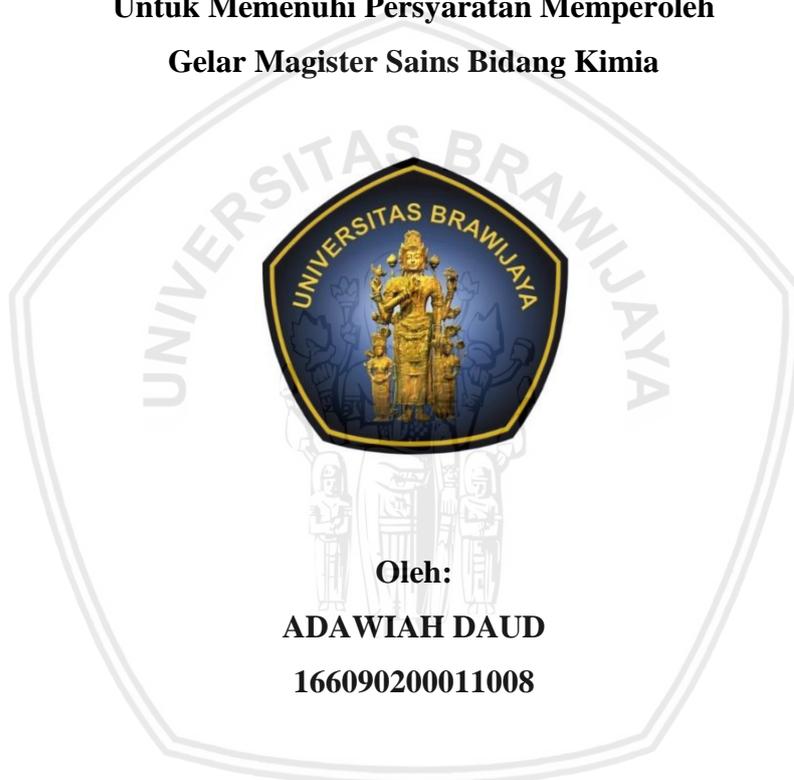


**METODE ANALISIS ISOFLAVON PADA KEDELAI (*Glycine max* (Linn.)
Merrill) TAHAN NAUNGAN DENA 1 MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh
Gelara Magister Sains Bidang Kimia**



**Oleh:
ADAWIAH DAUD
166090200011008**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
BIDANG MINAT KIMIA ANALITIK**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

METODE ANALISIS ISOFLAVON PADA KEDELAI (*Glycine max (Linn.) Merrill*) TAHAN NAUNGAN DENA 1 MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Oleh:

ADAWIAH DAUD

166090200011008

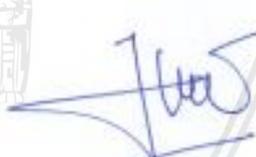
Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 1 Juli 2019 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains dalam Bidang Kimia.

Menyetujui
Komisi Pembimbing,

Ketua

Anggota


Dra. Hermin Sulistyarti, Ph.D
NIP. 196405291988022001


Dr. Rurini Retnowati, M.Si
NIP. 196012091988022001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S2 Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya


Dr. Arie Srilhadvastutie, S.Si., M.Kes
NIP. 1972032620022122001

**METODE ANALISIS ISOFLAVON PADA KEDELAI (*Glycine max* (Linn.)
Merrill) TAHAN NAUNGAN DENA 1 MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Nama Mahasiswa : Adawiah Daud
NIM : 166090200011008
Jurusan/Program Studi : Kimia/S2 Kimia
Bidang Minat : Kimia Analitik

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Dra. Hermin Sulistyarti, Ph.D
Anggota : Dr. Rurini Retnowati, M.Si

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Dr. Ulfa Andayani, S.Si., M.Si
Dosen Penguji 2 : Barlah Rumhayati, S.Si., M.Si., Ph.D

Tanggal Ujian : 1 Juli 2019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Adawiah Daud
NIM : 166090200011008
Jurusan/Program Studi : Kimia/S2 Kimia
Bidang Minat : Kimia Analitik
Fakultas : MIPA

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa

1. Tesis yang berjudul "Metode Analisis Isoflavon pada Kedelai (*Glycine Max* (Linn.) Merrill) Tahan Naungan Dena 1 Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)" benar-benar tulisan saya dan bukan merupakan jiplakan (plagiasi) baik sebagian atau seluruhnya, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tesis yang saya tulis ini terbukti hasil jiplakan (plagiasi) baik sebagian atau seluruhnya, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 23 Juni 2019

Yang menyatakan,



Adawiah Daud

NIM. 166090200011008

RIWAYAT HIDUP

Adawiah Daud dilahirkan di Kabupaten Tulungagung pada tanggal 5 Januari 1994. Putri kedua dari Bapak Sugeng Pambudi Khaimi dan Ibu Komariyah. Bertempat tinggal di Dusun Gambar RT 03 RW 04 Desa Mirigambar Kecamatan Sumbergempol Kabupaten Tulungagung Provinsi Jawa Timur. Pendidikan taman kanak-kanak sampai pendidikan sekolah dasar ditempuh di kampung halamannya di Desa Mirigambar. Pada tahun 2000 penulis menyelesaikan pendidikan taman kanak-kanak di RA Budi Utomo, tahun 2006 menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di MI Nurul Islam. Penulis melanjutkan ke jenjang pendidikan sekolah menengah pertama di SMP Negeri 2 Tulungagung dan menyelesaikan pendidikan sekolah menengah pertama pada tahun 2009. Penulis melanjutkan ke jenjang pendidikan sekolah menengah atas di SMA Negeri 1 Boyolangu, menyelesaikan pendidikan sekolah menengah atas pada tahun 2012. Pendidikan Sarjana ditempuh di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang (UM) dimulai pada tahun 2012 dan lulus pada tahun 2016. Penulis melanjutkan ke jenjang pendidikan Magister di Jurusan Kimia Bidang Minat Kimia Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya dimulai pada tahun 2016 dan lulus pada tahun 2019. Penulis merupakan anggota grup riset LCMIA (*Low Cost Automated Method and Instrumentation Analysis*) Universitas Brawijaya. Kegiatan akademik yang diikuti penulis meliputi:

- 6 Maret 2017 : Peserta pada International Guest Lecture Chemistry 2017 dengan topik “Metals-Based Anti Cancer Drugs”
- 4-5 November 2017 : Peserta pada International Conference On Chemistry and Material Science (IC2MS) Universitas Brawijaya
- 23 Februari 2018 : Peserta pada Workshop “New Innovation in Flash Chromatography: A Solution of Advance Separation and Purification in Natural Product Chemistry” Faculty of Science and Technology, Airlangga University
- 26-27 April 2018 : Peserta pada Invited Professor 3 in 1 Seminar Faculty of Agriculture Universitas Brawijaya Presented by Sastia P. Putri, Ph.D from Osaka University with the topic of “Instrumentation for Metabolomics Research” and “Metabolomics for The Improvement of Food and Agriculture”

- 26 Oktober 2018 : Peserta pada The Scientific Committee of Joint Symposium on Chemistry (JsoC) 2018 Brawijaya University - Okayama University
- 20-21 Maret 2019 : Presenter poster berjudul “High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Determination of Isoflavones Content in Shade-Tolerant Soybean Dena I pada *The Basic Science International Conference (BaSIC 2019)* Universitas Brawijaya

Penulis dapat dihubungi melalui *e-mail*: adawiahdaud15@gmail.com.



HALAMAN PERSEMBAHAN

*“Bismillah”
pangkal segala kebaikan,
permulaan segala kebaikan.
permulaan segala urusan penting,
dan dengannya juga
kita memulai segala urusan.*

“Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan) tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain)”

(QS 94: 6-7)

Tesis ini dipersembahkan untuk Almarhum Ayahanda tercinta Sugeng Pambudi Khaimi yang selalu mendo'akan dan memberikan kasih sayang semasa hidupnya.

Ibunda tercinta Komariyah yang selalu memberikan do'a, perhatian, dan dukungannya selama ini.

Untuk kakak dan adikku tercinta Wildan Ahda Luqmana dan Faiza Taufika, terimakasih telah menemani, memberikan dukungan serta menjadi teman dalam hidupku.

Terimakasih telah membesarkan mimpi saya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, berkat limpahan taufik dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis berjudul “Metode Analisis Isoflavon pada Kedelai (*Glycine Max* (Linn.) Merrill) Tahan Naungan Dena 1 Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)” sebagai salah satu persyaratan dalam menyelesaikan program Magister Kimia di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada seluruh pihak yang secara langsung maupun tidak langsung membantu dalam penyelesaian penelitian dan penulisan tesis ini, yaitu kepada:

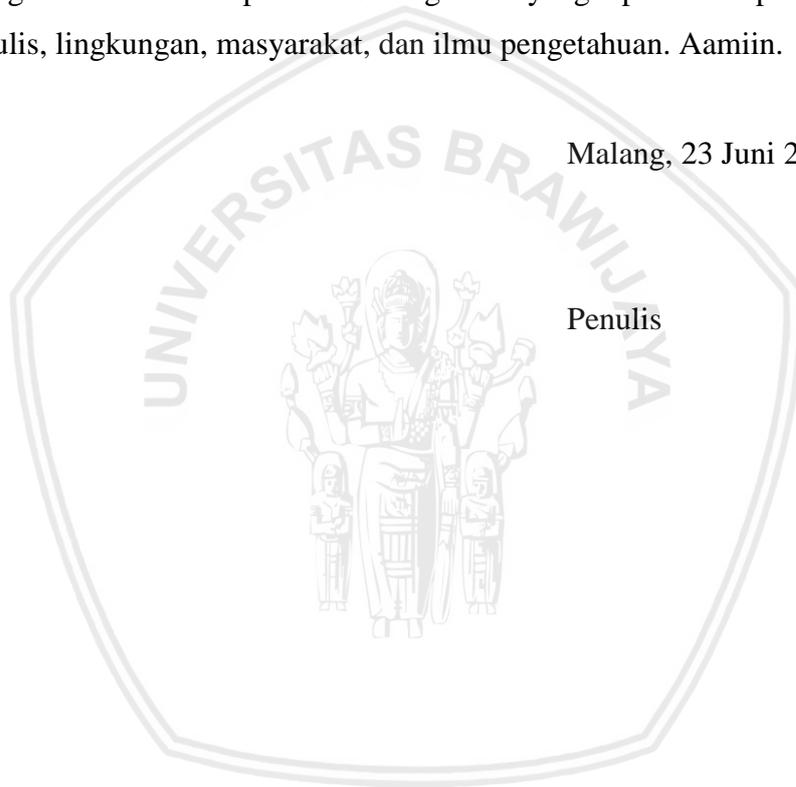
1. Ibu Dra. Hermin Sulistyarti, Ph.D dan Ibu Dr. Rurini Retnowati, M.Si selaku Dosen Pembimbing yang dengan sabar memberikan pengarahan, bimbingan, bantuan, motivasi, serta kesediaannya untuk berdiskusi sehingga memberikan masukan yang berarti sampai akhir penulisan tesis ini.
2. Ibu Dr. Ulfa Andayani, S.Si., M.Si dan Ibu Barlah Rumhayati, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Dosen Penguji yang dengan sabar telah yang memberi saran dan masukan kepada penulis untuk perbaikan naskah tesis ini.
3. Bapak Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya atas ijin yang telah diberikan untuk melaksanakan penelitian dalam menyelesaikan tesis ini.
4. Bapak Drs. Adi Susilo, M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya atas ijin yang telah diberikan untuk melaksanakan penelitian dalam menyelesaikan tesis ini.
5. Segenap Dosen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya yang telah mendidik dengan tulus dan sabar selama penulis kuliah di Universitas Brawijaya.
6. Seluruh staf di Jurusan Kimia dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya yang telah memberikan bantuan selama perkuliahan.

7. Sahabat-sahabat tercinta Anis Khoirun Nisa', Majida Ramadhan, Rifnida Azmi Fitratian, Anisa Resti, M. Iqbal Fahmi, Fath Dwisari, Irwansyah Putra Pradana, Fahrana Salas T., Dias Septiana, Yohana Felisita W., Laili Maghfiroh R., dan Stevin Carolius Angga yang telah berbagi kebersamaan, memberikan do'a, bantuan, dan kasih sayang, semoga tetap terjaga persaudaraan kita.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih atas do'a, motivasi, dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis.

Semoga Allah SWT memberikan pahala yang berlipat ganda kepada semua pihak yang telah membantu penulis. Semoga ilmu yang diperoleh dapat bermanfaat bagi penulis, lingkungan, masyarakat, dan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Malang, 23 Juni 2019

Penulis



RINGKASAN

Adawiah Daud. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Juni 2019. **Metode Analisis Isoflavon pada Kedelai (*Glycine Max* (Linn.) Merrill) Tahan Naungan Dena 1 Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**. Ketua Komisi Pembimbing: Dra. Hermin Sulistyarti, Ph.D. Anggota: Dr. Rurini Retnowati, M.Si.

Kebutuhan kedelai nasional dari tahun ke tahun mengalami peningkatan tetapi produksi kedelai mengalami penurunan karena berkurangnya luas panen kedelai. Sehingga untuk menutupi kekurangan produksi, Indonesia mengimpor kedelai rata-rata 70% per tahun. Peningkatan produksi kedelai nasional baik dari kuantitas maupun kualitas terus diupayakan oleh pemerintah melalui pemanfaatan areal di bawah naungan. Balitkabi telah mengembangkan varietas unggul baru kedelai tahan naungan (hingga 50%) yaitu Dena 1 dan Dena 2. Pengembangan varietas kedelai tetap harus memperhatikan kualitas kedelai yang ditandai dengan kandungan nutriennya. Kedelai (*Glycine max* (Linn.) Merril) adalah salah satu tanaman dari golongan *Leguminosae* yang merupakan sumber utama isoflavon. Konsentrasi isoflavon kedelai bervariasi tergantung pada kondisi lingkungan dalam pertumbuhan tanaman. Isoflavon sebagai salah satu nutrisi memiliki banyak manfaat untuk kesehatan yaitu sebagai antioksidan dan antikanker. Isoflavon merupakan senyawa fenolik polar yang terdiri dari 4 kerangka struktur dasar yaitu aglikon, glikosida, asetilglikosida, dan malonilglikosida. Isoflavon aglikon lebih cepat dan lebih banyak diserap tubuh dibandingkan isoflavon glikosida. Pada penelitian ini varietas kedelai yang diteliti adalah kedelai tahan naungan Dena 1 karena memiliki potensi rata-rata hasil lebih besar yaitu $\pm 1,69$ ton/ha dan belum ada informasi mengenai konsentrasi isoflavon terutama aglikon dalam kedelai Dena 1, sehingga diperlukan suatu metode analisis yang valid.

Tujuan penelitian ini adalah optimasi metode KCKT untuk menganalisis isoflavon dalam kedelai tahan naungan Dena 1. Optimasi metode KCKT fase diam C18 dilakukan pada kondisi: (1) panjang gelombang detektor UV 249; 250; 254;

260; dan 262 nm, sehingga dapat diperoleh respon maksimum dan sensitivitas pengukuran yang baik; (2) laju alir 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 dan 1,5 mL/min, semakin cepat laju alir yang digunakan maka waktu retensi yang diperlukan analit juga semakin cepat; (3) komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat teknik elusi isokratik, semakin banyak komposisi 0,1% asam asetat maka pemisahan semakin baik karena isoflavon merupakan senyawa fenolik yang bersifat asam maka kesetimbangan ionisasi bergeser ke bentuk molekul asamnya yang bersifat non polar yang dapat meningkatkan interaksi dengan kolom C18 yang non polar; (4) komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat teknik elusi gradien dengan kenaikan asetonitril 15-30%, sehingga pemisahan isoflavon dapat meningkat mengingat terdapat banyak isoflavon yang mungkin terdapat dalam kedelai Dena 1 serta untuk mempercepat waktu retensi analit dibandingkan dengan teknik elusi isokratik. Kondisi optimum ditentukan berdasarkan intensitas optimum dan jumlah puncak pada kromatogram dan berdasarkan nilai resolusi (R_s), jumlah plat teori (N), faktor kapasitas (k'), dan selektivitas (α) pada kromatogram optimasi laju alir sampel kedelai tahan naungan Dena 1. Kemudian dengan kondisi optimum tersebut dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi puncak standar genistein dengan puncak analit dalam sampel kedelai Dena 1 dan metode *spiking*. Analisis kuantitatif genistein dalam ekstrak kedelai Dena 1 menggunakan metode standar eksternal dan *spiking*.

Hasil optimasi metode KCKT untuk analisis isoflavon genistein adalah: (1) panjang gelombang deteksi UV 260 nm; (2) optimasi laju alir menunjukkan nilai parameter kromatografi yang bagus pada semua laju alir tetapi dipilih salah satu yang menunjukkan pemisahan optimum dan waktu retensi yang sesuai yaitu laju alir 1 mL/min; (3) teknik elusi gradien dengan komposisi fase gerak (A: asetonitril; B: 0,1% asam asetat) sebagai berikut: A 15%, B 85% pada menit ke 0–3; A 20%, B 80% pada menit ke 3–12; A 25%, B 75% pada menit ke 12–17; A 30%, B 70% pada menit ke 17–23; A 25%, B 75% pada menit ke 23–30; dan A 20%, B 80% pada menit ke 30–40.

Berdasarkan kromatogram sampel kedelai Dena 1 dan sampel yang *dispike* dengan standar genistein pada analisis kualitatif menunjukkan bahwa terdapat

puncak yang mengalami kenaikan area pada waktu retensi 24,803 menit. Kenaikan area puncak menunjukkan bahwa isoflavon genistein terdapat dalam ekstrak kedelai Dena 1. Analisis kuantitatif menunjukkan konsentrasi genistein yang diperoleh dari metode standar eksternal adalah $0,138 \pm 0,003$ mg/g dan dari metode *spiking* adalah $0,114 \pm 0,016$ mg/g. Dalam kedelai Dena 1 terdapat isoflavon genistein dan senyawa isoflavon lain yang ditunjukkan beberapa puncak selain genistein tetapi belum diidentifikasi, sehingga diperlukan analisis isoflavon dalam kedelai Dena 1 menggunakan standar isoflavon selain genistein.



SUMMARY

Adawiah Daud. Master Program. June 2019. **High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Determination of Isoflavones Content in Shade-Tolerant Soybean (*Glycine Max* (Linn.) Merrill) Dena 1.** Supervisor: Dra. Hermin Sulistyarti, Ph.D., Co. Supervisor: Dr. Rurini Retnowati, M.Si.

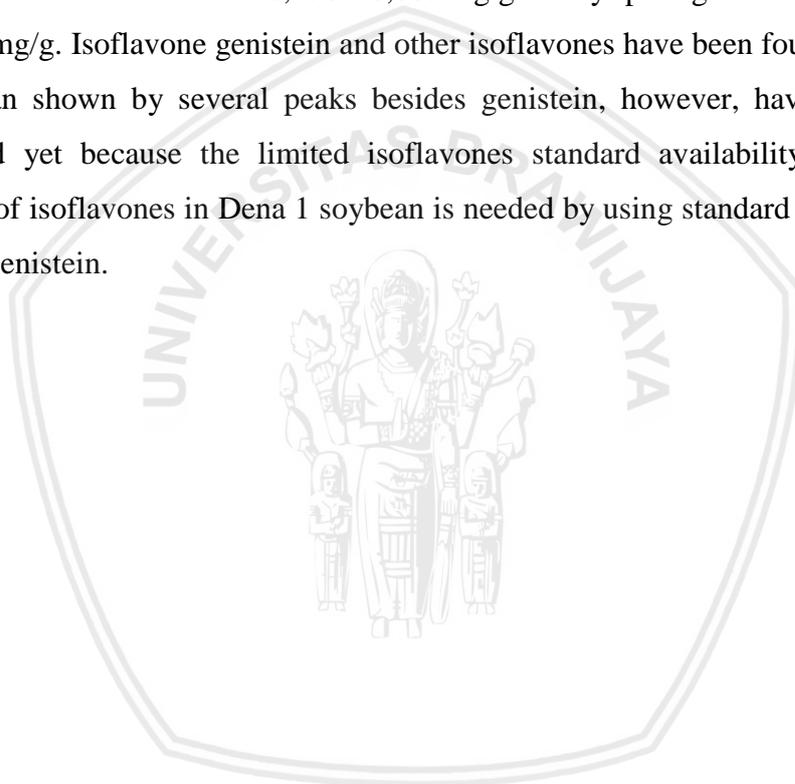
National soybeans need from year to year have increased meanwhile soybeans production decrease due to limited soybean harvest area. Therefore, to cover soybeans need Indonesia have to import soybeans about 70% per year. To overcome soybeans need in Indonesia, government working so hard to increase soybeans production by cultivated soybeans in shady or semi-shady conditions between trees. ILETRI cultivated a new soybean variety from plant breeding scheme which is shade-tolerant soybean, called Dena 1 and Dena 2. Cultivation of soybean varieties must concern to the quality of soybeans which are characterized by nutrient content. Soybean (*Glycine max* (Linn.) Merrill) is one of the plants that belongs to *Leguminosae* which is the main source of isoflavones. Isoflavones concentration depends on environmental conditions of cultivation. Isoflavones as a nutrient have many health benefits i.e antioxidants and anticancer. Among the four forms of isoflavones, the highest biological activity is indicated by isoflavones aglycones i.e., genistein, daidzein, and glycitein. Isoflavones are polar phenolic compounds classified into four groups: aglycones, glycosides, acetylglycosides, and malonylglycosides. Aglycones were absorbed faster and in greater amounts than their glucosides in humans than isoflavones glycosides. In this study, shade-tolerant soybean varieties studied was Dena 1 because it has a greater yield potential about ± 1.69 tons/ha, however there was no information about isoflavone concentrations especially aglycone in Dena 1 soybeans. Therefore, there is a need of valid method to identify and quantify isoflavones in Dena 1.

This study aims to optimize HPLC method for isoflavones determination in Dena 1 soybean extract. Optimization of the method of the C18 stationary phase was carried out under conditions: (1) the UV detector wavelength 249; 250; 254;

260; and 262 nm, therefore the maximum response and good sensitivity of measurement can be obtained; (2) flow rate of 0.5; 0.8; 1.0; 1.2 and 1.5 mL/min, the faster the flow rate, the faster the retention time needed by the analyte; (3) mobile phase composition of acetonitrile: 0.1% acetic acid isocratic elution technique, the more composition 0.1% acetic acid, the better the separation because isoflavones are acidic phenolic compounds so its ionization equilibrium shifts to its non polar acidic molecular form which can increase interaction with non-polar C18 columns, resulting in good separation; (4) mobile phase composition of acetonitrile: 0.1% acetic acid in gradient elution technique with gradual increase of 15-30% acetonitrile, therefore the separation of isoflavones can increase considering there are many isoflavones that may be available in Dena 1 soybeans, moreover to accelerate retention time of analyte compared to isocratic elution technique. The optimum condition was determined based on the optimum intensity and number of peaks on the chromatogram and based on the value of the resolution (R_s), the number of theoretical plates (N), capacity factor (k'), and selectivity (α) on the chromatogram of flow rate optimization of Dena 1 soybean. These optimum conditions were used for qualitative and quantitative analysis. Qualitative analysis for determination of genistein in Dena 1 soybean extract was done using two methods, i.e comparison of genistein standard retention time to the retention time of peaks in Dena 1 soybean extract chromatogram and spiking method. Quantitative analysis of genistein in Dena 1 soybean extract was conducted using external standard and spiking methods

The results of the HPLC method optimization for isoflavone genistein analysis were: (1) at 260 nm UV detection wavelength; (2) flow rate optimization showed good chromatographic parameter values at all flow rates, but flow rate of 1 mL/min was selected as it showed optimum separation and appropriate retention time; (3) gradient elution program three (GE-3) in the following arrangement (A: acetonitrile; B: acetic acid 0.1%): A 15%, B 85% for 0–3 min; A 20%, B 80% for 3–12 min; A 25%, B 75% for 12–17 min; A 30%, B 70% for 17–23 min; A 25%, B 75% for 23–30 min; and A 20%, B 80% for 30–40 min was chosen as optimum gradient program.

Based on qualitative analysis results, peak of chromatogram with the retention time of 24.708 min from Dena 1 extract chromatogram has similar retention time to the retention time of genistein (GEN) standard peak of 24.490 min, which means that genistein is available in Dena 1 extract; spiking method the chromatograms of sample Dena 1 extract and the sample spiked with genistein standard showed increasing peak area at retention time of 24.803 mins. The increasing peak area confirmed the presence of genistein in Dena 1 soybean extract. Based on quantitative analysis results, the concentration of genistein obtained by external standard method was $0,138 \pm 0,003$ mg/g and by spiking method was $0,114 \pm 0,016$ mg/g. Isoflavone genistein and other isoflavones have been found in Dena 1 soybean shown by several peaks besides genistein, however, have not been identified yet because the limited isoflavones standard availability, therefore analysis of isoflavones in Dena 1 soybean is needed by using standard isoflavones besides genistein.



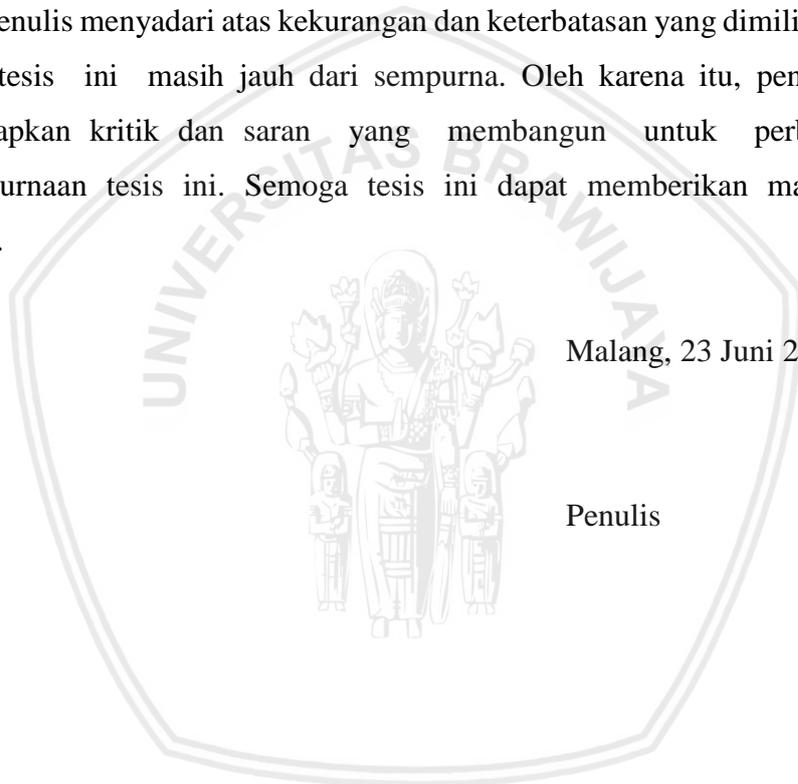
KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul “Metode Analisis Isoflavon pada Kedelai (*Glycine Max* (Linn.) Merrill) Tahan Naungan Dena 1 Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)”. Penyusunan naskah tesis ini merupakan salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar Magister Sains di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari atas kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki sehingga tulisan tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan dan penyempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Malang, 23 Juni 2019

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
RIWAYAT HIDUP	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xiii
KATA PENGANTAR	xvi
DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR GAMBAR	xxi
DAFTAR TABEL	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN	xxv
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xxvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Masalah.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan Umum Kedelai (<i>Glycine max</i> (Linn.) Merrill).....	6
2.2 Isoflavon.....	10
2.2.1 Struktur dan Sifat Isoflavon	12
2.2.2 Manfaat Isoflavon	13
2.3 Metode Ekstraksi <i>Ultrasound Assisted Extraction</i> (UAE).....	16

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	19
2.4.1 Instrumentasi KCKT	20
2.4.1.1 Fase Diam.	21
2.4.1.2 Fase Gerak	21
2.4.1.3 Pompa	23
2.4.1.4 Injektor	23
2.4.1.5 Detektor.....	23
2.4.2 Parameter Kromatografi.....	24
2.4.2.1 Resolusi (R_s)	24
2.4.2.2 Jumlah Plat Teori (N)	25
2.4.2.3 Faktor kapasitas (k')	25
2.4.2.4 Selektivitas (α).....	26
2.4.3 Elusi Isokratik	29
2.4.4 Elusi Gradien	29
2.5 Metode Analisis Kualitatif dan Kuantitatif KCKT	31
2.5.1 Analisis Kualitatif.	31
2.5.1.1 Identifikasi puncak berdasarkan waktu retensi standar	31
2.5.1.2 <i>Spiking</i> sampel.....	31
2.5.1.3 Menggunakan detektor selektif dan spektrometer.....	32
2.5.2 Analisis Kuantitatif.	32
2.5.2.1 Standar eksternal.....	32
2.5.2.2 <i>Spiking</i>	33
2.6 Analisis Isoflavon Menggunakan KCKT.....	34
BAB III KERANGKA KONSEP PENELITIAN	37
3.1 Kerangka Konsep	37
3.2 Skema Konsep Penelitian.....	38
3.3 Hipotesis Penelitian.....	39
BAB IV METODE PENELITIAN	40
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	40

4.2 Alat dan Bahan.....	40
4.2.1 Alat.....	40
4.2.2 Bahan	40
4.3 Tahapan Penelitian.....	41
4.4 Prosedur Penelitian.....	41
4.4.1 Preparasi sampel kedelai Dena 1	41
4.4.2 Analisa kadar air	42
4.4.3 Ekstraksi sampel kedelai Dena 1 menggunakan metode UAE	42
4.4.4 Pembuatan larutan standar genistein 600 ppm.....	42
4.4.4.1 Standar genistein 90 ppm	43
4.4.4.2 Standar genistein 20 ppm	43
4.4.4.3 Standar genistein 18 ppm	43
4.4.5 Optimasi metode KCKT pada analisis isoflavon kedelai Dena 1	44
4.4.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum.....	44
4.4.5.2 Penentuan Laju Alir Optimum	44
4.4.5.3 Penentuan Komposisi Fase Gerak Optimum	44
4.5 Analisis Kualitatif Isoflavon dalam Kedelai Tahan Naungan Dena 1	45
4.6 Analisis Kuantitatif Isoflavon dalam Kedelai Tahan Naungan Dena 1	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	47
5.1 Ekstrak Isoflavon dari Kedelai Dena 1 dan Analisis Pendahulunya.....	47
5.2 Standar Genistein	49
5.3 Panjang Gelombang Optimum dalam Pemisahan Isoflavon.....	50
5.4 Laju Alir Optimum dalam Pemisahan Isoflavon	51
5.5 Komposisi Fase Gerak Optimum dalam Pemisahan Isoflavon.....	55
5.5.1 Pemisahan Isoflavon dengan Elusi Isokratik	55
5.5.2 Pemisahan Isoflavon dengan Elusi Gradien.....	56
5.6 Analisis Kualitatif Genistein dalam Ekstrak Kedelai Dena 1	62
5.7 Analisis Kuantitatif Genistein dalam Ekstrak Kedelai Dena 1	62

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	67
6.1 Kesimpulan	67
6.2 Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	74



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman kedelai, biji kedelai, dan irisan melintang biji kedelai.....	8
Gambar 2.2 Budi daya kedelai secara tumpangsari dengan jagung.....	9
Gambar 2.3 Budi daya kedelai tahan naungan dengan pohon jati	10
Gambar 2.4 Dua varietas kedelai tahan naungan Dena 1 dan Dena 2	11
Gambar 2.5 Klasifikasi senyawa fenolik kacang-kacangan.....	12
Gambar 2.6 Struktur dasar senyawa isoflavon.....	13
Gambar 2.7 Struktur kimia 12 bentuk isoflavon.....	14
Gambar 2.8 Jalur degradasi isoflavon kacang kedelai	15
Gambar 2.9 Kemiripan struktur estrogen dan isoflavon	16
Gambar 2.10 Skema instrumen KCKT	19
Gambar 2.11 Proses pemisahan yang terjadi di dalam kolom	20
Gambar 2.12 Kromatogram KCKT dari 12 bentuk isoflavon kedelai	20
Gambar 2.13 Instrumen KCKT di Laboratorium Instrumen Kimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya.....	21
Gambar 2.14 Contoh profil kromatogram dengan beberapa nilai Faktor Resolusi (Rs)	24
Gambar 2.15 Perhitungan Resolusi (Rs) kromatogram	24
Gambar 2.16 Penentuan Jumlah Plat Teori (N)	25
Gambar 2.17 Contoh kromatogram dengan faktor kapasitas (k') rendah dan tinggi.....	26
Gambar 2.18 Penentuan Selektivitas (α).....	26
Gambar 2.19 Pengaruh jenis pelarut organik terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik	27
Gambar 2.20 Pengaruh perubahan pH fase gerak terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik dengan analit bersifat asam dan kolom C8	27
Gambar 2.21 Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perubahan sifat kimia	

fase diam pada metode KCKT fase terbalik.....	28
Gambar 2.22 Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perbedaan suhu kolom yang digunakan pada metode KCKT fase terbalik.....	28
Gambar 2.23 Profil kromatogram yang menunjukkan potensi masalah yang dihadapi dengan metode elusi isokratik KCKT.....	29
Gambar 2.24 Kromatogram hasil pemisahan herbisida pada kolom C8.....	30
Gambar 2.25 Identifikasi puncak sampel berbasis kesamaan waktu retensi zat standar	31
Gambar 2.26 Kromatogram sampel dan kromatogram spiking sampel.....	32
Gambar 2.27 Kromtogram standar eksternal dan sampel	33
Gambar 5.1 Hasil uji fitokimia ekstrak kedelai Dena 1	48
Gambar 5.2 Skema pembagian daerah serapan flavonoid	49
Gambar 5.3 Spektrum UV ekstrak kedelai Dena 1	49
Gambar 5.4 Spektrum UV standar genistein.....	50
Gambar 5.5 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 dengan lima titik panjang gelombang	52
Gambar 5.6 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 dengan lima variasi laju alir	53
Gambar 5.7 Pengaruh laju alir terhadap waktu retensi puncak terduga genistein (puncak 6) dalam ekstrak kedelai Dena 1	53
Gambar 5.8 Pengaruh komposisi fase gerak terhadap kromatogram ekstrak kedelai Dena 1	57
Gambar 5.9 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 dengan komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat (20:80).....	58
Gambar 5.10 Kromatogram ekstrak Dena 1 menggunakan elusi gradien program GE-1.....	59
Gambar 5.11 Kromatogram ekstrak Dena 1 menggunakan elusi gradien program GE-2.....	60
Gambar 5.12 Kromatogram ekstrak Dena 1 menggunakan elusi gradien program GE-3.....	61

Gambar 5.13 Kromatogram standar GEN, ekstrak kedelai Dena 1, dan ekstrak Kedelai Dena 1 *dispike* dengan standar GEN 63

Gambar 5.14 Kromatogram standar genistein 18 ppm 63

Gambar 5.15 Kromatogram hasil analisis kuantitatif metode standar eksternal 64

Gambar 5.16 Kromatogram hasil analisis kuantitatif metode *spiking* 64

Gambar 5.17 Perbesaran puncak kromatogram genistein pada (a) ekstrak kedelai Dena 1; (b) ekstrak kedelai Dena 1 *dispike* 18 ppm standar genistein hasil analisis kuantitatif metode *spiking* 65



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Pengembangan metode menggunakan <i>ultrasound</i> untuk ekstraksi isoflavon kedelai dan parameter yang dievaluasi	18
Tabel 2.2 Pelarut non-polar.....	22
Tabel 2.3 Pelarut polar aprotik “borderline”	22
Tabel 2.4 Pelarut polar aprotik.....	22
Tabel 2.5 Pelarut polar protik.....	22
Tabel 2.6 Data untuk konfirmasi identifikasi beberapa senyawa isoflavon.....	34
Tabel 2.7 Kondisi kromatografi yang digunakan dalam pemisahan isoflavon kedelai.	36
Tabel 4.1 Komposisi fase gerak pada program elusi gradien	45
Tabel 5.1 Evaluasi pemisahan isoflavon pada berbagai laju alir	54
Tabel 5.2 Keterangan untuk kromatogram Gambar 5.10.....	59
Tabel 5.3 Keterangan untuk kromatogram Gambar 5.11.....	60
Tabel 5.4 Keterangan untuk kromatogram Gambar 5.12.....	61
Tabel 5.5 Nilai % RSD konsentrasi genistein dalam kedelai Dena 1	65



DAFTAR LAMPIRAN

L.1 Preparasi Sampel Kedelai Dena 1.....	74
L.2 Analisa Kadar Air.....	74
L.3 Ekstraksi Sampel Kedelai Dena 1.....	75
L.4 Preparasi Larutan Standar Genistein	75
L.4.1 Standar Genistein 600 ppm.....	75
L.4.2 Standar Genistein 90 ppm.....	75
L.4.3 Standar Genistein 20 ppm.....	76
L.4.4 Standar Genistein 18 ppm.....	76
L.5 Spektrum <i>Scanning</i> UV 200-400 nm.....	76
L.5.1 Metanol	76
L.5.2 Standar Genistein.....	77
L.5.3 Ekstrak Kedelai Dena 1	77
L.6 Optimasi Metode KCKT pada Analisis Isoflavon Kedelai Dena 1	78
L.6.1 Optimasi Panjang Gelombang.....	78
L.6.2 Optimasi Laju Alir.....	80
L.6.3 Optimasi Komposisi Fase Gerak.....	85
L.6.3.1 Elusi Isokratik.....	85
L.6.3.2 Elusi Gradien	89
L.7 Analisis Kualitatif Genistein dalam Ekstrak Kedelai Dena 1	93
L.7.1 Perbandingan Waktu Retensi Puncak Standar Genistein dan Puncak Analit dalam Ekstrak Kedelai Dena 1	93
L.7.2 <i>Spiking</i>	93
L.8 Analisis Kuantitatif Genistein dalam Ekstrak Kedelai Dena 1	94
L.8.1 Standar Eksternal	94
L.8.2 <i>Spiking</i>	96
L.9 Deskripsi Kedelai Dena 1	99
L.10 Deskripsi Kedelai Dena 2	100
L.11 Sertifikat Bebas Plagiasi	101
L.12 Sertifikat sebagai Presenter pada <i>The Basic Science International Conference</i> (BaSIC 2019).....	102
L.13 <i>Paper of IOP Conference Series: Materials Science and Engineering</i>	103

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol atau Singkatan	Keterangan
°C	Derajat celcius
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
Balitkabi	Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi
Balitbangtan	Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
BPS	Badan Pusat Statistik
C18	<i>Octadecyl silica</i>
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DIY	Daerah Istimewa Yogyakarta
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
g	Gram
GEN	Genistein
ha	Hektar
HPLC	<i>High Perfomance Liquid Chromatography</i>
Hz	Hertz
ILETRI	<i>Indonesian Legumes and Tuber Crops Research Institute</i>
KCKT	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
kHz	Kilohertz
L	Liter
MAE	<i>Microwave-Assisted Extraction</i>
mAU	Milli-Absorbance Units
mdpl	Meter di atas permukaan laut
mg	Miligram
min	Menit
mL	Mililiter
mm	Milimeter
nm	Nanometer
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>

PLE	<i>Pressurized Liquid Extraction</i>
Pusdatin	Pusat Data dan Informasi
psi	Pounds per Square Inch
RP	<i>Reversed Phase</i>
rpm	Rotasi per menit
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>
SUSENAS	Survei Sosial Ekonomi Nasional
UAE	<i>Ultrasonically Assisted Extraction</i>
UPBS	Unit Pengelolaan Benih Sumber
UV	<i>Ultraviolet</i>
Vis	<i>Visible</i>
W	Watt



**METODE ANALISIS ISOFLAVON PADA KEDELAI (*Glycine max* (Linn.)
Merrill) TAHAN NAUNGAN DENA 1 MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh
Gelar Magister Sains Bidang Kimia**



Oleh:

ADAWIAH DAUD

166090200011008

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pertumbuhan ekonomi negara-negara berkembang telah mengubah pola konsumsi penduduknya dari pangan penghasil energi ke produk penghasil protein (Swastika, 2013). Kedelai (*Glycine max* (Linn.) Merrill) adalah salah satu jenis kacang yang paling sering dikonsumsi di seluruh dunia, dengan 200 juta metrik ton diproduksi per tahun (FAO, 2006). Kedelai merupakan sumber protein nabati paling populer bagi masyarakat Indonesia. Konsumsi utama produk kedelai bagi masyarakat Indonesia meliputi dalam bentuk tempe, tahu, kecap, tauco, oncom, dan susu kedelai. Hasil SUSENAS yang dilaksanakan BPS tahun 2015, menunjukkan konsumsi tempe rata-rata per orang per tahun di Indonesia sebesar 6,99 kg dan tahu 7,51 kg. Pemenuhan kebutuhan akan kedelai yang merupakan bahan baku utama tempe dan tahu, 67,28% atau sebanyak 1,96 juta ton harus diimpor (Anonim, 2016). Hal ini terjadi karena produksi kedelai dalam negeri tidak mampu mencukupi. Kebutuhan kedelai nasional dari tahun ke tahun mengalami peningkatan tetapi produksi kedelai mengalami penurunan karena berkurangnya luas panen kedelai sehingga pemerintah berusaha meningkatkan produksi kedelai nasional melalui berbagai upaya diantaranya adalah meningkatkan luas tanam dan luas panen (Sundari, 2015), areal tanam/panen kedelai tidak luas (\pm 600 ribu ha) dan produktivitasnya rendah yakni 1,6 t/ha (Subandi, 2018). Peningkatan luas tanam dan panen kedelai dapat diupayakan melalui pemanfaatan areal di bawah naungan, baik naungan tanaman perkebunan, industri, hutan, maupun tanaman pangan melalui tumpangsari. Balitbangtan melalui Balitkabi pada tahun 2014 telah melepas dua varietas unggul baru kedelai toleran naungan Dena 1 dan Dena 2. Kedua varietas kedelai ini memiliki toleransi terhadap naungan hingga 50% serta masing-masing memiliki potensi rata-rata hasil \pm 1,69 ton/ha dan \pm 1,34 ton/ha.

Studi tentang komponen nutrisi dan antinutrisi kedelai dapat memberikan informasi yang berguna untuk kualitas nutrisi pada varietas kedelai dan referensi nilai untuk konsumsi kedelai (Zhe *et al.*, 2012). Berdasarkan rekomendasi konsensus dari *Organization for Economic Cooperation and Development*

(OECD), nutrien meliputi: asam amino, asam lemak, isoflavon; dan antinutrien meliputi: asam fitat, rafinosa, stakiosa; merupakan penanda yang penting dalam penilaian kualitas nutrisi varietas kedelai (Taylor *et al.*, 1999; Harrigan *et al.*, 2007; Lundry *et al.*, 2008). Isoflavon sebagai salah satu nutrien pada kedelai merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak dihasilkan tanaman melalui sintesis oleh *2-hydroxyisoflavone synthase* (IFS). Tanaman menghasilkan senyawa metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan dari cekaman, biotik maupun abiotik (Setyorini, 2016). Isoflavon sebagai metabolit sekunder diproduksi tanaman dalam jumlah tertentu pada kondisi tercekam.

Tanaman dengan konsentrasi isoflavon tinggi adalah tanaman kelompok *Leguminosae*, khususnya kedelai. Tanaman kedelai memiliki syarat tumbuh sebagai berikut: (1) tumbuh pada ketinggian 0-1500 mdpl namun optimum sekitar 650 mdpl, (2) suhu optimum 29,4°C, (3) toleransi terhadap naungan <40%. Konsentrasi isoflavon dalam kedelai bervariasi tergantung pada variasi genetik, waktu tanam, waktu panen, *cultivar*, letak geografis, *agronomical practice*, kondisi lingkungan dalam pertumbuhan tanaman, dan kondisi pemrosesan (Kim, Jung, Ahn, & Chung, 2005; Kirakosyan *et al.*, 2006; Mebrahtu *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005).

Isoflavon dalam kedelai merupakan senyawa polifenol yang ada dalam bentuk kelompok aglikon, glikosida, asetilglikosida, dan malonilglikosida. Di antara keempat kelompok isoflavon, aktivitas biologis tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein, daidzein, dan glisitein (Tipkanon *et al.*, 2010). Isoflavon aglikon lebih cepat dan lebih banyak diserap tubuh dibandingkan isoflavon glikosida. Senyawa aktif dalam kedelai yang bertanggung jawab terhadap aktivitas biologis diantaranya daidzein dan genistein. Isoflavon memiliki banyak manfaat untuk kesehatan, sebagai antioksidan dan antikanker yang disebabkan oleh hormon estrogen karena memiliki kemiripan struktur. Pada penelitian ini varietas kedelai yang dianalisis kandungan isoflavonnya adalah kedelai tahan naungan Dena 1 karena kedelai varietas ini memiliki potensi rata-rata hasil lebih tinggi dibandingkan dengan kedelai Dena 2. Sehingga, agar diperoleh informasi konsentrasi isoflavon terutama aglikon dalam kedelai tahan naungan Dena 1 diperlukan suatu metode analisis yang valid.

Penentuan konsentrasi isoflavon dalam ekstrak kedelai sangat ditentukan oleh metode ekstraksi, pelarut pengestraksi yang digunakan, dan metode analisis yang digunakan (Luthria *et al.*, 2007). Metode ekstraksi modern dilakukan dalam penelitian ini karena memiliki kelebihan mengurangi kebutuhan akan pelarut (*reduced-solvent method*) dan mempercepat waktu analisis, salah satu metode ekstraksi modern adalah UAE. Metode UAE merupakan metode dengan biaya rendah dan memiliki efisiensi yang tinggi serta menghasilkan ekstrak yang relatif stabil (Rostagno *et al.*, 2009). Metode ini telah banyak digunakan untuk mengekstraksi isoflavon dari kedelai, makanan berbasis kedelai, dan dari matriks yang berbeda (Rostagno *et al.*, 2009). Ekstraksi isoflavon dari kedelai biasanya dilakukan dengan berbagai jenis pelarut (Luthria *et al.*, 2007), seperti air, etanol, metanol, dan asetonitril. Sebagian besar isoflavon adalah senyawa fenolik polar sehingga membutuhkan pelarut polar untuk ekstraksi yang efektif. Achouri *et al.*, (2005) membandingkan tiga pelarut (80% asetonitril + 0,1 N asam klorida, 80% metanol, 80% etanol) untuk metode ekstraksi UAE isoflavon dari matriks yang berbeda dan hasil menunjukkan bahwa 80% metanol dan 80% etanol mengekstraksi jumlah isoflavon yang paling tinggi pada kedua matriks yang berbeda. Sehingga, pada penelitian ini digunakan pelarut pengestraksi 80% metanol.

Deteksi dan kuantifikasi isoflavon penting untuk mengetahui bioavailabilitas isoflavon dalam kedelai Dena 1 sehingga dapat diketahui apakah kedelai ini baik atau tidak untuk ditanam oleh petani. KCKT merupakan metode pemisahan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Berbagai kondisi sistem KCKT untuk analisis senyawa isoflavon dalam kedelai telah dilakukan untuk memperoleh metode analisis yang valid. Metode analisis isoflavon menggunakan KCKT telah dilakukan oleh Jun-ming *et al.*, (2011) menggunakan KCKT dalam penentuan 12 struktur isoflavon pada biji kedelai dengan detektor UV fase diam C18, dan fase gerak asetonitril-0,1% asam asetat dan Szymczak *et al.*, (2017) menggunakan KCKT yang menggunakan detektor *diode array detector* (DAD), fase diam RP C18, dan fase gerak asetonitril-0,025% TFA untuk menganalisis konsentrasi isoflavon pada beberapa taksa kedelai yang berbeda. Pada penelitian ini detektor yang digunakan adalah UV, fase diam C18, dan fase gerak asetonitril-0,1% asam asetat. Analisis isoflavon kedelai menggunakan metode KCKT telah banyak dilakukan tetapi belum

ada penelitian tentang penggunaan metode ini untuk analisis isoflavon pada kedelai tahan naungan Dena 1. Oleh karena itu, perlu dikembangkan metode analisis KCKT untuk analisis isoflavon kedelai tahan naungan Dena 1 untuk mengetahui konsentrasinya dengan melakukan beberapa optimasi. Optimasi kondisi metode KCKT yang dilakukan pada penelitian ini meliputi optimasi panjang gelombang, laju alir, dan komposisi fase gerak menggunakan teknik elusi isokratik dan elusi gradien.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kondisi optimum metode KCKT pada analisis isoflavon kedelai tahan naungan Dena 1?
2. Berapa konsentrasi genistein dalam ekstrak sampel kedelai tahan naungan Dena 1 yang diukur menggunakan metode KCKT?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Melakukan optimasi kondisi KCKT pada analisis isoflavon kedelai tahan naungan Dena 1.
2. Mengetahui konsentrasi genistein dalam ekstrak sampel kedelai tahan naungan Dena 1 menggunakan metode KCKT.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan wawasan dan informasi tentang metode analisis isoflavon dalam kedelai tahan naungan Dena 1.
2. Memberikan wawasan dan informasi mengenai konsentrasi isoflavon dalam kedelai tahan naungan Dena 1.
3. Menjadi pendorong kreatifitas mahasiswa, akademisi, dan peneliti untuk mengembangkan potensi sumber daya tanaman kedelai tahan naungan, dalam rangka pengembangan ilmu, teknologi, dan kewirausahaan.

1.5 Batasan Masalah

1. Sampel kedelai yang digunakan adalah kedelai varietas tahan naugan Dena 1 dari UPBS BALITKABI Malang.
2. Jenis isoflavon yang dianalisis adalah genistein.
3. Metode analisis yang digunakan adalah metode *spiking* dan metode standar eksternal.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Kedelai (*Glycine max* (Linn.) Merrill)

Kedelai (*Glycine max* (Linn.) Merrill) bukan merupakan tanaman asli Indonesia. Pengkajian terhadap asal usul kedelai, pertama kali ditemukan dalam buku *Pen Ts'ao Kong Mu (Materia Medica)* pada era Kekaisaran Sheng-Nung pada 2838 Sebelum Masehi (SM) (Anonim 2005). Kedelai termasuk famili *Leguminosae*, subfamili *Papilionoideae*. Sejarah spesiasi kedelai cukup panjang, karena memang kedelai tergolong tanaman yang telah lama dikenal dan dibudidayakan. Tiga ilmuwan pemerhati klasifikasi kedelai yaitu Hermann (1962), Verdcourt (1966), dan Hymowitz (1970) berhasil mengklasifikasikan kedelai sebagaimana yang dianut saat ini. Awalnya Hermann (1962) menggolongkan menjadi tiga subgenus yaitu *Leptocytamus* (Benth) F.J. Herm, *Glycine* L. dan Soja (Moench) F.J. Herm. Penyempurnaan klasifikasi kedelai dilakukan oleh Verdcourt (1966) yang di antaranya mengklasifikasikannya kembali kedelai menjadi tiga subgenus yaitu: (1) *Glycine* (pengganti *Leptocytamus*), (2) *Bracteata* (pengganti *Glycine*), dan (3) *Soja*.

Klasifikasi dari kedelai (*Glycine max* (Linn.) Merrill) adalah:

Ordo	: <i>Polypetales</i>
Famili	: <i>Leguminosae</i>
Sub-famili	: <i>Papilionoideae</i>
Genus	: <i>Glycine</i>
Subgenus	: <i>Soja</i>
Spesies	: <i>max</i>

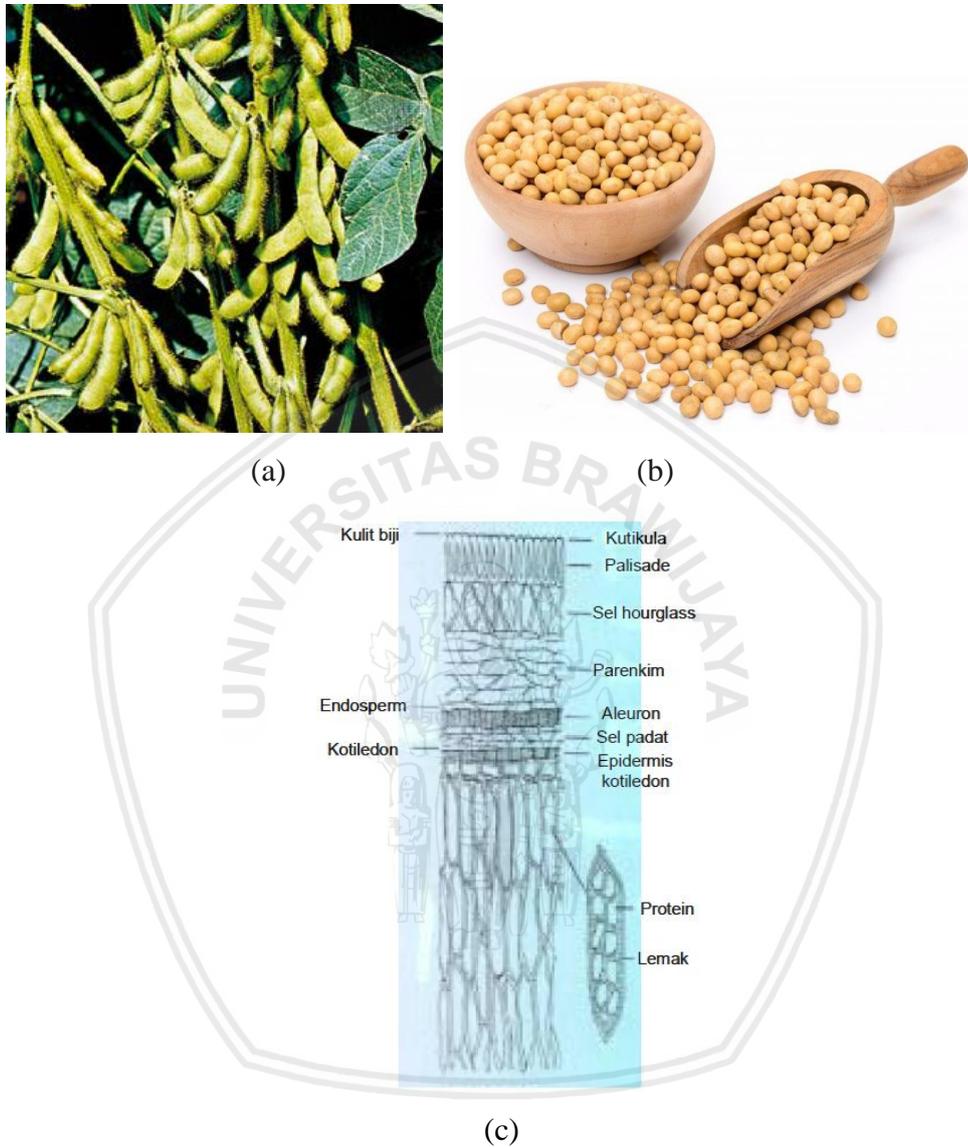
Terdapat dua spesies dasar kedelai yaitu *Glycine soja* (kedelai hitam) dan *Glycine max* (kedelai hijau, putih atau kuning). *Glycine soja* adalah tanaman yang berasal dari wilayah Asia tropis seperti Asia Tenggara, sementara *Glycine max* adalah tanaman yang berasal dari wilayah Asia subtropik seperti Jepang Selatan dan RRC. Tanaman ini kemudian menyebar ke Indonesia, Asia Tenggara, Jepang, dan Korea (DIY Agricenter, 2015).

Kedelai merupakan tanaman pangan terpenting ketiga setelah padi dan jagung. Komoditas ini kaya protein nabati yang diperlukan untuk meningkatkan gizi masyarakat, aman dikonsumsi, dan harganya murah. Konsumsi kedelai di Indonesia terus meningkat setiap tahun seiring bertambahnya jumlah penduduk, peningkatan pendapatan per kapita dan kesadaran masyarakat akan gizi makanan (Aldillah, 2014). Makanan olahan kedelai yang sering dikonsumsi masyarakat Indonesia meliputi, tempe, tahu, kecap, tauco, oncom, dan susu kedelai. Secara empiris, pertumbuhan produksi kedelai domestik lebih lambat dibandingkan permintaan. Oleh karena itu, untuk menutupi kekurangan produksi, Indonesia mengimpor kedelai rata-rata 70% per tahun (Pusdatin, 2015). Tanaman kedelai, biji kedelai, dan irisan melintang biji kedelai ditunjukkan Gambar 2.1.

Data BPS (2017) menunjukkan luas panen kedelai di Indonesia lima tahun terakhir mulai tahun 2013 hingga 2017 berturut-turut adalah 550,793 ha, 615,685 ha, 614,095 ha, 576,987 ha, dan 356,979 ha. Terdapat kenaikan luas panen dari tahun 2013 ke tahun 2014 sebesar 64,892 ha, tetapi pada tahun berikutnya mengalami penurunan, dari tahun 2014 ke tahun 2015 mengalami penurunan luas panen sebesar 1,59 ha, dari tahun 2015 ke tahun 2016 mengalami penurunan luas panen sebesar 37,108 ha, dari tahun 2016 ke tahun 2017 mengalami penurunan luas panen yang signifikan sebesar 220,008 ha. Serta, berdasarkan data BPS (2017) produktivitas kedelai di Indonesia dalam lima tahun terakhir mulai tahun 2013 hingga 2017 berturut-turut adalah 1,416 t/ha, 1,551 t/ha, 1,568 t/ha, 1,490 t/ha, 1,52 t/ha. Data tersebut menunjukkan bahwa produktivitas kedelai masih fluktuatif. Sehingga, peningkatan produksi kedelai baik dari kuantitas maupun kualitas terus diupayakan oleh pemerintah.

Lahan perkebunan di Indonesia sangat banyak dan luas, berdasarkan data Direktorat Jenderal Perkebunan, luas perkebunan kelapa sawit, karet, dan kakao merupakan tiga terbesar. Luas perkebunan kelapa sawit tiga tahun terakhir mulai tahun 2015 hingga 2017 berturut-turut adalah 11.260.277 ha, 11.914.499 ha, dan 12.307.677 ha; luas perkebunan karet berturut-turut adalah 3.621.102 ha, 3.639.092 ha, dan 3.672.123 ha; dan luas perkebunan kakao berturut-turut 1.709.284 ha, 1.701.351 ha, dan 1.691.334 ha. Sebagai upaya optimalisasi lahan dan mengatasi

penyediaan pangan manusia, kedelai dapat menjadi tanaman sela pada lahan perkebunan.



Gambar 2.1. (a) Tanaman kedelai, (b) biji kedelai, (d) irisan melintang biji kedelai (Snyder & Kwon 1987)

Tanaman kedelai memiliki syarat tumbuh sebagai berikut: (1) tumbuh pada ketinggian 0-1500 mdpl namun optimum sekitar 650 mdpl, (2) temperatur optimum 29,4°C, (3) toleransi terhadap naungan <40%, (4) mampu beradaptasi pada iklim yang luas; optimum pada tipe iklim C₁₋₂, D₁₋₃, dan E₁₋₂, (5) kedelai merupakan tanaman hari pendek (<12 jam/hari), (6) konsumsi air 64-75 cm/musim tanam atau

sepadan dengan curah-hujan 200-300 mm/musim tanam, (7) beradaptasi luas terhadap jenis tanah, namun optimal pada tanah yang subur dan gembur, pH optimal 6,2-7,0; kejenuhan Al<20%, dan (8) untuk setiap ton biji kedelai mengangkut hara lebih-kurang sebesar 66 kg N; 15,5 kg P; 39,7 kg K; 7,5 kg Mg; dan 7 kg S.

Peningkatan luas tanam dan panen kedelai dapat diupayakan melalui pemanfaatan areal di bawah tegakan, baik tegakan tanaman perkebunan, industri, hutan, maupun tanaman pangan melalui tumpangsari. Intensitas cahaya yang diterima kedelai pada tumpangsari dengan jagung berkurang sekitar 33% (Asadi *et al.* 1997). Budi daya kedelai secara tumpangsari dengan jagung ditunjukkan Gambar 2.2 dan budi daya kedelai dengan pohon jati ditunjukkan Gambar 2.3.

Sundari (2015) menyebutkan Balitbangtan melalui Balitkabi pada bulan Desember tahun 2014 telah melepas dua varietas unggul baru kedelai toleran naungan (hingga 50%) Dena 1 dan Dena 2, sesuai untuk dikembangkan di bawah tegakan tanaman perkebunan dan lingkungan agroforestri yang tanamannya masih muda (<4 tahun), maupun tumpangsari dengan tanaman pangan lain. Secara genetik, tanaman yang toleran terhadap naungan mempunyai kemampuan beradaptasi yang tinggi terhadap perubahan lingkungan cahaya. Adanya perubahan lingkungan tersebut, menyebabkan tanaman mengubah fisiologi, morfologi dan perkembangannya (Gao *et al.* 2008).



Gambar 2.2 Budi daya kedelai secara tumpangsari dengan jagung (Subandi, 2018).



Gambar 2.3 Budi daya kedelai tahan naungan dengan pohon jati
(fungsipengairan.blogspot.co.id)

Deskripsi singkat varietas kedelai tahan naungan Dena 1 adalah sebagai berikut: (1) umur tanaman + 84 hari setelah tanam dengan potensi hasil 2,89 ton/ha, (2) rata-rata hasil $\pm 1,69$ ton/ha, (3) berbiji besar dan kusam, agak tahan rebah, (4) tahan hama penghisap polong dan penyakit karat, (4) sangat rentan ulat grayak, (5) toleran naungan hingga 50%. Deskripsi singkat varietas kedelai tahan naungan Dena 2 adalah sebagai berikut: (1) umur tanaman + 84 hari setelah tanam dengan potensi hasil 2,89 ton/ha, (2) rata-rata hasil $\pm 1,34$ ton/ha, (3) berbiji besar dan mengkilap, (4) tahan rebah, (5) gak tahan hama penghisap polong dan penyakit karat dan ulat grayak, (6) tahan terhadap penyakit karat, (6) angat toleran naungan hingga 50%. Dua varietas kedelai tahan naungan Dena 1 dan Dena 2 masing-masing ditunjukkan Gambar 2.4 (a) dan (b).

2.2 Isoflavon

Metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang memiliki karakteristik khusus untuk setiap makhluk hidup dan dibentuk melalui jalur khusus dari metabolit primer seperti karbohidrat, lemak, dan asam amino. Metabolit sekunder dibentuk untuk meningkatkan pertahanan diri (Herbert, 1995), dan juga merupakan sumber senyawa yang mempunyai aktivasi farmatikal yang penting

(Rao, 2002). Tanaman menghasilkan senyawa metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan dari cekaman, biotik maupun abiotik (Setyorini, 2016).



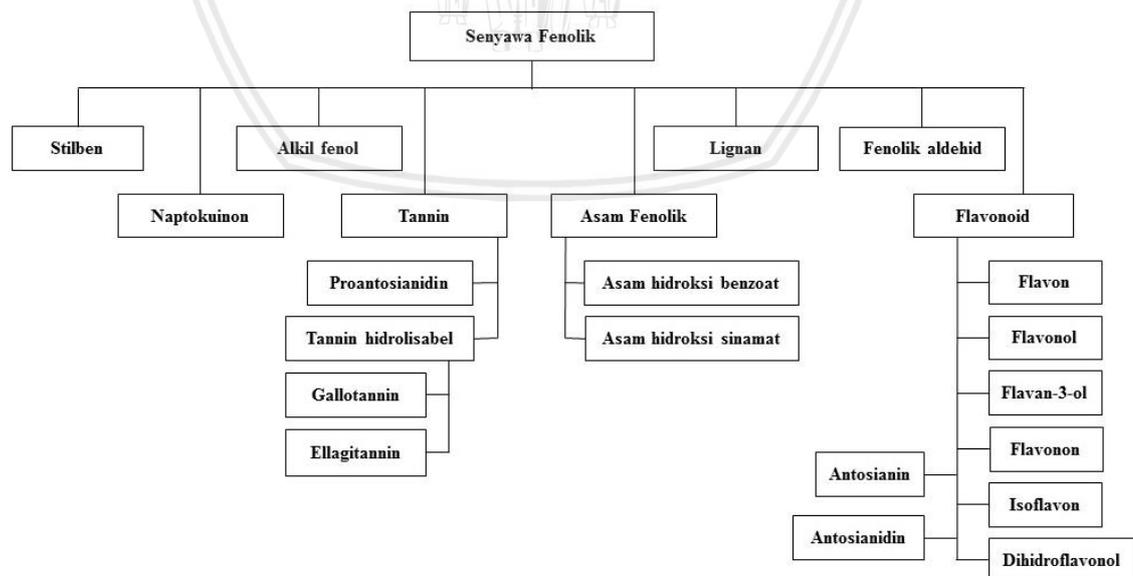
Gambar 2.4 Dua varietas kedelai tahan naungan (a) Dena 1 dan (b) Dena 2

Metabolit sekunder tanaman dibedakan menjadi tiga golongan berdasarkan sifat kimianya, salah satu di antaranya adalah senyawa golongan fenol. Tumbuhan memproduksi banyak variasi dari metabolit sekunder yang termasuk senyawa

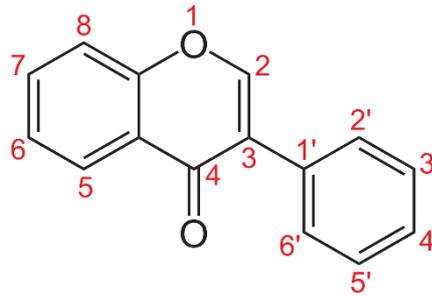
golongan fenol suatu kelompok hidroksil yang berikatan dengan cincin aromatik. Biosintesis senyawa fenol pada tumbuhan melewati jalur yang berbeda dengan metabolisme, dengan dibantu oleh adanya asam sikimit. Asam sikimit membentuk asam fenilalanin. Asam ini akan membantu biosintesis senyawa golongan fenol menjadi beberapa turunannya yaitu antosianin dan flavon, dari senyawa flavon akan terbentuk senyawa isoflavon (Taiz dan Zeigler, 2002).

2.2.1 Struktur dan Sifat Isoflavon

Isoflavon tergolong kelompok flavonoid, senyawa polifenol yang banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayur-sayuran, dan biji-bijian. Kedelai merupakan jenis kacang-kacangan yang menjadi sumber utama isoflavon. Klasifikasi senyawa fenolik dari kacang-kacangan ditunjukkan Gambar 2.5. Flavonoid merupakan kelompok terbesar penyusun senyawa fenolik. Karakteristik flavonoid terdapat pada susunan rantai karbon C6-C3-C6 dan terdiri atas struktur tiga cincin yaitu cincin A, B, dan C. Pada isoflavon cincin A dan B dihubungkan oleh tiga unit karbon, serta dihubungkan oleh oksigen pada cincin C. Senyawa isoflavon merupakan senyawa fenolik polar yang berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O- glikosidik. Struktur dasar senyawa isoflavon ditunjukkan Gambar 2.6.



Gambar 2.5 Klasifikasi senyawa fenolik kacang-kacangan (Bolling *et al.*, 2010)



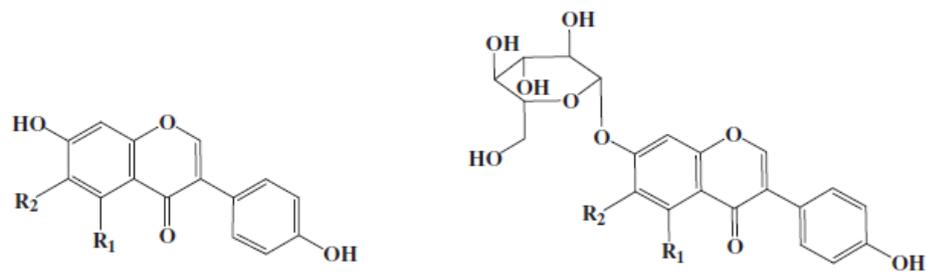
Gambar 2.6 Struktur dasar senyawa isoflavon.

Konsentrasi isoflavon dalam kedelai jumlahnya bervariasi satu sama lain (Kao, 2004) dan pada umumnya sekitar 0,1-0,4%. Konsentrasi isoflavon bervariasi dalam kedelai tergantung pada *cultivar*, letak geografis, *agronomical practice*, kondisi lingkungan dalam pertumbuhan tanaman, dan kondisi pemrosesan. Isoflavon merupakan senyawa polifenol yang ada dalam bentuk kelompok aglikon, glikosida, asetilglikosida, dan malonilglikosida. Dari keempat isoflavon tersebut, diketahui ada 12 isoflavon utama dalam kedelai, tiga aglikon genistein, daidzein, dan glisitein, turunannya 7-O- β -D-glikosida (genistin, daidzin dan glisitin), 6''-O-asetil-7-O- β -D-glikosida (asetilgenistin, asetildaidzin dan asetilglisitin) dan 6''-O-malonil-7-O- β -D-glikosida (malonilgenistin, malonildaidzin dan malonilglisitin). Struktur kimia 12 isoflavon ditunjukkan pada Gambar 2.7.

Isoflavon dapat terhidrolisis menjadi aglikon isoflavon dan glikosida. Jalur degradasi isoflavon kacang kedelai yang paling mungkin terjadi tertera pada Gambar 2.8. Aktivitas biologis tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein, daidzein, dan glisitein (Tipkanon *et al.*, 2010). Isoflavon aglikon lebih cepat dan lebih banyak diserap tubuh dibandingkan isoflavon glikosida.

2.2.3 Manfaat Isoflavon

Isoflavon adalah senyawa flavonoid yang merupakan salah satu anggota senyawa fitoestrogen (Winarsi, 2005). Fitoestrogen adalah kelompok tanaman, baik biji-bijian, kacang-kacangan, sayuran, dan buah-buahan yang memiliki sifat khasiat menyerupai hormon estrogen. Isoflavon pada kedelai pada dasarnya meliputi dua kerangka struktur yaitu aglikon dan glikosida.

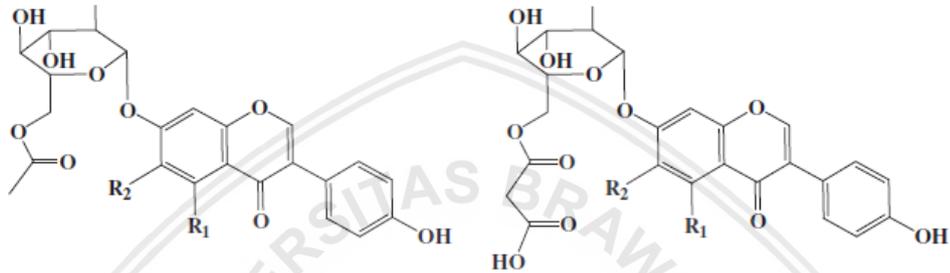


Aglikon

Daidzein $R_1=H$ $R_2=H$
 Glisitein $R_1=H$ $R_2=OCH_3$
 Genistein $R_1=OH$ $R_2=H$

7-O-β-D-Glikosida

Daidzin $R_1=H$ $R_2=H$
 Glisitin $R_1=H$ $R_2=OCH_3$
 Genistin $R_1=OH$ $R_2=H$



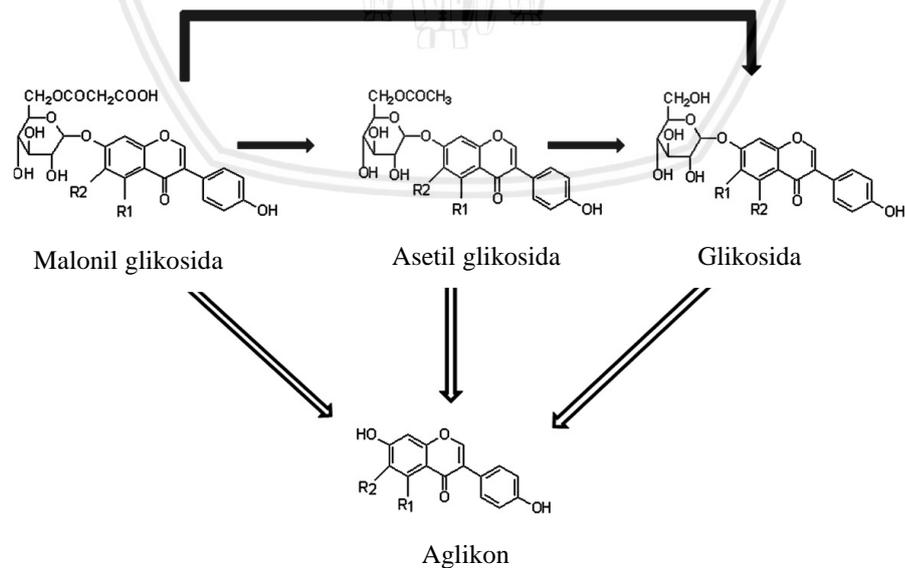
6''-O-Asetil-7-O-β-D-Glikosida

Asetil Daidzin $R_1=H$ $R_2=H$
 Asetil Glisitin $R_1=H$ $R_2=OCH_3$
 Asetil Genistin $R_1=OH$ $R_2=H$

6''-O-Malonil 7-O-β-D-Glikosida

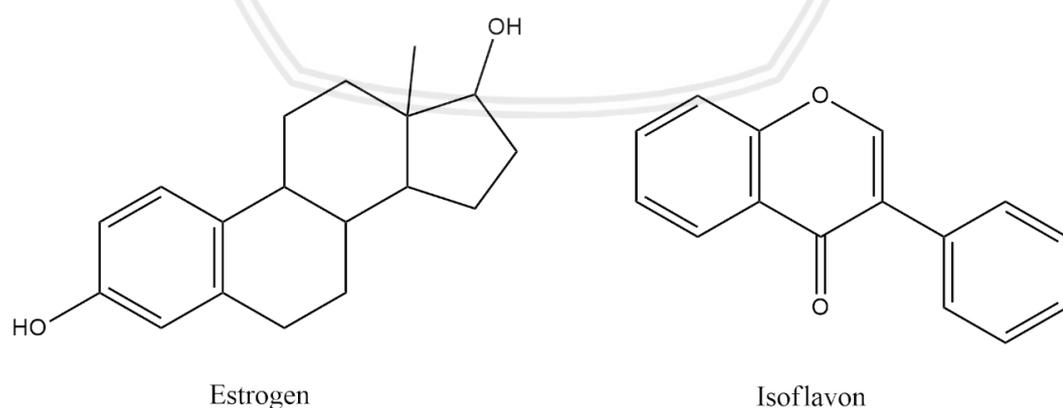
Malonil Daidzin $R_1=H$ $R_2=H$
 Malonil Glisitin $R_1=H$ $R_2=OCH_3$
 Malonil Genistin $R_1=OH$ $R_2=H$

Gambar 2.7 Struktur kimia 12 isoflavon (Shao, *et al.*, 2011)



Gambar 2.8 Jalur degradasi isoflavon kacang kedelai (Rostagno, *et al.*, 2009)

Isoflavon glikosida tidak dapat diserap oleh tubuh, agar bisa diserap maka isoflavon tersebut perlu dihidrolisis oleh enzim β -glucosidase dalam usus untuk melepaskan ikatan glikosidanya (Yamaguci *et al.*, 2005). Sebagai antioksidan, isoflavon mampu mencegah terjadinya reaksi oksidasi dan dapat meningkatkan status antioksidan tubuh. Isoflavon juga mampu bekerja seperti halnya estrogen endogen, meskipun potensinya rendah. Dengan struktur yang mirip dengan estrogen (Gambar 2.9), isoflavon juga berpotensi sebagai antikanker yang disebabkan oleh hormon estrogen. Hal ini dapat terjadi karena isoflavon dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen, membentuk ligan dan memacu kerja reseptor estrogen ketika kadar estrogen rendah, sebaliknya bersifat menghambat kerja reseptor estrogen ketika kadar estrogen tinggi. Dengan sifat fleksibel tersebut, maka isoflavon tidak berbahaya bagi orang yang mengkonsumsi. Sifat estrogenik isoflavon, juga berefek sebagai antiosteoporosis, karena isoflavon berpotensi untuk berikatan dengan reseptor estrogen dalam tulang, yang mengakibatkan asupan gizi meningkat dan memperkuat matriks tulang. Isoflavon juga meningkatkan fungsi dinding pembuluh darah supaya tidak mudah dilekati oleh ateroma, sehingga tidak terbentuk atherosklerosis, yang mampu memicu terjadinya penyakit jantung koroner. Isoflavon dan ligan juga berpengaruh pada metabolisme energi. Hal ini ditunjukkan dengan konsumsi makanan yang kaya fitoestrogen yang berefek positif bagi penderita obesitas dan diabetes.



Gambar 2.9 Kemiripan struktur estrogen dan isoflavon

2.3 Metode Ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE)

Ekstraksi adalah proses pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair sebagai *separating agent*. Metode UAE menggunakan gelombang *ultrasound* dengan bantuan pelarut organik. Pada dasarnya metode ini merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). UAE memungkinkan getaran yang sangat membantu merusak kesetimbangan campuran dan mengeluarkan analit dari matriks jaringan yang mengikat, sehingga terjadi peningkatan kelarutan senyawa dalam pelarut pengekstrak. Penggunaan temperatur yang lebih tinggi pada UAE dapat meningkatkan efisiensi proses ekstraksi. Beberapa parameter ekstraksi, hampir mirip dengan metode ekstraksi konvensional, seperti polaritas dan jumlah pelarut, massa, jenis sampel, dan waktu ekstraksi. Parameter lain yang berhubungan dengan sumber *ultrasound* seperti frekuensi dan intensitas getaran yang diaplikasikan.

Ekstraksi isoflavon dari kedelai biasanya dilakukan dengan berbagai macam pelarut (Luthria *et al.*, 2007), seperti air, etanol, metanol, dan asetonitril. Sebagian besar isoflavon adalah senyawa fenolik polar dan karenanya membutuhkan pelarut polar untuk ekstraksi yang efektif. Pengembangan metode ekstraksi menggunakan *ultrasound* yang telah dilakukan untuk ekstraksi isoflavon kedelai dan parameter yang dievaluasi tertera pada Tabel 2.1. Untuk pengembangan metode, beberapa parameter ekstraksi dipelajari termasuk pelarut, temperatur, jumlah sampel, dan waktu ekstraksi (Rostagno *et al.*, 2003). Parameter yang paling penting mempengaruhi efisiensi ekstraksi adalah pelarut pengekstraksi, temperatur, dan waktu ekstraksi. Efisiensi ekstraksi ditingkatkan dengan menggunakan *ultrasound* tetapi bergantung dengan pelarut yang digunakan. 50% etanol, 50% metanol, dan 40% asetonitril adalah pelarut yang mengekstraksi jumlah total isoflavon yang paling tinggi dengan efisiensi ekstraksi yang sama. Pelarut ekstraksi terbaik untuk setiap isoflavon bergantung pada struktur kimianya sendiri. Temperatur ekstraksi memiliki peran yang besar terhadap efisiensi ekstraksi, dengan menggunakan temperatur yang lebih tinggi secara signifikan meningkatkan jumlah isoflavon yang diuji.

Achouri *et al.*, 2005., membandingkan tiga pelarut (80% asetonitril + 0,1 N HCl, 80% metanol, 80% etanol) untuk UAE isoflavon dari matriks dua yang berbeda, *defatted soybean meal* dan *soy protein isolate*, telah diamati bahwa 80% metanol dan 80% etanol mengekstraksi isoflavon dalam jumlah yang paling tinggi untuk keduanya. Selain itu, teramati juga bahwa sonikasi selama 15 menit ekstraksinya sama banyaknya dengan ekstraksi lima kali dengan pengocokan biasa dengan waktu 10 jam, kecuali untuk asetonitril yang diasamkan. Asetonitril yang diasamkan merupakan pelarut yang paling sering digunakan dengan teknik ekstraksi konvensional dan poin bahwa pelarut ini tidak direkomendasikan digunakan ketika menggunakan *ultrasound*, karena dapat menurunkan konsentrasi isoflavon pada sampel. Perpanjangan waktu sonikasi dari 15 menit sampai 30 menit dan 60 menit, tidak meningkatkan jumlah total isoflavon yang diekstraksi.

Bajer *et al.*, 2007, membandingkan metanol, etanol, dan asetonitril untuk ekstraksi daidzein dan genistein dari tepung kedelai. Asetonitril memberikan hasil tertinggi dan lebih lanjut ditambahkan jumlah air yang berbeda (0-50%) dan 60% asetonitril memberikan hasil yang terbaik. Temperatur juga dievaluasi antara 25°C dan 80°C dengan waktu ekstraksi antara 10 menit dan 50 menit. Jumlah isoflavon tertinggi diperoleh pada 50°C selama 40 menit menggunakan *ultrasonic bath*. Penggunaan *ultrasonic homogenizer pulse generator* dievaluasi pada rentang penggunaan *ultrasonic pulses* 45-98 W (100%) selama ekstraksi dan waktu ekstraksi pada rentang 10-50 menit. Hasil ekstraksi terbaik diperoleh menggunakan 60 *ultrasonic amplitude* selama 30 menit. Pada penelitian ini informasi pengaruh kondisi ekstraksi dan data yang berkaitan tidak diberikan, hanya sedikit isoflavon yang dipelajari dan terbatas pada jenis sampel yang dievaluasi.

Pengaruh *ultrasound* pada proses ekstraksi padat-cair terhadap hasil ataupun selektifitas sangat sulit diprediksi karena interaksi banyak faktor, fase sistem (padat, cairan/zat terlarut) atau *ultrasonic reactor*. Perbedaan pengamatan jumlah air yang digunakan pada pelarut berhubungan dengan tipe sampel yang digunakan dan karakteristiknya. Kemungkinan besar bahwa jumlah air dibutuhkan untuk mencapai efisiensi ekstraksi maksimum mungkin membutuhkan pengaturan bergantung pada tipe sampel. Faktor lain juga dapat mempengaruhi *extraction dynamics* mengingat UAE dipengaruhi oleh distribusi gelombang ultrasonic di

dalam ekstraktor. Kekuatan maksimum *ultrasound* diperoleh di sekitar permukaan radiasi pada sumber ultrasonik dan menurun ketika jarak dari permukaan radiasi meningkat. Adanya partikel padatan dapat mempengaruhi profil intensitas ultrasonik, bergantung pada sifat asli sampel seperti kekerasan, kepadatan, ukuran partikel dan distribusinya sebagai zat terlarut.

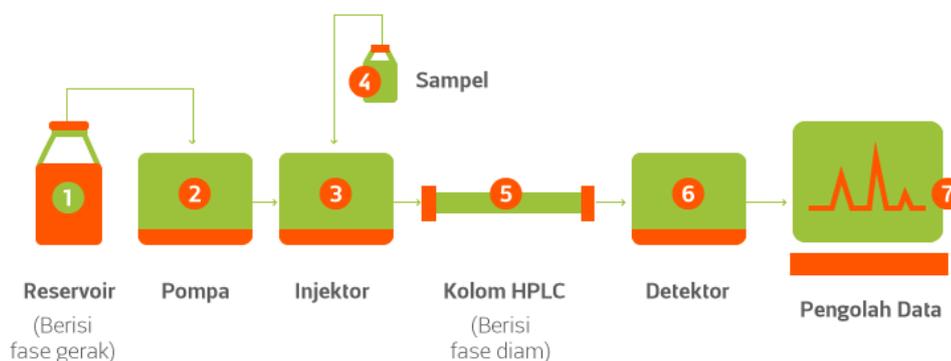
Tabel 2.1 Pengembangan metode menggunakan *ultrasound* untuk ekstraksi isoflavon kedelai dan parameter yang dievaluasi

Sampel yang digunakan untuk mengevaluasi metode	Isoflavon	Kondisi ekstraksi yang ditetapkan	Parameter yang dievaluasi	Kondisi yang dipilih	Rujukan
<i>Freeze-dried soybeans</i>	Di, Gi, Gly dan MGi	Volume pelarut: 25 mL Amplitudo getaran: 100%	Pelarut: EtOH (30-70%) MeOH (30-70%) CH ₃ CN (30-70%) Temperatur: 10 dan 60°C Jumlah sampel: 0,5-0,1 g Waktu ekstraksi: 5-30 menit <i>Ultrasound source: ultrasonic probe dan ultrasonic bath</i>	50% EtOH, 60°C, 0,1 g, 20 menit	Rostagno <i>et al.</i> , (2003)
<i>Defatted soybean meal dan soy protein</i>	Di, Gi, Gly, De, Ge, Gle, MDia, MGia dan MGlya	Sampel: 2g Volume pelarut: 10 mL Temperatur: 22°C <i>Ultrasound source: ultrasonic bath</i>	Pelarut: 80% EtOH 80% MeOH 80% CH ₃ CN (0,1N HCl) Waktu ekstraksi: 15-60 menit	80% MeOH dan 80% EtOH, 15 menit	Achouri <i>et al.</i> , (2005)
<i>Soy flour</i>	De and Ge	Sampel: 1g (<i>ultrasonic bath</i>) dan 2g (<i>ultrasonic homogenizer</i>) Volume pelarut: 25 mL (<i>ultrasonic bath</i>) dan 45 mL (<i>ultrasonic homogenizer</i>) Temperatur: Temperatur ruang (<i>ultrasonic homogenizer</i>)	Pelarut: EtOH MeOH CH ₃ CN (50-100%) Temperatur: 25-80°C (<i>ultrasonic bath</i>) Waktu ekstraksi: 10-50 menit <i>Ultrasound source: ultrasonic bath and ultrasonic homogenizer</i> Pulse generator: 45-98W Vibration amplitude: range not specified	60% CH ₃ CN <i>Ultrasound bath: 50°C, 40 min</i> <i>Ultrasound homogenizer: 30 menit, and 60% vibration amplitude, pulse generator (not specified)</i>	Bajer <i>et al.</i> , (2007)

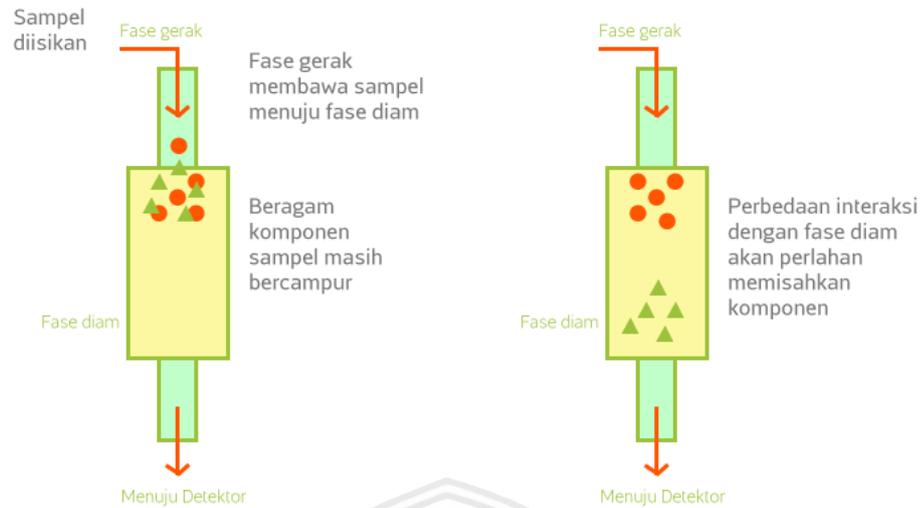
De: daidzein, Ge: genistein, Gle: glisitein, Di: daidzin, Gi: genistin, Gly: glisitin, MDi: malonil daidzin, MGi: malonil genistin, MGly: malonil glisitin, ADi: asetil daidzin, AGi: asetil genistin, AGly: asetil glisitin, MeOH: metanol, EtOH: etanol, CH₃CN: asetonitril.

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

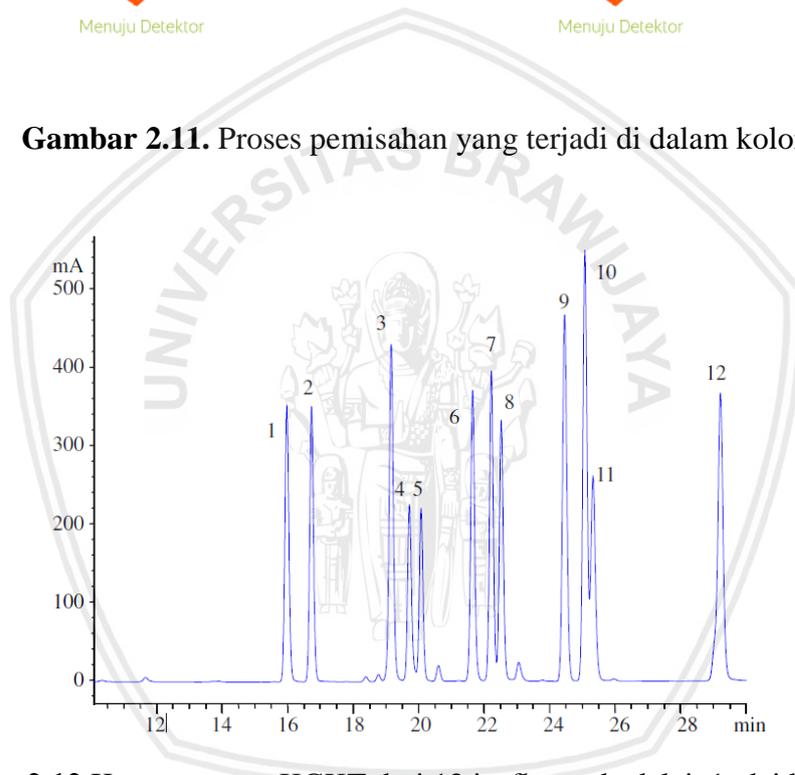
Kromatografi sebagai sistem pemisahan mempunyai rancangan yang terdiri dari fase diam dan fase gerak. KCKT sendiri merupakan salah satu kromatografi kolom. Pada KCKT, sampel dilarutkan dengan pelarut yang sesuai kemudian dialirkan menuju kolom kromatografi dengan fase gerak cair. Fase gerak sampel dialirkan melalui kolom ke detektor dengan menggunakan pompa. Sampel yang dilarutkan dalam pelarut, dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara injeksi. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran sampel. Sistem KCKT dihubungkan dengan *software* pada komputer dan dioperasikan secara *computerize*. Hasilnya berupa *peak*. Setelah itu kita mencari luasan di bawah *peak* untuk mengetahui konsentrasi analit. Skema instrumen KCKT ditunjukkan Gambar 2.10. Pemisahan terjadi karena perbedaan kekuatan interaksi antara analit dengan fase diam di dalam kolom. Proses pemisahan yang terjadi di dalam kolom ditunjukkan pada Gambar 2.11. Analit yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar dari kolom terlebih dahulu. Sebaliknya, analit yang kuat berinteraksi dengan fasa diam maka akan keluar dari kolom lebih lama. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram yang menampilkan hubungan intensitas dan waktu retensi senyawa. Contoh kromatogram KCKT dari 12 isoflavon kedelai ditunjukkan Gambar 2.12. KCKT menerapkan hasil optimasi kolom seperti dijabarkan van Deemter dengan mengatur laju alir fase geraknya sehingga pemisahan menjadi sempurna.



Gambar 2.10 Skema instrumen KCKT (*Labsatu.com*)



Gambar 2.11. Proses pemisahan yang terjadi di dalam kolom.



Gambar 2.12 Kromatogram KCKT dari 12 isoflavon kedelai. 1, daidzin; 2, glisitin; 3, genistin; 4, malonildaidzin; 5, malonilglisitin; 6, asetildaidzin; 7, asetilglisitin; 8, malonilgenistin; 9, daidzein; 10, asetilgenistin; 11, glisitein; dan 12, genistein.

2.4.1 Instrumentasi KCKT

Pada instrumen KCKT terdapat empat bagian penting yaitu fase diam, fase gerak, pompa, injektor, dan detektor. Instrumentasi KCKT yang akan digunakan pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Instrumen KCKT di Laboratorium Instrumen Kimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya

2.4.1.1 Fase Diam

Fase diam yang digunakan pada KCKT berbentuk kolom dengan isi berukuran μm atau lebih kecil dan dirancang dengan memberikan material seperti penyangga berpori dengan ukuran lebih besar (sekitar 30-50 μm). Isi kolom dibuat permanen dimana padatan penyangga, misalnya dari silika yang mempunyai gugus silanol diesterkan dengan alkohol sehingga membentuk ester silikat sebagai fase diamnya. Ada banyak tipe kolom yang telah dibuat secara komersial dengan membuat permukaan fase diam permanen dengan berbagai jenis gugus fungsi yang terikat di permukaan. Setiap instrumentasi KCKT biasanya dilengkapi dengan beberapa jenis kolom yang dapat diganti sesuai dengan kebutuhan. Pada analisis isoflavon kedelai digunakan kolom berbasis C18. Oktadesil silika (ODS atau C18) merupakan fase diam yang umum digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi.

2.4.1.2 Fase Gerak

Pemilihan fase gerak dan pelarut ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Pemilihan fase

gerak dapat dipertimbangkan berdasarkan kekuatan pelarut karena menentukan kompetisi penyerapan molekul sampel dan molekul pelarut sendiri di permukaan fase diam. Fase gerak harus memiliki kemurnian yang tinggi untuk menghindari adanya *impurities* yang akan mengganggu interpretasi pada kromatogram dan mengotori kolom. Jenis-jenis pelarut beserta nilai konstanta dielektrik (ϵ) dan momen dipol (D) tertera pada Tabel 2.2; Tabel 2.3; Tabel 2.4; dan Tabel 2.5.

Tabel 2.2 Pelarut non-polar

Pelarut	Konstanta Dielektrik (ϵ)	Momen Dipol (D)
Pentana	1,8	0,00
Heksana	1,8	0,00
Sikloheksana	2,0	0,00
Benzena	2,4	0,00
Toluena	2,3	0,36
Kloroform	4,8	1,04
Dietil eter	4,3	1,15

Tabel 2.3 Pelarut polar aprotik “borderline”

Pelarut	Konstanta Dielektrik (ϵ)	Momen Dipol (D)
Diklorometana	9,1	1,60
Tetrahidrofur (THF)	7,5	1,75
Etil asetat	6,0	1,78

Tabel 2.4 Pelarut polar aprotik

Pelarut	Konstanta Dielektrik (ϵ)	Momen Dipol (D)
Aseton	21	2,88
N,N-Dimetilformaamida (DMF)	38	3,82
Asetonitril (MeCN)	37	3,92
Dimetil sulfoksida (DMSO)	47	3,96

Tabel 2.5 Pelarut polar protik

Pelarut	Konstanta Dielektrik (ϵ)	Momen Dipol (D)
Amonia	~25	1,4
t-butanol	12	1,7
n-propanol	20	1,68
Etanol	25	1,69
Metanol	33	1,70
Asam Asetat	6,2	1,74
Air	80	1,85

2.4.1.3 Pompa

Pompa merupakan bagian yang penting dalam KCKT. Pompa yang sesuai digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai beberapa syarat, meliputi pompa harus inert terhadap fase gerak, bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit.

2.4.1.4 Injektor

Sampel dimasukkan menggunakan *loop* injektor. *Loop* sampel tersedia dengan volume mulai dari 0,5 μL ke 2 mL. Dalam injektor KCKT terdapat posisi *load* dan posisi *inject*. Dalam posisi *load* sampel diisolasi dari fase gerak dan terbuka ke atmosfer. Sebuah *syringe* digunakan untuk menempatkan sampel dalam *loop*. Setiap kelebihan sampel yang tidak dibutuhkan akan keluar dari sampel *loop* melalui jalur limbah. Setelah loading sampel, injektor dirubah ke posisi *inject*. Dalam posisi ini fase gerak diarahkan melalui *loop* sampel dan masuk ke kolom.

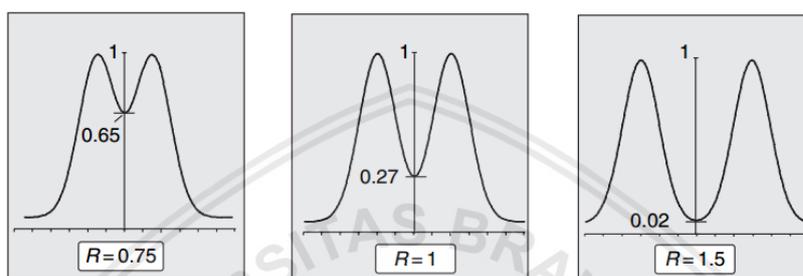
2.4.1.5 Detektor

Pada KCKT, fase gerak yang melewati detektor mempunyai kemampuan untuk menunjukkan pengukuran. Deteksi didasarkan pada sifat fisikokimia molekul sampel yang berbeda dari fase gerak. Deteksi spesies molekuler yang terelusi dari kolom dapat dilakukan menggunakan beberapa teknik, meliputi UV-Vis, *fluoresence*, *chemiluminescence*, dan *mass spectrometry* (MS). Suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut: (1) mempunyai respon terhadap analit yang cepat dan reproduibel, (2) mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada konsentrasi yang sangat kecil, (3) stabil dalam pengoperasiannya, (4) mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita, (6) signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier), (7) tidak peka terhadap perubahan temperatur dan kecepatan alir fase gerak, dan (8) waktu respon pendek sehingga tidak bergantung flow rate, mudah digunakan, tidak merusak sampel.

2.4.2 Parameter Kromatografi

2.4.2.1 Resolusi (R_s)

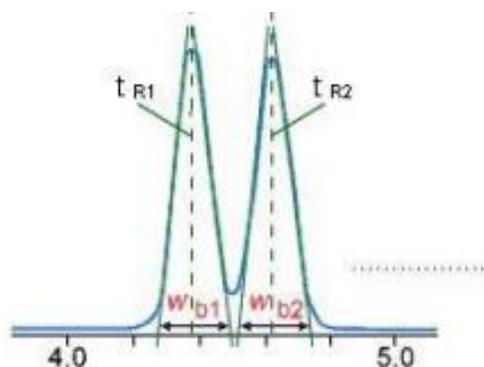
Hal yang paling penting dalam KCKT adalah untuk mendapatkan resolusi yang optimal dalam waktu yang minimum. Nilai resolusi 1,5 menunjukkan bahwa antara dua puncak komponen sampel dapat terpisah dengan baik, seperti pada Gambar 2.14 (Harvey, 2000).



Gambar 2.14 Profil kromatogram dengan beberapa nilai resolusi

Penentuan nilai resolusi menggunakan Persamaan 2.1, yang mana t_{R1} merupakan waktu yang diperlukan oleh analit ketika mulai diinjeksikan sampai keluar pertama kali dari kolom (puncak pertama). Sedangkan t_{R2} menunjukkan waktu yang diperlukan oleh analit ketika mulai diinjeksikan sampai keluar dari kolom dengan urutan kedua (puncak kedua), seperti ditunjukkan pada Gambar 2.15 (Harvey, 2000).

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_{b1} + W_{b2})/2} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad \text{Persamaan 2.1}$$

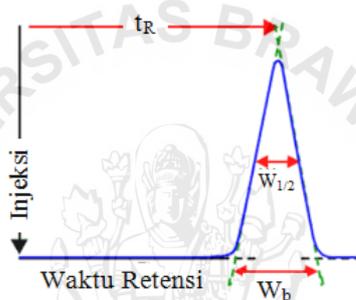


Gambar 2.15 Perhitungan resolusi (R_s) kromatogram

2.4.2.2 Jumlah Plat Teori (N)

Jumlah plat teori yang dapat dihitung menggunakan Persamaan 2.2 menunjukkan ukuran dispersi puncak pada kolom KCKT, yang mencerminkan kinerja dari kolom. Setiap plat adalah jarak dimana komponen sampel mencapai satu kesetimbangan antara fase diam dan fase gerak seperti yang ditunjukkan Gambar 2.16. Semakin banyak kesetimbangan yang terjadi, maka jumlah plat teoritis akan semakin besar, dan kualitas pemisahan akan menjadi lebih baik (Harvey, 2000).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{Persamaan 2.2}$$



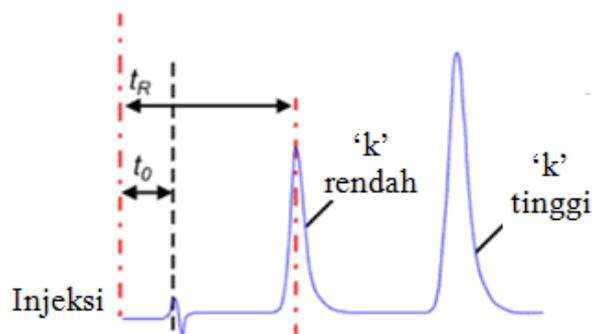
Gambar 2.16 Penentuan jumlah plat teori (N)

2.4.2.3 Faktor Kapasitas (k')

Faktor kapasitas adalah sarana untuk mengukur waktu retensi analit pada kolom kromatografi sesuai dengan Persamaan 2.3 (Harvey, 2000).

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad \text{Persamaan 2.3}$$

Nilai k' yang tinggi menunjukkan bahwa sampel sangat ditahan dan telah menghabiskan banyak waktu berinteraksi dengan fase diam, dengan ilustrasi seperti pada Gambar 2.17. Nilai k' optimum berada pada rentang 1-10, yang mana menunjukkan bahwa waktu berinteraksi sampel dengan kolom adalah maksimum. Cara untuk menentukan t₀ (*void volume*) yaitu waktu gangguan awal terlihat (puncak kaget), yang disebabkan karena perbedaan absorbansi atau indeks bias pelarut yang diinjeksikan ketika melalui detektor (Harvey, 2000).



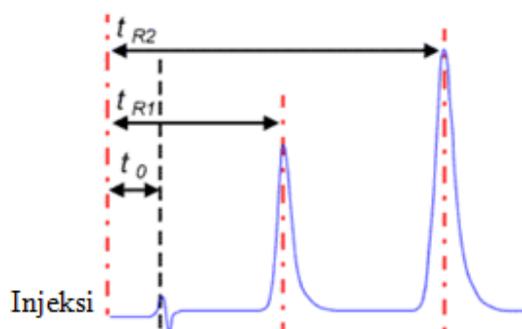
Gambar 2.17 Contoh kromatogram dengan faktor kapasitas (k') rendah dan tinggi

2.4.2.4 Selektivitas (α)

Faktor selektivitas atau faktor pemisahan adalah kemampuan dari sistem kromatografi untuk membedakan komponen-komponen kimia sampel. Faktor selektivitas biasanya diukur sebagai perbandingan antara faktor kapasitas (k') dari dua puncak yang bersangkutan sebagaimana ditunjukkan pada Persamaan 2.4 dan Gambar 2.18 (Harvey, 2000).

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{Persamaan 2.4}$$

Apabila nilai α adalah satu maka berarti dua puncak dari komponen senyawa dalam sampel tidak dapat dipisahkan, kemudian nilai α lebih besar dari satu menunjukkan bahwa komponen senyawa pertama lebih cepat terelusi dari komponen senyawa kedua. Selanjutnya, dua komponen senyawa dapat dikatakan terpisah dengan baik apabila menunjukkan nilai α yang besar (Harvey, 2000).

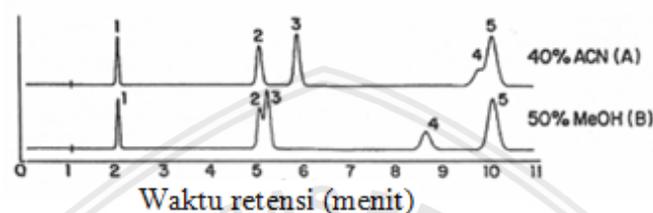


Gambar 2.18. Penentuan selektivitas (α)

Beberapa parameter yang dapat mempengaruhi selektivitas dalam metode KCKT fase terbalik yaitu (Skoog, 2004):

a) Jenis pelarut organik

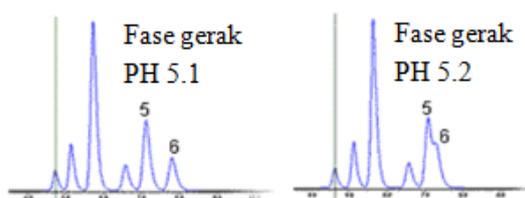
Berdasarkan Gambar 2.19 dapat dilihat bahwa meskipun waktu analisis keseluruhan adalah sama, selektivitas pemisahan antara puncak 2 dan 3 dan puncak 4 dan 5 berbeda ketika metanol diganti dengan asetonitril (Skoog, 2004).



Gambar 2.19 Pengaruh jenis pelarut organik terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik

b) pH fase gerak

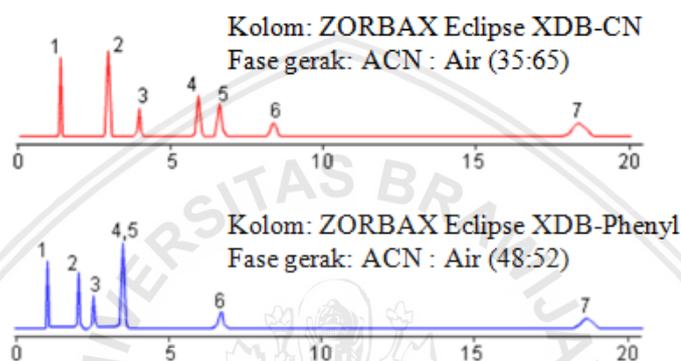
Pemisahan metode KCKT fase terbalik pada Gambar 2.20 menunjukkan bahwa, analit asam pada kolom C8 terlihat jelas bahwa pada perubahan pH 0,1 unit, dapat membawa perubahan besar dalam selektivitas antara puncak 5 dan 6. pH fase gerak biasanya menjadi parameter kunci untuk mengoptimalkan selektivitas, terutama ketika berkaitan dengan molekul analit yang memiliki kelompok terionisasi. Perubahan pH fase gerak harus dilakukan dengan hati-hati karena tidak semua kolom KCKT berbasis silika yang tahan terhadap perubahan pH secara ekstrim (Skoog, 2004).



Gambar 2.20 Pengaruh perubahan pH fase gerak terhadap selektivitas kromatogram metode KCKT fase terbalik dengan analit bersifat asam dan kolom C8

c) Jenis Fase diam

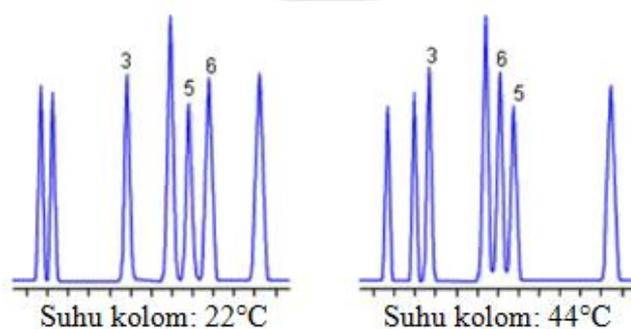
Mengubah kolom fase diam dapat mempengaruhi selektivitas dari pemisahan seperti ditunjukkan pada Gambar 2.21. Hidrofobisitas, polaritas, dan sifat dari silika, semuanya mempunyai peran penting dalam proses interaksi fisikokimia dengan analit. Memilih fase diam yang benar adalah di antara pilihan yang paling penting ketika akan melakukan pengembangan metode (Skoog, 2004).



Gambar 2.21. Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perubahan sifat kimia fase diam pada metode KCKT fase terbalik

d) Temperatur kolom

Temperatur kolom yang digunakan dalam Gambar 2.22 dapat mengubah selektivitas pemisahan yang mana puncak 5 dan 6 telah bertukar karena penyesuaian temperatur (Skoog, 2004).

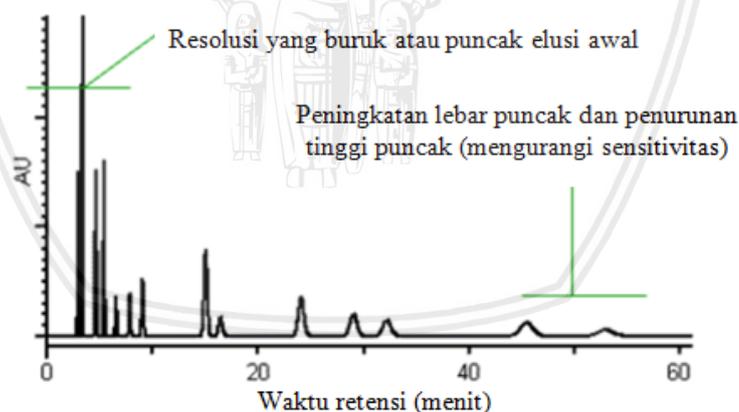


Gambar 2.22 Kromatogram yang menunjukkan perubahan selektivitas pemisahan yang disebabkan karena perbedaan temperatur kolom yang digunakan pada metode KCKT fase terbalik

2.4.3 Elusi Isokratik

Metode isokratik adalah metode elusi ketika komponen fase gerak tidak berubah selama analisis (komposisi konstan). Beberapa potensi masalah yang berhubungan dengan analisis isokratik sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.23, yaitu (Harvey, 2000):

- Ketika beberapa analit dengan polaritas yang luas, dimungkinkan sulit untuk dapat dipertahankan berinteraksi di dalam kolom dan resolusi antar puncak kromatogram sangat kecil ($< 1,5$) atau dekat dengan puncak kaget (t_0).
- Komponen analit lain yang mungkin lebih bersifat hidrofobik akan menunjukkan waktu retensi yang lama (yang mengakibatkan nilai k' tidak optimum: > 10)
- Beberapa proses *band-broadening*, mengakibatkan terjadinya pelebaran puncak atau penurunan tinggi puncak (mengurangi sensitivitas).
- Ada kemungkinan bahwa beberapa komponen akan irreversibel terabsorpsi pada kolom (komponen yang sangat dipertahankan) dan menyebabkan kontaminasi kolom.

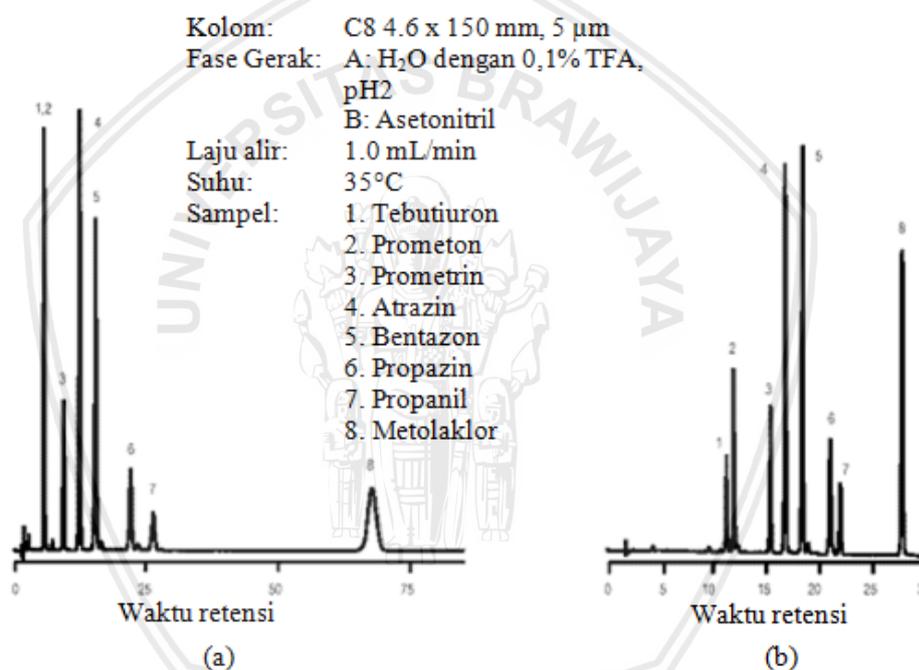


Gambar 2.23 Profil kromatogram yang menunjukkan potensi masalah yang dihadapi dengan metode elusi isokratik KCKT

2.4.4 Elusi Gradien

Metode gradien adalah metode elusi dengan komposisi fase gerak diubah selama proses analisis (biasanya dengan meningkatkan jumlah pelarut organik). Adapun tahapan untuk elusi gradien adalah sebagai berikut (Harvey, 2000):

- Komposisi awal dipilih dengan komposisi yang dapat mempertahankan analit dengan kuat di dalam kolom, sehingga dapat menghindari adanya puncak yang keluar pada daerah puncak kaget (t_0).
- Kekuatan elusi kemudian ditingkatkan dengan cara yang telah ditentukan untuk mengelusi senyawa analit dengan resolusi yang optimum.
- Komposisi fase gerak akhir, dipilih untuk memastikan semua senyawa dapat terelusi dari kolom dengan waktu retensi yang wajar (komposisi pelarut organik ditingkatkan), sehingga dapat sekaligus mencuci kolom dari komponen yang berpotensi sebagai pencemar.



Gambar 2.24 Kromatogram Hasil Pemisahan Herbisida pada kolom C8 (a) sistem elusi isokratik air : asetonitril (70:30), (b) sistem elusi gradien (20-60% asetonitril) untuk memisahkan sampel dengan tingkat polaritas yang bervariasi

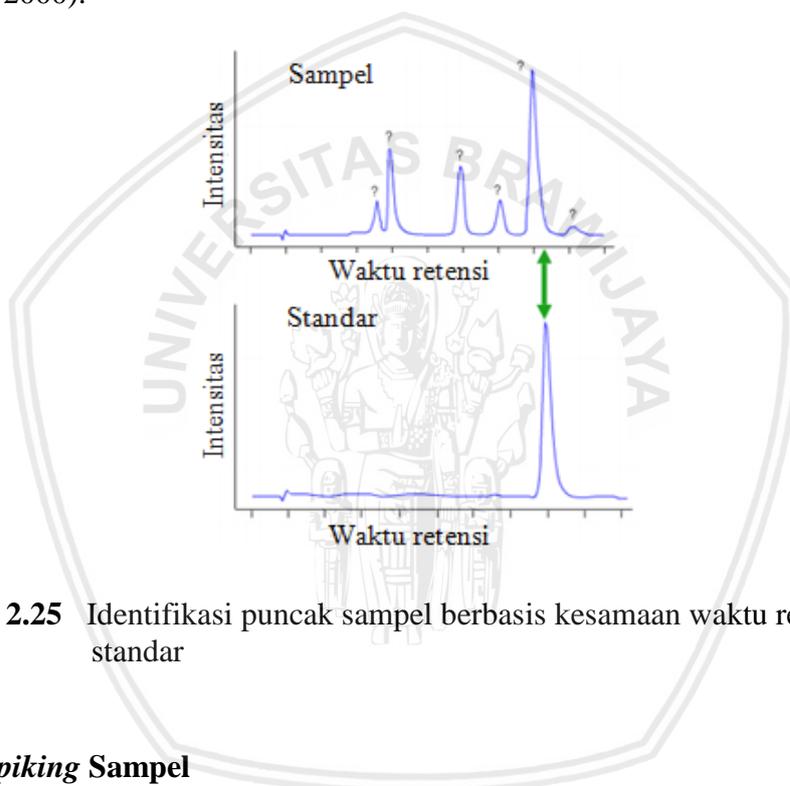
Gambar 2.24 menunjukkan hasil pemisahan herbisida dengan menggunakan sistem elusi gradien membutuhkan waktu retensi yang lebih cepat dan sensitivitas yang lebih bagus dibandingkan dengan menggunakan sistem elusi isokratik.

2.5 Metode Analisis Kualitatif dan Kuantitatif KCKT

2.5.1 Analisis Kualitatif

2.5.1.1 Identifikasi Puncak Berdasarkan Waktu Retensi Standar

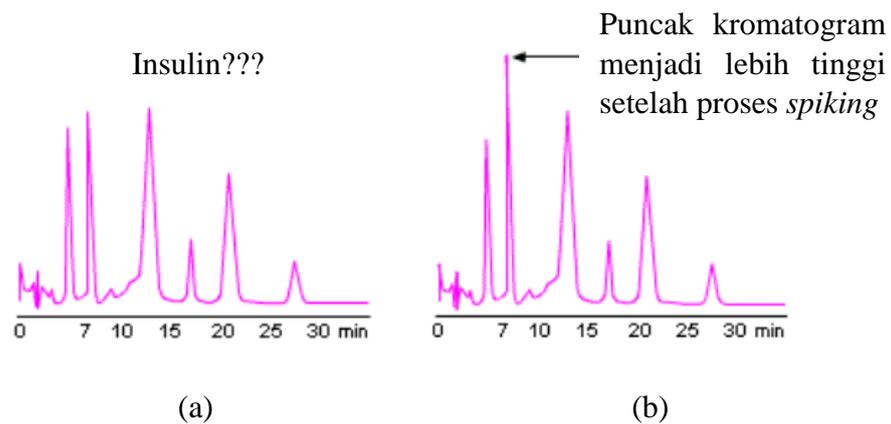
Cara yang paling mudah untuk menetapkan puncak kromatogram dalam larutan sampel adalah dengan menginjeksikan larutan standar dalam kondisi pemisahan yang sama. Kemudian membandingkan waktu retensi larutan standar yang sesuai dengan waktu retensi larutan sampel seperti pada Gambar 2.25 (Harvey, 2000).



Gambar 2.25 Identifikasi puncak sampel berbasis kesamaan waktu retensi zat standar

2.5.1.2 Spiking Sampel

Teknik *spiking* sampel melibatkan penambahan standar referensi yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam larutan sampel, untuk mengkonfirmasi identitas salah satu puncak komponen sampel. Pada Gambar 2.26, salah satu puncak pada sampel diduga adalah insulin. Kemudian sampel ditambah dengan standar insulin dengan konsentrasi yang diperkirakan sama dengan dugaan konsentrasi insulin dalam sampel. Jika salah satu puncak dalam kromatogram sampel (dengan waktu retensi yang sama dengan waktu retensi standar insulin) bertambah tinggi, maka puncak tersebut adalah benar sebagai puncak dari insulin (Harvey, 2000).



Gambar 2.26. (a) Kromatogram sampel; (b) kromatogram hasil *spiking* sampel

2.5.1.3 Menggunakan detektor selektif dan spektrometer

Penggunaan detektor selektif dan spektrometer dapat meningkatkan analisis kualitatif. Sistem detektor seperti UV-Vis atau *mass spectrometry* (MS) dapat merekam spektrum untuk masing-masing puncak dalam kromatogram sampel (Harvey, 2000).

2.5.2 Analisis Kuantitatif

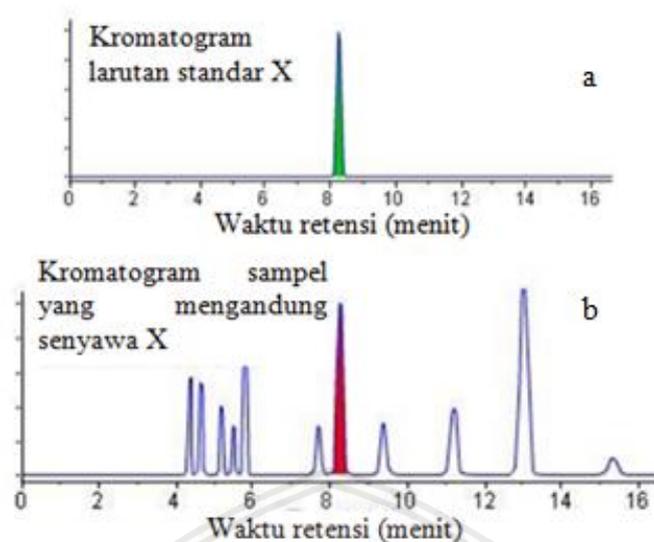
2.5.2.1 Standar Eksternal

Standar eksternal adalah prosedur kuantifikasi yang dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dan larutan sampel pada kondisi pemisahan yang sama seperti pada Gambar 2.27 kemudian dihitung faktor respon dari standar eksternal dengan menggunakan persamaan 2.5 (Harvey, 2000).

$$\text{Faktor respon} = \frac{\text{Area}_{\text{standar}}}{\text{Konsentrasi}_{\text{standar}}} \quad \text{Persamaan 2.5}$$

Setelah diketahui nilai faktor respon, selanjutnya dapat dihitung konsentrasi analit dalam larutan sampel sesuai dengan Persamaan 2.6 (Harvey, 2000).

$$\text{Konsentrasi analit} = \frac{\text{Area}_{\text{analit dalam sampel}}}{\text{Faktor respon}} \quad \text{Persamaan 2.6}$$



Gambar 2.27 (a) Kromatogram standar eksternal, (b) kromatogram sampel

2.5.2.2 Spiking

Selain digunakan dalam analisis kualitatif, metode spiking juga dapat digunakan dalam analisis kuantitatif pada KCKT dengan profil kromatogram seperti pada Gambar 2.28. Penentuan konsentrasi analit dalam sampel dengan metode *spiking* dihitung menggunakan persamaan 2.7 (Harris, D.C., 1948).

$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{std}} \quad \text{Persamaan 2.7}$$

Simbol C_s menunjukkan konsentrasi analit dalam sampel dan C_{std} adalah konsentrasi standar yang ditambahkan dalam sampel, kemudian A_s adalah luas area kromatogram analit dalam sampel dan A_{std} merupakan luas area zat standar. Luas area analit (A_s) akan bertambah setelah penambahan zat standar, sehingga dapat diketahui bahwa luas area zat standar (A_{std}) merupakan hasil pengurangan dari luas area total kromatogram analit dalam sampel yang sudah ditambah (*dispike*) dengan larutan standar (A_{total}) dengan A_s , sebagaimana ditunjukkan pada Persamaan 2.8.

$$A_{std} = A_{total} - A_s \quad \text{Persamaan 2.8}$$

Sehingga, dari Persamaan 2.7 dan Persamaan 2.8 dapat diturunkan menjadi Persamaan 2.9 berikut:

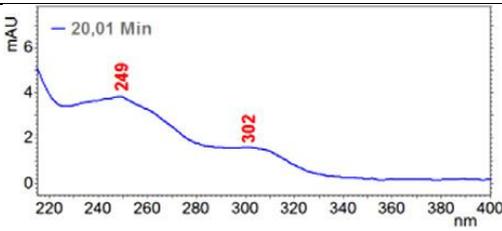
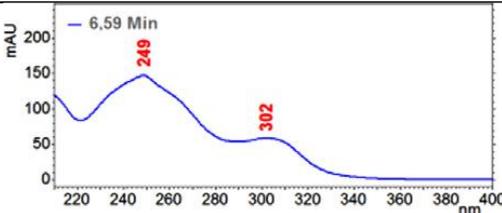
$$\frac{C_s}{C_{std}} = \frac{A_s}{A_{total} - A_s}$$

$$C_s = C_{std} \times \frac{A_s}{A_{total} - A_s} \quad \text{Persamaan 2.9}$$

2.6 Analisis Isoflavon Menggunakan KCKT

Metode analisis yang paling umum digunakan untuk mengkuantifikasi isoflavon dalam sampel padatan tanpa diragukan lagi adalah KCKT menggunakan kolom C18 dengan fase gerak air, metanol, etanol atau asetonitril yang mengandung sedikit asam sebagai fase geraknya (Rostagno *et al.*, 2009). Pada analisis isoflavon kedelai memerlukan data teoritis untuk memastikan keberadaan isoflavon sehingga dapat dibandingkan dengan hasil analisis. Tabel 2.6 menunjukkan data untuk konfirmasi identifikasi senyawa isoflavone. Metode analisis konsentrasi isoflavon menggunakan KCKT yang pernah dilakukan yaitu oleh Jun-ming *et al.* (2011) dalam penentuan 12 komponen isoflavon dalam biji kedelai menggunakan KCKT dengan detektor UV pada panjang gelombang 260 nm. Hasil penelitian Luthria *et al.* (2007) diperoleh total konsentrasi isoflavon dari serbuk kedelai non lemak 3.2 ± 0.01 mg/g dengan konsentrasi daidzin 0,95 mg/g, genistin 0,78 mg/g, genistein 0,04 mg/g dan daidzein 0,02 mg/g. Penelitian yang berkaitan dengan analisis isoflavon menggunakan KCKT telah dilakukan oleh beberapa peneliti, Tabel 2.7 menunjukkan kondisi KCKT yang digunakan beberapa peneliti.

Tabel 2.6 Data untuk konfirmasi identifikasi beberapa senyawa isoflavon

Isoflavon	Spektrum UV-Vis	λ (nm)
Daidzein		249
Daidzin		249

Tabel 2.6 Data untuk konfirmasi identifikasi beberapa senyawa isoflavon
(Lanjutan)

Isoflavon	Spektrum UV-Vis	λ (nm)
Malonildaidzin		249
Genistein		260
Genistin		260
Malonilgenistin		260
Glisitein		260
Glisitin		260

Tabel 2.7 Kondisi kromatografi yang digunakan dalam pemisahan isoflavon kedelai

Penulis	Metode KCKT					
	Fase gerak	Volume sampel	Laju alir (mL/min)	Kolom	Detektor	Temp eratur
Szymczak., <i>et al.</i>	Asetonitril dan air dengan 0,025% trifluoroacetic acid.	-	1,5	RP-C18 (25 cm x 4.0 mm i.d., 5 mm)	Spektrofotometri (DAD) 200-400 nm	30°C
Jun-ming., <i>et al.</i>	Asetonitril 13-30% mengandung 0,1% asam asetat.	10 µL	1	C18 (250 × 4.6 mm)	UV 260 nm	35°C
Jiao., <i>et al.</i>	1.0% asam asetat dan asetonitril.	-	-	C18 (250 x 4.6 mm, i.d., 5 µm)	UV 254 nm	-
Shao., <i>et al.</i>	Asetonitril dan 2% asam asetat	10 µL	1	C18 (250 × 4.6 mm)	DAD 260 nm	-
Achouri, <i>et al.</i>	Asetonitril dan 0,2% trifluoroacetic acid.	10 µL	1	C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm)	UV 254 nm	35°C
Ha TJ., <i>et al.</i>	Asetonitril yang mengandung 0,1% asam asetat	20 µL	1	RP-18 (125 x 4 mm i.d., 5 µm)	UV 260 nm	-
Lee., <i>et al.</i>	0,1% asam asetat glasial dalam air dan 0,1% asam asetat glasial dalam asetonitril	20 µL	1	C18 (250 × 4.6 mm i.d.)	UV	-
Hutabarat., <i>et al.</i>	Asetonitril : air (33:67, v/v)	-	-	RP-18 (150 x 3.9 mm i.d, 4 µm)	UV 200-400 nm	-

BAB III

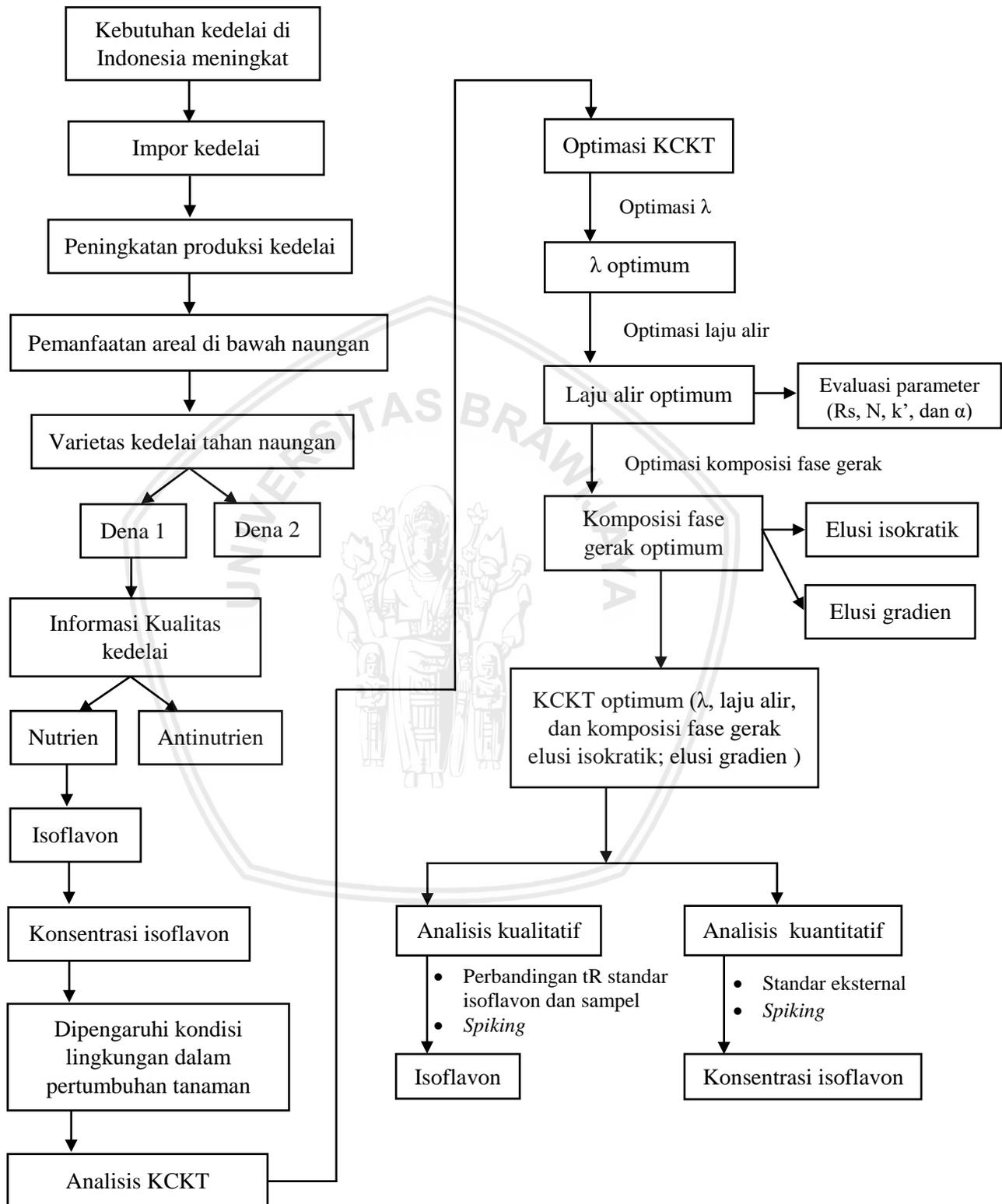
KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep

Konsumsi kedelai di Indonesia terus meningkat setiap tahun tetapi produktivitas kedelai masih fluktuatif, sehingga untuk menutup kekurangan produksi Indonesia mengimpor kedelai rata-rata 70% per tahun. Peningkatan produksi kedelai diupayakan melalui pemanfaatan areal di bawah naungan. Hasil pengembangan varietas kedelai yang dapat ditanam pada areal di bawah naungan salah satunya adalah kedelai Dena 1. Untuk mengetahui kualitas kedelai Dena 1 ditentukan dengan penanda penting yaitu kandungan nutriennya. Isoflavon adalah nutrien utama yang ada dalam kedelai. Konsentrasi isoflavon dalam kedelai bervariasi tergantung pada kondisi lingkungan dalam pertumbuhan tanaman. Sehingga dibutuhkan metode analisis untuk mengetahui konsentrasi isoflavon dalam kedelai Dena 1.

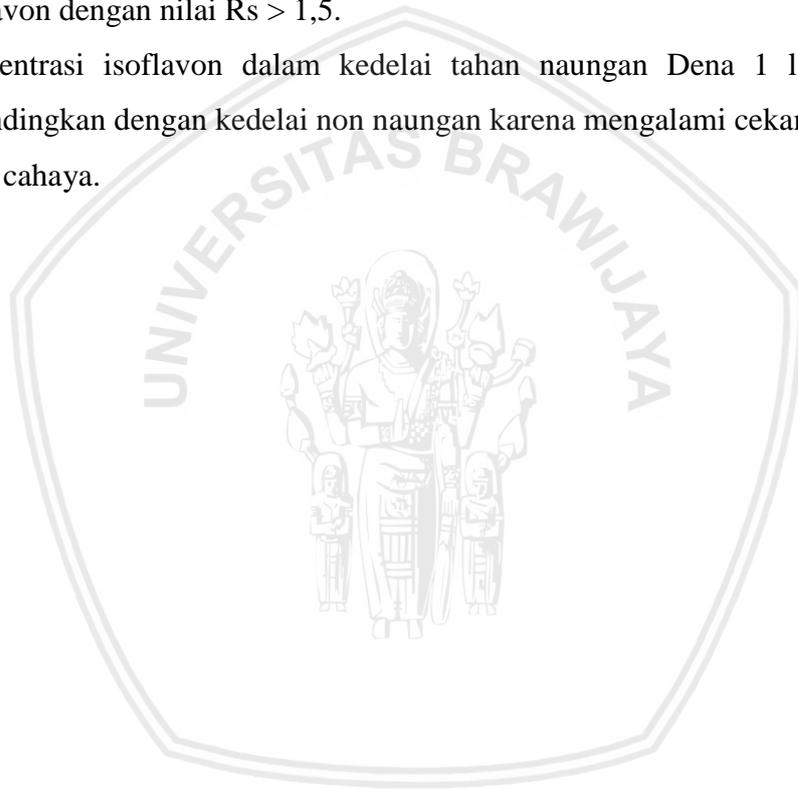
Ekstraksi isoflavon dari kedelai Dena 1 dilakukan dengan menggunakan metode UAE pelarut metanol 80%. Senyawa isoflavon merupakan senyawa fenolik polar yang berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O-glikosidik. Sehingga ekstraksi menggunakan pelarut polar memiliki tujuan untuk memaksimalkan hasil ekstraksi. Metode analisis yang digunakan untuk identifikasi dan mengkuantifikasi isoflavon kedelai Dena 1 adalah KCKT, sehingga diperlukan prosedur optimasi kondisi KCKT. Optimasi kondisi KCKT menggunakan fase diam C18 dan fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat. Optimasi metode KCKT yang dilakukan meliputi optimasi panjang gelombang UV berdasarkan data hasil *scanning* λ_{maks} standar genistein dan ekstrak Dena 1, optimasi laju alir, dan komposisi fase gerak menggunakan teknik elusi isokratik dan elusi gradien. Pemisahan isoflavon dalam kolom C18 adalah berbasis pada interaksi isoflavon dalam bentuk molekul asamnya yang bersifat non polar dengan kolom non polar C18 dan pengaturan komposisi asetonitril : 0,1% asam asetat. Dari hasil optimasi tersebut diperoleh kondisi optimum yang selanjutnya digunakan untuk analisis kualitatif (membandingkan waktu retensi puncak standar dan sampel; *spiking*) dan kuantitatif (metode standar eksternal; *spiking*) isoflavon kedelai Dena 1.

3.2 Skema Konsep Penelitian



3.3 Hipotesis Penelitian

1. Panjang gelombang deteksi UV optimum menghasilkan sensitivitas pengukuran yang tinggi sehingga mampu mendeteksi senyawa isoflavon yang terdapat dalam kedelai Dena 1.
2. Semakin cepat laju alir maka waktu retensi senyawa isoflavon semakin cepat, sedangkan semakin lambat laju alir maka waktu retensinya akan semakin lambat.
3. Optimasi komposisi fase gerak dapat meningkatkan pemisahan senyawa isoflavon dengan nilai $R_s > 1,5$.
4. Konsentrasi isoflavon dalam kedelai tahan naungan Dena 1 lebih tinggi dibandingkan dengan kedelai non naungan karena mengalami cekaman abiotik yaitu cahaya.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2018 – Juni 2019.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, labu takar, corong gelas, gelas beaker, cawan penumbuk (mortar), sonikator, pengaduk kaca, pipet mikro, penyaring ukuran 100 *mesh*, *rotary evaporator*, sentrifuge, labu takar, gelas arloji, botol semprot, *microfilter* Whatman ukuran 0,45 mm, mesin *blender* Panasonic MX-GX1061, serta perangkat KCKT (Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japan) yang terdiri dari *prominence degassing unit* (DGU-20A_{5R}), *prominence liquid chromatography* (LC-20AD), *prominence communication bus module* (CBM-20A), *prominence UV/VIS detector* (SPD-20A), kolom C18 (Fortis Technology, UK).

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai varietas tahan naungan Dena 1 dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi). Larutan yang digunakan untuk ekstraksi adalah metanol 80% HPLC *grade* (Merck, Germany). Fase gerak yang digunakan dalam proses analisis isoflavon dari kacang kedelai tahan naungan pada KCKT yaitu asetonitril (Fulltime, China) dan 0,1% asam asetat (Merck, Germany).

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel kedelai Dena 1
2. Analisa kadar air
3. Ekstraksi sampel kedelai Dena 1
4. Preparasi larutan standar genistein
5. Optimasi metode KCKT pada analisis isoflavon kedelai Dena 1
 - a. Penentuan panjang gelombang optimum
 - b. Penentuan laju alir optimum
 - c. Penentuan komposisi fase gerak asetonitril:0,1% asam asetat optimum teknik elusi isokratik dan elusi gradien.
6. Penentuan keberadaan isoflavon genistein dalam ekstrak kedelai Dena 1 dengan metode perbandingan data waktu retensi (standar dan sampel) dan metode *spiking*.
7. Pengukuran konsentrasi isoflavon dalam ekstrak kedelai Dena 1 dengan metode standar eksternal dan *spiking*.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Preparasi Sampel Kedelai Dena 1

Kedelai varietas tahan naungan Dena 1 diperoleh dari UPBS Balitkabi. Biji kedelai Dena 1 dikemas secara tertutup dalam plastik 1 kg dan disimpan di lemari pendingin. Setelah kedelai Dena 1 didapatkan kemudian dibiarkan beberapa saat pada temperatur ruangan, selanjutnya biji kedelai Dena 1 digiling menjadi bubuk. Penggilingan biji kedelai Dena 1 dilakukan di Laboratorium Kimia Pangan Balitkabi dengan menggunakan mesin *blender* Panasonic MX-GX1061 pada tanggal 24 Juli 2018. Setelah biji kedelai Dena 1 digiling sampai halus kemudian dimasukkan ke wadah plastik klip. Sebelum diekstraksi sampel bubuk kedelai diayak menggunakan ayakan ukuran 100 *mesh*, selanjutnya sampel siap digunakan. Prosedur preparasi sampel kedelai Dena 1 ditunjukkan pada Lampiran 1.

4.4.2 Analisa Kadar Air

Setelah sampel kedelai Dena I dipreparasi kemudian dianalisis kadar airnya sesuai prosedur SNI 01-2891-1992. Prinsip kerja analisis kadar air adalah menghilangkan air pada pemanasan 105°C yang dianggap sebagai kadar yang terdapat pada contoh. Prosedur analisa kadar air ditunjukkan pada Lampiran 2.

4.4.3 Ekstraksi Sampel Kedelai Dena 1 Menggunakan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE)

Bubuk kedelai Dena 1 ukuran 100 *mesh* ditimbang sebanyak 1 g. 1 g sampel bubuk kedelai Dena 1 diekstraksi dengan pelarut 25 mL metanol 80% di dalam bejana ultrasonik selama 1 jam kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 5000 rpm untuk memisahkan filtrat dan residu, dimana filtrat adalah sampel yang dianalisis. Sentrifugasi dilakukan karena menurut penelitian Schwartz., *et al* 2009, menyarankan untuk menghindari filtrasi dan menghilangkan partikel padatan dengan sentrifugasi untuk mencegah hilangnya analit. Filtrat yang diperoleh dipekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental methanol kedelai Dena 1, kemudian dipindahkan ke dalam botol vial dan disimpan di lemari pendingin. Sebelum diinjeksikan pada KCKT dilakukan penyaringan ekstrak menggunakan *microfilter* Whatman 0,45 μm . Selanjutnya ekstrak tersebut siap dianalisis menggunakan KCKT. Prosedur ekstraksi kedelai Dena I ditunjukkan pada Lampiran 3.

4.4.4 Pembuatan Larutan Standar Genistein 600 ppm

Pembuatan larutan standar dilakukan dengan membuat larutan induk standar genistein 600 ppm. Standar genistein yang digunakan pada penelitian ini adalah standar genistein sediaan farmasi. Berikut perhitungan konsentrasi standar genistein sediaan farmasi (15 mg/g tablet):

$$\text{dalam 1 L} \rightarrow \frac{1000}{25} \times 15 \text{ mg} = 600 \text{ mg/L (600 ppm)}$$

Prosedur pembuatan larutan standar genistein 600 ppm ditunjukkan pada Lampiran 4.

4.4.4.1 Standar Genistein 90 ppm

Pembuatan larutan standar genistein konsentrasi 90 ppm dilakukan melalui proses pengenceran dari larutan induk standar genistein 600 ppm.

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 600 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 90 \text{ ppm} \cdot 2 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,3 \text{ mL} \\ &= 300 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar genistein 90 ppm dilakukan dengan memipet 300 μL larutan induk menggunakan pipet mikro 10-1000 μL dan memasukkannya ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan pelarut metanol 80% dan menghomogenkannya.

4.4.4.2 Standar Genistein 20 ppm

Pembuatan larutan standar genistein konsentrasi 20 ppm dilakukan melalui proses pengenceran dari larutan induk standar genistein 600 ppm.

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 600 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 20 \text{ ppm} \cdot 1 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,33 \text{ mL} \\ &= 330 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar genistein 20 ppm dilakukan dengan memipet 330 μL larutan induk menggunakan pipet mikro 10-1000 μL dan memasukkannya ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan pelarut metanol 80% dan menghomogenkannya.

4.4.4.3 Standar Genistein 18 ppm

Pembuatan larutan standar genistein konsentrasi 18 ppm dilakukan melalui proses pengenceran dari larutan induk standar genistein 600 ppm.

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 600 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 18 \text{ ppm} \cdot 1 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,3 \text{ mL} \\ &= 300 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan standar genistein 18 ppm dilakukan dengan memipet 300 μL larutan induk menggunakan pipet mikro 10-1000 μL dan memasukkannya ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan pelarut metanol 80% dan menghomogenkannya.

4.4.5 Optimasi Metode KCKT pada Analisis Isoflavon Kedelai Dena 1

4.4.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum

Penentuan panjang gelombang optimum dilakukan dengan kondisi analisis metode KCKT sebagai berikut,

Temperatur	: Temperatur ruang
Kolom	: C18
Laju alir	: 1 mL/menit
Volume injeksi sampel	: 2 μL
Detektor	: UV 249; 250; 254; 257; 260; 262 nm
Fase gerak	: Asetonitril : 0,1 % asam asetat (20:80)
Teknik elusi	: Isokratik

Kemudian ditentukan panjang gelombang yang optimum dari hasil analisis yang ditunjukkan dengan intensitas optimum (% *height*) dari kromatogram ekstrak kedelai Dena 1.

4.4.5.2 Penentuan Laju Alir Optimum

Ekstrak kedelai Dena 1 yang telah dipreparasi selanjutnya diinjeksikan pada KCKT dengan kondisi analisis metode KCKT yang sama seperti **4.4.5.1**, dengan panjang gelombang yang ditetapkan (kondisi optimum), tetapi laju alir yang digunakan divariasikan yaitu 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 mL/min. Selanjutnya ditentukan laju alir optimum yang ditunjukkan dengan nilai R_s , N , k' , dan α berdasarkan kromatogram hasil analisis.

4.4.5.3 Penentuan Komposisi Fase Gerak Optimum

Penentuan komposisi fase gerak optimum dilakukan dengan kondisi analisis metode KCKT yang sama seperti **4.4.5.2**, dengan panjang gelombang dan laju alir yang sudah terpilih (kondisi optimum) dan yang dibuat berbeda adalah komposisi fase gerak

dan teknik elusi yang digunakan. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril dan 0,1% asam asetat, asam asetat digunakan untuk mengasamkan fase gerak. Pada teknik elusi isokratik fase gerak yang digunakan adalah asetonitril : 0,1% asam asetat dengan perbandingan 10:90 – 90:10, sedangkan pada teknik elusi gradien program gradien ditunjukkan pada Tabel 4.1. Kemudian ditentukan komposisi fase gerak dan teknik elusi yang optimum berdasarkan hasil analisis.

Tabel 4.1 Komposisi fase gerak pada program elusi gradien

Program Elusi Gradien	Komposisi Fase Gerak (%)		Waktu (menit)
	Asetonitril (A)	0,1% Asam Asetat (B)	
GE-1	15	85	0 - 5
	20	80	5 - 15
	25	75	15 - 40
GE-2	15	85	0 - 5
	20	80	5 - 10
	25	75	10 - 15
	30	70	15 - 40
GE-3	15	85	0 - 3
	20	80	3 - 12
	25	75	12 - 17
	30	70	17 - 23
	25	75	23 - 30
	20	80	30 - 40

4.5 Analisis Kualitatif Isoflavon dalam Kedelai Tahan Naungan Dena 1

Prosedur ini bertujuan untuk mengetahui waktu retensi analit dalam ekstrak kedelai Dena 1 yang bersesuaian dengan waktu retensi larutan standar isoflavon yang digunakan, pada penelitian ini digunakan standar genistein. Penentuan keberadaan isoflavon dalam kedelai Dena 1 dilakukan dengan dua metode yaitu perbandingan waktu retensi standar genistein dan sampel; dan metode *spiking*. Pada metode perbandingan data waktu retensi standar genistein dan sampel: 2 μ L standar genistein 90 ppm dan 2 μ L ekstrak kedelai Dena 1 diinjeksikan pada KCKT dengan kondisi analisis optimum yang diperoleh. Selanjutnya, membandingkan hasil kromatogram sampel kedelai Dena 1 dengan kromatogram larutan standar genistein. Apabila pada

kromatogram sampel kedelai Dena 1 muncul puncak pada waktu retensi yang sama dengan waktu retensi puncak kromatogram larutan standar genistein, maka dapat dinyatakan bahwa terdapat genistein dalam ekstrak kedelai Dena 1.

Selain itu, untuk memaksimalkan hasil analisis kualitatif yang diperoleh, maka dilakukan metode kedua yaitu *spiking* yaitu dengan mengambil ekstrak kedelai Dena 1 sebanyak 1 mL dan kemudian dimasukkan ke dalam botol vial, ditambahkan 10 μ L larutan standar genistein 20 ppm dihomogenkan dengan disonikasi selama 300 detik, sehingga dalam 1 mL ekstrak kedelai Dena 1 terdapat 0,2 ppm genistein. Setelah itu 2 μ L diinjeksikan pada KCKT dengan kondisi analisis optimum yang diperoleh. Apabila pada kromatogram muncul puncak dengan waktu retensi yang sama dengan larutan standar genistein serta tinggi dan area puncak yang diperoleh lebih tinggi dari puncak pada kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 sebelum *dispike* dengan standar genistein, maka dapat dipastikan bahwa dalam sampel kedelai Dena 1 terdapat senyawa isoflavon genistein.

4.6 Analisis Kuantitatif Isoflavon dalam Kedelai Tahan Naungan Dena 1

Pengukuran konsentrasi isoflavon dalam kedelai Dena 1 menggunakan metode standar eksternal dan *spiking*. Prosedur yang dilakukan pada metode standar eksternal yaitu dengan menginjeksikan larutan standar isoflavon genistein 18 ppm dan sampel kedelai Dena 1 pada kondisi pemisahan yang sama, kemudian dihitung faktor respon dari standar genistein 18 ppm dengan Persamaan 2.5. Setelah diketahui faktor respon, selanjutnya dapat dihitung konsentrasi analit dalam larutan sampel sesuai dengan Persamaan 2.6. Prosedur yang dilakukan pada metode *spiking* yaitu dengan menentukan luas puncak kromatogram isoflavon dalam sampel sebelum dan setelah ditambahkan larutan standar isoflavon genistein yang sudah diketahui konsentrasinya. Pada metode *spiking*, 1 mL ekstrak kedelai Dena 1 ditambahkan 30 μ L standar genistein 600 ppm, sehingga dalam 1 mL ekstrak kedelai terdapat 18 ppm genistein. Kemudian dihitung konsentrasi isoflavon genistein kedelai Dena 1 menggunakan Persamaan 2.9 dan mengkonversikan konsentrasinya dalam satuan mg/g.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini dijelaskan tentang hasil penelitian dan pembahasan tentang optimasi kondisi untuk pemisahan senyawa isoflavon dari kedelai tahan naungan Dena 1 menggunakan KCKT. Optimasi kondisi meliputi panjang gelombang, laju alir, dan komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat dengan teknik elusi isokratik dan elusi gradien dalam pemisahan isoflavon, yang dilanjutkan dengan analisis kualitatif dan kuantitatif isoflavon dari ekstrak kedelai Dena 1 menggunakan KCKT kondisi optimum.

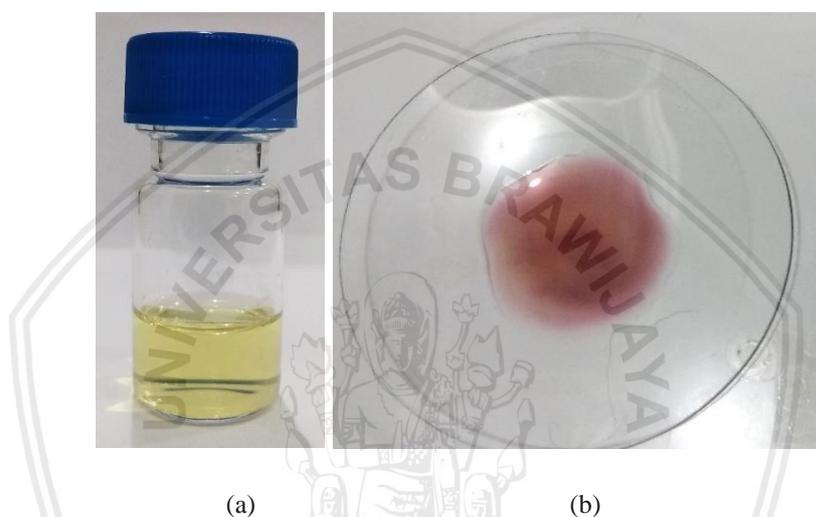
5.1 Ekstrak Isoflavon dari Kedelai Dena 1 dan Analisis Pendahulunya

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kedelai, (*Glycine max* (Linn.) Merril) yang merupakan famili *Leguminosae*. Kedelai diketahui merupakan sumber utama senyawa bioaktif isoflavon. Isoflavon dalam kedelai terdiri dari aglikon, glikosida, asetilglikosida, dan malonilglikosida. Di antara keempat kelompok isoflavon tersebut, aktivitas biologis tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein, daidzein, dan glisitein (Tipkanon *et al.*, 2010) karena lebih cepat dan lebih banyak diserap oleh tubuh.

Proses ekstraksi isoflavon dari kedelai Dena 1 pada penelitian ini dilakukan dengan metode UAE. Metode ini membutuhkan pelarut yang mampu mengekstrak senyawa metabolit sekunder isoflavon yang merupakan golongan flavonoid, pelarut metanol 80% adalah salah satunya. Pada proses ekstraksi isoflavon digunakan 1 g kedelai yang sudah dihaluskan menjadi bubuk ukuran 100 *mesh* dengan kadar air 8,1%. 1 gram bubuk kedelai Dena 1 ditambahkan 25 mL metanol 80% sehingga dihasilkan ekstrak kental metanol Dena I sebanyak 2,5 mL. Ekstrak yang didapatkan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan untuk analisis pada KCKT. Sebelum dilakukan analisis dengan KCKT dilakukan uji pendahuluan menggunakan uji fitokimia dan spektrofotometri UV-Vis.

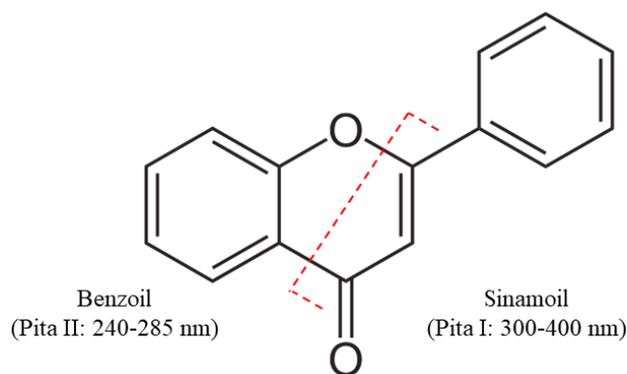
Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak kedelai Dena 1. Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak kedelai Dena 1 mengandung isoflavon yang termasuk dalam

golongan senyawa flavonoid. Uji fitokimia golongan flavonoid dapat dilakukan dengan uji warna yaitu mereaksikan ekstrak kedelai Dena 1 dengan H_2SO_4 pekat uji positif ditunjukkan oleh warna merah tua, asam kuat mereduksi flavonoid dengan cara memprotonasinya sehingga terbentuk warna merah tua. Berdasarkan hasil uji fitokimia menyatakan bahwa ekstrak kedelai positif mengandung senyawa golongan flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna dari kekuningan transparan menjadi merah tua setelah penambahan H_2SO_4 pekat, ditunjukkan pada Gambar 5.1.



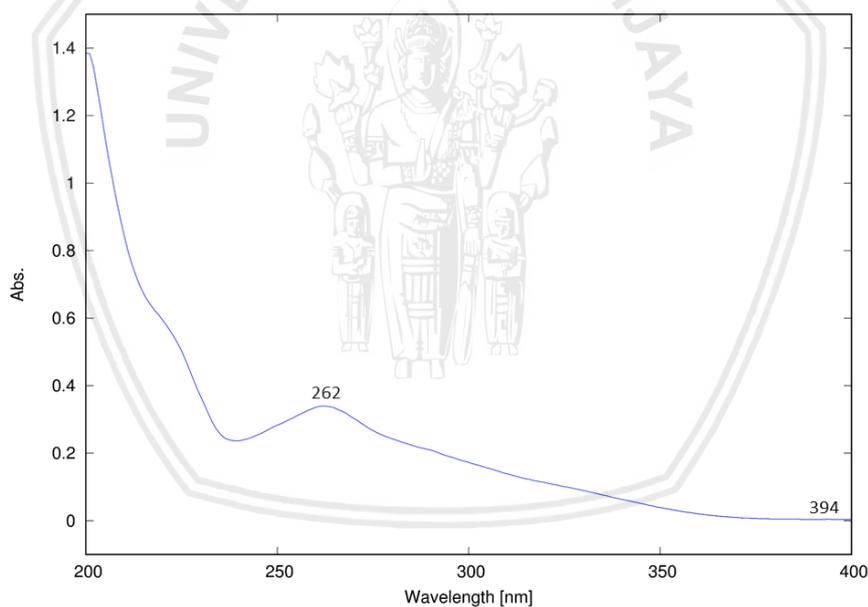
Gambar 5.1 (a) Ekstrak kedelai Dena 1 (b) hasil positif uji flavonoid

Ekstrak kedelai Dena 1 dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui transisi elektron dari ekstrak yang diperoleh. Analisa spektroskopi UV-Vis menggunakan pelarut metanol 80% sebagai blanko. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan melalui proses *scanning* λ_{maks} pada sampel dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm karena isoflavon merupakan senyawa golongan flavonoid. Senyawa golongan flavonoid memperlihatkan dua pergeseran panjang gelombang maksimum pada daerah 240 - 400 nm karena adanya gugus sinamoil (pita serapan I: 300-400 nm) dan gugus benzoil (pita serapan II: 240-285 nm). Skema pembagian daerah serapan UV flavonoid ditunjukkan Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Skema pembagian daerah serapan UV flavonoid

Hasil analisis ekstrak kedelai Dena I menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan λ_{maks} pada 262 nm dan 394 nm dengan nilai absorbansi masing-masing adalah 0,340 dan 0,005. Spektrum UV ekstrak kedelai Dena 1 ditunjukkan pada Gambar 5.3.

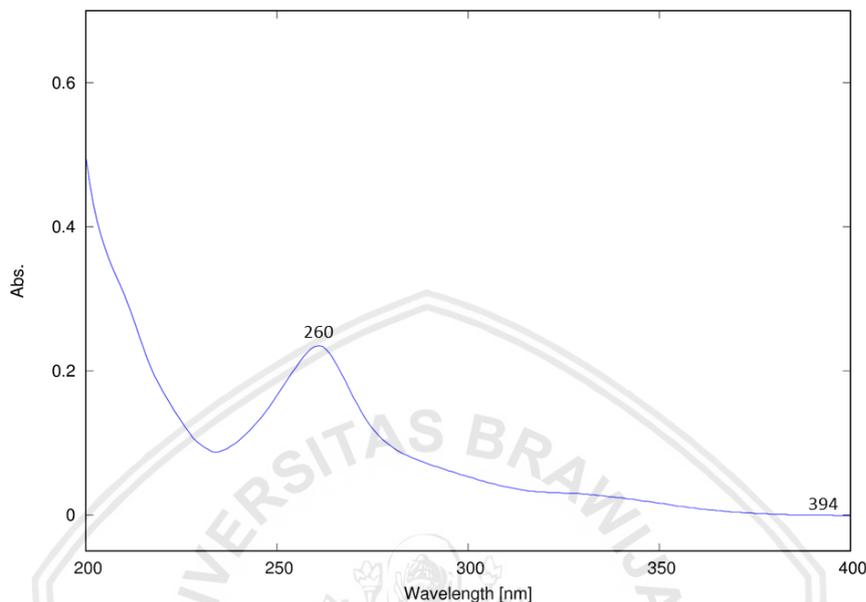


Gambar 5.3 Spektrum UV ekstrak kedelai Dena 1

5.2 Standar Genistein

Standar isoflavon yang digunakan adalah genistein (GEN) yang merupakan standar farmasi dalam bentuk sediaan obat berupa serbuk putih. Penentuan panjang gelombang maksimum standar GEN dilakukan melalui proses *scanning* λ_{maks} pada sampel dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm. Hasil analisis

menunjukkan λ_{maks} standar GEN adalah 260 nm dan 394 nm dengan nilai absorbansi masing-masing adalah 0,062 dan 0,020. Spektrum UV standar GEN ditunjukkan pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4 Spektrum UV standar genistein

Kemudian untuk mengetahui keberadaan isoflavon genistein secara pasti dalam sampel ekstrak kedelai Dena 1 dilakukan analisis menggunakan KCKT. Analisis ini membutuhkan optimasi kondisi operasional KCKT sehingga menghasilkan pemisahan yang bagus, mengingat kemungkinan terdapat 12 isoflavon dalam kedelai Dena 1. Optimasi kondisi operasional KCKT meliputi optimasi panjang gelombang UV, optimasi laju alir, dan optimasi komposisi fase gerak asetronitril : 0,1 % asam asetat dengan teknik elusi isokratik dan gradien.

5.3 Panjang Gelombang Optimum dalam Pemisahan Isoflavon

Kondisi panjang gelombang maksimum dipilih karena pada panjang gelombang tersebut zat akan memberikan respon yang maksimum atau absorbansi terbesar. Nilai dari panjang gelombang maksimum ini dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif suatu senyawa, karena bersifat spesifik untuk setiap senyawa yang mempunyai gugus kromofor tertentu.

Panjang gelombang maksimum digunakan untuk suatu analisis kuantitatif agar pengukuran yang dilakukan pada daerah panjang gelombang maksimum,

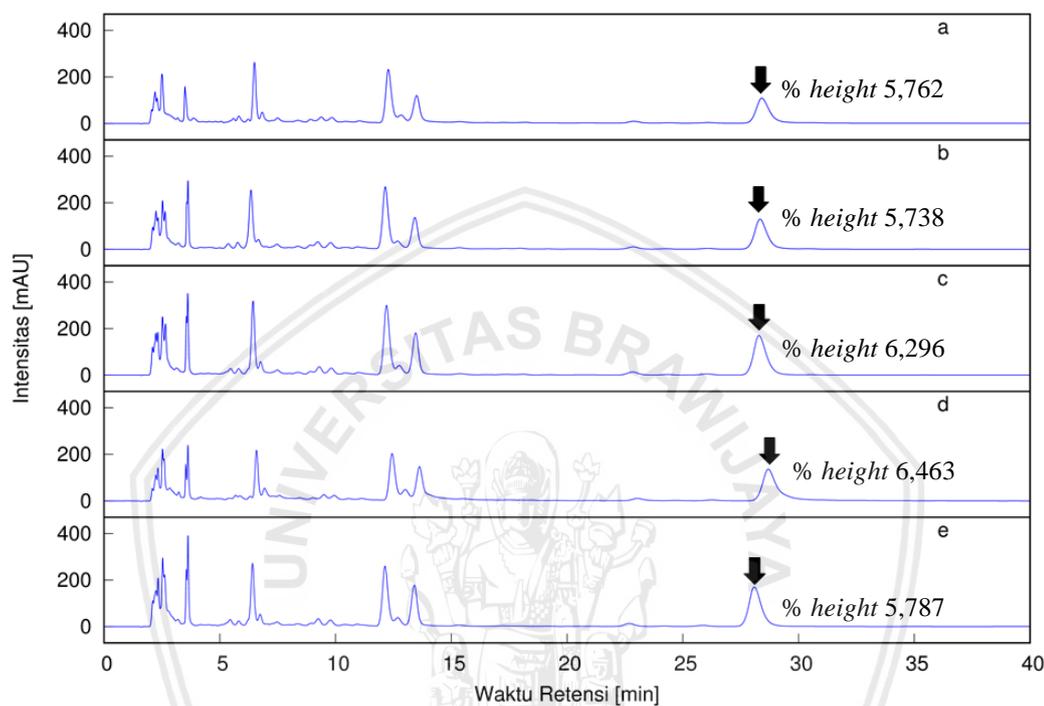
diperoleh nilai absorptivitas molar (ϵ) yang tinggi. Semakin tinggi absorptivitas molar, diharapkan sensitivitas pengukuran akan semakin baik dengan demikian maka kesalahan pada saat pengukuran akan semakin kecil. Berdasarkan hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV, λ_{maks} standar GEN adalah 260 nm dan 394 nm; dan ekstrak kedelai Dena 1 adalah 262 nm dan 394 nm. Berdasarkan data ini λ_{maks} standar GEN berdekatan dengan ekstrak kedelai Dena 1, sehingga dapat dimungkinkan kedelai mengandung genistein. Absorbansi tertinggi standar GEN adalah pada λ 260 nm yaitu 0,062 dan ekstrak kedelai Dena 1 pada 262 nm yaitu 0,340. Sehingga optimasi metode KCKT untuk analisis isoflavon kedelai Dena 1 menggunakan panjang gelombang 260 nm dan 262 nm. Berdasarkan penelitian-penelitian tentang isoflavon kedelai yang telah dilakukan menyebutkan beberapa panjang gelombang optimum untuk analisis isoflavon yaitu 249 nm, 250 nm, dan 254 nm, sehingga optimasi panjang gelombang pada analisis ini juga dilakukan pada panjang gelombang tersebut. Hasil optimasi kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 pada lima titik panjang gelombang tersebut ditunjukkan Gambar 5.5.

Panjang gelombang berpengaruh terhadap intensitas puncak kromatogram. Berdasarkan hasil optimasi intensitas yang tinggi untuk semua puncak ditunjukkan pada panjang gelombang 254 nm. Tetapi puncak terduga genistein ($t_R = 28$ menit) yaitu puncak yang ditunjuk anak panah memiliki intensitas tinggi pada panjang gelombang 260 nm dengan % *height* 6,463. Szymczak *et al.*, (2017) menyatakan bahwa untuk kuantifikasi standar GEN dan turunannya menggunakan panjang gelombang 260 nm, serta berdasarkan analisis menggunakan spektrofotometri UV, standar GEN mempunyai absorbansi maksimum pada panjang gelombang 260 nm. Sehingga, kondisi optimum pemisahan genistein dipilih pada panjang gelombang 260 nm karena pada panjang gelombang tersebut intensitas puncak terduga genistein menunjukkan intensitas yang tinggi.

5.4 Laju Alir Optimum dalam Pemisahan Isoflavon

Laju alir menunjukkan tingkat kecepatan aliran zat tertentu persatuan waktu. Optimasi laju alir menggunakan lima variasi 0,5 mL/min; 0,8 mL/min; 1,0 mL/min; 1,2 mL/min; dan 1,5 mL/min. Optimasi ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kondisi optimum laju alir dalam pemisahan isoflavon dan untuk

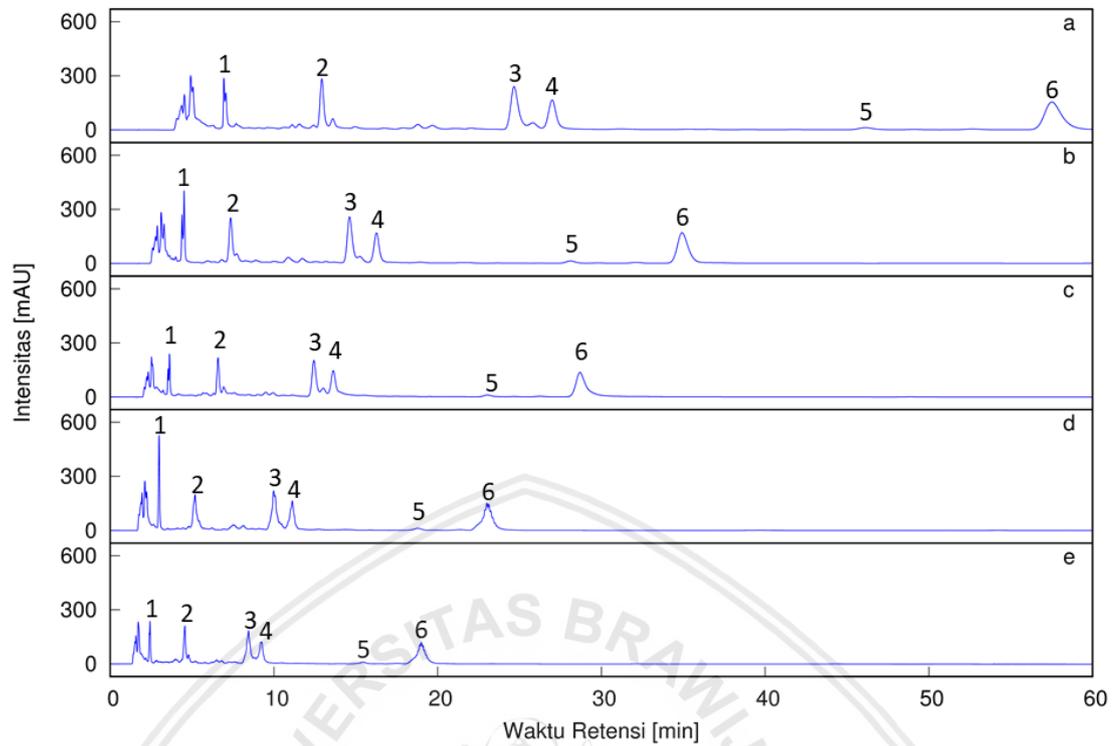
mengetahui apakah dengan perubahan laju alir dari lambat ke cepat, akan berpengaruh linier terhadap perubahan waktu retensi pemisahan isoflavon. Gambar 5.6 menunjukkan hasil pemisahan isoflavon dalam ekstrak kedelai Dena 1 dengan lima variasi laju alir. Gambar 5.7 menunjukkan hubungan laju alir dan waktu retensi.



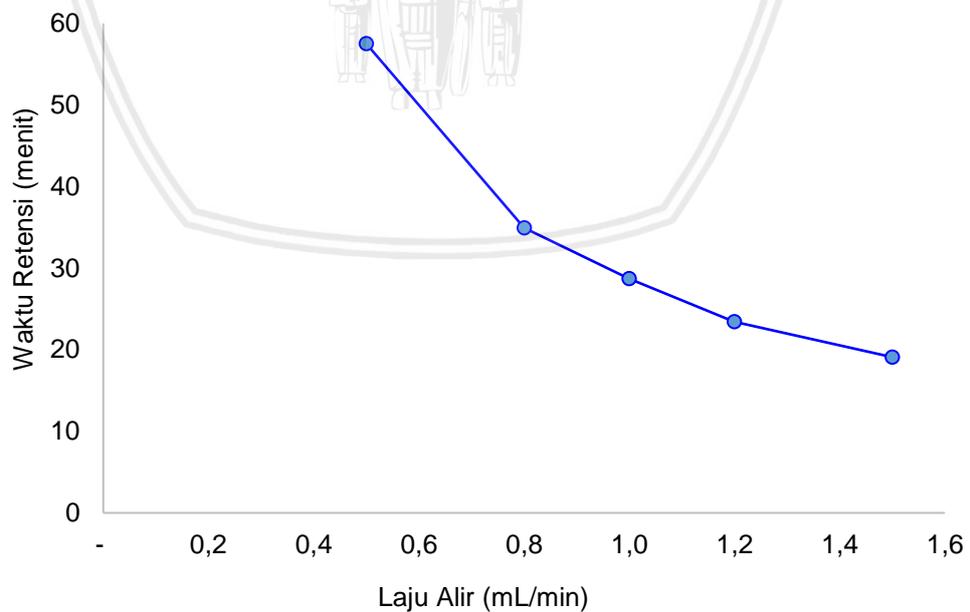
Gambar 5.5 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 dengan lima titik panjang gelombang: (a) 249 nm, (b) 250 nm, (c) 254 nm, (d) 260 nm, (e) 262 nm); Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μm *particle size*); Fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat (20:80); Volume sampel 2 μL ; Laju alir 1,0 mL/menit

Laju alir bernilai linier dengan waktu retensi, yaitu semakin cepat laju alir yang digunakan pada proses pemisahan isoflavon, maka waktu retensi yang diperlukan juga semakin cepat. Kondisi optimum diperoleh pada laju alir 1,0 mL/menit, dengan nilai kualitas kromatogram ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Laju alir 1,0 mL/min dipilih karena pada laju alir ini menghasilkan puncak tajam, puncak tajam dengan waktu retensi lebih cepat, meskipun pada laju alir 1,2 dan 1,5 mL/min waktu retensi puncak-puncak yang dihasilkan lebih cepat tetapi terdapat beberapa puncak yang tidak tajam. Puncak tajam merupakan tujuan utama dari semua proses pemisahan dengan kromatografi.



Gambar 5.6 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 dengan lima variasi laju alir: (a) 0,5 mL/min, (b) 0,8 mL/min, (c) 1,0 mL/min, (d) 1,2 mL/min, (e) 1,5 mL/min; Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m *particle size*); Fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat (20:80); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm.



Gambar 5.7 Pengaruh laju alir terhadap waktu retensi puncak terduga genistein (puncak 6) dalam ekstrak kedelai Dena 1

Tabel 5.1 Evaluasi pemisahan isoflavon pada berbagai laju alir

Laju alir (mL/min)	R	N	k'	A
0,5	R ₁₋₂ = 13,4	N ₁ = 4.820,53	k' ₁ = 3,91	α_{1-2} = 1,97
	R ₂₋₃ = 26,1	N ₂ = 15111,79	k' ₂ = 7,69	α_{2-3} = 2,14
	R ₃₋₄ = 2,6	N ₃ = 38935,18	k' ₃ = 16,43	α_{3-4} = 1,09
	R ₄₋₅ = 47,8	N ₄ = 19662595,05	k' ₄ = 18,07	α_{4-5} = 1,75
	R ₅₋₆ = 10,4	N ₅ = 212686,99	k' ₅ = 31,59	α_{5-6} = 1,25
			N ₆ = 107989,23	k' ₆ = 39,64
0,8	R ₁₋₂ = 11,38	N ₁ = 8143,26	k' ₁ = 28,5	α_{1-2} = 1,65
	R ₂₋₃ = 20,74	N ₂ = 9619,67	k' ₂ = 47,1	α_{2-3} = 2,01
	R ₃₋₄ = 4,71	N ₃ = 21362,75	k' ₃ = 94,53	α_{3-4} = 1,11
	R ₄₋₅ = 39,47	N ₄ = 47025,37	k' ₄ = 105,30	α_{4-5} = 1,73
	R ₅₋₆ = 19,47	N ₅ = 140425,07	k' ₅ = 182,69	α_{5-6} = 1,24
			N ₆ = 121954,61	k' ₆ = 227,25
1,0	R ₁₋₂ = 14,61	N ₁ = 21456,4	k' ₁ = 26,53	α_{1-2} = 1,83
	R ₂₋₃ = 16,73	N ₂ = 7705,32	k' ₂ = 48,50	α_{2-3} = 1,91
	R ₃₋₄ = 2,96	N ₃ = 15472,87	k' ₃ = 92,53	α_{3-4} = 1,01
	R ₄₋₅ = 26,88	N ₄ = 18561,34	k' ₄ = 101,44	α_{4-5} = 1,69
	R ₅₋₆ = 12,57	N ₅ = 94315,53	k' ₅ = 172,18	α_{5-6} = 1,25
			N ₆ = 36577,77	k' ₆ = 214,69
1,2	R ₁₋₂ = 10,97	N ₁ = 14275,47	k' ₁ = 0,99	α_{1-2} = 2,47
	R ₂₋₃ = 16,3	N ₂ = 4770,23	k' ₂ = 2,45	α_{2-3} = 2,32
	R ₃₋₄ = 3,5	N ₃ = 18027,45	k' ₃ = 5,69	α_{3-4} = 1,12
	R ₄₋₅ = 25,42	N ₄ = 21982,9	k' ₄ = 6,39	α_{4-5} = 1,79
	R ₅₋₆ = 11,24	N ₅ = 62474,17	k' ₅ = 11,47	α_{5-6} = 1,26
			N ₆ = 34566,25	k' ₆ = 14,46
1,5	R ₁₋₂ = 14,12	N ₁ = 9432,29	k' ₁ = 23,76	α_{1-2} = 1,91
	R ₂₋₃ = 15,57	N ₂ = 8302,85	k' ₂ = 45,49	α_{2-3} = 1,87
	R ₃₋₄ = 1,9	N ₃ = 12690,74	k' ₃ = 85,21	α_{3-4} = 1,08
	R ₄₋₅ = 18,00	N ₄ = 8315,62	k' ₄ = 92,05	α_{4-5} = 1,69
	R ₅₋₆ = 12,83	N ₅ = 42276,16	k' ₅ = 156,36	α_{5-6} = 1,23
			N ₆ = 35762,59	k' ₆ = 191,97

Keterangan:

R = Resolusi ($\geq 1,5$)

N = Jumlah plat teori (semakin tinggi semakin bagus)

k' = faktor kapasitas (1-10)

A = Selektivitas (>1)

Resolusi kolom adalah ukuran kinerja kolom yang menggambarkan derajat keterpisahan dua buah puncak dari dua senyawa komponen yang mirip, dan dilambangkan sebagai R. Jumlah plat teori (N) menunjukkan jarak dimana komponen sampel mencapai satu kesetimbangan antara fase diam dan fase gerak. Semakin banyak kesetimbangan yang terjadi, maka jumlah plat teoritis akan semakin besar, dan kualitas pemisahan akan menjadi lebih baik (Harvey, 2000). Faktor kapasitas (k'), nilai k' yang tinggi menunjukkan bahwa sampel sangat ditahan dan telah menghabiskan banyak waktu berinteraksi dengan fase diam. Nilai k' optimum berada pada rentang 1-10, yang mana menunjukkan bahwa waktu berinteraksi sampel dengan kolom adalah maksimum. Faktor selektivitas (α) atau

adalah kemampuan dari sistem kromatografi untuk membedakan komponen-komponen kimia sampel. Faktor selektivitas biasanya diukur sebagai perbandingan antara faktor kapasitas (k') dari dua puncak yang bersangkutan. Apabila nilai α adalah satu maka berarti dua puncak dari komponen senyawa dalam sampel tidak dapat dipisahkan, kemudian nilai α lebih besar dari satu menunjukkan bahwa komponen senyawa pertama lebih cepat terelusi dari komponen senyawa kedua. Selanjutnya, dua komponen senyawa dapat dikatakan terpisah dengan baik apabila menunjukkan nilai α yang besar. Berdasarkan Tabel 5.1, menunjukkan parameter kromatografi yang bagus, tetapi dipilih salah satu kondisi yang menunjukkan pemisahan optimum dan waktu retensi yang sesuai.

5.5 Komposisi Fase Gerak Optimum dalam Pemisahan Isoflavon

Penggunaan fase gerak dengan perbandingan tertentu ditujukan untuk mendapatkan selektivitas sehingga terjadi perubahan jarak puncak antar kromatogram yang satu dan yang lainnya terutama kromatogram yang saling berhimpitan khususnya kromatogram yang menjadi target analisis.

Pemisahan senyawa bergantung dengan polaritas fase gerak, berbagai komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat dimaksudkan untuk menentukan polaritas yang akan mempengaruhi pemisahan senyawa isoflavon.

Optimasi komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat dilakukan dengan elusi isokratik maupun elusi gradien, dengan tujuan untuk memperoleh hasil pemisahan yang optimum tidak hanya untuk puncak genistein tetapi juga untuk isoflavon lain dalam ekstrak kedelai Dena 1.

5.5.1 Pemisahan Isoflavon dengan Elusi Isokratik

Sistem elusi isokratik merupakan sistem elusi dengan komposisi fase gerak asetonitril - 0,1% asam asetat tidak berubah selama analisis. Pada penelitian ini dilakukan perubahan komposisi fase gerak dengan teknik elusi isokratik untuk mengetahui komposisi optimum fase gerak. Pemisahan isoflavon membutuhkan pengaturan komposisi fase gerak yang tepat karena isoflavon sebagai salah satu senyawa golongan flavonoid flavonoids mengandung *unsubstituted hydroxyl groups* dan menunjukkan sifat sedikit asam. pH fase gerak merupakan termasuk parameter

kunci untuk mengoptimalkan selektivitas. Optimasi komposisi fase gerak dilakukan dengan mengubah komposisi fase gerak asetonitril-0,1% asam asetat. Perubahan komposisi fase gerak membuat pH fase gerak juga berubah, pada komposisi asetonitril : 0,1% asam asetat 20:80; 25:75; 30:70; 40:60; 50:50; dan 60:40; nilai pH masing-masing adalah 3,84; 3,92; 4,05; 4,19; 4,32; dan 4,43. Kromatogram hasil optimasi komposisi fase gerak teknik elusi isokratik ditunjukkan Gambar 5.8.

Kromatogram menunjukkan bahwa pemisahan yang bagus dihasilkan dari penggunaan fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat 20:80 dengan nilai pH 3,84 (Gambar 5.8 (a)) dan perbesarannya pada Gambar 5.9. Pemisahan pada komposisi asetonitril : 0,1% asam asetat 20:80 dikatakan bagus karena menghasilkan puncak lebih banyak dengan jarak yang tidak berdekatan dibandingkan dengan puncak yang dihasilkan komposisi asetonitril : 0,1% asam asetat 25:75; 30:70; 40:60; 50:50; dan 60:40. Nilai pH fase gerak $\geq 4,19$ menunjukkan pemisahan yang kurang bagus, ditunjukkan dengan tidak terpisahnya puncak-puncak isoflavon sehingga hanya keluar sedikit puncak dengan intensitas yang tinggi. Hal ini karena kondisi semakin asam maka kesetimbangan ionisasi senyawa fenolik akan bergeser ke bentuk molekul asamnya (Persamaan 5.1) yang bersifat non polar yang dapat meningkatkan interaksi dengan kolom C18 yang bersifat non polar, sehingga terjadi pemisahan yang lebih baik dibandingkan pada kondisi basa.

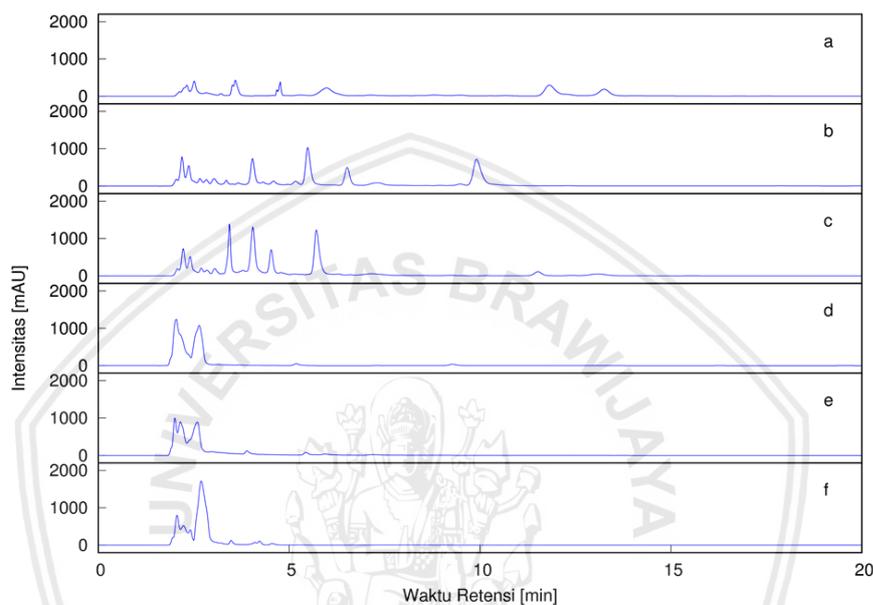


Pemisahan isoflavon dengan komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat 20:80 menunjukkan puncak kromatogram senyawa isoflavon dapat terpisah satu sama lain, tetapi pemisahan masih kurang bagus karena masih terdapat puncak yang berdekatan dan membutuhkan waktu elusi yang cukup lama. Sehingga dapat disimpulkan bahwa komposisi fase gerak asetonitril: 0,1% asam asetat 20:80 dengan sistem elusi isokratik masih belum cukup optimum untuk memisahkan senyawa isoflavon dalam ekstrak kedelai Dena 1, sehingga dilakukan elusi gradien untuk meningkatkan pemisahan isoflavon.

5.5.2 Pemisahan Isoflavon dengan Elusi Gradien

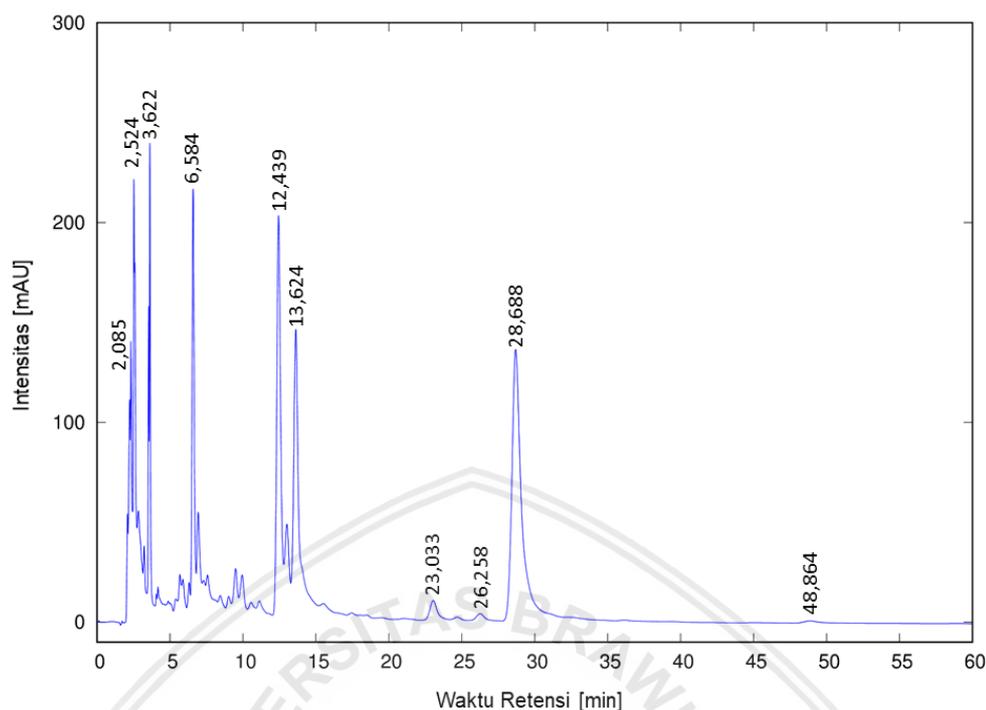
Sistem elusi gradien merupakan sistem elusi dengan komposisi fase gerak diubah dengan *gradient controller* selama proses analisis. Tujuan pengaturan dengan

program ini adalah lebih leluasa untuk memisahkan puncak-puncak dan untuk mempercepat waktu retensi analit dalam sampel. Pada penelitian ini, sistem gradien dengan komposisi fase gerak asetonitril: 0,1% asam asetat diubah dengan tujuan untuk mendapatkan hasil pemisahan yang optimum untuk semua senyawa isoflavon dalam ekstrak kedelai Dena 1. Terdapat 3 macam program dengan teknik elusi gradien yaitu GE-1, GE-2, dan GE-3 yang ditunjukkan Tabel 4.1.



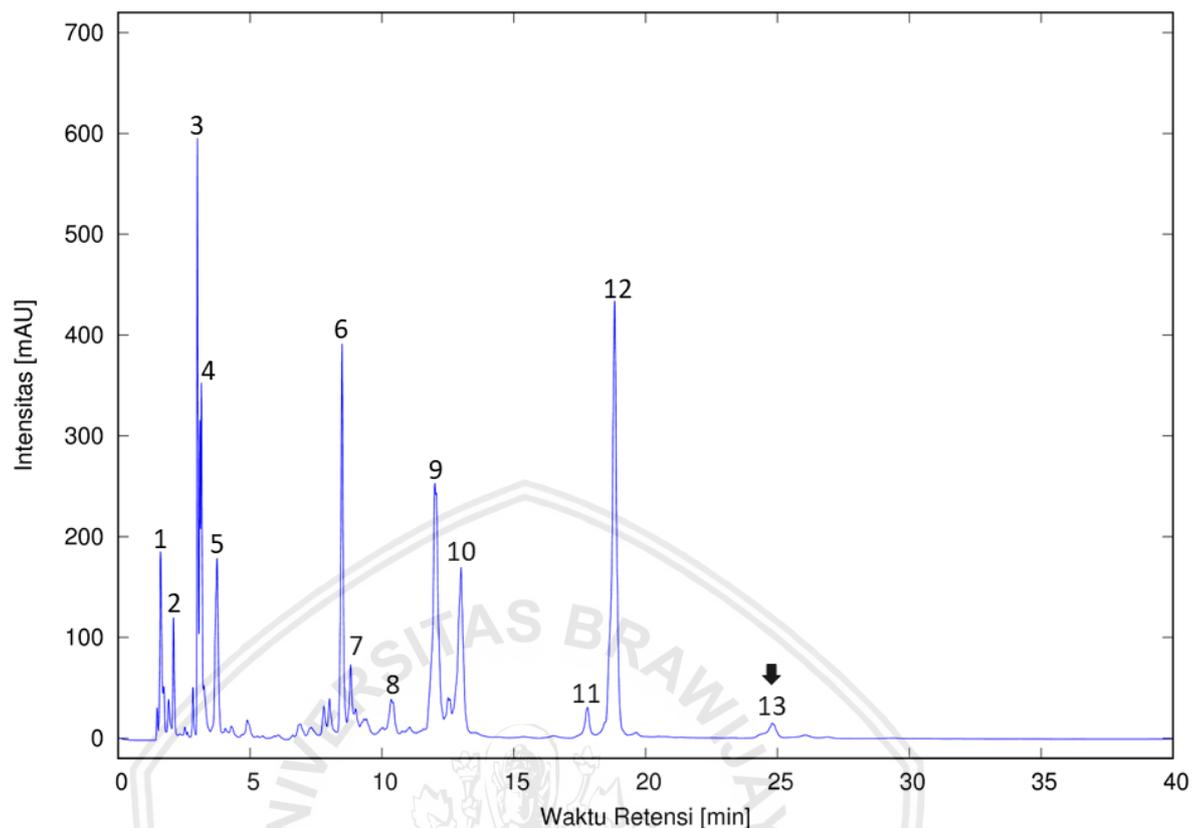
Gambar 5.8 Pengaruh komposisi fase gerak terhadap kromatogram ekstrak kedelai Dena 1. Komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat (a) 20:80, (b) 25:75, (c) 30:70, (d) 40:60, (e) 50:50, (f) 60:40. Laju alir 1,0 mL/min; Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m *particle size*); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm

Komposisi fase gerak pertama yang digunakan adalah program elusi gradien GE-1. Berdasarkan hasil perbandingan puncak-puncak kromatogram sampel ekstrak kedelai Dena 1 dengan teknik elusi isokratik dan teknik elusi gradien komposisi pertama (GE-1) sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 5.10 menunjukkan bahwa dengan komposisi fase gerak lebih polar yaitu asetonitril : 0,1% asam asetat (15:85) puncak pertama terelusi lebih cepat yaitu dari waktu retensi 2,085 menit pada elusi isokratik menjadi 1,606 pada gradien elusi GE-1. Sehingga dapat diketahui bahwa perubahan komposisi fase gerak dan teknik elusi mempercepat puncak-puncak analit untuk keluar dan dengan teknik elusi gradien puncak yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan elusi isokratik yaitu 13 puncak.



Gambar 5.9 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 dengan komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat (20:80); Laju alir 1,0 mL/min.; Kolom C-18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m *particle size*); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm

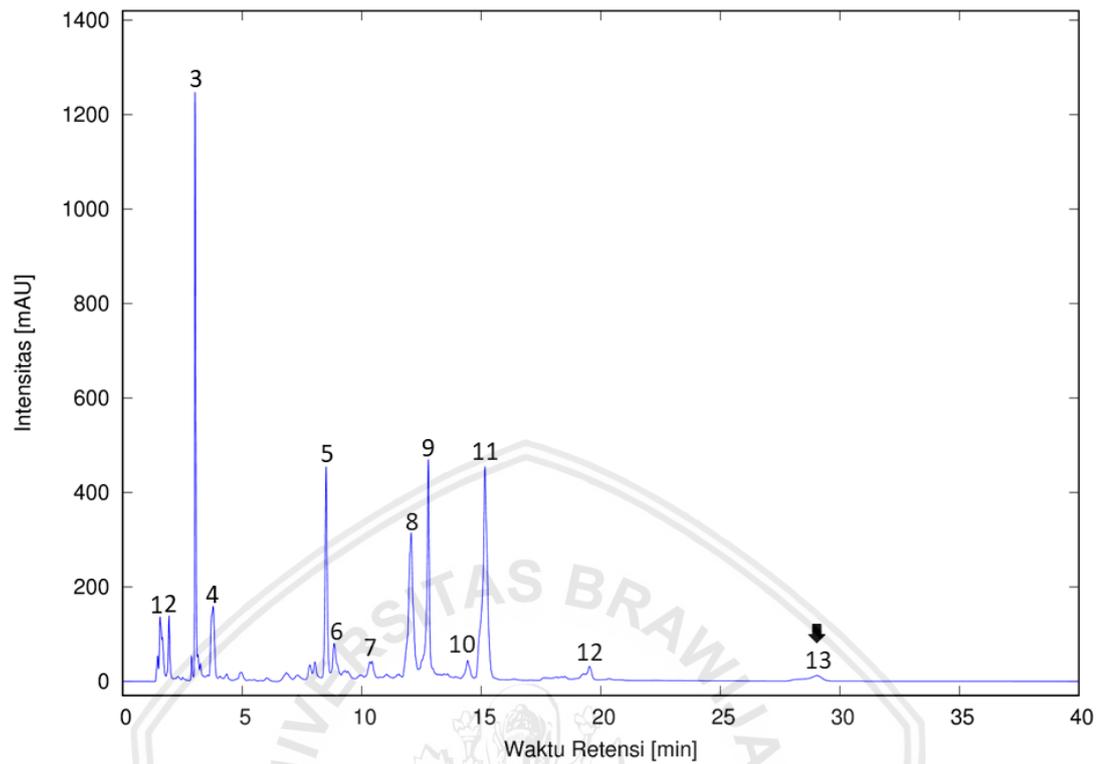
Kromatogram hasil analisis isoflavon kedelai Dena 1 menggunakan program gradien GE-2 ditunjukkan Gambar 5.10. Berdasarkan kromatogram tersebut jumlah puncak yang dihasilkan sama dengan jumlah puncak pada program gradien GE-1, tetapi terdapat beberapa puncak dengan waktu retensi yang lebih cepat. Untuk meningkatkan pemisahan lebih baik lagi digunakan program GE-3. Kromatogram hasil analisis isoflavon kedelai Dena 1 menggunakan program gradien GE-3 ditunjukkan Gambar 5.11. Berdasarkan kromatogram tersebut jumlah puncak yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan hasil analisis program GE-1 dan GE-2, perbedaan ini dikarenakan perubahan pH dan polaritas fase gerak, dimana komposisi fase gerak pada program GE-3 lebih baik dalam memisahkan puncak-puncak isoflavon dalam kedelai Dena 1. Sehingga, kondisi KCKT optimum yang dipilih dalam pemisahan isoflavon adalah pada komposisi fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat program GE-3.



Gambar 5.10 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 menggunakan elusi gradien program GE-1; Laju alir 1,0 mL/min; Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m particle size); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm.

Tabel 5.2 Keterangan untuk kromatogram Gambar 5.10

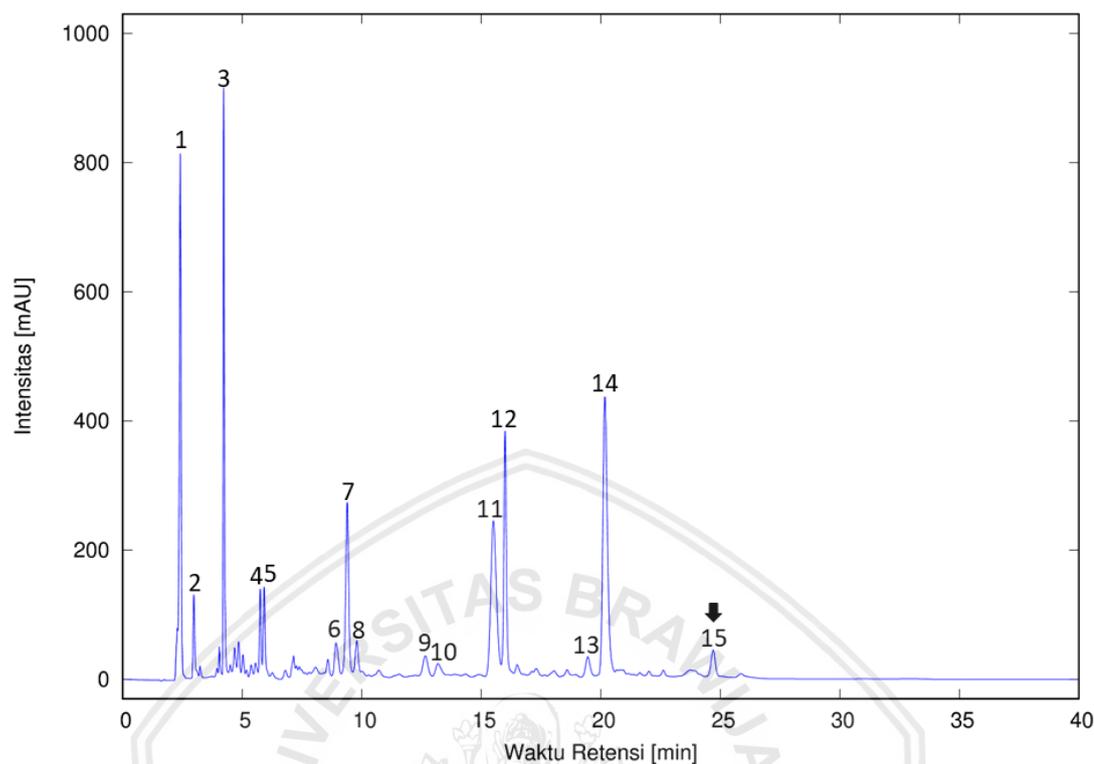
Puncak	Waktu Retensi	Area
1	1,606	1160346
2	2,097	517186
3	3,002	1752808
4	3,154	1635406
5	3,746	1575443
6	8,448	2530002
7	8,813	643219
8	10,351	705058
9	12,006	4027695
10	12,998	3217538
11	17,796	534539
12	18,824	6974874
13	24,795	393263



Gambar 5.11 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 menggunakan elusi gradien program GE-2; Laju alir 1,0 mL/min; Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m particle size); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm.

Tabel 5.3 Keterangan untuk kromatogram Gambar 5.11

Puncak	Waktu Retensi	Area
1	1,558	1263674
2	1,933	731469
3	3,024	4622553
4	3,777	1675449
5	8,505	2920994
6	8,8838	1050623
7	10,336	436039
8	12,061	4588896
9	12,781	5013994
10	14,425	448203
11	15,148	7955378
12	19,520	393263
13	29,034	207702



Gambar 5.12 Kromatogram ekstrak kedelai Dena 1 menggunakan elusi gradien program GE-1; Laju alir 1,0 mL/min; Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μm *particle size*); Volume sampel 2 μL ; λ 260 nm.

Tabel 5.4 Keterangan untuk kromatogram Gambar 5.12

Puncak	Waktu Retensi	Area
1	2,404	4632055
2	2,971	757112
3	4,219	3272382
4	5,748	717448
5	5,913	909975
6	8,919	711618
7	9,389	2605559
8	9,788	650218
9	12,657	658464
10	13,183	527737
11	15,502	4223222
12	15,991	3104264
13	19,451	559947
14	20,165	7309981
15	24,696	661617

5.6 Analisis Kualitatif Genistein dalam Ekstrak Kedelai Dena 1

Keberadaan senyawa isoflavon genistein dalam sampel kedelai Dena 1 secara kualitatif yaitu berdasarkan hasil perbandingan data waktu retensi standar GEN 90 ppm dengan waktu retensi puncak kromatogram sampel kedelai Dena 1 (Gambar 5.13 (a) dan (b)) dengan menggunakan metode KCKT pada kondisi optimum, maka dapat diketahui bahwa dalam ekstrak kedelai Dena 1 mengandung genistein dengan waktu retensi 24,708 dan area 793377 (Gambar 5.13 (b)).

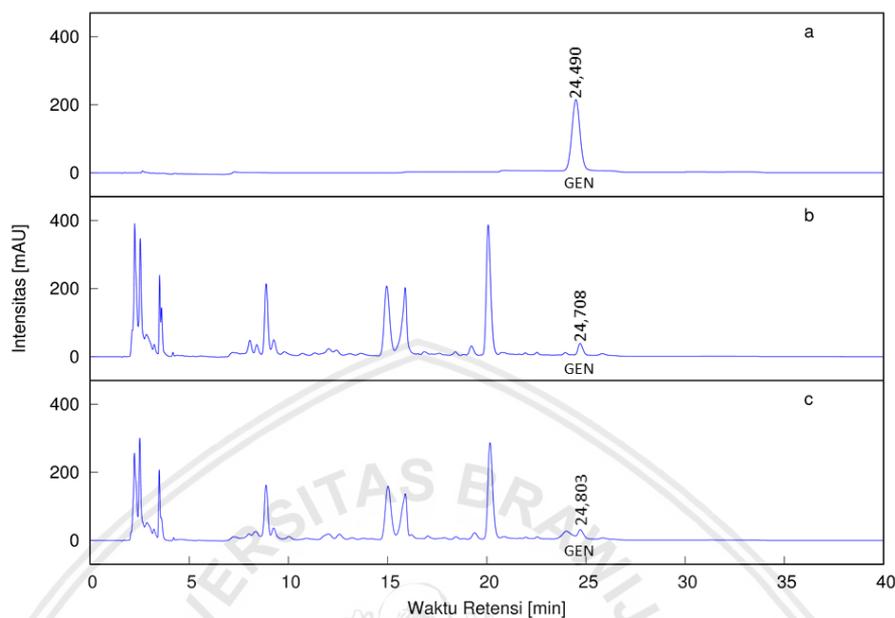
Analisis kualitatif genistein dalam kedelai Dena 1 juga menggunakan metode *spiking* yaitu dengan menambahkan larutan standar GEN yang sudah diketahui konsentrasinya dalam kedelai Dena 1 (Lampiran 7.2). Gambar 5.13 (c) merupakan kromatogram *spiking* GEN dengan konsentrasi 0,2 ppm dalam sampel kedelai Dena 1. Mengingat standar GEN yang *dispike* terlalu kecil, maka peningkatan puncak kromatogram tidak nampak. Namun bila diamati area puncaknya menunjukkan puncak GEN pada kromatogram semakin tinggi pada waktu retensi 24,803 dan area 853612. Sehingga dapat dipastikan bahwa dalam kedelai Dena 1 terkandung senyawa genistein.

5.7 Analisis Kuantitatif Genistein dalam Ekstrak Kedelai Dena 1

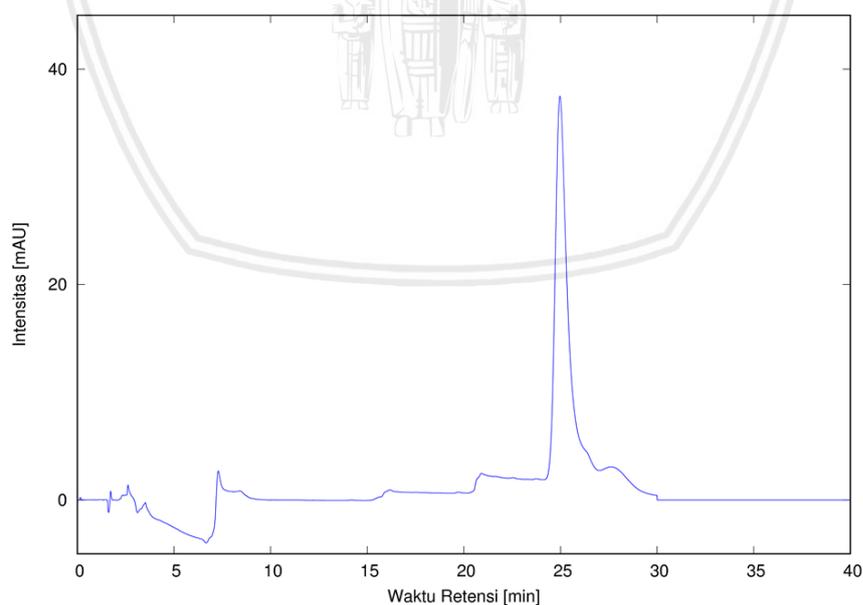
Pengukuran konsentrasi genistein secara KCKT membutuhkan preparasi sampel untuk mengurangi jumlah senyawa yang dapat mengganggu pengukuran sehingga puncak genistein dapat teridentifikasi dengan lebih baik. Analisis kuantitatif genistein dalam kedelai Dena 1 menggunakan metode standar eksternal dan *spiking*. Metode standar eksternal adalah prosedur kuantifikasi yang dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dan larutan sampel pada kondisi pemisahan yang sama (Lampiran 8.1), kemudian dihitung faktor respon dari standar genistein berdasarkan Persamaan 2.5, sehingga dapat diketahui konsentrasi genistein dalam ekstrak kedelai Dena 1 dengan Persamaan 2.6.

Hasil analisis standar GEN menggunakan KCKT memberikan kromatogram yang ditunjukkan Gambar 5.14. Puncak kromatogram standar GEN 18 ppm keluar pada waktu retensi 24,966 dengan area 1731080. Pada kromatogram

menunjukkan puncak tunggal yang tinggi, hal ini menunjukkan standar GEN memiliki kemurnian yang tinggi.

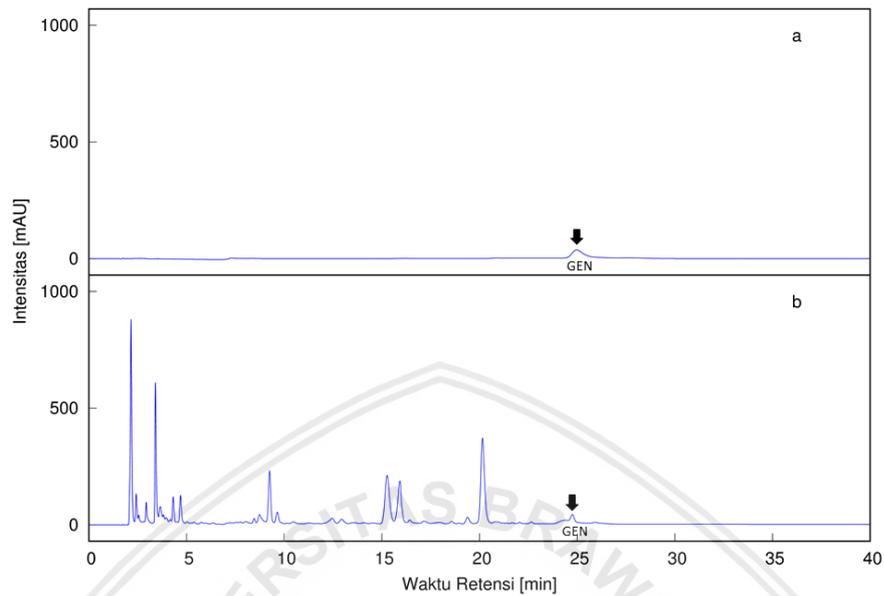


Gambar 5.13 Kromatogram (a) Standar GEN, (b) ekstrak kedelai Dena 1, (c) ekstrak kedelai Dena 1 *dispike* dengan standar GEN. Gradien program GE-3; Laju alir 1,0 mL/min.; Kolom C-18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m *particle size*); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm

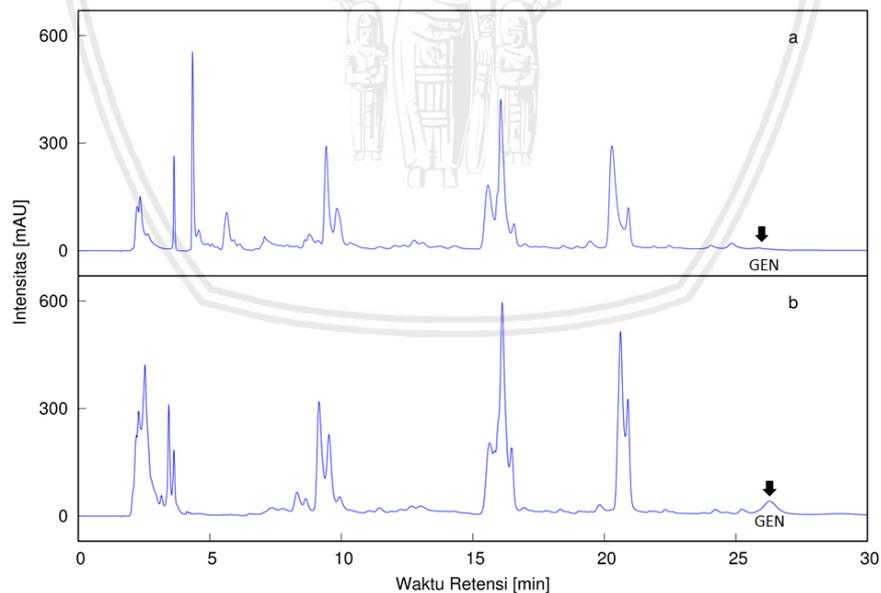


Gambar 5.14 Kromatogram standar genistein 18 ppm (Kondisi Pemisahan: Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m *particle size*); laju alir 1 mL/min; volume sampel 2 μ L; fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat program GE-3; λ 260 nm.

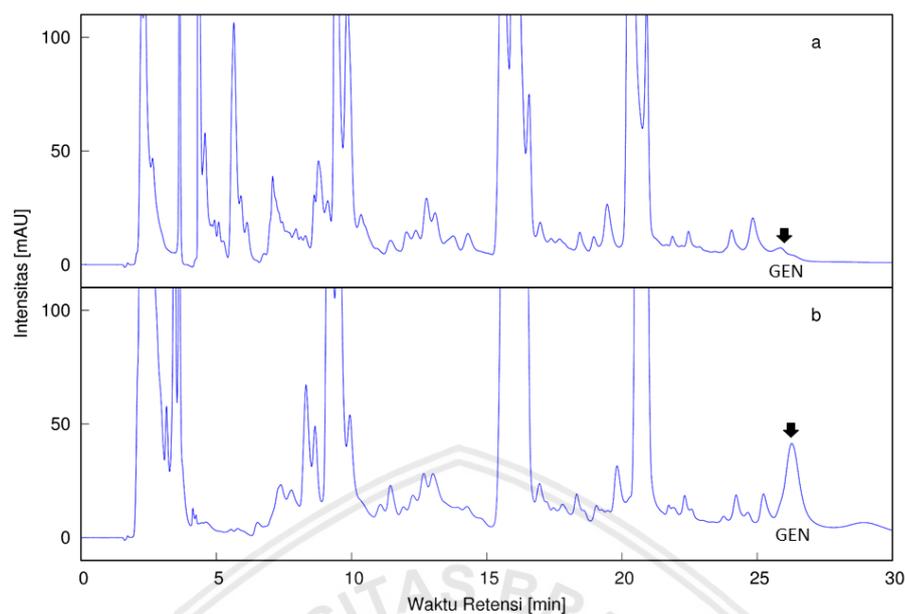
Kromatogram hasil analisis kuantitatif genistein menggunakan metode standar eksternal ditunjukkan Gambar 5.15 (a) dan (b).



Gambar 5.15 Kromatogram hasil analisis kuantitatif metode standar eksternal (a) standar genistein 18 ppm, (b) ekstrak kedelai Dena 1; Elusi gradien GE-3; Laju alir 1,0 mL/min; Kolom C18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m *particle size*); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm



Gambar 5.16 Kromatogram hasil analisis kuantitatif metode *spiking* (a) ekstrak kedelai Dena 1; (b) ekstrak kedelai Dena 1 *dispike* 18 ppm standar genistein; Gradien program GE-3; Laju alir 1,0 mL/min.; Kolom C-18 (250 x 4.6 mm *i.d.*, 5 μ m *particle size*); Volume sampel 2 μ L; λ 260 nm.



Puncak Spiking	Area
GEN (Ulangan 1)	1962637
GEN (Ulangan 2)	2029809
GEN (Ulangan 3)	2464622

Gambar 5.17 Perbesaran puncak kromatogram genistein pada (a) ekstrak kedelai Dena 1; (b) ekstrak kedelai Dena 1 *dispike* 18 ppm standar genistein hasil analisis kuantitatif metode *spiking*

Tabel 5.5 Nilai % RSD konsentrasi genistein dalam kedelai Dena 1

Metode Analisis	Ulangan	[GEN] _{sampel} (mg/g)	\bar{x} (mg/g)	RSD (%) ²	$\bar{x} \pm S$
Standar eksternal	1	0,125	0,138	2,17	0,138 ± 0,003
	2	0,195			
	3	0,172			
<i>Spiking</i>	1	0,131	0,114	14,03	0,114 ± 0,016
	2	0,113			
	3	0,099			

Keterangan:

[GEN]_{sampel} : Konsentrasi genistein dalam sampel kedelai Dena 1.

\bar{x} : Konsentrasi rata-rata genistein dalam kedelai Dena 1

RSD : Standar deviasi relatif

S : Standar deviasi

Berdasarkan penelitian Kusmardiyani (2012), konsentrasi genistein kedelai lokal Indonesia adalah 0,02 mg/g dan kedelai impor 0,019, sehingga dapat dinyatakan bahwa kedelai varietas tahan naungan Dena 1 memiliki konsentrasi genistein yang lebih besar dibandingkan dengan kedelai lokal Indonesia dan kedelai impor. Perbedaan konsentrasi isoflavon dalam kedelai Dena 1 terhadap kedelai lokal Indonesia dan kedelai impor disebabkan oleh perbedaan perbedaan lingkungan pertumbuhan.

Penelitian Shao *et al.*, (2011) dengan kondisi metode KCKT meliputi fase diam C18 (250×4.6 mm), laju alir 1,0 mL/min, volume sampel 10 µL, λ 260 nm, dan fase gerak asetonitril (A)-2% asam asetat (B) teknik elusi gradien dengan program: 0-40 menit, 100% - 50% B; 40-42 menit, 50% - 20% B; 42-45 menit, 20% - 100% B menghasilkan kromatogram yang ditunjukkan pada Gambar 2.12. Berdasarkan kromatogram tersebut puncak genistein ditunjukkan puncak nomor 12 dengan waktu retensi 27 menit dan intensitas mencapai lebih dari 300 mAU. Pada penelitian ini intensitas genistein lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Shao *et al.*, (2011). Genistein sebagai isoflavon aglikon keberadaannya dalam kedelai dimungkinkan dalam bentuk glikosidanya sehingga pada kondisi pemisahan yang lebih asam maka isoflavon glikosida dapat terhidrolisis. Asam asetat yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,1% asam asetat, sedangkan pada penelitian tersebut adalah 2% asam asetat, sehingga dimungkinkan puncak genistein lebih tinggi karena konsentrasi asam asetat yang digunakan lebih tinggi, selain itu kemungkinan karena perbedaan varietas kedelai. Berdasarkan penelitian Valls *et al.*, (2009) urutan pemisahan senyawa isoflavon aglikon kedelai adalah daidzein < glisitein < genistein dan sifat hidrofobisitas aglikon paling tinggi dengan urutan glikosida < malonilglikosida asetilglikosida < aglikon. Molekul hidrofobik cenderung nonpolar, dengan demikian, lebih memilih molekul netral dan pelarut nonpolar lainnya. Aglikon adalah senyawa isoflavon yang kepolarannya lebih rendah dari pada kepolaran isoflavon yang lain sehingga interaksi dengan kolom C18 lebih kuat sehingga puncak genistein memiliki waktu retensi yang paling lama yaitu 24 menit. Hal ini sesuai dengan penelitian Valls *et al.*, (2009), tetapi tidak bisa dibandingkan karena kondisi analisis berbeda sehingga diperlukan konfirmasi lagi dengan menggunakan metode analisis yang lebih baik yaitu LC-MS.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang analisis isoflavon dalam ekstrak kedelai tahan naungan Dena 1 menggunakan KCKT, diperoleh kesimpulan antara lain:

1. Analisis isoflavon genistein dalam kedelai tahan naungan Dena 1 dapat dilakukan dengan menggunakan metode KCKT fase diam C18 dan fase gerak asetonitril : 0,1% asam asetat dengan kondisi optimum panjang gelombang deteksi UV 260 nm, laju alir 1 mL/min, dan teknik elusi gradien dengan komposisi fase gerak (A: asetonitril; B: 0,1% asam asetat) sebagai berikut: A 15%, B 85% pada menit ke 0–3; A 20%, B 80% pada menit ke 3–12; A 25%, B 75% pada menit ke 12–17; A 30%, B 70% pada menit ke 17–23; A 25%, B 75% pada menit ke 23–30; dan A 20%, B 80% pada menit ke 30–40.
2. Konsentrasi genistein dalam kedelai tahan naungan Dena 1 yang diperoleh dari metode standar eksternal adalah $0,138 \pm 0,003$ mg/g dan dari metode *spiking* adalah $0,114 \pm 0,016$ mg/g.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada analisis kualitatif dan kuantitatif isoflavon dalam kedelai Dena 1 metode KCKT menggunakan standar isoflavon selain genistein karena dalam kedelai Dena 1 terdapat senyawa isoflavon lain selain yang ditunjukkan beberapa puncak tetapi belum diidentifikasi, optimasi panjang gelombang deteksi UV pada panjang gelombang yang termasuk pada Pita I dan Pita II, serta menggunakan sistem detektor selektif seperti *Mass Spectrometers* (MS) pada instrumen LC-MS sehingga dapat merekam spektrum untuk masing-masing puncak dalam kromatogram sampel kedelai Dena 1.

DAFTAR PUSTAKA

- Achouri, Allaoua., Joyce Irene Boye., Denis Belanger. 2005. Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability. *Food Research International*, 38, 1199–1204.
- Aldillah, R. 2014. *Analisis Produksi dan Konsumsi Kedelai Nasional*. Tesis. IPB. Bogor.
- Amin, I., & Mukhrizah, O. 2006. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 778–784.
- Amin, I., & Tan, S. H. 2002. Antioxidant activity of selected seaweeds. *Malaysian Journal of Nutrition*, 8, 167–177.
- Asadi, B., D.M. Arsyad, H. Zahara, Darmijati. 1997. Pemuliaan kedelai untuk toleran naungan. *Bul. Agrobio*.1:15–20.
- Anonim. 2015. Luas panen, produktivitas dan produksi kedelai 2010-2014, <http://www.bps.go.id>, diakses 21 Maret 2018.
- Anonim. 2016. <http://epublikasi.setjen.pertanian.go.id/arsip-outlook/81-outlook-tanaman-pangan/431-outlook-kedelai-2016> , diakses 24 Maret 2018.
- Anonim. 2017. Luas panen kedelai menurut provinsi 2013-2017*, www.pertanian.go.id/ap_pages/mod/datatp , diakses 24 Maret 2018.
- Bolling B, Dolnikowski GG, Blumberg J, Chen CY. 2010. Quantification of almond skin polyphenols by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Food Chemistry*, 122(3): 819–825.
- Candráková, Macák EM, Hanáčková E. 2012. The Effects of Fertilization and Variety on The Isoflavones Of Soybeans. *Research Journal of Agricultural Science*. 44 (1):14-19.
- Carrao-Panizzi MC, de Goes Fanoni SP, Kikuchi A. 2002. Extraction Time for Soybean Isoflavone Determination. *Brazilian archives of Biology and Technology*. 45 (4): 515-518.
- Carrao-Panizzi M C., Berhow M., Mandarino J M G. 2009. Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil. *Pesq. Agropec*. 44 (11): 1444-1451.
- Cheng G, Wilczek B, Warner M, Gustafsson JA, Landgren BM. 2007. Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause*. 468-473.
- Departemen Pertanian. 2009. Basis Data Pertanian, <http://database.deptan.go.id>, diakses tanggal 21 Maret 2018.

- DIY Agricenter. (2015). Kedelai. Retrieved January 22, 2015, from http://agricenter.jogjaprovo.go.id/index.php?action=generic_content.main&id_gc=130 environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Sci.* 40:48-51.
- FAO. 2006a. Harvested area and production of soybean. <http://faostat.fao.org/faostat/form?Collection.Production.crops.Primary&Domain>, diunduh 21 Maret 2018.
- FAO. 2006b. Soybeans import and export <http://faostat.fao.org/faostat/servlet/XteServlet3?Trade.CropsLivestockProducts&language=EN>, diunduh 21 Maret 2018.
- Genovese MI, Davila J, Lajolo FM. 2006. *Isoflavones in processed soybean products from Ecuador*. Braz. arch. biol. Technol. 49(5):853-859.
- Griffith, A. P., and Collison, M. W. Murphy PA, Barua K, Hauck CC. 2002. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soyfoods. *J Chromatogr B Analyte Technol Biomed Life Sci.* 777, 38-129.
- Gyorgy, S., Murata, K. and Ikehata, H., 1964, Antioxydant Isolated From Fermented Soybean, *Nature*, 23, 4947, p. 870-872.
- Ha TJ, Lee JH, Shin SO, Shin SH, Han SI, Kim HT, Ko JM, Lee MH, Park KY. 2009. Changes in anthocyanin and isoflavone concentrations in black seed-coated soybean at different planting locations. *J Crop Sci Biotech* 12:79-86.
- Harrigan, G. G., Ridley, W. P., Riordan, S. G., Nemeth, M. A., Sorbet, R., Trujillo, W. A. 2007. Chemical composition of glyphosate-tolerant soybean 40-3-2 grown in Europe remains equivalent with that of conventional soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6160-6168.
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. Boston: Mc Graw-Hill Higher Education Co.
- Hoeck JA, Fehr WR; Murphy PA, Welke GA. 2000. Influence of genotype and
- Hutabarat, L. S., Greenfield, H., and Mulholland, M. (2000). Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 886, 55-63.
- J.S. Choi, T.W. Kwon, J.S. Kim. 1996. Isoflavone contents in some varieties of soybean, *J. Kor. Food Biotechnol.* 5, 167-169.
- Jiao, Z., Si, X., Zhang, Z., Li, G., Cai, Z. 2012. Compositional study of different soybean (*Glycine max* L.) varieties by ¹H NMR spectroscopy,

chromatographic and spectrometric techniques. *Food Chem.* 135, 285–291. *Journal of Nutrition*, 8, 167–177.

- Jun-ming, SUN., SUN Bao-li., HAN Fen-xia., YAN Shu-rong., YANG Hua., Akio Kikuchi., 2011. Rapid HPLC Method for Determination of 12 Isoflavone Components in Soybean Seeds. *Agricultural Sciences in China*, 10(1): 70-77.
- Kim, J. A., Jung, W. S., Chun, S. C., Yu, C. Y., Ma, K. H., Gwag, J. G. 2006. A correlation between the level of phenolic compounds and the antioxidant capacity in cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. *European Food Research and Technology*, 224, 259–270.
- Kjeldus *et al.*,. 1999. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 839, 261–263.
- Kusmardiyani, Siti., Asri Dwijayanti, Komar Ruslan Wirasutisna. 2012. Penetapan Kadar Genistein Biji Kedelai (*Soya max* Piper) Lokal dan Impor Secara Densitometri Lapis Tipis dan KCKT. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, Vol. XXXVII, No. 1.
- Lee CH, Yang L, Xu JZ, Yeung SYV, Huang Y, Chen ZY. 2005. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chemistry*. 90(4):735–741.
- Lee *et al.*,. 2008 Analysis of Isoflavones and Phenolic Compounds in Korean Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Seeds of Different Seed Weights. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2751–2758.
- Li, Y.R., Yun, T.T., Liu, S., Qi, W.T., Zhao, L.Q., Liu, J.R., Li, A.K., 2016. Analysis of water- soluble bioactive compounds in commonly consumed soymilk in China. *J. Food Compos. Anal.* 46, 29–35.
- Lundry, D. R., Ridley, W. P., Meyer, J. J., Riordan, S. G., Margaret, A., Nemeth, W. A.,. 2008. Composition of grain, forage, and processed fractions from secondgeneration glyphosate-tolerant soybean, MON 89788, is equivalent to that of conventional soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4611–4622.
- Luthria D L., Biswas R., Natarajan S. 2007. Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used for The Assay of Isoflavones from Soybean. *Food Chemistry*, 105, 325-333.
- Mengenal HPLC dan Prinsip Kerjanya. 2017, <https://news.labsatu.com/mengenal-hplc-dan-prinsip-kerjanya/>, diakses tanggal 24 April 2018.

- Moldoveanu, S., David, V., 2013. *Essential in Modern HPLC Separations*. USA: Elsevier.
- Murphy PA. 1981. Phytoestrogen content of processed soybean food. *Food Technology* 36:4–50.
- Nan, G., Shi, J., Huang, Y., Sun, J., Lv, J., Yang, G., Li, Y., 2014. Dissociation constants and solubilities of daidzein and genistein in different solvents. *Journal of Chemistry Engineering, Data* 59, 1304–1311.
- Nemitz, Marina Cardoso., Helder Ferreira Teixeira., Gilsane Lino von Poser. 2015. A new approach for the purification of soybean acid extract: Simultaneous production of an isoflavone aglycone-rich fraction and a furfural derivative-rich by-product. *Industrial Crops and Products* 67, 414–421.
- Ni'mah, Rima Jannatun. 2009. Kadar Genistein dan Daidzein pada Kedelai, Ampas Tahu, dan Oncom Merah. Skripsi. IPB Bogor.
- Nur, Amaliah Firda. 2010. Uji Kandungan Senyawa Isoflavon Kalus Kedelai (*Glycine max* (L) Merr) Pada Media B5 dengan Penambah PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000. Skripsi. UIN Malang.
- Pawiroharsono, S. 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Polar protic? Polar Aprotic? Nonpolar? All About Solvents. 2012. <https://www.masterorganicchemistry.com/2012/04/27/polar-protic-polar-aprotic-nonpolar-all-about-solvents/>, diakses tanggal 25 April 2018, pukul 17.36 WIB.
- Preinerstorfer, B., & Sontag, G. 2004. Determination of isoflavones in commercial soy products by HPLC and coulometric electrode array detection. *European Food Research and Technology*, 219, 305–310.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian. 2016. *Outlook Komoditas Pertanian Sub Sektor Tanaman Pangan*. Kementerian Pertanian, Jakarta.
- Pusdatin. 2015. *Outlook Komoditas Pertanian Subsektor Tanaman Pangan*. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. Kementerian Pertanian.
- Raynie, D.E. 2006. *Modern Extraction Techniques*. *Analytical Chemistry*, Vol.78, No.12, June 15, 3997.

- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. 2004. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 522, 169–177.
- Rostagno, M.A., A. Villares., E. Guillamon., A. Garcia-Lafuente., J.A. Martinez., Review: Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2–29.
- Rouessac. F. and Rouessac, A., 2007. *Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques*, 2nd Edition, French.
- Sarkar FH, Li Y. 2003. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest.* 21(5):744-57.
- Shao, Suqin., Alison M. Duncan., Raymond Yang., Massimo F. Marcone., Istvan Rajcan., Rong Tsao. 2011. Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. *Food Research International* 44, 2425–2434.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 25, 653, 644, 668, 685, 688, 705-706.
- Subandi. 2018. Info Teknologi: Budi Daya Kedelai Secara Tumpangsari dengan Jagung pada Lahan Kering Beriklim Kering Alfisol, <http://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/>, diakses 24 Maret 2018.
- Sudaryanto, T. dan D.K.S. Swastika. 2013. *Ekonomi Kedelai Di Indonesia dalam Sumarno, Suyanto, A. Widjono, Hermanto, dan H. Kasim (Eds). Kedelai: Teknik Produksi dan Pengembangan*. Puslitbang Tanaman Pangan. Hal. 1-27.
- Sudaryono, 2007. Inovasi Rekayasa Teknologi Pengelolaan Tanaman Terpadu Kedelai. *Buletin Palawija*, Vol 14 No.2, 47-59.
- Sundari, Titik. 2015. Info Teknologi » Varietas Unggul Baru Kedelai Toleran Naungan, <http://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/>, diakses 24 Maret 2018.
- Sundari, Titik. 2016. Penampilan Galur-galur Kedelai Toleran Naungan di Dua Lingkungan. *Buletin Palawija* Vol. 14 No.2: 63-70.
- Suryana. A. 2008. *Penganekaragaman pangan dan gizi: Faktor pendukung peningkatan kualitas sumberdaya manusia*. Majalah Pangan. Media Komunikasi dan Informasi No. 52/XVII/Okttober-Desember 2008, Jakarta.
- Susanto, G.W.A., dan T. Sundari, 2010. Pengujian 15 genotipe kedelai pada kondisi intensitas cahaya 50% dan penilaian karakter tanaman berdasarkan fenotipnya. *J. Biologi Indonesia* 6(3):459–471.

- Sutrisno Koswara. 1995. *Isoflavon Senyawa Multimanfaat dalam Kedelai*, IPB, Bogor.
- Szymczak, Grazyna., Magdalena Wójciak-Kosior., Ireneusz Sowa., Karolina Zapala., Maciej Strzemski., Ryszard Kocjan. 2017. Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57,40–48.
- T.H. Kao, Y.F. Lu, H.C. Hsieh, B.H. Chen. 2004. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. *Food Res. Int.* 37, 891–900.
- Taufiq, Abdullah dan Titik Sundari. 2012. Respons Tanaman Kedelai Terhadap Lingkungan Tumbuh. *Buletin Palawija*, 23, 13-25.
- Taylor, N. B., Fuchs, R. L., MacDonald, J., Shariff, A. R., & Padgett, S. R. 1999. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4469–4473.
- Teekachunhatean S, Hanprasertpong N, Teekachunhatean T. 2013. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds Grown in Thailand. *Hindawi*, 1-12.
- Tipkanon, S., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Suwonsichon, T., Prinyawiwatkul, W., and Xu, Z., 2010. Optimizing time and temperature of enzymatic conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soy germ flour. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58: 11340–11345.
- Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone content in commercial soybean food. *J Agric Food Chem* 42:1666–1673.
- Wonorahardjo, Surjani. 2016. *Metode-Metode Pemisahan Kimia (Sebuah Pengantar)*. Jakarta: PT.Indeks.
- Valls J., Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L. 2009. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A.*; 1216(43):7143-72.
- Yamaguchi M., Igarashi A., Sakai M., Degawa H. & Ozawa Y. 2005. Prolonged Intake of Dietary Fermented Isoflavone-Rich Soybean Reinforced with Zinc Affects Circulating Bone Biochemical Markers in Aged Individuals. *Journal of Health Science*, 51(2):191-196.