

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Pada penelitian sebelumnya oleh Walter dan Marchesan (2011), menyatakan beras hitam mengandung fenolik berupa antosianin, sianidin-3-O- β -D-glukosida dan peonidin-3-O- β -D-glukosida. Komponen lain yang teridentifikasi termasuk antosianidin sianidin dan malvidin, antosianin pelargonidin-3,5-diglukosida dan sianidin-3,5-diglukosida serta asam fenolik seperti asam ferulik, kafeat, dan protokatekuat. Pada penelitian tersebut menyebutkan kandungan total fenolik beras hitam sekitar 1,90–50,32 mgGAE/g. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Ebrahimzadeh *et al* (2013), korelasi yang baik antara nilai SPF dan kandungan total fenolik namun tidak ada korelasi antara nilai SPF dan kandungan flavonoid atau pada aktivitas antioksidan.

Perbedaan antara penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya dengan penelitian yang dilakukan ini adalah pada pengujian penentuan nilai SPF. Pada penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya menggunakan sampel ekstrak beras hitam dengan menentukan kandungan total fenolik, sedangkan pada penelitian yang dilakukan ini dengan penentuan kandungan total fenolik dan nilai SPF ekstrak beras hitam pada masing-masing konsentrasi, kemudian menghubungkan antara kandungan total fenolik dengan nilai SPF yang telah diperoleh.

B. Landasan Teori

1. Beras Hitam

Beras hitam adalah salah satu jenis beras yang semakin populer baru-baru ini dan dikonsumsi sebagai makanan fungsional sebagai alternatif makanan sehat untuk kesehatan dan pengobatan penyakit karena mengandung satu atau lebih senyawa yang dianggap mempunyai fungsi-fungsi fisiologis yang bermanfaat bagi kesehatan (Kristamtini *et al*, 2012).

a. Klasifikasi beras hitam

1) Klasifikasi beras hitam antara lain:

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Sub Kelas	: Commelinidae
Ordo	: Glumiflorae
Famili	: Poaceae/Gramineae
Sub Famili	: Oryzoideae
Suku	: Oryzeae
Genus	: Oryza
Spesies	: <i>Oryza sativa</i> L.
Sub Spesies	: <i>japonica</i> / <i>indica</i> (Vaughan <i>et al.</i> , 2008)



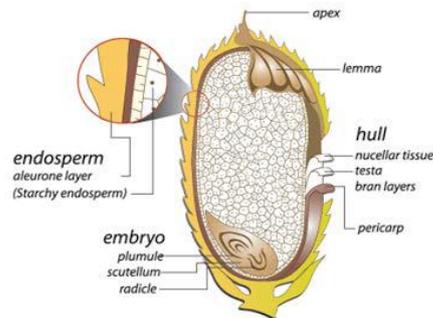
Gambar 2.1 Beras Hitam

2) Nama umum beras hitam

Di Indonesia, beras hitam dikenal dengan nama beras wulung (Solo, Jawa Tengah), beras gadog (Cibeusi, Subang, Jawa Barat), beras jlitheng atau cempo ireng (Sleman), beras melik (Bantul). Keturunan Cina kuno mengenal beras hitam sebagai beras terlarang atau *forbidden rice* (Kristamtini, 2012).

b. Anatomi beras hitam

Anatomi dari beras hitam terbagi antara lain:



Gambar 2.2 Struktur anatomi beras hitam (Suardi dan Ridwan, 2009)

- 1) Aleuron, lapis terluar yang sering kali ikut terbuang dalam proses pemisahan kulit.
- 2) Endosperma, tempat sebagian besar pati dan protein beras berada.
- 3) Embrio, yang merupakan calon tanaman baru, dimana dalam beras tidak dapat tumbuh lagi, kecuali dengan bantuan teknik kultur jaringan.

Pada beras hitam, bagian aleuron dan endosperma yang memproduksi antosianin dengan intensitas tinggi sehingga warna beras menjadi ungu pekat mendekati hitam (Suardi dan Ridwan, 2009). Beras hitam memiliki perikarp, aleuron dan endosperm yang berwarna merah-biru-ungu pekat, warna tersebut menunjukkan adanya kandungan antosianin. Beras hitam mempunyai kandungan serat pangan (*dietary fiber*) dan hemiselulosa masing-masing sebesar 7,5 dan 5,8%, sedangkan beras putih hanya sebesar 5,4 dan 2,2% (Narwidina, 2009).

c. Kandungan beras hitam

Sebagaimana beras jenis lainnya, bagian terbesar beras hitam didominasi oleh pati, sekitar 80-85%. Pati beras tersusun dari dua polimer karbohidrat (Suardi dan Ridwan, 2009), yaitu:

- 1) Amilosa, pati dengan struktur tidak bercabang.

2) Amilopektin, pati dengan struktur bercabang dan cenderung bersifat lengket.

Perbandingan komposisi kedua golongan pati ini sangat menentukan warna dari beras, apakah transparan atau tidak. Beras hitam memiliki kandungan amilosa melebihi 20% (Suardi dan Ridwan, 2009).

Tabel 2.1 Kandungan Beras Hitam

Kandungan	Kadar g/100g
Protein	17
Lemak	15
Karbohidrat	57.7
Fiber	9.7
Antosianin (mg/g)	31.3
Sianidin-3-glukosida	97.9
Peonidin-3-glukosida	2.1

(Zawaistowski *et al.*, 2009)

Beras hitam mengandung fenolik berupa antosianin, sianidin-3-O- β -D-glukosida dan peonidin-3-O- β -D-glukosida. Komponen lain yang teridentifikasi termasuk antosianidin sianidin dan malvidin, antosianin pelargonidin-3,5-diglukosida dan sianidin-3,5-diglukosida serta asam fenolik seperti asam ferulik, kafeat, dan protokatekuat. Total fenolik yang terkandung pada beras hitam sekitar 1,90–50,32 mg GAE/g (Walter dan Marchesan, 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Park dari Universitas Korea pada tahun 2008 melaporkan bahwa ekstrak antosianin dari beras hitam pada konsentrasi 100 ppm memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang hampir sama dengan aktivitas pada antioksidan sintetik butil hidroksi toluena (BHT).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ratnaningsih (2010) tentang potensi beras hitam sebagai sumber antosianin didapatkan bahwa kandungan antosianin pada beras hitam adalah sekitar 159,31-359,51 mg/100 gram. Ekstrak beras hitam memiliki kandungan antosianin dan vitamin C yang lebih tinggi dibandingkan salah satu bahan pangan lain yang mengandung zat aktif sama dengan beras hitam yaitu jagung ungu yang ekstraknya mengandung antosianin sebanyak 210,40 mg/100 gram, senyawa fenol sebanyak 35,29 %b/b

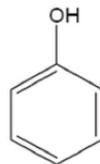
GAE (*Gallic Acid Equipment*) dan vitamin C sebanyak 593,40 mg/100 gram dengan kapasitas antioksidan 7723,91 ppm GAEAC dan IC 50% 6,08 mg/ml (Dianasari, 2014).

2. Antioksidan

Antioksidan dalam pengertian kimia, merupakan senyawa pemberi elektron. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Winarsi, 2007).

a. Fenol

Senyawa fenol adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mengandung cincin aromatik dengan satu atau dua gugus hidroksil. Fenol cenderung mudah larut dalam air. Senyawa fenol terdapat dalam berbagai jenis sayuran, buah-buahan dan tanaman yang memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiviral, dan antibiotik.

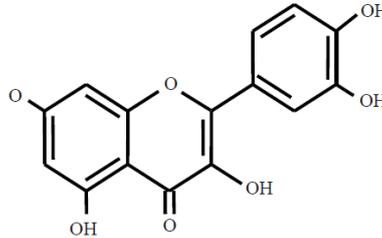


Gambar 2.3 Struktur Kimia Fenol (Vermerris, 2006)

Senyawa fenolik khususnya golongan flavonoid mempunyai potensi sebagai tabir surya karena adanya gugus kromofor (ikatan rangkap tunggal terkonjugasi) yang mampu menyerap sinar UV baik UV A maupun UV B sehingga mengurangi intensitasnya pada kulit (Wolf, *et al.*, 2001). Adanya kesamaan sistem konjugasi pada senyawa fenolik dan senyawa kimia yang biasanya terkandung di dalam tabir surya menyebabkan senyawa ini berpotensi sebagai *photoprotective* (Prasiddha *et al.*, 2016).

b. Flavonoid

Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (White dan Y. Xing, 1954).



Gambar 2.4 Struktur Kimia Flavonoid (Redha, 2010)

Berbagai jenis senyawa, kandungan dan aktivitas antioksidatif flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami yang terdapat pada sereal, sayur-sayuran dan buah, telah banyak dipublikasikan. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Cuppert *et al.*, 1954).

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan, diyakini bahwa flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidatif serta berperan dalam mencegah kerusakan sel dan komponen selularnya oleh radikal bebas reaktif (Redha, 2010).

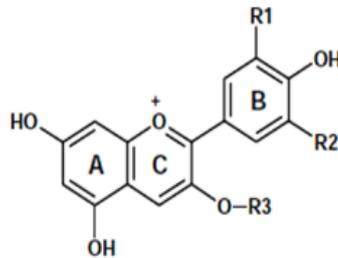
c. Antosianin

Antosianin adalah bagian dari senyawa fenol golongan flavonoid yang merupakan antioksidan kuat. Umumnya senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan primer, *chelator* dan *scavenger* terhadap superoksida anion (Santoso, 2006). Menurut Cao *et al.* (2001) antosianin merupakan glikosida dari antosianidin. Beberapa waktu lalu, diketahui variasi glikosidik diantara pigmen ini dibagi menjadi empat tipe yaitu *3-monoglycosides*, *3-diglycosides*, *3,5-diglycosides* dan *3-diglycosides-5-monoglycosides*.

Antosianin berperan dalam memberikan pigmen merah, biru, ungu hingga kehitaman pada beberapa bunga, buah, sayuran dan

sereal. Beberapa sumber antosianin yang telah dilaporkan terdapat pada buah *mulberry*, *bluberry*, *cherry*, *blackberry*, rosela, kulit dan sari anggur, stroberi dan lobak merah. Senyawa ini merupakan turunan dari *polyhydroxy* atau *polymethoxy* dari *2-phenyl-benzopyrilum* (Suhartatik *et al.*, 2013).

Kemampuan antioksidatif antosianin timbul dari reaktifitasnya yang tinggi sebagai pendonor hidrogen atau elektron, dan kemampuan radikal turunan polifenol untuk menstabilkan dan mendelokalikasi elektron tidak berpasangan, serta kemampuannya mengkhelat ion logam. Potensi kerja antioksidan antosianin ditentukan oleh jenis antosianidin, jenis *glycone*, posisi gugus hidroksil dan derajat metilasi gugus hidroksil dan gugus alifatik atau asam aromatik yang menempel pada glikosida. Antosianin bersifat polar sehingga dapat dilarutkan pada pelarut polar seperti etanol, aseton dan air (Evans *et al.*, 2007).



Gambar 2.5 Struktur Kimia Antosianin

Antosianin dipercaya dapat memberikan manfaat bagi kesehatan manusia. Antosianin diketahui memiliki aktivitas metabolik tinggi seperti antikarsinogenik, antiviral, dan efek antiinflamasi. Semua aktivitas ini didasarkan pada perannya sebagai antioksidan. Salah satu sumber antosianin yang juga merupakan sumber kekayaan alam di Indonesia selain buah dan sayuran adalah beras (*Oryza sativa*). Saat ini dikenal beberapa jenis beras yang kaya akan antosianin, seperti beras hitam (Suhartatik *et al.*, 2013).

3. Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis biota laut. Zat-zat tersebut terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda. Demikian pula ketebalannya sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya (Depkes RI, 1986).

Proses ekstraksi ini didasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Proses ini akan berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (Sudjadi, 1988).

Proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut:

1. Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, bunga, dll), pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan.
2. Pemilihan pelarut:
 - a. Pelarut polar : air, etanol, metanol, dan sebagainya
 - b. Pelarut semipolar : etil asetat, diklorometan, dan sebagainya.
 - c. Pelarut nonpolar : heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya.
3. Pemilihan metode ekstraksi.

Macam-macam metode ekstraksi bahan alam yang sering digunakan adalah ekstraksi secara panas dengan cara refluks dan penyulingan uap air dan ekstraksi secara dingin dengan cara maserasi, perkolasi, dan alat soxhlet (Depkes, 1986).

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi keseimbangan (Depkes RI, 2000). Maserasi merupakan metode paling sederhana yang sering digunakan. Dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah *inert* yang tertutup rapat pada suhu kamar.

Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak dan besar kemungkinan hilangnya senyawa, selain itu beberapa senyawa mungkin sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun disisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termostabil (Seidel, 2005).

4. *Sun Protecting Factor (SPF)*

Tabir surya adalah bahan kimia yang menyerap atau memblokir sinar UV dan menunjukkan berbagai efek immunosupresif dari sinar matahari. Ada beberapa agen yang tersedia dari kedua sumber sintetis dan alami dengan sifat penyaringan UV. Mengingat potensi keduanya untuk menghasilkan paparan lokal dan sistemik manusia yang cukup, penyaringan UV harus aman (Nohynek *et al.*, 2010). Penyaringan UV sintetis diketahui memiliki potensi toksisitas pada manusia dan juga menunjukkan kemampuan terjadi gangguan karsinogenesis (Chanchal dan Saraf, 2009).

Tabel 2.2 Keefektifan Sediaan Tabir Surya Berdasarkan Nilai SPF

No	Nilai SPF	Kategori Proteksi Berdasarkan Nilai SPF
1	2-4	Proteksi minimal
2	4-6	Proteksi sedang
3	6-8	Proteksi ekstra
4	8-15	Proteksi maksimal
5	≥15	Proteksi ultra

(Wilkinson dan Moore, 1982)

Efektivitas tabir surya biasanya dinyatakan dengan faktor perlindungan matahari (SPF), yang didefinisikan sebagai energi UV yang dibutuhkan untuk menghasilkan dosis eritema minimal (MED) pada kulit dilindungi, dibagi dengan energi UV yang dibutuhkan untuk menghasilkan MED pada kulit tak terlindungi.

(Persamaan 1) Dutra *et al* (2003):

$$SPF = \frac{\text{Dosis eritema minimal pada kulit yang terlindungi tabir surya}}{\text{dosis eritema minimal pada kulit yang tidak terlindungi tabir surya}}$$

Dosis eritema minimal (MED) didefinisikan sebagai interval waktu terendah atau dosis iradiasi sinar UV yang cukup untuk menghasilkan minimal eritema jelas pada kulit yang tidak terlindungi (Wood *et al.*, 2000). Perlindungan yang diberikan oleh tabir surya topikal terhadap paparan radiasi ultraviolet matahari dapat ditentukan secara *in vivo* atau *in vitro*. Pengujian *in vivo* dilakukan dengan menggunakan sampel sukarelawan manusia, pengujian tersebut telah digunakan selama bertahun-tahun, meskipun bermanfaat dan tepat, tetapi prosesnya lama, rumit dan mahal, terutama kurangnya informasi mengenai perlindungan tabir surya terhadap UV-A sehingga banyak dilakukan pengembangan teknik *in vitro* untuk menilai perlindungan senyawa tabir surya (Dutra *et al.*, 2003).

Metode *in vitro* pada umumnya terdapat dua jenis. Metode yang melibatkan pengukuran penyerapan atau transmisi radiasi UV melalui produk tabir surya dalam piring kuarsa atau biomembran, dan metode di mana karakteristik penyerapan agen tabir surya yang ditentukan berdasarkan analisis spektrofotometri dalam larutan encer (Mansur *et al.*, 1986).

Mansur *et al.* (1986), mengembangkan persamaan matematika yang sangat sederhana yang menggantikan metode *in vitro* yang diusulkan oleh Sayre *et al.* (1979), memanfaatkan spektrofotometri UV dan persamaan berikut:

$$SPF_{spectrophotometric} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Dimana: EE (l) = spektrum efek erythemal; I (l) = intensitas spektrum matahari; Abs (l) =- absorbansi dari produk tabir surya; CF = faktor koreksi (=10). Nilai-nilai EE x I adalah konstanta.

Tabel 2.3 Normalisasi fungsi produk digunakan dalam perhitungan SPF

Panjang Gelombang (λ nm)	EE x I (Normalisasi)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

EE = spektrum efek eritema; I = spektrum intensitas matahari

(Sayre *et al.*, 1979)

5. Kandungan Total Fenolik

Kandungan total fenolik ditentukan dengan metode menggunakan reagen Folin-Ciocalteu (FC). Reagen FC dibuat dengan campuran natrium tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), natrium molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), HCl, 85% asam fosfat, dan $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ yang menghasilkan larutan berwarna kuning yang jernih. Hasil pengukuran biasanya dinyatakan setara dengan asam galat (GAE). Asam galat digunakan karena tidak mahal, larut dalam air, mudah terkristalisasi, kering, dan stabil dalam bentuk kering (Singleton *et al.*, 1999).

Reaksi kimia dari tungstat dan molibdat sangat rumit. Senyawa isopolifosfat dalam keadaan tidak berwarna apabila keenam valensi (6^+) logamnya teroksidasi sempurna dan komponen molibdenum analog berwarna kuning. Kedua senyawa ini membentuk campuran heteropolitungstat-molibdat. Campuran ini berada dalam larutan asam dengan kompleks oktahedral terhidrasi dari oksidator logam terkoordinasi di sekeliling fosfat pusat. Reduksi dari satu atau dua elektron akan memunculkan senyawa biru seperti $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$. Pada prinsipnya, penambahan elektron ke orbital yang tidak terikat akan mereduksi nominal MoO^{+4} menjadi isostruktural MoO^{+3} (Singleton *et al.*, 1999).

Struktur tungstat cenderung mudah direduksi, namun cukup transfer satu elektron. Kondisi ketidakberadaan molibdenum membuat fosfat digunakan untuk menentukan fenol orto-dihidrat secara selektif tanpa melibatkan monofenol atau meta-dihidrat. Molibdat cenderung mudah direduksi menjadi senyawa biru yang dapat berupa Mo^{+6}

atau Mo^{+5} yang stabil. Puncak absorpsi berkisar pada kemurnian senyawa biru. Luasnya puncak ini dan tidak adanya komponen dalam sampel biologi yang dapat mengabsorpsi pada daerah ini membuat analisis dilakukan pada panjang gelombang 760 nm. Warna biru yang terbentuk pada suhu ruang berasal dari reaksi turunan fenolik yang terdata sebanyak 29 monofenol, 22 katekol, 11 pirogalol, 4 floroglusinol, 9 resorsinon, 9 *para*-hidrokuinol, 11 naftol, 6 antrasenes, 17 aglikon flavonoid, 9 glikosida, 5 hidroksikumarin, 7 aminofenol, dan 19 substansi nonfenolik (Singleton, 1999).

6. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektrofotometri UV-Vis biasanya digunakan untuk molekul dan ion anorganik atau kompleks di dalam larutan. Spektrum ini sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Dachriyanus, 2004).

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan.

$$A = a.b.c$$

Keterangan:

A = absorbansi

a = absorptivitas molar

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi

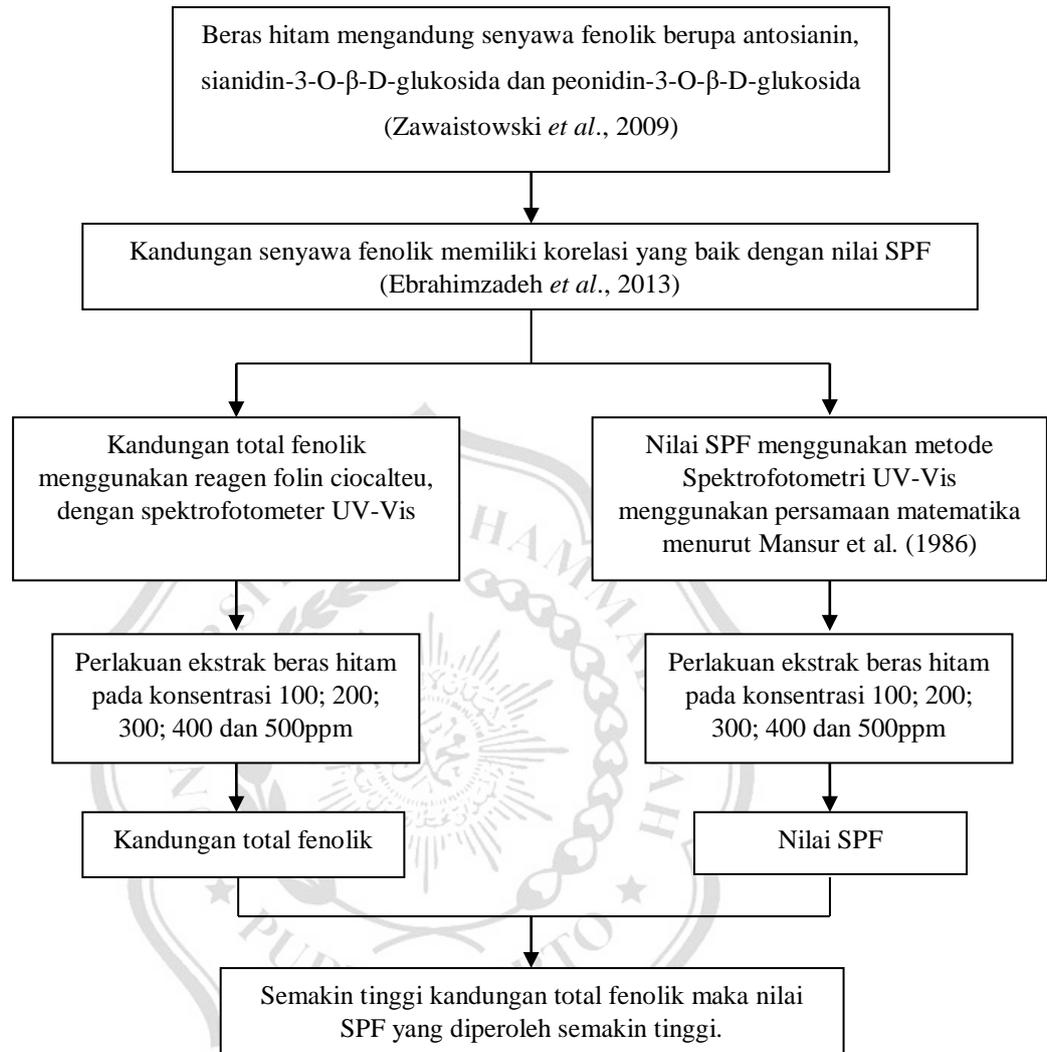
Absorptivitas molar merupakan suatu konstanta yang tidak tergantung pada konsentrasi, tebal kuvet, dan intensitas radiasi yang

mengenai larutan sampel. Absorptivitas molar tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang radiasi. Dalam hukum Lambert-Beer berlaku syarat sebagai berikut:

1. Sinar yang digunakan dianggap monokromatis.
2. Penyerapan terjadi dalam satu volume yang mempunyai penampang luas yang sama.
3. Senyawa yang menyerap dalam larutan tersebut tidak tergantung terhadap yang lain dalam larutan tersebut.
4. Tidak terjadi peristiwa fluoresensi atau fosforisensi.
5. Indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan (Gandjar dan Abdul, 2008).

Sinar ultraviolet berada pada panjang gelombang 200-400 nm sedangkan sinar tampak berada pada panjang gelombang 400-800 nm. Ketika suatu atom atau molekul menyerap cahaya maka energi tersebut akan menyebabkan tereksitasinya elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Tipe eksitasi tergantung pada panjang gelombang cahaya yang diserap. Sinar ultraviolet dan sinar tampak akan menyebabkan elektron tereksitasi ke orbital yang lebih tinggi. Sistem yang bertanggung jawab terhadap absorpsi cahaya disebut dengan kromofor (Dachyanus, 2004). Kromofor merupakan semua gugus atau atom dalam senyawa organik yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak (Gandjar dan Abdul, 2008).

C. Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka Konsep Penelitian