

**OPTIMASI METODE FERMENTASI PADA PROSES ISOLASI SENYAWA
ISOFLAVON DARI BIJI KEDELAI (*Glycine max* (L) Merril)
MELALUI FERMENTASI TEPUNG KEDELAI**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar
Sarjana Sains (S.Si) Program Studi Ilmu Kimia
pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Universitas Islam Indonesia
Jogjakarta**



Disusun oleh :

WINNI SEPTIYASARI

No Mhs : 00 612 050

**JURUSAN ILMU KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
2005**

**OPTIMASI METODE FERMENTASI PADA PROSES ISOLASI SENYAWA
ISOFLAVON DARI BIJI KEDELAI (*Glycine max (L) Merril*)
MELALUI FERMENTASI TEPUNG KEDELAI**

**Oleh :
WINNI SEPTIYASARI
No Mhs : 00 612 050**

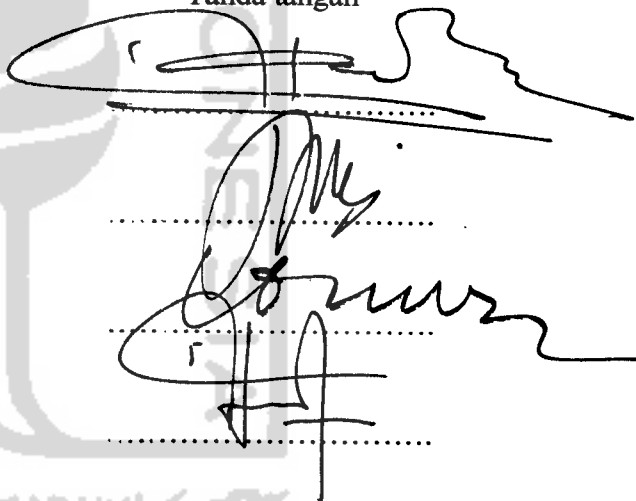
Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Ilmu Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 22 Februari 2005

Dewan Penguji

1. Drs. Allwar, M.Sc.
2. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si
3. Dr. H. Chairil Anwar
4. Tatang Shabur Julianto, S. Si

Tanda tangan



Mengetahui
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Jaka Nugraha, M.Si.

MOTTO

“...Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri...”
(QS. Ar-Ra’d ; 11)

“ Orang yang beriman dan selalu mengerjakan kebaikan, kami tidak membebani seseorang kecuali sesuai dengan kemampuannya. Mereka itulah yang akan menghuni surga, disana mereka kekal selamanya.”
(Al- A’raaf : 42)

“ Impian yang tidak terlaksana adalah impian yang terpenjara oleh musuh nomor satu yakni takut gagal”

*Sebuah karya kecil..... yang menambah warna dalam kehidupanku,
dengan segala kerendahan hati kupersembahkan padaMu Ya Robbi,
sebagai pemberi kehidupan dan sumber kekuatan untuk
menjalannya.*

Bapak dan ibu (Drs. Kadi Asroni dan Leti Herawati)

*Trima kasih atas doa, dukungan, limpahan kasih sayang dan linangan air
mata..., yang selalu tercurah untukku*

Adik-adikku tercinta (Putri Nuritawati dan Desti Utari)

**Makasih ya sudah mendukung kakakmu ini untuk terus maju, dan
jadilah adik yang baik dan berprestasi**

Keluargaku yang lain

**(Bul Nanuk, Bul Nanik, Mbah Ibu, Om Bambang, Mbah Din,
Handri, Gani, dll yang tak bisa kusebutkan satu peratu)
trimakasih atas doa dan dukungannya selama ini**

Almamaterku tercinta....

*Buat "Pami" yang telah hadir dalam kehidupan
Trim's atas cinta perhatian, n dukungannya*

**Temen-temen kos : Mumun (piye, ekswan, torik or lanang, milih song ndi kD), Dian (Gak ada lg nih
yang bakal panggil Ka' Win, piye si kris? Mbok ra popo drpd ora ono, lumayan wes kerjo), Wati
(wes salki ora garing neh kl, in the hoyyy je, ora usah nguya-nguyu), Izza (za, priyo piye, nek
seneng tambak wae, ojo dlm mimpi terus), M' Rani, n Sandra**

**dr Riona (makasih ya atas kenalan dr-drnya, gak ada yang nyantol tuh, n
kl udah jd dr buka prakteknya di lampung ya biar gw gratis) n dr Indah
(kapan lagi nih ke Sragen, salam buat kakakmu ya)**

**Bpk kos (pak Kandar), Ibu Kos, n Mba Dina : Trim's udah dianggap
seperti anak sendiri, sering dimasakin n diomelin, kapan Bu foto-foto
lagi**

**Kos lama : Kanthi (jangan lupa undangan nikahnya ya, aku pengen
deh ke Jepara lg, salam buat Heni, Ibu n Bapakmu ya), Sri (temen**

sebelah kamarku yang cerewet, kapan aku diajak ke Jambi), Veron
(kapan aku dirancangin baju lagi nih, kalo udah terkenal jangan lupa
aku ya), Indri n Eka (kok kalian gak ada kabarnya lg sih)
Nopi (aku kangen nih gak pernah ketemu lg, aku pengen deh ke
magelang lg)

M' Torik n M' Jamal trim's ya atas bimbingan n belajarnya selama skripsi (kapan lg
nih ditaraktir makan-makannya, apa kl jd sama mumun)

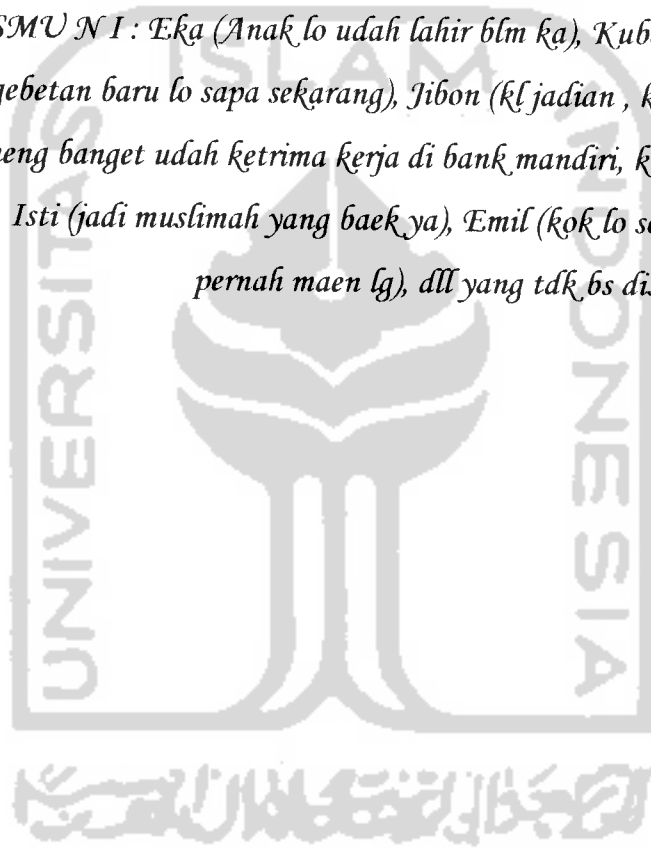


Motor Supra Fit ku (AB 3371 TZ) yang selalu setia
menemani hari-hariku
komputerku (kau sering eror n baik lg, tp tanpamu aku tdk
bs ngerjain skripsi)
Ikan louhan koe (raul), yang menemaniku saat suntuk, tp
kok u skrg di magelang, mil jagain ya

M'AB (ayo mas cepet lulus dong, aku Bantu doa deh), Sus (aku doain cepet nikah
ya n dapet kerja), Joki (wah sekarang tambah dewasa deh), Rahmat (kepala
keluarga yang baik, salam buat iril ya), Mba Ani (makasih ya mba semangat dan

Temen-temen KKN SL-34 (Yuni, Irma, Ade, Inten, M' Wisnu, Pur, Amin, Iman, Ibnu, Husni) Aku kangeeenn deh pengen kumpul-kumpul lg nih, kok pada gak ada kabarnya sih

Temen-temen SMU NI : Eka (Anak lo udah lahir blm ka), Kubeen (udah dpt kerja blm lo), Dian (gebetan baru lo sapa sekarang), Jibon (kl jadian , kabarin gw ya bon), Ema (seneng banget udah ketrima kerja di bank mandiri, kutunggu lo makan-makannya), Isti (jadi muslimah yang baik ya), Emil (kok lo sombong bgt sih gak pernah maen lg), dll yang tdk bs disebutkan satu-satu



KATA PENGANTAR



Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Adapun skripsi dengan judul **“OPTIMASI METODE FERMENTASI PADA PROSES ISOLASI SENYAWA ISOFLAVON DARI BIJI KEDELAI (*Glycine max (L) Merril*) MELALUI FERMENTASI TEPUNG KEDELAI”** ini disusun untuk memenuhi ketentuan akademik guna menyelesaikan studi pada Jurusan Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia Jogjakarta.

Penulis sadar bahwa selesainya penelitian ini banyak mendapatkan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Chairil Anwar, selaku dosen pembimbing satu yang telah memberi bimbingan, saran dan masukan dalam menyelesaikan tulisan ini dengan penuh kesabaran.

2. Tatang Shabur Julianto, S.Si, selaku dosen pembimbing dua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dukungan, pengarahan, dan bimbingan untuk menyelesaikan tugas akhir ini.
3. Jaka Nugraha, M.Si., selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia Jogjakarta.
4. Segenap Laboran yang ada di Laboratorium Jurusan Kimia dan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia Jogjakarta (Pak Irmansyah, Pak Dwi Mahmudi, Pak Riyanto, Pak Eko, Mba Reni). Terima kasih banyak atas bantuannya
5. Kedua orangtua, adik-adikku dan keluarga tercinta atas segala pengorbanan, dukungan dan doanya

Penulis menyadari masih adanya kekurangan dan ketidak sempurnaan dalam penyusunan skripsi ini. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan di masa yang akan datang.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan dan pengetahuan pembaca pada umumnya dan penulis pada khususnya. Amin.

Jogjakarta, Februari 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	<i>Halaman</i>
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
INTISARI	xv
ABSTRACT	xvi
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
 BAB III DASAR TEORI	
3.1 Tinjauan Botani Kedelai	11

3.2 Tempe.....	17
3.3 Senyawa Isoflavon	21
3.4 Ekstraksi	24
3.5 KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	26
3.6 Spektrofotometer UV-Vis	31
3.7 Hipotesis.....	36
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Alat dan Bahan.....	37
4.2 Jalan Penelitian.....	38
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Pembuatan Tempe Kedelai	42
5.2 Ekstrak Tempe Kedelai dan Tepung Tempe Kedelai	44
5.3 Hasil Pemisahan dengan KLT.....	45
5.4 Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis	47
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan	55
6.2 Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1 : Perbedaan antara tipe determinit dan indeterminit	15
Tabel 2 : Rentangan serapan spectrum UV-Tampak flavonoid	33
Tabel 3 : Harga R _f dan warna noda dengan lampu UV 254 nm	46
Tabel 4 : Analisis isoflavon dalam tempe kedelai.....	46
Tabel 5 : Analisis isoflavon dalam tepung tempe kedelai.....	47
Tabel 6 : Panjang gelombang maksimum sampel dalam metanol	48
Tabel 7 : Pergeseran batokromik dan hipsokromik pada penambahan pereaksi geser	50



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 : Struktur isoflavon	23
Gambar 2 : Struktur beberapa senyawa isoflavon.....	23
Gambar 3 : Bagan alat Spektrofotometer UV-Vis	32
Gambar 4 : Spektrum serapan UV-tampak jenis flavonoid yang berbeda tetapi pola hidroksilasinya sama	34
Gambar 5 : Hasil pengamatan dengan KLT menggunakan eluen metanol : kloroform (1:9)	45
Gambar 6 : Spektrum fraksi 1 dalam metanol	49
Gambar 7 : Spektrum fraksi 1 dalam MeOH dan MeOH + NaOH.....	51
Gambar 8 : Spektrum fraksi 1 dalam MeOH + AlCl ₃ dan MeOH + AlCl ₃ + HCl	51
Gambar 9 : Spektrum fraksi 1 dalam MeOH + NaOAc dan MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	52
Gambar 10 : Struktur genistein 7-O-glikosida	53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara agraris memiliki kekayaan alam tanaman obat berlimpah yang tersebar diseluruh daerah-daerahnya. Penggunaan tanaman obat ini sudah digunakan lama oleh nenek moyang bangsa kita. Ada beberapa tumbuhan yang sudah diketahui khasiatnya secara alamiah, salah satunya adalah kedelai. Selain digunakan sebagai bahan makanan, kedelai juga diketahui dapat berperan sebagai bahan obat karena kandungan senyawa kimia yang dimilikinya.

Dari beberapa bahan pangan yang telah dianalisis, diketahui kedelai menempati urutan pertama, mengandung daidzein 10,5 - 85 dan genistein 26,8 - 120,5 mg/100 g berat kering. Sedangkan urutan kedua biji semanggi (clover), hanya mengandung daidzein 0,178 dan genistein 0,323 mg/100 g berat kering.

Oleh karenanya, sampai sekarang kedelai menjadi pilihan utama sebagai sumber isoflavon. Kedelai sebagai sumber pangan dapat dikonsumsi melalui berbagai produk olahannya seperti bubuk kedelai, isolat dan konsentrat protein kedelai, soybean paste, tahu, tempe dan tauco (Wisnu, 2003)

Tempe adalah salah satu makanan tradisional Indonesia yang dibuat dari biji kedelai melalui proses fermentasi kapang, terutama *Rhizopus oligosporus*. Dari kelas bawah, tempe terangkat menjadi makanan primadona yang kaya gizi. Berbagai



macam kandungan dalam tempe mempunyai nilai obat, seperti antibiotika untuk menyembuhkan infeksi dan antioksidan pencegah penyakit degeneratif.

Saat ini tempe telah merambah ke lima benua. Melalui Belanda, tempe telah populer di Eropa sejak tahun 1946. Pada tahun 1984 sudah tercatat 18 perusahaan tempe di Eropa, 53 di Amerika, dan 8 di Jepang. Di beberapa negara lain, seperti Cina, India, Taiwan, Sri Lanka, Kanada, Australia, Amerika Latin, dan Afrika, tempe sudah mulai dikenal di kalangan terbatas. (Wisnu, 2003)

Indonesia merupakan negara produsen tempe terbesar di dunia dan menjadi pasar kedelai terbesar di Asia. Sebanyak 50 persen dari konsumsi kedelai Indonesia dilakukan dalam bentuk tempe, 40 persen tahu, dan 10 persen dalam bentuk produk lain (seperti tauco, kecap, dan lain-lain). Konsumsi tempe rata-rata per orang per tahun di Indonesia saat ini diduga sekitar 6,45 kg.

Perhatian yang begitu besar terhadap tempe sebenarnya telah dimulai sejak zaman pendudukan Jepang di Indonesia. Pada saat itu, para tawanan perang yang diberi makan tempe terhindar dari disentri dan busung lapar. Kini telah diketahui bahwa tempe sebagai makanan tradisional berpeluang dan berpotensi untuk digunakan melawan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dan mencegah terjadinya penyakit degeneratif (aterosklerosis, jantung koroner, diabetes melitus, kanker, dan lain-lain). Selain itu tempe juga telah diketahui mengandung zat antibakteri penyebab diare, penurun kolesterol darah, pencegah penyakit jantung, hipertensi, dan lain-lain.

Dua kelompok vitamin yang terdapat pada tempe, yaitu larut air (vitamin B kompleks) dan larut lemak (vitamin A, D, E, dan K). Tempe merupakan sumber vitamin B yang sangat potensial. Jenis vitamin yang terkandung dalam tempe antara lain vitamin B1 (thiamin), B2 (riboflavin), asam pantotenat, asam nikotinat (niasin), vitamin B6 (piridoksin), dan B12 (sianokobalamin). Vitamin B12 aktivitasnya meningkat sampai 33 kali selama fermentasi, riboflavin naik sekitar 8-47 kali, piridoksin 4-14 kali, niasin 2-5 kali, biotin 2-3 kali, dan asam folat 4-5 kali. (Wisnu, 2003)

Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Seperti halnya vitamin C, E, dan karotenoid, isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan, sehingga sangat reaktif dan dapat menyebabkan tumor, kanker, penuaan, dan kematian sel. Radikal bebas dapat berasal dari makanan sehari-hari yang kita makan atau reaksi yang terjadi di dalam tubuh. Adanya antioksidan dalam makanan akan mencegah terbentuknya radikal bebas tersebut. (Wisnu, 2003)

Dalam kedelai terdapat tiga jenis isoflavon, yaitu daidzein, glisitein, dan genistein. Pada tempe, di samping ketiga jenis isoflavon tersebut juga terdapat antioksidan faktor II (6,7,4 trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis

pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coreyne bacterium*. (Anonim, 2003)

Senyawa isoflavon dalam biji kedelai berbentuk senyawa konyugat dengan senyawa gula melalui ikatan O-glikosidik. Selama fermentasi, ikatan O-glikosidik terhidrolisa sehingga dibebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon bebas. Senyawa aglikon merupakan senyawa yang aktif dan sebaliknya senyawa konyugat merupakan senyawa yang tidak aktif. Hasil fermentasi lebih lanjut dari senyawa aglikon ini justru menghasilkan senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas biologis yang lebih tinggi.

Metode fermentasi biji kedelai oleh kapang menjadi tempe merupakan metode fermentasi padat. Fermentasi padat mempunyai beberapa kelemahan. Kelemahan tersebut yaitu keterbatasan penggunaan mikroba yang lebih cenderung pada kapang, karena kapang pada umumnya tahan pada kelembaban yang relatif rendah. Produksi metabolit selama fermentasi sulit diatur karena lingkungan substrat yang tidak homogen. Penetrasi enzim kapang pun menjadi sulit karena struktur fisiknya. Pada fermentasi biji kedelai, bagian permukaan biji merupakan bagian yang pertama kali terfermentasi, sedangkan bagian dalamnya belum terfermentasi. Pada waktu fermentasi selanjutnya bagian dalamnya baru terfermentasi sedangkan metabolit hasil fermentasi bagian permukaan biji telah mengalami fermentasi/transfotmasi lebih lanjut menjadi senyawa lain sehingga total senyawa isoflavon tunggal yang diperoleh lebih sedikit. (Jha, 1995)

Dalam proses isolasi senyawa isoflavon peneliti sebelumnya, senyawa-senyawa isoflavon yang muncul merupakan campuran dan sampai pada batas waktu fermentasi tertentu, senyawa isoflavon tunggal yang sama selalu muncul. Hal ini menyebabkan proses isolasi senyawa isoflavon tunggal menjadi lebih rumit. Dalam penelitian ini diupayakan untuk memperoleh kandungan senyawa isoflavon tunggal yang optimal dengan melakukan fermentasi terhadap tepung kedelai dengan asumsi bahwa luas permukaan substrat yang lebih besar akan mengoptimalkan kontak antara substrat dan enzim yang dihasilkan oleh kapang atau dengan kata lain proses fermentasinya akan lebih optimal sehingga memudahkan proses isolasinya.

Komposisi kandungan senyawa isoflavon tepung kedelai terfermentasi dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis yang kemudian dibandingkan dengan komposisi kandungan senyawa isoflavon biji kedelai terfermentasi (tempe).

1.2 Perumusan Masalah

Apakah optimasi metode fermentasi dalam proses isolasi senyawa isoflavon tunggal melalui fermentasi tepung kedelai akan mengoptimalkan kontak antara substrat dan enzim yang dihasilkan oleh kapang ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mencari metode fermentasi yang optimal dalam proses isolasi senyawa isoflavon tunggal.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Mengembangkan metode fermentasi yang lebih optimal dibandingkan metode sebelumnya dalam proses isolasi senyawa isoflavon tunggal dari biji kedelai
2. Meningkatkan nilai produk fermentasi biji kedelai sebagai bahan makanan



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Isoflavon secara alamiah disintesa oleh tumbuh-tumbuhan dari senyawa asam amino aromatik fenil alanin atau tirosin. Biosintesa ini berlangsung secara bertahap dan melalui sederetan senyawa lain yaitu asam sinamat, asam kumarat, kalkon, dan akhirnya flavon dan isoflavon.

Berdasarkan biosintesa tersebut maka isoflavon digolongkan sebagai senyawa metabolit sekunder biasanya merupakan senyawa yang disintesis oleh mikroba tertentu dan senyawa ini pada umumnya tidak merupakan kebutuhan fisiologis pokok dari mikroba baik untuk pertumbuhan dan aktivitas kebutuhannya. Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, namun senyawa metabolit sekunder dapat juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidup. Senyawa metabolit sekunder biasanya terbentuk pada saat tidak adanya pertumbuhan sel, akibat keterbatasan nutrisi dalam medium pertumbuhannya. Keterbatasan zat gizi dalam medium merangsang dihasilkannya enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan hidup. Isoflavon termasuk dalam golongan flavanoid dan merupakan bagian kelompok terbesar dalam golongan tersebut. Secara karakteristik senyawa isoflavon terdapat dalam tanaman kacang-kacangan atau *Leguminoceae* (Jha, 1995).

Salah satu sumber senyawa isoflavon adalah kedelai yang termasuk dalam golongan *Leguminoceae*. Kedelai oleh bangsa Indonesia banyak dikonsumsi melalui

berbagai produk yang salah satunya adalah tempe. Tempe adalah salah satu makanan tradisional yang dibuat dari kedelai melalui proses fermentasi kapang, terutama *Rhizopus oligosporus*. Berbagai penelitian menyebutkan bahwa tempe kedelai mengandung senyawa antioksidan (Ikehata, 1968), antibakteri (Wang, 1969), antihemolitik (Naim, 1976), antikolesterol, dan antikanker (Jha, 1995). Diantara senyawa komponen tersebut, isoflavon merupakan senyawa yang banyak disebut sebagai senyawa aktif dan mempunyai potensi pemanfaatan untuk kesehatan.

Senyawa isoflavon pada kacang kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan O-glikosidik. Selama fermentasi, ikatan O-glikosidik terhidrolisa, sehingga dibebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon bebas dan senyawa isoflavon aglikon ini dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa transformasi baru (Jha, 1995)

Berbagai jenis isoflavon yang terdapat dalam tempe adalah daidzein, genistein, Faktor 2 (Gyorgy, 1964), dan glistein (Naim, 1976). Transformasi senyawa isoflavon selama fermentasi tempe sangat menarik perhatian sebab selama fermentasi terdapat reaksi-reaksi transformasi yang dapat dikategorikan sebagai :

- a. Reaksi hidrolisa senyawa isoflavon konjugat oleh kapang *Rhizopus oligosporus*, sehingga dibebaskan senyawa aglikon dan senyawa gula
- b. Reaksi reduksi senyawa isoflavon oleh khamir atau oleh kapang menjadi senyawa isoflavon (Zilliken, 1987)

- c. Reaksi derivatisasi dari senyawa aglikon menjadi senyawa aglikon lainnya oleh bakteri, contoh: hidroksilasi dari senyawa daidzein atau demetilasi glisitein menjadi faktor 2.

Metode fermentasi biji kedelai oleh kapang menjadi tempe merupakan metode fermentasi padat. Terdapat beberapa hambatan pada fermentasi padat termasuk keterbatasan penggunaan mikroba yang lebih cenderung pada kapang, karena kapang pada umumnya tahan pada kelembaban yang relatif rendah. Produksi metabolit selama fermentasi sulit diatur karena lingkungan substrat yang tidak homogen. Lagipula pada fermentasi padat, substrat padatan, karena struktur fisiknya dapat menghambat transfer oksigen, penetrasi air atau enzim kapang yang larut dalam air, dan juga penetrasi panas. Jadi kita perlu melakukan pemantauan pada waktu-waktu tertentu apakah panas yang terjadi dalam proses fermentasi tidak terlalu tinggi oleh aktivitas mikroba atau apakah penetrasi oksigen dan air cukup ke daerah-daerah yang sulit dicapai. Sebagai konsekuensinya, organisme mungkin tumbuh sebagai menghambat proses fermentasi secara keseluruhan (Maggy, 1989). Pada fermentasi biji kedelai, bagian permukaan biji merupakan bagian yang pertama kali terfermentasi, sedangkan bagian dalamnya belum terfermentasi. Pada waktu fermentasi selanjutnya bagian dalamnya baru terfermentasi sedangkan metabolit hasil fermentasi bagian permukaan biji telah mengalami fermentasi/transformasi lebih lanjut menjadi senyawa lain.

Adapun sifat-sifat senyawa isoflavon aglikon kedelai yang sudah diketahui antara lain : genistein (5,7,4'-trihidroksi isoflavon), BM = 270,23 gr/mol, dengan titik

lebur $297 - 298^{\circ}\text{C}$; daidzein (7,4'-dihidroksi isoflavon), $\text{BM} = 254,23 \text{ gr/mol}$, berbentuk kristal dengan titik lebur $315 - 323^{\circ}\text{C}$ (Markham, 1988)

Komposisi aglikon hasil hidrolisis campuran glikosida dalam biji kedelai menggunakan KLT dan GLC adalah 87,5 % genistein, 10 % daidzein, dan 2,5 % glisitein. Prosentase total senyawa isoflavon dalam kedelai adalah 25 % (Naim, 1976). Sedangkan pada penelitian oleh Gyorgy (1964), banyaknya senyawa faktor 2 hanya 20 mg dari 5 kg tempe kedelai.

Dalam hidrolisis kedelai melalui proses fermentasi dengan berbagai waktu fermentasi sampai pada batas waktu tertentu (48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, dan 132 jam), senyawa daidzein ($R_f = 0,51$), genistein ($R_f = 0,61$), dan faktor 2 ($R_f = 0,30$) selalu muncul dalam tiap waktu fermentasi (Wuryani, 1995). Bila hal ini digunakan sebagai acuan untuk mengisolasi senyawa isoflavon tunggal tentunya akan sangat rumit untuk memisahkan masing-masing senyawa isoflavon tunggalnya.

BAB III

DASAR TEORI

3.1 Tinjauan Botani Kedelai

3.1.1 Taksonomi

Kedudukan tanaman kedelai (*Glycine max* (L) Merrill) dalam sistematika tumbuhan (taksonomi) menurut Lawrence (1958) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub Divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Polypetales</i>
Famili	: <i>Leguminoceae</i> (<i>Papilionaceae</i>)
Sub Famili	: <i>Papilinodeae</i>
Genus	: <i>Glycine</i>
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L) Merrill. Sinonim dengan <i>G. soya</i> (L) sieb dan <i>zucc</i> atau <i>Soya max</i> atau <i>s. Hispida</i>

Kedelai mempunyai susunan genom, diploid (2n), dengan kromosom sebanyak 20 pasang. Beberapa kedelai jenis liar juga mempunyai kromosom 20 pasang. Diperkirakan kedelai yang kita tanam sekarang berasal dari jenis liar, *Glycine soja* = *G. ururiensis*, *Glycine soja* mempunyai benthik polong dan biji yang hampir sama dengan kedelai biasa, tetapi tumbuhnya merambat, dan kulit bijinya sangat

tebal, sehingga embrio dan keping bijinya dapat terlindungi dengan baik. *Clycine soja* dapat disilangkan dengan kedelai biasa.

3.1.2 Morfologi

Susunan tubuh tanaman kedelai terdiri atas dua macam alat organ utama, yaitu organ vegetatif dan generatif. Organ vegetatif meliputi akar, batang, dan daun, yang berfungsi sebagai alat pengambil, pengangkut, pengolah, pengedar, dan penyimpan makanan, sehingga disebut sebagai alat hara (organ nutritivum). Sedangkan organ generatif meliputi bunga, buah, dan biji, yang berfungsi sebagai alat berkembang biak (organum reproductivum). (Suprpto, 2002)

a. Biji

Biji kedelai berkeping dua yang terbungkus oleh kulit biji. Embrio terletak diantara keping biji. Warna kulit biji bermacam-macam, ada yang kuning, hitam, hijau atau coklat. Pusat biji atau hilum, adalah jaringan bekas biji kedelai yang menempel pada dinding buah. Bentuk biji kedelai pada umumnya bulat lonjong, ada yang bundar atau bulat agak pipih. Besar biji bervariasi, tergantung varietas. Di Indonesia besar biji sering diukur dari bobot per 100 biji kering dan bervariasi dari 6 gram sampai 30 gram. Kedelai digolongkan berbiji kecil bila bobot 100 bijinya antara 6 – 10 gram ; berbiji sedang bila bobot 100 biji 13 gram dan lebih dari 13 gram termasuk berbiji besar. Di Amerika dan Jepang kedelai yang bobot 100 bijinya kurang dari 15 gram masih dianggap kedelai kecil. (Suprpto, 2002)

b. Perkecambahan

Biji kedelai yang kering akan berkecambah bila memperoleh air yang cukup. Bila biji kedelai ditanam dalam tanah, air dalam kapasitas lapang selama 5 hari setelah tanam merupakan keadaan yang baik untuk perkecambahan biji. Suhu optimumnya sekitar 27 – 30° C.

Kecambah kedelai tergolong *epigeous*, yang berarti keping biji muncul di atas tanah. Bagian batang berkecambah di bawah keping disebut *hipokotil*. Warna hipokotil ungu atau hijau, dan erat hubungannya dengan warna bunga. Kedelai yang hipokotilnya ungu bunganya ungu, yang hijau bunganya berwarna putih.

Biji kedelai mudah menurun daya kecambahnya, terutama bila kadar air dalam biji di atas 13 % dan disimpan pada ruangan yang suhunya di atas 25° C, serta kelembaban nisbi ruang di atas 80 %. Biji kedelai yang disimpan pada gudang tanpa pendingin hanya tahan sekitar 3 – 5 bulan. Lebih dari 6 bulan sebagian besar biji tidak dapat tumbuh lagi bila ditanam. Kedelai yang bijinya kecil, lebih tahan dalam penyimpanan daripada yang bijinya besar. (Suprpto, 2002)

c. Akar

Kedelai berakar tunggang. Pada tanah gembur akar kedelai dapat sampai kedalaman 150 cm. Pada akarnya terdapat bintil-bintil akar, berupa koloni dari bakteri *Rhizobium japonikum*. Pada tanah yang telah mengandung bakteri *Rhizobium*, bintil akar mulai terbentuk sekitar 15 – 20 hari setelah tanam. Pada tanah yang belum

pernah ditanami kedelai bakteri Rhizobium tidak terdapat dalam tanah, sehingga bintil akar tidak terbentuk.

Bakteri Rhizobium dapat mengikat nitrogen dari udara yang kemudian dapat digunakan untuk pertumbuhan kedelai. Sebaliknya Rhizobium juga memerlukan makanan yang berasal dari tanaman kedelai untuk pertumbuhannya. Hubungan hidup yang saling menguntungkan ini disebut *Simbiosis*. (Suprpto, 2002)

d. Batang

Kedelai berbatang semak, dengan tinggi batang antara 30 – 100 cm. Setiap batang dapat membentuk 3 – 6 cabang. Bila jarak antara tanaman dalam barisan rapat, cabang menjadi berkurang atau tidak bercabang sama sekali. Tipe pertumbuhan dapat dibedakan menjadi 3 macam, yakni determinit, indeterminit, dan semi determinit. Perbedaan antara tipe determinit dan indeterminit yang terpenting adalah terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan antara tipe determinit dan indeterminit

	Tipe determinit	Tipe indeterminit
Ujung batang	hampir sama besar dengan bagian tengah	lebih kecil agak melilit, dan ruas panjang
Perbungaan	serempak, dari bagian atas ke bagian pangkal	berangsur, dari bagian pangkal ke batang atas
Pertumbuhan vegetatif	berhenti setelah berbunga	tumbuh terus setelah berbunga
Tinggi batang	pendek – sedang	sedang – tinggi
Daun teratas	sama besar dengan daun pada bagian tengah batang	lebih kecil
Contoh varietas	Galunggung	No. 29

Tipe semi determinit adalah tipe antara indeterminit dan determinit varietas orba termasuk tipe semi determinit. (Suprpto, 2002)

e. Bunga

Bunga kedelai termasuk bunga sempurna, artinya dalam setiap bunga terdapat alat jantan dan alat betina. Penyerbukan terjadi pada saat mahkota bunga masih menutup, sehingga kemungkinan terjadinya kawin silang secara alam amat kecil. Bunga terletak pada ruas-ruas batang, berwarna ungu atau putih. Tidak semua bunga

dapat menjadi polong walaupun telah terjadi penyerbukan secara sempurna. Menurut penelitian sekitar 60 % bunga rontok sebelum membentuk polong.

Usia kedelai sampai berbunga bervariasi, tergantung varietasnya. Varietas umumnya dapat dipanen pada umur 80 – 90 hari. Pembungaan sangat dipengaruhi oleh lama penyinaran dan suhu. Kedelai termasuk tanaman berumur pendek, yang berarti tanaman tidak akan berbunga, bila lama penyinaran melebihi batas kritis, yakni sekitar 15 jam.

Varietas yang cocok untuk daerah dengan panjang hari lebih dari 12 jam, pada umumnya tidak tumbuh baik pada daerah dengan panjang hari sekitar 12 jam. Itulah sebabnya introduksi varietas unggul dari AS tidak cocok ditanam di Indonesia. Varietas kedelai di AS atau Jepang bila ditanam di Indonesia tumbuh kerdil-pendek, cepat berbunga, dan hasilnya rendah. (Suprpto, 2002)

f. Buah

Buah kedelai berbentuk polong, setiap buah berisi 1 – 4 biji. Rata-rata berisi 2 biji. Polong kedelai mempunyai bulu, berwarna kuning kecoklatan atau abu-abu. Polong yang sudah masak berwarna lebih tua, warna hijau berubah menjadi kehitaman, keputihan, atau kecoklatan. Bila polong telah kuning mudah pecah dan biji-bijinya melenting keluar.

Jumlah polong per pohon bervariasi, tergantung varietas, kesuburan tanah dan jarak tanam. Satu batang kedelai yang tumbuh tersendiri pada tanah subur dapat

menghasilkan 100 – 125 polong. Tetapi apabila ditanam rapat dalam pertanaman produksi, polong per pohon tidak akan melebihi 20 polong.

Umur sampai dengan polong masak bervariasi, tergantung varietasnya. Kedelai di Indonesia masak polongnya berkisar dari 75 - 110 hari setelah tanam. Kedelai umur masaknya 75 – 85 hari digolongkan kedelai genjah, umur 85 – 95 hari digolongkan tengahan dan umur masaknya lebih dari 95 hari digolongkan kedelai dalam.

Biji yang baru terbentuk mengandung kadar air hampir 90 %, kemudian kadar air ini turun seiring dengan proses masaknya biji. Penurunan kadar air dari 90 % menjadi 65 % berlangsung sangat cepat, ketika polong hampir penuh dan biji mulai matang. Dari kadar air 65 % menjadi 60 %, berlangsung agak lambat bersamaan dengan proses bertambah besarnya biji. Setelah akumulasi makanan cadangan dalam biji berakhir, kadar air menjadi sekitar 50 % (Suprpto, 2002)

3.2 Tempe

Tempe adalah salah satu makanan tradisional Indonesia yang dibuat dari biji kedelai melalui proses fermentasi kapang, terutama *Rhizopus oligosporus*.

Rujukan pertama mengenai tempe ditemukan pada tahun 1875. Bahkan dalam manuskrip serat Centini telah ditemukan kata tempe. Hal ini menunjukkan bahwa makanan tradisional ini sudah dikenal sejak berabad-abad lalu, terutama dalam tatanan budaya makan masyarakat Jawa, khususnya di Yogyakarta dan Surakarta.

Selanjutnya teknik pembuatan tempe menyebar ke seluruh Indonesia, sejalan dengan penyebaran masyarakat Jawa yang bermigrasi ke seluruh penjuru Tanah Air.

Komposisi gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah dibandingkan dengan kedelai. Namun, karena adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe, maka protein, lemak, dan karbohidrat pada tempe menjadi lebih mudah dicerna di dalam tubuh dibandingkan yang terdapat dalam kedelai. Oleh karena itu, tempe sangat baik untuk diberikan kepada segala kelompok umur (dari bayi hingga lansia), sehingga bisa disebut sebagai makanan semua umur.

Dibandingkan dengan kedelai, terjadi beberapa hal yang menguntungkan pada tempe. Secara kimiawi hal ini bisa dilihat dari meningkatnya kadar padatan terlarut, nitrogen terlarut, asam amino bebas, asam lemak bebas, nilai cerna, nilai efisiensi protein, serta skor proteinnya.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa zat gizi tempe lebih mudah dicerna, diserap, dan dimanfaatkan tubuh dibandingkan dengan yang ada dalam kedelai. Ini telah dibuktikan pada bayi dan anak balita penderita gizi buruk dan diare kronis.

Dengan pemberian tempe, pertumbuhan berat badan penderita gizi buruk akan meningkat dan diare menjadi sembuh dalam waktu singkat. Pengolahan kedelai menjadi tempe akan menurunkan kadar raffinosa dan stakiosa, yaitu suatu senyawa penyebab timbulnya gejala flatulensi (kembung perut).

Mutu gizi tempe yang tinggi memungkinkan penambahan tempe untuk meningkatkan mutu sereal dan umbi-umbian. Hidangan makanan sehari-hari yang

terdiri dari nasi, jagung, atau tiwul akan meningkat mutu gizinya bila ditambah tempe. Sepotong tempe goreng (50 gram) sudah cukup untuk meningkatkan mutu gizi 200 gram nasi. Bahan makanan campuran beras-tempe, jagung-tempe, gaplek-tempe, dalam perbandingan 7:3, sudah cukup baik untuk diberikan kepada anak balita.

Selama proses fermentasi tempe, terdapat tendensi adanya peningkatan derajat ketidakjenuhan terhadap lemak. Dengan demikian, asam lemak tidak jenuh majemuk (polyunsaturated fatty acids = PUFA) meningkat jumlahnya. Dalam proses itu asam palmitat dan asam linoleat sedikit mengalami penurunan, sedangkan kenaikan terjadi pada asam lemak oleat dan linolenat (asam linolenat tidak terdapat pada kedelai). Asam lemak tidak jenuh mempunyai efek penurunan terhadap kandungan kolesterol serum, sehingga dapat menetralkan efek negatif sterol di dalam tubuh.

Dua kelompok vitamin yang terdapat pada tempe, yaitu larut air (vitamin B kompleks) dan larut lemak (vitamin A, D, E, dan K). Tempe merupakan sumber vitamin B yang sangat potensial. Jenis vitamin yang terkandung dalam tempe antara lain vitamin B1 (thiamin), B2 (riboflavin), asam pantotenat, asam nikotinat (niasin), vitamin B6 (piridoksin), dan B12 (sianokobalamin). Vitamin B12 aktivitasnya meningkat sampai 33 kali selama fermentasi, riboflavin naik sekitar 8-47 kali, piridoksin 4-14 kali, niasin 2-5 kali, biotin 2-3 kali, asam folat 4-5 kali, dan asam pantotenat 2 kali lipat.

Vitamin B12 kenaikannya paling mencolok pada pembuatan tempe, sehingga menjadi satu-satunya sumber vitamin yang potensial dari bahan pangan nabati.

Vitamin ini tidak diproduksi oleh kapang tempe, tetapi oleh bakteri kontaminan seperti *Klebsiella pneumoniae* dan *Citrobacter freundii*.

Keberadaan vitamin B12 dalam tempe sangat istimewa. Vitamin B12 umumnya terdapat pada produk-produk hewani, tetapi tidak dijumpai pada makanan nabati (sayuran, buah-buahan, dan biji-bijian). Vitamin B12 sangat diperlukan dalam pembentukan sel-sel darah merah. Kekurangan vitamin ini mengakibatkan terjadinya anemia pernisiiosa. Gejala yang ditimbulkan dari gangguan ini adalah pucat, sakit perut, dan berat badan menurun.

Kadar vitamin B12 dalam tempe berkisar antara 1,5 sampai 6,3 mikrogram per 100 gram tempe kering. Jumlah ini telah dapat mencukupi kebutuhan vitamin B12 seorang per hari. Dengan adanya vitamin B12 pada tempe, para vegetarian tidak perlu merasa khawatir akan kekurangan vitamin B12, sepanjang mereka melibatkan tempe dalam menu hariannya.

Tempe bukan saja sebagai sumber protein, tetapi juga mengandung mineral makro dan mikro dalam jumlah yang cukup. Kapang tempe dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang mengikat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat, mineral-mineral tertentu (seperti besi, kalsium, magnesium, seng) menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh. Jumlah mineral zat besi, tembaga, dan seng berturut-turut adalah 9,39, 2,87, dan 8,05 mg setiap 100 gram tempe. Dengan mengonsumsi tempe secara teratur akan menghindarkan seseorang dari anemia akibat kekurangan zat gizi besi.

Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Berbagai jenis isoflavon yang terdapat dalam tempe adalah daidzein, genistein, Faktor 2 (Gyorgy, 1964), dan glisitein (Naim, 1976).

3.3 Senyawa Isoflavon

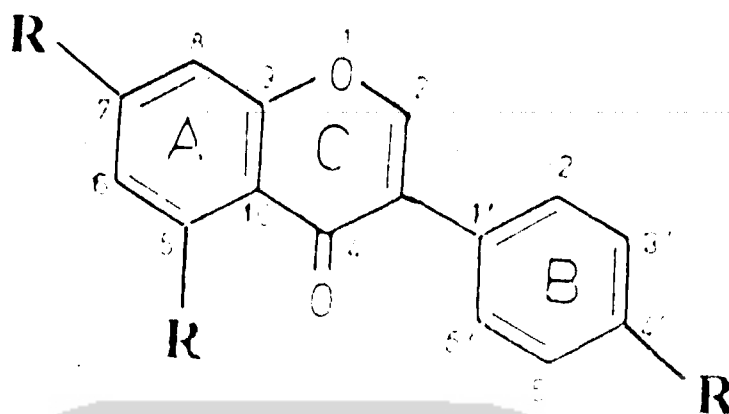
Berdasarkan biosintesa isoflavon digolongkan sebagai senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder biasanya merupakan senyawa yang disintesis oleh mikroba tertentu dan senyawa ini pada umumnya tidak merupakan kebutuhan fisiologis pokok dari mikroba baik untuk pertumbuhan dan aktivitas kehidupannya. Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, namun senyawa metabolit sekunder dapat juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidup. Senyawa metabolit sekunder biasanya terbentuk pada saat tidak adanya pertumbuhan sel, akibat keterbatasan nutrisi dalam medium pertumbuhannya. Keterbatasan zat gizi dalam medium merangsang dihasilkannya enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan kelangsungan hidup. Isoflavon termasuk dalam golongan flavonoid (1,2-diarilpropan) dan merupakan bagian kelompok yang terbesar dalam golongan tersebut. Secara karakteristik senyawa isoflavon terdapat dalam tanaman kacang-kacangan atau *Leguminoceae*.

Meskipun isoflavon merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder, namun tidak terdapat pada mikroorganisme seperti bakteri, algae, jamur dan lumut, karena mikroorganisme tersebut tidak mempunyai kemampuan untuk mensintesa.

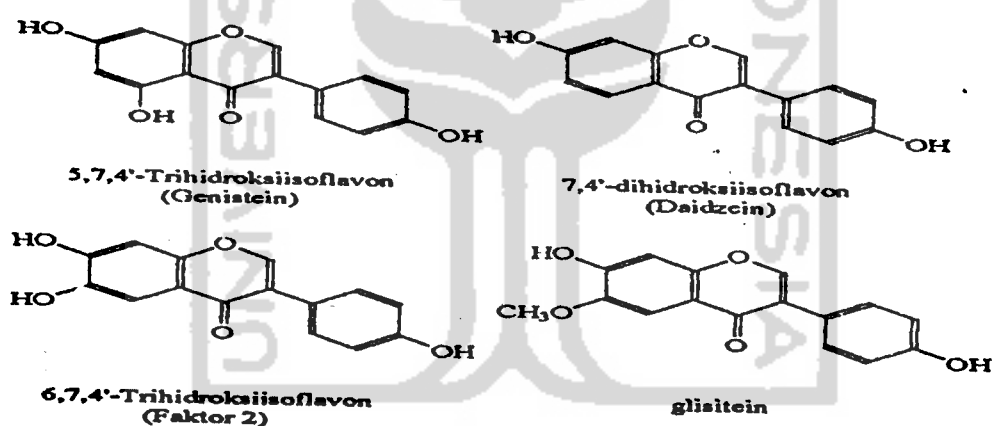
Meskipun demikian mikroba0mikroba tertentu mempunyai kemampuan untuk melakukan transformasi senyawa isoflavon (Lucker, 1984).

Secara umum senyawa isoflavon dibedakan menjadi 2 (dua) macam, yaitu senyawa aglikon (bebas) yang bermanfaat untuk kebutuhan obat-obatan, dan senyawa isoflavon glikosida (terikat oleh senyawa gula), dimana senyawa gula yang terikat tersebut dapat dihilangkan dengan hidrolisis asam dan hidrolisis enzim.

Isoflavon merupakan senyawa flavonoid minor. Disebut demikian karena penyebarannya terbatas. Isoflavon yang telah dikenal lebih dari 200 senyawa, merupakan isomer flavon, tetapi terdapat jauh lebih langka. Hampir semuanya terdapat dalam anak suku *Legumineceae*. Isoflavonoid dapat dipilih menjadi 3 kelas berdasarkan sifat fisiologisnya. Senyawa seperti 7, 4'-dihidroksiisoflavon (daidzein) dan 5, 7, 4'-trihidroksiisoflavon (genistein) merupakan estrogen alam lemah. Isoflavon rumit, misalnya rotenon, merupakan insektisida alam kuat, sementara kumestan yang sekerabat misalnya pisatin, adalah fitoaleksin, yaitu senyawa pelindung yang terbentuk dalam tumbuhan sebagai tanggapan terhadap serangan penyakit. Selain itu beberapa senyawa isoflavon juga mempunyai aktivitas antifungi, juga sebagai insektisida. Struktur umum senyawa isoflavon dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 1. Struktur Isoflavon



Gambar 2. Struktur beberapa senyawa isoflavon

3.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu komponen yang diinginkan dari penyusun-penyusun lain dalam suatu campuran. Berdasarkan jenis fasanya, maka ekstraksi dapat berupa ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair.

Ekstraksi cair-cair diklasifikasikan berdasarkan pada hukum distribusi yang menyatakan bahwa “jika pada suatu sistem yang terdiri dari dua lapisan cairan yang tidak larut sesamanya ditambahkan senyawa ketiga, maka senyawa ketiga tersebut akan terdistribusi diantara kedua lapisan cairan tersebut”.

Salah satu metode ekstraksi zat padat adalah menggunakan seperangkat soxhlet. Prosedur klasik untuk mendapatkan kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering (daun, akar, biji) ialah dengan mengekstraksi serbuk bahan dengan alat soxhlet menggunakan pelarut secara berganti-ganti (Harborne, 1987).

Ekstraksi soxhlet merupakan ekstraksi yang berlangsung secara berulang-ulang dan teratur sehingga dapat diharapkan hasil yang maksimal. Prinsip pemisahannya adalah dengan membiarkan komponen yang akan dipisahkan bercampur sementara waktu dengan pelarut melalui proses yang berulang-ulang dan teratur. Alat yang digunakan berupa seperangkat soxhlet yang terdiri dari pemanas, labu alas bulat, soxhlet dan pendingin bola (Meloan, 1999).

Serbuk yang akan diekstraksi dimasukkan dalam kertas saring lalu diikat kuat dan ditempatkan di bagian dalam alat soxhlet. Kemudian dipasang labu alas bulat yang sesuai ukurannya dan diisi pelarut. Bagian atas diisi pendingin balik. Pelarut

yang berada dalam labu alas bulat dipanaskan sehingga akan mencapai titik didihnya. Pada saat pelarut mendidih, terjadi kesetimbangan fase cair dan fase uap. Fase uap menguap melalui pipa masuk ke pendingin dan akan mengembun. Embun yang berupa fase cair pelarut menetes dan mengenai zat pada zat yang diletakkan dalam sokhlet.

Pemanasan dilakukan secara terus menerus sehingga akan dihasilkan fase uap yang terus mengembun di pendingin kemudian menetes ke zat padat. Pelarut akan ditampung sementara waktu dengan dibiarkan merendam ekstrak sampai tingginya mencapai tinggi pipa kapiler. Akhirnya pelarut yang telah membawa komponen yang akan dipisahkan kembali ke labu alas bulat melalui pipa soxhlet. Proses ini berlangsung secara terus menerus sampai batas waktu yang diinginkan.

Ekstraksi soxhletasi digunakan untuk isolasi senyawa dari bahan padat menggunakan pelarut tertentu sesuai dengan senyawa yang akan dipisahkan. Pemilihan pelarut berdasarkan kaidah "like dissolved like", yang berarti suatu senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, dan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar. Pelarut-pelarut yang biasa dipakai dalam ekstraksi soxhletasi antara lain : alkohol, kloroform, eter minyak bumi, n-heksana, dietil eter, dan lain sebagainya.

Pelarut yang baik harus memenuhi beberapa kriteria antara lain adalah :

1. Pelarut harus mampu melarutkan semua komponen yang dipisahkan dan tidak melarutkan bahan yang diekstrak
2. Pelarut harus mempunyai titik didih yang relatif rendah sehingga mudah dipisahkan.

3. Pelarut harus mudah dipisahkan dari komponen yang dipisahkan.
4. Pelarut tidak melarutkan air yang ada di dalam bahan.
5. Secara ekonomis pelarut murah harganya.

(Rohyami, 2003)

Ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu :

1. Jenis komponen yang akan dipisahkan
2. Jenis pelarut dan jumlahnya
3. Waktu ekstraksi
4. Temperatur ekstraksi

Keuntungan dari ekstraksi soxhletasi adalah kebutuhan akan pemanasan minimal, sehingga diharapkan tidak merusak komponen penyusun ekstrak yang diperoleh, dan proses ekstraksi dapat berlangsung berulang-ulang secara otomatis sampai ekstraksi sempurna (Furniss, 1978).

Sedangkan kekurangan metode ini adalah bahwa temperatur di labu berada di bawah temperatur didihnya sehingga temperatur pelarut untuk ekstraksi rendah dan ekstraksi berlangsung relatif lama. Hal ini akan nampak khususnya jika kelarutan zat meningkat dengan kenaikan temperatur (Vogel, 1985).

3.5 KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Cara pemisahan dengan adsorpsi pada lapisan tipis adsorben yang sekarang dikenal dengan KLT sebenarnya telah dipakai sejak tahun 1938 oleh Ismailov dan Shraiber. Sampai tahun 1959, cara ini masih belum dianggap mantap. Meskipun

demikian pada tahun 1961 penggunaannya telah meluas dan diakui merupakan cara pemisahan yang baik, khususnya untuk kegunaan analisis kualitatif. Kini KLT dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion anorganik, dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat di alam dan senyawa-senyawa organik sintetik.

Fase gerak (eluen) yang digunakan ada dua, yaitu eluen tunggal dan eluen yang terdiri dari campuran 2 atau lebih pelarut. Eluen yang digunakan sifatnya coba-coba. Berdasarkan strukturnya, pelarut dibedakan 3 yaitu :

1. Pelarut polar, misalnya: metanol, etanol, asam asetat
2. Pelarut semi polar, misalnya: aseton, etil asetat, kloroform
3. Pelarut non polar, misalnya: n-heksana, sikloheksana, benzena, karbon tetra klorida.

KLT merupakan kromatografi adsorpsi dan adsorben bertindak sebagai fase stationer. Empat macam adsorben yang umum dipakai ialah silika gel (asam silikat), alumina (*aluminium oxyde*), kieselguhr (*diatomeous earth*), dan selulosa. Dari keempat jenis adsorben tersebut, yang paling banyak dipakai ialah silika gel dan masing-masing terdiri dari beberapa jenis yang mempunyai nama perdagangan bermacam-macam.

plat yang telah dikembangkan di dalam ruangan gelap atau dengan sinar ultra violet yang bergelombang pendek.

2. Alumina

Penggunaan alumina dalam KLT, yang semula diperkenalkan oleh peneliti dari Cekoslawakia, tidak sesering silika gel. Sebenarnya alumina netral mempunyai kemampuan untuk memisahkan bermacam-macam senyawa, seperti terpena, alkaloid, steroid dan senyawa-senyawa alisiklik serta aromatik. Sebagai adsorben, alumina tidak mengandung zat perekat, mempunyai sifat sedikit alkalis dan dapat digunakan baik tanpa maupun dengan aktivasi.

3. Kieselguhr

Kieselguhr merupakan adsorben yang lebih lemah dari silika gel dan alumina, oleh karena itu lebih cocok untuk memisahkan senyawa-senyawa polar.

KLT mempunyai keuntungan antara lain :

- waktu yang dibutuhkan relatif lebih pendek dibandingkan dengan kromatografi kertas atau kolom,
- resolusi lebih baik,
- adsorben anorganik yang tidak berfluoresensi pada KLT akan lebih kontras terhadap noda berfluoresensi dari pada kromatografi kertas,
- banyak jenis adsorben yang dapat digunakan,

- sederhana,
- reproduksibilitas hasil cukup baik dan relatif murah.

Selain untuk identifikasi, KLT juga dapat digunakan untuk semi kuantitatif yaitu dengan membandingkan ukuran/luas noda antara senyawa yang diperiksa dan baku pembanding dan dapat juga digunakan pula untuk penetapan kadar (kuantitatif) yaitu dengan cara Spektrofotodensitometri, Spektrofotometri (setelah dikerok dan dilarutkan dalam pelarut) atau dengan cara titrasi, dan lain-lain.

Hal-hal yang perlu diperhatikan pada KLT :

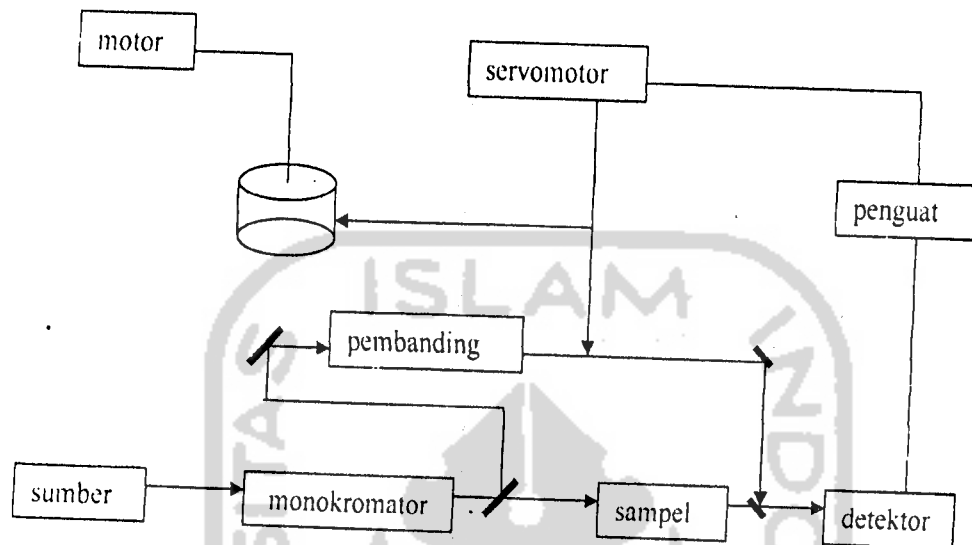
- KLT seperti metode kromatografi lainnya adalah metode analisis pembandingan. Untuk identifikasi senyawa haruslah digunakan senyawa pembanding dan tidak dapat digunakan harga R_f yang ada dalam pustaka.
- Jika suatu sampel yang tidak diketahui memberikan satu noda setelah pengembangan dengan sistem pelarut tertentu, belum berarti bahwa sampel mengandung hanya satu senyawa tersebut. Untuk memastikan harus dilakukan pengembangan dengan sistem pelarut yang lainnya atau digunakan metode pengembangan lainnya.
- Jika suatu senyawa yang tidak diketahui menunjukkan harga R_f yang sama dengan senyawa pembanding, belum berarti bahwa kedua zat adalah sama (identik). Untuk memastikan maka harus dikembangkan dengan sistem pengembangan yang lain, salah satunya dengan Spektrofotometer UV-Vis.

3.6 Spektrofotometer UV-Vis

Spektroskopi adalah suatu metode analisis berdasarkan interaksi antara radiasi gelombang elektromagnetik dengan molekul sampel. Spektrum elektromagnetik dikelompokkan berdasar pada sifat dan panjang gelombang. Spektrum sinar UV terletak pada panjang gelombang 100-380 nm, sedangkan spectrum sinar tampak pada panjang gelombang sekitar 380 – 780 nm. Apabila radiasi gelombang elektromagnetik dilewatkan pada suatu senyawa, maka sebagian radiasi akan diserap oleh suatu molekul dengan panjang gelombang tertentu sesuai dengan struktur molekul tersebut.

Spektroskopi serapan ultraviolet merupakan cara yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid. Keuntungan utama metode analisis ini adalah sangat sedikit cuplikan yang diperlukan dalam serangkaian analisis lengkap (Markham, 1988).

Pelarut yang biasa digunakan dalam analisis spektrofotometer ultraviolet adalah metanol dan etanol 95 %, karena kebanyakan golongan senyawa flavonoid larut dalam pelarut tersebut. Pelarut lain yang sering digunakan antara lain; air, n-heksana, dan eter, sedangkan pelarut seperti kloroform dan piridin sebaiknya dihindari (Markham, 1988).

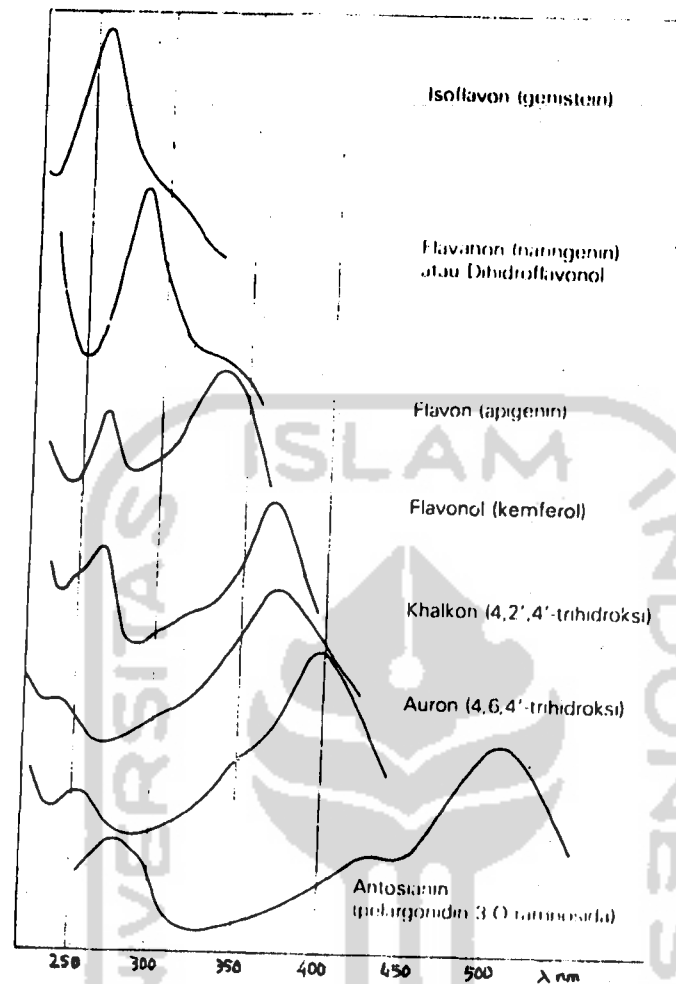


Gambar 3. Bagan Alat Spektrofotometer UV-Vis

Isoflavon merupakan senyawa flavonoid dengan sistem aromatis terkonjugasi, sehingga memberikan serapan pada spektrum UV-Vis. Spektrum khas isoflavon terdiri dari dua puncak yaitu pada rentang 245 – 275 nm (pita II) dan 310 – 330 nm (pita I). Petunjuk mengenai rentang maksimal utama yang diperkirakan untuk setiap jenis flavonoid yaitu terlihat pada tabel 2:

Tabel 2. Rentangan serapan spektrum UV-tampak flavonoid (Markham, 1988)

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis Flavonoid
250 – 280	310 – 350	Flavon
250 – 280	330 – 360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250 – 280	350 – 385	Flavonol (3-OH bebas)
245 – 275	310 – 330 bahu	Isoflavon
	kira-kira 320 puncak	Isoflavon (5-deoksi-6,7-dioksigenasi)
275 – 295	300 – 330 bahu	Flavanon dan dihidroflavonol
230 -270	340 – 390	Khalkon
230 – 270	380 – 430	Auron
270 – 280	465 – 560	Antosianidin dan antosianin



Gambar 4. Spektrum serapan UV-tampak jenis flavonoid yang berbeda tetapi pola hidroksilasinya sama (Markham, 1988)

Menurut Harjono (1985) istilah yang sering digunakan dalam spektrum elektronik adalah kromofor. Kromofor digunakan untuk menyatakan gugus jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi dalam daerah UV-Vis.

Beberapa istilah penting lainnya adalah:

- Auksokrom adalah gugus jenuh yang jika terikat pada kromofor dapat mengubah panjang gelombang dan intensitas serapan maksimum. Auksokrom merupakan hetero atom yang langsung terikat pada kromofor. Contoh: $-\text{OCH}_3$, $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$, dan $-\text{NH}_2$.
- Pergeseran batokromik adalah pergeseran serapan kearah panjang gelombang yang lebih panjang, disebabkan substitusi atau pengaruh pelarut. Sering disebut pergeseran merah.
- Pergeseran hipsokromik adalah pergeseran kearah panjang gelombang yang lebih pendek, disebabkan oleh substitusi atau pengaruh pelarut. Sering disebut pergeseran biru.
- Efek hiperkromik adalah kenaikan dalam intensitas serapan.
- Efek hipsokromik adalah penurunan dalam intensitas serapan.

Untuk membantu menentukan jenis flavonoid, pola oksigenasi dan letak gugus hidroksil pada flavonoid aglikon, dilakukan penambahan pereaksi geser. Pereaksi geser dapat ditambahkan pada sampel yang sudah dilarutkan terlebih dahulu dalam pelarut, seperti metanol atau etanol 95 %.

Pereaksi geser yang biasa ditambahkan, yaitu penambahan NaOMe (natrium metoksida) yang dapat diganti dengan NaOH 2M. Jika menyebabkan pergeseran panjang gelombang menunjukkan adanya 5-OH pada cincin A dan atau 4'-OH pada cincin B. Penambahan AlCl_3 (aluminium klorida) mendeteksi adanya gugus 5-OH

dan keton. Penambahan NaOAc (natrium asetat) mendeteksi adanya gugus 7-OH, dan H_3BO_3 (asam borat) mendeteksi adanya gugus orto-hidroksil pada cincin A (Markham, 1988).

3.7 Hipotesis

Isolasi senyawa isoflavon tunggal tepung kedelai terfermentasi lebih mudah dan mempunyai randemen yang lebih besar dibandingkan biji kedelai terfermentasi (tempe).



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Alat dan Bahan yang digunakan

4.1.1 Alat yang digunakan

1. Spektrofotometer UV-Vis merk Hitachi model U-1020
2. Kromatografi Lapis Tipis GF 254
3. Lampu UV 254 nm
4. Oven
5. Seperangkat alat soxhlet
6. *Rotary evaporator*
7. Corong *buchner*
8. Kertas saring
9. Blender Merk Philips
10. Beberapa alat gelas lain

4.1.2 Bahan yang digunakan

1. Kedelai kuning
2. n-heksana teknis CV.ORGANIK
3. Metanol p.a.; 99,8 % (v/v) Produksi E. Merck
4. Kloroform p.a.; 99,4 % (v/v) Produksi E. Merck
5. HCl p.a.; 37 % (v/v) Produksi E. Merck

6. Aquades
7. NaOH 2M
8. Serbuk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Produksi E. Merck
9. Serbuk NaOAc anhidrat Produksi E. Merck
10. Serbuk H_3BO_3 Produksi E. Merck

4.2 Jalan Penelitian

4.2.1 Pembuatan Biji Kedelai Terfermentasi (Tempe Kedelai)

Dua kilogram biji kedelai kering direndam dalam air sebanyak 6 L selama 1 malam. Biji kedelai yang telah direndam dikuliti dan direbus selama 30 menit kemudian ditiriskan dan didinginkan. Selanjutnya setengah bagian biji kedelai rebus tersebut diinokulasi dengan ragi tempe. Kacang yang diinokulasi dimasukkan dalam kantong plastik bening berlubang-lubang dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 12, 24, 36, dan 48 jam pada temperatur 30°C .

4.2.2 Pembuatan Tepung Kedelai Terfermentasi (Tempe Tepung Kedelai)

Setengah bagian biji kedelai rebus seperti dalam perlakuan pembuatan tempe kedelai di atas dikeringkan dan dihaluskan. Selanjutnya diinokulasi dengan ragi tempe sampai homogen dan ditambahkan air sebanyak bagian yang hilang pada saat pengeringan. Adonan yang terbentuk dimasukkan dalam kantong plastik bening berlubang-lubang dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 12, 24, 36, dan 48 jam pada temperatur 30°C .

4.2.3 Penyiapan Ekstrak Tempe Kedelai dan Tempe Tepung Kedelai

Tempe kedelai dan tempe tepung kedelai yang diperoleh pada tiap waktu fermentasi masing-masing diiris dan dikeringkan dalam oven (50°C) kemudian dihaluskan sampai menjadi tepung. Selanjutnya lemak tepung tempe dipisahkan dengan metode soxhletasi menggunakan n-heksana selama 3 – 4 jam. 40 gram tepung bebas lemak direndam dalam 400 ml metanol 80 %, kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan temperatur 4°C . Residu yang tertinggal dilarutkan kembali dengan 120 ml metanol, dan didiamkan semalaman, kemudian ekstrak sampel dalam metanol diuapkan kembali sampai setengahnya sehingga diperoleh ekstrak kental.

4.2.4 Identifikasi pendahuluan menggunakan kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak kental dilarutkan dalam metanol. Ambil dengan pipa kapiler, dan totolkan ke plat KLT 10 x 10 cm sebanyak 5 – 10 tetes (totolan), kemudian dielusi dengan menggunakan eluen metanol : kloroform (1 : 9), Naim (1976). Elusi ini dilakukan setelah bejana penuh dengan uap eluen, dan didiamkan selama 5 – 10 menit.

Plat dikeringkan, kemudian tandai noda yang dihasilkan dengan pensil dan dideteksi dengan menggunakan lampu ultraviolet pada $\lambda = 254 \text{ nm}$. Setelah itu noda tersebut dikerok dan ditambahkan metanol, kemudian disaring dan di UV.

4.2.5 Karakterisasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Diambil sebanyak 2-3 ml fraksi metanol tersebut, dimasukkan dalam kuvet dan diukur spektrumnya pada panjang gelombang 200 – 350 nm. Blanko yang digunakan adalah metanol. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pereaksi geser. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi natrium metoksida, AlCl_3 , HCl , serbuk natrium asetat anhidrat, dan serbuk H_3BO_3 . Pembuatan pereaksi tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Natrium metoksida

Sebanyak 2,5 gram logam natrium dipotong dengan hati-hati dan dimasukkan dengan hati-hati kedalam 100 ml metanol. Pereaksi ini disimpan dalam botol kaca bertutup plastik. Pereaksi pengganti yang cocok adalah NaOH 2M.

2. Aluminium klorida

Sebanyak 5 gram AlCl_3 dilarutkan dalam 100 ml metanol.

3. Asam Klorida

Sebanyak 50 ml HCl pekat dilarutkan dalam 100 ml akuades.

Tahapan penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut:

1. Tambahkan 3 tetes natrium metoksida kedalam kuvet yang berisi ekstrak metanol kemudian diukur spektrumnya. Setelah 5 menit spectrum diukur kembali untuk mengetahui kemungkinan terjadinya dekomposisi senyawa isoflavon.

2. Ekstrak metanol dimasukkan kedalam kuvet, kemudian tambahkan 6 tetes AlCl_3 dan diukur spektrumnya. Ditambahkan 3 tetes HCl dan diukur spektrumnya.
3. Ekstrak metanol dimasukkan kedalam kuvet, kemudian ditambahkan serbuk natrium asetat anhidrat sampai kira-kira terdapat 2 mm pada dasar kuvet, kemudian diukur spektrumnya. Ditambahkan serbuk asam borat setengah dari penambahan natrium asetat anhidrat dan diukur spektrumnya.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pembuatan Tempe Kedelai

Kedelai yang digunakan untuk pembuatan tempe berasal dari pasar Bringharjo, Jogjakarta, sebanyak dua kg. Cara pembuatan tempe kedelai yaitu pertama-tama biji kedelai di pilih/di bersihkan dari kotoran, dicuci dengan air yang bersih selama 1 jam. Setelah bersih kedelai di rebus dalam air selama 2 jam. Kemudian direndam 12 jam dalam air panas/hangat bekas air perebusan dengan maksud supaya kedelai mengembang. Berikutnya di rendam dalam air dingin selama 12 jam. Setelah 24 jam kedelai di cuci/dikuliti (dikupas). Setelah di kupas , direbus untuk membunuh bakteri yang kemungkinan tumbuh selama perendaman. Kedelai di ambil dari dandang, letakkan di atas tampah dan diratakan tipis-tipis. Biarkan dingin sampai permukaan keping kedelai kering dan airnya menetes habis. Kemudian di bagi 2, yaitu yang satu diblender sehingga menjadi tepung dan yang satu lagi tetap kedelai. Setelah itu masing-masing kedelai baik yang dijadikan tepung maupun tetap kedelai dicampur dengan laru (ragi 2 %) guna mempercepat/merangsang pertumbuhan jamur. Proses mencampur kedelai dengan ragi memakan waktu sekitar 20 menit. Tahap peragian (fermentasi) adalah kunci keberhasilan atau tidaknya membuat tempe kedelai. Fermentasi merupakan proses penguraian atau perombakan bahan organik yang dilakukan dalam kondisi tertentu oleh mikroorganisme fermentatif. Kondisi lingkungan yang mendukung proses fermentasi antara lain adalah:

1. Derajat keasaman atau pH rendah, antara 3-4;
2. Kadar garam dan kandungan gula yang tinggi;
3. Kadar air sedang antara 30-50%,
4. Kandungan antioksidan dari tanaman rempah dan obat, serta
5. Adanya mikroorganisme fermentasi.

Bila campuran bahan fermentasi kedelai sudah rata, kemudian dimasukkan plastik dan plastik tersebut di lobangi/ditusuk-tusuk. Maksudnya ialah untuk memberi udara supaya jamur yang tumbuh berwarna putih. Setelah itu masing-masing kedelai yang diblender atau yang tidak diblender diinkubasi selama 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Diinkubasi didalam ruang tertutup/gelap dengan temperatur 30°C. Kedelai yang diberi ragi dapat tumbuh jamur kapang dengan cepat, sehingga dapat cepat menjadi tempe.

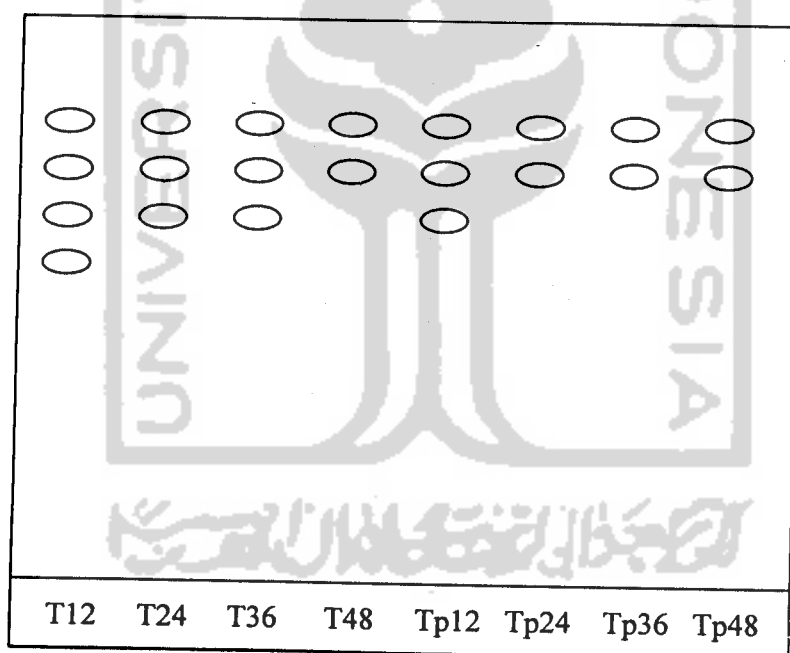
Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada proses pengolahan tempe agar diperoleh hasil yang baik ialah:

1. Kedelai harus dipilih yang baik (tidak busuk) dan tidak kotor
2. Air harus jernih, tidak berbau dan tidak mengandung kuman penyakit
3. Cara pengerjaannya harus bersih
4. Bibit tempe (ragi tempe) harus dipilih yang masih aktif (bila diremas membentuk butiran halus atau tidak menggumpal)

menjadi kuning kecoklatan. Setelah dievaporator lalu ditambahkan 120 ml metanol dan didiamkan lagi dalam lemari pendingin selama 1 malam atau 24 jam. Setelah itu diuapkan kembali dengan evaporator hingga setengah bagian, kurang lebih selama 45 menit juga, warnanya menjadi coklat muda. Maka jadilah ekstrak tempe kedelai dan tepung kedelai, sebanyak 8 sampel.

5.3 Hasil Pemisahan dengan KLT

Gambar 5 adalah hasil pengembangan ekstrak tempe dan tepung kedelai dengan KLT. Perbandingan eluen metanol : kloroform (1:9) menurut Naim (1976)



Gambar 5. Hasil pengembangan dengan KLT menggunakan eluen metanol : kloroform (1:9)

Keterangan gambar 5: T (12, 24, 36 dan 48) = Tempe kedelai

Tp (12, 24, 36 dan 48) = Tepung tempe kedelai

Tabel 3 merupakan harga Rf dan warna yang dihasilkan oleh pemisahan noda pada KLT setelah dilihat dibawah lampu 254 nm

Tabel 3. Harga Rf dan warna noda dengan lampu UV 254 nm

Rf	Senyawa	Warna pada UV 254 nm
0,96	Daidzein	Ungu kebiruan
0,87	Genistein	Ungu kebiruan
0,82	Faktor 2	Ungu kebiruan
0,76	Glistein	Ungu kebiruan

Tabel 4 dan tabel 5 merupakan harga Rf dari tempe kedelai dan tepung tempe kedelai yang dihasilkan oleh pemisahan noda pada KLT setelah dilihat dibawah lampu 254 nm, dengan eluen metanol : kloroform (1:9), menurut Naim (1976)

Tabel 4. Analisis isoflavon dalam tempe kedelai

Tempe Kedelai	Daidzein (Rf = 0,96)	Genistein (Rf = 0,87)	Faktor 2 (Rf = 0,82)	Glistein (Rf = 0,76)
Tempe 12	+	+	+	+
Tempe 24	+	+	+	-
Tempe 36	+	+	+	-
Tempe 48	+	+	-	-

Tabel 5. Analisis isoflavon dalam tepung tempe kedelai

Tepung Kedelai	Daidzein (Rf = 0,96)	Genistein (Rf = 0,87)	Faktor 2 (Rf = 0,82)	Glistein (Rf = 0,76)
Tepung 12	+	+	+	-
Tepung 24	+	+	-	-
Tepung 36	+	+	-	-
Tepung 48	+	+	-	-

Dari data diatas, berdasarkan deteksi secara kualitatif dan harga Rf yang dihasilkan setelah sampel yang ditotolkan pada plat KLT dideteksi dengan lampu UV 254 nm, menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah suatu senyawa isoflavon, yaitu genistein.

5.4 Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis

Analisis ini digunakan untuk membuktikan dugaan yang berasal dari identifikasi awal dengan KLT bahwa senyawa tersebut adalah isoflavon, dengan cara mengetahui panjang gelombang maksimum dan pergeseran batokromik yang terjadi pada saat ditambahkannya pereaksi geser ke dalam sampel dalam metanol. (Jamal, 2003)

Setelah di KLT pada tempe 12, 24, 36, dan 48 jam dan tepung tempe 12, 24, 36, dan 48 jam senyawa yang muncul sama yaitu genistein. Kemudian setelah di KLT lalu di spektro UV-Vis untuk menentukan panjang gelombang yang cocok untuk

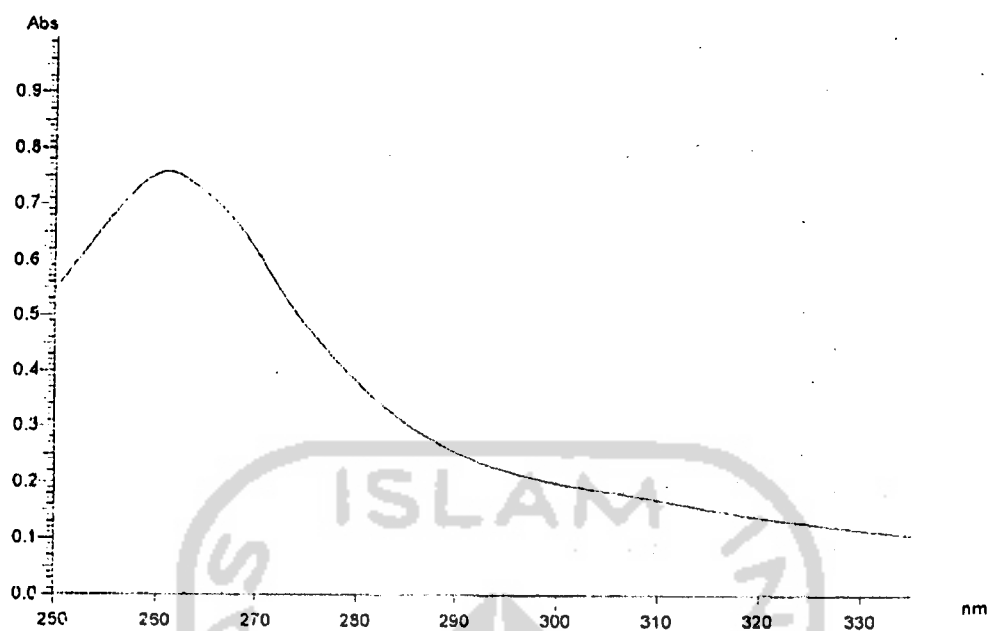
senyawa isoflavon tersebut. Ternyata dari hasil UV didapatkan bahwa tepung tempe 48 jam yang memenuhi panjang gelombang untuk senyawa isoflavon, dikarenakan senyawa isoflavon yang muncul dari berbagai waktu fermentasi pada tempe kedelai dan tepung tempe kedelai tidak terdapat perbedaan, karena senyawa isoflavon yang muncul dari kedua tipe fermentasi tersebut merupakan campuran, dan senyawa isoflavon tunggal yang sama selalu muncul dalam setiap variasi waktu fermentasi. Sehingga pada tepung tempe 48 jam kandungan senyawa genisteinnya lebih banyak dibandingkan dari fermentasi sebelumnya.

Tabel 6 terlihat bahwa panjang gelombang maksimum yang dimiliki oleh sampel (tepung tempe 48 jam) dengan senyawa genistein, yang menyerap pada panjang gelombang antara 245 – 275 nm (pita II), dan 310 – 330 nm (pita I).

Tabel 6. Panjang gelombang maksimum sampel dalam metanol

Pereaksi	Panjang gelombang maksimum (nm)
Sampel dalam MeOH	261,2

Gambar 6 merupakan spektrum UV tepung tempe 48 jam dalam metanol, yang menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 261,2 nm (pita II) yang sesuai dengan panjang gelombang yang dimiliki oleh genistein, yang menyerap pada panjang gelombang antara 245 – 275 nm (pita II) dan 300 – 330 nm (pita I).



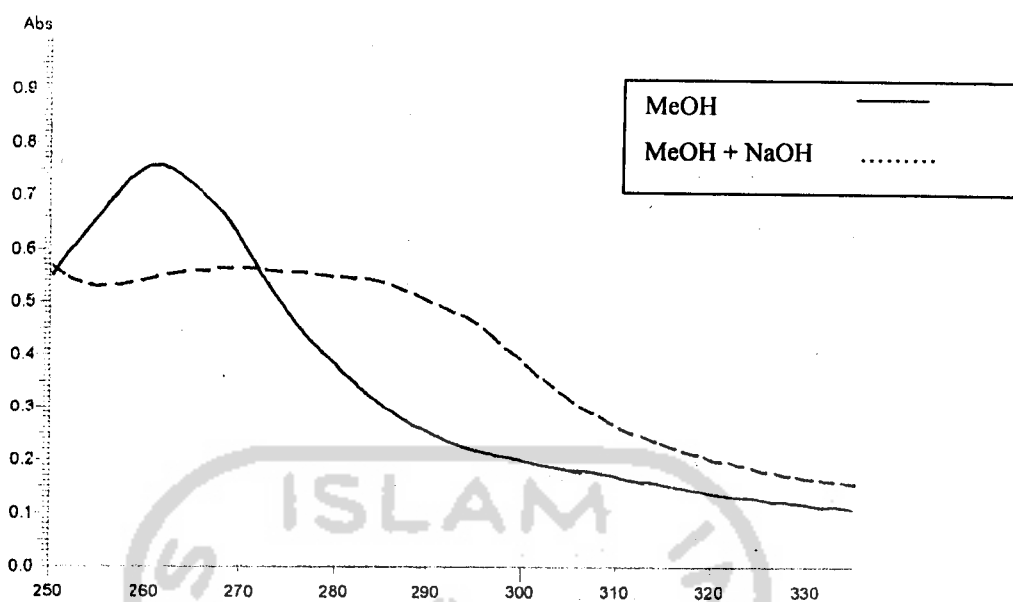
Gambar 6. Spektrum tepung tempe 48 jam dalam metanol

Data spektrum ultraviolet isoflavon pada tepung tempe 48 jam dalam metanol dengan penambahan pereaksi geser menyebabkan perubahan panjang gelombang maksimum di pita I dan pita II, disebabkan karena adanya interaksi antara senyawa isoflavon dengan pereaksi geser yang ditambahkan untuk mengetahui pola hidroksilasinya. Hasil analisis spektrofotometer UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser, menghasilkan pergeseran batokromik dan hipsokromik seperti terlihat pada tabel 7.

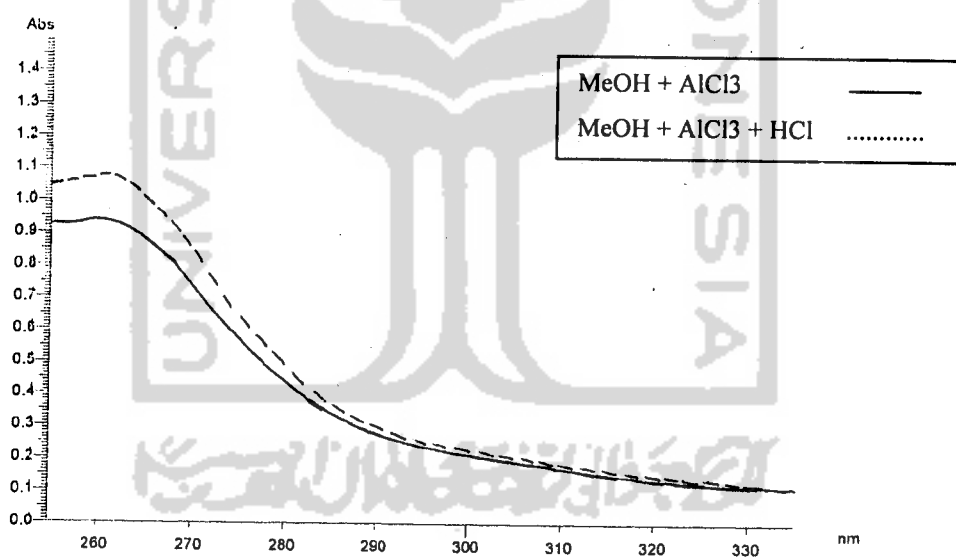
Tabel 7. Pergeseran batokromik dan hipsokromik pada penambahan pereaksi geser

Pereaksi	Pergeseran terhadap metanol	
	Batokromik	Hipsokromik
MeOH/NaOH	7,8 nm	-
MeOH/NaOH/5 menit	8,4 nm	-
MeOH/ AlCl_3	-	0,8 nm
MeOH/ AlCl_3/HCl	-	1 nm
MeOH/NaOAc	1 nm	-
MeOH/NaOAc/ H_3BO_3	0,4 nm	-

Pada gambar 7 terlihat, penambahan NaOH menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 7,8 nm terhadap spectrum metanol pada pita II, yaitu pergeseran dari 261,2 nm menjadi 269 nm. Hal ini menunjukkan adanya 5-OH pada cincin A dan adanya 4'-OH pada cincin B. Spektrum ini biasanya merupakan petunjuk "sidik jari" pola hidroksilasi dan juga bermanfaat untuk mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Dengan adanya penambahan waktu selama 5 menit setelah penambahan NaOH yaitu sebesar 0,6 nm dari 269 nm menjadi 269,6 nm merupakan petunjuk yang baik akan adanya gugus yang peka terhadap asam.



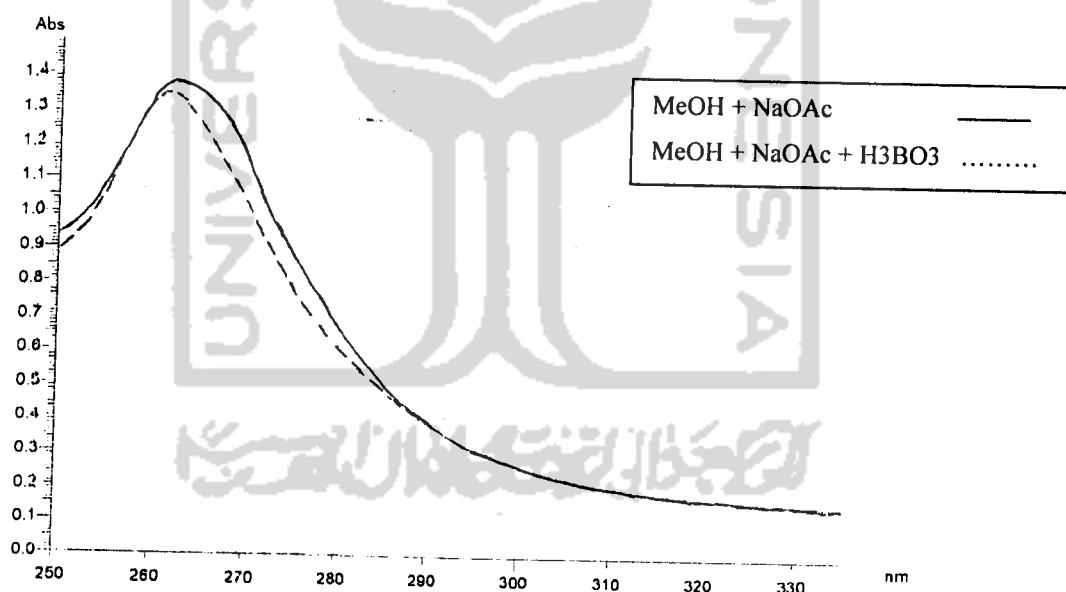
Gambar 7. Spektrum tepung tempe 48 jam dalam MeOH dan MeOH + NaOH



Gambar 8. Spektrum tepung tempe 48 jam dalam MeOH + AlCl₃ dan MeOH + AlCl₃ + HCl



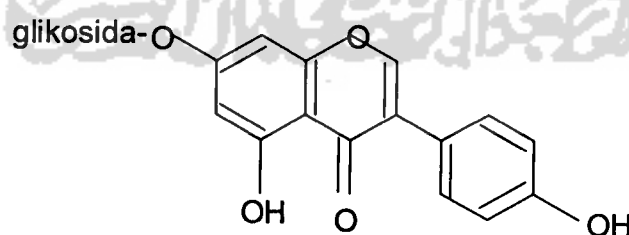
Gambar 8 menunjukkan spektrum pada penambahan AlCl_3 yang menyebabkan pergeseran hipsokromik sebesar 0,8 nm terhadap spektrum metanol pada pita II yaitu dari 261,2 nm menjadi 260,4 nm. Hal ini menunjukkan bahwa tidak adanya gugus 5-OH pada cincin A, karena pergeseran yang terjadi yaitu hipsokromik sedangkan pada penambahan AlCl_3 ini seharusnya pergeseran batokromik. Penambahan HCl terhadap larutan AlCl_3 ini juga mengalami pergeseran hipsokromik yaitu dari 261,2 nm menjadi 260,2 nm. Hal ini menunjukkan juga tidak adanya gugus 5-OH pada cincin A. Pereaksi AlCl_3 ini seharusnya dapat membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil (5-OH) dan keton yang berdampingan dan membentuk kompleks tidak tahan asam dengan gugus ortohidroksi (4'-OH).



Gambar 9. Spektrum tepung tempe 48 jam dalam MeOH + NaOAc dan MeOH + NaOAc + H₃BO₃

Gambar 9 menunjukkan spektrum pada penambahan pereaksi natrium asetat yang menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 1 nm terhadap spektrum metanol pada pita II yaitu dari 261,2 nm menjadi 262,2 nm. Hal ini menunjukkan bahwa tidak adanya gugus 7-OH dan tidak ada orto di -OH, atau juga disebabkan oleh adanya glikosida di C7 pada cincin A, karena penafsiran spektrum NaOAc adanya genistein jika ada pergeseran 20 nm. Penambahan natrium asetat hanya menyebabkan pengionan yang berarti pada gugus hidroksil isoflavon yang paling asam yang digunakan untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil bebas.

Pada penambahan asam borat menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 0,4 nm, terhadap spektrum metanol pada pita II yaitu dari 261,2 nm menjadi 261,6 nm, yang tidak menyebabkan pengaruh yang signifikan terhadap karakteristik pola hidroksilasi pada C7. Penambahan asam borat digunakan untuk menjembatani kedua gugus hidroksil pada cincin A dan cincin B, yaitu mendeteksi adanya gugus orto hidroksi. Tidak adanya pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi AlCl_3/HCl dan $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$, menyebabkan tidak adanya orto hidroksi, sehingga struktur senyawa dalam metanol adalah sebagai berikut seperti terlihat pada gambar 10.



Gambar 10. Struktur genistein 7-O-glikosida

Struktur diatas ikatan glikosida seharusnya sudah hilang karena adanya fermentasi, tetapi tidak hilang mungkin terjadi kesalahan dalam pembuatan tempe dan tepung kedelai, atau sewaktu fermentasi, raginya tidak rata atau terlalu tebal tempennya.

Dari data-data tersebut diatas mendukung dugaan bahwa senyawa tersebut adalah senyawa isoflavon genistein 7-O-glikosida (5,4'-dihidroksiisoflavon-7-O-glikosida).



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil pengamatan dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Senyawa isoflavon yang muncul dari berbagai waktu fermentasi pada tempe kedelai dan tepung tempe kedelai terdapat perbedaan, karena senyawa isoflavon yang muncul dari kedua tipe fermentasi tersebut merupakan campuran, dan senyawa isoflavon tunggal yang sama selalu muncul dalam setiap variasi waktu fermentasi, sehingga proses isolasi senyawa isoflavon tunggal tidak dapat optimal.
2. Berdasarkan spektrum ultraviolet dalam metanol dengan penambahan pereaksi geser NaOH, AlCl_3 dan NaOAc, menunjukkan bahwa senyawa isoflavon pada sampel tepung kedelai adalah genistein 7-O-glikosida.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penelitian ini, seperti:

1. Penelitian terhadap fraksi-fraksi lain hasil KLT
2. Perlu dilakukan penelitian tentang isoflavon menggunakan alat instrumen lain, misalnya seperti HPLC

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim., 2003, *Tempe Cegah Penuaan dan Kanker Payudara*, Arsip Kesehatan, Gloria Net (<http://www.tempe.com>)
- Furniss, B. S., Hannaford, A.J., Rogers, V., 1978, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Fourth Edition, The English Language Book Society and Longman, London, 130-132
- Gyorgy P., Kiku M., Hideo I., 1964, *Nature*, 203 (4979), 870-872
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, penerbit ITB Bandung
- Ikehata H., Michiko W., Kiku M., 1968, *J. Agric. Biol. Chem.*, 36(6), 740-746
- Jha. H. C, S. Kiriakidis, M. Hoppe, H. Eqqe, 1995, *Proceeding International Tempe Symposium*, Bali, 13-15 July
- Lail Jamalul, 2003, *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Isoflavon pada Akar Kedelai (Glycine max (L) Merrill)*, Skripsi, Fakultas MIPA, UII, Jogjakarta
- Lucker, M.1984, *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plant and Animals*, Springer-Verlag, Berlin.p: 453-456
- Maggy T. S., 1998, *Enzim dan Bioteknologi*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Markham. K. R, 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung
- Meloan, C.E, 1999, *Chemical Separations : Principles, Techniques, and Experiments*, John Wiley and Sons Inc, New York
- Naim., Benjamin G., Aron B., Yehudith B., 1976, *J. Food Chem.*, 24 (6), 1174-1177
- Rohyami Yuli, 2003, "*Identifikasi Flavonoid dari Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa Boerl) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis*", Skripsi, Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia, Jogjakarta.
- Sastrohamidjojo., 2001, *Spektroskopi*, Penerbit Liberty Jogjakarta

- Suprpto Hs., 2002, *Bertanam Kedelai*, Penerbit PT Penebar Swadaya, Jakarta
- Vogel., 1985, *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*, edisi kelima, Penerbit PT Kalman Media Pusaka, Jakarta
- Wang H. L. Ruttle D. I., Hesseltine C. W., 1969, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131, 579-582
- Wisnu., 2003, *Kedelai Bahan Pangan Penyayang Tulang*, Sinar Harapan, 2003 (<http://www.kedelai.com>)
- Wuryani W., Subaranti W., Yahya V. J., Sibarani S., 1995, *Proceeding Internasional Tempe Symposium*, Bali, 13-15 July
- Ziliken F., 1987, *Production of Novel Isoflavones*, Material Meeting, BMBF, Bonn, Germany



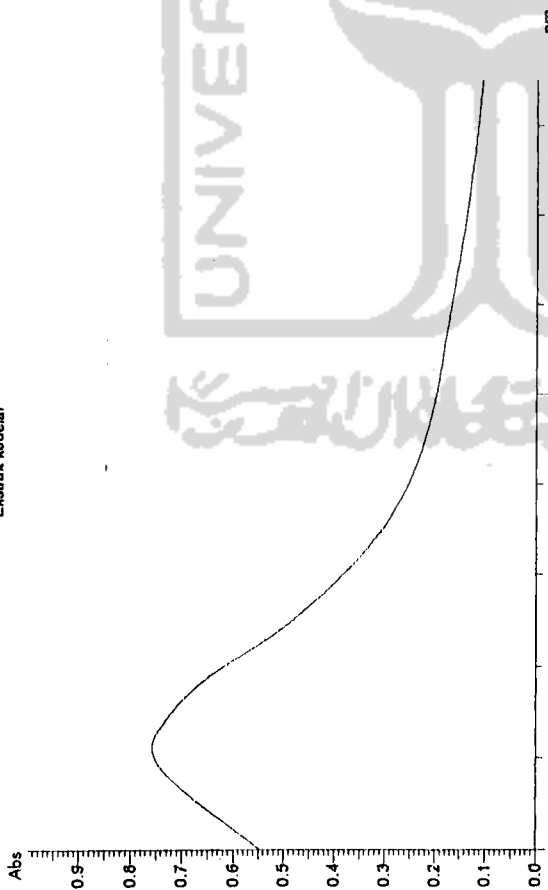
LAMPIRAN



Lampiran 1**Pohon Kedelai**

Report Date: 10:13:00, 01/20/2005

Ekstrak kedelai



Sample: Ekstrak kedelai
Run Date: 10:38:39, 01/08/2005
Operator: Rick
Comment: Tepung 48

Instrument Model: U-2010 Spectrophotometer
Serial Number: 0000-000
ROM Version: 2550 01

Measurement Type: Wavelength Scan

Data Mode: Abs
Starting Wavelength: 350.0 nm
Ending Wavelength: 220.0 nm
Scan Speed: 800 nm/min
Sampling Interval: 0.2 nm
Slit Width: 2 nm
Lamp Change: 340.0 nm
Baseline Correction: System
Response: Fast
Path Length: 10.0 mm

Processing Performed

Savitsky-Golay Smoothed

Smoothing Order: 3

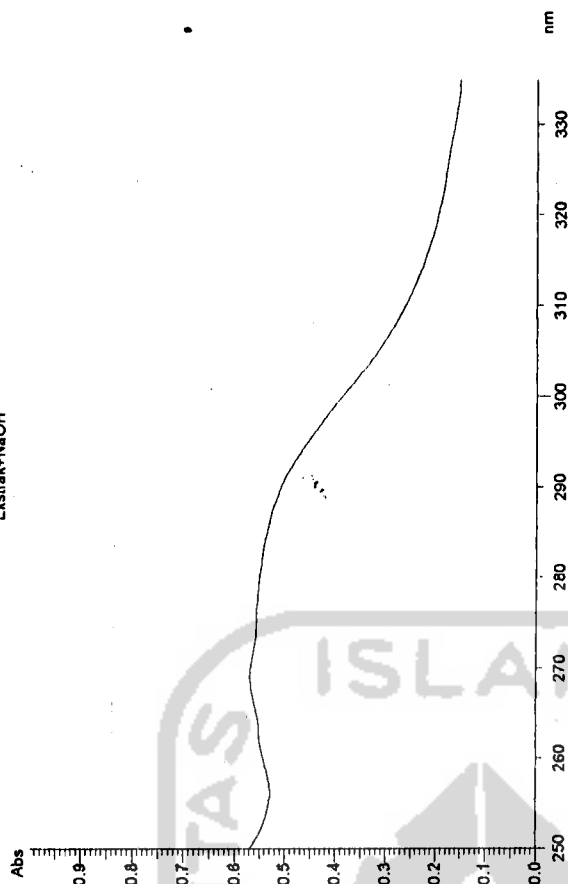
Number of Points: 50

Number of Times: 1

Peak #	Start (nm)	Area (Abs*nm)	Height (Abs)	End (nm)	Valley (nm)	Valley (Abs)
1	350.0	560.0	-0.254	343.8	343.8	-0.330
2	343.8	236.2	0.153	335.0	335.0	0.207
3	335.0	236.2	0.153	326.2	326.2	0.207
4	326.2	236.2	0.153	221.4	221.4	-0.329

Report Date: 10:13:11, 01/20/2005

Ekstrak+NaOH



Sample: Ekstrak+NaOH
Run Date: 10:41:32, 01/09/2005
Operator: Rick
Comment: langsung

Instrument Model: U-2010 Spectrophotometer
Serial Number: 0000-000
ROM Version: 2550 01

Measurement Type: Wavelength Scan

Data Mode: Abs
Starting Wavelength: 350.0 nm
Ending Wavelength: 230.0 nm
Scan Speed: 800 nm/min
Sampling Interval: 0.2 nm
Slit Width: 2 nm
Lamp Change: 340.0 nm
Baseline Correction: System
Response: Fast
Path Length: 10.0 mm

Processing Performed

Savitsky-Golay Smoothed

Smoothing Order: 3

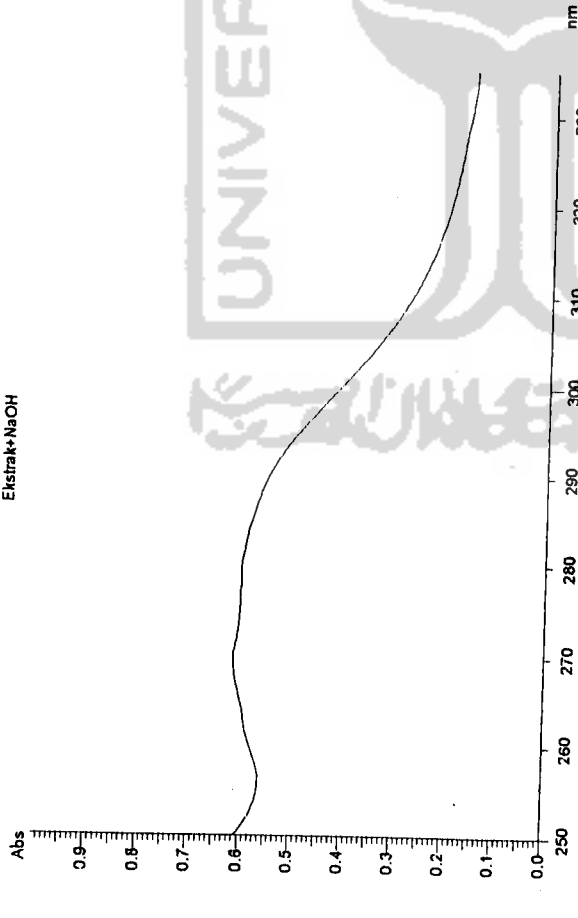
Number of Points: 50

Number of Times: 1

Peak #	Start (nm)	Area (Abs*nm)	Height (Abs)	End (nm)	Valley (nm)	Valley (Abs)
1	350.0	265.0	0.570	256.2	256.2	0.530
2	256.2	265.0	0.570	247.4	247.4	0.530
3	247.4	265.0	0.570	238.6	238.6	0.530

Report Date: 10:13:28, 01/20/2005

Ekstrak+NaOH



Sample: Ekstrak+NaOH
Run Date: 10:52:05, 01/08/2005
Operator: Rick
Comment: Setelah 5 menit
Instrument Model: U-2010 Spectrophotometer
Serial Number: 0000-000
ROM Version: 2550 01

Instrument Parameters
Measurement Type: Wavelength Scan
Data Mode: Abs
Starting Wavelength: 335.0 nm
Ending Wavelength: 230.0 nm
Scan Speed: 800 nm/min
Sampling Interval: 0.2 nm
Slit Width: 2 nm
Lamp Change: 340.0 nm
Baseline Correction: System
Response: Fast
Path Length: 10.0 mm

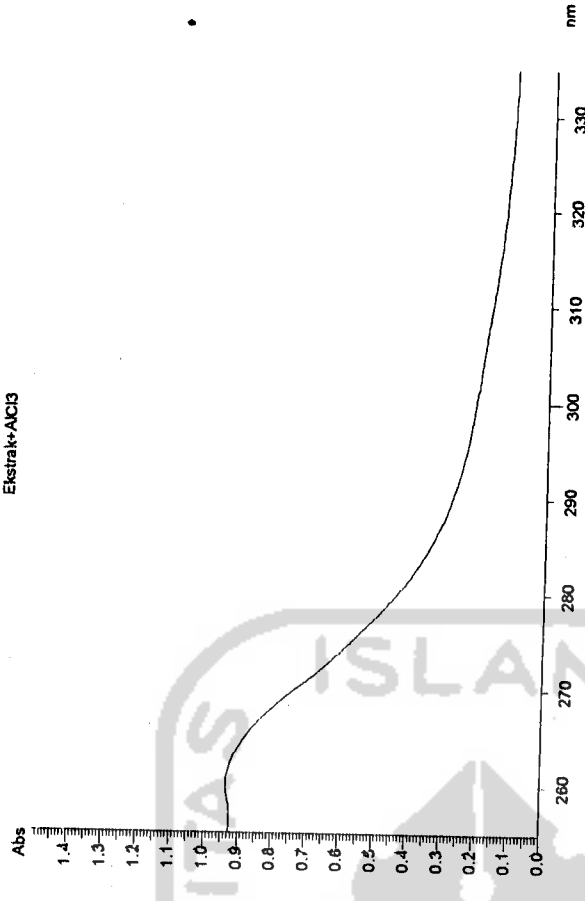
Processing Performed
Savitsky-Golay Smoothed
Smoothing Order: 3
Number of Points: 50
Number of Times: 1

Sensitivity: 1
Threshold: 0.0100

Peak #	Start (nm)	Area (nm)	End (nm)	Height (Abs)	Area (Abs*nm)	Width (nm)	Width (Abs)
1	242.0	231.8	226.0	0.613	33.601	256.0	0.567
2	255.0	243.0	242.0	0.761	9.004	230.0	0.633
3	262.0	231.8	226.0	4.132	35.086	230.0	3.946

Report Date: 10:13:39, 01/20/2005

Ekstrak+AlCl3



Sample: Ekstrak+AlCl3
Run Date: 10:57:50, 01/08/2005
Operator: Rick
Comment:

Instrument Model: U-2010 Spectrophotometer
Serial Number: 0000-000
ROM Version: 2550 01

Instrument Parameters
Measurement Type: Wavelength Scan
Data Mode: Abs
Starting Wavelength: 335.0 nm
Ending Wavelength: 230.0 nm
Scan Speed: 800 nm/min
Sampling Interval: 0.2 nm
Slit Width: 2 nm
Lamp Change: 340.0 nm
Baseline Correction: System
Response: Fast
Path Length: 10.0 mm

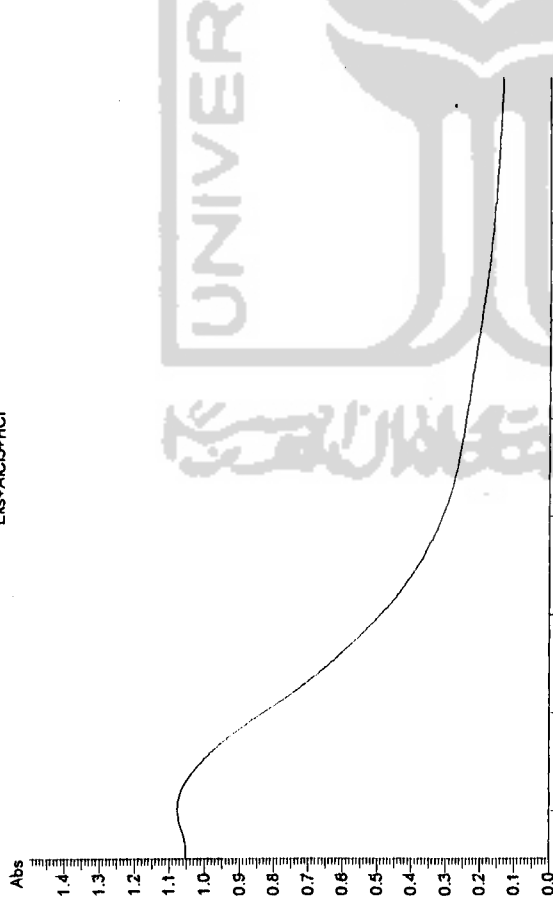
Processing Performed
Savitsky-Golay Smoothed
Smoothing Order: 3
Number of Points: 50
Number of Times: 1

Sensitivity: 1
Threshold: 0.0100

Peak #	Start (nm)	Area (nm)	End (nm)	Height (Abs)	Area (Abs*nm)	Width (nm)	Width (Abs)
1	235.0	260.4	255.8	0.936	20.618	235.8	0.852
2	255.8	253.2	252.0	0.943	3.664	232.0	0.830
3	252.0	244.0	230.0	4.200	76.206	230.0	4.000

Report Date: 10:13:51, 01/20/2005

Eks+AlCl3+HCl



Sample: Eks+AlCl3+HCl
Run Date: 11:02:18, 01/08/2005
Operator: Rick
Comment:

Instrument: U-2010 Spectrophotometer
Model: 0000-000
Serial Number: 2550 01
ROM Version:

Instrument Parameters
Measurement Type: Wavelength Scan
Data Mode: Abs
Starting Wavelength: 335.0 nm
Ending Wavelength: 230.0 nm
Scan Speed: 800 nm/min
Sampling Interval: 0.2 nm
Slit Width: 2 nm
Lamp Change: 340.0 nm
Baseline Correction: System
Response: Fast
Path Length: 10.0 mm

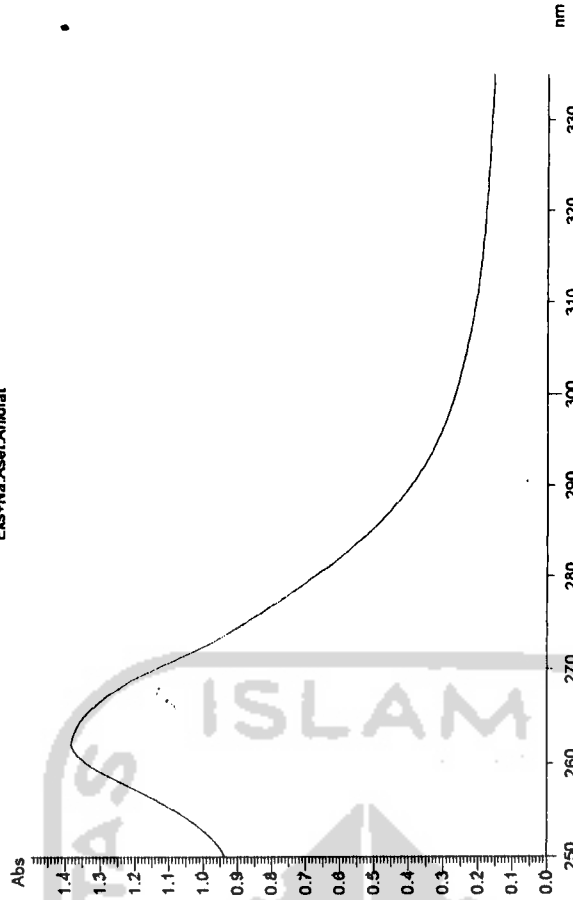
Processing Performed
Savitsky-Golay Smoothed
Smoothing Order: 3
Number of Points: 50
Number of Times: 1

Sensitivity: 1
Threshold: 0.0100

Peak #	Start (nm)	Apex (nm)	End (nm)	Height (Abs)	Area (Abs*nm)	Valley (nm)	Valley (Abs)
1	335.0	262.2	252.6	1.078	37.089	252.6	0.948
2	252.6	244.6	230.0	4.189	79.192	230.0	4.000

Report Date: 10:13:58, 01/20/2005

Eks+Na.Aset.Ahidrat



Sample: Eks+Na.Aset.Ahidrat
Run Date: 11:09:59, 01/08/2005
Operator: Rick
Comment:

Peak Integration
Method: Rectangular
Sensitivity: 1
Threshold: 0.0100

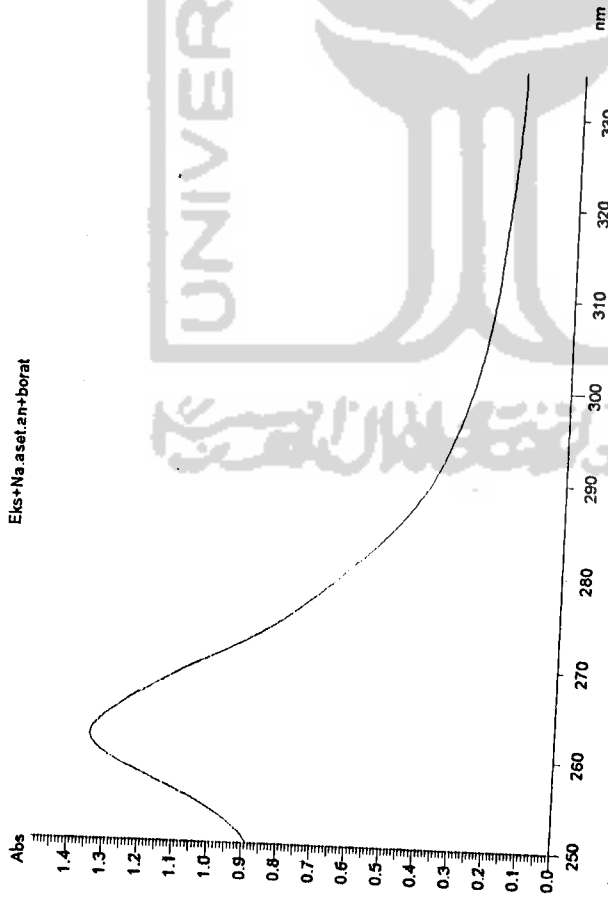
Peak #	Start (nm)	Apex (nm)	End (nm)	Height (Abs)	Area (Abs*nm)	Valley (nm)	Valley (Abs)
1	335.0	262.2	245.0	1.384	53.003	245.0	0.819
2	245.0	237.0	230.0	4.200	48.308	230.0	4.000

Sensitivity: 1
Threshold: 0.0100

Peak #	Start (nm)	Apex (nm)	End (nm)	Height (Abs)	Area (Abs*nm)	Valley (nm)	Valley (Abs)
1	335.0	262.2	245.0	1.384	53.003	245.0	0.819
2	245.0	237.0	230.0	4.200	48.308	230.0	4.000

Report Date: 10:14:08, 01/20/2005

Eks+Na asel.an+borat



Sample: Eks+Na asel.an+borat
Run Date: 11:13:15, 01/08/2005
Operator: Rick
Comment:

Instrument Model: U-2010 Spectrophotometer
Serial Number: 0000-000
ROM Version: 2550 01

Instrument Parameters
Measurement Type: Wavelength Scan
Data Mode: Abs
Starting Wavelength: 335.0 nm
Ending Wavelength: 230.0 nm
Scan Speed: 800 nm/min
Sampling Interval: 0.2 nm
Slit Width: 2 nm
Lamp Change: 340.0 nm
Baseline Correction: System
Response: Fast
Path Length: 10.0 mm

Processing Performed
Savitsky-Golay Smoothed
Smoothing Order: 3
Number of Points: 50
Number of Times: 1

Sensitivity: 1
Threshold: 0.0100

Peak #	Start (nm)	Area (nm)	Height (Abs)	End (nm)	Area (Abs*nm)	Valley (nm)	Valley (Abs)
1	244.8	261.6	4.208	230.0	244.8	230.0	0.739
2	244.8	261.6	4.208	230.0	244.8	230.0	4.000