



PENGARUH FERMENTASI TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN KADAR BETASIANIN MINUMAN FUNGSIONAL BUAH NAGA DAN UMBI BIT

Effect of Fermentation on Antioxidant Activities and Betacyanin Content of Functional Beverages from Dragon Fruit and Beetroot

Yati Maryati*, Agustine Susilowati, Nina Artanti, Puspa DN Lotulung, Aspiyanto

Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15314, Indonesia

*Email: maryati97@yahoo.com

ABSTRACT

Kombucha is a traditional beverage prepared by fermenting polyphenol-rich tea using a consortium of bacteria and yeast (SCOBY). Dragon fruit and beetroot contain a significantly high amount of polyphenols and betacyanin as antioxidants which are beneficial in reducing the risk of cardiovascular disease, cancer, and the body's natural degeneration related to the early-aging process. This study aims to determine changes in antioxidant activity and levels of betacyanin from fermented dragon fruit and beetroot as functional drinks during different fermentation times. The results showed that there was a correlation between fermentation time and antioxidant activity in its ability to counteract free radicals, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and the levels of betacyanin produced. Longer fermentation time caused an increase in free radical inhibition and reduction of iron ions but reduced the levels of betacyanin. The optimum value of free radical inhibitory activity (DPPH) was obtained in the 12-day fermented dragon fruit drink with an inhibitory value of 80.76%, ability to reduce iron ions by 197.94 μg ascorbic acid mL^{-1} , and betacyanin level of 0.055 mg L^{-1}

Keywords: *antioxidants, dragon fruit, betacyanin, beetroot, functional beverages*

ABSTRAK

Kombucha merupakan minuman tradisional hasil olahan fermentasi teh yang kaya polifenol dengan konsorsium bakteri dan yeast (SCOBY). Buah naga dan umbi bit memiliki polifenol dan senyawa betasianin yang cukup tinggi sebagai antioksidan yang bermanfaat dalam menurunkan risiko penyakit kardiovaskular, penyakit kanker dan degenerasi alami tubuh terkait proses penuaan dini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan aktivitas antioksidan dan kadar betasianin dari fermentasi buah naga maupun umbi bit sebagai minuman fungsional selama waktu fermentasi yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa adanya korelasi antara waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan dalam kemampuannya menangkal radikal bebas, kemampuan mereduksi ion besi (FRAP), dan kadar betasianin yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi menyebabkan peningkatan penghambatan radikal bebas dan reduksi ion besi, namun menurunkan kadar betasianin. Nilai aktivitas penghambatan radikal bebas (DPPH) optimum diperoleh dari minuman fermentasi buah naga selama waktu fermentasi 12 hari dengan nilai penghambatan sebesar 80,76%, kemampuannya dalam mereduksi ion besi sebesar 197,94 μg asam askorbat mL^{-1} , dan kadar betasianin sebesar 0,055 mg L^{-1}

Kata Kunci: antioksidan, betasianin, buah naga, fermentasi, minuman fungsional, umbi bit

PENDAHULUAN

Kombucha merupakan minuman non-alkohol yang populer dan biasanya diperoleh dari fermentasi teh hijau dan teh hitam dengan adanya simbiotik bakteri dan yeast (ragi). Kombucha dianggap sebagai minuman fungsional yang dapat meningkatkan kesehatan secara keseluruhan. Kultur kombucha, sering disebut dengan SCOBY (*symbiotic culture bacteria and yeast*), merupakan kumpulan dari beberapa jenis bakteri dan yeast yang membentuk substansi gelatinoid yang tumbuh dan menghasilkan enzim yang dapat mengubah kandungan gula menjadi berbagai jenis asam, vitamin dan senyawa organik yang berkhasiat (Shade 2011).

Buah-buahan yang memiliki polifenol tinggi seperti buah naga (*Hylocereus polyrhizus*) dan umbi bit (*Beta vulgaris var. rubra* L.) (Gambar 1) dapat dimanfaatkan sebagai minuman kombucha. Umbi bit kaya akan sumber senyawa fitokimia, yang meliputi: asam askorbat, karotenoid, asam fenolik, dan flavonoid (Clifford et al. 2015). Buah naga kaya akan nutrisi dan mineral seperti vitamin B1, B2, B3, C, protein, lemak, karbohidrat, serat kasar, flavonoid, tiamin, niasin, piridoksin, kobalamin, glukosa, fenolik, betasianin, polifenol, karoten, fosfor, besi dan phytoalbumin (Shekade et al. 2018). Pigmen buah yang paling penting dalam buah naga merah adalah betalain seperti betasianin dan *betaxanthins* (Gengatharan et al. 2015). Betalains digunakan sebagai pewarna alami makanan pada berbagai bidang industri (Ali dan El-Mohamedy 2011). Kim et al. (2011) melaporkan bahwa buah naga merah dan putih yang diekstrak dari kulit dan pulpnya memiliki nilai indeks bioaktivitas yang tinggi seperti aktivitas antioksidan dan antiproliferatif. Begitu pula dengan umbi bit juga merupakan salah satu dari sedikit sayuran yang mengandung sekelompok pigmen sangat bioaktif yang dikenal sebagai betalains (Ravichandran et al. 2013). Umbi bit dilaporkan menjadi sumber pangan yang berpotensi sebagai peningkatan kesehatan atau terapi pengobatan untuk beberapa gangguan patologis, memberikan efek antioksidan yang kuat, antiinflamasi, dan protektif pembuluh darah dalam menurunkan tekanan darah, serta membantu mengelola penyakit kardiovaskular dan kanker (Clifford

et al. 2015). Begitu pula dengan buah naga dimana buah naga merah berfungsi dalam menurunkan kadar kolesterol dalam darah.

Antioksidan yang berasal dari tumbuhan dipercaya melindungi sel-sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Oleh karena itu beberapa penelitian dalam beberapa tahun terakhir menunjukkan bahwa polifenol pada tanaman dapat menangkal spesies oksigen reaktif dan mencegah kerusakan sel oksidatif lebih efektif (Bhattacharyya et al. 2009). Betasianin memiliki kapasitas antioksidan yang kuat, khususnya betanidin dengan kelompok katekol memiliki aktivitas yang lebih tinggi daripada glikosida betasianin, dan betasianin akan berguna sebagai pigmen alami untuk memberikan pertahanan terhadap stres oksidatif (Taira et al. 2015). Kandungan pigmen alami pada suatu bahan umumnya berkorelasi terhadap sifat antioksidan, seperti yang diungkapkan oleh Wu et al. (2006) bahwa semakin tinggi kadar pigmen maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Kugler et al. (2007) melakukan evaluasi antioksidan pada tiga spesies buah naga dan menemukan fakta jika jus buah naga merah memiliki kandungan total fenol lebih tinggi bila dibandingkan dengan jus buah naga kuning dan putih. Hal tersebut dapat mengindikasikan bahwa komponen zat warna (pigmen) pada buah naga merah berkontribusi terhadap besaran total fenolik.

Betasianin sebagai pigmen alami dan fenol antioksidan dalam industri telah banyak dimanfaatkan. Fermentasi dari umbi bit dan buah naga telah dikembangkan dan terus dioptimalkan sebagai minuman fungsional. Oleh karenanya tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pola perubahan kondisi optimal fermentasi buah naga dan umbi bit serta pengaruhnya terhadap aktivitas antioksidan dan kadar betasianin produk minuman terfermentasi kombucha dari buah naga dan umbi bit sebagai minuman fungsional.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2018 hingga April 2019. Lokasi penelitian bertempat di Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan.

Starter kultur kombucha

Kultur starter kombucha atau dikenal sebagai SCOBY diperoleh dari koleksi komersial wiki kombucha, Indonesia (<https://wikikombucha.com/>). Kultur starter yang digunakan dalam penelitian ini disimpan dalam lemari es (4°C) dan terdiri dari komponen cair (*sour broth*) dan lapisan selulosa pada bagian permukaan.

Persiapan pembuatan minuman

Bahan baku terdiri dari jus buah naga merah (*H. polyrhizus*) dan umbi bit (*B. vulgaris*), difermentasi dalam skala laboratorium dengan kultur starter kombucha (SCOBY). Bahan-bahan berikut digunakan untuk membuat minuman terdiri dari air steril, kultur starter kombucha teh, filtrat jus buah naga dan umbi bit, dan sukrosa. Setiap minuman dibuat dari rasio pelumatan buah naga atau umbi bit 1 bagian buah dan 4 bagian air, selanjutnya dilakukan penyaringan lolos 80 mesh dan 100 g L⁻¹ sukrosa. Filtrat jus buah naga dan umbi bit dipasteurisasi 90–100°C, selama 5–10 menit dan sukrosa ditambahkan ke setiap filtrat jus dan kemudian diaduk sampai larut, selanjutnya ditempatkan dalam toples steril secara aerobik hingga dingin mencapai suhu ruang 27–30°C. Setelah itu, filtrat jus diinokulasi dengan kultur starter kombucha dalam jumlah 60 mL cairan asam (*sour broth*) dan 40 g lapisan selulosa per 1 L jus (total 10% b/v). Toples ditutup dengan kain kasa steril untuk memastikan kondisi aerobik untuk fermentasi. Proses fermentasi dilakukan selama 12 hari dengan interval waktu 3 hari dalam suhu ruang gelap (\pm 28–30°C).

Nilai pH

Pengukuran pH untuk mengukur keasaman produk yang diuji ditentukan dengan menggunakan pH meter yang dikalibrasi (pH700, Instrumen Eutech). Dilakukan tiga kali ulangan.

Total asam

Total keasaman tertitrasi, dinyatakan sebagai asam asetat g 100 mL⁻¹, minuman fermentasi diukur pada interval 3 hari selama fermentasi dengan mentitrasi sebanyak 10 mL sampel dengan 0,1 N NaOH.

Total polifenol

Total polifenol diuji menggunakan metode Folin-Ciocalteu (Akhter et al. 2013). Sampel sebanyak 100 μ L ditambahkan 700 μ L aquades dan 500 μ L reagen Folin-Ciocalteu dan selanjutnya 1 mL larutan Na₂CO₃ jenuh. Kemudian tambahkan 1,4 mL (1400 μ L) aquades, lalu di vortex. Hasil campuran dibiarkan pada suhu kamar dalam ruang gelap selama 30 menit dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 760 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, begitu pula dengan blanko. Asam galat digunakan sebagai larutan standard dan hasil konsentrasi sebagai mikrogram asam galat equivalen (GAE) per milliliter sampel.

Kemampuan mereduksi ion besi

Metode yang dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Vijayalakshmi dan Ruckmani (2016). Sebanyak 20 μ L sample dicampur dengan 2,5 mL buffer fosfat (0,2 M, pH 6,6) dan 2,5 mL 1% K₃[Fe(CN)₆. Campuran reaksi diinkubasi pada 50°C selama 30



Gambar 1. (A). Buah naga dan (B). Umbi bit

menit. Setelah itu 2,5 mL TCA (*Trichloroacetic acid*) 10% ditambahkan ke dalam campuran dan disentrifugasi 10 menit pada 3.000 rpm. Larutan filtrat 2,5 mL dicampur dengan 2,5 mL air aquades dan 0,5 mL FeCl₃ 0,1%. Absorbansi diukur pada 700 nm. Peningkatan absorbansi campuran reaksi menunjukkan peningkatan daya reduksi.

Antioksidan DPPH

Pengujian antioksidan sebagai aktivitas penangkal radikal bebas pada sampel diuji menggunakan metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*) sesuai penelitian Mazidi et al. (2012). Sampel minuman dari setiap hasil fermentasi (500 µL) ditambahkan dengan 500 µL larutan DPPH 0,1 mM (0,4 mg mL⁻¹) dalam metanol. Selanjutnya ditambahkan 1,5 mL metanol. Larutan disimpan pada suhu kamar dalam ruang gelap selama 30 menit dan penghambatan radikal bebas DPPH diukur dengan membaca absorbansi pada 515 nm menggunakan spektrofotometer (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis). Persamaan berikut digunakan untuk menghitung aktivitas penghambatan.

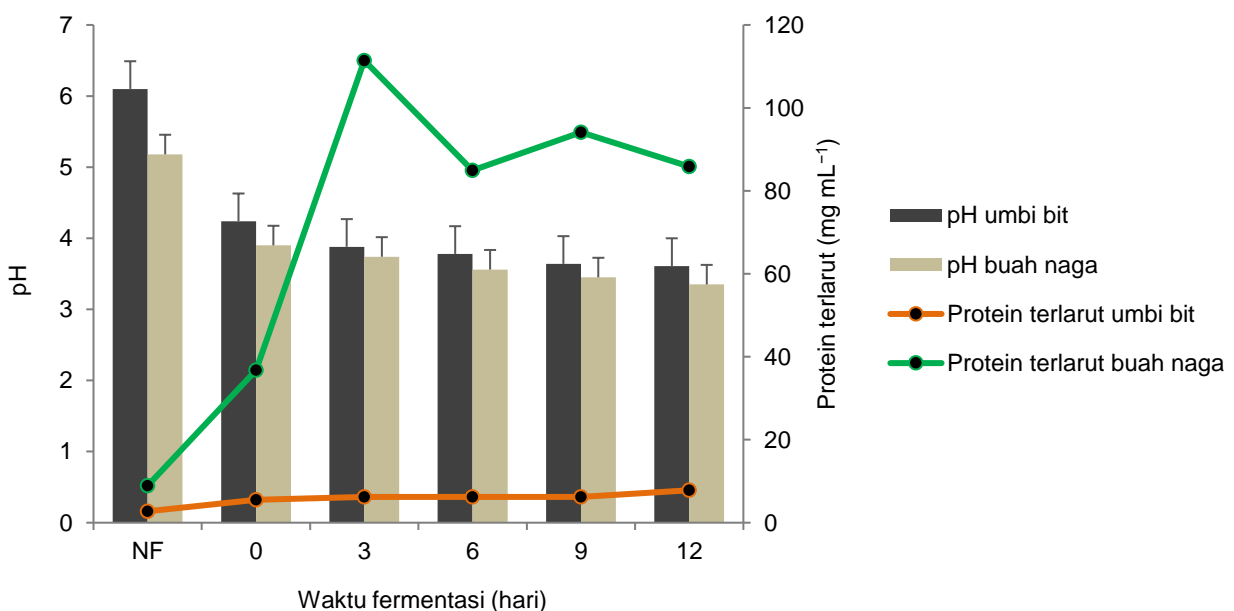
$$\text{Aktivitas penghambatan radikal bebas (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{(\text{Absorbansi kontrol})} \times 100$$

Penentuan kadar betasianin

Pengukuran kadar betasianin dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wong dan Siow (2015). Sejumlah sampel diencerkan dengan buffer McIlvaine (pH 6,5) sampai penyerapan maksimum 1,00 ± 0,05 tercapai. Buffer McIlvaine disiapkan dari campuran 0,1 M asam sitrat (30 mL) dan 0,2 M natrium fosfat (70 mL) (Müller-Maatsch et al. 2016). Pengenceran yang digunakan (40x) kemudian disimpan untuk pemrosesan semua sampel selanjutnya. Masing-masing sampel, sebanyak 0,1 mL ditambahkan dengan 3,9 mL larutan buffer McIlvaine dalam kuvet sebelum dianalisis spektrofotometri. Selanjutnya diukur absorbansi sampel menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 537 nm dan 500 nm, dan untuk menghitung nilai kadar betasianin digunakan rumus sebagai berikut:

$$Bc [mg L^{-1}] = [(A \times F \times MW \times 1000) / (\epsilon \times l)]$$

Dimana A: nilai penyerapan pada λ_{max} (537 nm) dikoreksi oleh penyerapan pada 600 nm (koreksi untuk kotoran); F: pengenceran faktor; MW: berat molekul betanin (550 g mol⁻¹); ε: koefisien kepunahan molar betanin (60.000 L mol⁻¹ cm⁻¹); dan l: panjang lintasan kuvet (1 cm). Dalam penelitian ini, semuanya penentuan dilakukan dalam tiga kali ulangan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis).



Gambar 2. Perubahan nilai pH dan protein terlarut terhadap kombucha buah naga dan umbi bit selama waktu fermentasi

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai pH dan protein terlarut

Pengujian nilai pH dan kandungan protein terlarut pada kedua jenis minuman fermentasi yaitu kombucha buah naga dan umbi bit selama waktu fermentasi dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan nilai pH yang dihasilkan dari kedua minuman fermentasi kombucha buah naga dan umbi bit menunjukkan adanya laju penurunan nilai pH pada keduanya dan peningkatan kadar protein terlarut (Gambar 2). Akumulasi asam-asam yang berasal dari hasil fermentasi kombucha mengakibatkan penurunan nilai pH. Nilai pH menurun secara eksponensial pada kedua sample dari 6,10 menjadi 3,61 pada fermentasi umbi bit dan pada fermentasi buah naga dari 5,18 menjadi 3,35. Sedangkan nilai protein terlarut juga meningkat secara eksponensial dari 2,75 menjadi 7,81 mg mL⁻¹ pada fermentasi umbi bit, dan dari 8,93 menjadi 85,83 mg mL⁻¹ pada fermentasi buah naga.

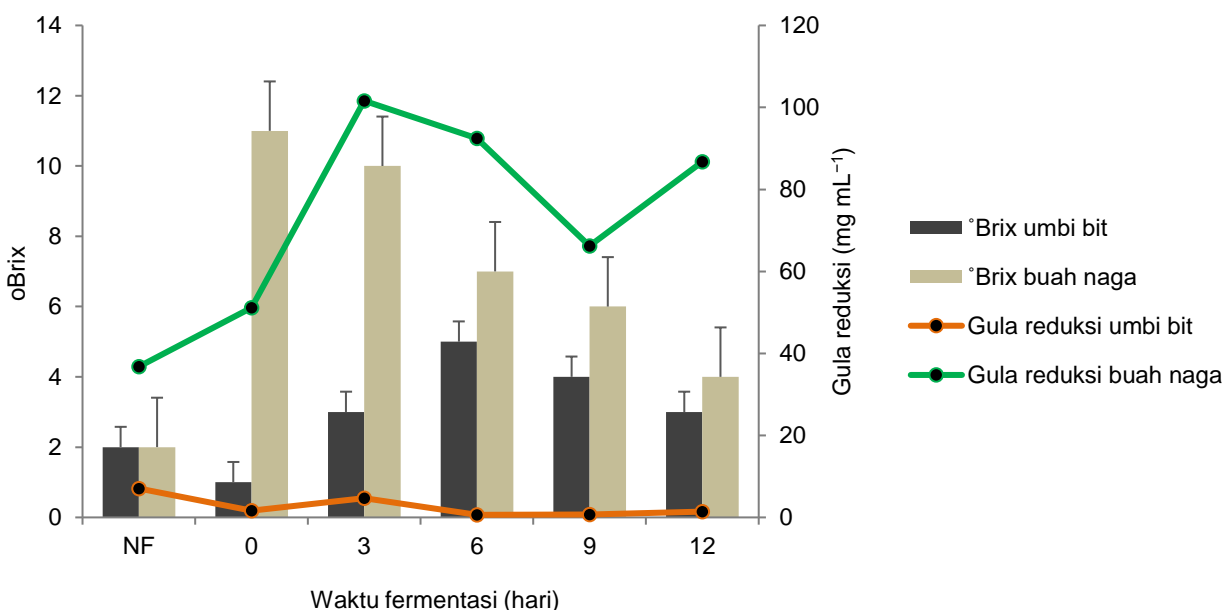
Peningkatan asam yang semakin tinggi diduga karena bakteri dalam kombucha telah mengalami fase pertumbuhan logaritmik. Selama proses fermentasi, bakteri dan ragi memetabolisme sukrosa menjadi sejumlah asam organik seperti asam asetat dan asam glukuronat. Hal ini sesuai dengan penelitian (Nurikasari et al. 2017). pH kombucha menurun dengan cepat pada waktu fermentasi karena peningkatan konsentrasi

asam organik yang dihasilkan selama fermentasi oleh konsorsium bakteri dan ragi. Selama proses fermentasi karbon dioksida dilepaskan pada awalnya kemudian menghasilkan molekul H₂O, CO₂ berdisosiasi dan anion hidrokarbonat amphiprotik (HCO₃⁻), yang mudah bereaksi dengan ion hidrogen (H⁺) dari asam organik, hal ini akan mencegah perubahan lebih lanjut dalam konsentrasi H⁺ (Jayabalan et al. 2014)

Pada fermentasi minuman kombucha buah naga dan umbi bit terjadi peningkatan kadar protein terlarut yang dihasilkan selama waktu fermentasi, meskipun tidak ada sumber nitrogen lain yang ditambahkan ke dalam filtrat sebelum fermentasi. Protein-protein ini kemungkinan mewakili protein ekstraseluler yang dikeluarkan oleh bakteri dan ragi selama waktu fermentasi (Jayabalan et al. 2010). Kadar protein buah naga meningkat dengan cepat dari 36,81 menjadi 111,43 mg mL⁻¹ pada fermentasi 3 hari, selanjutnya mengalami penurunan hingga fermentasi 12 hari. Hal ini dikarenakan adanya penurunan protein ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri dan ragi, sedangkan pada fermentasi umbi bit terus mengalami peningkatan hingga fermentasi 12 hari dari 5,50 menjadi 7,81 mg mL⁻¹, hal ini dimungkinkan protein ekstraseluler masih dikeluarkan dari sel bakteri dan ragi selama waktu fermentasi.

°Brix dan gula reduksi

Nilai °Brix menunjukkan seberapa besar konsentrasi sukrosa di dalam sampel

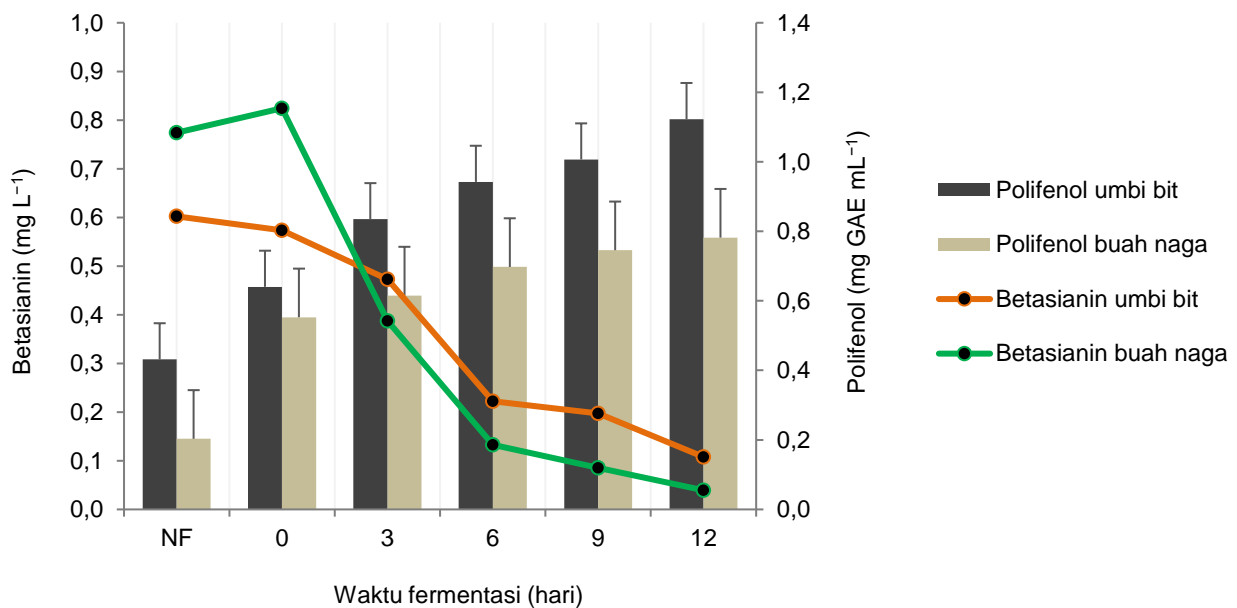


Gambar 3. Perubahan nilai total gula °Brix dan kadar gula reduksiselama fermentasi kombucha buah naga dan umbi bit

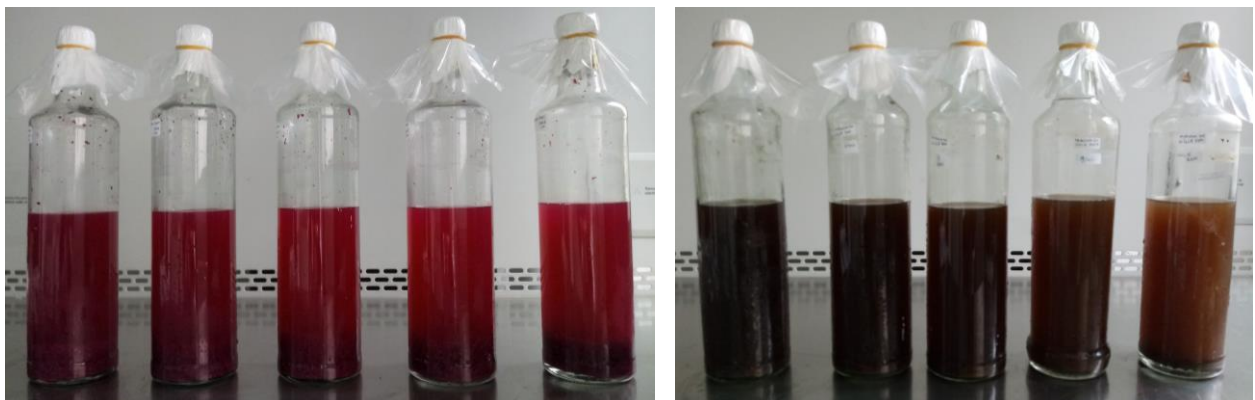
fermentasi. Jumlah sukrosa yang ditambahkan ke dalam sampel dan kontrol sebesar 10%. Proses fermentasi yang terjadi dapat menurunkan konsentrasi awal dan selama fermentasi berlangsung. Perubahan nilai total gula °Brix dan kadar gula reduksi (mg mL^{-1}) selama fermentasi kombucha buah naga dan umbi bit ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil menunjukkan bahwa nilai °Brix mengalami penurunan selama fermentasi. Hal ini dipengaruhi oleh fermentasi gula dalam sampel, alkohol dan karbon dioksida yang dihasilkan (Santos et al. 2013).

Ragi dan bakteri yang terlibat dalam aktivitas metabolik fermentasi minuman kombucha umbi bit dan buah naga, dengan memanfaatkan substrat dengan cara yang berbeda dan saling melengkapi. Sukrosa adalah sumber karbon yang paling umum dalam fermentasi kombucha. Ragi

menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa oleh invertase dan menghasilkan etanol melalui glikolisis, dengan preferensi fruktosa sebagai substrat (Jayabalan et al. 2014). Adanya aktivitas amilase pada hasil fermentasi menggunakan kultur kombucha SCOBY menunjukkan kemampuan mikroba untuk memecah rantai karbohidrat menjadi unit disakarida yang lebih kecil. Gambar 3 menggambarkan kadar gula pereduksi dan °Brix yang dihasilkan oleh adanya aktivitas amilase dari kultur kombucha pada minuman terfermentasi buah naga dan umbi bit yang cukup berfluktuasi. Ada pun kondisi optimum dari fermentasi buah naga dan umbi bit dicapai pada fermentasi hari ketiga dan dengan konsentrasi masing-masing adalah sebesar 101,62 dan 4,69 mg mL^{-1} . Aktivitas enzim amilase yang berperan dalam memecah molekul karbohidrat sukrosa dapat



Gambar 4. Perubahan kadar total polifenol dan kadar betasianin selama fermentasi kombucha buah naga dan umbi bit



Gambar 5. Perubahan pigmen warna selama fermentasi kombucha buah naga dan umbi bit

dihambat oleh monomer senyawa fenolik (Akhter et al. 2013). Dengan demikian, penurunan aktivitas amilase bisa jadi karena adanya fraksi fenolik yang dihasilkan pada buah naga dan umbi bit terfermentasi dengan menggunakan kultur kombucha. Selain itu berkurangnya gula reduksi karena mikroba memanfaatkan sumber karbon sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya dan akan mengubahnya menjadi alkohol dan gas CO₂. Gas CO₂ selanjutnya bereaksi dengan uap air dan membentuk asam karbonik. Dalam proses fermentasi ini yeast sangat berperan dalam dekomposisi gula menjadi CO₂ dan asam organik lainnya (Nurikasari et al. 2017).

Polifenol dan betasianin

Perubahan konsentrasi total senyawa fenolik dan kadar betasianin pada minuman fermentasi kombucha buah naga dan umbi bit selama waktu fermentasi ditampilkan pada Gambar 4. Dari hasil pengamatan menunjukkan total fenol kombucha total senyawa fenolik secara progresif meningkat seiring dengan waktu fermentasi. Berbeda halnya dengan kadar betasianin yang mengalami penurunan sejalan dengan adanya waktu fermentasi. Total polifenol filtrat awal pada umbi bit dan buah naga, tanpa fermentasi menunjukkan nilai yang rendah pada masing-masing bahan yaitu 0,31 dan 0,15 mg GAE mL⁻¹. Kadar total polifenol buah naga dan umbi bit meningkat dengan cepat masing-masing dari 0,46 menjadi 0,8 mg GAE mL⁻¹ dan 0,39 menjadi 0,56 mg GAE mL⁻¹ pada fermentasi 0 hingga 12 hari. Peningkatan total fenolik dikarenakan senyawa fenolik kompleks dalam fermentasi kombucha buah naga dan umbi bit mungkin mengalami degradasi di lingkungan asam kombucha dan oleh enzim yang dibebaskan oleh bakteri dan ragi selama fermentasi. Degradasi polifenol kompleks menjadi molekul kecil yang akhirnya menghasilkan peningkatan total senyawa fenolik. Hal ini terjadi karena senyawa fenolik dapat dengan mudah menyumbangkan gugus hidrogen hidroksil karena stabilisasi resonansi (Bhutto et al. 2018).

Betasianin merupakan pigmen berwarna merah atau merah-violet dari kelompok pigmen betalain. Betasianin dari umbi bit telah diketahui memiliki efek antiradikal dan aktivitas antioksidan yang tinggi sebagai *dietary cationized antioxidant*.

Adapun total betasianin dalam fermentasi buah naga dan umbi bit merah bervariasi masing-masing antara 0,843 dan 1,084 mg L⁻¹ (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan bahwa selama waktu fermentasi selama 12 hari yang menyebabkan hilangnya kandungan betasianin. Hal ini terjadi karena senyawa Betalains (betasianin) rentan terhadap pH, oksigen, ion logam, suhu, aktivitas air, paparan cahaya dan aktivitas enzimatik (Sawicki dan Wiczowski 2018).

Pigmen warna yang dihasilkan dari buah naga dan umbi bit disumbangkan oleh betasianin, dimana senyawa dari sekumpulan pigmen yang mengandung nitrogen yang larut dalam air yang dikenal sebagai betalains (Rebecca et al. 2010). Betalain adalah pigmen tanaman yang termasuk dalam ordo Caryophyllales. Dimana struktur kimia, betalains dapat dibagi menjadi betasianin (ungu merah) atau betaxanthins (kuning). Warnanya dimungkinkan berasal dari ikatan rangkap struktur betalain. Betasianin adalah turunan dari betanidin, berasal dari asam betalainat dan cyclo-DOPA (cyclo-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine) glukosida yang tidak berwarna, sedangkan betaxanthins dihasilkan dari kondensasi asam amino atau amina dengan asam betalainat (Gengatharan et al. 2015).

Penurunan kandungan betalains fermentasi dari buah naga dan umbi bit merah oleh aktivitas mikroba mungkin terkait tidak hanya dengan degradasi pigmen alami ini selama proses yang dilakukan, tapi juga dengan migrasi pigmen-pigmen yang terlarut. Senyawa ini mungkin dibebaskan dari matriks buah naga atau umbi bit merah yang dipicu oleh proses fermentasi. Di sisi lain, senyawa ini dapat dengan cepat mengalami hidrolisis betanidin. Perubahan pigmen warna buah naga dan buah bit selama waktu fermentasi ditunjukkan pada Gambar 5.

Aktivitas antioksidan

Peningkatan aktivitas antioksidan yang dihasilkan diperoleh dari hasil degradasi polifenol oleh enzim. Dua buah pengujian antioksidan dilakukan untuk mengukur aktivitas antioksidan kombucha buah naga dan umbi bit, yaitu, uji DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*) dan kemampuan mereduksi ion besi (*Ferric Reducing*

Table 1. Aktivitas antioksidan dari sampel kombucha buah naga (*H. polyrhizus*) dan umbi bit (*B. vulgaris*)

Jenis Kombucha	Waktu Fermentasi (hari)	% Penghambatan DPPH	Reduksi Ion Besi (FRAP) (μg asam askorbat mL^{-1})
Buah naga	Tanpa fermentasi	77,45	141,75
	0	59,05	184,45
	3	64,42	171,29
	6	76,31	196,65
	9	70,25	186,38
	12	80,76	197,94
Umbi bit	Tanpa fermentasi	41,39	342,09
	0	26,55	223,30
	3	30,01	273,06
	6	60,14	309,02
	9	53,53	247,70
	12	42,02	256,37

Antioxidant Power). Pada pengujian DPPH digunakan untuk mengevaluasi kemampuan antioksidan untuk menangkal radikal bebas, terhadap kemampuan antioksidan dari senyawa yang diuji (Sulandi et al. 2014). Ion logam transisi juga terlibat dalam banyak reaksi oksidasi *in vivo*, karena bentuk ion besi yang berkurang menyebabkan keracunan oksigen, dengan mengubah hidrogen peroksida yang kurang reaktif menjadi spesies oksigen yang lebih reaktif, seperti radikal hidroksil, melalui reaksi Fenton (Unal dan Akalın 2012). Aktivitas antioksidan dapat diukur dengan uji daya reduksi antioksidan ion besi (FRAP).

Berdasarkan hasil pengujian pada Tabel 1 menunjukkan bahwa fermentasi buah naga dan umbi bit memiliki kemampuan penghambatan senyawa radikal bebas (DPPH) maksimum masing-masing sebesar 80,76% inhibisi pada fermentasi buah naga hari ke 12, dan 60,14% pada fermentasi umbi bit hari ke-6. Sedangkan kemampuan mereduksi senyawa logam maksimum masing-masing 197,94 μg ascorbic acid mL^{-1} pada buah naga dan 309,02 μg ascorbic acid mL^{-1} pada umbi bit. Adanya penurunan kemampuan mereduksi suatu senyawa terkait dengan kemampuan transfer elektron senyawa itu. Oleh karena itu, kemampuan mereduksi senyawa dapat berfungsi sebagai indikator potensial signifikan aktivitas antioksidan (Bursal dan Köksal 2011).

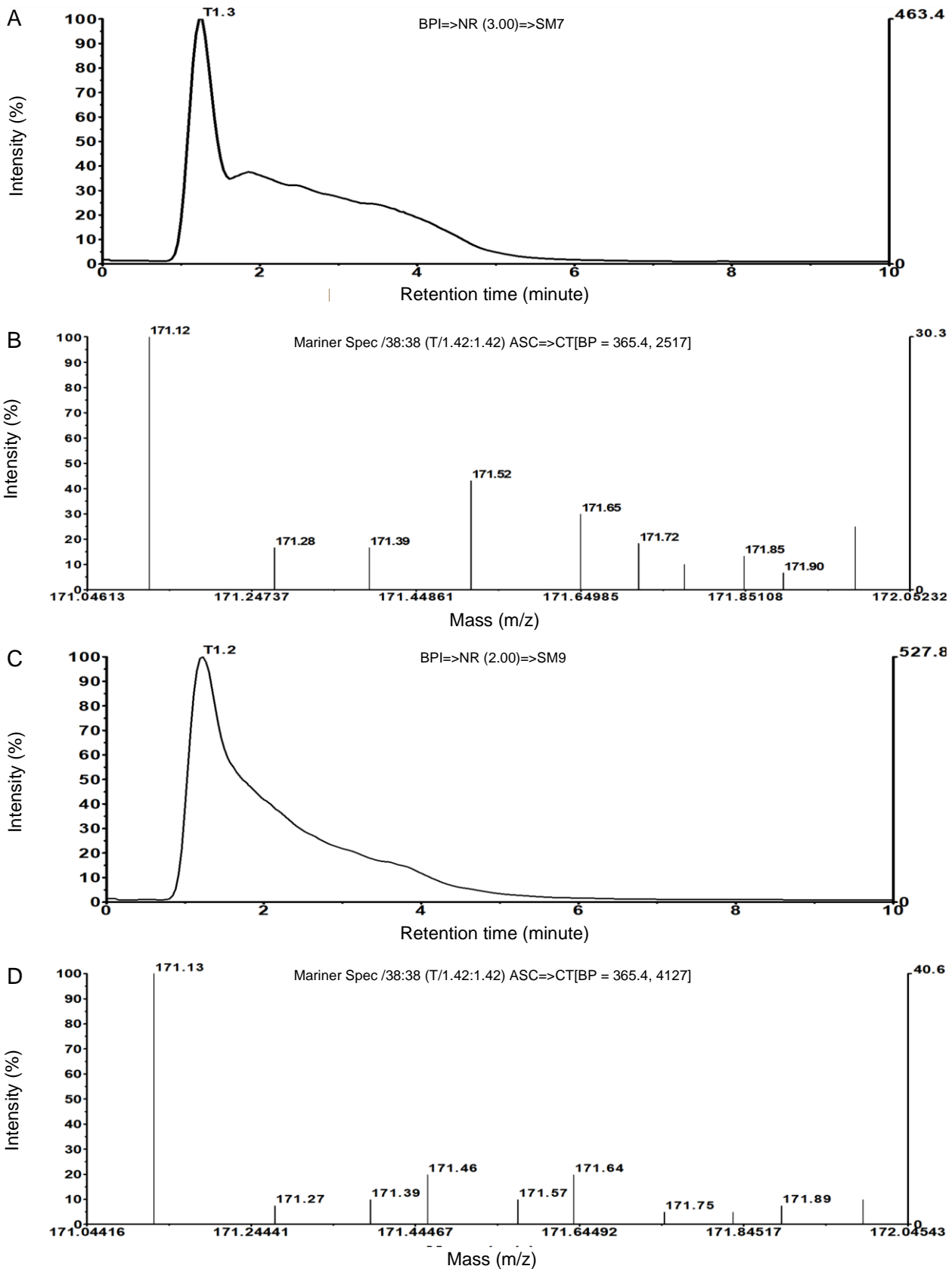
Asam fenolat yang terdapat dalam jus kombucha menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang kuat tergantung pada

potensinya untuk membentuk kompleks dengan atom logam, terutama besi dan tembaga. Metode ini didasarkan pada prinsip peningkatan absorbansi campuran reaksi, sehingga peningkatan absorbansi aktivitas antioksidan meningkat.

Identifikasi monomer asam galat

Hasil identifikasi asam galat sebagai antioksidan pada fermentasi 12 hari dari kombucha buah naga diperoleh kromatogram dengan 1 peak (T 1,3) dan pada fermentasi kombucha umbi bit 6 hari diperoleh kromatogram dengan 1 peak (T 1,2), pada waktu retensi 0–10 menit seperti ditunjukkan pada Gambar 6a dan 6c.

Berdasarkan hasil LC-MS dimungkinkan suatu senyawa memperlihatkan perbedaan BM dimana kemungkinannya adalah sebagai M^+ , $\text{M}^+ \text{Na}^+$, 2M^{++} atau $2 \text{M}^{++}, \text{Na}^+$. Hal ini disebabkan oleh adanya ionisasi karena sensitivitas instrumen LC-MS yang berkaitan dengan eluen yang digunakan (Eichhorn dan Knepper 2001). Kondisi operasi LC-MS adalah pada volume injeksi 5 μL , laju alir 0,1 mL menit^{-1} dengan eluent campuran metanol dan air pada rasio 80 : 20, menggunakan kolom C-8 (15 mm \times 2 mm). Mass spektra dari peak T 1,3 dan peak T 1,2 pada Gambar 6a dan 6c. Terlihat adanya monomer asam galat yaitu dilihat dari berat molekul 171 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$. Rentang mass spektra antara 171–172 dan diperoleh peak dengan intensitas 100%. Dengan hasil intensitas relatif tertinggi asam galat pada masing-masing kombucha sebesar 30,3% dan 40,6%.



Gambar 6. (A). Kromatogram T 1.3 dalam identifikasi aktif pada kombucha buah naga pada fermentasi 12 hari, (B). Spektrum kombucha buah naga untuk menunjukkan puncak pada m/z 171-172 dari intensitas ion yang paling kuat dalam spektrum, (C). Kromatogram T 1.2 dalam identifikasi aktif pada kombucha umbi bit pada fermentasi 6 hari, dan (D). Spektrum kombucha umbi bit untuk menunjukkan puncak pada m/z 171 dari intensitas ion yang paling kuat asam galat sebagai antioksidan

KESIMPULAN

Perubahan karakteristik komponen bioaktif dari minuman fungsional fermentasi buah naga dan fermentasi umbi bit dengan konsentrasi kultur kombucha yang berbeda berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan, kadar betasianin, total polifenol, pH dan total asam yang dihasilkan. Kondisi optimum diperoleh berdasarkan kemampuan dalam menghambat senyawa radikal bebas (DPPH) dan kemampuan mereduksi ion logam besi (FRAP). Nilai aktivitas penghambatan radikal bebas (DPPH) optimum diperoleh dari minuman fermentasi buah naga selama waktu fermentasi 12 hari dengan nilai penghambatan sebesar 80,76%, kemampuannya dalam mereduksi ion besi (FRAP) sebesar 197,94 μg asam askorbat mL^{-1} dan kadar betasianin sebesar 0,055 mg L^{-1} diikuti oleh minuman umbi bit optimum pada fermentasi selama 6 hari, dengan nilai penghambatan radikal bebas DPPH sebesar 60%, kemampuan mereduksi ion besi (FRAP) sebesar 309,02 μg asam askorbat mL^{-1} dengan kadar betasianin sebesar 0,151 mg L^{-1} . Identifikasi asam galat sebagai antioksidan dan polifenol melalui LC-MS diperoleh dengan berat molekul 171 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, melalui Program Penelitian Inovasi Nasional (INSINAS) pada 2018–2019 untuk dukungan pendanaan, dan untuk Pusat Penelitian Kimia LIPI untuk dukungan analisa dan peralatan yang disediakan dalam menunjang penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhter F, Hashim A, Khan MS, Ahmad S, Iqbal D, Srivastava AK, Siddiqui MH (2013) Antioxidant, α -amylase inhibitory and oxidative DNA damage protective property of *Boerhaavia diffusa* (Linn.) root. *South Afr J Bot* 88:265–272. doi: 10.1016/j.sajb.2013.06.024
- Ali NF, El-Mohamedy RSR (2011) Eco-friendly and protective natural dye from red prickly pear (*Opuntia Lasiantha Pfeiffer*) plant. *J Saudi Chem Soc* 15:257–261. doi: 10.1016/j.jscs.2010.10.001
- Bhattacharya, S., & Sil, P. C. (2018). Role of plant-derived polyphenols in reducing oxidative stress-mediated diabetic complications. *Reactive Oxygen Species*, 5(13), 15-34. doi: 10.20455/ros.2018.811
- Bhutto, A. A., Kalay, Ş., Sherazi, S. T. H., & Culha, M. (2018). Quantitative structure–activity relationship between antioxidant capacity of phenolic compounds and the plasmonic properties of silver nanoparticles. *Talanta*, 189, 174-181. doi: 10.1016/j.talanta.2018.06.080
- Bursal E, Köksal E (2011) Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). *Food Res Int* 44:2217–2221. doi: 10.1016/j.foodres.2010.11.001
- Clifford T, Howatson G, West DJ, Stevenson EJ (2015) The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients* 7:2801–2822. doi: 10.3390/nu7042801
- Eichhorn P, Knepper TP (2001) Electrospray ionization mass spectrometric studies on the amphoteric surfactant cocamidopropylbetaine. *J mass Spectrom* 36:677–684. doi: 10.1002/jms.170
- Gengatharan A, Dykes GA, Choo WS (2015) Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Sci Technol* 64:645–649. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.052
- Jayabalan R, Malbasa R V, Loncar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A Review on kombucha tea — microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13:538–550. doi: 10.1111/1541-4337.12073
- Jayabalan R, Malini K, Sathishkumar M, Swaminathan K, Yun S-E (2010) Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Sci Biotechnol* 19:843–847. doi: 10.1007/s10068-010-0119-6
- Kim H, Choi HK, Moon JY, Kim YS, Mosaddik A, Cho SK (2011) Comparative antioxidant and antiproliferative

- activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. *J Food Sci* 76:C38–C45. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01908.x
- Kugler F, Stintzing FC, Carle R (2007) Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MSn. *Anal Bioanal Chem* 387:637–648. doi: 10.1007/s00216-006-0897-0
- Mazidi SM, Rezaei K, Golmakani MT, Sharifan A, Rezazadeh S (2012) antioxidant Activity of essential oil from black zira (*Bunium persicum* Boiss.) obtained by microwave-assisted hydrodistillation. *J Agric Sci Technol* 14:1013-1022
- Müller-Maatsch, J., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2016). Adulteration of anthocyanin-and betalain-based coloring foodstuffs with the textile dye 'Reactive Red 195'and its detection by spectrophotometric, chromatic and HPLC-PDA-MS/MS analyses. *Food control*, 70, 333-338. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.012
- Nurikasari M, Puspitasari Y, Siwi RPY (2017) Characterization and analysis kombucha tea antioxidant activity based on long fermentation as a beverage functional. *J Glob Res Public Health* 2:90–96. doi: 10.5281/1117425
- Ravichandran K, Saw NMMT, Mohdaly AAA, Gabr AMM, Kastell A, Riedel H, Cai Z, Knorr D, Smetanska I (2013) Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Res Int* 50:670–675. doi: 10.1016/j.foodres.2011.07.002
- Rebecca OPS, Boyce AN, Chandran S (2010) Pigment identification and antioxidant properties of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Afr J Biotechnol* 9:1450–1454. doi: 10.5897/AJB09.1603
- Santos CCAA, Duarte WF, Carreiro SC, Schwan RF (2013) Inoculated fermentation of orange juice (*Citrus sinensis* L.) for production of a citric fruit spirit. *J Inst Brew* 119:280–287. doi: 10.1002/jib.89
- Sawicki T, Wiczowski W (2018) The effects of boiling and fermentation on betalain profiles and antioxidant capacities of red beetroot products. *Food Chem* 259:292–303. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.143
- Shade A (2011) The kombucha biofilm: a model system for microbial ecology. Final report on research conducted during the Microbial Diversity course, Marine Biological Laboratories, Woods Hole, Massachusetts USA
- Shekade, D. P., Patil, P. D., Mote, G. V., & Sahoo, A. K. (2018). Potential Use of Dragon Fruit and Taro leaves as Functional Food: A Review. *European Journal of Engineering Science and Technology*, 1(1), 10-20. doi: 10.33422/EJEST.2018.07.77
- Sulandi A, Sari R, Wahdaningsih S (2014) Aktivitas antioksidan ekstrak kloroform buah lakum (*Cayratia trifolia*) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). *J Mhs Farm Fak Kedokteran UNTAN* 1:1–11
- Taira J, Tsuchida E, Katoh MC, Uehara M, Ogi T (2015) Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chem* 166:531–536. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.102
- Unal G, Akalin AS (2012) Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of yoghurt fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Dairy Sci Technol* 92:627–639. doi: 10.1007/s13594-012-0082-5
- Vijayalakshmi M, Ruckmani K (2016) Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh J Pharmacol* 11:570–572. doi: 10.3329/bjp.v11i3.27663
- Wong Y-M, Siow L-F (2015) Effect of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *J Food Sci Technol* 52:3086–3092. doi: 10.1007/s13197-014-1362-2.
- Wu L, Hsu H-W, Chen Y-C, Chiu C-C, Lin Y-I, Ho JA (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *J Food Chem* 95:319–327. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.002