-konvensional. Sampel yang diuji dapat dipersiapkan dan dilakukan proses *pre-treatment*. Proses *pre-treatment* seperti pengeringan, pendinginan ataupun *thermal pressure processing* dan *acid/enzyme treatment* dapat mengurangi keberadaan mikotoksin pada *grape pomace* seperti ochratoxin A (OTA).

Penerapan *green extraction* atau *green chemistry concept* sangat diperlukan dalam mengembangkan produk bernilai tinggi dari limbah anggur. Hal itu tentunya didukung dengan metode yang ramah lingkungan. *Green chemistry concept* terdiri dari UAE, MAE dan PEF. Penggunaan metode non-konvensional bertujuan untuk mendapatkan senyawa fenolik dari kulit dan biji anggur yang bermanfaat sebagai antioksidan, antikanker, antibakteri, anti inflamasi. Selain ramah lingkungan, metode ini juga membutuhkan waktu lebih singkat dibandingkan dengan metode konvensional. Alih-alih menggunakan metode konvensional, metode non-konvensional dapat dijadikan sebagai alternatif dalam melakukan proses ekstraksi. Salah satu metode ekstraksi non-konvensional yang telah diterapkan dalam skala industri adalah *pulsed electric field* (PEF) (Soto *et al.*, 2015). Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut dalam penggunaan metode non-konvensional dengan *pre-treatment* untuk mengurangi keberadaan ochratoxin A (OTA) dalam limbah anggur dan prospek penerapan teknologi ekstraksi dengan pelarut yang tidak beracun didukung dengan biaya yang rendah agar dapat diimplementasikan dalam skala industri.