

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI TAUCO DENGAN METODE DPPH****<sup>1</sup>Ade Zuhrotun, <sup>2</sup>Arina Syifa Hidayati, <sup>3</sup>Resmi Mustarichie, <sup>4</sup>Wiwiek Indriyati***<sup>1,2,3,4</sup>Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jl Raya Bandung-Sumedang KM 21 Jatinangor, Sumedang**e-mail: airkusaja@yahoo.com*

**Abstrak.** *Tauco merupakan salah satu bahan makanan tradisional Indonesia yang terbuat dari fermentasi kedelai. Kedelai telah lama dikenal sebagai sumber alami antioksidan. Kedelai merupakan kelompok tanaman penghasil flavonoid alami, yaitu golongan isoflavon. Proses fermentasi pada tauco akan meningkatkan kandungan isoflavon bebas dalam tauco sehingga diharapkan aktivitas antioksidan akan meningkat. Antioksidan merupakan suatu senyawa yang memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi tauco. Tauco diekstraksi dengan menggunakan metode sokletasi kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) dengan vitamin C sebagai pembanding. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan aktivitas antioksidan paling kuat dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 722,38 ppm, diikuti dengan ekstrak etanol, fraksi air, dan fraksi n-heksana dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 1.192,71; 1.746,01; dan 1.845,45 ppm.*

**Kata kunci:** *Tauco, flavonoid, antioksidan, radikal bebas, DPPH*

## 1. Pendahuluan

Tauco merupakan salah satu bahan makanan tradisional yang berasal dari Indonesia dan banyak ditemukan khususnya di daerah Jawa Barat. Tauco berbentuk pasta, dapat ditemukan dalam bentuk tauco kering dan tauco basah. Tauco adalah satu produk olahan kedelai yang diperoleh dari teknik fermentasi. Fermentasi ini bertujuan meningkatkan cita rasa tauco, selain itu juga dapat meningkatkan kandungan gizi yang terdapat dalam kedelai sehingga tauco umumnya digunakan masyarakat sebagai bahan penyedap makanan (Purwaningsih, 2007).

Tauco umumnya terbuat dari kedelai kuning. Kedelai termasuk kelompok tanaman penghasil flavonoid alami, yaitu golongan isoflavon. Kedelai diketahui memiliki aktivitas biologis sebagai antioksidan, efek estrogenik, antiosteoporosis, dan antikanker (Samruan, 2012).

Senyawa yang berperan sebagai antioksidan pada kedelai adalah isoflavon. Isoflavon merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas (Pawiroharsono, 1996). Isoflavon glikosida merupakan komponen utama pada kedelai dan produk kedelai nonfermentasi, sementara pada produk fermentasi kedelai ditemukan isoflavon bebas (aglikon) dalam jumlah yang melimpah (Chen dan Wei, 2008). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Hutriadi (2001), tauco mengandung senyawa daidzein dan genistein. Genistein dan daidzein termasuk ke dalam senyawa isoflavon bebas yang terbentuk dari proses fermentasi kedelai (Pawiroharsono, 2001). Genistein merupakan antioksidan yang paling kuat di dalam kedelai, diikuti daidzein (Hassan, 2006).

Antioksidan merupakan senyawa yang memiliki kemampuan untuk melindungi sel dan jaringan dari ancaman kerusakan yang disebabkan oleh keberadaan radikal bebas yang bersifat reaktif (Figuroa, 2014). Antioksidan akan bereaksi dengan radikal bebas membentuk senyawa nonradikal yang relatif stabil (Winarsi, 2007). Kuat atau tidaknya aktivitas antioksidan dapat dilihat dari nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% oksidasi. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka aktivitas antioksidan akan semakin tinggi (Fitriani, 2014).

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan pada kedelai telah banyak dilakukan, namun penelitian mengenai aktivitas antioksidan pada produk fermentasi kedelai belum banyak dilakukan, khususnya pada tauco. Oleh karena, itu, dalam penelitian ini akan dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas antioksidan tauco dengan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

## 2. Alat, Bahan, dan Metode

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat soklet, cawan penguap, timbangan analitis (Mettler Toledo), *rotary evaporator*, *waterbath*, vial coklat 10 mL, spektrofotometer *visible* (Analitik-Jena), kuvet, dan alat-alat yang gelas yang umum digunakan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam dan Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu sampel tauco komersial dari supermarket di wilayah Bandung, yaitu Tauco Cap Gajah Dua. Bahan kimia yang dibutuhkan adalah etanol 96% (PT. Brataco), n-heksana (PT. Brataco), toluen (PT. Brataco), asam asetat (Merck), kloroform (PT. Quadran), serbuk magnesium (PT. Brataco), amil alkohol (Merck), eter (Merck), asam klorida p.a. (Merck), pereaksi *Mayer* (Merck), pereaksi *Dragendorff* (Merck), pereaksi *Liebermann-Burchard* (Merck), pereaksi besi (III) klorida (Merck), kalium hidroksida 5% (Merck), larutan gelatin 1%, asam sulfat p.a (Merck), akuades, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich), dan vitamin C.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Hasil Pengumpulan Bahan dan Pra-Perlakuan Sampel

Sampel tauco kedelai yang digunakan merupakan tauco komersial dengan merk Tauco Cap Gajah Dua yang didapatkan dari wilayah Bandung, Jawa Barat. Kandungan air dalam tauco cukup tinggi sehingga sampel tauco perlu dikeringkan untuk menghilangkan kandungan air yang terdapat di dalamnya. Sampel tauco sebanyak 2,25 kg dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 70°C sampai didapatkan bobot yang konstan, yaitu 832,55 gram. Kandungan air yang terdapat dalam tauco yaitu 37%.

### 3.2 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi

Sampel tauco yang telah dikeringkan diekstraksi dengan menggunakan metode sokletasi. Dengan menggunakan metode sokletasi akan terjadi penyarian berulang sehingga proses ekstraksi akan lebih sempurna. Metode sokletasi ini dilakukan karena telah diketahui bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam tauco bersifat termostabil dan tidak akan rusak dengan adanya pemanasan. Selain itu, dengan metode sokletasi

jumlah sampel dan pelarut yang dibutuhkan hanya sedikit sehingga proses ekstraksi lebih efisien.

Proses ekstraksi dilakukan pada suhu 60°C selama kurang lebih 4 jam atau sampai tetesan pelarut hampir tidak berwarna. Selanjutnya, ekstrak cair yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* kemudian diuapkan diatas *waterbath* hingga didapatkan ekstrak kental dengan bobot yang konstan.

Dari 300 gram tauco kering diperoleh ekstrak kental sebesar 88,45 gram sehingga didapatkan rendemen ekstrak sebesar 29,48%.

Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dihidrolisis untuk memecah isoflavon glikosida menjadi komponen glikosida dan isoflavon bebas (aglikon). Sebanyak 10 gram ekstrak kental dihidrolisis menggunakan HCl dan metanol dengan perbandingan 1:1. Proses hidrolisis dilakukan selama 2 jam pada suhu 40°C dengan tujuan mempercepat reaksi pemutusan gugus glikosida dari komponen isoflavon glikosida. Hasil hidrolisis kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut metanol. Residu kemudian difraksinasi untuk menarik senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut air, etil asetat, dan *n*-heksana. Fraksi yang didapat yaitu fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksana dengan rendemen fraksi berturut-turut sebagai berikut 5,69%; 1,47%; dan 0,53%.

### 3.3 Hasil Penentuan Kadar Air

Berdasarkan hasil penelitian, kadar air dalam ekstrak tauco adalah 10%. Berdasarkan literatur, kadar air dalam ekstrak tidak boleh melebihi 10% karena kandungan air yang tinggi dalam ekstrak dapat menyebabkan ekstrak rentan ditumbuhi jamur.

### 3.4 Hasil Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi-fraksi tauco. Dari hasil penapisan fitokimia terlihat bahwa ekstrak etanol dan fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, monoterpenoid, dan *sesquiterpenoid*.

### 3.5 Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan pengembang toluen: etil asetat: asam asetat dengan perbandingan 5: 4: 1. Ekstrak dan fraksi-fraksi tauco diamati pada sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm, dan penampak bercak larutan DPPH.

KLT dilakukan sebagai deteksi awal aktivitas antioksidan dalam sampel. Larutan DPPH digunakan sebagai penampak bercak untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan pada ekstrak dan fraksi dari tauco. Adanya aktivitas antioksidan ditandai dengan terbentuknya bercak berwarna kuning dengan latar berwarna ungu.

### 3.6 Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak etanol, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana dari tauco dengan menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

Uji aktivitas antioksidan metode DPPH dilakukan berdasarkan prinsip pengukuran intensitas warna ungu dari larutan DPPH berbanding lurus dengan konsentrasi DPPH. Ketika DPPH direaksikan dengan senyawa antioksidan maka DPPH akan tereduksi, dan terjadi perubahan warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning yang menandakan bahwa DPPH telah tereduksi seluruhnya. Perubahan warna ini disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH karena elektron pada radikal DPPH akan berpasangan dengan atom hidrogen dari antioksidan sehingga menjadi DPPH-H yang merupakan radikal stabil. Perubahan warna tersebut dapat diukur secara spektrofotometri.

Pada penelitian ini, masing-masing sampel ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam labu ukur 50 mL sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan induk kemudian diencerkan menjadi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Larutan DPPH dibuat dengan menimbang 2 mg DPPH dan dilarutkan dalam labu ukur 50 mL, sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm.

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan menambahkan 2 mL sampel setiap konsentrasi tertentu dengan 3 mL DPPH. Sebagai kontrol, digunakan 3 mL larutan DPPH dan 2 mL etanol 96%. Dalam setiap pengukuran digunakan blanko untuk mengurangi kesalahan akibat pengukuran absorbansi sampel. Blanko yang digunakan untuk pengujian sampel yaitu 2 mL larutan sampel dengan konsentrasi tertentu dan 3 mL etanol 96%

Sebagai pembanding digunakan vitamin C karena vitamin C diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Vitamin C mampu mendonorkan atom hidrogen untuk menstabilkan radikal bebas serta mampu mencegah reaksi berantai.

Parameter yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah *inhibition concentration* 50 ( $IC_{50}$ ), yaitu konsentrasi sampel mampu meredam 50% aktivitas DPPH dari konsentrasi awal. Nilai  $IC_{50}$  sampel diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi pada sumbu X dengan persen inhibisi pada sumbu Y.

Pengujian absorbansi masing-masing sampel pada berbagai konsentrasi dilakukan pada panjang gelombang 517 nm, kemudian dihitung nilai persen inhibisi masing-masing sampel. Semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin besar pula aktivitas peredaman radikal bebas (% inhibisi). Sampel yang bersifat sebagai antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal DPPH. Radikal DPPH akan mengalami reduksi yang ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Ketika terjadi perubahan warna tersebut, maka akan terjadi penurunan absorbansi DPPH. Semakin besar konsentrasi sampel yang digunakan, maka semakin besar pula kemampuan antioksidan mereduksi DPPH dan absorbansi yang terukur akan menurun seiring peningkatan konsentrasi sampel sehingga semakin besar konsentrasi sampel yang digunakan, maka akan semakin besar pula persen inhibisi sampel.

Nilai persen inhibisi masing-masing larutan uji dan larutan pembanding pada berbagai konsentrasi kemudian digunakan untuk membuat persamaan regresi linier. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana dari tauco secara berturut-turut adalah 1.192,71 ppm; 1.746,01 ppm; 722,38 ppm; dan 1.845,45

ppm. Namun, nilai  $IC_{50}$  sampel tauco jauh lebih besar dibanding dengan pembandingnya yaitu vitamin C.

Fraksi etil asetat memiliki nilai  $IC_{50}$  paling kecil diantara ekstrak etanol, fraksi air, dan fraksi n-heksana dari tauco sehingga dapat dikatakan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling baik dibanding dengan ekstrak etanol, fraksi air, dan fraksi n-heksana dari tauco. Tauco merupakan hasil fermentasi dari kedelai yang diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid golongan isoflavon. Isoflavon dalam kedelai dapat ditemukan dalam bentuk terikat dengan gula (isoflavon glikosida) ataupun dalam bentuk bebas (isoflavon aglikon). Dalam proses fermentasi kedelai, senyawa isoflavon aglikon akan mengalami transformasi membentuk senyawa isoflavon aglikon (Prawiroharsono, 2001). Oleh karena itu, dalam produk fermentasi kedelai, isoflavon aglikon ditemukan dalam jumlah yang melimpah (Cheng dan Wei, 2008). Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tidak sebaik aktivitas antioksidan fraksi etil asetat. Hal ini dapat disebabkan oleh kandungan isoflavon aglikon dalam ekstrak etanol tidak sebanyak dalam fraksi etil asetat. Diduga dalam ekstrak etanol, masih ada senyawa isoflavon glikosida yang belum terhidrolisis. Ketika ekstrak etanol tauco dihidrolisis maka kadar isoflavon aglikon akan meningkat. Senyawa isoflavon aglikon hasil hidrolisis ini bersifat kurang polar sehingga akan larut dalam pelarut etil asetat yang bersifat semi polar. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hutriadi (2011), tauco diketahui mengandung senyawa isoflavon aglikon, yaitu genistein dan daidzein. Kedua senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antioksidan.

Aktivitas antioksidan yang baik ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka kemampuan antioksidan untuk meredam radikal bebas akan semakin baik pula. Nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat tauco 1,65 kali lebih kuat dari ekstrak etanol tauco; 2,41 kali lebih kuat daripada fraksi air tauco; dan 2,55 kali lebih kuat daripada fraksi n-heksana tauco. Namun jika dibandingkan dengan vitamin C, fraksi etil asetat 163,77 kali lebih lemah dibanding dengan vitamin C.

## **4. Simpulan dan Saran**

### **4.1 Simpulan**

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antioksidan tauco terhadap radikal DPPH, nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanol, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana berturut-turut sebesar 1.192,71 ppm, 1.746,01 ppm, 722,38 ppm, dan 1.845,45 ppm. Dibandingkan dengan vitamin C yang memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 4,41 ppm, ekstrak dan fraksi-fraksi tauco memiliki aktivitas antioksidan yang lebih lemah daripada vitamin C.

### **4.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji aktivitas antioksidan dari tauco dengan menggunakan metode lainnya. Hal ini akan memperkuat data ilmiah mengenai aktivitas antioksidan tauco.

## Daftar Pustaka

- Chen TR, Wei QK. Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soybean and soybean products. *Nutrition and Food Science*. 2008; 36 (6) : 540-7.
- Figuerola LA, Navarro LB, Vera MP, and Petricevich VL. Antioxidant Activity, Total Phenolic And Flavonoid Contents, and Cytotoxicity Evaluation of Bougainvillea Xbutian. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 6 : 497-502.
- Fitriani V. Bebas pilih atasi radikal bebas. 2014; Tersedia di <http://www.lizaherbal.com/main/content/view/169/1> [diakses tanggal 9 September 2014].
- Hassan N. The extraction of antioxidant from soybean [Thesis]. Malaysia : University College of Engineering and Technology Malaysia; 2006.
- Hutriadi. Analisis Isoflavon dari Tempe dan Tauco dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2001.
- Pawiroharsono S. Aspek Mikrobiologi Tempe. Bunga Rampai Tempe Indonesia. Jakarta: Yayasan Tempe Indonesia; 1996.
- Pawiroharsono S. Artikel. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi; 2007.
- Purwaningsih E. Cara Pembuatan Tahu dan Manfaat Kedelai. Bekasi: Ganeca Exact; 2007
- Samruan W. Oonsivilai A. Oonsivilai R. Soybean and Fermented Soybean Extract Antioxidant Activities. *World Academy of Science, Engineering, and Technology*. 2012; 6: 1223-6.
- Winarsi H. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Ed.V. Yogyakarta: Kanisius; 2007.