

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ubi Jalar Ungu

2.1.1. Klasifikasi dan deskripsi tanaman ubi jalar ungu

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Convolvulales
Famili	: Convolvulaceae
Genus	: Ipomoea
Spesies	: <i>Ipomoea batatas</i> L. <i>Sin batatas</i>

(Juanda dan Cahyono, 2000).

Tanaman ubi jalar ungu berbatang lunak, tidak berkayu, berbentuk bulat, dan batang ubi jalar beruas-ruas teras bagian tengah bergabus (Juanda dan Cahyono, 2000). Bentuk umbi ubi jalar ungu biasanya bulat sampai lonjong dengan permukaan rata hingga tidak rata. Kulit ubi jalar ungu berwarna ungu kemerahan, dan daging umbinya berwarna keunguan (Rukmana, 1997). Gambar umbi ubi jalar ungu dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Umbi Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) (Tan, 2015)

2.1.2. Kandungan kimia dan khasiat umbi ubi jalar ungu

Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L) merupakan tanaman yang kaya akan kandungan karbohidrat, mineral (kalsium, besi, magnesium, fosfor, kalium, natrium dan zink), vitamin (A, B₁, B₂, B₃, B₅, C dan E) dan antioksidan seperti antosianin, kuersetin, beta-karoten, dan turunan *caffeoylquinic acid* (Mohanraj *and* Sivasankar, 2014). Kadar antosianin ubi jalar ungu relatif lebih besar yaitu berkisar 84 hingga 174 mg/100 gram berat basah jika dibandingkan dengan lobak merah, kubis merah, *raspberries* dan *strawberries* yang memiliki kadar antosianin 11-60; 25; 20-60; dan 15-35 mg/100 gram berat basah (Bridgersa *et al.*, 2010). Antosianin dari ubi jalar ungu lebih stabil dari pada pigmen yang terkandung di dalam *strawberry*, kubis merah, dan *perilla* (Zhang, *et al.*, 2009).

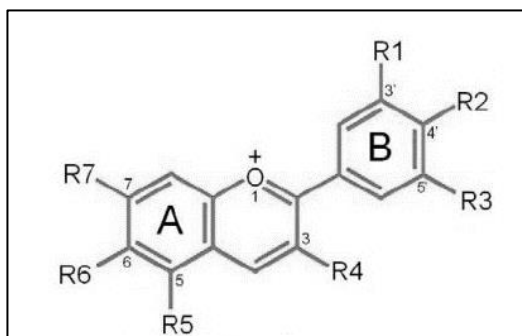
Ubi jalar ungu memiliki beberapa khasiat farmakologi, yaitu terbukti memiliki khasiat sebagai antioksidan dengan aktivitas antioksidan sebanyak 2,5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan *blueberry*. Aktivitas farmakologi ubi ungu sebagai antidiabetes, antikanker, antitumor, antiulcer, efek kardiovaskuler, dan antineuroinflamasi (Mohanraj *and* Sivasankar, 2015; Jawi *et al.*, 2012; Zhao *et al.*,

2013; Kang *et al.*, 2014). Bahkan efek *free radical scavenging*-nya lebih tinggi daripada pigmen yang terkandung dalam kubis merah, kulit anggur, elderberi, dan jagung ungu, serta asam askorbat (Kano *et al.*, 2005; Philpott *et al.*, 2004).

2.2. Antosianin

2.2.1. Struktur antosianin

Antosianin umumnya terkandung dalam tanaman dan dideteksi oleh penglihatan manusia sebagai warna merah hingga biru keunguan. Antosianin merupakan senyawa fenol yang masuk ke dalam kelompok flavonoid. Terdapat enam jenis antosianin yang umumnya ditemukan pada tumbuhan antara lain pelargonidin, sianidin, peonidin, delphenidin, petunidin dan malvidin (Giusti *and* Wrolstad, 2003). Seluruh senyawa antosianin merupakan senyawa turunan dari kation flavilium (Francis, 1985). Antosianin terdiri dari aglikon (antosianidin), gula (s) dan gugus asil (pada beberapa jenis antosianin). Kerangka gugus aglikon didasarkan pada rantai C15 (C6-C3-C6). Gugus gula yang umumnya menyusun antosianin adalah mono-, di- atau tri- yang terglisosilasi pada C-3 hidroksi. Monosakarida tersebut meliputi glukosa, galaktosa, rhamnosa, fruktosa dan arabinosa, selain monosakarida jenis gula lainnya berupa kombinasi dari 3 atau 4 monosakarida (Ignat *et al.*, 2011). Jenis antosianin pada ubi jalar ungu adalah bentuk mono- atau diasilasi dari jenis peonidin dan sianidin (Terahara *et al.*, 2000). Gambar 2.2.dibawah ini menunjukkan inti kation flavilium pada antosianin.



Gambar 2.2. Inti Kation Flavilium (Martin *et al.*, 2009)

Inti kation flavilium memiliki tujuh cabang yang akan diisi oleh gugus pengganti. Jenis gugus yang mengganti akan menentukan jenis antosianidin. Pada setiap inti kation flavilium terdapat sejumlah molekul yang berperan sebagai gugus pengganti. Pada Tabel 2.1. dapat dilihat sejumlah gugus pengganti yang paling umum ditemui pada antosianin.

Tabel 2.1. Gugus pengganti pada struktur kation flavilium antosianin utama

Antosianidin (aglikon)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Warna	λ _{maks} (nm)
Sianidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	Magenta	535
Definidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	Ungu	546
Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	Merah	520
Malvidin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH	Ungu	542
Peonidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	Magenta	532
Petunidin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH	Ungu	543

(Martin *et al.*, 2009; He, 2008).

2.2.2. Stabilitas antosianin

Antosianin adalah senyawa yang bersifat amfoter, hal ini ditunjukkan dengan adanya gugus H⁺ dan OH⁻, sehingga memiliki kemampuan untuk bereaksi, baik dengan asam maupun basa. Adanya ion⁺ (pada cincin ditengah) menyebabkan antosianin rentan terhadap serangan senyawa-senyawa asing dan perubahan faktor

lingkungan (pH, suhu) sehingga hal tersebut akan berpengaruh terhadap stabilitasnya (Yudiono, 2011). Antosianin merupakan senyawa yang reaktif terhadap perubahan lingkungan termasuk perubahan pH dan suhu. Sifat reaktif ini disebabkan oleh inti kation flavilium pada pigmen antosianin yang kekurangan elektron. Pigmen antosianin memiliki kestabilan yang rendah, reaksi yang terjadi umumnya menyebabkan terjadinya kehilangan warna (Markakis, 1982). Warna dan stabilitas antosianin dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu panas (suhu), pH, enzim, cahaya, dan oksigen (Huang, *et al.*, 2010).

Panas dapat menggeser kesetimbangan stabilitas antosianin. Perlakuan panas dapat menyebabkan kesetimbangan antosianin cenderung menuju bentuk yang tidak berwarna yaitu basa karbinol dan kalkon yang tidak stabil. Terdapat tiga jalur yang terlibat dalam degradasi panas pada antosianin. Jalur pertama melibatkan hidrolisis ikatan glikosida yang merupakan tahap awal degradasi antosianin, membentuk antosianidin. Aglikon yang lebih tidak stabil dibandingkan glukosidanya, melalui tahap senyawa antara alfa diketon yang sangat tidak stabil membentuk turunan aldehid dan asam benzoat. Jalur kedua melibatkan hidrolisis cincin pirilium membentuk kalkon sebagai langkah awal, diikuti oleh proses hidrolisis ikatan glikosida membentuk kalkon, selanjutnya terdegradasi menjadi turunan aldehid dan asam benzoat. Jalur ketiga melibatkan proses pembentukan karbinol pseudobasa menjadi kalkon, selanjutnya menjadi glikosida kumarin (Sun *et al.*, 2011).

Derajat keasaman (pH) akan mempengaruhi pigmen dan stabilitas dari pigmen antosianin. Antosianin akan lebih stabil pada kondisi asam (pH 2-4.5)

daripada kondisi netral atau basa. Pada pH sangat asam (pH 1-2), bentuk dominan antosianin adalah kation flavilium. Pada bentuk ini, antosianin berada dalam kondisi paling stabil dan paling berwarna. Ketika pH meningkat di atas 4 terbentuk senyawa antosianin berwarna kuning (bentuk kalkon), senyawa berwarna biru (bentuk *quinoid*), atau senyawa yang tidak berwarna (basa karbinol) (Brouillard, 1998).

Laju hilangnya warna antosianin secara enzimatik disebabkan oleh glukosidase yang menghidrolisis grup 3-glikosida menjadi glikon yang tidak stabil. Perubahan warna fenolase-katekol-antosianin juga melibatkan enzim untuk oksidasi. Peroksidase dapat mengkatalisis terjadinya diskolorisasi antosianin. Begitu juga dengan kehadiran fenolase (fenoloksidase dan polifenoloksidase). Fenolase akan bereaksi dengan antosianin. Reaksinya akan terjadi sangat kuat ketika ada senyawa fenolik untuk menjadi substrat daripada antosianin sebagai substratnya. Pirokatekol dalam bahan pangan akan dioksidasi oleh fenolase menjadi o-benzokuinon. Sistem enzimatik yang dapat menyebabkan diskolorisasi antosianin dapat ditemukan pada kapang, akar, daun, dan buah (Markakis 1982; Peng dan Markakis 1963).

Cahaya memegang peranan penting dalam pembentukan pigmen antosianin, yaitu berkaitan dengan proses fotosintesis. Begitu pula sebaliknya, cahaya dapat mempercepat degradasi antosianin. Cahaya mampu mendegradasi pigmen antosianin dan membentuk kalkon yang tidak berwarna. Energi yang dikeluarkan oleh cahaya memicu terjadinya reaksi fitokimia atau fotooksidasi yang dapat membuka cincin antosianin. Paparan yang lebih lama menyebabkan terjadinya

degradasi lanjutan dan terbentuk senyawa turunan lain seperti 2,4,6-trihidroksibenzaldehid dan asam benzoat tersubstitusi (Andarwulan dan Faradilla, 2012). Jenis antosianin yang paling stabil terhadap keberadaan cahaya adalah diglikosida yang termetilasi atau terasilasi. Diglikosida non asilasi merupakan jenis antosianin yang kurang stabil, dan antosianin monoglikosida merupakan gliosida paling tidak stabil (Markakis, 1982). Oksigen dapat mempercepat dekomposisi antosianin. Sebagai aseptor elektron utama, oksigen secara langsung maupun tidak langsung terlibat ke dalam mekanisme degradasi antosianin (He, 2008).

2.3. Enzim polifenol oksidase (PPOs)

Enzim PPOs dikenal sebagai fenolase, tirosinase, monofenol, o-difenol dan merupakan anggota dari oksidoreduktase. PPOs merupakan enzim yang mengkatalisis oksidasi senyawa fenolik oleh dua reaksi yang berbeda dengan menggunakan molekul oksigen sebagai *co*-substratnya. Enzim PPOs banyak ditemukan dalam organisme termasuk tumbuhan, jamur, hewan dan bakteri (Mercimek *et al.*, 2015).

Pada tumbuhan, enzim PPOs berada pada membran tilakoid di kloroplas dan mitokondria. Enzim PPOs merupakan enzim terikat membran sementara antosianin merupakan vakuolar. Sehingga kontak antara antosianin dan enzim PPOs tidak dapat terjadi apabila tidak ada disrupsi pada tingkat selular. Reaksi pencoklatan terjadi setelah adanya distrupsi jaringan kaya fenol dapat menyebabkan pengikatan polifenol oksidase. Enzim PPOs memiliki dua atom tembaga dengan dua sisi aktif katalitik yaitu monofenolase dan difenolase. Aktivitas monofenolase

yaitu mengkatalisis hidroksilasi monofenol menjadi o-difenol dan aktivitas difenolase spesifik dalam oksidasi o-difenol membentuk o-kuinon. Selanjutnya, o-kuinon dapat bereaksi dengan fenol atau sebaliknya, berpolimerisasi membentuk melanin yang bertanggung jawab untuk reaksi pencoklatan warna gelap (*browning*) yang tidak diinginkan (Manohan *and* Wong, 2012; Mercimek *et al.*, 2015; Murniati, dkk., 2014).

2.4. Metode ekstraksi antosianin

Ekstraksi ubi jalar ungu biasanya dilakukan menggunakan pelarut organik seperti metanol dan etanol, dan salah satu metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah metode maserasi (Huang *et al.*, 2010). Antosianin lebih stabil dalam suasana asam dibandingkan dalam suasana basa atau netral (Hambali dkk., 2014), sehingga proses ekstraksi antosianin dilakukan menggunakan pelarut yang diasamkan menggunakan HCl atau asam sitrat. Penggunaan etanol 70% sebagai pelarut yang diasamkan dengan asam sitrat 3% lebih efektif jika dibandingkan dengan etanol 70% yang diasamkan dengan HCl. Ekstraksi antosianin menggunakan pelarut etanol 70% yang diasamkan dengan asam sitrat 3% mampu menghasilkan rendemen total antosianin sebesar 22,6 % b/b (Senja dkk., 2014). Selain itu, ekstraksi antosianin menggunakan pelarut etanol 70% yang diasamkan dengan asam sitrat 3% juga mampu menghasilkan antosianin dengan *yield* sebesar 41,8 % b/b (Amelia *et al.*, 2013).

Ekstraksi antosianin ubi jalar ungu saat ini dapat dilakukan menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE). Metode ekstraksi menggunakan

UAE dapat menghemat waktu dan energi proses ekstraksi serta memiliki kemampuan untuk mengekstraksi senyawa yang sifatnya termolabil. Teknologi ultrasonikasi dapat menginaktivasi mikroorganisme dan enzim (Wicaksono *et al.*, 2016; Alighourchi *et al.*, 2013). Metode ekstraksi maserasi menggunakan ultrasonikasi *bath* merupakan metode ekstraksi dengan perambatan energi melalui gelombang dengan menggunakan cairan sebagai media perambatan yang dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi sehingga proses ekstraksi lebih maksimal dibandingkan metode ekstraksi konvensional (Winata dan Yuniarta, 2015).

2.5. Metode spektrofotometri Uv-VIS *pH-differential*

Antosianin mengalami perubahan bentuk struktur yang bersifat reversibel ketika terjadi perubahan pH, hal ini ditunjukkan dengan bentuk spektrum serapan yang berbeda (Wrolstad *et al.*, 2005). Metode standar yang digunakan dalam menentukan kadar total antosianin adalah *pH Differential* dengan Spektrofotometri UV-Vis. Pada pH 1 antosianin berada dalam bentuk *oxonium* dengan kondisi berwarna, sedangkan pada pH 4,5 antosianin mengalami perubahan struktur menjadi bentuk hemiketal dan kehilangan warna (Lee *et al.*, 2005). Penetapan kadar total antosianin dilakukan dengan melakukan pengukuran serapan atau absorbansi pada panjang gelombang maksimum dan 700 nm dimasing-masing pengkondisian pH, hal ini dapat diamati pada gambar 2.3. Nilai absorbansi yang diperoleh dihitung dengan data berat molekul (BM) dan absorptivitas molar (ϵ) dari antosianin utama.

Penentuan nilai absorbansi akhir dari sampel (A) dengan rumus sebagai berikut:

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700nm}})_{pH\ 1} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700nm}})_{pH\ 4,5} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

A : absorbansi akhir dari sampel

$A_{\lambda_{521nm}}$: absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimumnya

$A_{\lambda_{700nm}}$: absorbansi sampel pada panjang gelombang 700 nm

(Lee *et al.*, 2005)

Kadar total antosianin (mg/L) dihitung dengan rumus yang diekspresikan sebagai *cyanidin 3-glucoside* (Lee *et al.*, 2005):

$$TAC = \frac{A}{\epsilon \cdot l} \times MW \times DF \times 10^3 \dots \dots \dots (2)$$

(Lee *et al.*, 2005)

Keterangan:

TAC : Total Anthocyanins Content (mg/L)

A : absorbansi akhir dari sampel

ϵ : koefisien absorbtivitas molar cyanidin 3-glucoside (26.900 L(mol.cm)⁻¹)

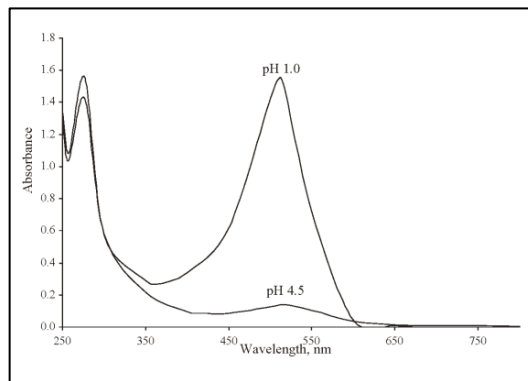
MW : berat molekul *cyanidin 3-glucoside* (449,2 g/mol)

DF : faktor pengenceran

l : tebal kuvet (1 cm)

10³ : faktor konversi dari gram ke mg.

Produk degradasi antosianin dalam bentuk polimer tidak mengalami perubahan warna ketika terjadinya perubahan pH sehingga antosianin yang mengalami polimerisasi tidak dapat ditetapkan dengan metode *pH Differential* karena mampu mengabsorbsi pada pH 1 dan 4,5. Dalam menetapkan kadar total antosianin, *cyanidin-3-glukosida* digunakan untuk mengekspresikan kadar total antosianin karena umumnya terdapat dalam jumlah yang dominan pada tanaman (Lee *et al.*, 2005).



Gambar 2.3. Karakteristik spektra antosianin dari buah *huckleberry* pada *buffer* 1 dan 4,5 (Lee *et al.*, 2005).

2.6. Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

2.6.1. Presisi

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n-1}} \dots\dots\dots (3)$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

SD : standar deviasi

n : jumlah sampel

KV : koefisien variasi
 \bar{x} : kadar rata-rata sampel

(Harmita, 2004).

2.6.2. Linieritas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima. Dalam praktik, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50 – 150% kadar analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004).

2.6.3. *Limit of detection (LOD)* dan *limit of quantification (LOQ)*

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004).

Batas deteksi pada analisis instrumen dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula di bawah ini dapat digunakan untuk perhitungan:

$$Q = \frac{k \times S_b}{Sl} \dots\dots\dots (5)$$

Keterangan:

Q : LOD atau LOQ

k : 3 untuk LOD atau 10 untuk LOQ

S_b : simpangan baku respon analitik dari blangko

Sl : arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = *slope*
(b pada persamaan garis $y = a + bx$)

(Harmita).