

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ubi Jalar Ungu (*I. batatas*)

Ubi jalar diduga merupakan tanaman yang berasal dari Amerika Tengah. Diperkirakan pada abad ke-16, tanaman ubi jalar tersebut mulai tersebar ke negara-negara tropis di seluruh dunia termasuk Indonesia. Pada tahun 1960, ubi jalar sudah tersebar ke hampir setiap provinsi di Indonesia. Adapun 5 daerah sentra produksi ubi jalar terbesar di Indonesia adalah Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Papua, dan Sumatra. Namun, pada saat ini, baru Papua sajalah yang memanfaatkan ubi jalar sebagai makanan pokok, walaupun belum menyamai padi, jagung, dan ubi kayu (singkong) (Suprpti, 2003).

Adapun taksonomi dari tumbuhan ubi jalar ungu ditampilkan sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisio	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisio	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Convolvulus</i>
Familia	: <i>Convolvulaceae</i>
Genus	: <i>Ipomoea</i>
Species	: <i>Ipomoea batatas</i> L.

Terdapat banyak sekali varietas ubi jalar. Ada yang berwarna putih, kuning, oranye, merah, atau ungu. Semakin gelap warnanya, akan semakin baik karena menunjukkan bahwa kandungan senyawa karotennya juga lebih tinggi. Selain sebagai sumber karoten, ubi jalar juga mengandung vitamin C, vitamin B₆, vitamin B₂, mangan, tembaga biotin, asam pantothenat, dan serat. Setiap 100 gram ubi jalar mengandung sekitar 8,4 gram gula; 2 gram protein; 20,7 gram karbohidrat; 3,3 gram serat; dan 90 kalori. Ubi jalar termasuk memiliki nilai GL rendah (8,6) dan GI sedang (54) sehingga sangat cocok sebagai sumber kalori diabetesi. Secara tradisional, ubi jalar telah digunakan oleh diabetesi sebagai pengganti nasi karena diyakini mengandung kalori yang lebih rendah. Gambar dari ubi jalar ungu ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Ubi Jalar Ungu.

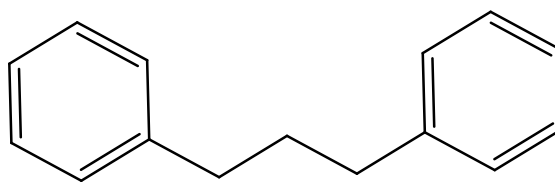
Warna merah dan ungu pada bunga, batang, daun, dan umbi ubi jalar merupakan akibat dari keberadaan senyawa antosianin. Antosianin pada ubi jalar ungu jika dibandingkan dengan tanaman-tanaman lain yang juga merupakan sumber antosianin tidak kalah banyak. Tabel 1 menyajikan data kandungan antosianin berbagai macam tanaman termasuk ubi jalar ungu (Andarwulan dan Faradilla, 2012).

Tabel 1. Kandungan pigmen antosianin dalam beberapa tanaman (Andarwulan dan Faradilla, 2012).

Sumber	Kandungan pigmen (mg/100 g berat basah)
Buah Plum	2-25
Bawang bombay merah	7-21
Lobak merah	11-60
Stroberi	15-35
Raspberi merah	20-60
Kol merah	25
<i>Blueberry</i>	25-495
<i>Blackberry</i>	83-326
<i>Cranberry</i>	60-200
Anggur	6-600
Ubi Jalar Ungu	84-600

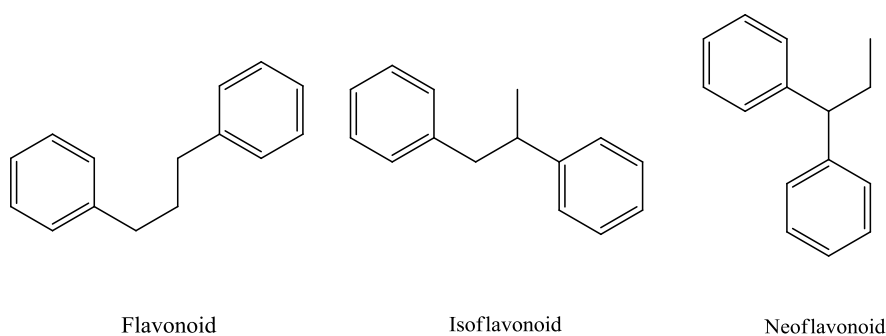
B. Flavonoid

Flavonoid adalah sebuah kelas metabolit sekundertanaman. Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga, dan *hornwort*. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah buni, dan biji. Hanya sedikit saja catatan yang melaporkan adanya flavonoid pada hewan, misalnya dalam kelenjar bau berang-berang, ‘propolis’ (sekresi lebah) dan di dalam sayap kupu-kupu; itu pun dengan anggapan bahwa flavonoid tersebut berasal dari tumbuhan yang menjadi makanan hewan tersebut dan tidak di biosintesis di dalam tubuh mereka (Markham, 1988). Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mengandung C_{15} terdiri dari dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon. Golongan flavonoid dapat juga digambarkan sebagai deretan senyawa $C_6-C_3-C_6$. Artinya, kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C_6 disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Kerangka dasar flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kerangka dasar flavonoid (Robinson, 1995).

Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yaitu flavonoid (1,3-diaril propana), isoflavonoid (1,2-diaril propana), neoflavonoid (1,1-diaril propana) seperti ditunjukkan pada Gambar 3.

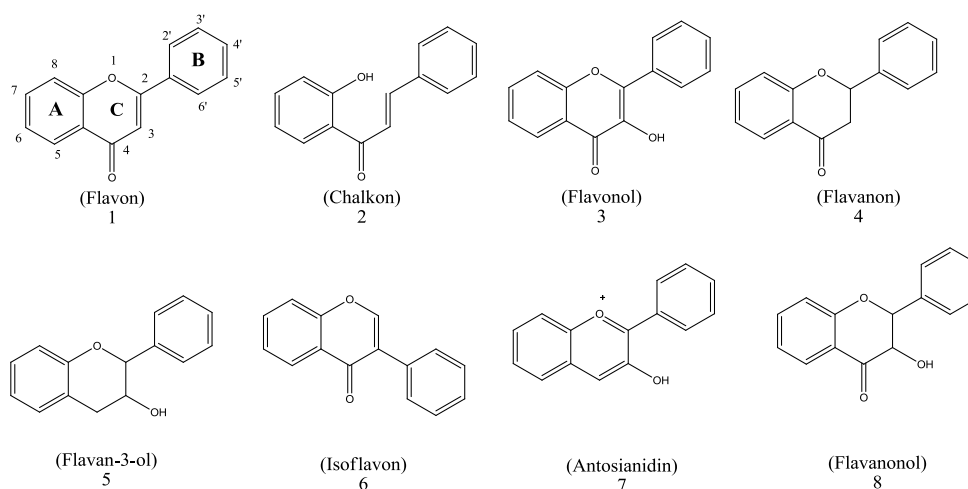


Gambar 3. Tiga jenis flavonoid (Achmad, 1986).

Menurut Harborne (1987) dan Markham (1988) flavonoid yang terdapat pada tanaman dapat digolongkan menjadi dua yaitu glikosida dan aglikon. Glikosida merupakan flavonoid yang mengandung gugusan gula dan cenderung bersifat polar sehingga mudah larut dalam air, metanol, etanol, dan lain-lain. Aglikon sendiri merupakan flavonoid tanpa gugusan gula terikat, aglikon yang kurang polar ini lebih larut dalam pelarut eter dan kloroform. Aglikon yang kurang polar tersebut antara lain isoflavan, flavanon, flavon, dan flavonol termetoksilasi. Menurut Achmad (1986) suatu bentuk glikosida akan terurai menghasilkan gugus gula dan aglikon apabila dihidrolisis oleh asam. Glikosilasi

menyebabkan flavonoid kurang efektif dan lebih mudah larut dalam air sehingga memungkinkan penyimpanan flavonoid (termasuk antosianin) di dalam vakuola sel, tempat di mana flavonoid bisa ditemukan (Markham, 1988).

Senyawa flavonoid terdiri dari beberapa jenis, tergantung pada tingkat oksidasi rantai propana dari sistem 1,3-diaril propana. Struktur kimia dari beberapa jenis flavonoid ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur kimia dari beberapa jenis flavonoid (Tapas *et al.*, 2008).

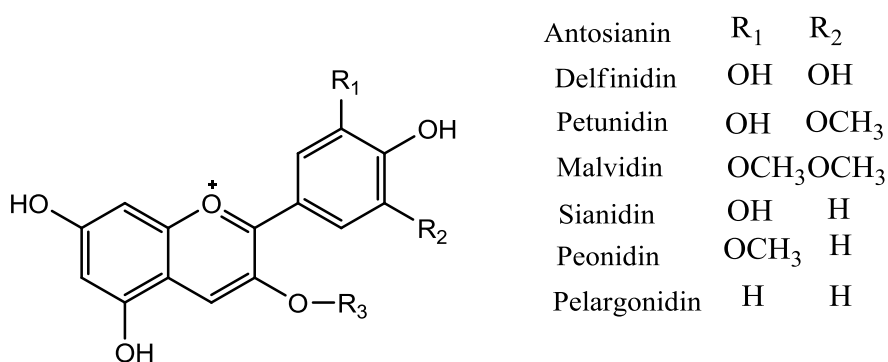
C. Antosianin

Antosianin ialah pigmen daun bunga merah sampai biru yang biasa, (meskipun apigenidin kuning), banyaknya sampai 30% bobot kering dalam beberapa bunga. Antosianin terdapat juga dalam bagian lain tumbuhan tinggi dan seluruh dunia tumbuhan kecuali fungus. Tidak seperti golongan flavonoid lain, antosianin tampaknya selalu terdapat dalam bentuk glikosida kecuali aglikon antosianidin (Robinson, 1995).

Antosianidin adalah aglikon antosianin yang terbentuk bila antosianin dihidrolisis dengan asam. Antosianidin yang paling umum dikenal adalah sianidin

yang berwarna merah lembayung. Warna jingga disebabkan oleh pelargonidin yang gugus hidroksilnya kurang satu dibandingkan sianidin, sedang warna merah senduduk, lembayung, dan biru umumnya disebabkan oleh delphinidin yang gugus hidroksilnya lebih satu dibandingkan sianidin. Tiga jenis ester metil antosianidin juga sangat umum, yaitu peonidin yang merupakan turunan sianidin serta petunidin dan malvidin yang terbentuk dari delphinidin. Masing-masing antosianidin tersebut sebagai sederetan glikosida (yaitu sebagai antosianin) dengan berbagai gula yang terikat. Keragaman utama adalah sifat gulanya (sering kali glukosa, tetapi mungkin juga galaktosa, ramnosa, xilosa, atau arabinosa), jumlah satuan gula (mono-, di-, atau triglikosida), dan letak ikatan gula (biasanya pada 3-hidroksi atau pada 3- dan 5-hidroksi) (Harborne, 1996).

Kerangka dasar antosianin dan jenis-jenis aglikon antosianin yang biasa ditemukan pada tanaman ditampilkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Kerangka dasar antosianidin dan namanya dengan substituen yang berbeda.

Antosianin merupakan bentuk flavonoid yang paling teroksidasi, dengan cincin karbon yang sepenuhnya tidak jenuh dan memiliki gugus hidroksil pada posisi 3. Struktur dasarnya adalah suatu aglikon, atau antosianidin, dengan satu atau lebih gula yang terikat, biasanya pada C₃, C₅, atau C₇ dan memiliki

kemungkinan esterifikasi pada gula. Saat ini telah ditemukan 19 jenis antosianidin yang terdapat di alam. 6 jenis antosianidin yang paling umum terdapat pada tanaman-tanaman pangan yaitu, pelargonidin, peonidin, cyanidin, malvidin, petunidin, dan delphinidin. Peonidin dan sianidin tersubstitusi pada posisi 3' dan 4'; petunidin, malvidin dan delphinidin tersubstitusi pada posisi 3', 4', dan 5'; sedangkan pelargonidin hanya tersubstitusi pada satu posisi (Welch *et al.*, 2008).

Sifat fisika dan kimia dari antosianin dilihat dari kelarutan antosianin larut dalam pelarut polar seperti metanol, aseton, atau kloroform, terlebih sering dengan air dan diasamkan dengan asam klorida atau asam format (Socaciu, 2007). Antosianin stabil pada pH 3,5 dan suhu 50°C mempunyai berat molekul 207,08 gram/mol dan rumus molekul $C_{15}H_{11}O$ (Fennema, 1996). Antosianin dilihat dari penampakan berwarna merah, ungu dan biru mempunyai panjang gelombang maksimum 515-545 nm, bergerak dengan eluen BAA (n-butanol-asam asetat-air) (Harborne, 1996).

Sumber senyawa antosianin selain yang telah ditampilkan pada Tabel 1, yaitu Manggis (Chaovanalikit *et al.*, 2012), kopi (Murthy *et al.*, 2012), buah senggani (Kristiana dkk., 2012), *blackberry* dan *sweet cherry* (Oancea *et al.*, 2013), bunga rosella (Moulana *et al.*, 2012), buah sikaduduk (Arja dkk., 2013), wortel hitam (Turker *et al.*, 2004), buah arben (Tensiska dkk., 2007), buah salam (Ariviani, 2010) dll.

Antosianin telah dimasukkan ke dalam pola makan manusia sejak beberapa abad yang lalu. Antosianin merupakan komponen dalam obat-obatan herbal tradisional yang digunakan oleh suku Indian di Amerika Utara, Eropa, dan Cina, dan biasanya didapatkan dari daun yang dikeringkan, buah-buahan (*berry*),

akar, atau biji. Campuran atau ekstrak yang kaya kandungan antosianin (walaupun belum dimurnikan), sejak dahulu telah digunakan untuk mengobati kondisi yang bermacam-macam, seperti hipertensi, pileksia, kelainan pada hati, disentri dan diare, permasalahan saluran urin seperti batu ginjal dan infeksi saluran kemih, serta demam biasa. Antosianin bahkan telah dikembangkan untuk memperbaiki pengelihan dan sirkulasi darah (Konczak and Zhang, 2004).

D. Teknik Isolasi Antosianin

1. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi padat-cair. Prinsip teknik ini yaitu sampel ditempatkan dalam suatu wadah yang tertutup, dan selanjutnya ditambahkan pelarut yang dapat melarutkan analit yang diinginkan. Sampel dibiarkan berada dalam pelarut selama beberapa jam hingga satu malam hingga ekstraksi berjalan optimal. Selama proses maserasi, sampel diaduk secara berkala. Selanjutnya larutan dipisahkan dari padatan sampel dengan menggunakan kertas saring atau dapat juga didekantir atau disentrifugasi untuk memisahkan larutan dari padatan yang tidak larut (Settle, 1997).

2. Freeze Drying

Kadar air dalam suatu sampel atau ekstrak seringkali memiliki efek yang nyata dan mengganggu dalam proses pemurnian suatu senyawa organik. Perlakuan standar yang biasa dilakukan adalah pengeringan sampel dengan menggunakan oven hingga didapatkan bobot yang konstan. Namun, sampel biologis sebaiknya tidak dipanaskan lebih dari 100°C

sehingga kandungan senyawa didalamnya tidak terdekomposisi atau hancur. *Freeze drying* atau liofilisasi adalah suatu metode pengeringan sampel tanpa menggunakan panas. Metode ini cocok dilakukan untuk sampel yang sensitif terhadap panas, sampel yang mengandung senyawa yang mudah teroksidasi dalam kondisi panas (termolabil), atau sampel yang memiliki kandungan analit yang volatil. *Freeze drying* mula-mula dilakukan dengan membekukan sampel, selanjutnya kandungan air di dalamnya dikeluarkan dari sampel yang beku tersebut dengan bantuan vakum (Settle, 1997).

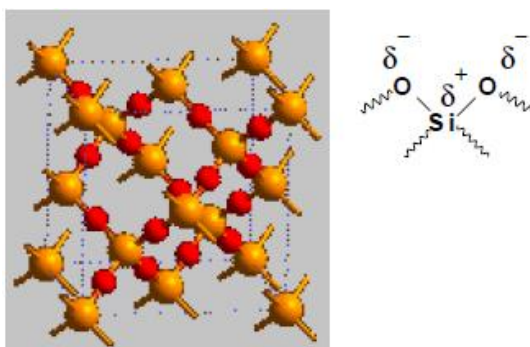
3. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah teknik pemisahan dua atau lebih senyawa atau ion dengan cara distribusi senyawa tersebut diantara dua fase, yang satu bergerak, dan fase yang lainnya diam. Kedua fase ini dapat berupa padat-cair, cair-cair, gas-padat, atau gas-cair. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah jenis kromatografi padat-cair, dengan fasa diamnya biasanya absorbent polar dan fasa geraknya dapat berupa satu jenis pelarut atau berupa campuran. KLT merupakan teknik pemisahan skala mikro yang cepat dan murah yang dapat digunakan untuk :

- ⇒ Menentukan jumlah komponen dalam campuran
- ⇒ Menguji identitas suatu senyawa
- ⇒ Memantau perkembangan suatu reaksi
- ⇒ Menentukan kondisi yang cocok untuk kromatografi kolom
- ⇒ Menganalisa fraksi yang didapatkan dari kromatografi kolom

Ada 3 faktor utama yang harus diperhatikan dalam kromatografi, yaitu kepolaran dan ukuran molekul, kepolaran fasa diam, dan kepolaran

pelarut. Pada KLT, fasa diam biasanya berupa alumina ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)_n atau silika gel ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)_n. Ikatan kovalen pada absorben ini menyebabkan material ini sangat polar. Struktur silika ditunjukkan pada Gambar 6. (Sastrohamidjojo, 2002).



Gambar 6. Struktur silika penyusun fasa diam KLT (Sastrohamidjojo, 2002).

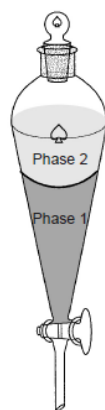
Untuk menghitung secara kualitatif, KLT juga memiliki pengukuran secara kromatografi yang dikenal sebagai nilai R_f . Nilai R_f merupakan nilai faktor retensi suatu senyawa yang nilainya berupa angka desimal. Nilai R_f dapat dihitung dengan cara:

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh sampel}}{\text{jarak tempuh pelarut}}$$

4. Partisi (ekstraksi cair-cair)

Ekstraksi cair-cair adalah salah satu teknik pemisahan yang penting digunakan dalam lingkungan, klinik, dan laboratorium industri. Dalam ekstraksi cair-cair sederhana, zat terlarut dipartisi diantara dua fase yang tidak saling bercampur. Biasanya fase yang satu adalah fase air, dan fase lainnya adalah fase pelarut organik, seperti dietil eter atau kloroform. Kedua fase tersebut tidak bercampur, sehingga terbentuklah dua lapisan, dan fase yang memiliki masa jenis lebih besar berada di bawah. Pada

awalnya, zat terlarut hanya berada dalam satu fase, tetapi setelah ekstraksi zat terlarut terbagi menjadi terlarut dalam dua fase (Harvey, 2000). Untuk melakukan partisi, digunakan alat yang bernama corong pisah seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Corong pisah yang digunakan dalam ekstraksi cair-cair (Harvey,2000).

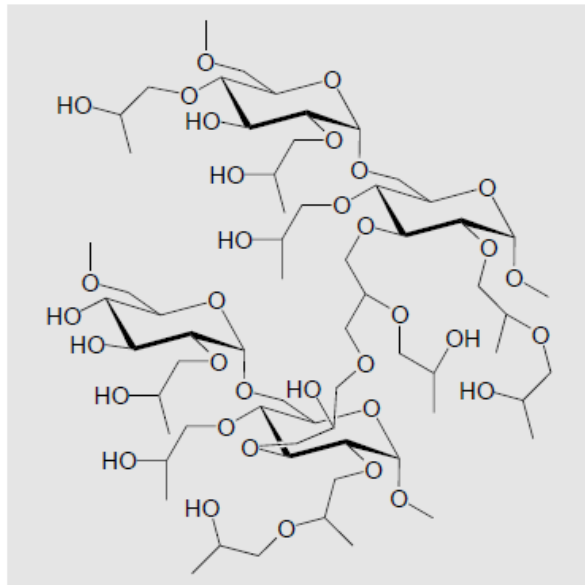
5. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah teknik pemisahan yang umum dan sangat berguna dalam kimia organik. Metode pemisahan ini memiliki prinsip yang sama dengan KLT, tapi dapat diaplikasikan untuk memisahkan sampel dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan KLT. Kromatografi kolom dapat digunakan baik dalam skala besar maupun skala kecil. Teknik ini dapat diaplikasikan pada berbagai disiplin ilmu, seperti biologi, biokimia, mikrobiologi, dan obat-obatan. Banyak jenis antibiotik yang telah dimurnikan dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom memungkinkan kita untuk memisahkan dan mengumpulkan masing-masing senyawa dalam *beaker glass* yang berbeda-beda.

Sebagaimana pada metode KLT, alumina dan silika gel merupakan fasa diam yang paling populer digunakan dalam kromatografi kolom. Dengan menggunakan fasa diam ini, sampel yang lebih polar akan lebih lama berikatan dengan fasa diam, sementara sampel yang kurang polar akan terelusi terlebih dahulu dari kolom, diikuti dengan komponen dengan kepolaran yang semakin meningkat secara berurutan (Sastrohamidjojo, 2002).

Selain alumina dan silika gel, fasa diam yang biasa digunakan dalam kromatografi kolom adalah Sefadeks LH-20. Sefadeks LH-20 memisahkan komponen sampel berdasarkan ukuran molekulnya. Metode ini biasanya digunakan untuk memisahkan steroid, terpenoid, lipid, dan peptida dengan bobot molekul yang rendah (sekitar lebih dari 35 residu asam amino).

Sefadeks LH-20 adalah dekstran yang memiliki ikatan silang, yang telah terhidroksipropilasi sehingga menghasilkan media kromatografi yang memiliki sifat ganda, sebagai hidrofilik dan lipofilik. Struktur kimia dari Sefadeks LH-20 ditunjukkan dalam Gambar 8.



Gambar 8. Struktur kimia dari Sefadeks LH-20 (Anonim, 2014).

Beberapa sifat fisika dan kimia secara umum dari Sefadeks LH-20 ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat kimia dan fisika dari Sefadeks LH-20 (Anonim, 2014).

Parameter	Keterangan
Ukuran partikel	Kering : 18-111 μm
	Dalam Metanol : 27-163 μm
Stabil dalam pH	2-13
Kestabilan kimia	Stabil dalam sebagian besar larutan berair dan sistem pelarut organik Tidak stabil dalam pH < 2, dan dengan adanya agen oksidator
Temperatur operasi	4 sampai 40° C
Daya simpan	5 tahun

Sebelum digunakan, Sefadeks LH-20 dikembangkan terlebih dahulu dengan cara direndam dalam pelarut yang akan digunakan untuk mengelusi senyawa yang akan dipisahkan. Pengembangan dilakukan selama minimal 3 jam hingga 1 malam. Pelarut yang dapat digunakan untuk pengembangan dan volume akhir Sefadeks LH-20 setelah pengembangan ditampilkan pada Tabel 3. Jenis

pelarut yang hanya mengembangkan Sefadeks LH-20 hingga volume < 2,5 mL/g gel kering biasanya tidak digunakan.

Tabel 3. Volume rata-rata Sefadeks LH-20 setelah dikembangkan dalam pelarut yang berbeda (Anonim, 2014).

Pelarut	Volume rata-rata (mL/gram gel kering)
Dimetil Sulfoksida	4.4–4.6
Piridina	4.2–4.4
Air	4.0–4.4
Dimetil formamida	4.0–4.4
Metanol	3.9–4.3
Salin	3.8–4.2
Etilen diklorida	3.8–4.1
Kloroform	3.8–4.1
Propanol	3.7–4.0
Etanol	3.6–3.9
Isobutanol	3.6–3.9
Formamida	3.6–3.9
Metilen diklorida	3.6–3.9
Butanol	3.5–3.8
Isopropanol	3.3–3.6
Tetrahidrofuran	3.3–3.6
Dioxan	3.2–3.5
Aseton	2.4–2.6
Asetonitril	2.2–2.4
Karbon tetraklorida	1.8–2.2
Benzena	1.6–2.0
Etil asetat	1.6–1.8
Toluena	1.5–1.6

6. Kromatotron

Kromatografi digunakan pada beberapa teknik pemisahan berdasarkan pada “*migration medium*” yang berbeda, yaitu distribusinya terhadap fase diam dan fase gerak. Terdapat 3 hal yang wajib ada pada teknik ini, yang pertama yaitu harus terdapat medium perpindahan tempat, yaitu tempat terjadinya pemisahan. Kedua harus terdapat gaya dorong agar

spesies dapat berpisah sepanjang “*migration medium*”. Ketiga harus terdapat gaya tolakan selektif. Gaya yang terakhir ini dapat menyebabkan pemisahan dari bahan kimia yang dipertimbangkan (Sienko *et al.*, 1984).

Kromatotron memiliki prinsip yang sama seperti kromatografi klasik dengan aliran fase gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal. Kromatografi jenis ini menggunakan rotor yang dimiringkan dan terdapat dalam ruang tertutup oleh plat kaca kuarsa, sedangkan lapisan penyerapnya berupa plat kaca yang dilapisi silika gel. Plat tersebut dipasang pada motor listrik dan diputar dengan kecepatan 800 rpm. Pelarut pengelusi dimasukkan kebagian tengah plat melalui semacam alat infus, sehingga dapat mengalir dan merambat melalui plat silika karena adanya gaya sentrifugal.

Untuk mengetahui jalannya proses elusi, dimonitor dengan menggunakan lampu UV. Gas nitrogen dialirkan ke dalam ruang plat untuk mencegah pengembunan pelarut pengelusi dan mencegah oksidasi sampel. Pemasukan sampel diikuti dengan pengelusan menghasilkan pita-pita komponen berupa lingkaran sepusat. Pada tepi plat, pita-pita akan terputar keluar dengan gaya sentrifugal dan ditampung dalam botol fraksi, diidentifikasi dengan KLT (Hossettmann *et al.*, 1995).

E. Penentuan Struktur Antosianin

1. Spektrofotometri UV-Vis

Dalam spektroskopi UV-VIS penyerapan sinar tampak dan ultraviolet oleh suatu molekul akan menghasilkan transisi diantara tingkat

energi elektronik molekul tersebut. Transisi tersebut pada umumnya antara orbital ikatan, orbital *non*-ikatan atau orbital anti-ikatan. Panjang gelombang serapan yang muncul merupakan ukuran perbedaan tingkat-tingkat energi dari orbital suatu molekul (Sudjadi, 1983).

Metode Spektrofotometri ini berguna untuk mengetahui jenis flavonoid. Selain itu, kedudukan gugus fungsi hidroksil pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan cara menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak yang terjadi. Spektrum khas flavonoid terdiri dari dua pita yaitu pada rentang 240-285 nm (Pita II) dan 300-550 nm (Pita I). Letak serapan pita tepat dan kekuatan dari pita tersebut akan memberikan informasi yang berguna mengenai sifat flavonoid (Markham, 1988). Rentang utama yang diperkirakan untuk setiap jenis flavonoid dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rentang serapan spektrum ultraungu-tampak untuk flavonoid.

Pita II	Pita I (nm)	Jenis Flavonoid
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250-280	350-385	Flavonol (3- OH bebas)
245-275	310-330	Isoflavon
275-295	300-390	Flavanon dan dihidroflavon
230-270	340-390	Calcon
230-270	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianidin dan antosianin

Dengan menggunakan data yang diperoleh dari analisis berdasarkan spektrofotometer ultraviolet-tampak ini kita dapat mengetahui absorptivitas molar senyawa yang diperoleh. Absorptivitas molar senyawa dihitung dengan menggunakan persamaan Lambert-Beer berikut :

$$A = \varepsilon b c \text{ atau } \varepsilon = \frac{A}{b.c}$$

Keterangan:

A	= absorbansi
ε	= absorptivitas molar
b	= tebal sel (cm)
c	= konsentrasi (mol/liter)

Absorbansi (A) ini diperoleh dari data spektrum dimana terdapat puncak-puncak serapannya. Tebal sel (b) adalah ketebalan sel dalam alat yang digunakan, sedangkan konsentrasi (c) dapat diperoleh dengan menggunakan persamaan :

$$\text{Konsentrasi (c)} = \frac{\text{mol}}{L} = \frac{g}{BM.L}$$

Keterangan:

g	= Massa senyawa hasil isolasi (gram)
BM	= Berat molekul relatif (gram/mol)
L	= Volume larutan yang digunakan (L)

2. Spektrofotometri LC- MS

Spektrofotometri LC-MS merupakan jenis kromatografi yang digunakan dalam kimia organik untuk pemisahan dan analisis. LC dapat digunakan untuk menguji kemurnian dari bahan tertentu atau memisahkan berbagai komponen dari campuran. Dalam beberapa situasi, LC dapat membantu dalam mengidentifikasi sebuah senyawa kompleks. Dalam kromatografi cair, fase yang bergerak atau *mobile phase* adalah sebuah operator cair yang biasanya pelarut murni (> 99%) seperti metanol, aseton, air, dan pelarut jenis lainnya. *Stationary* atau fasa diam merupakan tahap mikroskopis lapisan cair atau polimer yang mendukung pelarut murni di dalam bagian dari sistem pipa-pipa kaca atau logam yang disebut kolom.

Instrumen yang digunakan untuk melakukan kromatografi cair (LC) disebut *liquid chromatograph*. LC-MS yang digunakan adalah LC-MS jenis Shimadzu LC-20AD (Prominence Liquid Chromatography) Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) dengan Spektrofotometri massa jenis AB SCIEX *Triple quadrupole ion Trap* (3200 Q TRAP LC/MS/MS System).

F. Pengukuran Kadar Antosianin Total Dengan Metode Perbedaan pH.

Salah satu jenis senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak umbi ubi jalar ungu adalah antosianin. Karena itu perlu dilakukan penghitungan kadar antosianin total dalam ekstrak umbi ubi jalar ungu. Metode yang digunakan adalah metode perbedaan pH yang prinsipnya adalah mengukur absorbansi warna ungu dari antosianin dalam sistem pelarutnya pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm (Ariviani, 2010).

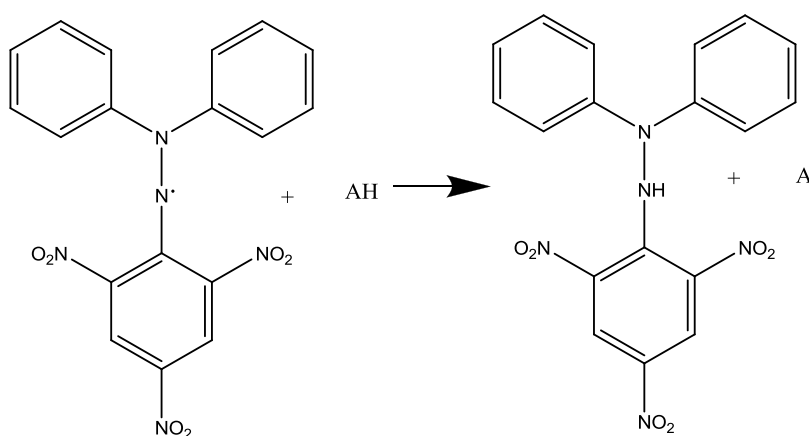
G. Pengujian Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron yang berada di sekitarnya sehingga dapat memicu timbulnya penyakit (Sunarni, dkk., 2007).

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting dalam kesehatan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan mengurangi risiko berbagai penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung koroner. Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu

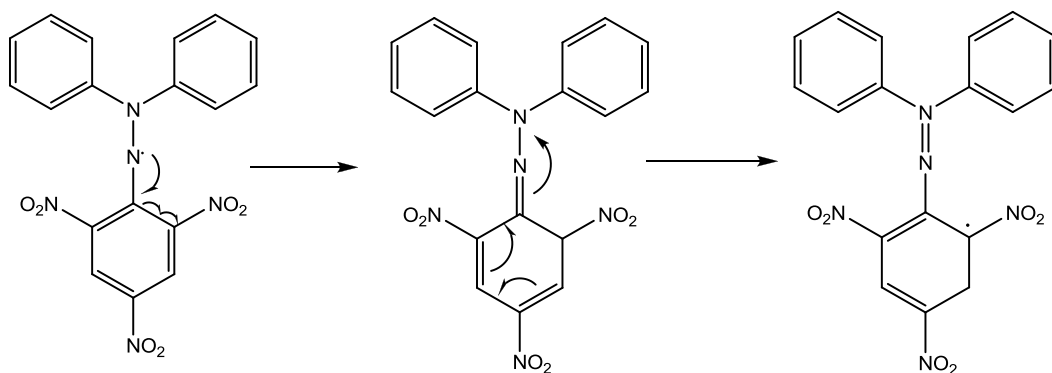
antioksidan alami merupakan antioksidan hasil ekstraksi bahan alami dan antioksidan buatan (sintetik) merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia. Karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya menangkap radikal bebas (Prakash, 2001). Antosianin diketahui dapat berfungsi sebagai antioksidan (Jordheim, 2007), sehingga nilai aktivitas antioksidan dari senyawa antosianin tertentu dapat diukur.

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, dkk.,2007). Struktur DPPH sebelum dan setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9.Reaksi senyawa DPPH dan antioksidan (Pratiwi dkk., 2013).

DPPH merupakan bentuk seyawa radikal yang stabil, karena DPPH dapat mengalami perpindahan elektron (resonansi) pada strukturnya. Gambar resonansi pada struktur DPPH ditampilkan pada Gambar 10.



Gambar 10. Resonansi pada struktur DPPH (Pratiwi dkk., 2013).

Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel padat maupun cairan, dan tidak spesifik kepada salah satu bagian komponen antioksidan, melainkan mengukur kapasitas antioksidan sampel secara keseluruhan. Pengukuran kapasitas antioksidan suatu makanan dapat membantu untuk mengerti sifat fungsional dari makanan (Prakash *et al.*, 2013).