

## BAB II. KERANGKA PENELITIAN

### 2.1 Tinjauan Pustaka

#### 2.1.1 Gambaran Umum Tempe Kedelai

Tempe adalah salah satu produk fermentasi menggunakan kapang *Rhizopus oligosporus* yang umumnya berbahan dasar kedelai (Cahyadi, 2007). Secara umum tempe berwarna putih karena terdapat miselia kapang yang merekat pada biji-biji kedelai sehingga membentuk tekstur yang padat (Dewi dan Aziz, 2011). Proses fermentasi pada tempe tidak hanya melibatkan satu jenis kapang melainkan beberapa jenis kapang *Rhizopus* seperti *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* atau *Rhizopus arrhizus*. Sediaan fermentasi ini secara umum dikenal dengan ragi tempe (Yudana, 2003). Masyarakat dalam industri pengolahan tempe umumnya menggunakan ragi tempe dengan merek raprima.



Gambar 1. Tempe Kedelai

Ragi merupakan kumpulan dari mikroba atau mikroorganisme yang ukurannya sangat kecil. Mikroorganisme yang terkandung dalam ragi tempe umumnya berasal dari genus *Rhizopus* (Suprapti, 2003). Pengrajin tempe umumnya menggunakan ragi tempe yang dijual dipasaran yaitu merek raprima produksi LIPI Bandung. Penggunaan ragi raprima dari pasaran lebih praktis dibandingkan pengrajin harus memproduksi ragi secara mandiri (Dewi dan Aziz, 2011). Fungsi ragi tempe pada proses fermentasi kedelai adalah untuk menghidrolisis senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana menggunakan enzim. Kapang *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *R. stolonifer* dan *R. arrhizus* yang terkandung dalam ragi tempe mampu menghasilkan enzim (Sutikno, 2009).

Terdapat empat langkah penting dalam proses pembuatan tempe kedelai yaitu perendaman, perebusan, inokulasi ragi tempe dan inkubasi pada suhu kamar hingga terbentuk miselia berwarna putih (Tamam, 2019). Proses pembuatan tempe dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu suhu, kelembaban dan waktu inkubasi serta aerasi. Suhu inkubasi yang baik digunakan dalam pembuatan tempe adalah pada suhu kamar berkisar antara 20-37°C dengan kondisi tempat sedikit gelap dan suhu maksimal adalah 40°C. Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan pertumbuhan kapang tidak sempurna. Kelembaban dipengaruhi oleh lamanya fermentasi yang bervariasi dari 18-36 jam. Aerasi dapat tetap berlangsung melalui celah-celah pada kemasan karena kapang tempe membutuhkan oksigen (aerob) dalam proses pertumbuhannya (Astuti, 2009).

Tempe kaya akan serat, kalsium, vitamin B dan zat besi. Komposisi gizi tempe seperti kadar protein, lemak dan karbohidrat tidak banyak berubah dibandingkan kedelai. Adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe selama proses fermentasi menyebabkan kadar protein, lemak dan karbohidrat menjadi lebih mudah untuk dicerna di dalam tubuh (Yudana, 2003).

Kualitas atau mutu tempe telah diatur oleh Badan Standardisasi Nasional (BSN) dengan diterbitkannya standar tempe yaitu SNI 3144:2015 tentang tempe kedelai. SNI ini merupakan hasil revisi dari SNI 01-3144-2009 tentang tempe kedelai. Syarat mutu tempe kedelai berdasarkan SNI 3144:2015 disajikan pada Tabel 1.

Tempe mengandung zat antioksidan berupa karoten, vitamin E dan isoflavon. Tempe juga mengandung *superoksida dismutase* (SOD) yang dapat menghambat kerusakan sel dan proses penuaan (Cahyadi, 2006). Isoflavon pada kedelai direkomendasikan untuk dikonsumsi sebanyak 50-100 mg/hari hingga 150 mg/hari, didalam 1 gram kedelai mengandung isoflavon sebanyak 3,5 mg. Isoflavon tertinggi terdapat pada produk tempe kedelai dibandingkan dengan kedelai tanpa pengolahan (Nagata dkk., 2007). Isoflavon berperan sebagai antioksidan yang mampu mencegah terjadinya reaksi oksidasi dengan menangkap senyawa radikal dan mengubahnya menjadi senyawa yang lebih stabil dan tidak berbahaya bagi tubuh (Winarsi, 2007).

Tabel 1. Syarat Mutu Tempe Kedelai (SNI, 2015)

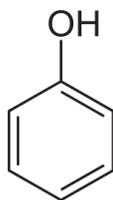
No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1.	Keadaan		
	1.1 Bau	-	Normal, khas
	1.2 Warna	-	Normal
	1.3 Rasa	-	Normal
2.	Kadar air (b/b)	%	Maks. 65
3.	Kadar abu (b/b)	%	Maks. 1,6
4.	Kadar lemak (b/b)	%	Min. 10
5.	Kadar protein (N x 625) (b/b)	%	Min. 16
6.	Kadar serat kasar (b/b)	%	Maks. 2,5
7.	Cemaran logam		
	7.1 Cadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,2
	7.2 Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 0,25
	7.3 Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40
	7.4 Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03
8.	Cemaran arsen (As)	mg/kg	Maks. 0,25
9.	Cemaran mikroba		
	9.1 Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	Maks. 10
	9.2 <i>Salmonella sp.</i>	-	Negatif

### 2.1.2 Fenol

Fenol merupakan senyawa yang berasal dari tumbuhan dan mempunyai ciri cincin aromatik dengan mengandung gugus hidroksil. Gugus aromatik yang dimiliki oleh senyawa fenol dapat menyerap kuat pada spektrum UV (Harborne, 1987). Senyawa fenol dapat memiliki aktivitas antioksidan, antitumor, antiviral dan antibiotik (Deore dkk., 2009). Senyawa fenol memiliki beberapa nama lain seperti asam karbolik, fenat monohidroksi benzena, asam fenat, asam fenilat, fenil hidroksida, oksibenzena, benzenol, monofenol, fenil hidrat, fenilat alkohol dan fenol alkohol (Nair dkk., 2008). Contoh senyawa fenol sederhana adalah katekol dan hidrokuinon (Kiessoun dkk., 2010). Struktur kimia fenol sederhana dapat dilihat pada Gambar 2.

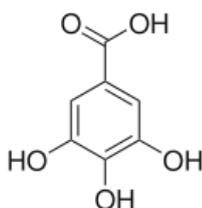
Banyaknya variasi gugus yang tersubstitusi pada kerangka utama fenol menyebabkan fenol memiliki beberapa kelompok seperti asam fenolat, asetofenon, asam fenilasetat dan fenil propanoid (Harborne, 1987). Kelompok

tersebut memiliki variasi gugus pada ikatan kimianya dengan satu gugus fenol. Kelompok fenol tersubstitusi antara lain :



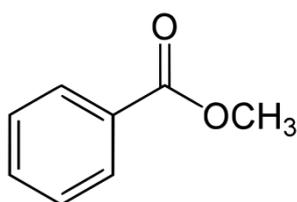
Gambar 2. Struktur Kimia Fenol Sederhana

- a. Asam fenolat, yaitu fenol yang tersubstitusi oleh gugus karboksil. Contoh asam fenolat adalah asam galat. Asam galat mempunyai gugus hidroksil dan gugus karboksilat dalam molekul yang sama dan dua molekulnya dapat bereaksi dengan yang lainnya membentuk ester (Tricone, 2013). Asam galat merupakan sebuah fenol tumbuhan alami dengan aktivitas antioksidan yang potensial digunakan sebagai efek anti kanker (Kamatham dkk., 2014). Struktur kimia asam galat dapat dilihat pada Gambar 3.

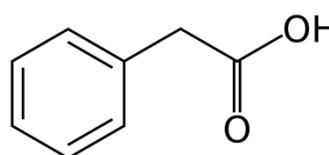


Gambar 3. Struktur Kimia Asam Galat

- b. Asetofenon dan asam fenilasetat, merupakan golongan senyawa fenol yang jarang ditemukan di alam. Asetofenon mempunyai gugus aseton yang tersubstitusi pada fenol. Asam fenilasetat juga memiliki gugus karboksil yang sama seperti asam fenolat, namun tidak berikatan langsung dengan cincin benzene. Contoh senyawa dari golongan asetofenon yaitu 2-hidroksiasetonfenon dan contoh senyawa dari golongan asam fenilasetat yaitu 2-hidroksifenilasetat (Vermerris dan Nicholson, 2007). Struktur kimia asetofenon dan asam fenilasetat dapat dilihat pada Gambar 4.



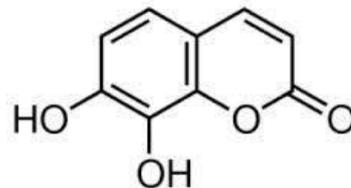
Asetofenon



Asam fenilasetat

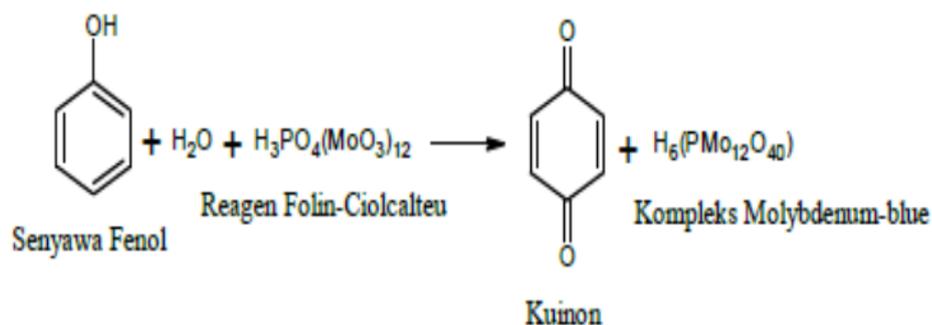
Gambar 4. Struktur Kimia Asetofenon dan Asam Fenilasetat

- c. Fenil propanoid, merupakan senyawa fenol alam yang mempunyai cincin aromatik dengan rantai samping terdiri dari tiga atom karbon. Contoh senyawa dari golongan fenil propanoid yaitu hidroksikumarin, fenilpropena dan lignin (Hasibuan, 2018). Struktur kimia fenil propanoid dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur Kimia Fenil Propanoid

Kandungan total fenol dapat diukur secara kolorimetri dengan metode Folin-Ciocalteu dan dinyatakan massa ekuivalen asam galat (Jasson, 2005). Pereaksi Folin-Ciocalteu merupakan suatu larutan kompleks yang terbentuk dari asam fosfomolibdat dan asam heteropoli fosfotungstat. Pereaksi ini terbuat dari air, natrium tungstat, natrium molibdat, asam fosfat, asam klorida, litium, sulfat dan bromin (Nurhayati dkk., 2012). Pereaksi Folin-Ciocalteu mengoksidasi fenol serta mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks *molybdeum-tungsten* (*Mo-W*). Selama reaksi berlangsung, gugus fenol-hidroksil akan bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru (Jasson, 2005). Reaksi senyawa fenol dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dapat dilihat pada Gambar 6.

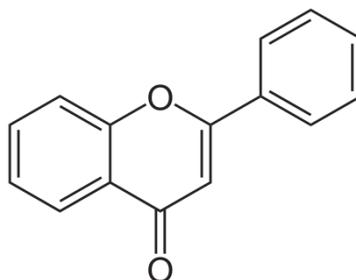


Gambar 6. Reaksi Senyawa Fenol dengan Pereaksi Folin-Ciocalteu (Kate, 2014)

### 2.1.3 Polifenol

Polifenol merupakan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun, biji dan buah dari tumbuhan tingkat tinggi (Baxter dkk., 1997). Polifenol memiliki tanda

khas yaitu memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya (Agustina, 2015). Senyawa antioksidan alami polifenol dapat bereaksi sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam dan peredam terbentuknya singlet oksigen (Pratt, 1992). Salah satu golongan dari senyawa polifenol adalah flavonoid yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon (Manitto, 1981). Struktur kimia flavonoid dapat dilihat pada Gambar 7.



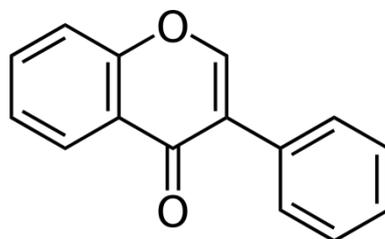
Gambar 7. Struktur Kimia Flavonoid

Flavonoid adalah suatu senyawa polifenol yang terbesar di alam (Muchtadi, 2009). Flavonoid merupakan senyawa yang umumnya ditemukan berikatan dengan gula membentuk glikosida yang menyebabkan komponen ini lebih mudah larut pada pelarut polar seperti metanol, eter dan etil asetat, namun dalam bentuk aglikon komponen flavonoid memiliki sifat yang cenderung mudah larut dalam komponen semi polar seperti kloroform dan eter (Hanani, 2014).

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, penghambat banyak reaksi oksidasi secara enzimatik maupun non enzimatik (Robinson, 1995). Berdasarkan strukturnya, flavonoid dapat diklasifikasikan menjadi flavon, flavonol, flavan-3,4-diol, leukoantosianidin, flavanon, flavanonol, isoflavon, katekin, antosianidin, auron, khalkon dan dihidrokhalkon (Sirait, 2007). Isoflavon merupakan golongan flavonoid terbanyak yang ditemukan di dalam kedelai. Struktur kimia isoflavon dapat dilihat pada Gambar 8.

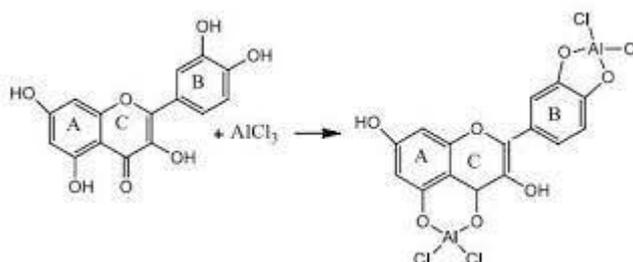
Struktur kimia dasar isoflavon hampir sama seperti flavonoid, yaitu terdiri dari 2 cincin benzena (A dan B) dan terikat pada cincin C piran heterosiklik, tetapi orientasi cincin B yang berbeda. Cincin B pada isoflavon diikat oleh karbon nomor 3, sedangkan cincin B pada flavonoid diikat oleh karbon nomor 2 (Schmidl dan Labuza, 2001). Kandungan utama isoflavon dalam kedelai adalah genistin dan daidzin. Kandungan genistin lebih banyak daripada daidzin walaupun memiliki

rasio yang bervariasi dalam produk kedelai yang berbeda. Selain kandungan utama isoflavon tersebut, terdapat kandungan isoflavon lain seperti glisitin dan biochanin A (Hughes, 1998). Senyawa isoflavon mengalami transformasi selama proses pengolahan fermentatif maupun non fermentatif terutama melalui proses hidrolisis sehingga diperoleh senyawa isoflavon bebas (aglikon) yang memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan isoflavon dalam bentuk terikat (glikon). Senyawa aglikon tersebut adalah genistein, daidzein dan glisitein (Ariani dan Hastuti, 2009). Isoflavon dalam bentuk aglikon lebih mudah diserap oleh usus halus sebagai bagian dari misel yang dibentuk oleh empedu (Schmidl dan Labuza, 2000).



Gambar 8. Struktur Kimia Isoflavon

Kandungan total flavonoid dapat ditentukan menggunakan metode kolorimetri. Prinsip pewarnaan larutan uji pada metode ini adalah senyawa  $AlCl_3$  membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keton, lalu dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu,  $AlCl_3$  juga membentuk senyawa kompleks yang labil dengan gugus ortodihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (Chang dkk., 2002). Larutan standar dalam penentuan total flavonoid menggunakan kuersetin karena paling efektif dalam menangkap radikal bebas serta menghambat berbagai reaksi oksidasi. Keberadaan flavonoid ditunjukkan dengan larutan yang berwarna kuning (Sri, 2008). Reaksi senyawa flavonoid dengan senyawa  $AlCl_3$  dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Reaksi Senyawa Flavonoid dengan Senyawa  $AlCl_3$   
(Susilowati dan Sari, 2020)

#### 2.1.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu zat yang memiliki kemampuan untuk memperlambat proses oksidasi (Irmawati, 2015). Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*) dan secara biologis dan merupakan senyawa yang mampu mengatasi dampak negatif oksidan dalam tubuh (Winarsi, 2007). Antioksidan dapat diproduksi oleh tubuh dalam bentuk enzim yang berfungsi sebagai sistem pertahanan terhadap radikal bebas. Peningkatan radikal bebas yang terjadi akibat faktor *stress*, radiasi sinar UV, polusi udara dan lingkungan mengakibatkan sistem pertahanan yang kurang memadai. Hal ini yang menyebabkan diperlukannya tambahan antioksidan dari luar (Muchtadi, 2013).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan terbagi menjadi tiga kelompok yaitu :

- a) Antioksidan Primer, yaitu antioksidan yang bekerja dengan mencegah reaksi berantai dalam pembentukan radikal bebas dengan mengubahnya menjadi senyawa yang tidak reaktif dan stabil. Antioksidan ini berperan sebagai pendonor hidrogen atau sebagai akseptor elektron. Contoh antioksidan primer adalah enzim superoksidase dismutase (Kumalaningsih, 2007).
- b) Antioksidan Sekunder, yaitu senyawa penangkap radikal bebas yang mampu mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin C, vitamin E, dan betakaroten (Kumalaningsih, 2007).
- c) Antioksidan Tersier, yaitu senyawa yang dapat memperbaiki kerusakan sel atau jaringan oleh radikal bebas. Contoh antioksidan tersier adalah metionin sulfoksidan reduktase yang dapat memperbaiki DNA di dalam sel (Atmosukarto dan Mitri, 2003).

Berdasarkan fungsinya, antioksidan diklasifikasikan menjadi 5 jenis (Miryanti dkk., 2011), yaitu :

- a) *Primary Antioxidant*, yaitu senyawa-senyawa fenol yang mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak dengan memberikan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksi senyawa fenol. Senyawa antioksidan yang termasuk ke dalam kelompok ini yaitu BHA (*butyl hidroksilanol*), BHT (*butyl hydrotoluen*), dan tokoferol.

- b) *Oxygen Scavengers*, yaitu senyawa-senyawa yang berperan sebagai pengikat oksigen pendukung reaksi oksidasi radikal bebas sehingga jumlahnya didalam sistem berkurang. Senyawa antioksidan yang termasuk ke dalam kelompok ini yaitu vitamin C (asam askorbat), askorbil palminat, asam eritorbat, dan sulfit.
- c) *Secondary Antioxidant*, yaitu senyawa-senyawa yang mempunyai kemampuan untuk berdekomposisi hidroperoksida menjadi produk akhir yang stabil. Senyawa antioksidan ini umumnya digunakan untuk menstabilkan poliolefin resin. Contoh senyawa antioksidan ini yaitu asam triodipropinat dan dilauril tiopropinat.
- d) *Antioxidant Enzyme*, yaitu enzim yang berperan mencegah terbentuknya radikal bebas. Enzim antioksidan yang termasuk ke dalam kelompok ini yaitu *glukose oksidase*, *superoksidase dismutase (SOD)*, *glutation peroksidase* dan *katalase*.
- e) *Chelators Sequestrans*, yaitu senyawa-senyawa yang mampu mengikat logam seperti besi dan tembaga yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi lemak. Senyawa yang termasuk kedalam kelompok ini yaitu asam sitrat, asam amino, *ethylenediaminetetra acetid acid (EDTA)*, dan fosfolipid.

Antioksidan dapat diuji menggunakan metode *in vivo* dan *in vitro*. Para peneliti lebih banyak menggunakan metode *in vitro* karena proses pengerjaan metode *in vivo* membutuhkan waktu yang lebih lama. Metode uji antioksidan *in vitro* terbagi menjadi metode uji 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH), xantin oksidase, tiosianat, dan deoksiribosa (Gill dan Sharma, 2014).

a) Metode DPPH

Metode absorbansi radikal DPPH merupakan metode yang sederhana dan dapat dikerjakan dalam waktu yang singkat. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada panjang gelombang 517 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH dengan konsentrasi 50  $\mu\text{M}$ . Aktivitas antioksidan dinyatakan positif ditandai dengan perubahan warna pada larutan DPPH dalam etanol yang pada awalnya berwarna violet menjadi kuning pucat (Andayani dkk., 2008). Metode DPPH merupakan pengukuran penangkal radikal bebas sintetik dalam pelarut organik pada suhu kamar oleh suatu



c) Metode Tiosianat

Metode sianat adalah metode dengan prinsip lipid peroksidasi menggunakan asam linoleat yaitu asam lemak tidak jenuh yang bertindak sebagai radikal bebas (Hanani dkk., 2007). Metode ini secara spesifik dapat mengukur jumlah radikal bebas berdasarkan peroksidasi lipid, yaitu pembentukan radikal alkoksi. Metode ini memerlukan proses pengukuran serapan yang lama serta pengukuran tetap dilakukan hingga mendapatkan nilai absorbansi maksimum (Gill dan Sharma, 2014).

d) Metode Deoksiribosa

Metode deoksiribosa menggunakan reaksi degradasi deoksiribosa dengan radikal bebas yang dihasilkan dari larutan besi (II) sulfat dan hidrogen peroksida. Reaksi ini membentuk malonaldehida (MDA) sehingga produk MDA akan terhambat karena antioksidan mencegah radikal hidroksil merusak 2-deoksiribosa. Larutan sampel uji akan berwarna merah karena MDA berikatan dengan tiobarburat (TBA) yang diberikan (Young dkk., 2013). Metode ini memerlukan tahapan yang lebih banyak dibandingkan metode in vitro yang lain karena produk MDA harus dihentikan terlebih dahulu menggunakan TBA sebelum dilakukan pengukuran nilai serapan pada panjang gelombang yang ditentukan (Atun, 2010).

Sumber-sumber antioksidan dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari sintesa reaksi kimia. Antioksidan sintetik yang diizinkan penggunaannya untuk makanan yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksil toluen (BHT), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan alami merupakan antioksidan yang dihasilkan dari ekstraksi bahan alami. Senyawa antioksidan alami dalam suatu makanan dapat berasal dari senyawa yang sudah ada dalam komponen makanan, senyawa antioksidan yang terbentuk selama proses pengolahan, dan senyawa yang diisolasi dari bahan alami yang kemudian ditambahkan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992).

### 2.1.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut (Mukhriani, 2014). Ekstraksi bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat di dalam bahan. Ekstraksi didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam cairan penyari. Perpindahan tersebut terjadi dimulai pada lapisan permukaan, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Ditjen POM, 1986).

Secara umum ekstraksi dibagi menjadi dua jenis yaitu ekstraksi tunggal dan ekstraksi bertingkat. Ekstraksi tunggal adalah ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan satu jenis pelarut. Ekstraksi tunggal tidak memerlukan banyak waktu dan pengerjaan lebih sederhana. Ekstraksi bertingkat adalah ekstraksi yang dilakukan dengan berbagai pelarut dengan kepolaran yang berbeda sehingga diharapkan dapat memisahkan komponen kimia sesuai dengan tingkat kepolarannya (Teroreh dkk., 2015).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi cara dingin. Ekstraksi cara dingin merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan dapat meminimalkan bahan alam terurai karena ekstrak tidak dipanaskan (Heinrich dkk., 2004). Salah satu cara ekstraksi yang paling sederhana dalam metode ekstraksi dingin adalah maserasi. Maserasi didasarkan pada melarutnya kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk pada saat penghalusan, dan ekstraksi bahan dari sel yang masih utuh. Selama proses maserasi dilakukan pengocokan berulang-ulang atau agitasi untuk menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat di dalam cairan (Voight, 1994).

Proses ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor (Treyball, 1980; McCabe, 2005; Skoog, 2002) :

#### a) Ukuran Partikel Bahan

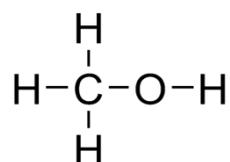
Kinerja proses ekstraksi meningkat dengan luas permukaan bahan yang semakin besar. Luas permukaan bahan yang besar didapatkan dengan memperkecil ukuran bahan. Semakin luas permukaan bahan maka perpindahan massa ekstraksi akan berlangsung lebih cepat.

## b) Pelarut

Pemilihan pelarut yang sesuai dengan memperhatikan jenis dan mutu dari pelarut yang digunakan sangat menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang dipilih memiliki kepolaran sesuai dengan bahan yang akan diekstrak (Kasminah, 2016). Polaritas bahan pelarut dan angka konstanta dielektrikunya disajikan pada Tabel 2.

## 1) Metanol

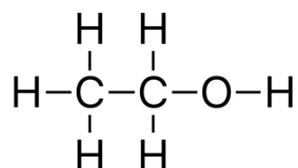
Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) adalah senyawa alkohol dengan satu rantai karbon. Metanol memiliki berat molekul 32 g/mol, titik didih  $64\text{-}65^\circ\text{C}$  dan berat jenis  $0,792\text{-}0,793\text{ g/m}^3$ . Metanol merupakan cairan bening, berbau seperti alkohol, higroskopis, mudah menguap dan mudah terbakar dengan api berwarna biru. Metanol dapat bercampur dengan air, etanol dan kloroform dalam perbandingan berapapun (Spencer, 1988). Struktur kimia pelarut metanol dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Struktur Kimia Pelarut Metanol

## 2) Etanol

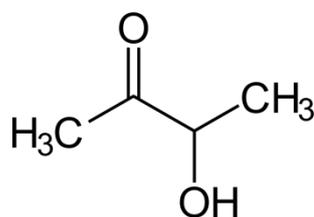
Etanol disebut juga etil alkohol dengan rumus kimia  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  atau  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  dengan titik didih  $78,4^\circ\text{C}$ . Etanol merupakan cairan tidak berwarna, volatil dan dapat bercampur dengan air (Kartika dkk., 1997). Pemanfaatan etanol yang beraneka ragam menyebabkan etanol harus dibedakan sesuai dengan penggunaannya. Etanol yang mempunyai *grade* 90-96,5% dapat digunakan pada industri maupun bahan pangan. Etanol dengan *grade* 96-99,5% dapat digunakan sebagai bahan dasar industri farmasi. Besaran etanol yang dimanfaatkan sebagai campuran bahan bakar kendaraan sebesar 99,5- 100% (Nurdyastuti, 2005). Struktur kimia pelarut etanol dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Struktur Kimia Pelarut Etanol

## 3) Etil Asetat

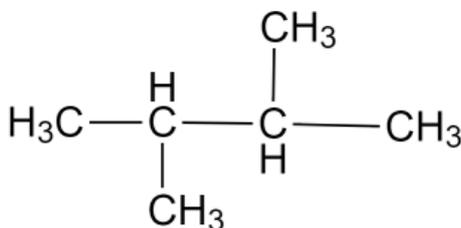
Etil asetat adalah salah satu pelarut yang memiliki rumus molekul  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ . Etil asetat berwujud cairan tak berwarna dan memiliki aroma khas. Etil asetat adalah pelarut semi polar yang volatil, tidak beracun dan tidak higroskopis. Etil asetat dibuat melalui reaksi esterifikasi Fischer dari asam asetat dan etanol. Reaksi esterifikasi Fischer adalah reaksi pembentukan ester dengan cara merefluks asam karboksilat bersama etanol dengan katalis asam. Etil asetat memiliki titik didih sebesar  $77,1^\circ\text{C}$  (Mc. Ketta dan Cunningham, 1977). Struktur kimia pelarut etil asetat dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Struktur Kimia Pelarut Etil Asetat

## 4) N-Heksana

N-Heksana merupakan salah satu pelarut non-polar yang sering digunakan dalam mengekstraksi suatu ekstrak. N-Heksana adalah bahan kimia yang dibuat dari minyak mentah. N-Heksana berwujud cairan tidak berwarna dengan bau yang sedikit tidak menyenangkan. Bersifat sangat mudah terbakar dan uap yang dapat meledak. Selain penggunaan n-Heksana dilaboratorium, larutan ini juga banyak digunakan dalam industri. N-Heksana memiliki titik didih sebesar  $69^\circ\text{C}$  (ATSDR, 1999). Struktur kimia pelarut n-Heksana dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Struktur Kimia Pelarut N-Heksana

## c) Temperatur

Temperatur yang digunakan harus dapat disesuaikan dengan kelarutan pelarut, stabilitas pelarut, tekanan uap pelarut dan selektifitas pelarut.

## d) pH

Rentang pH yang digunakan disesuaikan dengan kestabilan bahan yang akan diekstrak.

## e) Agitasi

Agitasi diperlukan untuk meningkatkan difusi sehingga perpindahan massa dari bahan ke pelarut dapat meningkat. Agitasi juga dapat mencegah terjadinya pengendapan yang dapat menghambat proses perpindahan massa.

Tabel 2. Karakteristik Pelarut

Pelarut	Titik Didih (°C)	Konstanta Dielektrik	Kerapatan (g/ml)	Momen Dipol (D)	Polaritas
Pelarut Bersifat Non Polar					
Pentana	36°C	1,84	0,626 g/ml	0,00 D	0,00
Heksan	69°C	1,88	0,655 g/ml	0,00 D	0,10
Benzen	80°C	2,30	0,879 g/ml	0,00 D	2,70
Toluen	111°C	2,38	0,867 g/ml	0,36 D	2,40
Kloroform	61°C	4,81	1,498 g/ml	1,04 D	4,10
Dietil eter	35°C	4,30	0,713 g/ml	1,15 D	2,80
Pelarut Bersifat Semi Polar					
Diklorometana (DCM)	40°C	9,10	1,3266 g/ml	1,60 D	3,10
Etil Asetat	77°C	6,02	0,894 g/ml	1,78 D	4,40
Aseton	56°C	21,00	0,786 g/ml	2,88 D	5,10
Propilen karbonat	240°C	64,00	1,205 g/ml	4,90 D	6,00
Pelarut Bersifat Polar					
Asam Formiat	101°C	58,00	1,21 g/ml	1,41 D	5,00
n-Butanol	118°C	18,00	0,810 g/ml	1,63 D	4,00
n-Propanol	97°C	20,00	0,803 g/ml	1,68 D	4,00
Etanol	79°C	24,55	0,789 g/ml	1,69 D	5,10
Metanol	65°C	33,00	0,791 g/ml	1,70 D	5,20
Asam Asetat	118°C	6,20	1,049 g/ml	1,74 D	6,20
Air	100°C	80,00	1,000 g/ml	1,85 D	9,00

Sumber : Fuchs (2013).

## f) Waktu Ekstraksi

Semakin lama waktu ekstraksi, maka semakin lama waktu kontak antara pelarut dengan bahan sehingga perolehan ekstrak akan semakin besar.

g) Rasio Zat Padat Terhadap Pelarut

Rasio pelarut perlu diperhatikan karena pelarut yang terlalu banyak dapat mengakibatkan operasional ekstraksi tidak ekonomis.

Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan persentase berat produk akhir yang dihasilkan per berat bahan olahan (Hartanti dkk., 2003). Perhitungan rendemen bertujuan untuk mendapatkan efektivitas pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi maserasi. Besarnya suatu rendemen dapat dipengaruhi oleh banyaknya jenis komponen bioaktif yang dapat terlarut dalam pelarut yang digunakan (Suryani dkk., 2017).

## 2.2. Kerangka Konsep

Proses pembuatan tempe kedelai dalam penelitian ini menggunakan metode Setyani dkk. (2017). Secara garis besar kedelai dilakukan dengan preparasi kedelai, inokulasi ragi raprima dengan konsentrasi tertentu dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Penelitian tersebut menunjukkan penggunaan konsentrasi ragi raprima sebesar 1,5% menghasilkan tempe terbaik dengan penerimaan keseluruhan agak suka.

Ekstraksi tempe kedelai dilakukan menggunakan metode Dewi dkk. (2020). Secara garis besar ekstraksi dilakukan dengan maserasi antara bahan dan pelarut, filtrasi dan evaporasi. Penelitian Dewi dkk. (2020) menunjukkan metode ekstraksi yang digunakan dapat mengoptimalkan dalam penentuan kandungan total fenol, kandungan total flavonoid dan aktivitas antioksidan.

Penelitian Surya dan Romulo (2020) menunjukkan penggunaan pelarut etanol terhadap ekstraksi tempe kedelai menghasilkan kandungan total fenol, total flavonoid dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak air tempe, ekstrak etanol kedelai dan ekstrak air kedelai.

Penelitian Dajanta dkk. (2013) menunjukkan penggunaan pelarut metanol terhadap ekstraksi produk fermentasi kedelai Thailand (*Thua Nao*) menghasilkan rendemen sebesar 11,99%, total fenol sebesar 27,05 mg GAE/g, total flavonoid sebesar 3,5 mg CE/g dan persen penghambatan radikal DPPH berkisar 45,58% - 97,09%.

Penelitian Fawwaz dkk. (2013) menunjukkan penggunaan pelarut etil asetat terhadap ekstraksi kedelai fermentasi menghasilkan kadar genistein sebesar 4,99% (b/b). Genistein merupakan salah satu isoflavon dalam kedelai yang berpotensi sebagai antioksidan alami dalam penghambatan kerusakan sel akibat radikal bebas.

Penelitian Athaillah dkk. (2019) menunjukkan penggunaan pelarut n-heksana terhadap ekstraksi tempe kedelai menghasilkan kandungan total fenol dan flavonoid terbaik pada waktu fermentasi 60 jam serta nilai antioksidan  $IC_{50}$  yang rendah. Semakin rendah nilai antioksidan  $IC_{50}$  maka potensi antioksidan pada ekstrak semakin besar.

Penelitian Rusdah dkk. (2017) menunjukkan penggunaan pelarut organik dibandingkan dengan pelarut air terhadap ekstraksi tempe kedelai menghasilkan tingkat kelarutan peptida pada ekstrak pelarut organik lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut air. Pelarut organik berpotensi dalam mengikat senyawa antioksidan pada tempe lebih baik dari pada menggunakan pelarut air.

Penentuan kandungan total fenol menggunakan metode Farhan dkk. (2012), kandungan total flavonoid menggunakan metode Chang dkk. (2002) dan aktivitas antioksidan menggunakan metode Fadly dkk. (2020). Penentuan kandungan total fenol menggunakan standar asam galat sehingga hasil yang didapatkan dihitung sebagai ekuivalen asam galat (GAE). Penentuan kandungan total flavonoid menggunakan standar kuersetin sehingga hasil yang didapatkan dihitung sebagai ekuivalen kuersetin (QE) dan aktivitas antioksidan menggunakan metode uji DPPH.

### **2.3. Hipotesis**

Hipotesis dalam penelitian ini adalah diduga ekstrak metanol tempe kedelai menghasilkan total fenol tertinggi, total flavonoid tertinggi dan aktivitas antioksidan tertinggi.