

BAB III DASAR TEORI

3.1 Tanaman Kubis Ungu

Tanaman kubis (*Brassica oleracea*) bentuk capitata merupakan tumbuhan yang berasal dari famili Brassicaceae atau Cruciferae (Majeed, 2004). Bentuk capitata menghasilkan kubis ungu maupun kubis putih. Nama latin kubis ungu yaitu *Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Kubis ungu dapat ditanam di dataran tinggi maupun dataran rendah dengan rata-rata curah hujan 850-900 mm dan umur panen berbeda-beda berkisar dari 90 hari sampai 150 hari. Kubis dapat diperbanyak melalui biji atau setek tunas (Dalimartha, 2000). Kubis ungu memiliki nama lain dari berbagai negara, diantaranya yaitu *Rode Kool* di Belanda, *Suitkoll* di Afrika, di Perancis dikenal sebagai *Chou Cobus*, di Jerman sebagai *Kopfkohl* dan *Purple* atau *Red Cabbage* di Inggris (Heyne, 1987).

3.1.1 Klasifikasi

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Capparales
Suku	: Brassicaceae
Marga	: Brassica
Spesies	: <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L. (Majeed, 2004).



Gambar 1. Kubis Ungu

3.1.2 Morfologi

Tumbuhan kubis memiliki daun berbentuk bulat, oval, sampai lonjong, membentuk roset akar yang besar dan tebal, serta warna daun bermacam-macam, antara lain putih (*forma alba*), hijau (*forma viridis*) dan merah keunguan (*forma rubra*). Pada awalnya daun berlapis lilin tumbuh lurus, daun-daun berikutnya tumbuh membengkok dan menutupi daun-daun muda yang terakhir tumbuh. Pertumbuhan daun terhenti dengan ditandai terbentuknya krop atau telur (kepala) dan krop samping pada kubis tunas (*Brussel sprouts*). Krop adalah susunan daun yang sangat rapat membentuk bulatan atau bulatan pipih. Selanjutnya, krop tersebut akan pecah dan keluar malai bunga yang bertangkai panjang, bercabang-cabang, berdaun kecil-kecil, mahkota tegak dan berwarna kuning. Buahnya polong berbentuk silindris dengan panjang 5-10 cm dan berbiji banyak. Adapun bijinya berdiameter 2-4 mm, berwarna coklat kelabu dan berakar serabut (Dalimartha, 2000).

3.1.3 Kandungan Kubis Ungu

Tanaman kubis ungu biasa digunakan sebagai pewarna alami di berbagai produk, mempunyai serat diet yang cukup tinggi dalam membantu pencegahan kanker kolon, kolesterol, diabetes dan obesitas. Mengonsumsi jus kubis ungu juga dapat membantu memperbaiki lapisan lambung dan mengobati ulkus (Dragichi, 2013). Kubis ungu memiliki kandungan karbohidrat, protein, glikosida, flavonoid, fenol (Shama, et al., 2012), air, lemak, karbohidrat, serat, kalsium, fosfor, besi, natrium, kalium, vitamin (A, C, E), dan beta karoten (Dalimartha, 2000). Selain itu, dalam kubis ungu juga terdapat senyawa yang termasuk golongan flavonoid yaitu antosianin yang berperan dalam berbagai warna merah dan biru pada tanaman (Harbone, J.B., 1987). Antosianin yang terdapat pada kubis ungu biasanya dalam bentuk glukosidanya (Park et al, 2014). Molekul pigmen ini tersimpan dalam sel-sel daun kubis ungu, ketika terkena panas selama memasak atau proses perebusan, sel-sel mengandung antosianin terbuka yang menyebabkan pigmen warna larut dalam pelarut (Cabrita, I., 1999). Warna diberikan oleh antosianin berasal dari susunan rangkap terkonjugasinya yang panjang. Sistem ikatan rangkap terkonjugasi ini mampu menjadikan antosianin sebagai antioksidan dengan mekanisme

penangkapan radikal bebas (Welch, et al., 2008). Pigmen antosianin bersifat larut dalam air (Robinson, 1995; Dragichi, et al., 2013). Hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap khasiat kubis ungu yaitu ekstrak metanol sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Rokayya, et.al., 2013). Kandungan gizi dalam setiap 100 gram kubis ungu dapat dilihat pada Tabel 1.

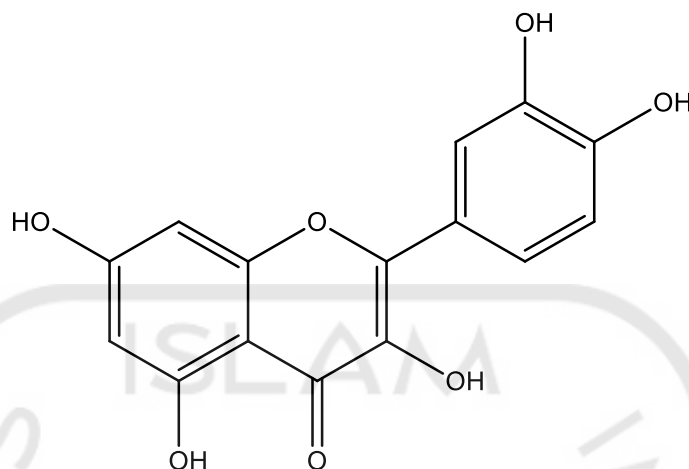
Tabel 1. Kandungan Gizi dalam Setiap 100 gram Kubis Ungu

No.	Kandungan Gizi	Jumlah
1.	Protein	1,4 gr
2.	Karbohidrat	5,3 gr
3.	Lemak	0,2 gr
4.	Kalsium	46 mg
5.	Fosfor	31 mg
6.	Zat Besi	1 mg
7.	Vitamin A	80 IU
8.	Vitamin B1	0,06 mg
9.	Vitamin C	50 mg

Sumber : Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Indonesia 2016

3.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman (Rajalakshmi dan S. Narasimhan, 1985). Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C6-C3-C6 (White dan Y. Xing, 1951; Madhavi et al., 1996; Maslarova, 2001). Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya. Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (Cook dan S. Samman, 1996). Salah satu kelompok senyawa flavonoid adalah Quersetin yang memiliki lima gugus hidroksil yang mampu meredam radikal bebas DPPH (Rahayu et al., 2014). Struktur Quersetin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kerangka Golongan Flavonoid (Quersetin) (Robinson, 1995)

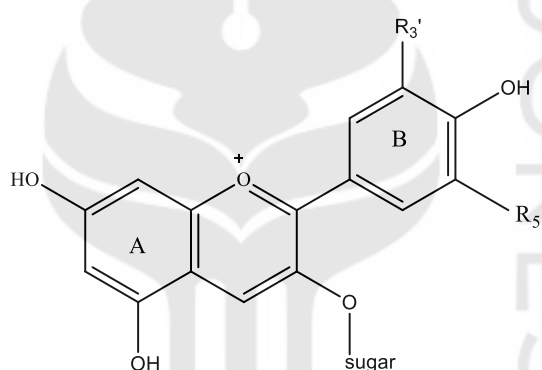
Flavonoid terdapat dalam tumbuhan yaitu sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam suatu jaringan tumbuhan. Sebagian besar flavonoid alam ditemukan dalam bentuk glikosida, yang mana unit flavonoid tersebut terikat pada satu gula. Glikosida adalah kombinasi antara suatu gula dan suatu alkohol yang saling berikatan melalui ikatan glikosida (Lenny, 2006). Flavonoid dapat ditemukan sebagai mono, di atau triglikosida (Achmad, 1986). Flavonoid yang berupa glikosida merupakan senyawa polar sehingga dapat diekstrak dengan etanol, metanol maupun air.

Kelompok senyawa flavonoid seperti antosianin merupakan salah satu kelompok bahan alam pada tumbuhan yang berperan sebagai antioksidan, antimikroba, antialergi, antivirus dan antiinflamasi (Pietta, 2000). Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang mampu mentransfer sebuah elektron atau sebuah atom hidrogen ke senyawa radikal bebas dengan menghentikan tahap awal reaksi. Selain itu juga dapat melalui kemampuannya mengkhelat logam, baik dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Cuppert et al., 1954). Oleh karena itu, flavonoid dapat menghambat peroksidasi lipid dan menekan kerusakan jaringan oleh radikal bebas.

3.3 Antosianin

Antosianin adalah pigmen yang memberikan warna merah keunguan pada sayuran, buah-buahan dan tanaman bunga dan termasuk golongan senyawa

flavonoid yang dapat melindungi sel dari sinar ultraviolet. (Astawan dan Kasih, 2008). Sebagian besar antosianin alami adalah glikosida (pada kedudukan 3-atau 3,5-) dari sejumlah terbatas antosianidin (Sastrohamidjojo, 1996). Antosianin merupakan gugus glikosida yang dibentuk dari gugus aglikon dan glikon. Apabila gugus glikon dihilangkan melalui proses hidrolisis maka akan dihasilkan antosianidin. Struktur dasar antosianin adalah 2-phenylbenzo pyrylium (Brouillard, 1982) yang dapat dilihat pada Gambar 3. Struktur utama turunan benzo pyrylium ditandai adanya dua cincin aromatik benzena (C_6H_6) yang dihubungkan dengan tiga atom karbon yang membentuk cincin. Gugus gula pada antosianin, biasanya berupa glukosa, ramnosa, silosa, galaktosa, arabinosa, dan fruktosa (Ozela et al., 2007). Molekul gula antosianin umumnya berupa monosakarida dan terikat pada C-3.



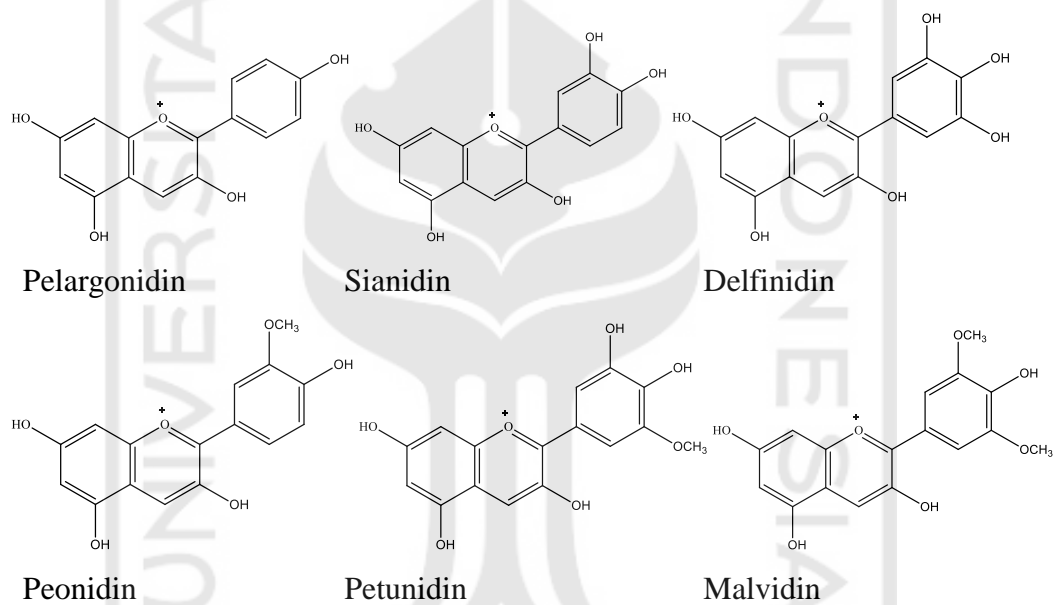
Gambar 3. Struktur dasar antosianin (Brouillard, 1982)

Keterangan : R_3' dan R_5' : gugus substitusi

Molekul antosianin diketahui memiliki berbagai bentuk antosianin yang ditemukan di alam, tetapi hanya enam yang memegang peranan penting dalam bahan pangan, yaitu sianidin, malvidin, petunidin, pelargonidin, delphinidin, dan peonidin (Brouillard, 1982). Pada setiap kation flavilium (Gambar 3) terdapat molekul yang berperan sebagai gugus substitusi yang dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 4. Berbagai bentuk struktur kimia antosianin secara umum hanya berbeda pada gugus alkil (-R) seperti pada Gambar 3.

Tabel 2. Gugus Substitusi pada Antosianidin

Struktur antosianidin	Gugus substitusi pada atom karbon nomor	
	R3'	R5'
Pelargonidin	H	H
Sianidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Peonidin	OCH3	H
Petunidin	OH	OCH3
Malvidin	OCH3	OCH3



Gambar 4. Bentuk-Bentuk Struktur Antosianidin (Brouillard, 1982)

Senyawa antosianin tergolong pigmen dan pembentuk warna pada tanaman yang ditentukan oleh pH dari lingkungannya (Diyar, 2009). Antosianin memiliki sifat mudah larut dalam air dan merupakan suatu gugusan glikosida yang terbentuk dari gugus aglikon dan glikon (Markakis, 1982). Apabila gugus glikon dihilangkan melalui hidrolisis maka dihasilkan antosianidin yang berwarna merah di lingkungan asam, biru di lingkungan basa dan warna ungu di lingkungan netral (Francis, 1982; Cit Kristie, 2008). Antosianin kurang stabil dalam larutan netral atau basa (Harbone, 1987).

Ditinjau dari kestabilan antosianin maka antosianin secara umum mempunyai stabilitas rendah. Salah satu faktor fisik yang dapat mempengaruhi stabilitas antosianin adalah suhu pemanasan (Francis 1989; Elbe & von Schwartz 1996; Jackman & Smith 1996). Pada pemanasan yang tinggi, kestabilan dan ketahanan antosianin akan berubah dan mengakibatkan kerusakan. Selain mempengaruhi warna antosianin, pH juga mempengaruhi stabilitasnya, dimana dalam suasana asam akan berwarna merah dan dalam suasana basa berwarna biru.

Keberadaan beberapa enzim seperti *glucosidase* dan polifenol oksidase (PPO) diketahui merupakan salah satu faktor pendukung degradasi antosianin. Enzim *glucosidase* secara langsung menyerang antosianin dengan cara menghidrolisis ikatan antara gugus aglikon dengan gugus glikon. Hal ini menyebabkan cincin aromatik antosianin terbuka menjadi senyawa kalkon yang tidak berwarna. Sedangkan enzim PPO tidak secara langsung menyerang antosianin. Enzim ini mengoksidasi senyawa fenolik menjadi o-benzoquinon kemudian dapat mengalami kondensasi dengan antosianin sehingga antosianin terdegradasi menjadi senyawa tidak berwarna (kalkon).

Antosianin memiliki fungsi fisiologis yaitu sebagai antioksidan, perlindungan terhadap sel-sel hati (Kumalaningsih dan Suprayogi, 2006). Antosianin bermanfaat bagi kesehatan tubuh yakni sebagai antioksidan, antihipertensi, dan pencegah gangguan fungsi hati, jantung koroner, kanker, dan penyakit degeneratif, seperti aterosklerosis. Antosianin juga dapat menghalangi laju kerusakan sel radikal bebas akibat nikotin, polusi udara, dan bahan kimia lainnya.

3.4 Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid (Kochner dan Rosseli, 1990). Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya pada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Secara alami sistem antioksidan tubuh sebagai mekanisme perlindungan terhadap serangan radikal bebas telah ada dalam tubuh. Akan tetapi, seiring dengan bertambahnya usia maka kemampuan tubuh untuk memproduksi antioksidan alami (internal) akan semakin berkurang.

Penggunaan senyawa antioksidan juga antiradikal saat ini semakin luas seiring dengan semakin besarnya pemahaman masyarakat tentang peranannya dalam menghambat penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, arteriosklerosis, kanker, serta gejala penuaan. Antioksidan memiliki kemampuan sebagai penghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas yang reaktif (Tahir, et al., 2003). Antioksidan alami secara toksikologi lebih aman dikonsumsi dan lebih mudah diserap oleh tubuh daripada antioksidan sintesis (Madhavi, et al., 1996).

Pengelompokan antioksidan berdasarkan enzimatis dan non enzimatis, yaitu :

1. Antioksidan enzimatis

Misalnya enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathione peroksidase

2. Antioksidan non enzimatis

Antioksidan ini dibagi menjadi 2 kelompok :

a. Antioksidan larut lemak

Seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin

b. Antioksidan larut air

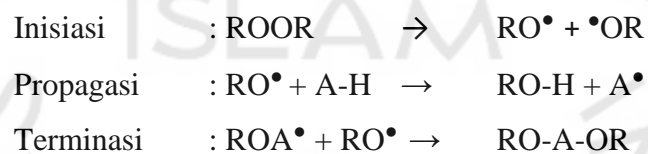
Seperti asam askorbat, protein pengikat logam

Kerusakan oksidatif atau kerusakan akibat radikal bebas dalam tubuh pada dasarnya bisa diatasi oleh antioksidan endogen seperti enzim *catalase*, *glutathione peroxidase*, *superoxide dismutase*, dan *glutathione S-transferase*. Tetapi jika senyawa radikal bebas dalam tubuh melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler, maka dibutuhkan antioksidan tambahan dari luar atau antioksidan eksogen untuk menetralkan radikal yang terbentuk (Reynertson, 2007).

Menurut Gordon (1990), antioksidan mempunyai dua fungsi berdasarkan mekanisme kerja. Antioksidan, pertama berfungsi sebagai pemberi hidrogen. Antioksidan (AH) yang memiliki fungsi tersebut disebut juga sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid (R^\bullet , ROO^\bullet) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara hasil reaksi radikal antioksidan (A^\bullet) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding dengan radikal lipid. Fungsi kedua yaitu antioksidan merupakan antioksidan sekunder yang berfungsi untuk memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme

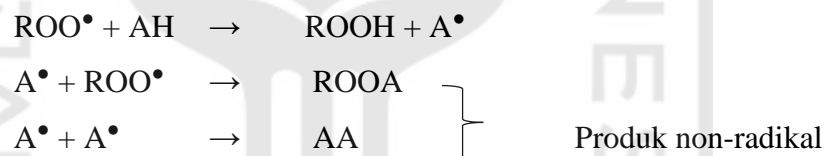
pemutusan rantai oksidasi di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi. Hal ini merupakan perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil.

Radikal-radikal antioksidan (A^\bullet) yang terbentuk pada reaksi autooksidasi relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru seperti Gambar 5 (Gordon, 1990).



Gambar 5. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida

Autooksidasi dapat dihambat dengan menambahkan antioksidan (AH) dalam konsentrasi rendah yang dapat berasal dari penginterferensian rantai propagasi atau inisiasi. Radikal-radikal antioksidan dapat saling bereaksi membentuk produk non-radikal seperti pada Gambar 6 (Hamilton, 1994).



Gambar 6. Reaksi Penghambatan antioksidan antar radikal antioksidan

3.5 Fermentasi Ragi Tempe (*Rhizopus oligosporus*)

Fermentasi merupakan suatu proses metabolik untuk menghasilkan senyawa-senyawa organik tanpa melibatkan agen pengoksidasi eksogen (Bourdichon et al., 2012). Fermentasi dapat diartikan sebagai teknik kuno untuk pengawetan makanan dan dianggap sebagai proses bioteknologi yang sederhana, alami, dan berharga. Keuntungan teknologi ini adalah mempertahankan dan atau meningkatkan nutrisi, sensori, dan sifat umur simpan dari produk makanan nabati (Hunaefi et al, 2013).

Fermentasi merupakan proses penguraian kimia secara aerob dan anaerob dengan menggunakan mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk (Buffaloe & Ferguson, 1981). Mikroorganisme yang biasa digunakan yaitu bakteri, kapang dan khamir. Menurut Buckle et al. (1985), mikroorganisme tersebut mampu menghasilkan enzim hidrolitik yang mampu menghidrolisis komponen kompleks

menjadi komponen yang sederhana. Mikroorganisme yang berbeda akan menghasilkan produk yang berbeda.

Inokulum jamur dalam pembuatan tempe umumnya disebut dengan laru atau ragi tempe. Salah satu jenis jamur yang sering dijumpai dalam ragi tempe adalah *Rhizopus oligosporus*. *Rhizopus oligosporus* banyak terdapat di alam karena hidupnya bersifat saprofit (Shurtleff & Aoyogi, 1979). Jenis jamur lainnya seperti *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* dan *Rhizopus arrhizus* juga sering ditemui dalam kultur campuran ragi tempe (Iskandar, 2002). Winarno et al (2017) juga menyebutkan bahwa spesies kapang *Rhizopus* yang berada dalam tempe yakni *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus* dan *Rhizopus stolonifer*, namun *Rhizopus oligosporus* diketahui sebagai kapang yang paling sesuai untuk pembuatan tempe.

Kedudukan taksonomi kapang *Rhizopus oligosporus* menurut Lendecker & Moore (1996) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Fungi
 Divisio : Zygomycota
 Kelas : Zygomycetes
 Ordo : Mucorales
 Famili : Mucoraceae
 Genus : *Rhizopus*
 Spesies : *Rhizopus oligosporus*

Persyaratan tempat yang dipergunakan untuk inkubasi (fermentasi) kedelai adalah kelembaban, kebutuhan oksigen dan suhu yang sesuai dengan pertumbuhan jamur (Hidayat, et al., 2006). Menurut Sorenson dan Hesseltine (1986) dalam Pangastuti (1996), secara umum jamur dalam pertumbuhannya juga membutuhkan air, tetapi kebutuhan air jamur lebih sedikit dibandingkan bakteri.

Bahan pembungkus tempe dari daun atau plastik dan biasanya diberi lubang-lubang dengan cara ditusuk-tusuk. Hal tersebut dikarenakan kapang tempe memerlukan oksigen dalam pertumbuhannya (Hermana dan Karmini, M., 1999). Oksigen diperlukan dalam pertumbuhan kapang, tetapi bila berlebihan dan tak seimbang dengan pembuangnya (panas yang ditimbulkan menjadi lebih besar dari

pada panas yang dibuang dari bungkus). Jika hal ini terjadi maka suhu kedelai yang sedang difermentasi menjadi tinggi dan mengakibatkan kapangnya mati (Hayati, 2009).

Untuk pertumbuhannya kapang tempe memerlukan suhu antara 25-30 °C (suhu kamar). Oleh karena itu suhu ruang fermentasi harus diperhatikan dan memiliki ventilasi yang cukup. Derajat keasaman (pH) mempengaruhi keberhasilan fermentasi. Kondisi pH optimum selain berfungsi sebagai syarat kapang untuk tumbuh, juga diperlukan untuk mencegah tumbuhnya mikroba lain selama fermentasi. Kisaran pH optimum untuk aktivitas enzim yang dihasilkan oleh kapang adalah berkisar 5-7, tetapi masih dapat hidup pada pH 3-8,5 (Fardiaz, 1992). Oleh karena itu kestabilan udara (oksigen), suhu dan pH dalam ruang fermentasi menentukan keberhasilan proses fermentasi tempe (Pusbangtepa, 1982).

Telah dilakukan penelitian oleh Hunaefi et al (2013), tentang pengaruh fermentasi terhadap sifat antioksidan kubis ungu dengan variasi fermentasi alami dan diinokulasi dengan dua jenis bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 dan *Lactobacillus acidophilus*, NCFM) yang dibandingkan dengan kubis ungu tanpa fermentasi. Dari penelitian dihasilkan jumlah total fenolik kubis merah yang diinokulasi dengan *Lactobacillus Plantarum* dan *Lactobacillus Acidophilus* sedikit meningkat sampai hari ke 7 fermentasi. Dan juga menunjukkan bahwa fermentasi dapat menyebabkan kerusakan pada struktur dinding sel kubis merah yang mana merupakan konstituen fenolik terikat, sehingga mengarah pada pembebasan dan atau sintesis dari berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi mengakibatkan peningkatan aktivitas antioksidan.

Fleschhut et al (2006) menyatakan bahwa senyawa antosianin dapat diubah menjadi antosianidin (bentuk aglikon dari antosianin) oleh enzim yang disebut dengan β -glucosidase (BGS). Menurut Kahkonen dan Heinonen (2003), bahwa aglikon dari antosianin lebih ampuh daripada bentuk glikosilasi (antosianin) kaitannya dengan aktivitas antioksidan. Penelitian oleh Chaiyasut et al (2017) menunjukkan bahwa antosianin pada bekatul beras hitam difermentasi oleh *Saccaromyces cerevisiae* karena mengandung enzim β -glucosidase. *Saccharomyces cerevisiae* diketahui memiliki aktivitas β -glucosidase yang baik

(Delcroix et al, 1994). Hasil yang diperoleh yakni terjadi peningkatan terhadap aktivitas antioksidan setelah 24 jam fermentasi.

Selain *Saccharomyces cerevisiae*, kapang golongan *Rhizopus* sp juga mempunyai kemampuan menghasilkan enzim β -glucosidase. Kapang *Rhizopus* sp berperan penting dalam proses pembuatan fermentasi tempe. Selama proses fermentasi kedelai berlangsung menjadi tempe, *isoflavon glucosidase* dikonversi menjadi isoflavon aglikon oleh enzim β -glucosidase yang disekresikan oleh mikroorganisme. Selain terdapat di dalam kedelai, enzim ini juga diproduksi oleh mikroorganisme selama proses fermentasi berlangsung dan mampu memecah ikatan glukosida menjadi aglikon dan gugus gula (Ewan et al., 1992).

3.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan senyawa metabolit sekunder dengan bantuan pelarut. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam berbagai golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Dengan diketahui senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut yang akan digunakan untuk ekstraksi secara tepat (Ditjen POM, 2000). Prinsip dasar ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam pelarut non polar (Harbone, 1987). Hal tersebut sesuai dengan kaidah *like dissolved like* yang artinya suatu senyawa akan larut dalam pelarut dengan tingkat kepolaran yang sama. Ekstraksi akan lebih cepat dilakukan pada suhu tinggi, tetapi dalam hal ini beberapa komponen senyawa yang tidak stabil terhadap panas maka akan mengalami kerusakan (Harbone, 1987). Menurut Ahmad (2006), terdapat beberapa aspek yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut antara lain :

1. Selektifitas, yaitu pelarut hanya melarutkan komonen target yang diinginkan dan bukan komonen lain.
2. Kelarutan, yaitu kemampuan pelarut untuk melarutkan ekstrak yang lebih besar dengan sedikit pelarut.
3. Toksisitas, yaitu pelarut tidak beracun.
4. Penguapan, yaitu pelarut yang digunakan mudah diuapkan.
5. Ekonomis, yaitu harga pelarut relatif murah.

Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Metode ekstraksi paling sederhana adalah maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik pada suhu ruangan. Dengan perendaman sampel maka akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang digunakan (Darwis, 2000). Metode ini dapat menghasilkan ekstrak dalam jumlah banyak serta terhindar dari perubahan kimia senyawa-senyawa tertentu karena pemanasan (Pratiwi, 2009).

Antosianin dalam kubis ungu dapat diekstraksi menggunakan pelarut polar. Hal tersebut dikarenakan antosianin bersifat polar sehingga dapat larut dengan baik dalam pelarut polar (Wijaya, Widjanarko dan Susanto, 2001).

3.7 Radikal Bebas

Para ahli biokimia menyebutkan bahwa radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Menurut Winarti (2010), radikal bebas adalah atom, molekul atau senyawa yang dapat berdiri sendiri yang mempunyai elektron tidak berpasangan, oleh karena itu bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Elektron yang tidak berpasangan selalu berusaha untuk mencari pasangan baru, sehingga mudah bereaksi dengan zat lain (protein, lemak maupun DNA) dalam tubuh. Radikal bebas terjadi secara terus menerus di dalam tubuh. Hal ini terjadi melalui proses metabolisme sel normal, proses peradangan, kekurangan nutrisi, maupun sebagai respons adanya radiasi gama, ultraviolet (UV), polusi lingkungan dan asap rokok (Wijaya, 1996).

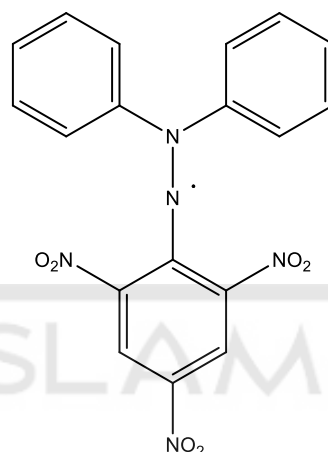
Radikal bebas bersifat reaktif, dan jika tidak dinaktifkan akan dapat merusak makromolekul pembentuk sel, yaitu protein, karbohidrat, lemak, dan asam nukleat, sehingga dapat menyebabkan penyakit degeneratif. Kerusakan sel akibat reaktivitas senyawa radikal mengawali timbulnya berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, infeksi, penyakit jantung koroner, rematik, penyakit respiratorik, katarak, liver dan (Wijaya, 1996; Meydani, 2000).

Sumber radikal bebas bisa berasal dari dalam tubuh (endogen) maupun dari luar tubuh (eksogen). Secara endogen, sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, radikal bebas yang terbentuk dan berpengaruh di dalam sel (intrasel) maupun ekstrasel. Secara eksogen, radikal bebas berasal dari pencemaran lingkungan, asap kendaraan, bahan tambahan makanan dan rokok (Rice Evan et al., 1991; Halliwell, 1994). Radikal bebas yang sangat berbahaya pada makhluk hidup antara lain:

1. Golongan radikal hidroksil (OH^\cdot)
2. Superoksida (O_2^\cdot)
3. Nitrogen monoksida (NO)
4. Peroksidal (RO_2)
5. Peroksinitrit (ONOO^\cdot)
6. Asam hipoklorit (HOCl)
7. hidrogen peroksida (H_2O_2) (Silalahi, 2006).

3.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Analisis aktivitas penangkapan radikal bebas menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). DPPH adalah radikal bebas stabil berwarna ungu yang digunakan secara luas dalam pengujian kemampuan penangkapan radikal bebas dari beberapa komponen alam seperti komponen fenolik, antosianin atau ekstrak kasar (Pezzuto, 2002 dalam Yuswantina, 2009). DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Metode DPPH ini dipilih karena metode ini sederhana, mudah, cepat peka, dan hanya memerlukan sedikit sampel (Molyneux, 2004). Struktur DPPH dapat dilihat pada Gambar 7.



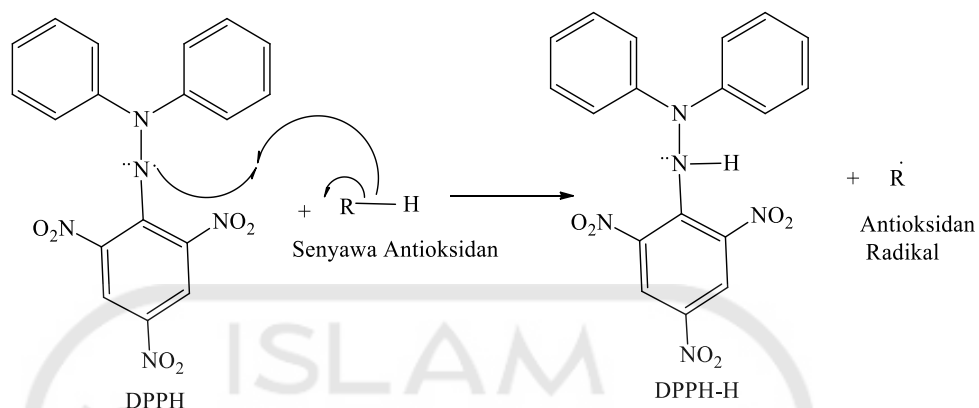
Gambar 7. Struktur DPPH

Fungsi metode DPPH yaitu untuk mengukur elektron tunggal seperti transfer hidrogen sekaligus mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas (Yuswantina, 2009). Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer, dan diplotkan terhadap konsentrasi. Penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH. Hal ini dapat terjadi apabila adanya penangkapan satu elektron oleh zat antioksidan, menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi (Sudjadi, 1986).

Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi, dapat disebabkan oleh empat macam mekanisme reaksi yaitu:

- a. Pelepasan hidrogen dari antioksidan
- b. Pelepasan elektron dari antioksidan
- c. Adisi asam lemak ke cincin aromatik pada antioksidan
- d. Pembentuk senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan

Mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi radikal DPPH dengan Antioksidan (Windono et al., 2001)

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau Efficient Concentration (EC50) atau Inhibitory Concentration (IC50) yaitu konsentrasi zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi zat antioksidan yang memberikan persen peredaman sebesar 50%. Suatu zat yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi akan memiliki harga EC50 atau IC50 yang rendah (Molyneux, 2004). Perhitungan nilai konsentrasi efektif atau IC50 menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Antioksidan} = \frac{Ac - A}{Ac} \times 100\%$$

Keterangan :

Ac = Nilai absorbansi kontrol

A = Nilai absorbansi sampel

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC50 kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100-150), dan lemah (151-200). Semakin kecil nilai IC50 semakin tinggi aktivitas antioksidan (Badarinath, 2010)

3.9 Spektrofotometer Uv-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah metode pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektrum UV-Vis mempunyai bentuk yang lebar dan hanya sedikit mengenai informasi struktur yang bisa diperoleh dari spektrum ini. Tetapi spektrum ini sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Sinar Ultraviolet memiliki panjang gelombang antara 200-400 nm sementara sinar tampak memiliki panjang gelombang 400-800 nm (Dachriyanus, 2004).

Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan linearitas antara absorban dengan konsentrasi analit dan berbanding terbalik dengan transmitan. Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam persamaan berikut (Rohman, 2007):

$$A = a.b.c$$

Keterangan:

- A = absorban
- a = absorpsivitas molar
- b = tebal kuvet (cm)
- c = konsentrasi

Salah satu syarat senyawa dapat dianalisis menggunakan spektrofotometri adalah karena senyawa tersebut mengandung gugus kromofor. Kromofor merupakan gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet dan tampak, jika diikat oleh gugus aoksokrom. Hampir semua kromofor memiliki ikatan rangkap berkonjugasi (diena (C=C-C=C), dienon (C=C-C=O), benzena dan lain-lain. Aoksokrom adalah gugus fungsional yang memiliki elektron bebas, seperti –OH, NH₂, NO₂, -X (Harmitta, 2006).

Menurut Henry (2002), komponen-komponen spektrofotometer UV-Vis antara lain:

1. Sumber cahaya, untuk memancarkan radiasi yang stabil dengan intensitas yang tinggi. Sumber cahaya pada spektrofotometer UV-Vis ada dua macam yaitu lampu deuterium (hidrogen) untuk pengukuran daerah ultraviolet dan lampu tungsten (wolfram) untuk daerah visibel.
2. Monokromator, alat untuk memecah cahaya dengan panjang gelombang tertentu menjadi cahaya tunggal.
3. Kuvet, tempat untuk menaruh sampel yang akan dianalisis.
4. Detektor, untuk menangkap sinar yang diteruskan oleh suatu larutan.
5. Visual Display atau recorder, untuk membaca besarnya absorban pada suatu larutan.

3.10 Karakterisasi menggunakan HPLC

HPLC adalah kependekan dari *High Performance Liquid Chromatography* yang dalam bahasa Indonesia menjadi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau “KCKT”. Prinsip kerja HPLC ini adalah pemisahan dengan teknik kromatografi. Kromatografi dapat diartikan sebagai cara pemisahan berdasarkan partisi sampel antara fasa diam dan fasa bergerak. Pada HPLC, sistem kromatografi yang dipakai adalah cair-padat, fasa bergerak (*mobile phase*) berupa cairan yakni pelarut dan fasa diam (*stationer phase*) berupa padatan yakni adsorban yang terdapat dalam kolom analitik (Stahl, 1985; Harbone, 1987).

Sistem operasional HPLC dibedakan menjadi 2 yaitu sistem isokratik dan sistem gradien. Sistem isokratik (berkelanjutan) merupakan sistem yang paling sederhana dengan perlengkapan minimum, karena hanya dilengkapi dengan satu pompa maka hanya dimungkinkan memakai satu reservoir, oleh karena itu jika akan memakai pelarut campuran, maka harus dicampurkan terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke reservoir yakni pencampuran manual.

Sedangkan sistem gradien (berubah per satuan waktu) bisa dilakukan pada HPLC yang dilengkapi dengan 2 buah pompa. Dengan adanya 2 pompa, pemakaian campuran pelarut dapat diprogram perbandingannya, sehingga dimungkinkan memakai perbandingan yang berbeda sepanjang analisis dan variasi kecepatan aliran pelarut dapat diatur sesuai kebutuhan (Willard, 1988).

Untuk memperoleh pemisahan yang baik penentuan fase diam dan fase gerak yang tepat sangat diperlukan Berikut ini jenis-jenis HPLC yang sering digunakan dalam analisis yaitu :

a. Kromatografi Fase Normal

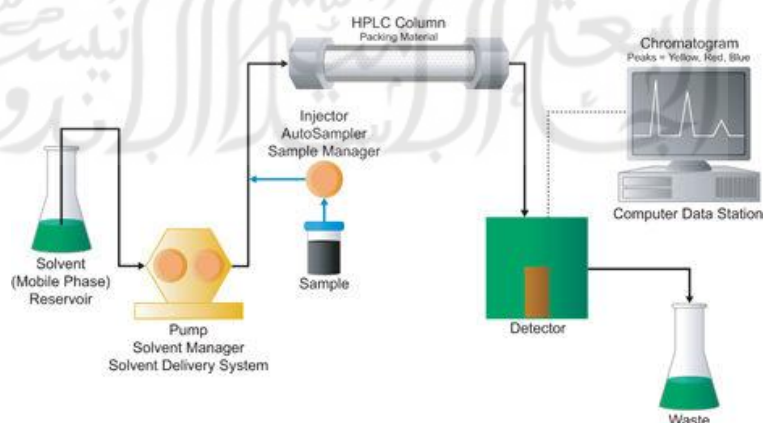
Disebut juga sebagai *Normal Phase HPLC (NP-HPLC)*, dimana pemisahannya didasarkan pada kepolaran. Metode ini menggunakan fase diam yang bersifat polar contohnya alumina atau silika tidak termodifikasi dan fase gerak bersifat non polar seperti heksana. Dan sampel yang cenderung polar akan berinteraksi dan tertahan pada fase diam polar. Modifier dapat ditambahkan untuk mengontrol waktu retensi, umumnya bersifat polar serta dapat memperpendek waktu retensi.

Jika semakin tinggi kepolaran suatu sampel, maka semakin kuat interaksinya dengan fase diam polar. Sehingga meningkatkan waktu elusi (Malvia, 2010).

b. Kromatografi Fase Terbalik

Fase terbalik atau *Reversed phase HPLC (RP-HPLC atau RPC)*. Dimana pemisahannya menggunakan fase diam yang bersifat non polar dan fase gerak polar misalnya adalah air. Fase diam yang biasa digunakan adalah oktadesilsilan (ODS atau C18). Sampel yang memiliki sifat asam lemah atau basa lemah perlu pengaturan pH pada fase gerak. Hal ini dilakukan agar tidak mengalami ionisasi atau protonasi, yang mana dapat mengakibatkan interaksi atau afinitas sampel dengan fase diam menjadi lemah, sehingga tidak akan terpisah sempurna (Malvia, 2010).

Berikut adalah rangkaian komponen pada HPLC dapat dilihat pada Gambar 9.



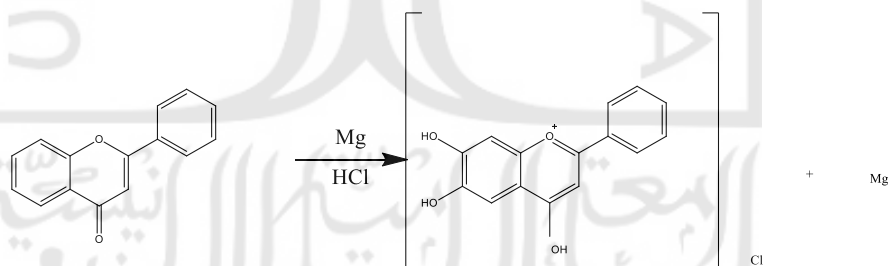
Gambar 9. Rangkaian komponen pada HPLC

3.11 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah suatu cara untuk mengidentifikasi bioaktif yang belum tampak melalui suatu tes atau pemeriksaan yang dapat dengan cepat memisahkan antara bahan alam yang memiliki kandungan fitokimia tertentu dengan bahan alam yang tidak memiliki kandungan fitokimia tertentu. Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan menggunakan suatu pereaksi warna dengan melihat reaksi pengujian warna.

3.11.1 Uji Flavonoid

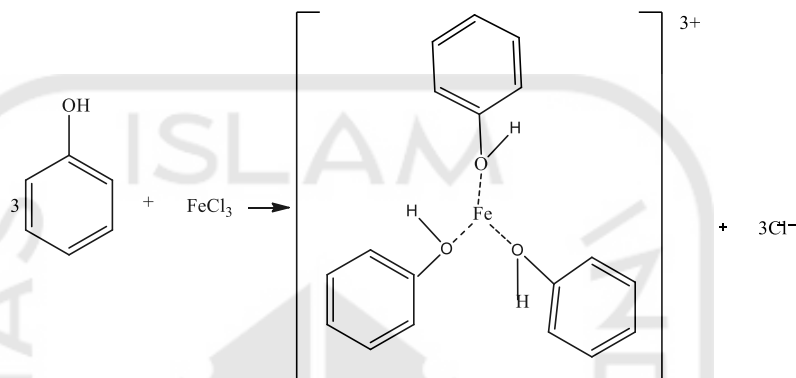
Uji flavonoid salah satunya yaitu metode Wilstater yakni dengan menambahkan HCl pekat dan Mg. Penambahan HCl pekat dimaksudkan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Glikosida berupa gula yang biasa dijumpai yaitu glukosa, galaktosa dan ramnosa. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton (Mariana, 2013). Reaksi antara flavonoid dengan logam HCl dan Mg seperti pada Gambar 10.



Gambar 10. Reaksi Antara Flavonoid dengan Serbuk Mg dan HCl

3.11.2 Uji Fenolik

Isolat ditambahkan larutan FeCl_3 dalam akuades. Reaksi positif jika memberikan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harbone, 1987). Reaksi antara fenolik dengan FeCl_3 seperti pada Gambar 11.



Gambar 11. Reaksi antara fenol dengan FeCl_3 ((Kelly, 2009)

3.12 Hipotesis Penelitian

Dari tinjauan pustaka dan dasar teori yang dijelaskan, dapat di tarik beberapa hipotesa sebagai berikut:

1. Jamur *Rhizopus oligosporus* dalam ragi tempe dapat menghasilkan enzim β -glucosidase (BGS) yang dapat mengkonversi antosianin menjadi antosianidin dalam kubis ungu.
2. Aktivitas antioksidan dalam ekstrak kubis ungu setelah proses fermentasi dengan ragi tempe *Rhizopus oligosporus* dapat lebih meningkat.