

BAB I

TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Tahu

Banyak produk makanan yang dibuat dari bahan baku kedelai, salah satunya yaitu Tahu. Tahu diproduksi dengan memanfaatkan sifat protein, yaitu akan menggumpal jika bereaksi dengan asam. Senyawa penggumpal yang biasa digunakan adalah biang hasil pengepresan atau dapat pula digunakan pengganti seperti kalsium sulfat (CaSO_4) yang dikenal sebagai batu tahu atau sioko, cuka, air jeruk, larutan asam laktat, atau larutan CaCl_2 . Gumpalan protein tersebut yang kemudian disebut sebagai Tahu. Pada prosesnya, tahu diperoleh dengan cara menyaring bubur kedelai sebelum dimasak sehingga cairan tahu (*whey*) dan ampasnya terpisah (Cahyadi, 2007 dan Prabhakaran, 2006). Kadar unsur gizi dan kalori dalam *whey* sangat bervariasi, tergantung pada jumlah air yang ditambahkan atau digunakan dalam proses pembuatan tahu. Demikian pula kadar protein dalam *whey* (Prabhakaran, 2006).

Kadar lemak tahu memang tidak tinggi, namun lemak tahu tergolong bermutu tinggi karena 80% dari asam lemak penyusunnya terdiri dari asam lemak tak jenuh, sedangkan kadar asam lemak jenuh tahu sekitar 15% dan tidak mengandung kolesterol. Dilihat berdasarkan nilai NPU (*Net Protein Utilization*), protein tahu setara dengan mutu daging ayam. Mutu protein suatu bahan pangan dapat dilihat berdasarkan kandungan asam amino penyusunnya (Ronzio, 2003).

Tabel I.1. Kandungan unsur gizi dan kalori dalam kedelai basah, tahu, dan ampas tahu (Nio, 1996)

No.	Unsur Gizi	Kadar/100 g Bahan		
		Kedelai Basah	Tahu	Ampas Tahu
1	Energi (kal)	382	79	393
2	Air (g)	20	84,8	4,9
3	Protein (g)	30,2	7,8	17,4
4	Lemak (g)	15,6	4,6	5,9
5	Karbohidrat (g)	30,1	1,6	67,5
6	Mineral (g)	4,1	1,2	4,3
7	Kalsium (mg)	196	124	19
8	Fosfor (mg)	506	63	29
9	Zat Besi (mg)	6,9	0,8	4
10	Vitamin A (mcg)	29	0	0
11	Vitamin B (mg)	0,93	0,06	0,2

1.2. Flavonoid

Flavonoid adalah suatu senyawa polifenol yang tersebar di alam. Mekanisme antioksidan senyawa polifenol berdasarkan atas kemampuan untuk mendonorkan atom hidrogen (bersifat sebagai reduktor) yang kemudian berubah menjadi senyawa fenolik radikal yang terstabilkan secara resonansi sehingga tidak mudah berpartisipasi dalam reaksi radikal yang lain. Akan tetapi, dalam beberapa kondisi, misalnya pada konsentrasi senyawa fenolik yang tinggi, adanya ion-ion metal atau pH tinggi, senyawa fenolik dapat menjadi pro-oksidan. Aktivitas antioksidan flavonoid dipengaruhi oleh hidrosilasi dan terdapatnya gugus gula (Muchtadi, 2009). Selain itu, flavonoid memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks (kelat) dengan ion

logam transisi seperti besi, sehingga tidak lagi bertindak sebagai pro-oksidan (Silalahi, 2006).

Flavonoid terdapat dalam dua bentuk yaitu yang terikat pada gula sebagai glikosida dan yang tidak terikat pada gula sebagai aglikon (Harborne, 1987). Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform. Aglikon flavonoid bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Namun, jika dibiarkan dalam larutan basa dan disamping itu terdapat oksigen maka aglikon flavonoid dapat terurai (Markham, 1988).

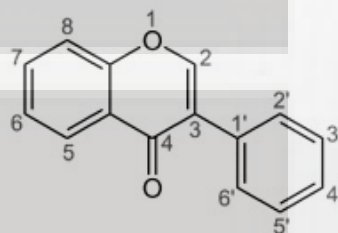
1.2.1. Isoflavon

Isoflavon termasuk golongan senyawa flavonoid yang penyebarannya terbatas dan banyak terdapat pada tanaman kacang-kacangan terutama kedelai. Kedelai mengandung isoflavon dalam jumlah tinggi. Konsumsi kedelai dan produk olahannya berhubungan dengan efek biologis, termasuk anti-karsinogenik, anti-aterosklerosis, dan anti-hemolitik yang komponen bioaktifnya adalah isoflavon. Cassidy *et al.* (1994), menyarankan konsumsi isoflavon 50 mg per hari untuk memperoleh pengaruh klinis atau biologis dalam tubuh.

Aktivitas antioksidan isoflavon dapat menghambat oksidasi LDL. Konsumsi genistin secara oral dapat meningkatkan resistensi LDL terhadap oksidasi dan menghambat oksidasi produk lipid dalam plasma. Isoflavon memiliki struktur kimia menyerupai estradiol, hormon utama wanita. Dengan kemiripan struktur ini, maka

isoflavon dapat melekat pada reseptor estrogen tubuh dan dapat digunakan oleh wanita yang mengalami gangguan menopause serta dapat membantu mengatasi osteoporosis (Preedy, 2013).

Mekanisme antioksidan isoflavon belum sepenuhnya diketahui dan diduga berbeda dengan antioksidan konvensional lain. Glukosa yang terikat dengan aglikon dapat mengurangi aktivitas antioksidan isoflavon. Isoflavon memberikan efek antioksidan bersinergi dengan asam askorbat. Diduga mekanisme antioksidan isoflavon serupa dengan tokoferol (Muchtadi, 2009).

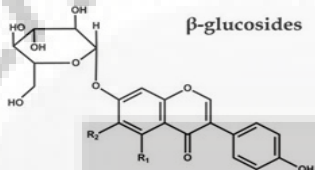
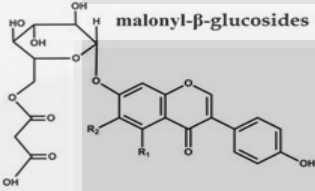
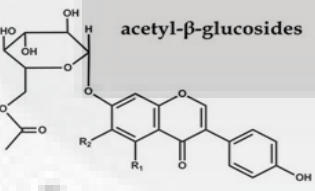
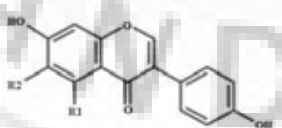


Gambar I.1. Sistem penomoran turunan isoflavon (Preedy, 2013)

Isoflavon dengan struktur dasar $C_6-C_3-C_6$, secara alami disintesis oleh tumbuh-tumbuhan dan senyawa asam amino aromatik fenilalanin dan tirosin. Biosintesis ini berlangsung secara bertahap dan melalui sederetan senyawa antara yaitu asam sinamat, asam kumarat, kalkon, dan isoflavon. Isoflavon sukar dicirikan karena reaksinya tidak khas dengan pereaksi warna manapun tetapi beberapa isoflavon tampak sebagai bercak lembayung yang pudar dengan sinar UV bila diuap amonia dan ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat. Dapat dilihat pada **Tabel I.2.** isoflavon terdiri atas 4 bentuk, yaitu aglikon, glukosida, malonil glukosida, dan asetil glukosida yang masing-masing bentuk tersebut memiliki 3 jenis isomer.

Isoflavon pada olahan kedelai non-fermentasi umumnya berada dalam bentuk glukosida, yaitu 64% genistin, 23% daidzin, dan 13% glisitin (Naim *et. al.*, 1974), sedangkan pada produk fermentasi kedelai seperti tempe, isoflavon umumnya berada dalam bentuk bebas (aglikon) (Coward *et al.*, 1998).

Tabel I.2. 3 Isomer isoflavon berdasarkan bentuk isoflavon aglikon dan glukosida (Naim *et. al.*, 1974 dan Preedy, 2013)

	Bentuk Isoflavon	Jenis Isoflavon	R1	R2
Glukosida	 <p>β-glucosides</p>	Genistin	OH	H
		Daidzin	H	H
		Glisitin	H	OCH ₃
Malonil Glukosida	 <p>malonyl-β-glucosides</p>	6''-O-malonilgenistin	OH	H
		6''-O-malonildaidzin	H	H
		6''-O-malonilglisitin	H	OCH ₃
Asetil Glukosida	 <p>acetyl-β-glucosides</p>	6''-O-asetilgenistin	OH	H
		6''-O-asetildaidzin	H	H
		6''-O-asetilglisitin	H	OCH ₃
Aglikon		Genistein	OH	H
		Daidzein	H	H
		Glisitein	H	OCH ₃

1.3. Radikal Bebas dan ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Reaksi oksidasi adalah peristiwa pelepasan elektron oleh suatu spesies kimia berupa unsur atau molekul. Oksidasi merupakan proses normal di dalam tubuh untuk

melepaskan panas dan energi bebas sebagai proses homeostasis di dalam tubuh. Namun, pada kondisi tertentu seperti infeksi, inflamasi, dan paparan *xenobiotics*, oksidasi destruktif sering terjadi. Oksigen merupakan oksidator yang diperlukan untuk kelangsungan makhluk hidup. Namun, oksigen juga merupakan sumber radikal bebas. Toksisitas oksigen berpangkal dari pembentukan senyawa oksigen yang reaktif (ROS) yang kebanyakan adalah radikal bebas (Silalahi, 2006).

Radikal bebas adalah setiap molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif dan dapat dengan mudah menyebabkan reaksi yang tidak terkontrol seperti ikatan silang (*cross-link*) pada DNA. Pembentukan radikal bebas dan reaksi oksidasi pada biomolekul akan berlangsung sepanjang hidup sehingga dijadikan sebagai penyebab utama dari proses penuaan dan berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit kardiovaskuler, aterosklerosis, dan diabetes (Silalahi, 2006). Radikal bebas yang sangat berbahaya bagi makhluk hidup adalah yang termasuk ke dalam kelompok *oxygen-centered radicals*, yaitu hidroksil (*OH), anion superoksida (*O₂⁻), alkoksil (RO*), dan peroksil (RO₂*). Radikal OH merupakan radikal yang paling toksik dan dapat mendegradasi semua makromolekul, sedangkan yang termasuk sebagai *oxygen-centered non-radicals* yaitu hidrogen peroksida (H₂O₂) dan oksigen singlet (¹O₂), bukanlah suatu radikal namun dapat dengan mudah menjurus ke reaksi-reaksi radikal bebas yang disebut sebagai inisiator radikal bebas (Muchtadi, 2009). Reaksi radikal bebas adalah reaksi rantai yang terdiri dari inisiasi (pembentukan radikal bebas),

propagasi (reaksi yang sudah terbentuk radikal bebas), dan pengakhiran atau terminasi (pembentukan radikal bebas yang stabil) (Fessenden, 1986).

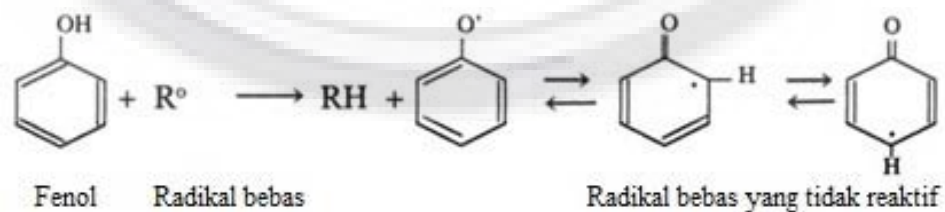
1.4. Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu molekul yang dapat menetralkan radikal bebas dengan cara menerima atau mendonorkan satu elektron untuk menghilangkan kondisi elektron tidak berpasangan. Mekanisme kerja dari antioksidan yaitu dapat menghambat atau memperlambat pembentukan radikal bebas dan ROS pada tahap awal pembentukannya (*initiation step*) serta dapat memutus rantai reaksi radikal pada tahap propagasi (*propagation step*). Antioksidan yang dikonsumsi dapat aktif secara biologis dengan mekanisme yang berbeda, termasuk: (a) bertindak sebagai senyawa pendonor hidrogen, (b) pengikat (*chelator*) ion-ion metal, atau (c) sebagai *quenchers singlet oxygen*. Suatu senyawa dapat bertindak sebagai antioksidan atau pro-oksidan, dapat ditentukan dengan melihat potensial reduksi standar 1-elektron (Muchtadi,2009).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dapat dibedakan menjadi; (1) antioksidan primer yang bekerja dengan cara mencegah terbentuknya radikal bebas yang baru dan mengubah radikal bebas menjadi molekul yang tidak merugikan, misalnya *glutation peroksidase*, (2) antioksidan sekunder berfungsi untuk menangkap radikal bebas dan menghalangi terjadinya reaksi berantai seperti vitamin C dan E, dan (3) antioksidan tersier bermanfaat untuk memperbaiki kerusakan biomolekular yang disebabkan oleh radikal bebas seperti DNA *repair enzyme* (Silalahi, 2006).

Sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas dan ROS dibagi dalam dua kelompok yaitu sistem pertahanan preventif (antioksidan endogen) dan sistem pertahanan melalui pemutusan rantai reaksi radikal (antioksidan eksogen) (Muchtadi, 2009). Akan tetapi, karena perkembangan industri yang pesat, radikal bebas yang berasal dari lingkungan dan dari kegiatan fisik semakin tinggi sehingga sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh tidak memadai. Maka, dibutuhkan tambahan antioksidan yang cukup untuk dapat menekan penyebab oksidatif yang tinggi seperti vitamin E (tokoferol) (Silalahi, 2006).

Isoflavon merupakan salah satu sumber antioksidan. Namun, mekanisme antioksidan isoflavon belum sepenuhnya diketahui dan diduga berbeda dengan antioksidan konvensional lain. Isoflavon memberikan efek antioksidan bersinergi dengan asam askorbat. Diduga mekanisme antioksidan isoflavon serupa dengan tokoferol (Muchtadi, 2009). Tokoferol adalah inhibitor yang potensial terhadap lipid peroksidasi. Tokoferol adalah suatu antioksidan yang sangat efektif, yang dengan mudah menyumbangkan atom hidrogen pada gugus hidroksil (OH) dari struktur cincin ke radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi tidak reaktif (Muchtadi, 2009).



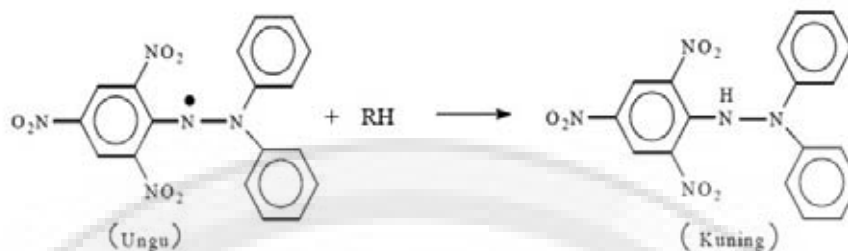
Gambar I.2. Mekanisme kerja antioksidan dari turunan fenol; flavonoid, vitamin E (Silalahi, 2006)

1.5. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Salah satu metode yang digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil yang memiliki berat molekul 394,33 dengan rumus molekul $C_{18}H_{12}N_5O_6$ (Molyneux, 2004). DPPH dapat digunakan untuk menguji kemampuan antioksidan yang terkandung dalam makanan baik sampel padat ataupun cair (Pyrzynska, 2013).

Untuk menjaga reagen agar tetap baik dalam jangka waktu yang singkat sebaiknya reagen disimpan pada suhu kamar (Pyrzynska, 2013). Selain itu, metode ini akan bekerja dengan baik jika menggunakan pelarut metanol atau etanol karena kedua pelarut ini tidak mempengaruhi reaksi antara sampel uji sebagai antioksidan dengan DPPH sebagai radikal bebas. Panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang digunakan dalam pengukuran sampel uji sangat bervariasi yaitu 515 nm - 520 nm. Namun, dalam praktiknya hasil pengukuran yang memberikan puncak maksimum itulah panjang gelombangnya tetapi berada dalam rentang 515 nm - 520 nm. Sedangkan lamanya pengukuran menurut beberapa literatur, direkomendasikan selama 30 menit (Molyneux, 2004).

Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya untuk berikatan dengan DPPH membentuk DPPH tereduksi, ditandai dengan semakin hilangnya warna ungu menjadi kuning pucat. Antioksidan akan mendonorkan proton atau hidrogen kepada DPPH dan selanjutnya akan terbentuk radikal baru yang bersifat stabil atau tidak reaktif yaitu *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (Molyneux 2004).



Gambar I.3. Pembentukan *free radical* menjadi *non-radical* (Molyneux 2004)

Kemampuan suatu senyawa untuk menangkap radikal bebas dinyatakan dalam nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration 50%*). IC_{50} adalah besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menangkap radikal bebas sebesar 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi senyawa uji dengan aktivitas penangkap radikal rata-rata. Semakin kecil nilai IC_{50} maka senyawa uji tersebut mempunyai keefektifan sebagai penangkal radikal bebas yang lebih baik (Molyneux 2004).

1.6. Spektrofotometer UV-Vis

Pada spektrofotometer UV-*visible*, pengukuran serapan dilakukan pada daerah panjang gelombang UV (190 nm - 380 nm) dan pada daerah *visible* (380 nm - 780 nm). Spektrofotometer pada dasarnya terdiri atas sumber cahaya, monokromator, kuvet, detektor, penguat arus (*amplifier*) dan alat pencatat (*recorder*) (Underwood, 2002).

Spektrofotometri UV-*Vis* merupakan teknik analisis spektroskopik yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik UV dan *visible* dengan instrumen

spektrofotometer yang didasarkan pada hukum Lambert-Beer. Berkas sinar yang datang melalui monokromator akan diteruskan menuju sampel. Sinar yang diterima oleh sampel dapat diserap atau dapat juga diteruskan menuju detektor. Sinar yang diteruskan menuju detektor tersebut selanjutnya diolah menjadi nilai absorbansi pada layar. Intensitas sinar yang diserap tergantung pada jenis senyawa yang ada dan konsentrasi dari larutan tersebut. Semakin tinggi konsentrasi suatu senyawa dalam larutan, maka semakin banyak sinar yang diserap (Fessenden, 1997). Pada spektrofotometer UV-Vis, warna yang diserap oleh suatu senyawa atau unsur adalah warna komplementer dari warna yang teramati (Underwood, 2002).