

**PENGARUH PENAMBAHAN GARAM NaCl PADA MEDIA
PERTUMBUHAN KECAMBAH KACANG HIJAU (*Phaseolus
aureus Roxb*) TERHADAP AKUMULASI ISOFLAVON**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh
FAESAL TRI PUTRA
0410923016-92



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PENAMBAHAN GARAM NaCl PADA MEDIA
PERTUMBUHAN KECAMBAH KACANG HIJAU (*Phaseolus
aureus Roxb*) TERHADAP AKUMULASI ISOFLAVON**

oleh
FAESAL TRI PUTRA
0410923016-92

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I

Pembimbing II

Drs. Warsito, MS
NIP.131 471 016

Drs. Damar Purwonugroho, M.Si
NIP.132 008 086

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

M.Farid Rahman,S.Si,M.Si.
NIP. 132 158 726

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Faesal Tri Putra
NIM : 0410923016-92
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul : Pengaruh Penambahan Garam NaCl pada Media Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus aureus* Roxb) Terhadap Akumulasi Isoflavon

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam tugas akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Desember 2008
Yang menyatakan,

Faesal Tri Putra
NIM. 0410923016-92

PENGARUH PENAMBAHAN GARAM NaCl PADA MEDIA PERTUMBUHAN KECAMBAH KACANG HIJAU (*Phaseolus aureus* Roxb) TERHADAP AKUMULASI ISOFLAVON

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan garam NaCl pada media pertumbuhan kecambah kacang hijau terhadap akumulasi isoflavon meliputi daidzein dan genistein. Penelitian ini dilakukan dengan menumbuhkan kecambah dalam media agar-agar dengan variasi konsentrasi NaCl yang ditambahkan (0-75 ppm) selama satu minggu dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi NaCl optimum dalam memproduksi isoflavon. Kandungan isoflavon dalam kecambah diekstrak menggunakan pelarut metanol 80 % (v/v). Komponen-komponen dalam ekstrak termasuk isoflavon dipisahkan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel dan fase gerak toluen : dietil eter : asam asetat (10:10:2). Untuk analisis daidzein dan genistein digunakan KLT-video densitometri dan spektrofotometri inframerah (IR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi NaCl maka akumulasi isoflavon yang didapatkan juga semakin meningkat. Akumulasi isoflavon optimum pada konsentrasi NaCl 45 ppm dengan kandungan daidzein sebesar 36,25 ng/mg dan genistein sebesar 39,50 ng/mg.

Kata kunci : *garam NaCl, isoflavon, kecambah kacang hijau*

THE EFFECT OF NaCl SALT ON ISOFLAVONE ACCUMULATION IN GREEN GRAM SPROUT (*Phaseolus aureus Roxb*) GROWTH MEDIA

ABSTRACT

Research about the effect of NaCl salt on isoflavone accumulation, especially daidzein and genistein in green gram sprout growth media has been conducted. Experiments were performed by inducing NaCl at various concentrations (0-75 ppm) to sprout growth media of seaweed in order to determine optimum NaCl concentration in producing isoflavones. After one week seedling, the total isoflavones produced in sprout were extracted using 80 % (v/v) of methanol. Extracted compounds including isoflavones were separated using thin layer chromatography (TLC) with silica gel as stationary phase, and mixture of toluene : diethyl ether : acetic acid with volume ratio 10 : 10 : 2 as mobile phase. TLC-video densitometry and infra red (IR) spectrophotometry was used for further analysis of daidzein and genistein. The result showed that the concentration of NaCl in growth media influenced the production of isoflavones in sprout. The isoflavone accumulation increase as the NaCl concentration increased. The optimum production of isoflavones was obtained at 45 ppm NaCl salt, with concentration of daidzein and genistein was 36,25 ng/mg and 39,50 ng/mg, respectively.

Key word : *NaCl salt, isoflavone, green gram sprout*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, hidayah dan ridho serta petunjukNya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW beserta seluruh umatnya.

Skripsi yang berjudul ***Pengaruh Penambahan Garam NaCl pada Media Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau (Phaseolus aureus Roxb) Terhadap Akumulasi Isoflavon*** ini disusun sebagai salah satu syarat mendapatkan gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Penyusunan skripsi ini tak lepas dari bantuan yang diberikan oleh berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Drs. Edi Priyo Utomo MS atas proyek penelitian fitoestrogen pada kacang-kacangan, segala bimbingan dan pengarahan yang diberikan kepada penulis selama pengerjaan penelitian ini.
2. Drs. Warsito MS dan Danar Purwonugroho, S.Si, M.Si. selaku dosen pembimbing I dan II atas segala bimbingan, pengarahan dan kesabaran yang diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
3. Ir. Adam Wiryawan MS selaku dosen penasihat akademik yang telah memberikan bimbingan selama kuliah.
4. M. Farid Rahman, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan fasilitas kepada penulis untuk mengadakan penelitian di seluruh laboratorium kimia.
5. Bapak dan Ibukku tercinta, mbak mas “adek”ku terima kasih atas semua doa, semangat, perhatian dan kasih sayangnya selama ini.
6. Saudara-saudaraku Kimia 2004 dan semua pihak yang telah membantu tersusunnya skripsi ini yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu, terima kasih telah banyak membantu selama ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran diharapkan dari pembaca. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pemerhati Kimia dan pembaca sekalian, khususnya penulis.

Malang, Desember 2008
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kecambah Kacang Hijau	4
2.2 Pengaruh Garam NaCl Terhadap Proses Metabolit Sekunder	4
2.3 Isoflavon	7
2.4 Metode Isolasi isoflavon	10
2.4.1 Ekstraksi	10
2.5 Metode Identifikasi Senyawa Isoflavon	10
2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-video densitometer	10
2.5.2 Spektrofotometri Inframerah (IR)	11
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	13
3.2.1 Bahan Penelitian	13
a. Bahan Sampel	13

b. Bahan Kimia	13
3.2.2 Alat Penelitian	13
3.3 Tahapan Penelitian	13
3.4 Cara Kerja Penelitian	14
3.4.1 Preparasi Larutan Perlakuan NaCl	14
3.4.2 Preparasi Media Kecambah (agar) ...	14
a. Media Kecambah Tanpa Penambahan NaCl (media kontrol)	14
b. Media Kecambah dengan Penambahan NaCl	14
3.4.3 Perkecambahan Biji Kacang Hijau	14
3.4.4 Pemanenan Kecambah Kacang Hijau	15
3.4.5 Preparasi Sampel	15
3.4.6 Analisis Komponen Isoflavon	15
a. Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-video densitometer	15
b. Analisis dengan Spektrofotometer IR .	16
3.4.7 Analisis Data	16
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Sampel	18
4.2 Ekstraksi Sampel	18
4.3 Analisis Komponen Isoflavon dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-video densitometer	20
4.3.1 Pengaruh Garam NaCl pada Kecambah Kacang Hijau Terhadap Kandungan Isoflavon	22
4.4 Analisis Komponen Isoflavon dengan Spektrofotometer IR	25
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	27
5.2 Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Grafik respon tanaman terhadap parameter lingkungan	6
Gambar 2.2 Struktur Isoflavon beserta turunannya	8
Gambar 2.3 Biosintesis Isoflavon	9
Gambar 4.1 Mekanisme Pemutusan Glukosa oleh Hidrolisis Asam	19
Gambar 4.2 Kromatogram Ekstrak Kecambah Kacang Hijau	21
Gambar 4.3 Model Rekaman Densitogram	21
Gambar 4.4 Kecambah Kacang Hijau dengan Berbagai macam Variasi Konsentrasi	23
Gambar 4.5 Grafik Pengaruh Penambahan Garam NaCl pada Kecambah Kacang Hijau Terhadap Kandungan Isoflavon	24
Gambar L.4.1.1 Densitogram Standar Tunggal daidzein dan genistein	37
Gambar L.4.1.2 Densitogram Standar Campuran daidzein dan genistein	38
Gambar L.4.2 Densitogram Sampel	40
Gambar L.5.1.1 Spektrum IR Standar daidzein dengan Silica ..	41
Gambar L.5.1.2 Spektrum IR Standar daidzein tanpa Silica	42
Gambar L.5.1.3 Spektrum IR Standar genistein dengan Silica .	43
Gambar L.5.1.4 Spektrum IR Standar genistein tanpa Silica ...	44
Gambar L.5.2.1 Spektrum IR Sampel Isolat R _f 0,39	45
Gambar L.5.2.2 Spektrum IR Sampel Isolat R _f 0,59	46
Gambar L.5.3.1 Perbandingan Spektrum Sampel Isolat R _f 0,39 dengan Standar daidzein	47
Gambar L.5.3.2 Perbandingan Spektrum Sampel Isolat R _f 0,59 dengan Standar genistein	48
Gambar L.7.1 Kurva Standar daidzein	50
Gambar L.7.2 Kurva Standar genistein	50
Gambar L.8.1 Bagan Pengaruh Penambahan Garam NaCl Terhadap Kenaikkan Isoflavon	52

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Frekuensi Rentangan Karbonil C=O Flavonoid	12
Tabel 4.1 Nilai R _f dari Standar Tunggal daidzein, genistein dan standar campuran daidzein dan genistein	20
Tabel 4.2 Bilangan Gelombang C=O dari standar isoflavon dan isolat R _f 0,39 dan R _f 0,59	26
Tabel L.5.1.1 Serapan dari Standar daidzein dengan Silica ..	41
Tabel L.5.1.2 Serapan dari Standar daidzein tanpa Silica	42
Tabel L.5.1.3 Serapan dari Standar genistein dengan Silica .	43
Tabel L.5.1.4 Serapan dari Standar genistein tanpa Silica	44
Tabel L.5.2.1 Serapan dari Isolat R _f 0,39	45
Tabel L.5.2.2 Serapan dari Isolat R _f 0,59	46
Tabel L.6.1 Nilai R _f dan Luas area Standar Isoflavon menggunakan Pelarut Toluena : dietil eter : asam asetat (10:10:2)	49
Tabel L.6.2 Nilai R _f dan Luas area Sampel dengan Berbagai Variasi Konsentrasi NaCl menggunakan Pelarut Toluena : dietil eter : asam asetat (10:10:2)	49
Tabel L.8.1 Perhitungan Kadar daidzein dalam Sampel	51
Tabel L.8.2 Perhitungan Kadar genistein dalam Sampel	52



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Skema Kerja	33
Lampiran 2 Perhitungan dan Pembuatan Larutan	35
Lampiran 3 Identifikasi Kacang Hijau	36
Lampiran 4 Densitogram	37
Lampiran 5 Spektrum Inframerah (IR)	41
Lampiran 6 Nilai R_f dan Luas area	49
Lampiran 7 Kurva Standar Daidzein dan Genistein	50
Lampiran 8 Perhitungan Kadar Isoflavon	51



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Isoflavon merupakan salah satu senyawa aktif sebagai fitoestrogen, dimana fitoestrogen merupakan estrogen alami yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, yang memiliki khasiat seperti hormon estrogen (Biben, 1999). Isoflavon merupakan satu kelompok flavonoid yang mempunyai struktur kimia serupa dengan estradiol dan mempunyai aktivitas estrogenik yang potensial (Robinson, 1995). Kandungan senyawa flavonoid sendiri dalam tanaman sangat rendah, yaitu 0,25% (Nakamura, dkk, 2001).

Menurut Iwan (2008) isoflavon merupakan sumber estrogen alami dan mempunyai gugus aktif daidzein, genistein dan glisitein. Senyawa isoflavon yang banyak diteliti berdasarkan aktivitas estrogennya yaitu daidzein dan genistein, keduanya mempunyai aktifitas estrogenik lemah, dan berfungsi sebagai anti oksidan, pengontrol pertumbuhan, anti inflamasi, anti tumor, anti virus, anti kolesterol dan sebagai penurun tekanan darah (Pawiroharsono, 2001).

Isoflavon secara alami dapat diperoleh dari tumbuhan sebagai hasil metabolisme sekunder. Sebagai metabolit sekunder, isoflavon banyak terdapat pada tanaman khususnya golongan *Leguminoceae* (Iwan, 2008). Kecambah kacang hijau termasuk dalam famili *leguminoceae* sehingga secara kemotaksonominya kecambah kacang hijau juga mengandung senyawa isoflavon yang merupakan senyawa metabolit sekunder.

Metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang memiliki karakteristik khusus untuk setiap makhluk hidup, gen, spesies tertentu dan dibentuk melalui jalur yang khusus dari metabolit primer. Metabolit sekunder dibentuk untuk meningkatkan daya adaptasi dan meningkatkan pertahanan diri terhadap makhluk hidup lain atau lingkungan yang mengancam hidupnya (Herbert, 1995).

Lingkungan yang dapat mengancam kelangsungan hidup suatu tumbuhan ini salah satunya bisa disebabkan karena adanya garam yang terdapat secara berlebih. Stres akibat garam termasuk stres

nutrisi yang bisa mengancam kelangsungan hidup dari tanaman. Stres ini terjadi dengan terdapatnya salinitas atau konsentrasi garam-garam terlarut yang berlebihan dalam tanaman, yang umumnya terjadi pada tanah salin. Bahkan meningkatnya konsentrasi garam hingga tingkat konsentrasi tertentu dapat mengakibatkan kematian pada tanaman (Sipayung, 2003).

Tanah disekitar pantai tergolong tanah yang memiliki salinitas tinggi karena diakibatkan kandungan garam NaCl tinggi. Garam dapur (NaCl) merupakan garam yang dominan menentukan salinitas tanah (Agus, 2006).

Konsentrasi garam NaCl yang lebih tinggi di dalam lahan akan mengubah potensial osmosis dari sel, dengan menghalangi pengangkutan air dan mineral-mineral yang dibutuhkan tanaman, seperti K^+ dan Ca^{2+} . Ion Na^+ menyebabkan kerusakan yang utama, karena ion tersebut bersaing dan menggantikan K^+ yang penting bagi banyak aktivitas enzim dan sintesis protein (Karim, 2007). Menurut Falah (2006) stres akibat kelebihan Na^+ dan Cl^- dapat mempengaruhi beberapa proses fisiologi dari mulai perkecambahan sampai pertumbuhan tanaman.

Perkecambahan merupakan tahap awal perkembangan suatu tumbuhan, khususnya tumbuhan berbiji. Perkecambahan diawali dengan penyerapan air dari lingkungan sekitar biji, baik yang berasal dari tanah, udara (dalam bentuk embun atau uap air), maupun media lainnya (Li, dkk, 2007). Tumbuhan muda yang baru saja berkembang dari tahap embrionik di dalam biji dikenal sebagai kecambah. Menurut Hidayat (1995) sebelum embrio menjadi kecambah yang mandiri, kecambah menggunakan makanan yang tersimpan dalam endosperm dari dalam selnya sendiri, sehingga kecambah relatif belum terkontaminasi.

Proses metabolisme pertumbuhan telah terjadi pada saat perkecambahan dan pada umumnya metabolit sekunder sudah terbentuk pada tanaman dari nutrien-nutrien yang belum tercemari. Akibat dari konsentrasi garam NaCl yang terdapat dalam jumlah berlebih dapat mengganggu proses penyerapan nutrien-nutrien yang dibutuhkan oleh tanaman sehingga bisa menyebabkan terjadinya perubahan gen-gen dan diekspresikannya senyawa metabolit sekunder. Oleh karena itu menarik untuk dikaji sejauh manakah

pengaruh penambahan garam NaCl pada media pertumbuhan kecambah kacang hijau terhadap akumulasi isoflavon.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh penambahan garam NaCl pada media pertumbuhan kecambah kacang hijau terhadap akumulasi isoflavon?
2. Pada tingkat konsentrasi berapakah penambahan garam NaCl pada media pertumbuhan kecambah kacang hijau mampu meningkatkan akumulasi isoflavon?

1.3 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Konsentrasi NaCl yang digunakan adalah 0, 15, 30, 45, 60, dan 75 ppm.
2. Komponen isoflavon yang diamati adalah daidzein dan genistein.
3. Kecambah yang digunakan sebagai sampel adalah kecambah yang telah berumur satu minggu.

1.4 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh penambahan garam NaCl pada media pertumbuhan kecambah kacang hijau terhadap akumulasi isoflavon.
2. Mengetahui tingkat konsentrasi penambahan garam NaCl pada media pertumbuhan kecambah kacang hijau yang mampu meningkatkan akumulasi isoflavon.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk pemanfaatan lahan salin dan sebagai metode budidaya tanaman kacang hijau dengan kandungan isoflavon yang tinggi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kecambah Kacang Hijau

Kecambah sering digunakan sebagai bahan pangan dan digolongkan sebagai sayur-sayuran. Kecambah biasanya dibagi menjadi tiga bagian utama: radikula (akar embrio), hipokotil, dan kotiledon (daun lembaga). Bentuk kecambah diperoleh setelah biji diproses selama beberapa hari. Proses berkecambah (germinasi) setelah satu hari germinasi akan dihasilkan kecambah dengan panjang sekitar 1 cm, setelah dua hari akan mencapai 4 cm, dan dalam 3-5 hari akan tumbuh 5-7 cm (Tjioe, 2007).

Dalam dunia tumbuh-tumbuhan, tanaman kacang hijau diklasifikasikan seperti berikut (Sumadi, 2004) :

Divisi	: Spermatophyta
Sub-divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Rosales
Famili	: Papilionaceae
Genus	: <i>Phaseolus</i>
spesies	: <i>Phaseolus aureus</i> Roxb

Kecambah jenis apapun, baik seperti kecambah kacang hijau, kecambah kedelai, kecambah alfafa, maupun jenis kecambah lainnya mengandung banyak sekali senyawa fitokimiawi yang sangat berkhasiat. Estrogen alami yang terdapat dalam kecambah dapat berfungsi sama dengan estrogen sintetis, sehingga kecambah dapat mencegah osteoporosis, menambah kesuburan, dan membuat terhindar gangguan akibat menopause (Tjioe, 2007).

2.2 Pengaruh Garam NaCl Terhadap Proses Metabolit Sekunder

Stres garam merupakan salah-satu dari antara enam bentuk stres tanaman yaitu stres suhu, stres air, stres radiasi, stres bahan kimia dan stres angin, tekanan, bunyi dan lainnya. Stres garam termasuk stres bahan kimia yang meliputi garam, ion-ion, gas, herbisida, insektisida dan lain sebagainya (Harjadi dalam Sipayung, 2003).

Tanaman mengalami stres terhadap garam bila konsentrasi garam yang berlebih cukup tinggi sehingga menurunkan potensial air. Stres terhadap garam ini berbeda dengan stres ion yang tidak begitu menekan potensial air (Lewit dalam Sipayung, 2003). Jika konsentrasi garam di dalam tanah tinggi, pergerakan air dari tanah ke akar melambat. Jika konsentrasi garam pada tanah lebih tinggi dibandingkan dengan di dalam sel-sel akar, tanah akan menyerap air dari akar, dan tanaman akan layu dan mati. Ini merupakan prinsip dasar bagaimana salinisasi mempengaruhi produksi tanaman (Fao, 2005). Selain itu pengaruh yang merusak dari garam pada tanaman tidak hanya disebabkan oleh daya osmosis, tetapi juga oleh sodium (Na^+) dan klor (Cl^-) pada konsentrasi yang meracuni tanaman. Garam mempengaruhi pertumbuhan tanaman umumnya melalui keracunan yang diakibatkan penyerapan unsur penyusun garam secara berlebihan, seperti sodium (Fao, 2005).

Kandungan garam total pada daerah yang sangat salin berkisar antara 55,3-78,4 mg/ml dan kandungan garam total pada daerah dengan tingkat salinitas rendah berkisar antara 19,8-41,9 mg/ml. Nilai kadar salinitas tanah pada salah satu pesisir pantai provinsi Jawa Barat berkisar 3658,26-6509,09 ppm. Tingkat salinitas ini diperoleh berdasarkan jarak tanah dengan garis pantai, dimana semakin jauh dari garis pantai terdapat kecenderungan penurunan nilai salinitas tanah (Delvian, 2006).

Toleransi terhadap salinitas adalah beragam dengan spektrum yang luas diantara spesies tanaman mulai dari yang peka hingga yang cukup toleran. Tanaman tanggap terhadap hampir semua parameter lingkungan menurut suatu pola umum ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Salisbury, 1995).

Salinitas menekan proses pertumbuhan tanaman dengan efek yang menghambat pembesaran dan pembelahan sel, produksi protein serta penambahan biomassa tanaman. Tanaman yang mengalami stres terhadap garam umumnya tidak menunjukkan respon dalam bentuk kerusakan langsung tetapi pertumbuhan yang tertekan dan perubahan secara perlahan (Sipayung, 2003).

Metabolit sekunder tak hanya berperan sebagai syarat utama untuk adaptasi tanaman terhadap lingkungannya, namun juga merupakan sumber senyawa yang mempunyai aktifitas farmakal yang penting (Ramachandra Rao, 2002). Tanaman memproduksi

metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan. Pembentukan metabolit dapat diinduksi dengan salinitas garam NaCl sebagai sinyal picu. Garam NaCl pada tanah dalam jumlah yang berlebihan akan bersifat racun bagi tanaman dengan menekan nutrisi yang diserap. Akar merupakan organ yang kontak secara langsung dengan lingkungan salin, oleh karena itu akar merupakan suatu struktur dan berfungsi pengambilan dan transfer ion (Shannon, dkk dalam Onrizal, 2005).



Gambar 2.1 Grafik respon tanaman terhadap parameter lingkungan

Stres garam akibat akumulasi Cl^- dan ion Na^+ didalam sel akan berdampak berat dalam homeostasis dari ion seperti Ca^{2+} , K^+ , NO_3^- yang sangat penting sebagai transpor nutrisi dalam tanaman. (Maathuis, 2006). Ion Cl^- terlibat proses pemecahan air pada fotosintesis dan pengendalian tekanan osmosis (Salisbury, 1995). Sedangkan ion Na^+ terlibat dalam proses fotosintesis dan pertukaran kation khususnya dengan K^+ (saeni dalam Onrizal, 2005). Masalah potensial bagi tanaman yang tumbuh dilahan bergaram adalah dalam memperoleh K^+ yang cukup (Salisbury, 1995). Ion K^+ yang merupakan kofaktor dalam mensintesis pati, protein dan pengaktifan enzim akan bersaing dengan Na^+ melalui saluran pengangkutan K^+ sehingga Na^+ dapat terserap akar. Dalam jumlah berlebih Na^+ akan merusak tanaman (Karim, 2007).

Pada tanaman *dasyatis sabina* efek dari salinitas akan mempengaruhi transpor Na^+/K^+ -ATPase pada sistem pengangkutan

nutrien (Piermarini, 2000). Pengaruh toksisitas garam NaCl pada kacang hijau, dapat diamati antara lain pemendekan akar, meningkatnya kerusakan membran sel, meningkatnya peroksidase (POD) serta menurunnya katalase (CAT) seiring dengan meningkatnya konsentrasi garam (Panda, dkk, 2003).

Tumbuhan yang kekurangan substrat (karena kelaparan, kandungan pati atau gulanya rendah) yang semakin parah akan mendorong protein direspirasikan (Salisbury, 1995). Stres garam NaCl yang terjadi pada jagung dapat menyebabkan perbedaan respon dalam menghasilkan protein (Zhu, dkk, 2005).

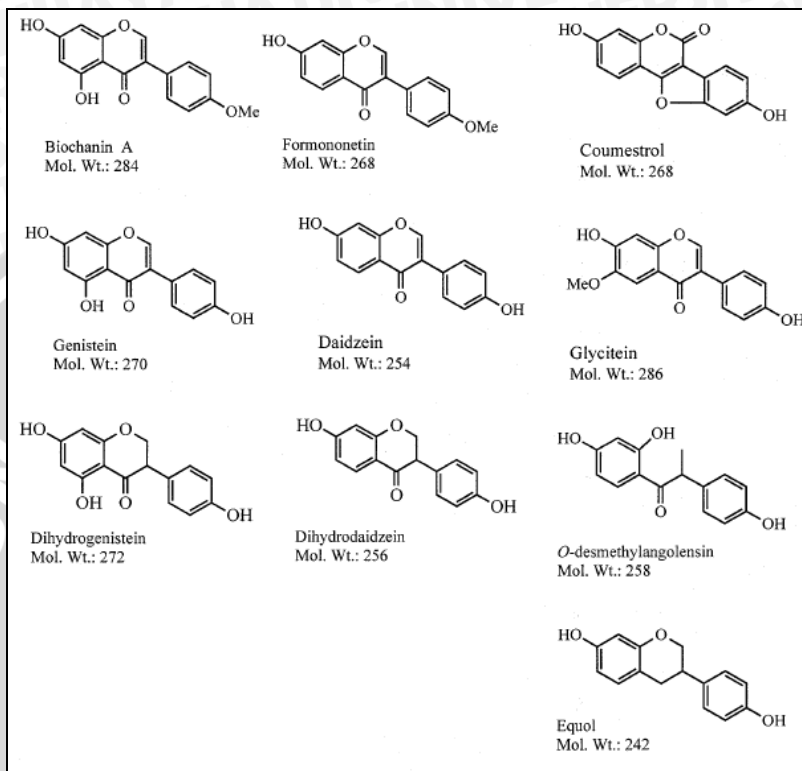
2.3 Isoflavon

Isoflavon meliputi subklas flavonoid yang berbeda secara struktural dari klas flavonoid yang lain karena mempunyai cincin fenil (cincin B) yang lebih banyak terikat pada posisi 3 daripada posisi 2 pada cincin heterosiklik (1,2-diarilpropan). Isoflavon berbeda dalam jumlah variasi struktural dan banyaknya substituen isoprenoid (Mazur, 2000).

Struktur isoflavon mirip dengan hormon estrogen dan mempunyai beberapa sifat fisiologis dari estrogen sehingga disebut dengan fitoestrogen (Widyarini, 2001). Struktur estrogen mempunyai kerangka dasar steroid sedangkan isoflavon adalah flavonoid, namun adanya gugus 2 gugus -OH/hidroksil yang berjarak 11.0-11,5 Å pada intinya sama dengan inti estrogen, menyebabkan aktifitas biologisnya mirip estradiol (Achadiat, 2003).

Isoflavon ini dapat bertindak sebagai antioksidan yang dapat digunakan untuk menetralkan efek yang berasal dari senyawa radikal di dalam jaringan. Isoflavon juga telah ditemukan mempunyai efek antiangiogenik (gejala pembentukan pembuluh darah baru) dan dapat menghalangi pertumbuhan sel yang tak terkendali yang berhubungan dengan sel kanker, dan hampir bisa dipastikan dengan menghambat aktivitas unsur di dalam tubuh yang mengatur survival sel dan divisi sel (faktor pertumbuhan) (Wikipedia, 2007).

Struktur senyawa isoflavon beserta turunannya dapat ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Mazur, 2000).



Gambar 2.2 Struktur isoflavon beserta turunannya

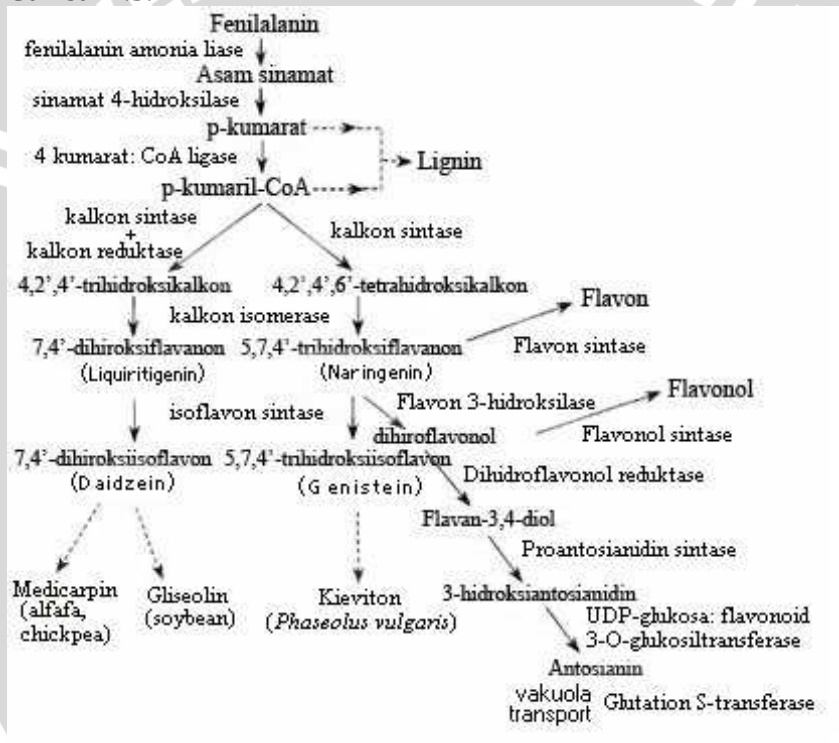
Isoflavon berfungsi sebagai antiestrogen, antioksidan, dan antikarsinogenik. Isoflavon dari golongan genistein dan daidzein dinilai paling berperan untuk kesehatan (Adie dan Krisnawati, 2006). Menurut Harbone (1987) isoflavon dalam penyebarannya adalah tanpa warna, sering dalam akar, dan hanya terdapat dalam satu suku yaitu *leguminosae*.

Berdasarkan biosintesisnya flavon/isoflavon digolongkan sebagai senyawa metabolit sekunder. Pada umumnya, senyawa metabolit sekunder disintesis oleh mikroba tertentu dan tidak merupakan kebutuhan fisiologis pokok dari mikroba itu sendiri, baik untuk pertumbuhan maupun untuk aktivitas kehidupannya. Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, senyawa metabolit sekunder dapat juga berfungsi sebagai nutrient darurat untuk mempertahankan

hidup. Keterbatasan nutrisi dalam tanaman akan merangsang dihasilkannya enzim–enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan kelangsungan hidup (Pawiroharsono, 2001).

Isoflavon yang terdiri atas struktur dasar C6-C3-C6, secara alami disintesa oleh tumbuh-tumbuhan dari senyawa asam amino aromatik fenilalanin. Biosintesa ini berlangsung secara bertahap dan melalui sederetan senyawa antara, yaitu asam sinamat, asam kumarat, kalkon, dan flavon serta isoflavon (Pawiroharsono, 2001).

Menurut Yu *et al* (2005) biosintesis isoflavon terlihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Biosintesis Isoflavon

2.4 Metode Isolasi Isoflavon

2.4.1 Ekstraksi

Keberadaan kelas isoflavon ini dalam makanan hampir semuanya sebagai campuran kompleks dari glikosida dan esternya. Maka dari itu, analisis selalu memerlukan prosedur ekstraksi yang sesuai dan langkah pemisahan sebelum identifikasi dan kuantifikasi. Secara khusus pada pembentukan konjugat, isoflavon telah diekstraksi dari matriks makanan dengan pelarut polar encer yang panas seperti metanol dan asetonitril. Figalo (2002) menyebutkan bahwa pada ekstraksi isoflavon, hasil terbaik diperoleh dari ekstraksi menggunakan metanol 80 % (v/v) dimana pelarut ini mampu mengekstrak lebih banyak jumlah isoflavon yang ada.

Metode yang mudah untuk menganalisa isoflavon ini adalah menghidrolisa konjugat dan mengamati aglikon yang terbentuk (Mazur, 1998). Isoflavon ini biasanya stabil terhadap asam sehingga untuk memutus ikatan glikosida tanpa memecah cincin heterosiklis dapat dilakukan hidrolisis asam. Hidrolisis dilakukan dengan pemanasan pada penangas air pada suhu 100 °C dengan HCl 2 N selama 2 jam atau lebih (Geissman, 1969).

2.5 Metode Identifikasi Senyawa Isoflavon

2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-video densitometri

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk memantau kemajuan reaksi dan untuk mengidentifikasi komponen secara spesifik. Jarak yang ditempuh pada plat adalah suatu cerminan polaritas campuran suatu komponen. Peningkatan kepolaran pelarut mengakibatkan interaksi dari komponen campuran dalam fase diam lebih kecil, dimana komponen campuran dalam fase gerak akan bergerak ke atas plat. Komponen campuran pada plat biasanya diperlihatkan di bawah sinar ultraviolet (UV) karena senyawa aromatik menyerap sinar UV (Bresnick, 1996).

Pada kromatografi lapis tipis (KLT), cuplikan yang akan dipisahkan ditotolakan pada lapisan tipis yang nantinya akan diabsorpsi oleh zat penyerap dan selanjutnya dielusi dengan fasa gerak. Pemisahan ini didasarkan pada sifat polaritas senyawa. Untuk senyawa yang mempunyai sifat hampir sama dengan fasa geraknya akan terelusi terlebih dahulu dibandingkan senyawa yang

mempunyai sifat polaritas berbeda dengan fasa geraknya (Sastrohamidjojo, 2007).

Parameter yang digunakan untuk menentukan derajat letak bercak pada kromatogram KLT adalah harga R_f . Besarnya nilai R_f setiap substansi spesifik tergantung dari sifat fisik masing-masing substansi terhadap fasa gerak (Shriner, 1980).

Densito lapis tipis (*Thin Layer Chromatoscanner*) merupakan suatu alat yang digunakan untuk menentukan noda analit pada plat KLT berdasarkan interaksinya dengan radiasi elektromagnetik. Prinsip analisa dari densito lapis tipis ini mirip dengan spektrofotometri yaitu berdasarkan pada proses absorpsi-refleksi. Akan tetapi pada densitometri, analit pada plat KLT yang diperiksa akan diradiasi dengan sinar UV. Jika pada plat tidak ada noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali sama kuat, tetapi jika cahaya yang jatuh mengenai noda dari suatu senyawa maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas cahaya yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas sinar datang (Imamkhasani, 1989).

Densitometri merupakan metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda KLT. Densitometer akan mengubah noda yang dibacanya menjadi kromatogram yang terdiri dari deretan puncak. Letak noda sesuai dengan jarak tempuh noda dan tinggi atau luas puncak sebanding dengan kadar analit pada noda yang bersangkutan (Mulja dan Suharman, 1995).

Untuk mengenal identitas senyawa maka digunakan acuan senyawa standar. Kesamaan R_f , warna dan spektrum absorbansi noda senyawa dengan noda acuan senyawa standar yang dibuat pada plat KLT dapat mendukung analisa kualitatif. Adapun spektrofotodensitogram yang diperoleh menunjukkan garis integrasi yang sebanding dengan kandungan senyawa pada masing-masing noda yang diukur sehingga dapat digunakan untuk analisa kuantitatif (Mulja, M, dalam Mulja, dkk, 2005).

2.5.2 Spektrofotometri Inframerah (IR)

Spektroskopi inframerah merupakan spektroskopi vibrasi. Vibrasi yang dimaksud adalah serapan "fundamental" yang timbul akibat eksitasi dari tingkatan yang lebih rendah (*ground state*) ke

tingkatan energi tereksitasi yang terendah. Penggunaan spektroskopi inframerah pada bidang kimia organik ini menggunakan daerah 650-4000 cm^{-1} . Ikatan-ikatan yang berbeda (C-C, C=C, C-O, O-H, N-H) mempunyai serapan yang berbeda pula dan ikatan dalam molekul organik ini dapat dideteksi dengan mengidentifikasi frekuensi-frekuensi karakteristiknya sebagai pita serapan dalam spektrum inframerah (Sastrohamidjojo, 1992).

Dua molekul yang berbeda strukturnya tidak akan mempunyai bentuk serapan inframerah atau spektrum inframerah yang tepat sama. Dengan membandingkan spektra inframerah dari dua senyawa yang diperkirakan identik, maka dapat dinyatakan bahwa kedua senyawa tersebut identik atau tidak, pelacakan ini biasa disebut dikenal dengan bentuk "sidik jari" dari dua spektrum inframerah. Jika puncak spektrum inframerah kedua senyawa tepat sama maka dua senyawa tersebut adalah identik (Sastrohamidjojo, 1992).

Puspita (2003) telah mengidentifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri IR dan didapatkan pola-pola serapan -OH pada daerah 3500-3400 cm^{-1} C-O pada 1100-1000 cm^{-1} , dan serapan asimetris dan simetris C=O aromatis pada 1600-1400 cm^{-1} .

Serapan gugus-gugus karbonil pada senyawa-senyawa flavonoid umumnya sangat khas, terutama pada gugus-gugus karbonil yang terkonjugasi dengan ikatan karbon-karbon tak jenuh. Frekuensi vibrasi rentangan karbonil dari beberapa senyawa flavonoid tercantum pada Tabel 2.1 (Geissman, 1969).

Tabel 2.1 Frekuensi rentangan karbonil C=O flavonoid

Senyawa flavonoid	Frek (cm^{-1})
Flavon	1649
3-hidroksiflavon	1615
5-hidroksiflavon	1652
7-hidroksiflavon	1625
Flavanon	
5-hidroksiflavanon	1648
5,7,3',4'-tetrahidroksiflavanon	1620
5,7,3',4'-tetrametoksiflavanon	1680
3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavanon	1627
3,5,7,3',4'-pentametoksiflavanon	1640

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di jalan Danau Toba E9 no 17 Sawojajar Malang dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Maret sampai Mei 2008.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

a. Bahan sampel

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kecambah kacang hijau yang diperoleh dari perkecambahan menggunakan media agar di jalan Danau Toba E9 no 17 Sawojajar Malang.

b. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah garam NaCl pro analisis (p.a), larutan standar daidzein dan genistein, metanol teknis dan pro analisis (p.a), etil asetat teknis, HCl 2 N dalam MeOH, akuades, gas N₂, toluen, dietil eter, asam asetat, dan Uap NH₃.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah botol gelas, gelas ukur 10 mL, beaker glass 250 mL, labu ukur 25 mL dan 50 mL, pengaduk gelas, pipet volume 10 mL, pipet ukur 0,5 dan 2 mL, botol semprot, pipet tetes, botol sampel, kertas saring, neraca analitik, nampan media kecambah, vorteks, oven, penumbuk, ultrasonik cleaner merek Bronson, bejana pengembang, plat silica gel 60 F₂₅₄ merek merck, pipa kapiler 2 μ L dan 5 μ L, lampu UV 254 nm, software TLSee, kamera digital merek sony DSC W35/W55 dan FTIR-8400S merek SHIMADZU.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Preparsi larutan perlakuan NaCl

2. Preparasi media kecambah (agar)
 - a. Media kecambah tanpa penambahan NaCl (media kontrol)
 - b. Media kecambah dengan penambahan NaCl
3. Perkecambahan biji kacang hijau
4. Pemanenan kecambah kacang hijau
5. Preparasi Sampel
6. Analisis komponen isoflavon
 - a. Analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT)-video densitometer
 - b. Analisis dengan spektrofotometer IR
7. Analisis data

3.4 Cara Kerja Penelitian

3.4.1 Preparasi Larutan Perlakuan NaCl

Larutan perlakuan NaCl dibuat dengan melakukan penimbangan sebanyak 0,015; 0,030; 0,045; 0,060 dan 0,075 g. Serbuk NaCl yang telah ditimbang dilarutkan dalam akuades masing-masing sebanyak 1 L.

3.4.2 Preparasi Media Kecambah (agar)

a. Media kecambah tanpa penambahan NaCl (media kontrol)

Ditimbang agar-agar kering dengan berat 7 g dan direndam dalam air 0,5 L selama 1 hari. Agar-agar yang telah mengembang ditambah air sebanyak 0,5 L dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih larutan dituang dalam tempat yang telah disediakan dan didiamkan sampai mengeras selama semalam.

b. Media kecambah dengan penambahan NaCl

Ditimbang agar-agar kering dengan berat 7 g dan direndam dalam larutan garam NaCl 0,5 L selama 1 hari. Agar-agar yang telah mengembang ditambah larutan garam NaCl sebanyak 0,5 L dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih larutan dituang dalam tempat yang telah disediakan dan didiamkan sampai mengeras selama semalam.

3.4.3 Perkecambahan Biji Kacang Kijau

Diatas setiap media berukuran panjang 30 cm dan lebar 22 cm yang telah disiapkan sebelumnya, diletakkan biji kacang hijau

dengan jarak 2,5 cm dengan penyinaran lampu TL 25 watt merek philips selama satu minggu.

3.4.4 Pemanenan Kecambah Kacang Hijau

Pemanenan dilakukan setelah pertumbuhan kecambah sempurna yaitu memiliki akar, batang, dan tumbuhnya daun kedua dengan umur sekitar satu minggu. Setelah sempurna, kecambah diambil dan dimasukkan dalam kantong plastik yang sudah berlabel sesuai dengan konsentrasi.

3.4.5 Preparasi Sampel

Kecambah yang telah dipanen kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C hingga didapatkan berat konstan (selama 1 minggu) dan ditimbang kembali dalam keadaan kering. Kecambah kering yang telah ditimbang ditumbuk hingga halus. Serbuk diambil sebanyak 2 g, kemudian diekstrak dengan maserasi yang mengacu pada metode yang dilakukan Pangastuti (2002). Maserasi dilakukan dengan menambahkan 10 mL metanol 80 % (v/v) pada bubuk kecambah. Setelah disaring, residu dimaserasi kembali dengan perlakuan yang sama sebanyak 3 kali. Kemudian, hasil ekstrak dipekatkan dengan rotary evaporator hingga volumenya kurang lebih 10 mL, setelah itu ditambahkan dua hingga tiga tetes HCl dalam metanol untuk dihidrolis. Selanjutnya, hidrolisat diekstraksi cair-cair dengan menggunakan etil asetat : air (1:1) 10 mL sebanyak tiga kali dan diambil fasa organiknya lalu ditambahkan dengan MgSO_4 anhidrat untuk menghilangkan air yang mungkin masih tertinggal dalam fasa organikya. Hasil dari ekstraksi cair-cair ini kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator hingga volumenya kurang lebih 3 mL dan dilanjutkan menggunakan gas N_2 hingga didapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat ini kemudian ditimbang dan dilarutkan dengan 1mL metanol p.a.

3.4.6 Analisis Komponen Isoflavon

a. Analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT)-video densitometer

Ekstrak kecambah kacang hijau dianalisis dengan metode KLT, dengan fase diam, plat silika gel 60 F₂₅₄ berukuran panjang 20 cm, lebar 10 cm dan fase gerak, toluen : dietil eter : asam asetat (10:10:2)

(dalam pengerjaan Wijayanti, 2008). Ekstrak sampel ditotolkan 4 μL disamping senyawa standar daidzein dan genistein yang telah ditotolkan sebanyak 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μL sehingga didapatkan kadar 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ng/noda dan dielusi dengan fase geraknya sejauh 8 cm. Plat KLT yang telah kering lalu diuapi dengan uap NH_3 dan noda-noda yang dihasilkan lalu diamati dengan menggunakan lampu UV 254 nm dan direkam menggunakan kamera digital merek sony DSC-W35/W55 pada jarak $\pm 25\text{-}30$ cm. Setelah itu, dianalisis menggunakan video densitometer yaitu gambar hasil rekaman kromatogram diolah menggunakan program software TLSee dengan pengaturan *fixed band* 10+10 untuk membuat densitogramnya sehingga didapatkan nilai R_f , luas area, % areanya. Dari nilai tersebut, kemudian dibuat persamaan regresi linier antara luas area dengan konsentrasi, dengan regresi mendekati satu ($R \approx 1$). Persamaan regresi linier sebagai persamaan 3.1.

$$y = ax \quad (3.1)$$

b. Analisis dengan spektrofotometer IR

Kromatogram disinari menggunakan lampu UV 254 nm, spot-spot yang timbul dan menunjukkan kesamaan R_f dengan senyawa standar daidzein dan genistein dikerok, kemudian dicampur dengan pelet KBr dan dibuat spektrum IRnya pada daerah $4500\text{-}350$ cm^{-1} dengan pengaturan number of scan 20 dan resolutionnya 2,0. Selanjutnya dilakukan uji perbandingan spektrum sampel terhadap standar dengan program algoritma 'Difference 1. Derivative'. Dengan software FTIR 8400S dengan rentang kualitas 250-1000.

3.4.7 Analisis Data

Analisis data dengan KLT-video densitometer dilakukan dengan membandingkan nilai R_f , dimana R_f dari masing-masing standar daidzein dan genistein digunakan untuk perbandingan R_f masing-masing sampel. Nilai R_f yang sama menandakan adanya senyawa yang sama dikarenakan nilai R_f bersifat spesifik untuk satu senyawa pada kondisi tertentu. Perbandingan nilai R_f ini digunakan untuk analisis kualitatif. Sedangkan luas area dilakukan untuk membuat kurva standar hubungan luas area dan konsentrasi dari data luas area masing-masing standar daidzein dan genistein, dan dicari persamaan regresi liniernya. Selanjutnya luas area untuk masing-masing puncak kromatogram sampel di interpolasi pada kurva

standar sehingga dapat dihitung konsentrasi komponen dalam sampel. Perhitungan konsentrasi isoflavon ini digunakan untuk analisis kuantitatif.

Analisis data dengan spektrofotometer IR dapat dilakukan dengan melihat pola serapan dan puncak yang ada baik pada standar maupun sampel. Selain itu juga dapat digunakan untuk menentukan tingkat kemiripan spektra isolat yang diduga senyawa daidzein dan genistein pada sampel terhadap spektra standar daidzein dan genistein.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Kecambah kacang hijau diperoleh dari penanaman biji kacang hijau pada media agar-agar sampai tumbuhnya akar, batang, dan daun kedua ($\pm$ satu minggu). Gambar kecambah kacang hijau dapat dilihat pada Lampiran 3.

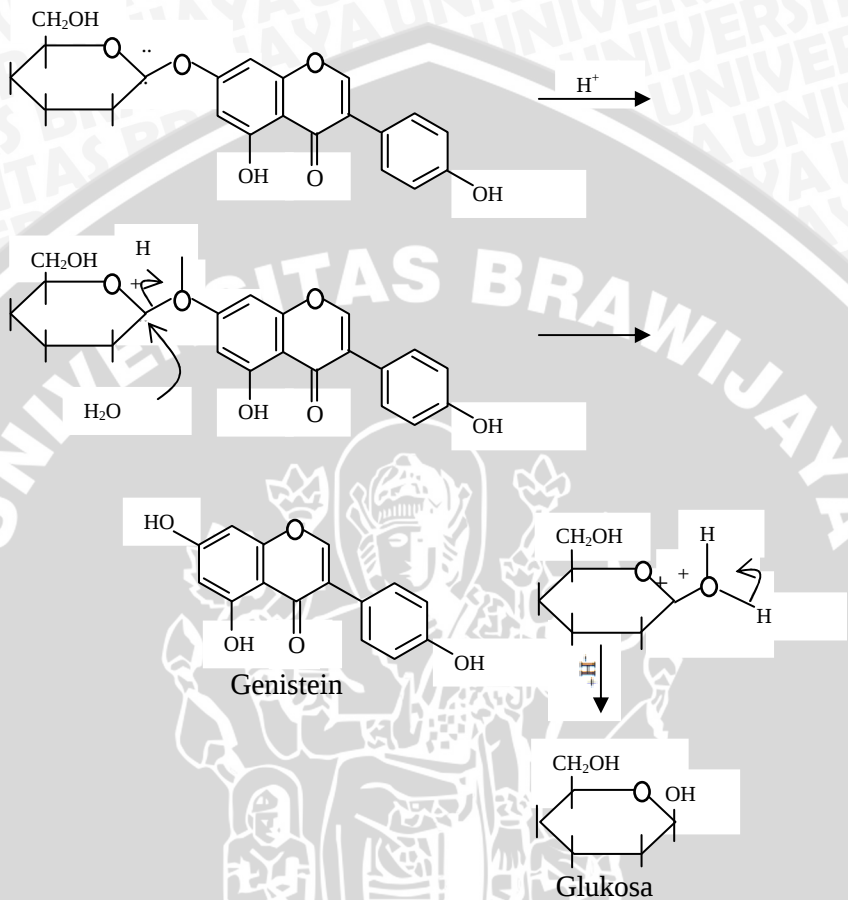
Kecambah yang diperoleh dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 °C dengan tujuan untuk menghilangkan air, juga untuk menjaga struktur dari senyawa yang di inginkan agar tidak terdegradasi. Proses pengeringan ini dilakukan hingga didapatkan berat konstan (1 minggu) dan ditimbang kembali dalam keadaan kering. Berat kering yang konstan menandakan bahwa seluruh kandungan air didalamnya telah teruapkan.

Kecambah yang telah kering dihaluskan dengan mortar dan siap untuk dilakukan proses ekstraksi.

4.2 Ekstraksi Sampel

Untuk memperoleh bahan analisis dilakukan ekstraksi terhadap sampel dengan maserasi menggunakan metanol 80 % (v/v). Dalam proses maserasi akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam metanol. Dipilihnya pelarut ini dikarenakan isoflavon bersifat polar dan diharapkan terekstrak dalam bentuk glikosidanya. Pelarut metanol 80 % (v/v) digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Figallo (2002) yang menyatakan bahwa pelarut ini mampu mengekstrak relatif lebih banyak isoflavon seperti daidzein dan genistein dalam kedelai daripada pelarut lain seperti asetonitril.

Mengingat bahwa daidzein dan genistein masih terikat dengan gula maka dilakukan hidrolisis asam menggunakan HCl untuk memutus ikatan glikosida pada bentuk glikosida isoflavon sehingga diperoleh dalam bentuk aglikonnya. Pembentukan aglikon ini akan memudahkan untuk melakukan analisisnya karena standar isoflavon yang digunakan adalah aglikon daidzein dan genistein. Reaksi pemutusan gula oleh hidrolisis asam (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Mekanisme pemutusan glukosa oleh hidrolisis asam

Metode hidolisis asam ini seperti yang dilakukan Geissman (1969) yang menyatakan bahwa isoflavon stabil terhadap asam sehingga untuk memutus ikatan glikosida tanpa memecah cincin heterosiklis dapat dilakukan hidrolisis asam. Hidrolisis ini dilakukan dengan merefluks sampel dengan tujuan supaya reaksi hidrolisis oleh asam berjalan lebih sempurna karena adanya energi panas dapat meningkatkan aktivitas asam. Selama refluks terjadi perubahan warna dari hijau bening menjadi warna hijau pekat.

4.3 Analisis Komponen Isoflavon dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-video Densitometer

Dalam penelitian ini untuk memisahkan daidzein dan genistein dalam sampel menggunakan eluen mengadopsi dari Wijayanti (2008) dengan komposisi toluen : dietil eter : asam asetat (10:10:2) dimana hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa daidzein dan genistein dapat terpisah dengan baik dengan nilai R_f yang relatif jauh.

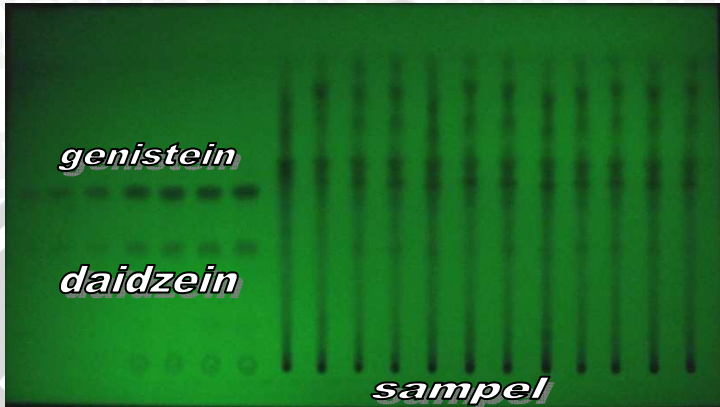
KLT menggunakan standar tunggal daidzein dan genistein untuk memastikan nilai R_f daidzein dan genistein. Tetapi karena sampel senyawanya dalam bentuk campuran maka dalam penelitian ini dibandingkan dengan standar yang dicampur. Dari Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa nilai R_f dari standar tunggal maupun campuran tidak berbeda signifikan sehingga antara daidzein dan genistein tidak mempengaruhi interaksi sehingga tidak mempengaruhi elusinya.

Tabel 4.1 Nilai R_f dari standar tunggal daidzein, genistein dan standar campuran daidzein dan genistein

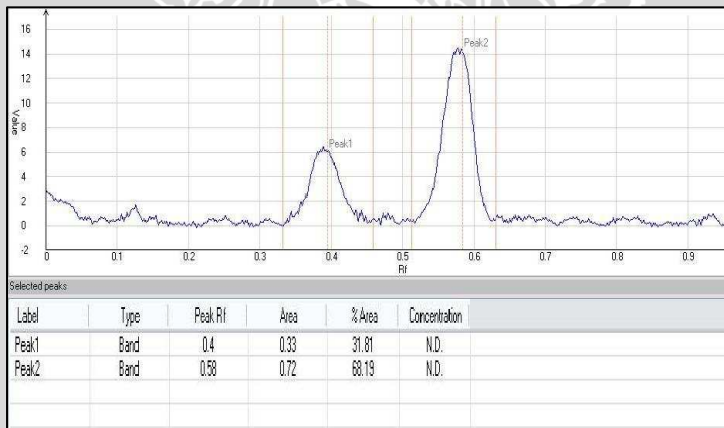
Sampel	Noda	R_f
Standar Tunggal	Daidzein	0,41
	Genistein	0,59
Standar Campuran	Daidzein	0,39
	Genistein	0,58

Hasil elusi ekstrak kecambah berbagai variasi konsentrasi yang ditotolkan disamping senyawa standar isoflavon menggunakan eluen toluen : dietil eter : asam asetat (10 : 10 : 2) (Gambar 4.2).

Video densitometer dapat digunakan untuk segala macam kromatogram yang telah direkam, dengan cara membandingkan sampel dengan standar yang digunakan akan lebih memperkuat dugaan senyawa sampel sama dengan senyawa standarnya melalui densitogram yang dihasilkan. Video densitometer akan merubah noda yang dibaca menjadi kromatogram dengan letak noda akan sesuai dengan jarak tempuh noda dan luas puncak sebanding dengan kadar analit pada noda tersebut, sehingga tiap noda yang telah dibaca video densitometer dapat diketahui nilai R_f dan luas areanya (Gambar 4.3).



Gambar 4.2 Kromatogram ekstrak kacang hijau
Keterangan : Konsentrasi NaCl yang digunakan pada sampel dari kiri ke kanan adalah 0-15-30-45-60-75 ppm dengan 2 kali pengulangan



Gambar 4.3 Model rekaman densitogram

Keterangan : Densitogram merupakan standar daidzein dan genistein dengan konsentrasi 350 ng/mg. Puncak pertama pada R_f 0,4 adalah daidzein dengan luas area 0,33 dan puncak kedua pada R_f 0,58 adalah genistein dengan luas area 0,72

Dari Gambar 4.3 dapat dilihat adanya kesamaan noda pada sampel dengan noda pada standar daidzein dan genistein, yaitu pada sampel R_f 0,39 dan 0,59 dengan R_f standar daidzein 0,39 dan genistein 0,58. Nilai R_f dari masing-masing standar daidzein dan genistein beserta sampel disajikan pada Lampiran 6. Berdasarkan R_f yang sama dengan daidzein dan genistein maka memunculkan dugaan bahwa noda-noda tersebut analog dengan standar. Besarnya nilai R_f setiap substansi spesifik tergantung dari sifat-sifat fisik masing-masing substansi terhadap fasa gerak (Shriner, 1980), sehingga pada pengembang yang sama dan dalam kondisi pengelusan yang sama, nilai R_f suatu substansi adalah sama. Dengan membandingkan nilai R_f noda ekstrak sampel dengan noda standar merupakan analisis kualitatif yang dilakukan.

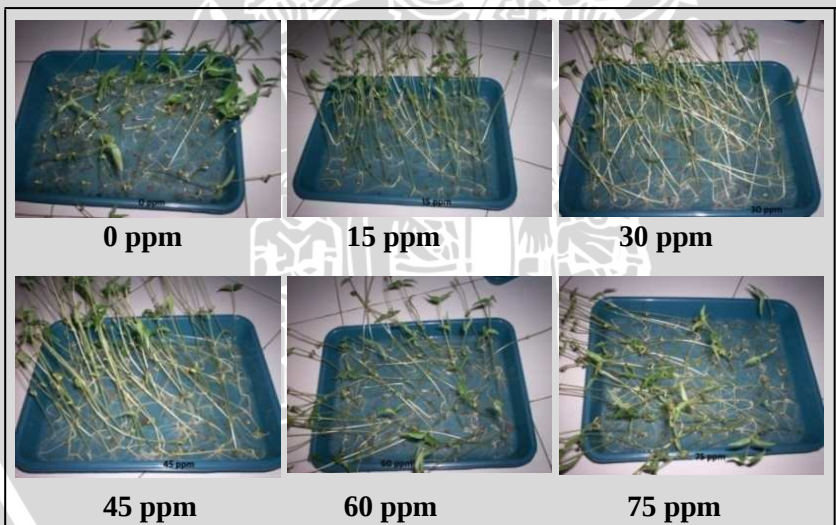
Untuk memperkuat dugaan tersebut maka noda-noda yang memiliki nilai R_f sama dengan standar dikerok lalu dianalisis menggunakan IR.

4.3.1 Pengaruh Garam NaCl Pada Kecambah Kacang Hijau Terhadap Kandungan Isoflavon

Produksi metabolit sekunder dalam tanaman dapat dipengaruhi oleh faktor eksternal dan faktor internal. Faktor internal berupa sifat gen yang dimiliki oleh tanaman untuk memproduksi metabolit sekunder. Faktor eksternal berupa kondisi lingkungan yang dapat memicu terbentuknya metabolit sekunder seperti intensitas cahaya, luka, serangan patogen, suhu, ataupun juga bisa dikarenakan kondisi stres terhadap tanaman. Perubahan fisik seperti lebar daun, tinggi kecambah, dan panjang akar kecambah pada penambahan NaCl berbagai variasi konsentrasi tidak menunjukkan perubahan fisik yang signifikan hal ini bisa disebabkan kadar garam yang diberikan belum mencapai tahap yang toksis sehingga belum mematikan. Mengacu pada Gambar 2.1 maka penambahan garam NaCl pada kecambah kacang hijau masih dalam daerah toleransi suatu tanaman, dimana fisik tanaman dapat dilihat pada Gambar 4.4.

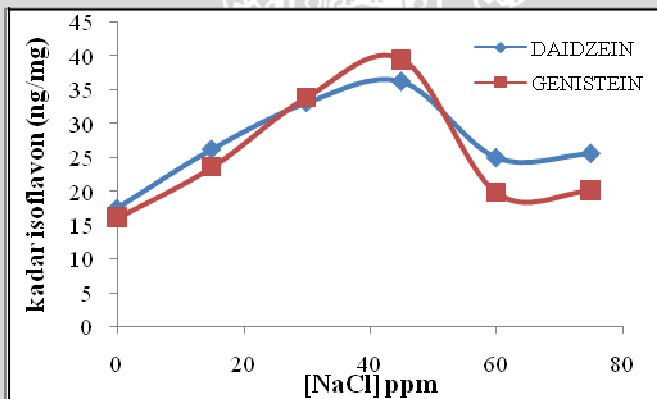
Perubahan fisik yang tidak signifikan ini akan meningkatkan akumulasi isoflavon yang dihasilkan, yaitu pada penambahan garam NaCl dengan konsentrasi 15, 30, 45 ppm. Konsentrasi Na^+ dan Cl^- yang besar, terutama Na^+ akan masuk ke dalam sel melalui Na^+/K^+ -ATPase yang ada dimembran. Setelah masuk ke dalam sel Na^+ akan

mempengaruhi kinerja dari enzim yang salah satunya adalah peroksidase. Menurut Ying, dkk (2006) untuk bertahan dari cekaman lingkungan, tanaman akan meningkatkan adaptasi fisiologi sel yaitu dengan meningkatnya peroksidase, dimana peroksidase merupakan salah satu enzim penting yang lekat hubungannya dengan pertumbuhan tanaman. Peroksidase merupakan enzim yang peka terhadap perubahan lingkungan. Menurut Sukmaningrum (2006) peroksidase meningkat akan menyebabkan OH terprotonasi menjadi O_2H yang menyebabkan peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) menjadi PUFA hidroperoksida (PUFA-OOH). Dimana PUFA-OOH akan diubah secara enzimatik ataupun non-enzimatik menjadi oksiplipin yang berperan dalam induksi ekspresi gen yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder. Salah satu gen yang terekspresi adalah gen yang dibutuhkan dalam transkripsi fenilalanin amonia liase (PAL). Mengacu Gambar 2.3 fenilalanin amonia liase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi pemutusan amonia pada fenilalanin menjadi asam sinamat, sehingga meningkatnya aktivitas PAL akan meningkatkan akumulasi isoflavon yang disintesis.



Gambar 4.4 Kecambah kacang hijau dengan berbagai macam variasi konsentrasi

Densitogram dari sampel yang diberi perlakuan NaCl dari 0-75 ppm tercantum pada Lampiran 4. Dimana luas area dari daidzein dan genistein yang diperoleh dari masing-masing perlakuan di interpolasi terhadap luas puncak standar yang bersesuaian untuk menentukan kadar masing-masing perlakuan. Perhitungan kandungan daidzein dan genistein pada sampel disajikan pada Lampiran 8. Kandungan daidzein dan genistein yang diperoleh pada sampel dipengaruhi adanya variasi konsentrasi NaCl pada media agar, dimana pada perhitungannya konsentrasi 45 ppm merupakan konsentrasi optimum dari kenaikan kandungan daidzein dan genistein yang dihasilkan, dengan mengakumulasi daidzein sebesar 36,25 ng/mg dan genistein sebesar 39,50 ng/mg (Gambar 4.5). Pada konsentrasi ini NaCl yang terserap dalam kecambah dapat menginduksi enzim-enzim yang berperan dalam sintesis isoflavon secara maksimum



Gambar 4.5 Grafik pengaruh penambahan garam NaCl pada kecambah kacang hijau terhadap kandungan isoflavon

Pada penambahan NaCl 60 ppm dan 75 ppm terjadi penurunan akumulasi isoflavon, hal ini dikarenakan konsentrasi Na^+ dan Cl^- yang sangat besar, terutama Na^+ akan mempengaruhi penyerapan nutrisi oleh akar, seperti Ca^{2+} dan K^+ . Ion K^+ sangat penting untuk aktivasi enzim-enzim, seperti pada sintesa piruvat dan translasi protein akan bersaing dengan Na^+ dikarenakan kesamaan ion monovalen antara Na^+ dan K^+ , sehingga kelebihan Na^+ akan cenderung menggantikan K^+ . Menurut Vilardell, dkk (1994) menyatakan bahwa stres yang diakibatkan tingginya salinitas pada

suatu spesies dapat membuat suatu spesies tersebut mengekspresikan perubahan gen dan menghasilkan polipeptida baru. Sehingga Na^+ yang masuk kedalam sel secara berlebih diduga memicu sintesa polipeptida baru yang bersifat inhibitor dalam sintesis isoflavon.

Semakin besar konsentrasi NaCl yang diberikan maka akan mendorong semakin banyak polipeptida baru yang dihasilkan, dengan meningkatnya polipeptida ini akan menurunkan akumulasi isoflavon yang akan disintesis.

4.4 Analisis Komponen Isoflavon dengan Spektrofotometer IR

Untuk mendukung data R_f bahwa pada zona (R_f) yang sama diduga berasal dari senyawa yang sama, maka digunakan analisis FTIR dengan membandingkan spektra standar dengan spektra noda- R_f yang sama.

Pola spektrofotometri IR yang cukup khas untuk senyawa flavonoid adalah serapan karbonilnya. Serapan karbonil flavonoid teramati pada bilangan gelombang yang lebih rendah daripada kemunculan serapan aril keton normal pada 1715 cm^{-1} (Geissman dan Crout, 1969), sehingga serapan $\text{C}=\text{O}$ pada standar isoflavon yakni daidzein dan genistein dengan silica terletak pada daerah $1648,06\text{--}1641\text{ cm}^{-1}$, sedangkan serapan $\text{C}=\text{O}$ pada standar isoflavon yakni daidzein dan genistein tanpa silica terletak pada daerah $1688,67\text{--}1649\text{ cm}^{-1}$. Perbedaan bilangan gelombang yang semakin besar dengan mendekati daerah 1700 cm^{-1} ini menandakan bahwa standar daidzein dan genistein benar menunjukkan adanya serapan $\text{C}=\text{O}$. Spektrum dari senyawa isoflavon standar daidzein dan genistein dapat dilihat pada Lampiran 5. Mengacu pada Tabel 2.1 maka bilangan gelombang $\text{C}=\text{O}$ dari daidzein dan genistein berbeda dengan flavon ataupun flavanon. Hal ini bisa disebabkan karena perbedaan struktur dari isoflavon dimana cincin B-nya terikat pada posisi 3 dari cincin A, sedangkan flavon ataupun flavanon cincin B-nya terikat pada posisi 2 dari cincin A.

Pola serapan isolat R_f 0,39 dan isolat R_f 0,59 disajikan pada Lampiran 5. Untuk senyawa isoflavon, serapan yang paling khas adalah $\text{C}=\text{O}$. Bilangan gelombang $\text{C}=\text{O}$ dari isolat R_f 0,39 dan R_f 0,59 dan standar dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Bilangan gelombang C=O dari standar isoflavon dan isolat R_f 0,39 dan R_f 0,59

Senyawa	Bilangan Gelombang C=O (cm ⁻¹)
Standar daidzein dengan silica tanpa silica	1641,31
	1649,02
Standar genistein dengan silica tanpa silica	1648,06
	1688,67
Isolat R _f 0,39	1632,63
Isolat R _f 0,59	1634,56

Berdasarkan data diatas dapat diketahui bahwa isolat R_f 0,39 relatif mendekati bilangan gelombang C=O dari daidzein, sedangkan isolat R_f 0,59 bilangan gelombang C=O relatif mendekati dari genistein.

Dari uji perbandingan spektrum sampel dengan standar daidzein dan genistein yang disajikan pada Lampiran 5.3 didapatkan bahwa spektrum sampel R_f 0,39 jika dibandingkan dengan spektrum daidzein didapatkan 'score quality' 958, sedangkan spektrum sampel R_f 0,59 dengan spektrum genistein diperoleh 'score quality' 957. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa noda R_f 0,39 berasal dari daidzein, sedangkan R_f 0,59 berasal dari genistein.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Penambahan garam NaCl pada kecambah kacang hijau yang diberikan pada media agar mempengaruhi akumulasi isoflavon daidzein dan genistein. Semakin tinggi konsentrasi NaCl yang diberikan maka akumulasi isoflavon yang didapatkan juga akan meningkat.
2. Penambahan garam NaCl optimum pada konsentrasi 45 ppm dengan mengakumulasi kandungan daidzein sebesar 36,25 ng/mg dan genistein sebesar 39,50 ng/mg.

5.2 Saran

Mengingat bahwa tingginya garam pada suatu spesies dapat menghasilkan polipeptida baru maka perlu dipelajari lebih lanjut untuk mengetahui peranan garam NaCl dalam biosintesis polipeptida baru yang mempengaruhi kerja enzim dalam proses biosintesis isoflavon.

DAFTAR PUSTAKA

- Achadiat, Chrisdiono M A. 2003. Fitoestrogen Untuk Wanita Menopause. <http://situs.kesepro.info/aging/jul/ag01.htm>. Tanggal akses: 12 Desember 2007.
- Adie, M. Muchlish dan Krisnawati, Adya. 2006. Peluang Perbaikan Kualitas Biji Kedelai. http://www.puslittan.bogor.net/webbaru/index.php?page=download_detail&&no=8.
- Agus, Fahmuddin dan Subiksa I.G.M. 2006. Status Hara Tanah Terpengaruh Lumpur Tsunami dan Implikasi Pengelolaanya. http://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets/pdf_file/0004/199453/Ses2-Nutrient-status-of-tsunami-affected-soils-and-themanagement-implications.pdf.
- Biben, A. 1999. Phytoestrogen alternatif pengganti pemakaian hormon subsitusi. Majalah Kedokteran Bandung, edisi 3. Hal 2-6.
- Bresnick, Stephen, 1996, High-Yield Organic Chemistry, Williams & Wilkins, USA.
- Dixon, R.A. dan Nancy L, Pavia. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. Plant cell. 7, 1085-1097
- Falah, M. Affan Fajar. 2006. Perspektif Pertanian dalam Lingkungan yang Terkontrol. <http://io.ppi-jepang.org/article.php?id=148>. Tanggal akses : 12 Desember 2007.
- Fao. 2005. 20 Hal Untuk diketahui Tentang Dampak Air Laut pada Lahan Pertanian di Propinsi NAD. J FAO.
- Figalo, V.B., F. Lin, W.J. Kenworthy dan M.M. Giusti. 2002. The Effect of Ekstraktion Solvent on The Qualitative and Quantitative Recovery of Isoflavon from Soybean

(Glycinemax) Cultivars. http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_14221.htm. Diakses: 25 september 2007.

Geissman, T. A, Crout, P. H. G. 1969. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman, Cooper and Co. California, hal 215.

Harborne, J.B. 1987. Metode Fotokimia Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Penerjemah Kokasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Penerbit ITB, Bandung.

Herbert, R. B. 1995. Biosintesis Metabolit Sekunder. Edisi kedua. Alih Bahasa : Bambang Srigandono. IKIP Semarang Press. Semarang, 1-2.

Hidayat, Estiti B. 1995. Anatomi Tumbuhan Berbiji. Penerbit ITB. Bandung, hal 261.

Imamkhasani, S. 1989. Perkembangan Baru Instrumentasi TLC. Warta Kimia Analitik, Puslitbang Kimia Terapan LIPI. Bandung.

Iwan, Haris. 2005. Antioksidan Isoflavon. <http://antioxidantcentre.com>. Tanggal akses 28 Agustus 2008.

Karim, Sazzad. 2007. Exploring Plant Tolerance to Biotic and Abiotic Stresses. J plant biology.

Li, J., Ou-Lee, T.A., Raba, R., Amundson, R.G., dan Last, R.L. 2007. Repression of *Auxin Response Factor10* by microRNA 160 is critical for seed germination and post-germination stages. <http://id.wikipedia.org/wiki/Perkecambahan>. Tanggal akses : 11 Maret 2008.

Markham, 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Penerjemah Kosasih Padmawita, Penerbit ITB. Bandung.

- Maathuis, Frans. 2006. The Role of Monovalent Cation Transporters in Plant Responses to Salinity. *Journal of experimental botany* 57, No. 5, 1137-1147.
- Mazur, W. 1998. Phytoestrogens in food, in Baillierie's Clinical. Endocrinology and metabolism : phytoestrogens Bailliere Tindall. London, 729-742.
- Mazur, W. 2000. Phytoestrogens: Occurrence In Foods, and Metabolism Of Lignans In Man and Pigs, <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/kliin/vk/mazur/phytoest.pdf>, diakses tanggal 26 Maret 2008.
- Mulja, H. Muhammad, dan Suharman, 1995. Analisis Instrumental. Airlangga University Press. Surabaya, hal 223- 32.
- Onrizal. 2005. Adaptasi Tumbuhan Mangrove Pada Lingkungan Salin dan Jenuh Air. <http://library.usu.ac.id/download/fp/hutan-onrizal9.pdf>. e-USU repository.
- Panda, S.K, L.B. Singha and M.H. Khan. 2003. Does Aluminium Phytotoxicity Induce Oxidative Stress In Greengram (*Vigna radiata*)?. *J Plant Physiol* 29(1-2), 77-86.
- Pawiroharsono, S. 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan pengkajian dan Penerapan Teknologi, <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/042001/pus-2.htm>. Tanggal akses : 5 Januari 2008.
- Ramachandra Rao, S. 2000. Biotechnological Production of Phytopharmaceuticals. *J. Biochem. Mol. Bio. Biophys.* 4,73-102.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, penerjemah: Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.

- Salisbury, F. B dan Ross, C. W. 1995. Fisiologi Tumbuhan, edisi keempat. Penerjemah Diah R Lukman dan Sumaryono. Penerbit ITB, Bandung.
- Sastrohamidjojo H. 2007. Kromatografi, edisi kedua. Penerbit Liberty. Bandung. hlm 28, 34-35.
- Sastrohamidjojo, H. 1992. Spektroskopi Inframerah. Penerbit Liberty. Bandung. hlm 4, 46-48.
- Sipayung, Rosita. 2003. Stres Garam dan Mekanisme Toleransi Tanaman. <http://library.usu.ac.id/download/fp/bdp-rosita2.pdf>. USU digital library.
- Snyder, H. E, dan T. W, Kwon. 1987. Soybean Utilization. Van Nostrand Reinhold Co. New York.
- Sukmaningrum, Ari. 2006. Pengaruh Ion Logam Co^{2+} , Cu^{2+} , dan Mn^{2+} terhadap akumulasi isoflavon pada kalus bengkuang (*pachyrrizus erosus (L)uvb*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Brawijaya, Malang.
- Sumadi, Suprpto, H. 2004. Bertanam Kacang Hijau. Penebar swadaya, Jakarta. hal 7-8.
- Tjioe, Lonny. 2007. Tauge Yang Menyehatkan. http://www.vibizlife.com/health_details.php?awal=70&page=8&id=157. Tanggal akses : 12 Januari 2008.
- Widyarini, S., Spinks, N., Husband, A.J., Reeve, V.E. 2001. Isoflavonoid Compounds from Red Clover (*Trifolium Pratense*) Protect from Inflammation and immune Suppression Induced by UV Radiation. Department of Veterinery Anatomy and Pathology University of Sidney. Sidney.
- Wikipedia, 2007, Genistein, <http://en.wikipedia.org/wiki/Genistein>, diakses tanggal 3 April 2007.

Ying, X.F., liu, P and Xu, G.D. 2006. Effect Of Aluminium On The Seedlings Of Two Soybeans (*Glycine max* L. Merrill) Varieties. *Plant Soil Environ* 52 (6): 262-270.

Yu, Oliver., Woosuk, Jung., June, Shi., Robert A. Croes., Gary M. Fader., Brian McGonigle., dan Joan T. Odell. 2000. Production of the Isoflavones Genistein and Daidzein in Non-Legume Dicot and Monocot Tissues. *J Plant Physiol* 124, 781-793.

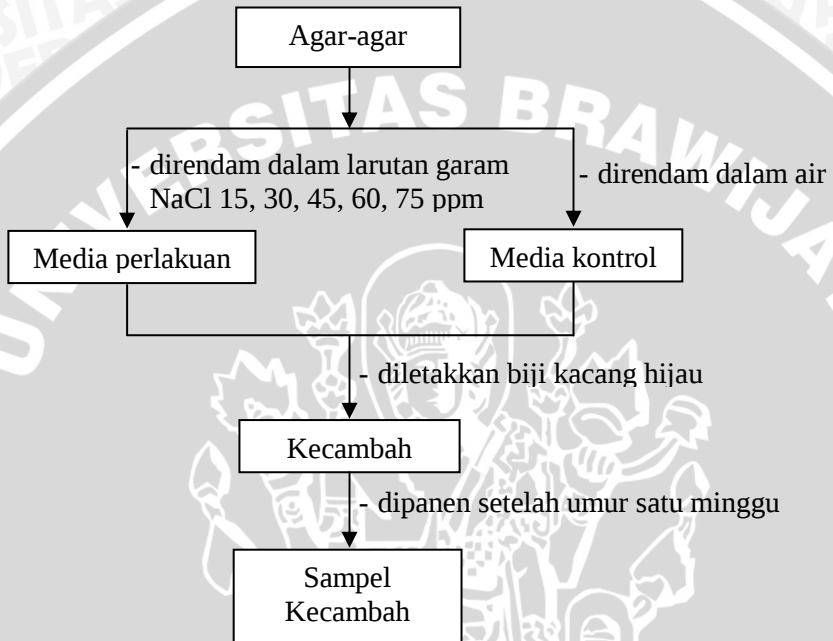
Zhu, Chuanfeng., Daniela, Scrhaut., Wolfram, Hartung., Anton Schaffner. 2005. Differential Responses of Maize MIP Genes to Salt Stress and ABA. *Journal of experimental botany*, 56, No. 421, 2971-2981.



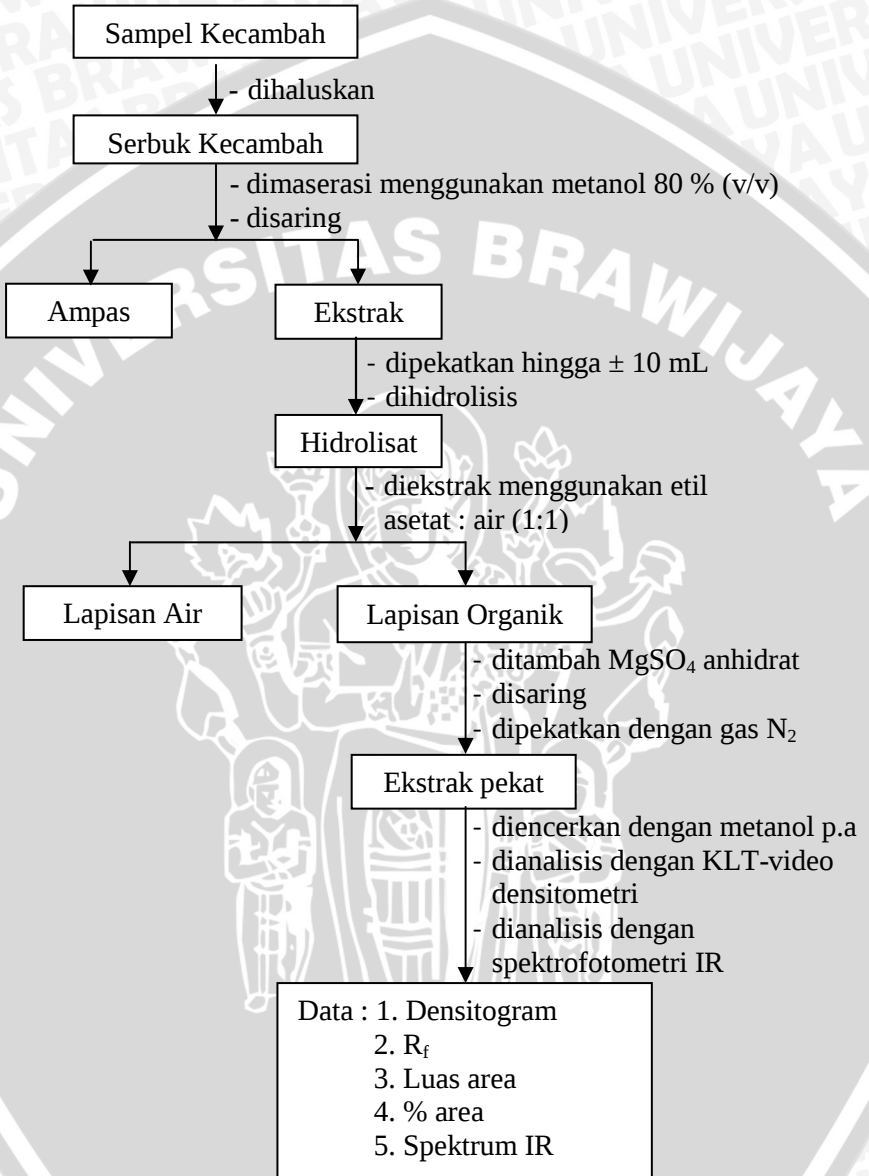
LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja

L.1.1 Proses Pertumbuhan Kecambah



L.1.2 Identifikasi Isoflavon



Lampiran 2 Perhitungan dan Pembuatan Larutan

L.2.1 Pembuatan Larutan HCl 2 M

BJ HCl pekat : 1,19 g/mL

BM HCl pekat : 36,5 g/mol

Kadar HCl pekat : 37 % (b/b)

maka, konsentrasi HCl pekat adalah

$$\begin{aligned} [\text{HCl}] &= \frac{\text{BJ}}{\text{BM}} \times \text{kadar}(\%) \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \\ &= \frac{1,19 \text{ g/mL}}{36,5 \text{ g/mol}} \times 0,37 \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \\ &= 12,063 \text{ mol/L} \\ &= 12,063 \text{ M} \end{aligned}$$

Untuk membuat larutan HCl 2 M dalam metanol maka dilakukan pengenceran dengan rumus :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 12,063 \text{ M} &= 100 \text{ mL} \times 2 \text{ M} \\ V_1 &= 200 / 12,063 \\ V_1 &= 16,580 \text{ mL} \end{aligned}$$

Dipipet 16,6 mL HCl 37 %, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL yang sudah diisi metanol seperempat bagian kemudian diencerkan sampai 100 mL.

L.2.2 Pembuatan Larutan media agar

Variasi [NaCl] = 15, 30, 45, 60, 75 ppm

Volume = 1 L

maka, NaCl yang dibutuhkan adalah :

$$X \text{ mg} = Y \text{ ppm} \times L$$

Dimana : X = NaCl yang harus ditimbang

Y = ppm NaCl yang diinginkan

Y (ppm)	X (g)
15	0,015
30	0,030
45	0,045
60	0,060
75	0,075

Lampiran 3 Identifikasi kacang hijau



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS MIPA JURUSAN BIOLOGI
LABORATORIUM TAKSONOMI & STRUKTUR PERKEMBANGAN TUMBUHAN
Jl. Veteran Telp. (0341) 575840, 575841, 575842 Pes. 313 Fax, (0341) 554402 Malang 65145

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

25 NOV 2008

Nomor : 0010 /J10.1.28.II/takso.ident/04/2008

Ketua Laboratorium Taksonomi dan Struktur Perkembangan Tumbuhan
Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, dengan ini
menerangkan bahwa specimen tanaman yang dibawa oleh:

Nama : **FAESAL TRI PUTRA**
NIM : 0410923016
Fak./Jurusan : MIPA-Kimia
Institusi : Universitas Brawijaya

Berdasarkan pada deskripsi dan buku "*Flora of Java*" karangan C.A.
BACKER (1968) diidentifikasi sebagai : (Jilid 1 : Halaman 572,638)

1. Familia/Suku : FABACEAE
 Sub Famili : PAPILIONACEAE
 M a r g a : Phaseolus
 Spesies : Phaseolus aureus Roxb.
 (Phaseolus radiatus L. forma aureus (Roxb.) Hara)
 (Phaseolus mungo L. sensu Savi)

Demikian, Surat Keterangan Identifikasi ini dibuat untuk dipergunakan
seperlunya.



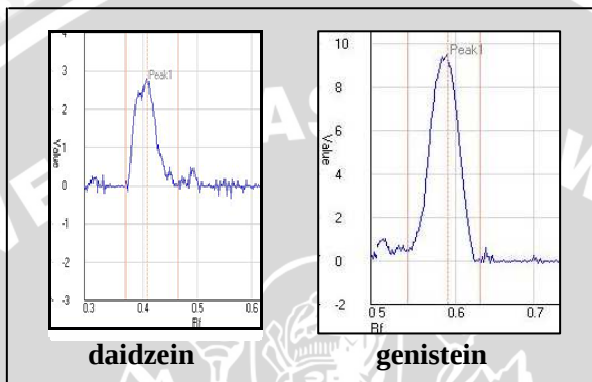
Malang, 25 November 2008
Ketua Laboratorium

RODLYATI AZRIANINGSIH, PhD
NIP. 132 126 050

Lampiran 4 Densitogram

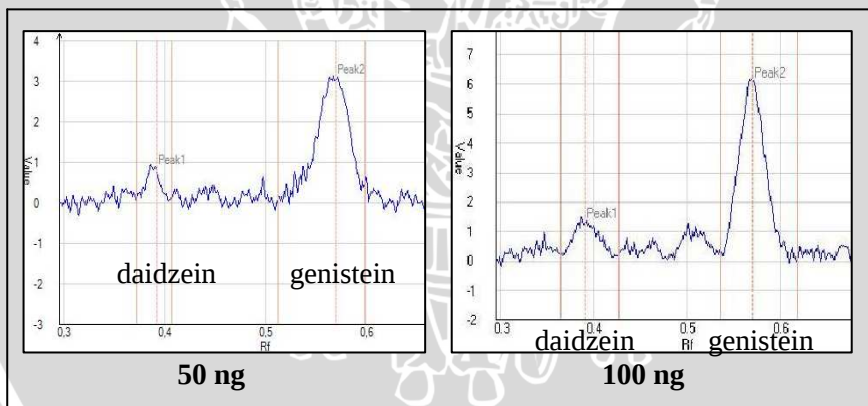
L.4.1 Standar isoflavon

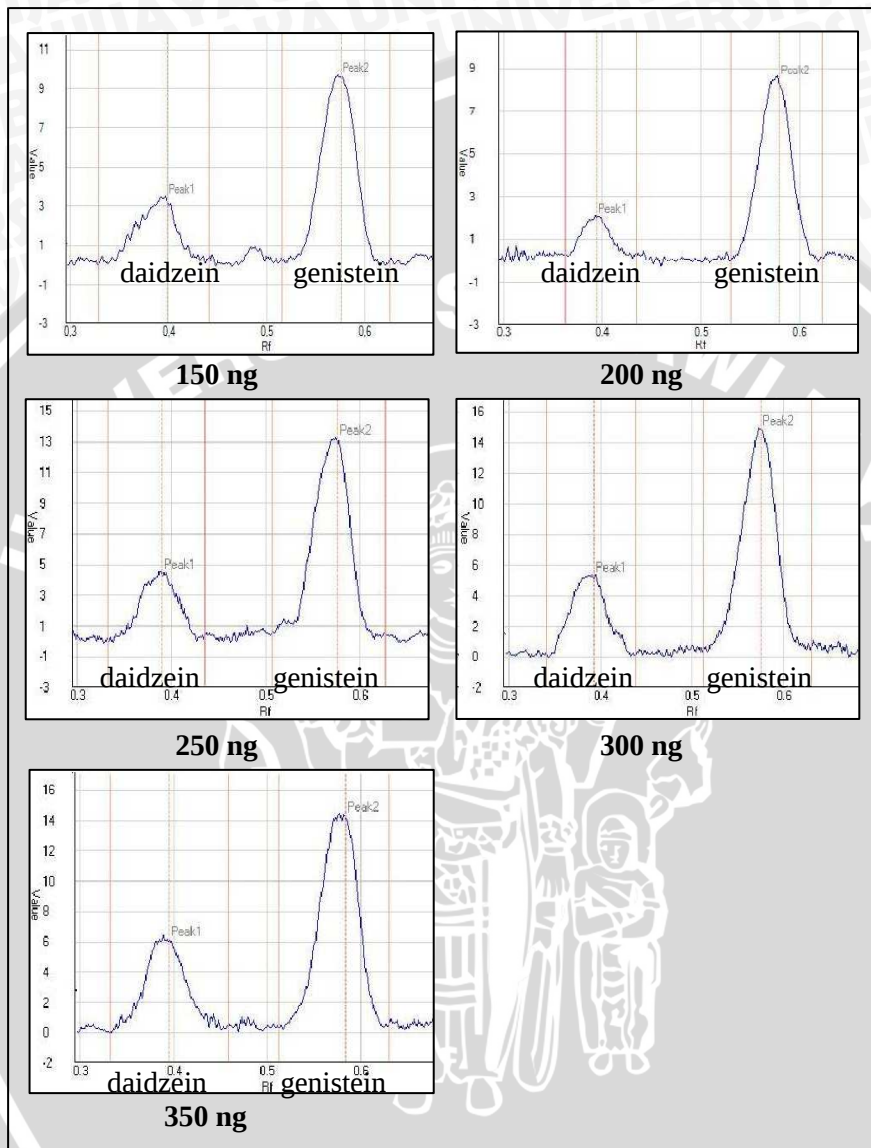
L.4.1.1 Standar tunggal daidzein dan genistein



Gambar L.4.1.1 Densitogram standar tunggal daidzein dan genistein

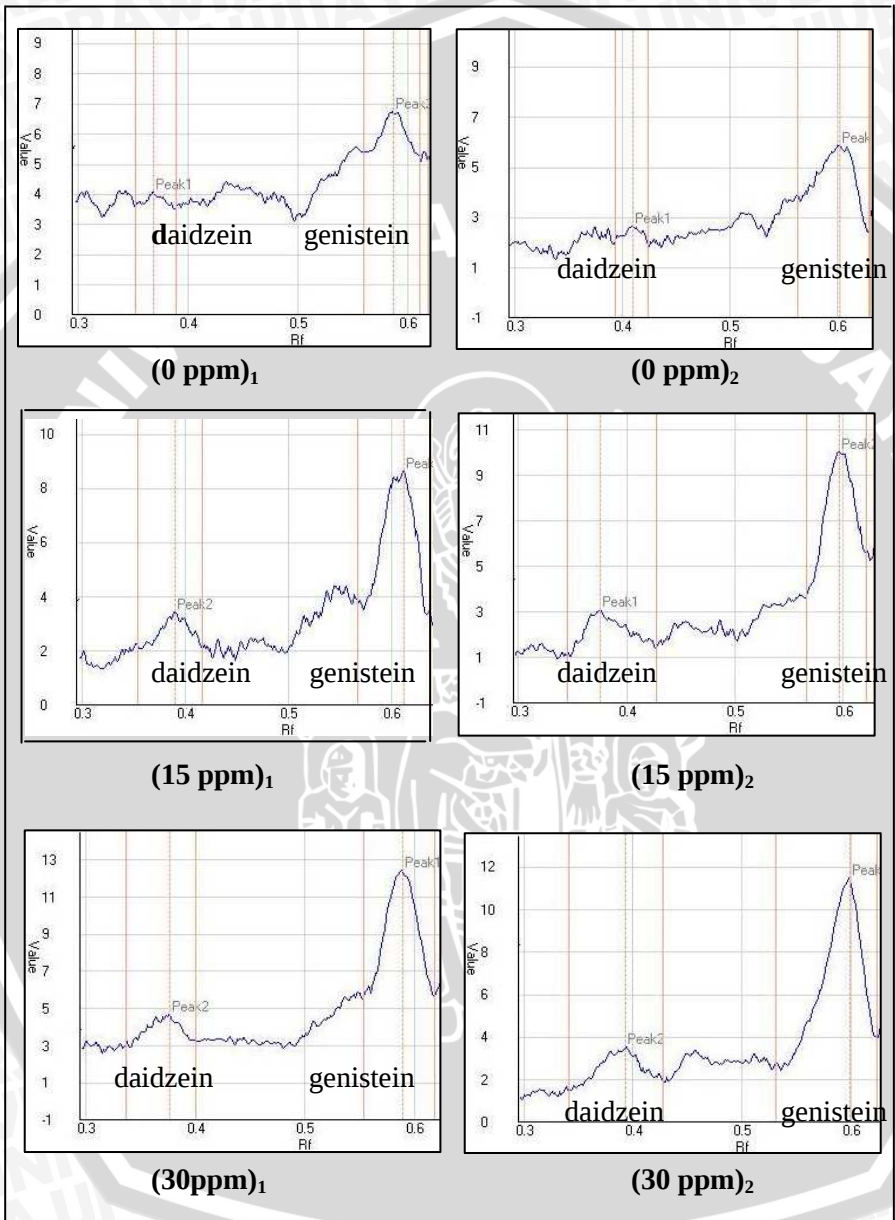
L.4.1.2 Standar campuran daidzein dan genistein

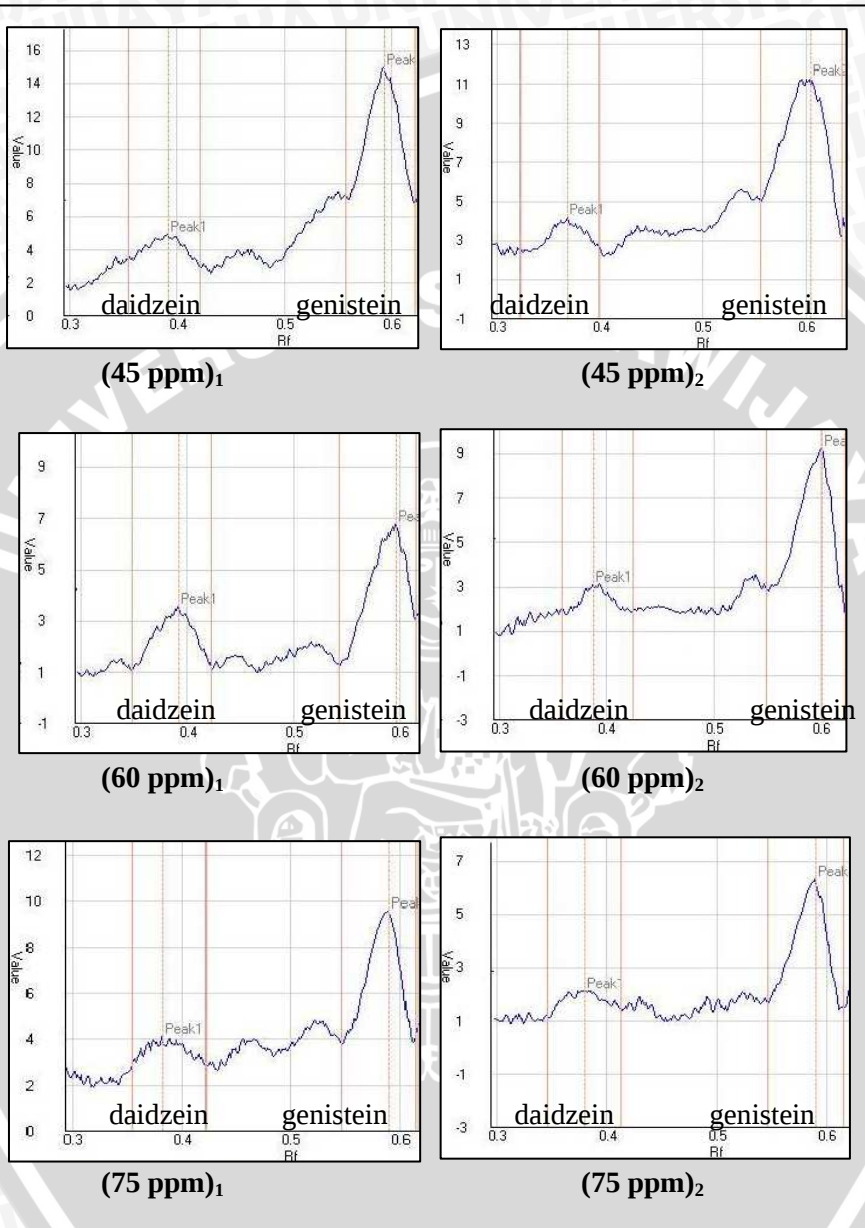




Gambar L.4.1.2 Densitogram standar campuran daidzein dan genistein

L.4.2. Sampel



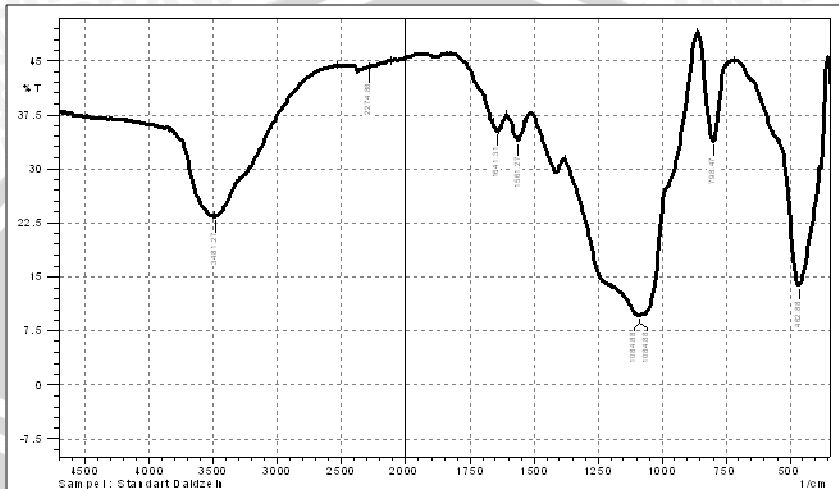


Gambar L.4.2 Densitogram sampel

L.5 Spektrum inframerah (IR)

L.5.1 Standar isoflavon

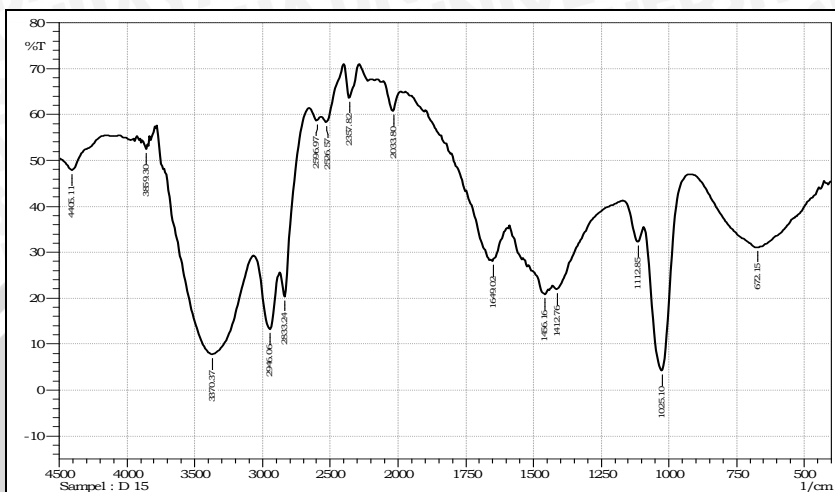
L.5.1.1 Daidzein



Gambar L.5.1.1 Spektrum IR standar daidzein dengan silica

Tabel L.5.1.1 Serapan dari standar daidzein dengan silica

Serapan	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
OH	3481,27
C=O	1641,31
C=C (aromatik)	1600-1450
Si-O	1110-1000

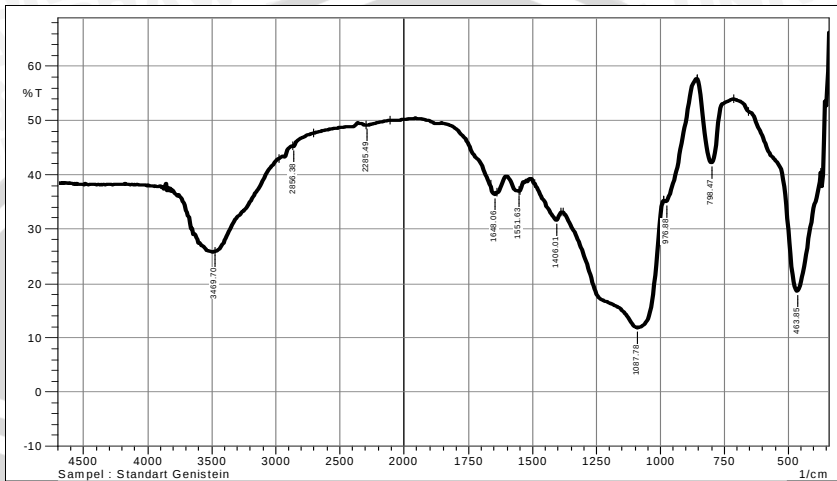


Gambar L.5.1.2 Spektrum IR standar daidzein tanpa silica

Tabel L.5.1.2 Serapan dari standar daidzein tanpa silica

Serapan	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
OH	3370,37
C=O	1649,02
C=C (aromatik)	1600-1450
C-H	2949,06
C-O-C	1025,10

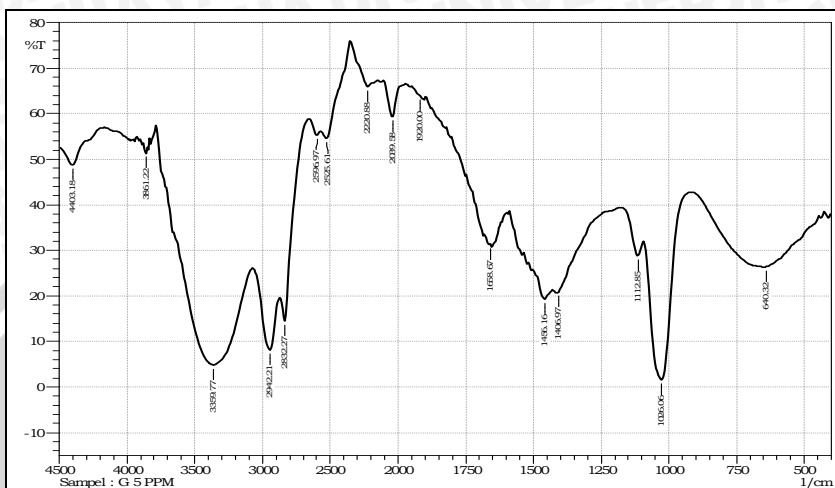
L.5.1.2 Genistein



Gambar L.5.1.3 Spektrum IR standar genistein dengan silica

Tabel L.5.1.3 Serapan dari standar genistein dengan silica

Serapan	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
OH	3469,70
C=O	1648,08
C=C (aromatik)	1600-1450
C-H	2866,38
Si-O	1110-1000



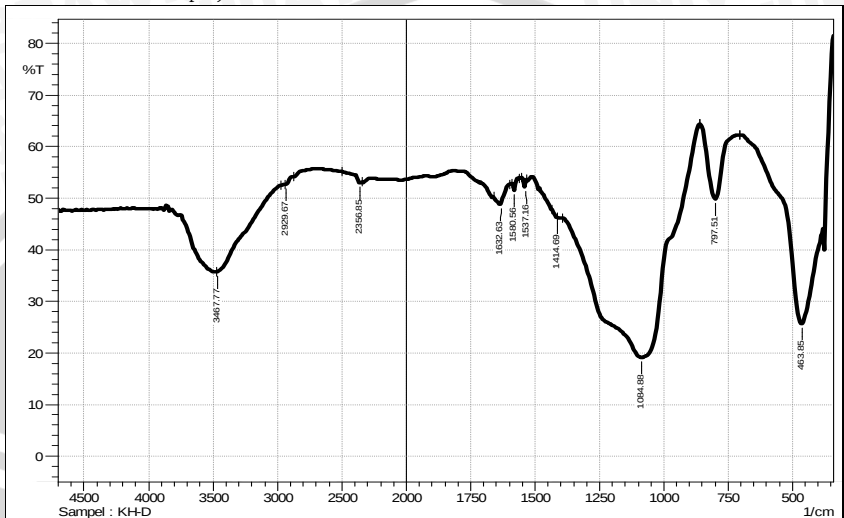
Gambar L.5.1.4 Spektrum IR standar genistein tanpa silica

Tabel L.5.1.4 Serapan dari standar genistein tanpa silica

Serapan	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
OH	3359,77
C=O	1688,67
C=C (aromatik)	1600-1450
C-H	2942,21
C-O-C	1026,06

L.5.2 Sampel

L.5.2.1 Isolat R_f 0,39

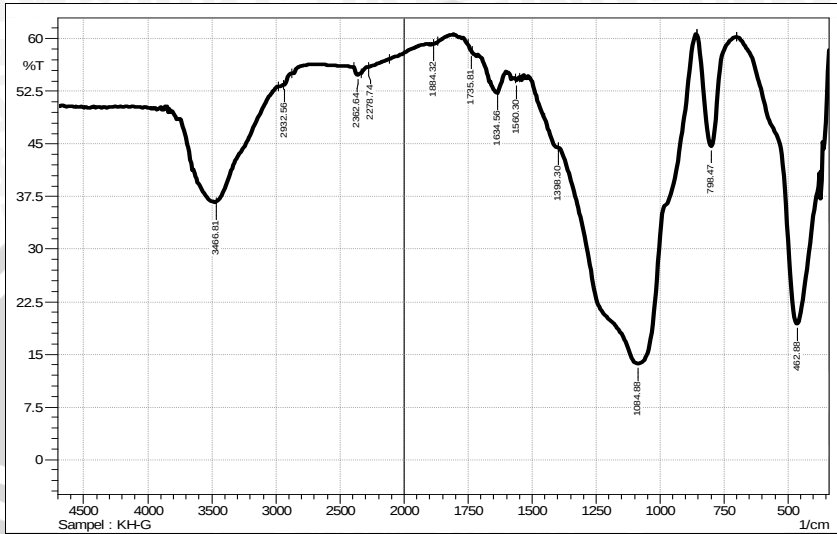


Gambar L.5.2.1 Spektrum IR sampel isolat R_f 0,39

Tabel L.5.2.1 Serapan dari isolat R_f 0,39

Serapan	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)
OH	3467,77
C=O	1632,63
C=C (aromatik)	1600-1450
C-H	2929,67

L.5.2.2 Isolat R_f 0,59



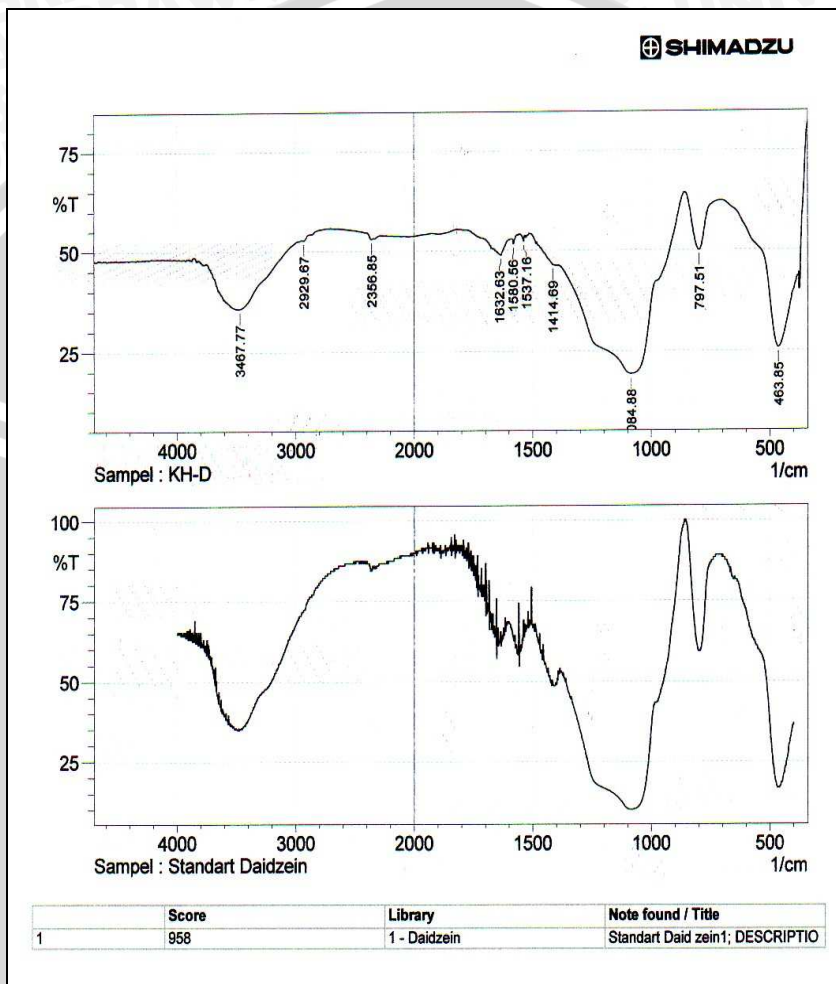
Gambar L.5.2.2 Spektrum IR sampel isolat R_f 0,59

Tabel L.5.2.2 Serapan dari isolat R_f 0,59

Serapan	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)
OH	3466,81
C=O	1634,56
C=C (aromatik)	1600-1450
C-H	2932,56

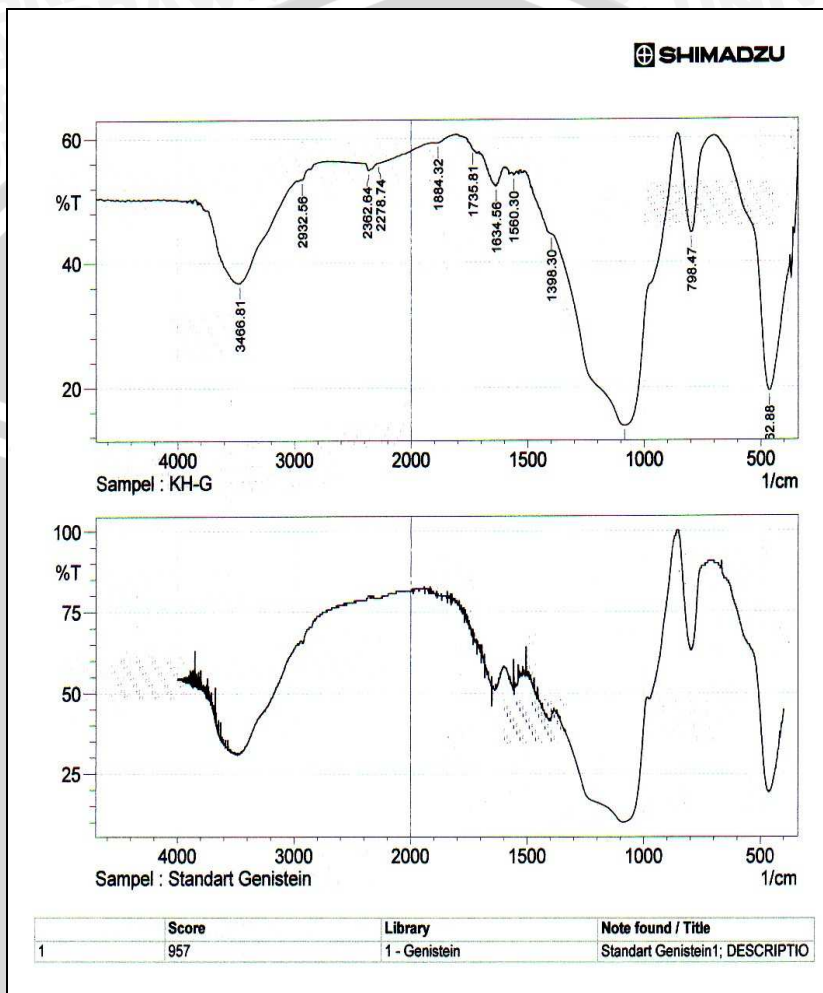
L.5.3 Uji perbandingan spektrum sampel dengan standar isoflavon

L.5.3.1 Perbandingan dengan standar daidzein



Gambar L.5.3.1 Perbandingan spektrum sampel isolat R_f 0,39 dengan standar daidzein

L.5.3.2 Perbandingan dengan standar genistein



Gambar L.5.3.2 Perbandingan spektrum sampel isolat R_f 0,59 dengan standar genistein

Lampiran 6 Nilai R_f dan Luas area

L.6.1 Standar Isoflavon

Tabel L.6.1 Nilai R_f dan luas area standar isoflavon menggunakan pelarut toluen : dietil eter : asam asetat (10 : 10 : 2)

Berat Standar (ng)	R_f		L. Area	
	Daidzein	Genistein	Daidzein	Genistein
50	0,39	0,57	0,02	0,12
100	0,39	0,57	0,05	0,21
150	0,39	0,58	0,08	0,33
200	0,40	0,58	0,16	0,41
250	0,39	0,58	0,21	0,61
300	0,39	0,58	0,25	0,68
350	0,40	0,58	0,33	0,72

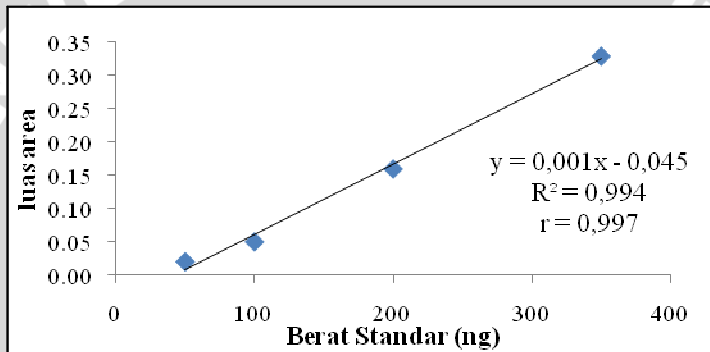
L.6.2 Sampel

Tabel L.6.2 Nilai R_f dan luas area sampel dengan berbagai variasi konsentrasi NaCl menggunakan pelarut toluen : dietil eter : asam asetat (10 : 10 : 2)

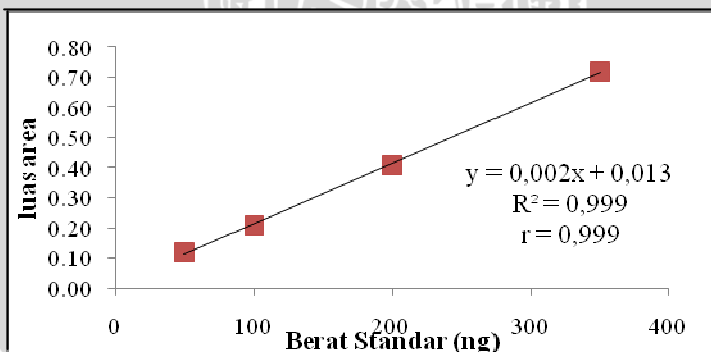
[NaCl] (ppm)	Daidzein				Genistein			
	R_f		Luas area		R_f		Luas area	
	I	II	I	II	I	II	I	II
0	0,37	0,41	0,13	0,06	0,59	0,60	0,26	0,28
15	0,39	0,38	0,16	0,17	0,61	0,60	0,41	0,37
30	0,38	0,39	0,23	0,21	0,59	0,60	0,57	0,54
45	0,39	0,37	0,25	0,24	0,59	0,60	0,68	0,61
60	0,39	0,39	0,16	0,15	0,60	0,60	0,28	0,38
75	0,38	0,38	0,21	0,11	0,59	0,59	0,42	0,25

Lampiran 7 Kurva Standar Daidzein dan Genistein

Berat Standar (ng)	Luas Area Genistein	Luas Area Daidzein
50	0,12	0,02
100	0,21	0,05
200	0,41	0,16
350	0,72	0,33



Gambar L.7.1 Kurva standar daidzein



Gambar L.7.2 Kurva standar genistein

Lampiran 8 Perhitungan Kadar Isoflavon

$$[\text{noda}](x) = \frac{y - b}{a} (\text{ng})$$

$$\text{Kadar Isoflavon} = \frac{V_{\text{ekstrak}} / V_{\text{totalan}} \times [\text{noda}]}{W_{\text{sampel}}}$$

Dimana :

V_{ekstrak} = volume ekstrak = 1 mL = 1000 μL

V_{totalan} = volume penotolan ekstrak pada plat KLT = 4 μL

$[\text{noda}]$ = kadar noda didapatkan dari persamaan regresi (ng)

W_{sampel} = berat sampel (mg)

L.8.1 Daidzein

Pers regresi $y = 0,001x - 0,045$

Tabel L.8.1 Perhitungan kadar daidzein dalam sampel

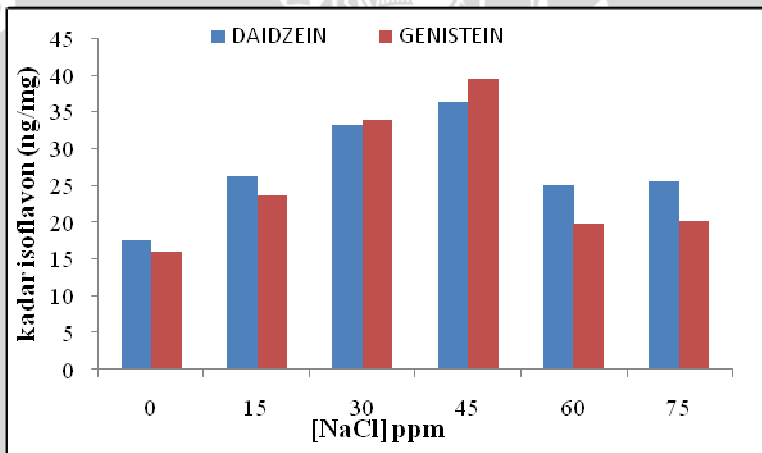
[NaCl]	x (ng)		Rata-rata (ng)	Kadar (ng/mg)		Rata-rata (ng/mg)
	I	II		I	II	
0	175	105	140	21,88	13,13	17,50
15	205	215	210	25,63	26,88	26,25
30	275	255	265	34,38	31,88	33,13
45	295	285	290	36,88	35,63	36,25
60	205	195	200	25,63	24,38	25,00
75	255	155	205	31,88	19,38	25,63

L.8.2 Genistein

Pers regresi $y = 0,002x + 0,013$

Tabel L.8.2 Perhitungan kadar genistein dalam sampel

[NaCl]	x (ng)		Rata-rata (ng)	Kadar (ng/mg)		Rata-rata (ng/mg)
	I	II		I	II	
0	123,50	133,50	128,50	15,44	16,69	16,06
15	198,50	178,50	188,50	24,81	22,31	23,56
30	278,50	263,50	271,00	34,81	32,94	33,88
45	333,50	298,50	316,00	41,69	37,31	39,50
60	133,50	183,50	158,50	16,69	22,94	19,81
75	203,50	118,50	161,00	25,44	14,81	20,13



Gambar L.8.1 Bagan pengaruh penambahan garam NaCl terhadap kenaikan isoflavon