

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kubis ungu (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) diperoleh dari minimarket Alfamidi Jalan Kaliurang, Sleman Yogyakarta. Kubis ungu ini seringkali digunakan sebagai pewarna alami di berbagai produk dan biasa disajikan sebagai campuran pada salad. Manfaat kubis ungu diantaranya adalah membantu pencegahan kanker kolon, kolesterol, diabetes dan obesitas (Dragichi, 2013). Hal ini dikarenakan adanya kandungan karbohidrat, protein, glikosida, flavonoid, fenol, air, lemak, serat, kalsium, fosfor, besi, natrium, kalium, vitamin, betakaroten dan antosianin dalam kubis ungu (Shama, et al., 2012; Dalimartha, 2000). Adapun kandungan vitamin dalam kubis ungu meliputi vitamin A, B, C dan E. Warna ungu pada kubis ungu disebabkan adanya pigmen penting yakni antosianin yang berasal dari susunan ikatan rangkap terkonjugasi (Welch, et al., 2008). Antosianin merupakan komponen bioaktif kelompok flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antioksidan (He dan Giusti, 2010). Dalam biokonversi antosianin menjadi antosanidin dan uji aktivitas antioksidan metode DPPH melalui fermentasi kapang *Rhizopus oligosporus*, yang pertama kali dilakukan adalah preparasi sampel kubis ungu (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.).

5.1 Preparasi Sampel

5.1.1 Preparasi Sampel Kubis Ungu Fermentasi

Kubis ungu yang diperoleh dicuci kemudian dipotong dadu kecil-kecil dengan maksud memperluas permukaan dan akan menjadikan waktu kontak dengan ragi tempe nantinya lebih lama sehingga proses fermentasi dapat optimal. Setelah itu potongan kubis direbus pada suhu 35 °C selama 5 menit yang bertujuan untuk menghilangkan kontaminan dan membuka pori-pori dari kubis ungu itu sendiri sehingga proses fermentasi dapat berjalan dengan baik. Penggunaan suhu tersebut dikarenakan jika suhu terlalu tinggi maka dapat menyebabkan antosianin mengalami kerusakan. Tahap berikutnya yaitu penirisan, pendinginan dan pengasatan kubis ungu, hal ini dilakukan untuk mengurangi kadar air dalam kubis ungu sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk yang tidak diinginkan. Selanjutnya yaitu proses fermentasi yakni dengan menambahkan ragi

tempe *Rhizopus oligosporus* pada kubis ungu dan diaduk merata. Tujuan pengadukan yaitu agar ragi dapat tercampur merata dengan kubis ungu sehingga fermentasi dapat berhasil dengan optimal. Setelah penambahan ragi dan dilakukan pengadukan, campuran dimasukkan dalam plastik dan ditusuk-tusuk dengan tujuan agar oksigen dapat masuk dalam plastik. Dikarenakan proses fermentasi dengan ragi tempe *Rhizopus oligosporus* ini membutuhkan oksigen dalam jumlah yang tidak sedikit (mikroaerob). Jika jumlah oksigen berlebihan dan tidak seimbang dengan pembuangannya (panas yang ditimbulkannya menjadi lebih besar daripada panas yang dibuang dari bungkus) maka suhu kubis ungu yang sedang mengalami fermentasi menjadi tinggi dan mengakibatkan kapang mati (Hayati, 2009). Sebaliknya, jika oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan kurang, maka pertumbuhan kapang menjadi terhambat (lambat). Selanjutnya proses fermentasi dilakukan pada suhu ruang, dikarenakan kapang tempe bersifat mesofilik, yaitu untuk pertumbuhannya memerlukan suhu antara 25-30 °C atau suhu kamar (Fardiaz, 1992).

Biokonversi dalam penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan aktivitas dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam kubis ungu. Peningkatan aktivitas tersebut dilakukan menggunakan bantuan mikroorganisme. Fermentasi pada penelitian ini menggunakan ragi tempe dengan jamur yang sering dijumpai yaitu *Rhizopus oligosporus*. Jenis jamur lainnya seperti *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* dan *Rhizopus arrhizus* juga sering ditemui dalam kultur campuran ragi tempe (Iskandar, 2002). Tujuan dari proses fermentasi dalam konteks penelitian ini adalah mengkonversi senyawa antosianin menjadi antosianidin dengan harapan agar aktivitas antioksidan dapat meningkat. Fermentasi kubis ungu dilakukan selama 1 hari, 3 hari dan 5 hari. Variasi waktu tersebut yakni untuk mengetahui pengaruh dari proses fermentasi kubis ungu dengan jarak waktu satu hari terhadap aktivitas antioksidan serta untuk mencari waktu fermentasi yang optimal kaitannya dengan aktivitas antioksidan. Kubis ungu setelah penambahan ragi tempe *Rhizopus oligosporus* dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Kubis Ungu Setelah Dilakukan Penambahan Ragi Tempe *Rhizopus oligosporus*

5.1.2 Preparasi Sampel Kubis Ungu Non Fermentasi

Untuk kubis ungu non fermentasi, preparasi sampel hampir sama dengan yang fermentasi yaitu kubis ungu dipotong dadu kecil-kecil untuk memperluas permukaan sampel sehingga dalam proses ekstraksi didapatkan senyawa yang diinginkan secara maksimal. Setelah itu dilakukan perebusan selama 5 menit, perebusan pada perlakuan non fermentasi ini bertujuan agar perlakuan awal sampel kubis ungu yang difermentasi dengan non fermentasi sama. Kemudian dilakukan penirisan dan pendinginan sampel kubis ungu. Kali ini merupakan perlakuan tanpa adanya fermentasi sehingga tahap selanjutnya sampel kubis ungu langsung masuk proses ekstraksi yakni pengambilan senyawa tertentu dalam suatu sampel. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol teknis 96 %. Perlakuan ini bertujuan untuk perbandingan antara hasil aktivitas antioksidan kubis ungu non fermentasi dan terfermentasi sehingga dapat diketahui perlakuan mana yang dapat memiliki hasil aktivitas antioksidan terbaik. Kubis ungu non fermentasi dapat dilihat pada Gambar 13.

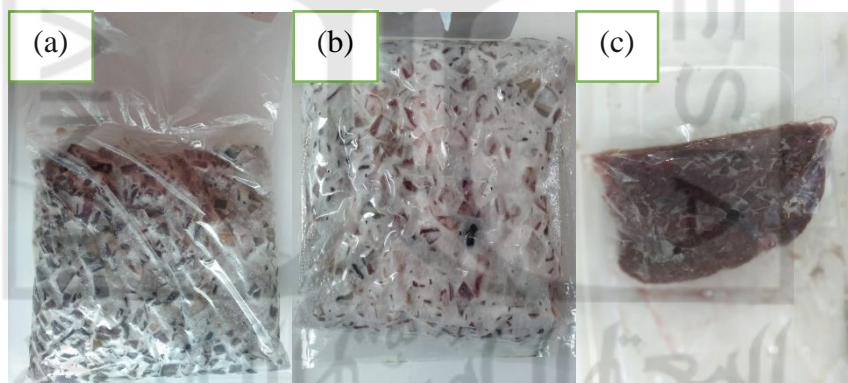


Gambar 13. Maserasi Kubis Ungu Non Fermentasi dengan Pelarut Etanol Teknis 96%

5.2 Ekstraksi dan Filtrasi

5.2.1 Ekstraksi dan Filtrasi Sampel Kubis Ungu Fermentasi

Kubis ungu fermentasi yang telah mencapai 1 Hari, 3 Hari dan 5 Hari dilakukan proses ekstraksi. Berikut adalah hasil fermentasi kubis ungu, seperti pada Gambar 14.



Gambar 14. (a) Hasil Fermentasi Kubis Ungu 1 Hari, (B) Hasil Fermentasi Kubis Ungu 3 Hari, (C) Hasil Fermentasi Kubis Ungu 5 Hari

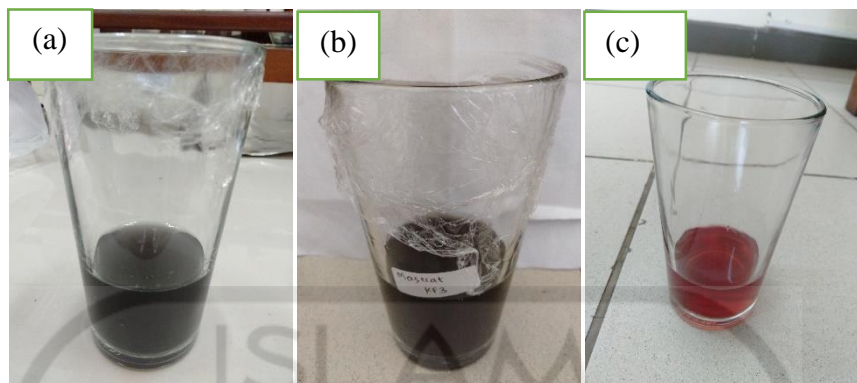
Dalam ekstraksi suatu senyawa diperlukan metode ekstraksi yang sesuai dengan sifat bahan (sumber senyawa), seperti pemilihan jenis pelarut, agar memperoleh hasil yang optimal dan stabilitas senyawa yang tinggi (Sari, 2003). Begitu juga dengan senyawa antosianin yang memiliki sifat polar dan dapat larut dengan baik dalam pelarut polar (Wijaya, Widjanarko dan Susanto, 2001). Hal tersebut sesuai dengan prinsip ekstraksi “*like dissolved like*”, yakni senyawa polar

akan larut dalam pelarut polar begitu juga sebaliknya dengan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar.

Dalam penelitian ini ekstraksi senyawa antosianin pada kubis ungu dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Metode ini dipilih karena antosianin tidak tahan terhadap pemanasan tinggi yang mengakibatkan kerusakan. Sedangkan pelarut etanol digunakan karena etanol termasuk golongan pelarut polar sehingga dapat mengesktrak senyawa polar yakni antosianin. Selain itu pelarut ini juga aman digunakan, "*food grade*", serta harganya yang ekonomis. Dengan metode maserasi dan pelarut polar maka antosianin dapat terkestrak secara optimal, memperoleh hasil banyak dan senyawa terhindar dari kerusakan karena pemanasan.

Kubis ungu terfermentasi dipotong kecil-kecil untuk memperluas permukaan sampel sehingga proses maserasi memperoleh hasil yang maksimal. Proses maserasi dilakukan dengan menempatkan sampel pada suatu wadah tertutup rapat oleh *aluminium foil* pada ruang gelap serta suhu ruang guna mencegah kontak antara sampel dengan cahaya yang mengakibatkan degradasi senyawa antosianin. Maserasi dilakukan selama 2 hari dengan tujuan agar proses ekstraksi lebih maksimal.

Selanjutnya yaitu proses filtrasi (penyaringan) terhadap sampel yang telah selesai proses maserasi. Dari filtrasi diperoleh suatu filtrat dan residu, yang mana filtrat atau maserat yang dihasilkan akan digunakan untuk skrining fitokimia, uji aktivitas antioksidan dan karakterisasi HPLC. Untuk menghindari degradasi senyawa akibat cahaya maka maserat juga ditutup rapat dengan *aluminium foil*. Gambar maserat untuk kubis fermentasi 1 Hari, 3 Hari dan 5 Hari seperti pada Gambar 15.



Gambar 15. (A) Maserat Kubis Ungu Fermentasi 1 Hari, (B) Maserat Kubis Ungu Fermentasi 3 Hari, (C) Maserat Kubis Ungu Fermentasi 5 Hari

5.2.2 Ekstraksi dan Filtrasi Sampel Kubis Ungu Non Fermentasi

Sampel kubis ungu non fermentasi langsung masuk pada tahap ekstraksi yaitu maserasi menggunakan pelarut etanol. Sesuai dengan literatur bahwasanya antosianin bersifat polar sehingga dapat larut pada pelarut polar. Proses maserasi dilakukan selama 2 hari dengan tujuan agar hasil lebih maksimal. Setelah itu, dilakukan filtrasi dan diperoleh maserat dari kubis ungu tanpa fermentasi. Maserat kubis ungu non fermentasi dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Maserat Kubis Ungu Non Fermentasi

Hasil dari uji pH dari ekstrak kubis ungu non fermentasi yaitu sebesar 5,4 yang termasuk pada suasana asam yang mana senyawa antosianin akan stabil pada kondisi asam. Adapun nilai pH ekstrak kubis ungu setelah dilakukan fermentasi 1 hari, 3 hari dan 5 hari mengalami peningkatan dan penurunan. Nilai pH ekstrak kubis fermentasi 1 hari yaitu 6,2 dan ekstrak kubis ungu 3 hari 7,9. Fermentasi pada tempe dengan ragi tempe *Rhizopus oligosporus* semakin lama fermentasi maka

nilai pH akan meningkat. Hal ini disebabkan karena terbentuknya senyawa amonium pada saat proses fermentasi yang memberikan sifat basa (Subranti, 1996). Dan dimungkinkan fermentasi hari ke 3 pembentukan amonium terjadi secara maksimal sehingga pH cenderung basa. Kemudian untuk ekstrak kubis ungu 5 hari nilai pH mengalami penurunan yaitu 4,9, nilai tersebut tergolong asam yang mana dimungkinkan terbentuk asam-asam organik meliputi asam asetat dan asam oksalat. Asam-asam tersebut terbentuk pada saat proses fermentasi kubis ungu yang dihasilkan oleh *Rhizopus oligosporus* (Erkan, et al., 2018). Yang mana nilai pH fermentasi hari ke 5 yakni 4,9 ini lebih rendah dibandingkan yang non fermentasi yaitu 5,4 sehingga dapat dinyatakan bahwa fermentasi telah terjadi yang ditandai dengan adanya penurunan nilai pH akibat terbentuknya asam-asam organik. Sebagaimana senyawa antosianin, senyawa antosinidin juga stabil dalam kondisi asam. Nilai pH yang diperoleh sesuai untuk pertumbuhan kapang, dikarenakan kapang tumbuh optimal pada pH 5-7 namun masih dapat tumbuh pada pH 3-8,5 (Fardiaz, 1992).

5.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan cara untuk mengidentifikasi suatu bioaktif yang belum tampak melalui tes atau pemeriksaan yang dapat dengan cepat memisahkan antara bahan alam yang memiliki dan tidak memiliki kandungan fitokimia tertentu. Sehingga skrining fitokimia ini menjadi tahap pendahuluan untuk memberikan gambaran tentang metabolit sekunder dalam tanaman yang sedang diteliti.

5.3.1 Uji Flavonoid

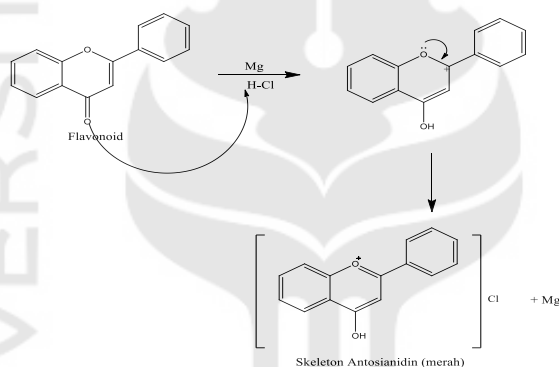
Salah satu uji flavonoid yaitu metode Wilstater yakni dengan menambahkan HCl pekat dan serbuk Mg dan terjadi perubahan warna menjadi senyawa kompleks yakni menjadi jingga hingga merah. Sampel ditambahkan HCl sehingga terjadi hidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan terganti oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang suka elektron. Maserat semua perlakuan diambil beberapa mL dan ditambahkan 2-3 tetes HCl pekat serta ditambahkan serbuk Mg. Hasil uji flavonoid terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Flavonoid Ekstrak Kubis Ungu Non Fermentasi, Fermentasi 1 Hari, 3 Hari Dan 5 Hari

Pengamatan Reaksi Positif (Teori)	Hasil Pengamatan	Keterangan
Terbentuk warna jingga hingga merah	Terbentuk warna merah	(+)

Keterangan : (+) = reaksi termasuk golongan flavonoid

Dari hasil uji flavonoid menunjukkan bahwa ekstrak kubis ungu positif yang berarti bahwa ekstrak tersebut termasuk golongan flavonoid yang ditandai dengan warna merah. Reaksi antara flavonoid dengan HCl dan Mg adalah seperti pada Gambar 17.



Gambar 17. Reaksi Pada Uji Flavonoid (Setiabudi dan Tukiran, 2017)

5.3.2 Uji Fenolik

Pada uji fenolik pereaksi yang digunakan berupa FeCl_3 . Hasil positif jika terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat (Harbone, 1987). Hasil uji fenolik dapat dilihat pada Tabel 4.

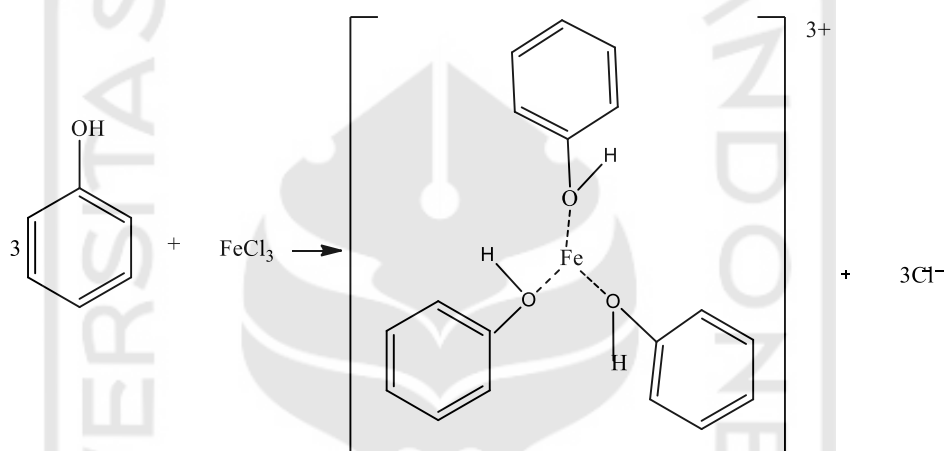
Tabel 4. Hasil Uji Fenolik Ekstrak Kubis Ungu Non Fermentasi, Fermentasi 1, 3, dan 5 Hari

Pengamatan Reaksi Positif (Teori)	Hasil Pengamatan		Keterangan
	Non Fermentasi	Terbentuk warna ungu	(+)

Terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat	Fermentasi 1 Hari	Terbentuk warna hitam	(+)
	Fermentasi 3 Hari	Terbentuk warna biru	(+)
	Fermentasi 5 hari	Terbentuk warna biru	(+)

Keterangan : (+) = termasuk golongan fenolik

Dari hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak kubis ungu positif sehingga ekstrak tersebut termasuk golongan fenolik. Reaksi antara fenolik dengan FeCl_3 seperti pada Gambar 18. Perbaiki struktur reaksi



Gambar 18. Reaksi Uji Fenolik

Pada Gambar 18 dapat dilihat bahwa senyawa fenolik bereaksi dengan FeCl_3 karena adanya ikatan kovalen koordinasi logam Fe^{3+} sebagai atom pusat yang mengikat pasangan elektron bebas atom O dari senyawa fenolik sehingga membentuk suatu ligan. Warna dari kompleks tersebut tergantung dari substituen yang terikat pada senyawa fenolik.

5.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kubis ungu (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) dilakukan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Metode ini dipilih dikarenakan sederhana, cepat, mudah dan sampel yang diperlukan sedikit serta peka.

Tahap awal pengujian aktivitas antioksidan yaitu pembuatan larutan induk DPPH. Larutan induk dibuat pada tempat yang gelap untuk menghindari paparan cahaya sehingga tidak menimbulkan kerusakan pada DPPH. Sedangkan sampel

dibuat variasi berdasarkan konsentrasi yakni 1 %, 2 % dan 3 %. Preparasi larutan uji dengan mereaksikan larutan DPPH dengan ekstrak etanol kubis ungu dan dilakukan secara duplo. Larutan DPPH berwarna ungu ditambahkan larutan ekstrak dengan perbandingan 1:1, kemudian distirrer selama 30 detik untuk mempercepat reaksi antara radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan. Setelah itu larutan didiamkan selama 30 menit dalam lemari dengan tujuan agar DPPH dan senyawa antioksidan dapat bereaksi sempurna dan juga terhindar dari degradasi akibat cahaya. Setelah didiamkan larutan DPPH tereduksi berubah warna menjadi kuning yang menunjukkan bahwa senyawa antioksidan telah bereaksi dengan DPPH seperti pada Gambar 19. Selain itu juga disiapkan larutan kontrol yang berfungsi sebagai perbandingan, dengan menyiapkan 1 mL larutan DPPH dan 2 mL etanol teknis 96%.



Gambar 19. Perubahan Warna DPPH dari Ungu Menjadi Kuning

Tahap berikutnya yaitu pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis *Double Beam* secara duplo. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 517 nm, dikarenakan DPPH memiliki serapan kuat pada panjang gelombang tersebut. Dalam metode DPPH, yang diukur adalah absorbansi sisa yang tidak ikut bereaksi dengan senyawa antioksidan. Penurunan nilai absorbansi menunjukkan bahwa telah terjadi proses peredaman radikal bebas DPPH oleh ekstrak etanol kubis ungu. Selain itu juga menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanol kubis ungu terdapat senyawa antioksidan.

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kubis ungu dengan metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kubis Ungu Metode DPPH

Absorbansi Kontrol	Sampel Ekstrak Kubis Ungu (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)					
	Perlakuan	Konsentrasi (%)	Absorbansi		Rata-rata	% Inhibisi
			Data 1	Data 2		
0,229	Non Fermentasi	1	0,173	0,04	0,106	53,493
0,229		2	0,042	0,034	0,038	83,406
0,229		3	0,025	0,025	0,025	89,082
0,229	Fermentasi 1 Hari	1	0,083	0,097	0,09	60,698
0,229		2	0,025	0,035	0,03	86,899
0,229		3	0,019	0,019	0,019	91,703
0,229	Fermentasi 3 Hari	1	0,131	0,049	0,09	60,698
0,229		2	0,046	0,046	0,046	79,912
0,229		3	0,033	0,028	0,030	86,681
0,229	Fermentasi 5 Hari	1	0,078	0,104	0,091	60,262
0,229		2	0,042	0,062	0,052	77,292
0,229		3	0,046	0,026	0,036	84,279

Dari data diatas dapat diketahui bahwa hubungan antara kosentrasi dengan absorbansi yaitu berbanding terbalik. Semakin besar nilai kosentrasi sampel maka nilai absorbansi semakin kecil. Penurunan absorbansi tersebut menunjukkan adanya peningkatan kemampuan penghambatan dari ekstrak kubis ungu terhadap radikal bebas. Hal tersebut juga menandakan bahwa ekstrak kubis ungu memiliki aktivitas aktioksidan. Dari data absorbansi larutan sampel dan kontrol dapat digunakan untuk mencari nilai persentase inhibisi (peredaman) dari masing-masing perlakuan dengan rumus :

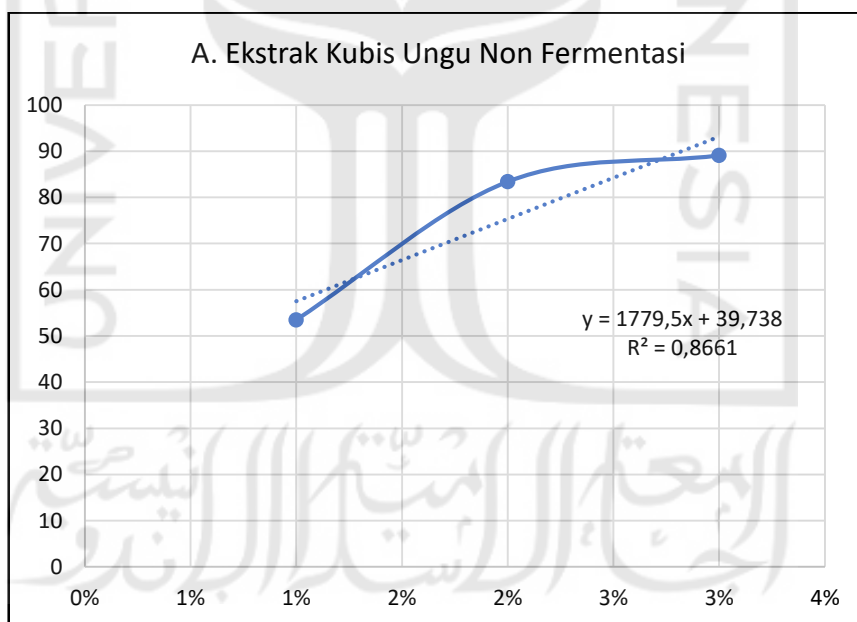
$$\% \text{ Inhibisi} : \frac{A \text{ Kontrol} - A \text{ sampel}}{A \text{ Kontrol}} \times 100 \%$$

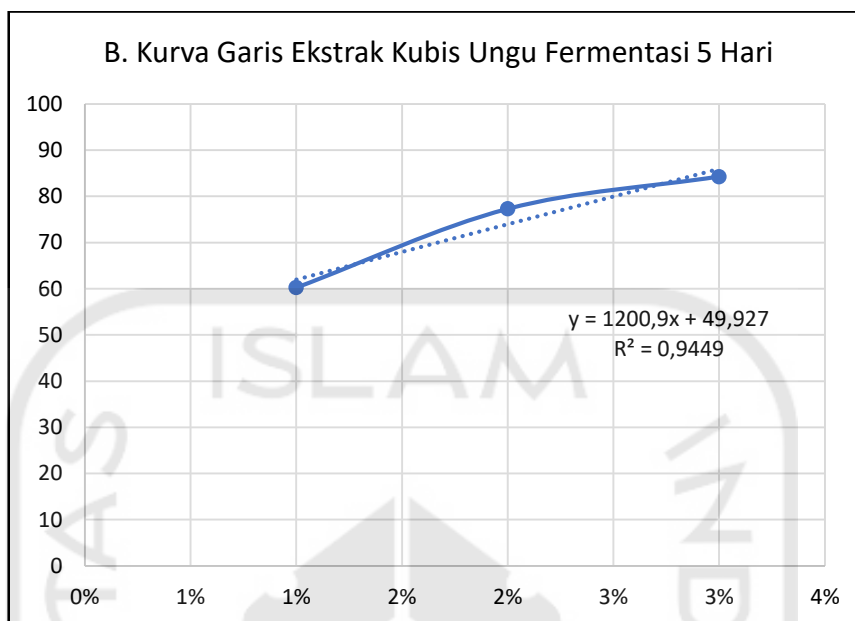
Persentase Inhibisi (% Inhibisi) merupakan nilai yang menunjukkan persentase hambatan dari suatu bahan atau senyawa terhadap radikal bebas. Dari perhitungan diperoleh nilai persentase inhibisi kubis ungu non fermentasi dan fermentasi kubis ungu 1 hari, 3 hari dan 5 hari seperti pada Tabel 3. Dari tabel

tersebut menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi dan persentase inhibisi adalah berbanding lurus. Dimana semakin besar nilai konsentrasi maka nilai persentase inhibisi juga semakin meningkat. Sehingga dapat dinyatakan bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin besar juga kemampuannya dalam menghambat radikal bebas.

Data persentase inhibisi yang diperoleh selanjutnya diplotkan dalam kurva garis dengan konsentrasi sampel. Dimana variasi konsentrasi sebagai sumbu X dan persentase inhibisi sebagai sumbu Y sehingga didapatkan suatu persamaan regresi. Dari persamaan tersebut digunakan untuk mencari konsentrasi efektif ekstrak etanol kubis ungu untuk meredam radikal bebas DPPH 50 % atau dapat disebut juga dengan nilai IC_{50} .

Kurva garis hubungan antara variasi konsentrasi sampel dengan persentase inhibisi ekstrak kubis ungu non fermentasi dan kubis ungu fermentasi 5 hari dapat dilihat pada Gambar 20.





Gambar 20. (A) Kurva Garis Ekstrak Kubis Ungu Non Fermentasi (B) Kurva Garis Ekstrak Kubis Ungu Fermentasi 5 Hari

Dari kurva garis hubungan antara variasi konsentrasi sampel dengan persentase inhibisi diperoleh persamaan garis yang kemudian digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Nilai IC_{50} Kubis Ungu Non Fermentasi dan Terfermentasi

Perlakuan	Persamaan Regresi	Nilai Y	IC_{50} (NilaiX)
Non Fermentasi	$y = 1779,5x + 39,738$	50	0,00576
Fermentasi 1 Hari	$y = 1550,2x + 48,763$	50	0,00079
Fermentasi 3 Hari	$y = 1299,1x + 49,782$	50	0,00016
Fermentasi 5 Hari	$y = 1200,9x + 49,927$	50	0,00006

Berdasarkan Tabel 6, menunjukkan nilai IC_{50} masing-masing variasi non fermentasi, fermentasi 1 hari, 3 hari dan 5 hari berturut-turut adalah 0,00576; 0,00079; 0,00016 dan 0,00006. Dari data diatas menunjukkan bahwasanya kubis ungu non fermentasi telah memiliki kemampuan aktivitas antioksidan yang

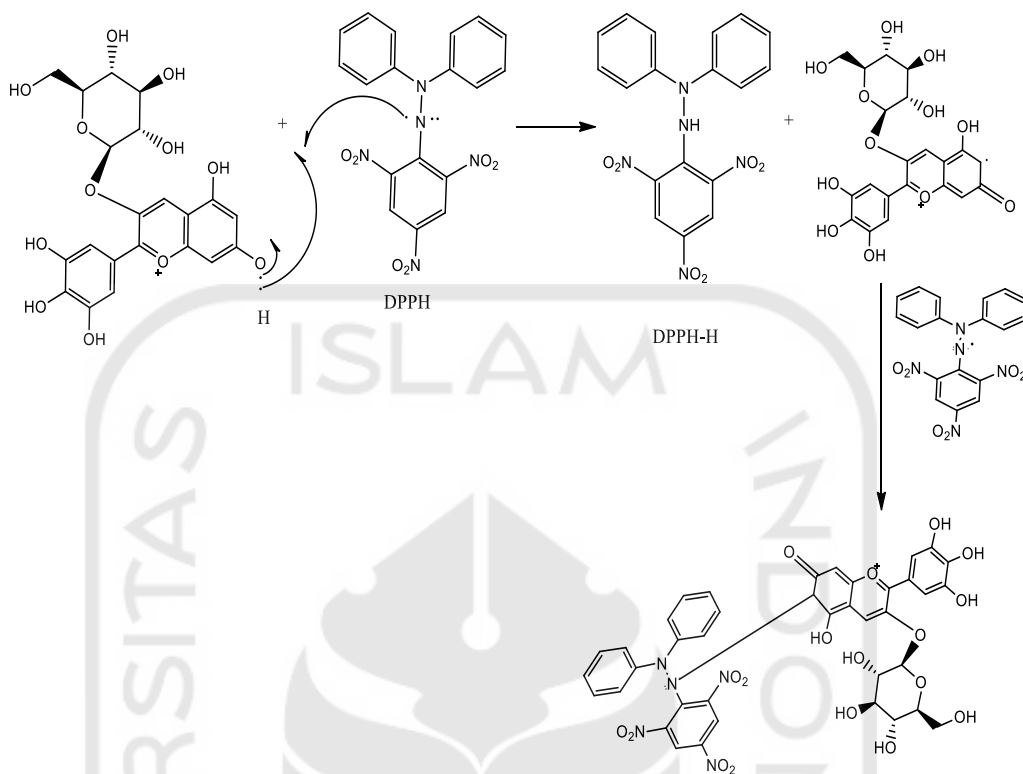
ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 0,00576. Kemudian dilakukan fermentasi dengan variasi 1 hari, 3 hari, 5 hari. Data pada Tabel 4 menunjukkan bahwasanya dengan dilakukan fermentasi nilai IC_{50} semakin kecil yang berarti bahwa kemampuan aktivitas antioksidan semakin meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa enzim *β -glucosidase* telah mulai mengkonversi senyawa antosianin menjadi aglikonnya yakni antosianidin. Enzim *β -glucosidase* telah menghidrolisis gugus gula pada senyawa antosianin sehingga terbentuk senyawa antosianidin. Dimana gugus gula pada senyawa antosianin setelah mengalami hidrolisis terkonversi menjadi gugus -OH pada antosianidin. Dari Tabel 4 juga menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka aktivitas antioksidannya semakin meningkat yakni hari pertama hingga hari ketiga dan kelima. Kemampuan aktivitas antioksidan tertinggi yaitu diperoleh pada fermentasi kubis ungu 5 hari dengan nilai IC_{50} 0,00006. Kemungkinan pada fermentasi hari ke-5 banyak senyawa antosianin yang telah dikonversi menjadi antosianidin.

Sifat antioksidan dapat dibedakan berdasarkan nilai IC_{50} -nya menjadi beberapa tingkatan seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Sifat Antioksidan Berdasarkan Nilai IC_{50} (Molyneux, 2004)

Nilai IC_{50}	Sifat Antioksidan
50 ppm <	Sangat kuat
50 ppm - 100 ppm	Kuat
100 ppm - 150 ppm	Sedang
150 ppm -200 ppm	Lemah

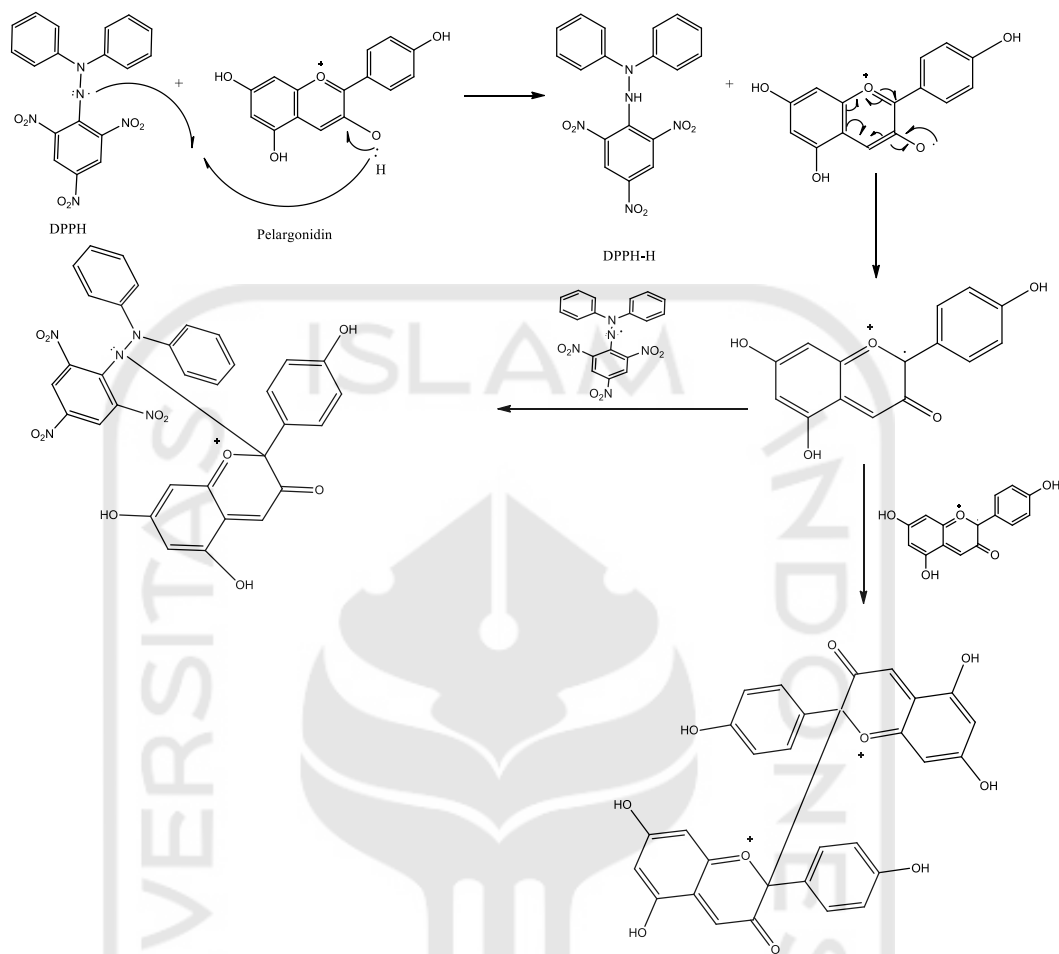
Semua perlakuan sampel mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 50. Hal ini menunjukkan bahwa antioksidan ekstrak kubis ungu non fermentasi dan terfermentasi termasuk dalam antioksidan yang sangat kuat dengan aktivitas antioksidan terbaik pada fermentasi ke-5. Reaksi yang mungkin terjadi antara DPPH dengan senyawa antosianin yaitu seperti pada Gambar 21.



Gambar 21. Reaksi antara DPPH dengan Senyawa Antosianin (Windono et al., 2001)

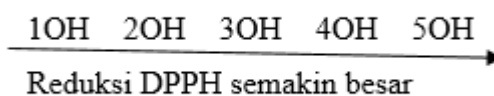
Dari Gambar 21 dapat dilihat bahwa peredaman warna DPPH disebabkan oleh adanya senyawa antosianin yang bisa memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*2,2-diphenyl-2-picrilhydrazil*).

Mekanisme reaksi senyawa pelargonidin dengan DPPH dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22. Reaksi Antara DPPH dengan Pelargonidin

Dari Gambar 22 di atas, menunjukkan bahwa bahwa hidrogen radikal dari antioksidan pelargonidin didonorkan sehingga membentuk ikatan dengan atom nitrogen dari senyawa radikal bebas DPPH dan membentuk senyawa yang sifatnya lebih stabil yakni DPPH-H serta menghasilkan senyawa antioksidan radikal. Namun, senyawa antioksidan radikal tersebut tidak berbahaya bagi tubuh. Reduksi DPPH menjadi DPPH-H disebabkan adanya donor hidrogen dari senyawa hidroksil. Semakin banyak gugus hidroksil bebas yang dapat menyumbangkan hidrogen maka semakin banyak juga reduksi yang dapat dilakukan terhadap DPPH.



Gambar 23. Orientasi Besarnya Reduksi DPPH oleh Gugus Hidroksil
(Sayuti dan Rina, 2015).

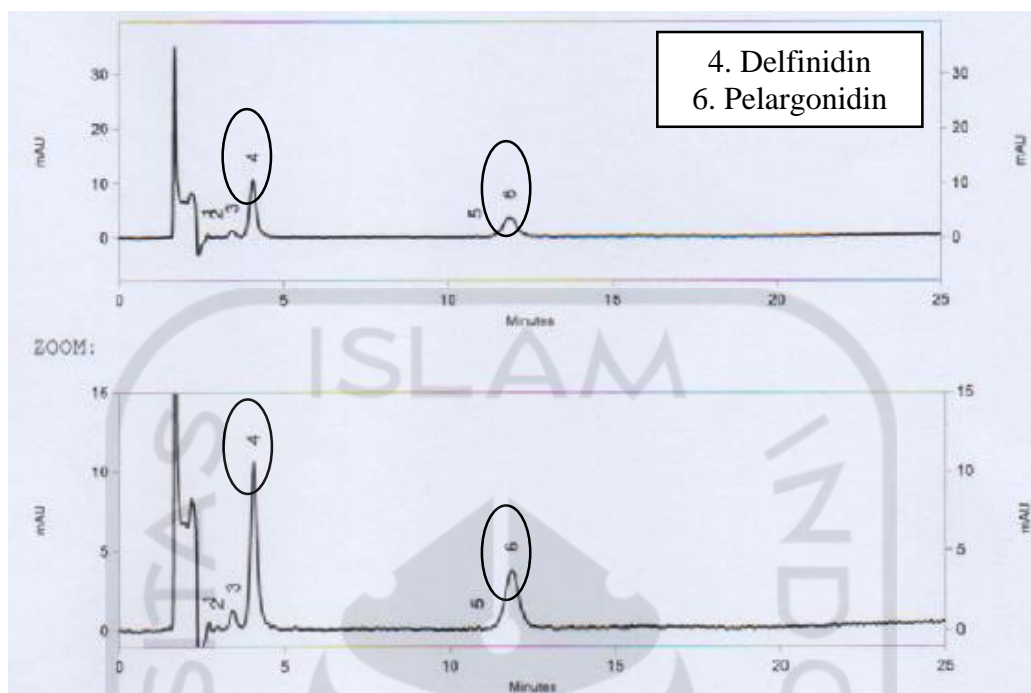
5.5 Karakterisasi dengan HPLC

Karakterisasi menggunakan HPLC ini menggunakan teknik eluen jenis isokratik, yaitu eluen (solvent) yang digunakan memiliki komposisi konstan atau tetap dan dipompakan ke dalam kolom selama proses analisis berlangsung. Jenis HPLC yang digunakan adalah *reversed phase* (fase terbalik). Fase diam yang digunakan yaitu C_{18} yang cenderung sifatnya nonpolar. Dan fase gerak yang digunakan yaitu 1 % asam format (dalam air) : asetonitril (85:15 v/v), dengan laju alir 1,0 mL/min dan volume injeksi sebesar 20 μ L.

Untuk ekstrak kubis ungu non fermentasi dan fermentasi 5 hari dilakukan hidrolisis asam terlebih dahulu dengan dipanaskan dalam HCl 2 M selama 40 menit pada 100 °C, didinginkan, kemudian dicuci dengan etil asetat sebanyak 2 kali. Kemudian fraksi etil asetat dibuang dan fraksi air dipanaskan pada 80 °C selama 3 menit untuk menghilangkan sisa etil asetat. Fraksi air diekstraksi dengan amil alkohol, kemudian fraksi amil alkohol dipekatkan pada gelas arloji di atas penangas air yang mendidih. Ekstrak antosianidin yang telah kering dilarutkan dalam sejumlah tertentu volume metanol yang mengandung 0,01 % HCl. Kemudian ekstrak diinjeksikan dalam *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Tujuan karakterisasi menggunakan HPLC yaitu untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam sampel yang dianalisis serta mengetahui jumlah kadarnya. Sebelum pengujian larutan sampel, terlebih dahulu dilakukan pengujian larutan standar. Identifikasi peak pada larutan sampel berdasarkan waktu retensi dan penentuan kadar senyawa berdasarkan luas area.

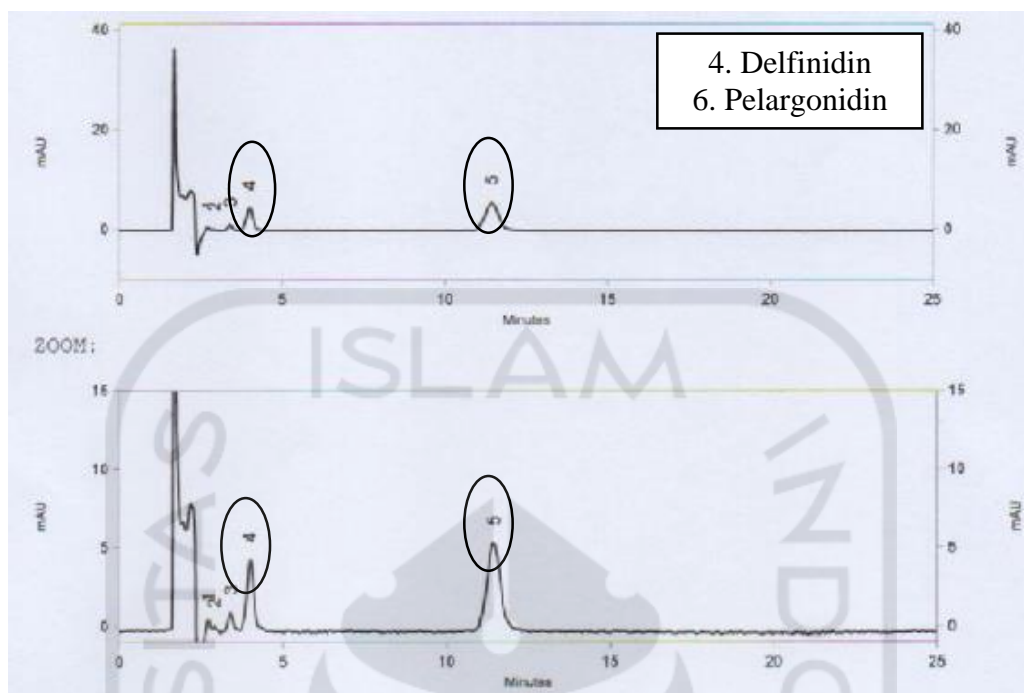
Berikut hasil karakterisasi ekstrak etanol kubis ungu dengan perlakuan non fermentasi yaitu pada Gambar 24.



Gambar 24. Kromatogram Ekstrak Etanol Kubis Ungu Non Fermentasi

Berdasarkan kromatogram diatas, diperoleh 6 buah puncak dengan dua puncak dominan yaitu puncak 4 dan 6. Diketahui bahwasanya puncak nomor 4 merupakan antosianidin jenis delfinidin dengan waktu retensi 4,050 dan luas area sebesar 185601. Sedangkan puncak nomor 6 merupakan antosianidin jenis pelargonidin dengan waktu retensi 11,867 dan luas area sebesar 109755.

Selanjutnya dilakukan analisis pada sampel ekstrak etanol kubis ungu dengan perlakuan fermentasi 5 hari. Hasil kromatogram yang didapatkan dapat dilihat pada 25.



Gambar 25. Kromatogram Ekstrak Etanol Kubis Ungu Fermentasi 5 Hari

Berdasarkan kromatogram di atas diperoleh 5 puncak dengan 2 puncak dominan yaitu puncak 4 dan 5. Identifikasi puncak berdasarkan waktu retensi. Diketahui bahwa puncak 4 merupakan senyawa antosianidin jenis delfinidin dengan waktu retensi 3,983 dan luas area sebesar 98629. Sedangkan puncak 5 merupakan antosianidin jenis pelargonidin dengan waktu retensi 11,433 dan luas area 168101.

Berikut perbandingan waktu retensi dan luas area ekstrak etanol kubis ungu non fermentasi dan fermentasi 5 hari dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Perbandingan Waktu Retensi Dan Luas Area Sampel Non Fermentasi Dan Fermentasi 5 Hari

Perlakuan	Waktu Retensi		Luas Area	
	Delfinidin	Pelargonidin	Delfinidin	Pelargonidin
Non Fermentasi	4,050	11,867	185601	109755
Fermentasi 5 Hari	3,983	11,433	98629	168101

Tabel 8 menunjukkan bahwa antosianidin jenis delphinidin lebih dulu terdeteksi dibandingkan pelargonidin yang dibuktikan dengan waktu retensi delphinidin lebih kecil dari pelargonidin. Sehingga dapat dinyatakan bahwa delphinidin memiliki sifat cenderung polar dibandingkan pelargonidin.

Berdasarkan data diatas, didapatkan persamaan regresi untuk delphinidin yaitu $y = 4795x - 3407$; $R^2=0,999$ dan pelargonidin yaitu $y = 3879x + 10936$; $R^2=0,998$. Selanjutnya dilakukan perhitungan konsentrasi sebenarnya dari delphinidin dan pelargonidin dengan faktor pemekatan (Fp) 1. Hasil konsentrasi delphinidin dan pelargonidin ekstrak etanol kubis ungu non fermentasi dan fermentasi 5 hari dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Perbandingan konsentrasi ekstrak kubis ungu

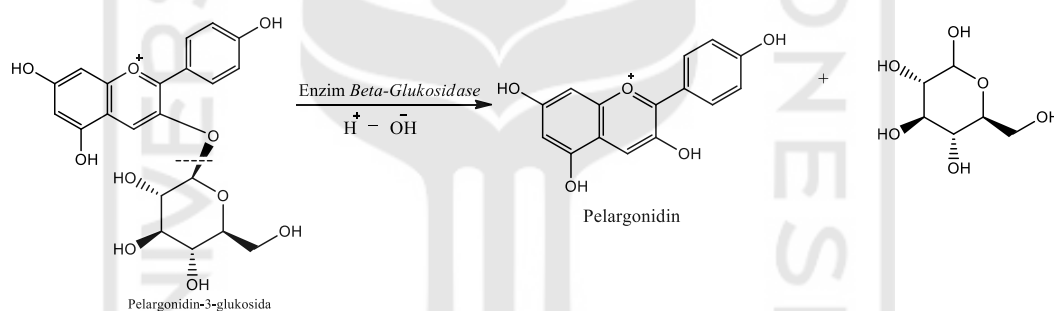
Perlakuan	Konsentrasi Uji ($\mu\text{g/mL}$)		Fp	Konsentrasi Sampel ($\mu\text{g/mL}$)	
	Delfinidin	Pelargonidin		Delfinidin	Pelargonidin
Non Fermentasi	39,418	25,475	1	39,418	25,475
Fermentasi 5 Hari	21,280	40,517	1	21,280	40,517

Dari hasil konsentrasi tersebut dapat dilihat bahwa kadar pelargonidin pada perlakuan non fermentasi mengalami peningkatan setelah dilakukan fermentasi 5 hari. Peningkatan kadar pelargonidin menunjukkan bahwa enzim β -glucosidase telah berhasil memutus ikatan glikosida pada antosianin sehingga terbentuk aglikonnya yakni antosianidin. Namun, untuk kadar antosianidin jenis delphinidin terjadi penurunan setelah dilakukan fermentasi 5 hari. Penurunan kadar delphinidin kemungkinan adanya pengaruh dari struktur dan proses fermentasi. Keberadaan molekul glukosida memberikan efek yang baik terhadap stabilitas antosianin, yakni mencegah degradasi, tetapi kurang reaktif terhadap radikal bebas, sehingga aktivitas antioksidannya rendah (Rice-Evans, Miller, & Paganga 1997). Laju degradasi antosianin meningkat karena suhu dan jumlah gugus hidroksil yang

meningkat. Pada umumnya penambahan hidroksilasi menurunkan stabilitas sedangkan penambahan metilasi meningkatkan stabilitas (Fennema, 1996). Kehadiran tiga kelompok hidroksil di cincin B dari struktur delphinidin membuatnya cukup rentan terhadap degradasi kimia di bawah kondisi lingkungan yang kurang sesuai. Degradasi delphinidin utamanya mengarah pada pembentukan asam galat dan asam fenolik. Berdasarkan penelitian Avila et al (2009) aglikon delphinidin sensitif mengalami degradasi lebih lanjut akibat aktivitas intraseluler dari enzim β -glucosidase yang tinggi.

Sehingga dapat dimungkinkan bahwa peningkatan aktivitas antioksidan yang tinggi pada ekstrak kubis ungu fermentasi 5 hari dominan dipengaruhi oleh kadar pelargonidin yang tinggi. Dan terbukti bahwasanya aglikon dari antosianin memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik.

Berikut reaksi biokonversi yang mungkin terjadi yaitu pada Gambar 26 :



Gambar 26. Reaksi Biokonversi Pelargonidin-3-Glukosida Menjadi Pelargonidin

Dari gambar 26 diatas, dapat dilihat bahwa enzim β -glucosidase akan memutus ikatan glukosida yang terdapat pada antosianin sehingga antosianin akan terhidrolisis membentuk antosianidin. Antosianin pelargonidin-3-glukosida setelah mengalami hidrolisis ikatan glukosida membentuk senyawa aglikonnya yaitu pelargonidin. Gugus gula pada pelargonidin-3-glukosida digantikan dengan gugus -OH pada aglikonnya sehingga memiliki aktivitas peredaman radikal bebas yang lebih tinggi dan peningkatan aktivitas antioksidan.