

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 13
NOMOR 2
AGUSTUS 2015
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126
Tel. & Fax. +62-271-663375
E-mail: unsjournals@yahoo.com
Online: <http://biosains.mipa.uns.ac.id/C/index.htm>

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI / PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso
Gut Windarsih
Ratna Setyaningsih
Solichatun
Suratman
Tetri Widiyani

PENYUNTING AHLI:

Prof. Dr. Dayar Arbain – Universitas Andalas Padang
Prof. Dr. dr. Santosa, M.S. – Universitas Sebelas Maret Surakarta
Prof. Dr. Syamsul Arifin Achmad – Institut Teknologi Bandung
Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D. – Universitas Sebelas Maret Surakarta
Dr. Chaerul, Apt. – Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor
Dr. C.J. Sugiharjo, Apt. – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
Dr. Ir. Supriyadi, M.Sc. – Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

mempublikasikan tulisan ilmiah, baik hasil penelitian asli maupun telaah pustaka (*review*) dalam lingkup ilmu-ilmu farmasi dan biologi, dengan tema khusus biokimia bahan alam (*natural product biochemistry*). Setiap naskah yang dikirimkan akan ditelaah oleh redaktur pelaksana, redaktur ahli, dan redaktur tamu yang diundang secara khusus sesuai bidangnya. Dalam rangka menyongsong pasar bebas, penulis sangat dianjurkan menuliskan karyanya dalam Bahasa Inggris, meskipun tulisan dalam Bahasa Indonesia yang baik dan benar tetap sangat dihargai. Hingga nomor ini, jurnal dikirimkan kepada institusi-institusi yang meminta tanpa biaya pengganti, sebagai bentuk pertukaran pustaka demi mendorong penelitian, pengembangan, dan pemanfaatan bahan alam. Jurnal ini terbit dua kali setahun, setiap bulan Pebruari dan Agustus.

Kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) pada berbagai teknik pengeringan dan proporsi pelarutan

Curcuminoid content, total phenol and antioxidant activity of curcuma (*Curcuma xanthorrhiza*) extract in various drying technique and proportion of dissolution

PRIMA RISK A OKTAVIANA, KAWIJI, WINDI ATMAKA

Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 2 Juli 2015. Revisi disetujui: 15 Agustus 2015.

Abstract. Oktaviana P, Kawiji, W Atmaka. 2015. Curcuminoid content, total phenol and antioxidant activity of curcuma (*Curcuma xanthorrhiza*) extract in various drying technique and proportion of dissolution. *Biofarmasi* 13: 41-49. Curcuma (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) is one of the traditional medicine is widely spread in Indonesia and has largely grown by the community. Usefulness of curcuma mainly because of the content of the active compounds such as curcuminoid, phenolic compounds, and antioxidants. Traditional processing such as drying with the sunlight and the proportion of water solubility can lead to decreased efficacy of herbal medicine. This study aims to determine the effect of drying techniques, the color of the fabric cover and the proportion of dissolution on serum antioxidant activity of curcuminoids and curcuma extract. This research using Complete Random Program with two factors: variety of drying techniques (*solar dryer* and direct sunlight) and the color of the fabric cover (without lid, black cloth, and white cloth). The treatments were as follows: SMK (sun without fabric cover), SMP (Sunlight white cloth), SMH (Sunlight black cloth), SDK (*solar dryer* without fabric cover), SDP (*Solar dryer* white cloth), SDH (*Solar dryer* black cloth). The study consisted of two phases; the first phase carried out to extract with the treatment of curcuma drying techniques and the best cover fabric color; the second phase conducted to determine the effect of dissolution proportions (1:10, 1:12, 1:14) on the best sample. The result showed that the drying treatment using *solar dryer* and use fabric coverings obtain curcuminoid content, antioxidant activity, and total phenols are highest. But the differences did not affect the color of the fabric of active component in curcuma spices. While the ratio of the higher proportion of dissolution which showed levels of antioxidant activity and curcuminoid are lower. However, dissolution does not influence the proportion of total phenols in extracts of curcuma.

Keywords: Curcuma extract, drying, dissolution, curcuminoid, antioxidant activity, total phenol

PENDAHULUAN

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu bahan baku obat tradisional yang banyak tersebar di Indonesia dan telah banyak dibudidayakan oleh masyarakat. Berdasarkan informasi dari Badan Pusat Statistik Indonesia wilayah pengembangan temulawak di Indonesia meliputi 13 propinsi yang ada di Pulau Sumatera bagian Utara, Jawa, Bali, Kalimantan, dan Sulawesi Selatan. Rata-rata laju penambahan areal panen temulawak nasional pada tahun 2002 sampai 2006 adalah 34,86% /tahun, dan pada tahun 2006 luas panen mencapai 1.548 ha dengan rata-rata produksi adalah 17,3 ton/ha (BPS 2007). Rata-rata produksi rimpang temulawak yang demikian besar tentu tidak terlepas dari pemanfaatan akan rimpang temulawak yang terus meningkat untuk berbagai keperluan, terutama untuk jamu atau minuman segar.

Rimpang temulawak digunakan dalam pembuatan jamu secara tradisional di Indonesia karena temulawak dipercaya mempunyai manfaat yang sangat besar antara lain meningkatkan nafsu makan, anti kolesterol, anti inflamasi, anemia, antioksidan, pencegah kanker, dan anti mikroba.

Rimpang ini terdiri dari tiga fraksi yaitu fraksi pati, kurkuminoid, dan minyak atsiri.

Fraksi pati merupakan kandungan yang terbesar pada rimpang temulawak (Pati 48,18-59,64%). Makin tinggi tempat tumbuh maka kadar pati semakin tinggi. Pati rimpang temulawak terdiri dari abu, protein, lemak, karbohidrat, serat kasar, kalium, natrium, kalsium magnesium, besi, mangan, dan kadmium (Sidik et al. 1985) Fraksi kurkuminoid (1,60-2,20%) yang terdapat pada rimpang, kurkuminoid terdiri atas senyawa berwarna kuning kurkumin dan turunannya (Kunia 2006) dan minyak atsiri (6,00-10,00%) yaitu isofuranogermakren, trisiklin, allo-aromadendren, germakren, xanthorizol (Dalimartha 2000).

Dari hasil penelitian dalam dunia kedokteran modern, diketahui bahwa khasiat temulawak terutama disebabkan oleh dua kelompok kandungan kimia utamanya, yaitu senyawa berwarna kuning golongan kurkuminoid dan minyak atsiri. Kurkuminoid rimpang temulawak terdiri atas dua jenis senyawa, yaitu: kurkumin dan desmetoksikurkumin yang berkhasiat menetralkan racun, menghilangkan rasa nyeri sendi, meningkatkan sekresi

empedu, menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida darah, antibakteri, serta dapat mencegah terjadinya pelemakan dalam sel-sel hati dan sebagai antioksidan pengangkal senyawa-senyawa radikal yang berbahaya. Pada tahun 2006 dibuktikan bahwa kurkuminoid secara klinis berkhasiat mencegah penyakit jantung koroner dan meningkatkan daya tahan tubuh dan mencegah penggumpalan darah (Sidik 2006). Kurkumin juga sebagai *acnevulgaris*, anti inflamasi (anti radang), antioksidan, anti hepatotoksik (anti keracunan empedu). Kandungan kurkumin dan monodesmetoksi kurkumin yang bersifat antitumor (Kunia 2006).

Dengan mempertimbangkan hal-hal tersebut, masyarakat seringkali mengkonsumsi temulawak sebagai jamu atau obat. Meskipun telah lama digunakan sebagai bahan baku obat alami, masih banyak dijumpai pengolahan tradisional obat alami di Indonesia yang hanya melakukan ekstraksi tanpa mempertimbangkan faktor-faktor yang mempengaruhi efisiensi proses. Sehingga selama proses pengolahan temulawak kemungkinan mengalami penurunan aktivitas antioksidan dan kandungan kurkuminoidnya sangatlah besar. Proses pembuatan ekstrak temulawak yang panjang, mulai dari pemanenan sampai menjadi ekstrak yang pekat sangat memungkinkan terjadinya degradasi kurkuminoid. Stabilitas kurkuminoid terbatas dan mudah mengalami kerusakan dengan adanya cahaya, panas, oksigen, dan peroksidase (Bueser dan Yang 1990; Price dan Buescher 1996). Pengolahan tradisional yang kurang benar seperti pengeringan dengan sinar matahari dan proporsi pelarutan dengan air yang kurang tepat menyebabkan khasiat jamu tersebut menjadi turun.

Tujuan dari penelitian ini adalah: Mengetahui pengaruh teknik pengeringan terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak temulawak. Mengetahui pengaruh warna kain penutup pada proses pengeringan terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak temulawak. Mengetahui pengaruh proporsi pelarutan (perbandingan bahan dengan pelarut dalam ekstraksi) terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak temulawak.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Pangan dan Gizi Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta, dan Institut Obat dan Bahan Alam Jawa Tengah. Penelitian ini akan dilaksanakan dalam jangka waktu 4 bulan.

Bahan dan alat

Bahan utama dalam penelitian ini berupa rimpang temulawak yang kemudian dislicer dengan ukuran 3 mm dan dikeringkan pada sinar matahari langsung dan *solar dryer* dengan perlakuan kontrol, ditutup kain putih dan hitam. Untuk tahap ekstraksi temulawak digunakan pelarut air. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk analisis

antara lain: Analisis kadar kurkuminoid: kurkumin standar, etanol 96% p.a; Analisis Antioksidan: DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl) 0,04 mM, methanol p.a; Analisis Total Fenol: Na_2CO_3 alkali, Folin Ciocalteu, fenol murni. Analisis Kadar air: toluene.

Alat yang digunakan dalam proses pengeringan temulawak adalah 3 buah tampah untuk pengeringan matahari langsung, 1 buah *solar dryer* dan kain hitam dan putih (masing-masing 2 buah) untuk 3 perlakuan yaitu kontrol (tanpa ditutup kain), ditutup kain hitam dan putih untuk masing-masing metode pengeringan. Alat yang digunakan untuk proses pembubukan temulawak adalah mesin giling/mesin penepungan dengan saringan kecil dan mesin pengayak dengan ukuran 80 mesh. Alat yang digunakan untuk ekstraksi temulawak adalah beaker glass, pengaduk dan kertas saring. Sedangkan alat-alat yang digunakan untuk analisis antara lain: Analisis kadar kurkuminoid: spektrofotometer UV-Vis, beaker glass, pipet volume, gelas ukur, vortex, tabung reaksi, labu takar 10 ml. Analisis Antioksidan: spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, pipet volume, vortex, labu takar 10 ml. Analisis Total Fenol: labu takar 100 ml, gelas ukur, shaker (vortex), tabung reaksi, spektrofotometer, pengaduk. Analisis Kadar air: pipet volume, labu destilasi, pipet, alat destilasi.

Tahapan penelitian

Proses pengolahan menjadi ekstrak, rimpang temulawak harus melewati proses pengeringan dan ekstraksi terlebih dahulu. Proses pengeringan yang kurang tepat pada rimpang temulawak dapat menyebabkan kandungan kurkuminoid dan antioksidan banyak yang hilang, sehingga perlu dilakukan beberapa teknik pengeringan pada rimpang temulawak agar kandungan kurkuminoid dan antioksidan tidak terlalu banyak yang rusak. Demikian pula pada proses ekstraksi, penentuan proporsi pelarut air dan bahan yang tepat juga dapat mempertahankan mutu bahan aktif ekstrak temulawak.

Pada penelitian ini, proses pengeringan dilakukan dengan 2 cara yaitu pengeringan matahari dan *solar dryer* dengan perlakuan tidak ditutup kain, ditutup kain hitam dan ditutup kain putih untuk masing-masing pengeringan. Sedangkan untuk ekstraksi dilakukan tiga variasi yaitu 1:10, 1:12, 1:14 (b/v). Diharapkan dengan penelitian ini dapat ditentukan proses pengeringan yang paling efisien terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan pada ekstrak temulawak.

Penyiapan bahan dan perajangan

Rimpang temulawak yang digunakan berasal dari nogosari, boyolali dengan umur rata-rata 10 – 12 bulan. Kemudian rimpang tersebut dicuci sampai bersih dan dilakukan proses perajangan dengan menggunakan *slicer* manual. Proses perajangan dalam hal ini dilakukan untuk mempercepat proses pengeringan. Ketebalan rimpang temulawak mengacu pada Rahardjo dan Rostiana (2005) sekitar 3 mm yang kemudian selanjutnya ditimbang 800 gr untuk masing-masing sampel perlakuan yang berupa kontrol, ditutup kain hitam dan putih pada masing-masing proses pengeringan yaitu pengeringan dengan sinar matahari langsung maupun *solar dryer*.



Gambar 1. Pengeringan Sinar Matahari Langsung (kiri) dan Solar dryer (kanan)

Tabel 1. Macam metode analisis

Macam analisis	Metode
Kadar air	Thermovolumetri (Sudarmadji et al. 1997).
Kadar kurkuminoid	Spektrofotometer UV Visible (Zahro et al. 2009)
Kadar total fenol	Folin-Ciocalteu (Suradi 1998)
Aktivitas antioksidan	DPPH (Subagio dan Morita 2001)

Tabel 2. Rancangan Acak Lengkap

Tarf perlakuan	Perlakuan	
	SM	SD
K	SMK	SDK
P	SMP	SDP
H	SMH	SDH

Keterangan: SM = Sinar Matahari langsung, SD = Solar dryer, K= tanpa ditutup kain/control, P = ditutup kain putih, H = ditutup kain hitam

Pengeringan

Pada proses pengeringan rimpang temulawak dilakukan dengan 2 cara yaitu pengeringan langsung dan *solar dryer*, yang ditunjukkan pada Gambar 1. Setiap pengeringan dilakukan dengan perlakuan tanpa ditutup kain, ditutup kain putih dan ditutup kain hitam.

Proses pengeringan tersebut dihentikan hingga kadar air rimpang temulawak mencapai maksimal 12% (rimpang kering dapat dipatahkan) yang mengacu pada standar simplisia kering ekspor tahun 2009 (Menegristek 2009). Pengujian kadar air dilakukan dengan pengambilan sampel secara acak dengan menggunakan metode thermovolumetri (penentuan kadar air dengan cara destilasi) yang mengacu pada (Sudarmadji et al. 1997).

Penepungan

Proses penepungan pada rimpang temulawak menggunakan mesin penepung dengan saringan berukuran kecil. Yang kemudian dilakukan pengayakan dengan ukuran ayakan 80 mesh.

Ekstraksi

Ekstraksi rimpang temulawak dilakukan dengan menggunakan metode meserasi yang berupa pelarutan bahan dengan menggunakan pelarut. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut air dengan suhu 55°C yang biasa digunakan pada minuman segar maupun jamu. Untuk perbandingan bahan dengan pelarut menggunakan perbandingan 1: 10, 1: 12, 1: 14 (b/v) yang mengacu pada penelitian pendahuluan.

Penyaringan

Setelah proses ekstraksi dilakukan proses penyaringan. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan antara ampas (endapan) dengan larutan. Pada proses penyaringan campuran bahan dengan pelarut menggunakan kertas saring.

Rancangan penelitian

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap dengan dua faktorial pada tahap pertama yaitu variasi teknik pengeringan (*solar dryer* dan sinar matahari langsung) dan warna kain penutup (tanpa penutup, kain hitam dan kain putih) dengan ulangan sebanyak tiga kali tiap disampelnya. Berikut ini merupakan tabel rancangan percobaan Acak Lengkap dengan dua faktor yaitu variasi teknik pengeringan dan warna kain penutup.

Uji karakteristik bahan aktif ekstrak

Macam-macam metode yang digunakan untuk menganalisis kandungan kimia bahan ditunjukkan pada Tabel 1.

Rancangan penelitian

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap dengan dua faktorial pada tahap pertama yaitu variasi teknik pengeringan (*solar dryer* dan sinar matahari langsung) dan warna kain penutup (tanpa penutup, kain hitam dan kain putih) dengan ulangan sebanyak tiga kali tiap disampelnya. Tabel 2 merupakan rancangan percobaan Acak Lengkap dengan dua faktor yaitu variasi teknik pengeringan dan warna kain penutup.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu tahap yang pertama dilakukan untuk mengetahui hasil yang terbaik terhadap pengaruh pengeringan dan tahap kedua dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstraksi (1:10, 1:12, 1:14) pada tiga sampel yang terpilih. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan ANOVA, dan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan perlakuan pada tahap pertama kemudian dilanjutkan dengan DMRT pada tingkat $\alpha = 0,05$. Sedangkan pada tahap kedua dilakukan analisis menggunakan *One Way ANOVA*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu jenis tanaman obat yang potensial untuk dikembangkan adalah temulawak. Pada tanaman temulawak yang harus diperhatikan adalah penanganan dan pengelolaan pasca panen, karena sangat berpengaruh pada senyawa berkhasiat obat. Tanpa adanya usaha perbaikan

penanganan akan menyebabkan tidak terjaminnya kualitas produk temulawak. Menurut Bombardelli (1991), peningkatan penggunaan temulawak dalam industri obat-obatan memerlukan teknik pengolahan yang baik sehingga mutunya dapat meningkat. Mutu ekstrak dipengaruhi oleh teknik ekstraksi, kehalusan bahan, jenis pelarut, lama ekstraksi, konsentrasi pelarut, nisbah bahan dengan pelarut, proses penguapan pelarut, pemurnian dan pengeringan. Bahan aktif yang diuji dalam penelitian ini adalah kadar air, kadar kurkuminoid, aktivitas antioksidan dan total fenol.

Analisis kadar air simplisia bubuk temulawak

Untuk memanfaatkan bubuk temulawak menjadi berbagai produk obat-obatan dan agar didapatkan hasil yang baik, maka perlu mengetahui dan mempertimbangkan kondisi serta komponen-komponen yang terdapat dalam simplisia bubuk temulawak yang akan digunakan sebagai bahan baku sebelum diolah lebih lanjut. Salah satu parameter utama untuk menentukan kualitas simplisia temulawak adalah kadar airnya. Proses pengeringan harus dihentikan hingga kadar air rimpang temulawak mencapai maksimal 12% (rimpang kering dapat dipatahkan) yang mengacu pada standar simplisia kering ekspor tahun 2009 (Menegristek 2009). Pada penelitian ini, kadar air simplisia bubuk temulawak ditentukan dengan menggunakan metode thermovolumetri dan pengambilan secara acak pada masing-masing sampel. Hasil analisis kadar air pada simplisia temulawak ditunjukkan pada Tabel 3

Hasil analisis kadar air bubuk temulawak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 11,4265%. Dalam penelitian ini digunakan temulawak yang telah dikeringkan dengan sinar matahari maupun *solar dryer* kemudian dibuat bubuk, sehingga air yang terkandung didalam temulawak sebelum dilakukan pengujian sudah banyak yang teruapkan. Penghentian proses pengeringan mengacu pada Cahyano (2007 yang mengatakan bahwa pada umumnya indikator yang digunakan oleh para petani dalam memperoleh gambaran mengenai kadar air simplisia adalah jika simplisia tersebut dapat dipatahkan. Umumnya kadar air simplisia yang dapat dipatahkan kira-kira antara 10 – 12%. Ketepatan pengukuran indikator simplisia dapat dipatahkan akan mempengaruhi kadar air dan kualitas simplisia bubuk temulawak.

Dalam penelitian ini tahap pertama dikaji lebih mendalam mengenai kemungkinan pengaruh pengeringan (sinar matahari dan *solar dryer*), warna kain penutup dan proporsi pelarutan terhadap senyawa aktif pada ekstrak temulawak, yaitu: kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan. Sedangkan pada tahap yang kedua dilakukan pengujian pengaruh proporsi pelarutan terhadap tiga sampel terbaik dari pengujian tahap yang pertama.

Pengaruh teknik pengeringan dan kain penutup

Kadar kurkuminoid

Kurkuminoid rimpang temulawak adalah suatu zat yang terdiri dari campuran komponen senyawa yang bernama kurkumin, desmetoksikurkumin dan bisdesmetoksikurkumin dan mempunyai warna kuning atau kuning jingga. Menurut Bueser dan Yang (1990), stabilitas

kurkuminoid terbatas dan mudah mengalami kerusakan dengan adanya cahaya, panas, oksigen, dan peroksidase. Oleh karena itu penggunaan teknik pengeringan dan kain penutup yang tepat diduga dapat mempertahankan kadar kurkuminoid tiap bobot keringnya.

Teknik pengeringan. Pada pengeringan temulawak, panas yang diterima atau suhu pada teknik pengeringan yang berbeda akan menghasilkan kadar yang berbeda pula. Dari hasil penelitian diperoleh kadar kurkuminoid ekstrak simplisia bubuk temulawak yang berbeda pada teknik pengeringan yang juga berbeda yaitu sinar matahari langsung dan *solar dryer*. Hasil penelitian ditunjukkan pada Tabel 4.

Hasil kadar kurkuminoid menggunakan pengeringan sinar matahari langsung dan dengan menggunakan *solar dryer* ternyata menunjukan hasil yang berbeda nyata. Kadar yang diperoleh dengan pengeringan menggunakan sinar matahari langsung adalah 0,342% dan pengeringan dengan menggunakan *solar dryer* adalah 0,422%. Hasil yang diperoleh menunjukan bahwa kadar kurkuminoid pada pengeringan dengan sinar matahari langsung lebih kecil daripada kadar kurkuminoid pada simplisia temulawak yang dikeringkan dengan *solar dryer*. Hal ini menunjukan dimana pengeringan menggunakan *solar dryer* lebih dapat mempertahankan kandungan kurkuminoid dibandingkan pengeringan dengan sinar matahari langsung.

Penggunaan sinar matahari secara langsung dengan suhu yang berkisar antara 28-45°C memungkinkan terjadinya degradasi kurkuminoid. Hal tersebut yang menyebabkan rendahnya kadar kurkuminoid. Menurut Tonnesen dan Karlsen (1985), kurkuminoid terdiri dari kurkumin, demethoksikurkumin dan kurkumin merupakan senyawa yang peka terhadap lingkungan. Kurkumin dapat mengalami degradasi karena pengaruh pH, suhu, cahaya serta radikal-radikal. Green (1988), menyatakan bahwa kurkumin, dan desmetoksi kurkumin sangat terpengaruh oleh pemanasan. Namun meskipun demikian menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Pudjihartati (1999), pada kurkuminoid standar, peningkatan suhu tidak menurunkan kadar kurkuminoid. Hal ini menunjukkan kurkuminoid murni (97%) relatif stabil selama terjadinya peningkatan suhu.

Pengeringan dengan alat *solar dryer* cenderung lebih dapat mempertahankan kadar kurkuminoid karena meskipun *solar dryer* juga mengambil panas dari sinar matahari, suhu pada alat ini hanya berkisar antara 28-35°C. Hal ini disebabkan karena pada alat ini sinar matahari tidak langsung mengenai simplisia sehingga suhu yang terkena bahan dapat lebih rendah daripada pengeringan dengan sinar matahari langsung. Suhu yang lebih rendah ini menyebabkan kadar kurkuminoid lebih dapat dipertahankan meskipun untuk mencapai kadar air dibawah 12% relatif membutuhkan waktu yang lebih lama jika dibandingkan dengan pengeringan dengan sinar matahari langsung.

Penggunaan kain penutup. Dari hasil penelitian Zahro (2009) pengeringan sinar matahari langsung dapat menyebabkan terjadinya degradasi kurkuminoid akibat pengaruh sinar ultraviolet langsung yang ditandai dengan pucatnya warna pada temulawak. Selain itu menurut

Praasad et al. (2006), simplisia hasil pengeringan matahari baik dari pagi sampai siang maupun dari pagi sampai sore mempunyai warna yang lebih gelap yaitu berwarna jingga kecoklatan.

Penggunaan kain penutup diduga dapat mempertahankan kadar kurkuminoid dibandingkan tanpa ditutup kain baik untuk pengeringan sinar matahari langsung maupun *solar dryer*. Untuk hasilnya ditunjukkan pada Tabel 5. Pada Tabel 5, kadar kurkuminoid paling rendah ditunjukkan pada temulawak yang tidak ditutup oleh kain yaitu 0,355% dan berbeda nyata pada perlakuan dengan menggunakan penutup kain putih maupun hitam. Kadar kurkuminoid pada perlakuan yang ditutup kain hitam adalah 0,392% sedangkan kadar kurkuminoid pada temulawak yang dikeringkan dengan menggunakan penutup kain putih adalah sebesar 0,396%. Secara statistik kadar kurkuminoid antara kain putih dan hitam tidak berbeda nyata. Sehingga dapat disimpulkan bahwa warna kain tidak berpengaruh terhadap kadar kurkuminoid ekstrak simplisia bubuk temulawak. Namun meskipun warna kain tidak berpengaruh pada kadar kurkuminoid, akan tetapi penggunaan kain penutup berpengaruh pada kadar kurkuminoid karena temulawak yang dikeringkan tanpa ditutup kain akan terjadi degradasi senyawa kurkuminoid oleh cahaya.

Hal tersebut tidak terlepas dari sifat kurkuminoid yang sensitif terhadap cahaya dan akan mengalami dekomposisi jika terkena cahaya. Produk degradasinya adalah asam ferulat, feruloilaldehid, dihidroksinaftalen, vinilguaikol, vanillin dan asam vanilat (Price dan Buescher 1996). Bila kurkumin terkena cahaya akan terjadi dekomposisi struktur berupa siklisasi kurkumin atau degradasi struktur yang dipercepat oleh pengaruh UV (Tonnesen dan Kalrsen 1985). Sehingga penutupan dengan kain pada proses pengeringan baik menggunakan kain berwarna hitam maupun putih akan dapat menghambat degradasi kurkumin sehingga dapat mempertahankan kandungan kurkuminoid di dalam ekstrak simplisia bubuk temulawak. Hasil ini didukung oleh penelitian Safitriani (2005), kandungan kurkuminoid pada ekstrak aquades bubuk simplisia temulawak yang pengeringannya dengan penutupan kain hitam (1,25%) lebih tinggi daripada yang tanpa penutupan kain hitam (0,8%).

Kombinasi antara teknik pengeringan dan kain penutup. Pengaturan selama proses pengeringan merupakan salah satu kunci keberhasilan dalam menghasilkan simplisia yang baik, apakah itu fisik maupun kimia. Kondisi suhu pengeringan yang terlalu tinggi maupun paparan sinar UV yang terlalu lama karena terkena langsung sinar matahari dapat menguraikan zat-zat yang terkandung didalamnya. Berdasarkan permasalahan tersebut, maka perlu ditentukan kondisi pengeringan yang baik untuk mendapatkan hasil yang optimal. Perlakuan penggabungan yang tepat pada teknik pengeringan dan kain penutup dimungkinkan dapat mempertahankan senyawa aktif yang terkandung dalam temulawak selama proses pengeringan berlangsung.

Meskipun menurut hasil statistik antara teknik pengeringan dan kain penutup menunjukkan tidak ada interaksi antara keduanya yang mempengaruhi kadar kurkuminoid. Namun kedua faktor tersebut tetap

mempunyai pengaruh secara individu terhadap kadar kurkuminoid ketika kedua perlakuan dikombinasikan.

Kurkumin yang merupakan komponen utama dalam kurkuminoid mempunyai sifat yang fotosensitif menyebabkan rimpang yang dikeringkan dibawah sinar matahari langsung berwarna lebih gelap daripada yang dikeringkan dengan *solar dryer*. Rimpang temulawak yang dikeringkan pada *solar dryer* cenderung berwarna lebih terang. Parameter warna ini cenderung mengindikasikan kadar kurkuminoid yang terkandung dalam sampel. Untuk lebih mengetahui pengaruh kombinasi teknik pengeringan dan kain penutup terhadap kadar kurkuminoid ditunjukkan pada Tabel 6.

Kadar kurkuminoid lebih besar terlihat pada teknik pengeringan yang berbeda yaitu pada teknik pengeringan dengan menggunakan *solar dryer*. Penggunaan *solar dryer* cenderung lebih dapat mempertahankan kadar kurkuminoid jika dibandingkan dengan sinar matahari langsung dan secara statistik kadar kurkuminoid terlihat berbeda nyata. Untuk lebih jelasnya ditunjukkan pada Tabel 6. Pada Tabel 6, hubungan yang menunjukkan nilai kurkuminoid yang paling optimal adalah teknik pengeringan dengan menggunakan *solar dryer* dengan penutupan kain hitam dan putih. Sedangkan yang paling tidak efektif dalam mempertahankan kandungan kurkuminoid adalah teknik pengeringan dengan sinar matahari langsung tanpa penutup.

Rata-rata hasil kurkuminoid pada semua perlakuan berada pada rata-rata dibawah 0,45%. Sedangkan menurut Zahro (2009) perlakuan pengeringan dengan menggunakan sinar matahari langsung mempunyai kadar kurkuminoid sekitar 0,86% dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Photitrat et al. (2004) menyatakan bahwa diantara banyak pelarut organik, pelarut etanol adalah salah satu pelarut yang cocok untuk memisahkan kurkuminoid yang optimal. Perbedaan kadar kurkuminoid yang diperoleh kemungkinan disebabkan karena penggunaan pelarut yang berbeda, pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah air. Dan kurkuminoid mempunyai kecenderungan tidak larut terhadap air.

Total fenol

Beberapa grup senyawa kimia utama yang bersifat anti mikroba adalah fenol dan senyawa fenolik, alkohol, logam berat dan senyawanya, zat warna dan deterjen, senyawa ammonium khemosterilan. Kurkumin pada temulawak adalah suatu persenyawaan fenolitik maka mekanisme kerjanya sebagai anti mikroba akan mirip dengan sifat persenyawaan fenol lainnya (Depkes RI 1979). Fenolik merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Fenolik memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksi (OH-) dan gugus-gugus lain penyertainya. Fenol mudah teroksidasi. Fenol yang dibiarkan diudara terbuka cepat berubah warna karena pembentukan hasil-hasil oksidasi.

Tabel 3. Hasil analisis kadar air simplisia temulawak

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
Sampel	11,4029%	11,4147%	11,4620%	11,4265%

Tabel 4. Hasil analisis faktor pengeringan terhadap kadar kurkuminoid, total fenol, dan antioksidan

Pengeringan	Kadar (%)		
	Kurkuminoid	Total fenol	Antioksidan
Sinar matahari langsung	0,342a	1,068a	20,190a
<i>Solar dryer</i>	0,422b	2,321b	24,236b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf α 0,05

Tabel 5. Hasil analisis faktor kain penutup terhadap kadar kurkuminoid, total fenol, dan antioksidan

Penutup	Kadar (%)		
	Kurkuminoid	Total fenol	Antioksidan
Tanpa penutup	0,355a	1,286a	20,693a
Kain penutup hitam	0,392b	1,888b	22,791b
Kain penutup putih	0,396b	1,910b	23,154b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf α 0,05

Tabel 6. Hasil analisis pengaruh kombinasi pengeringan dan kain penutup terhadap kadar kurkuminoid, total fenol, dan antioksidan

Sampel	Kadar (%)		
	Kurkuminoid	Total fenol	Antioksidan
Sinar matahari tanpa penutup	0,308	0,685	18,680a
Sinar matahari penutup putih	0,359	1,266	21,085b
Sinar matahari penutup hitam	0,358	1,253	20,805b
<i>Solar dryer</i> tanpa penutup	0,402	1,887	22,707c
<i>Solar dryer</i> penutup putih	0,439	2,566	25,224d
<i>Solar dryer</i> penutup hitam	0,425	2,511	24,776d
Vitamin C 500 ppm	-	-	36,624

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf α 0,05

Tabel 7. Hasil analisis pengaruh proporsi pelarutan terhadap kadar kurkuminoid, total fenol, dan antioksidan

Proporsi pelarut	Kadar (%)		
	Kurkuminoid	Total fenol	Antioksidan
1: 14	0,262a	2,809a	11,270a
1: 12	0,319b	3,233a	19,226b
1: 10	0,323b	3,258a	22,788b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf α 0,05

Teknik pengeringan. Pada prinsipnya pengeringan *solar dryer* pada temulawak adalah pengeringan dengan bantuan sinar matahari yang menggunakan alat sederhana sehingga pengeringan yang dihasilkan lebih efektif. Pengeringan ini terjadi dari pemanasan yang berasal dari dua arah, yaitu dari sinar matahari secara langsung (radiasi) dan aliran udara panas dari bawah (konveksi) yang kemudian di buang keluar dengan menggunakan blower. Walaupun suhu pengeringan pada *solar dryer* sulit dikontrol cenderung sama seperti umumnya pengeringan dengan menggunakan sinar matahari langsung, tetapi pengeringan ini cukup efektif untuk mempertahankan kandungan total fenol pada temulawak yang dibuktikan dari hasil pada Tabel 4 bahwa perlakuan pengeringan *solar dryer* memiliki total fenol yang lebih tinggi dari pada pengeringan sinar matahari langsung.

Pengeringan dengan sinar matahari langsung menunjukkan kadar sebesar 1,068% dan berbeda nyata dengan teknik pengeringan dengan *solar dryer* sebesar 2,321%. Hal ini disebabkan pada pengeringan dengan sinar matahari langsung menyebabkan komponen fenol lebih mudah menguap. Sedangkan penggunaan *solar dryer* cenderung dapat menghambat penguapan tersebut karena kelembapannya yang tinggi. Meskipun demikian penggunaan *solar dryer* cenderung memiliki waktu yang lebih lama dalam mengeringkan simplisia.

Penggunaan kain penutup. Pada pengaruh penggunaan kain penutup didapatkan hasil bahwa total fenol pada simplisia temulawak yang tidak ditutup adalah sebesar 1,286%, penggunaan kain penutup hitam total fenol 1,888% dan kain putih 1,910% (Tabel 5).

Pada simplisia yang tidak ditutup kain secara statistik menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada simplisia yang ditutup kain baik hitam maupun putih. Hal ini disebabkan bawa pengeringan tanpa kain penutup menyebabkan penguapan yang terlalu cepat sehingga penggunaan kain penutup disini lebih dapat melindungi minyak atsiri yang juga merupakan senyawa fenol dari penguapan yang terlalu cepat. Menurut Depkes RI (1985), simplisia yang berupa rimpang dikeringkan dengan cara dirajang dan dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam untuk menghindari penguapan terlalu cepat yang dapat menurunkan mutu minyak atsiri dalam bahan.

Kombinasi antara teknik pengeringan dan kain penutup. Berdasarkan analisa statistik teknik pengeringan dan kain penutup menunjukkan tidak ada interaksi dalam pengaruhnya terhadap total fenol sampel karena nilai Sig. > 0,05. Namun pengeringan dan penutupan mempunyai pengaruh secara individu dalam kombinasi penggunaan teknik pengeringan dan kain penutup pada pengaruhnya terhadap total fenol. Penggunaan *Solar dryer* dengan maupun tanpa penggunaan kain penutup menunjukkan hasil kadar total fenol yang lebih besar daripada menggunakan teknik pengeringan sinar matahari secara langsung.

Senyawa fenol merupakan senyawa yang bersifat antioksidan dan sifat antioksidan tersebut akan teroksidasi dengan adanya cahaya, panas dan oksigen (Zapsalis dan Beck 1985). Dimana penggunaan *solar dryer* dan kain penutup dapat meminimalkan terjadinya kontak oksigen dan sinar UV secara langsung karena desain *solar dryer*

yang seluruhnya tertutup oleh plastik bening dengan blower diatas sehingga pengeringan *solar dryer* merupakan pengeringan yang efektif untuk mempertahankan kandungan senyawa fenol dari suhu, oksigen dan sinar UV. Demikian pula pada penggunaan kain penutup dalam proses pengeringan dapat melindungi bahan yang dikeringkan sehingga dapat meminimalkan terjadinya kerusakan pada bahan tersebut. Untuk lebih jelasnya ditunjukkan pada Tabel 6. Berdasarkan Tabel 6 total fenol yang paling tinggi adalah pada perlakuan dengan teknik pengeringan *solar dryer* dengan ditutup kain putih, dan yang paling rendah adalah pada pengeringan sinar matahari langsung tanpa ditutup kain.

Aktivitas antioksidan

Temulawak merupakan salah satu sumber antioksidan alami. Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam (Suhartono 2002). Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidasi lipid pada makanan. Meningkatnya minat untuk mendapatkan antioksidan alami terjadi beberapa tahun terakhir ini. Antioksidan alami umumnya mempunyai gugus hidroksi dalam struktur molekulnya (Sunarni 2005). Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan (Rohdiana 2001).

Dari sejumlah penelitian pada tanaman obat dilaporkan bahwa banyak tanaman obat yang mengandung antioksidan dalam jumlah besar. Efek antioksidan disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti yang terdapat pada minyak atsiri. Selain itu terutama adanya kurkuminoid pada temulawak yang merupakan molekul dengan kadar polifenol yang rendah namun juga memiliki potensi sebagai antioksidan. Menurut Majeed et al. (1995), kurkuminoid tersebut mempunyai kemampuan mencegah terbentuknya peroksida.

Mekanisme penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menambahkan larutan DPPH Radical Scavenging Ability sebagai radikal sintesis. Metode DPPH dipilih karena sederhana dan efektif untuk evaluasi aktivitas antioksidan dari bahan alam. Besar aktivitas antioksidan pada ekstrak simplisia bubuk temulawak ditunjukkan dengan semakin besarnya penurunan intensitas warna ungu pada larutan yang dilakukan dengan mengamati penurunan absorbansi pada panjang gelombang 515 nm. Pokorny et. al (2001) menjelaskan bahwa penurunan absorbansi terjadi karena penambahan elektron dari senyawa antioksidan pada elektron yang tidak berpasangan pada gugus hidrogen dalam struktur senyawa DPPH.

Kekurangan dari antioksidan adalah merupakan zat kimia yang secara bertahap akan teroksidasi dengan adanya efek seperti cahaya, panas, logam peroksida atau secara

langsung bereaksi dengan oksigen. Oleh karena itu perlakuan selama pengeringan dan pelarutan akan mempengaruhi aktivitas antioksidan yang ada.

Teknik pengeringan. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan tujuan mengetahui aktivitas antioksidan pada sampel temulawak yang telah dikeringkan pada sinar matahari langsung dan pada *solar dryer*. Dari pegujian sesuai prosedur yang ada diperoleh aktivitas antioksidan pada penggunaan sinar matahari secara langsung simplisia bubuk temulawak mempunyai aktivitas antioksidan 20,190% lebih kecil jika dibandingkan aktivitas antioksidan pada ekstrak simplisia bubuk temulawak yang menggunakan pengeringan *solar dryer* yaitu sebesar 24,236%. (Tabel 4). Hal ini menunjukkan penggunaan *solar dryer* dapat mempertahankan aktivitas antioksidan, jika dibandingkan dengan penggunaan sinar matahari langsung.

Dari hasil analisis statistik ditunjukkan bahwa setiap perlakuan teknik pengeringan menunjukkan adanya beda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh penggunaan sinar matahari langsung dan *solar dryer* seperti yang ditampilkan pada Tabel 4 memberikan hasil yang berbeda nyata pada aktivitas antioksidan. Perbedaan ini disebabkan antara lain adalah sifat antioksidan yang rentan terhadap suhu, oksigen, pH, peroksida dan cahaya. Penggunaan *solar dryer* cenderung lebih dapat melindungi komponen-komponen aktif seperti kurkuminoid dan senyawa-senyawa fenol, karena pengaruh pengeringan dengan sinar matahari langsung dapat menyebabkan degradasi kurkuminoid karena cahaya dan terjadinya kerusakan sebagian senyawa fenol, akibatnya terjadi penurunan aktivitas antioksidan pada simplisia bubuk temulawak.

Selain kurkuminoid dan minyak atsiri yang berperan sebagai antioksidan pada temulawak Kinsella et al. (1993) menyebutkan bahwa senyawa fenol dapat berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya meniadakan radikal-radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipida. Kemampuan antioksidan yang dimiliki oleh temulawak serta kandungan senyawa fenolnya menjadi peran penting dalam peningkatan aktivitas antoksidan pada sampel yang telah dikeringkan.

Penggunaan kain penutup. Aktivitas antioksidan pada perlakuan tanpa ditutup kain mempunyai kadar sebesar 20,693% dan untuk yang ditutup kain hitam adalah sebesar 22,791% sedangkan pada kain putih adalah 23,154% (Tabel 5). Perlakuan dengan menggunakan penutup kain cenderung mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada yang tidak ditutup kain dan menunjukan hasil yang berbeda nyata.

Simplisia yang dikeringkan dan tidak ditutup dengan kain terjadi interaksi dengan oksigen dan cahaya secara langsung. Kedua faktor ini dapat menyebabkan rusaknya antioksidan. Penutupan dengan kain dapat menghambat interaksi tersebut sehingga menyebabkan penutupan dengan kain baik hitam maupun putih dapat mempertahankan aktivitas antioksidan dalam temulawak

Kombinasi antara antara teknik pengeringan dan kain penutup. Berdasarkan Tabel 6 aktivitas antioksidan yang paling tinggi adalah pada perlakuan dengan teknik pengeringan *solar dryer* dan dengan ditutup kain putih, dan

yang paling rendah adalah pada pengeringan sinar matahari langsung tanpa ditutup kain. Meskipun berdasarkan analisa statistik teknik pengeringan dan kain penutup menunjukkan tidak ada interaksi antar kedua faktor tersebut terhadap aktivitas antioksidan sampel. Namun kedua faktor tersebut tetap mempunyai pengaruh secara individu pada kombinasi perlakuan itu meskipun tidak saling berhubungan.

Antioksidan alam antara lain adalah fenol, dan polifenol seperti tokoferol, flavon, koumin, asam sinamat, kurkumin. Bahan alami lain yang mempunyai efektivitas antioksidan sinergis adalah asam askorbat, asam amino dan protein hasil hidrolisisnya (Hartiwi 2001). Kombinasi antara teknik pengeringan dan kain penutup diduga lebih dapat melindungi senyawa aktif ini seperti yang terlihat pada Tabel 6.

Nilai aktivitas antioksidan sampel rata-rata berada dibawah aktivitas antioksidan vitamin C 500 ppm yaitu sebesar 36%. Meskipun demikian hal ini tetap menunjukkan bahwa ekstrak simplisia temulawak berpotensi sebagai salah alternatif antioksidan alami. Beberapa penelitian bahkan menunjukkan bahwa salah satu senyawa pada temulawak yaitu kurkumin mempunyai efek antioksidan yang lebih tinggi dibanding dengan asam sitrat dan asam askorbat. Hal ini disebabkan penstabilan radikal pada kurkumin berjalan baik. Efek antioksidatif terjadi karena adanya penggabungan radikal membentuk hasil non radikal (Hidaka 1999).

Pengaruh proporsi pelarutan

Pada penelitian tahap ke dua ini dilakukan analisis kimia terhadap sampel yang terpilih pada tahap pertama yaitu sampel ekstrak simplisia temulawak pada teknik pengeringan *solar dryer* tanpa ditutup kain (kontrol), ditutup kain hitam dan putih. Pemilihan ketiga sampel didasarkan pada hasil uji pada tahap pertama yang mempunyai kadar kurkuminoid, aktivitas antioksidan dan total fenol paling tinggi dari keseluruhan sampel.

Kadar kurkuminoid

Menurut Majeed et al. (1995), ethanol dan aseton merupakan pelarut yang baik bagi kurkuminoid tetapi ethanol lebih aman digunakan untuk bahan pangan. Kurkuminoid cenderung tidak larut dalam air tetapi biasanya untuk mengkonsumsi temulawak digunakan air sebagai pelarut. Penggunaan perbandingan jumlah pelarut dalam penelitian ini adalah air dan bahan baku yang tepat diduga akan berpengaruh pada kadar kurkuminoid yang terlarut dalam air. Pengaruh proporsi pelarutan terhadap kadar kurkuminoid ditunjukkan pada Tabel 7.

Dari data yang terlihat pada Tabel 7 perbandingan bahan baku dan pelarut atau disebut juga dengan proporsi pelarutan menunjukkan hasil bahwa semakin tinggi rasio antara bahan dan pelarut menunjukkan semakin rendah kadar kurkuminoid yang terkandung didalamnya. Hal ini terlihat pada rasio 1:14 kadar sebesar 0,262% berbeda nyata dengan proporsi pelarutan 1:12 sebesar 0,319% dan 1:10 sebesar 0,323%. Namun proporsi pelarutan pada rasio 1:12 dan 1:10 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata secara statistik.

Kadar total fenol

Prinsip ekstraksi dengan pelarut yaitu memisahkan dua komponen atau lebih dalam bahan berdasarkan perbedaan kelarutan komponen tersebut dalam pelarut yang digunakan. Menurut Sudarmadji et al. (1997) polaritas menunjukkan tingkat kelarutan bahan dalam air di satu sisi dan pelarut organik disisi lain yang berlawanan. Yang cenderung lebih larut air disebut memiliki sifat yang polar dan yang cenderung larut dalam pelarut organik disebut non polar. Menurut Przybylski (1998) dalam Dzakiyyah (2000), senyawa dengan polaritas tinggi sangat cocok untuk ekstraksi senyawa-senyawa fenol.

Berdasarkan tabel diatas data yang diperoleh berturut-turut dengan proporsi pelarutan 1:10, 1:12, dan 1:14 adalah 3,258%, 3,233%, 3,258%. Ketiga perbandingan bahan baku dan pelarut diatas tidak menunjukkan adanya beda nyata secara statistik. Hal ini menunjukkan bahwa proporsi pelarutan tidak mempengaruhi komponen senyawa fenol pada ekstrak temulawak. Karena senyawa fenol mempunyai keterbatasan dalam berikatan dengan air.

Aktivitas antioksidan

Ekstraksi bahan bioaktif dari rimpang temulawak telah dilakukan dengan menggunakan heksan, etil asetat, etanol dan metanol. Berdasarkan uji kemampuan menangkap radikal (Radical Scavenging Activity) diperoleh secara berturut-turut bahwa ekstrak etanol lebih kuat dari pada ekstrak etil asetat, ekstrak metanol dan ekstrak heksan (Sukardi 2002).

Pelarutan dengan air yang digunakan mendapatkan hasil yang berbeda pada proporsi pelarutan yang berbeda. Pada proporsi antara bahan baku dan pelarut sebanyak 1:10, 1:12 dan 1:14 menunjukkan aktivitas berturut-turut dengan nilai sebesar 22,780%, 19,226%, dan 11,270%. Pada proporsi 1: 10 dan 1: 12 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata secara statistik, namun menunjukkan beda nyata jika dibandingkan dengan proporsi 1:14. Semakin tinggi rasio antara air dan bahan menunjukkan bahwa semakin rendah kemampuan dalam penghambatan oksidasi. Hal ini dapat dimungkinkan bahwa senyawa yang terekstrak dalam pelarut air terdiri dari senyawa yang polar dan sifat antioksidatifnya sangat rendah.

KESIMPULAN

Perlakuan pengeringan dengan menggunakan *solar dryer* mendapatkan kadar kurkuminoid, aktivitas dan antioksidan dan total fenol lebih besar jika dibandingkan dengan pengeringan sinar matahari langsung. Penggunaan kain penutup mampu mempertahankan kandungan kurkuminoid, aktivitas antioksidan dan total fenol jika dibandingkan dengan tanpa penggunaan kain penutup. Warna kain tidak berpengaruh terhadap komponen aktif pada simplisia temulawak. Semakin tinggi proporsi pelarutan, kadar kurkuminoid dan aktivitas antioksidan semakin rendah. Proporsi pelarutan tidak berpengaruh terhadap total fenol pada ekstrak simplisia temulawak

DAFTAR PUSTAKA

- Bombardelli E. 1991. Technologies for Processing of Medicinal Plants, in the Medicinal Plant industry, CRC Press, Florida, USA.
- BPS. 2007. Statistik Tanaman Obat-obatan dan Hias. Jakarta.
- Buescher R, Yang L. 1990. Aluminium stabilizes turmeric in pickle brine against decomposition by light, heat and peroxidase. *J Food Biochem* 14: 263-271.
- Cahyono B. 2007. Standardisasi Bahan Baku Obat Alam di Jawa Tengah, Seminar Nasional, Penggunaan Obat Bahan Alam untuk Kesehatan, Semarang, 29 Agustus 2007.
- Dalimartha S. 2000. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Depkes RI. 1985. Cara Pembuatan Simplisia. Departemen Kesehatan RI. Indonesia. Jakarta
- Dzakiyyah A. 2000. Evaluasi Antioksidan ekstrak rimpang kunyit, kencur, temu giring dan temu kunci menggunakan system DPPH dan linoleat. Skripsi FTP. UGM. Yogyakarta.
- Green C.L, Robbins S.R.J, Purseglove J.W, Brown G.G. 1988. Spices. Vol. II. Logman Scientific and Technical, New York.
- Hartiwi. 2001. Pengaruh Waktu Pemanasan Dan kombinasi ekstrak jahe, kunyit, kencur, dan temulawak terhadap daya tangkap radikal bebas (DPPH). [Skripsi]. UGM. Yogyakarta.
- Hidaka K, Matsuda T, Takea T. 1999. Chemical studies on antioxydant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *J. Agric Food Chem* 47 (1): 71-77.
- Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanmer J. 1993. Possible mekanisme for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *J Food Technol* 4: 85-89
- Kunia K. 2006 Temulawak, Ginsengnya Indonesia. http://www.pikiranrakyat.net.id/ind/cakrawala_temulawak. (31 Desember 2009).
- Majeed M, Vladimir B, Uma S, Rjendran R. 1995. Curcuminoids Antioxidants Phytonutrients. Nutriscience. Publ. Inc., New Jersey.
- Menegristek. 2009. Budidaya Temulawak. Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Jakarta.
- Depkes RI. 1979. Buku Penuntun Ilmu Gizi Umum. Depkes RI, Jakarta.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. 2001. Antioxidant in Food. CRC Press Cambridge. England.
- Pothitirat W, Supabphol R, Dritsanapan W. 2004. Comparison of Free Radical Scavenging Activity and Curcuminoids Content of Turmeric Extracts Using Different Methods of Extraction, Mahidol Univ J Pharmaceut Sci 31: 3-4.
- Praasad J, Vijay V.K, Tiwari G.N, Sorayan V.P.N. 2006. Study on performance evaluation of hybrid drier for turmeric (*Curcuma longa* L.) Drying at Village Scale. *J Food Eng* 4: 497-502.
- Price LC, Buescher RW. 1996. Decomposition of turmeric curcuminoids as affected by lighth, solvent and oxygen. *J Food Biochem* 20: 125-133.
- Pudjihartati L. 1999. Stabilitas Antioksidan Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*) selama penyimpanan Umbi dan Pemanasan. [Thesis]. UGM, Yogyakarta.
- Rahardjo M, Rostiana O. 2005. Budidaya tanaman temulawak. Sirkuler No. 11. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Jakarta.
- Rohdiana D. 2001. Aktivitas daya tangkap radikal polifenol dalam daun teh. *Majalah Jurnal Indonesia* 12 (1): 53-58.
- Safitriani RR. 2005. Potensi Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Robx.) sebagai Sumber Antioksidan Alami. [Thesis]. UGM, Yogyakarta.
- Sidik, Mulyono MW, Muhtadi A. 1985, Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Robx.), Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phytomedica, Jakarta.
- Sidik. 2006. Gerakan Nasional Minum Temulawak. http://www.majalah-farmacia.comrubrikone_news/ (31 Desember 2009).
- Subagio A, Morita N. 2001. No Effect of Esterification with Fatty Acid on Antioxidant Activity of Lutein. *Food Res. Int.* 34: 315-320
- Sudarmadji, Suhardi, Haryono B. 1997. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty, Yogyakarta.
- Suhartono E, Fujiati, Aflanie I. 2002. Oxygen toxicity by radiation and effect of glutamic piruvat transamine (GPT) activity rat plasma after vitamine C treatmen. Internatinal Seminar on Environmental Chemistry and Toxicology, Yogyakarta.
- Sunarni T. 2005. Aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas beberapa kecambah dari biji tanaman Familia Papilionaceae. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 (2): 53-61.
- Suradi. 1998. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Jambu Air (*Eugena aquae* Born), Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn), Jambu Mete (*Anacardium occidentale* Linn), dan Langsep (*Lansium domesticum* Corr). [Skripsi]. UGM, Yogyakarta.
- Tonnesen H, Karlsen J. 1985. Studies on curcuminoid and curcuminoids. V. Alkaline degradation of curcumin. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 180: 132-134.
- Zahro L. 2009. Profil tampilan fisik dan kandungan kurkuminoid dari simplisia temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) pada beberapa metode pengeringan. *Jurnal Sains & Matematika* 17 (1): 24-32.
- Zapsalis C, Beck A. 1985. Food Chemistry and Nutritional Biochemistry. John Wiley and Sons, New York.

Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku koro pedang (*Canavalia ensiformis*)

The characteristics of the bioactive compounds of isoflavone and study of antioxidant activity of the ethanol extract of tempeh made of jack bean (*Canavalia ensiformis*)

YURINA ISTIANI, SRI HANDAJANI, ARTINI PANGASTUTI

Prodi Biosains, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 21 Januari 2015. Revisi disetujui: 6 Juni 2015.

Abstract. Istiani Y, S Handajani, A Pangastuti. 2015. The characteristics of the bioactive compounds of isoflavone and study of antioxidant activity of the ethanol extract of tempeh made of jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Biofarmasi* 13: 50-58. The objectives of the research were to find out: (i) the contents of the isoflavone compounds of daidzein, genistein, glisitein, and factor-2, and (ii) the antioxidant activity of jack bean and its tempeh product. The material used for the research was jack bean with the treatment of the whole and chopped seed size and length of fermentation (0, 1, 2, 3, 4 days) compared with the ethanol extract of the soybean and its tempeh product and several natural antioxidants (α -tocopherol, β carotene, and Vitamin C) and BHT synthetic antioxidant. The method used to extract the isoflavone compounds was maceration, and the method used to identify the isoflavone compounds was that of HPLC. The test of antioxidant activity used the method of DPPH. The analysis of the data of the test of antioxidant activity used the method of General Linear Model -Univariate and Compare Means -One-Way Anova. The largest total content of the isoflavone compounds of the tempeh made of the whole and chopped jack bean took place in the 1-day fermentation, that is, 0.786% and 0.590% while the largest total content of the isoflavone compounds of the tempeh made of the soybean took place in the 2-day fermentation, that is, 1.812%. The highest antioxidant activity of the tempeh made of the whole and chopped jack bean and soybean took place in the 3-day fermentation, that is, 77.32%, 68.63%, and 81.43% respectively. The antioxidant activity of the tempeh made of the soybean was relatively similar to that of BHT, that is, at the range of 81%, and the antioxidant activity of the tempeh made of the whole jack bean was relatively similar to those of vitamin C and α -tocopherol, that is, ranging from 75% to 77%. The oxidant activity of the tempeh made of the chopped jack bean was lower compared to those of soybean, natural antioxidant (Vitamin C and α -tocopherol and BHT) significantly different that is 69%, and β carotene (45%) had the lowest antioxidant activity.

Keywords: Jack bean, tempeh, antioxidant, isoflavone

PENDAHULUAN

Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis tanaman. Namun tidak seperti metabolit sekunder lainnya, senyawa ini tidak disintesis oleh mikroorganisme. Oleh karena itu, tanaman merupakan sumber senyawa isoflavon di alam (Anderson et al. 1998). Isoflavon yang terdapat dalam biji kedelai dormant adalah dalam bentuk isoflavon glikosida yaitu daidzin, genistin dan glisitin. Isoflavon glikosida tersebut mempunyai aktivitas fisiologis yang rendah. Pawiroharsono (1995), menyatakan bahwa 99% isoflavon glikosida yang terdapat pada biji kedelai, selama proses perendaman (dalam pembuatan tempe) dapat terhidrolisis menjadi aglukan isoflavon dan glukosa. Aglukan isoflavon yang mempunyai aktivitas fisiologis tinggi tersebut adalah genistein (5,7,4'-trihidroksi isoflavon), daidzein (7,4'-trihidroksi isoflavon), dan glisitein (6-metoksi-7,4'-trihidroksi isoflavon), selanjutnya pada proses fermentasi kedelai rendam dengan kapang *Rhizopus oligosporus*, daidzein dapat mengalami proses hidroksilasi sehingga

menjadi senyawa faktor-2 (6,7,4'-trihidroksi isoflavon) (Gyorgy et al. 1964). Faktor-2 mempunyai aktivitas antioksidan dan antihemolisis yang lebih baik dari daidzein dan genistein. Dengan demikian di dalam tempe kedelai dapat kita jumpai 4 jenis isoflavon yaitu daidzein, genestein, glisitein dan faktor-2.

Salah satu aktivitas fisiologis yang menonjol dari isoflavon daidzein, genestein, glisitein dan faktor-2 adalah aktivitas antioksidan. Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid. Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan pada isoflavon sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dini, mencegah penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, jantung koroner, *diabetes militus*, dan kanker.

Pada umumnya selama ini antioksidan yang digunakan sebagai pengawet pada bahan makanan adalah antioksidan sintetik seperti *Butylated Hydroxyanisole* (BHA),

Butylated Hydroxytoluene (BHT), *Propyl Gallat* (PG) dan *Etylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA). Pemanfaatan zat antioksidan sintetis dapat menimbulkan gangguan kesehatan bagi konsumen antara lain gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan (Suryo dan Tohari 1995). Untuk itu perlu dicari alternatif lain untuk mengatasi permasalahan tersebut. Salah satu cara adalah dengan mengganti pemanfaatan antioksidan sintetis dengan antioksidan alami. Mengingat adanya kandungan isoflavon dalam kedelai yang dapat berfungsi sebagai antioksidan, maka tempe kedelai dapat direferensikan sebagai bahan baku sumber antioksidan alami. Disamping sebagai antioksidan, isoflavon daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2 juga mempunyai khasiat lain diantaranya sebagai estrogenik, anti inflamasi, anti tumor atau anti kanker, anti hemolisis, anti penyempitan pembuluh darah, anti kolesterol, menurunkan kadar trigliserida VLDL (*very low density lipoprotein*) dan LDL (*low density lipoprotein*) serta meningkatkan HDL (*high density lipoprotein*) (Pawiroharsono 2001). Dengan demikian isoflavon dari tempe kedelai selain berkhasiat sebagai antioksidan juga mempunyai khasiat ganda seperti yang tertera diatas.

Tempe kedelai merupakan salah satu makanan tradisional asli Indonesia yang sangat digemari oleh penduduk Indonesia dan sering dijumpai sebagai makanan dalam menu sehari-hari, baik sebagai lauk pauk maupun sebagai makanan sambilan (Ariani 1997). Masyarakat Indonesia yang secara tradisi telah lama mengkonsumsi tempe, banyak diuntungkan dari berbagai faktor karena produk tersebut mengandung nilai gizi tinggi, khususnya sebagai sumber protein dan mengandung senyawa aktif isoflavon (Pawiroharsono 2001).

Pada saat ini tengah terjadi dilema dalam memproduksi bahan pangan berbahan baku kedelai (termasuk tempe), karena harganya yang melambung. Penurunan harga kedelai sulit terjadi karena kedelai diperebutkan sebagai bahan pangan (*food*), pakan (*feed*) dan bahan bakar (*fuel*) (Suharyanto 2008). Untuk itu perlu alternatif lain, yaitu dengan menggali potensi bahan pangan lokal yang murah dan melimpah di Indonesia sebagai pengganti kedelai dan sumber antioksidan alami khususnya isoflavon.

Handayani et al. (1996) menyatakan bahwa Indonesia mempunyai banyak jenis *legume* yang beberapa diantaranya belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu jenis *legume* yang cocok dibudidayakan di Indonesia dan dapat berfungsi sebagai bahan pangan tetapi produk olahannya masih jarang dikonsumsi yaitu koro pedang (*Canavalia ensiformis*).

Tujuan penelitian ini adalah: mengetahui isoflavon jenis apa saja yang terkandung dalam biji koro pedang dan produk tempennya bentuk utuh maupun Rajang; mengetahui lama waktu fermentasi optimum untuk menghasilkan aktivitas antioksidan yang optimum pada perlakuan fermentasi dengan biji bentuk utuh dan Rajang; mengetahui aktivitas antioksidan koro pedang dibandingkan dengan antioksidan alami (α -tokoferol, β -karoten, dan vitamin C) maupun antioksidan sintetis (BHT).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada pertengahan bulan Maret sampai Juli 2009, dan penelitian ini dilakukan di: Laboratorium Kimia FKIP UNS Surakarta. Sub Laboratorium Biologi Pusat MIPA UNS. Laboratorium Kimia Organik F.MIPA UGM Yogyakarta.

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah: Kedelai Kuning Madura dan koro pedang. Inokulum *Rhizopus oligosporus* ("RAPRIMA", produk dari LIPI). Etanol 70 % (*Merck*); Metanol p.a (*Merck*); Standar Genistein (*Sigma Chemical Co.*); standar Daidzein (*Sigma Chemical Co.*); Standar Glisitein (*Sigma Chemical Co.*); Standar Faktor-2 (*Sigma Chemical Co.*); DPPH (*Sigma Chemical Co.*); BHT (*Butyl Hidroksi Toluena*) (*Sigma Chemical Co.*); β -karoten (*Sigma Chemical Co.*); α -tokoferol (*Sigma Chemical Co.*); Metanol gradient grade for liquid chromatography (*Merck*); Aluminium foil; Akuades; Kertas saring.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Alat *rotary vacuum evaporator* (*Buchi*); Neraca analitik (*Sartorius*); Alat HPLC (*Perkin Elmer LC 295*); Blender (*Philip*); Pipet mikro; Alat *Spektrofotometer UV - VIS* (*Shimadzu*); Alat-alat gelas merek *Pyrex*.

Pembuatan tempe

Pembuatan tempe kedelai

Persiapan bahan. Penyiapan bahan baku berupa kedelai kuning Madura 500 gr dipilih biji-biji yang bernas, licin dan mengkilat kulitnya.

Perendaman. Perendaman dilakukan dengan merendam 500 gr kedelai kuning Madura dalam 1000 ml air bersih selama 24 jam, dengan penggantian air rendaman setiap 8 jam.

Pengupasan kulit. Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi.

Perebusan. Biji direbus dalam air sebanyak 1000 ml selama 45 menit, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan sampai biji kedelai dalam keadaan lembab (tidak terlalu basah).

Penambahan inokulum. Setelah sampel dalam keadaan tidak terlalu basah, ditaburi ragi/inokulum sebanyak 0,5 gr untuk 500 gr sampel. Inokulum yang digunakan adalah *Rhizopus oligosporus*, produk dari LIPI dengan merek RAPRIMA.

Pemeraman. Sampel yang sudah diberi inokulum dicampur dengan rata kemudian dibungkus dengan menggunakan daun pisang dan diperam selama 24, 48, 72, 96 jam dalam suhu kamar (27°C) dan terbentuklah tempe kedelai.

Pembuatan tempe koro pedang utuh dan rajang

Persiapan bahan. Tahap pertama dimulai dengan penyiapan bahan baku yaitu koro pedang (*Canavalia ensiformis*). Dengan menggunakan 2 perlakuan biji yaitu utuh dan dirajang.

Perendaman. Perendaman dilakukan dengan merendam 1000 g biji koro pedang dalam 2000 ml air bersih selama

tiga hari untuk menghilangkan senyawa glukosianida (HCN). Selama 24 jam sekali dilakukan penggantian air sebanyak tiga kali, agar air yang digunakan untuk merendam koro tidak jenuh.

Pengupasan kulit. Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi.

Perlakuan. Biji koro pedang yang telah dikuliti, selanjutnya dilakukan perlakuan ukuran biji yaitu utuh dan dirajang masing-masing 500 g.

Teknik pemanasan/perebusan. Biji koro pedang utuh dan rajang direbus dalam air masing-masing sebanyak 1000 ml selama 45 menit.

Penirisan dan pemberian inoculum. Koro pedang yang telah direbus, ditiriskan atau didinginkan selama 30 menit setelah itu diberi inoculum.

Pengemasan. Koro pedang yang telah diberi inoculum dengan dua perlakuan ukuran biji, yaitu utuh dan rajang di bungkus dengan daun pisang. Kemudian ditutup rapat dan diikat dan diperam selama 24, 48, 52, 96 jam dalam suhu kamar (27°C) dan terbentuklah tempe koro pedang dengan perlakuan biji utuh dan rajang.

Ekstraksi isoflavan dengan metode maserasi

Sebanyak 100gr sampel diblender hingga terbentuk bubur, kemudian dimaserasi dalam 250 ml etanol 70 % selama 24 jam, kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Residu ditambah dengan 100 ml etanol 70 %, kemudian dimaserasi selama 24 jam, kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Residu kedua ditambah dengan 100ml etanol 70 %. Filtrat hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental di oven selama 30 menit dengan suhu 50oC sehingga diperoleh isolat. Isolat yang dihasilkan kemudian diidentifikasi isoflavonnya dengan metode HPLC.

Metode identifikasi isoflavan

Identifikasi isoflavan dengan menggunakan metode HPLC dilakukan dengan pengkondisian instrumen HPLC dan pembuatan larutan sampel. Larutan sampel dibuat dengan mengambil 1 mg isolat isoflavan hasil ekstraksi lalu masing-masing dilarutkan dalam etanol 10 mL. Larutan kemudian disentrifuge lalu diambil 20 µL dengan alat injeksi. Selanjutnya sampel diinjeksikan ke dalam HPLC setelah pengkondisian HPLC selesai. Menganalisis kromatogram HPLC dengan menggunakan pembanding kromatogram isoflavan standar yang terdiri dari daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2. Adapun kondisi HPLC adalah sebagai berikut: Panjang Kolom: 10 cm, Jenis Kolom: Lichrosper (R) 100 RP-18 (non polar), Fase Gerak: metanol:asam asetat 0,02 (57,5% ; 42,5%) , Volume Injeksi: 20 µL, Detektor: sinar UV pada panjang gelombang 265 nm, Suhu Oven: suhu kamar

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Pembuatan larutan DPPH

Pembuatan larutan DPPH dengan menimbang kristal sebanyak 7,88 mg DPPH dan dilarutkan dalam metanol 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 0,2 mM sebagai

larutan kontrol. Pengukuran absorbansi larutan DPPH dilakukan dengan memipet 600 µL pelarut (metanol) ke dalam kuvet dan ditambahkan larutan DPPH sampai volume 3 mL kemudian ditutup dan dikocok sampai homogen warnanya. Selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbannya pada puncak panjang gelombang 517nm sebagai absorbansi kontrol.

Pembuatan larutan sampel

Pembuatan larutan uji dengan menimbang ekstrak sebanyak 2 mg dan melarutkan ke dalam etanol 4 mL untuk membuat larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian pengukuran antioksidan bahan uji digunakan metode yang sama, dimana 600 µL pelarut diganti dengan 600 µL larutan uji (sampel). Selanjutnya diukur absorbansi tampak pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbannya pada puncak panjang gelombang mendekati 517nm sebagai absorbansi sampel.

Pengukuran kadar antioksidan

Aktivitas antiradikal dihitung dengan metode DPPH dimana sampel direaksikan dengan larutan DPPH. Aktivitas antiradikal diperlihatkan pada sistem yang warnanya berubah dari ungu menjadi kekuningan.

Perubahan warna larutan menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dan dapat diukur dengan perbedaan absorbansi yang dihasilkan pada sampel dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas antiradikal dinyatakan dalam bentuk persen penangkapan radikal DPPH dan dihitung dengan persamaan (Yen dan Chen 1995 dalam Ariani dan Hastuti 2009).

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \%$$

Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas atau antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.

Analisis data

Teknik analisis data statistik menggunakan program SPSS *version 15* yaitu: *General Linear Model -Univariate* untuk analisis data hasil uji aktivitas antioksidan pada koro pedang dan kedelai dengan lama waktu fermentasi menggunakan dua faktor yaitu jenis bahan dasar pembuat tempe dan lama fermentasi. *Compare Means -One Way Anova* untuk analisis data statisitik perbandingan aktivitas antioksidan (%) tempe koro pedang utuh dan rajang serta sumber lain menggunakan satu faktor yaitu jenis bahan dasar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi isoflavan biji legume dan produk tempenya

Ekstraksi isoflavan dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol 70% diketahui mampu mengekstrak isoflavan secara optimal (Kudou et al.

1991). Etanol merupakan salah satu pelarut yang sesuai untuk mengisolasi senyawa-senyawa organik polar dan memiliki kepolaran mendekati metanol. Metanol merupakan pelarut optimum untuk mengekstrak isoflavon dari kedelai, namun penggunaannya untuk skala komersial masih perlu dikaji lebih lanjut karena bersifat toksik (Susanto et al. 1998). Penelitian ini dilakukan menggunakan pelarut etanol karena selain kepolarannya mendekati metanol, etanol juga relatif tidak beracun.

Maserasi merupakan cara ekstraksi senyawa organik yang mudah dan sederhana. Bahan mentah yang akan diekstrak direndam dalam pelarut yang sesuai selama waktu tertentu. Selanjutnya filtrat dipisahkan dari residu untuk diproses lebih lanjut menjadi ekstrak yang murni. Dari proses maserasi dengan pelarut etanol 70% diperoleh hasil berupa filtrat berwarna kuning untuk tempe fermentasi 0 hari, lalu meningkat intensitasnya, warna semakin pekat dengan semakin lama waktu fermentasinya. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak yang pekat atau hampir semua etanol teruapkan. Ekstrak ini selanjutnya disimpan dalam oven suhu 40°C untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa, kemudian ditimbang sehingga diperoleh massa hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 dapat diketahui massa hasil ekstraksi etanol tempe koro pedang utuh dan rajang terbanyak terjadi pada fermentasi hari keempat yaitu sebanyak 3.044 g dan 3.610 g per 100 g sampel tempe koro pedang. Sementara itu, untuk biji mentah didapat 2.581 g ekstrak per 100 g sampel biji koro pedang mentah. Pada kedelai massa hasil ekstraksi terbanyak juga terjadi pada hari keempat yaitu 5.192 g, sedangkan pada biji mentahnya didapatkan 3.442 g ekstrak per 100 g sampel.

Tabel 1 juga dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu fermentasinya semakin banyak massa ekstrak etanol yang dihasilkan, kecuali untuk kedelai dan koro pedang rajang hasil fermentasi 2 hari dan 3 hari tidak meningkat bahkan menurun. Namun hal ini tidak berlaku bagi biji mentah, karena pada biji mentah masih mengandung senyawa sianida sehingga massa hasil ekstraksi biji mentah relatif banyak. Ini terlihat dari warna hasil ekstraksi yang dihasilkan. Pada koro pedang mentah massa hasil ekstraksi berwarna coklat kehitaman karena masih banyak mengandung senyawa sianida, sedangkan pada kedelai mentah berwarna coklat tua kemungkinan kandungan sianidanya relatif sedikit dibanding dengan koro pedang. Hal ini ditandai dengan lamanya waktu perendaman, untuk kedelai perendaman 24 jam, sedangkan koro pedang 3 x 24 jam. Hasil ekstraksi isoflavon dari biji yang sudah difermentasi berwarna kuning muda hingga coklat tua, karena senyawa sianidanya sudah hilang di saat perendaman sehingga aman untuk dikonsumsi.

Dari Tabel 1 juga dapat disimpulkan bahwa massa hasil ekstraksi isoflavon dari kedelai dan koro pedang utuh serta rajang ternyata bervariasi. Hal ini diduga karena kekerasan atau kelunakan dan kepadatan komponen zat yang ada didalam biji setiap *legume* berbeda. Berdasarkan penelitian Handayani dan Atmaka (1993) bahwa faktor varietas, faktor daerah tempat tumbuh dan musim panen ternyata

memberikan pengaruh yang cukup bervariasi terhadap sifat fisis dan khemis dari biji kacang-kacangan.

Identifikasi Isoflavon dengan HPLC

Analisis dengan HPLC bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dalam sampel tempe koro pedang dan tempe kedelai pada berbagai waktu fermentasi. Seperti metode kromatografi yang lain, analisis HPLC dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari senyawa isoflavon standar dengan waktu retensi dari masing-masing sampel. Adanya puncak-puncak yang memiliki waktu retensi relatif sama dengan senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 standar menunjukkan bahwa dalam sampel tersebut terdapat kandungan isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2.

Penentuan waktu retensi senyawa daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 standar dilakukan pada hari yang sama dengan penentuan waktu retensi dari masing-masing sampel untuk meminimalkan perbedaan kondisi. Analisis kuantitatif senyawa isoflavon dilakukan dengan cara menghitung luas kromatogram. Konsentrasi senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dapat diketahui dengan mengalikan persen luas masing-masing senyawa isoflavon dalam kromatogram dengan massa ekstrak yang dihasilkan. Berikut adalah tabel hasil identifikasi isoflavon dari kedelai dan koro pedang baik utuh maupun rajang.

Dari Tabel 2 dapat diketahui kandungan jenis-jenis isoflavon dari masing-masing sampel. Untuk koro pedang mentah hanya terdapat kandungan isoflavon daidzein dan glisitein, sedangkan untuk kedelai mentah terdapat kandungan daidzein, glisitein dan genistein, walaupun demikian kandungan daidzein koro pedang mentah 0.075 gram, lebih tinggi jika dibandingkan dengan kedelai yang hanya 0.034 gram. Adanya kandungan isoflavon tersebut diduga telah terjadi proses hidrolisis menjadi aglukan isoflavon dan glukosanya pada waktu penyimpanan, biji kedelai dan koro pedang masih mengandung air walaupun tidak mengalami proses pengolahan.

Di kedua jenis sampel tersebut yaitu koro pedang dan kedelai mentah kandungan isoflavon faktor-2 tidak terbentuk. Menurut Barz dan Papendorf (1991), faktor-2 dapat terbentuk karena selama proses perendaman β -glukosidase akan aktif dan mengubah glisitin, genistin dan daidzin menjadi daidzein, genistein dan glisitein yang selanjutnya selama proses fermentasi dengan *Rhizopus oligosporus* terjadi biokonversi lebih lanjut daidzein dan glisitein menjadi faktor-2. Juga menurut penelitian Barz et al. (1993), biosintesa faktor-2 dihasilkan melalui demetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui reaksi hidroksilasi daidzein. Sehingga pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa faktor-2 hanya dijumpai pada tempe selama proses fermentasi dan hal ini mendukung penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

Pada Tabel 2 ditampilkan juga masing-masing kandungan isoflavon untuk fermentasi 0 hari sampai 4 hari dari masing-masing sampel. Untuk kandungan isoflavon

faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein untuk masing-masing sampel berbeda-beda. Pada koro pedang utuh dan rajang kandungan total isoflavon tertinggi terjadi pada fermentasi 1 hari, sedangkan pada kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari. Dari 100 g sampel tempe koro pedang utuh diperoleh kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.786 g yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.009 g, daidzein 0.228 g, glisitein 0.079 g, dan genistein 0.469 g, sedangkan pada tempe koro pedang rajang kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.590 g yang terdiri dari kandungan isoflavon daidzein 0.226 g, glisitein 0.077 g, dan genistein 0.287 g.

Untuk kandungan total isoflavon tertinggi pada tempe kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari yaitu 1.812 g yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.064 g, daidzein 0.586 g, glisitein 0.306 g dan genistein 0.856 g. Walaupun rata-rata kandungan isoflavon kedelai lebih tinggi dari koro pedang baik utuh maupun rajang, namun kandungan isoflavon faktor-2 pada fermentasi 0 hari untuk koro pedang 0.003 g, lebih tinggi bila dibanding dengan kedelai yang hanya sebanyak 0.001 g. Hal ini menjadi nilai tambah bagi koro pedang sebagai alternatif pengganti kedelai.

Perbedaan kandungan jumlah senyawa isoflavon yang naik turun bahkan ada yang tidak muncul seperti yang terlihat pada Tabel 2, diduga disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, karakteristik dari senyawa isoflavon sendiri yang sangat reaktif dan mudah teroksidasi sehingga dimungkinkan sudah berikatan dengan senyawa lain menjadi senyawa baru.

Kedua, beberapa penelitian melaporkan bahwa kandungan isoflavon pada kacang-kacangan dipengaruhi oleh varietas, waktu panen dan lokasi penanaman (Mazur et al. 1998), waktu tanam (Aussenac et al. 1988) dan kondisi iklim (Tsukamoto et al. 1995). Sehingga kondisi pertumbuhan, varietas, lokasi, dan waktu tanam membedakan jumlah senyawa isoflavon (Harbone 1996).

Untuk koro pedang dengan dua perlakuan biji utuh dan dirajang berdasarkan Tabel 2 diketahui koro pedang utuh memiliki kandungan jenis-jenis isoflavon rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan koro pedang rajang. Hal ini kemungkinan dipengaruhi oleh pertumbuhan kapang serta massa terlarut pada saat pengolahan tempe, dari proses perendaman hingga fermentasi. Dengan perlakuan perajangan maka dimungkinkan senyawa-senyawa yang terlarut saat perendaman lebih banyak bila dibanding dengan biji utuh, sehingga dijumpai kandungan isoflavon biji rajang lebih rendah dibandingkan dengan biji utuh.

Berdasarkan Tabel 2 ada beberapa jenis isoflavon yang tidak muncul. Pada koro pedang utuh fermentasi 2 hari dan 4 hari, faktor-2 tidak muncul. Sedangkan pada koro pedang rajang, faktor-2 tidak muncul pada fermentasi 1 hari dan 3 hari. Hal ini dikarenakan isoflavon sebagai antioksidan memiliki sifat mudah teroksidasi sehingga mudah bereaksi dengan radikal bebas, sehingga pada beberapa tempe koro pedang ada beberapa jenis isoflavon yang tidak muncul dimungkinkan karena sudah bereaksi dengan senyawa lain dan menjadi senyawa baru yang belum diketahui.

Dari Tabel 2 diketahui pula untuk koro pedang rajang 3 hari dan 4 hari genistein tidak muncul. Kemungkinan pada fermentasi 3 hari dan 4 hari aktivitas isoflavon genistein sudah berhenti atau sudah bereaksi dengan senyawa lain. Berikut adalah grafik kandungan masing-masing jenis isoflavon untuk masing-masing sampel.

Dari Gambar 1 diketahui rata-rata kandungan jenis-jenis isoflavon pada tempe kedelai fermentasi 0 hari sampai 4 hari jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan tempe koro pedang utuh dan rajang, sedangkan untuk tempe koro pedang utuh memiliki kandungan jenis-jenis isoflavon rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan tempe koro pedang rajang. Dari Gambar 1 juga dapat dilihat penurunan kandungan isoflavon pada koro pedang utuh dan rajang setelah fermentasi 1 hari, sedangkan pada kedelai penurunan kandungan isoflavon setelah fermentasi 2 hari, namun meningkat pada fermentasi 4 hari. Hal ini diduga karena selama fermentasi terjadi aktivitas mikroba yang bervariasi dan pembentukan aglukan sudah berhenti. Tempe yang terbaik dengan tekstur kompak diselimuti miselia putih tebal terjadi pada fermentasi 3 hari. Namun setelah itu pada fermentasi 4 hari sudah terjadi pembusukan, diduga karena *Rhizopus* mengalami fase pembusukan atau fermentasi lanjut (50-90 jam fermentasi) terjadi penarikan jumlah bakteri dan jumlah asam lemak bebas, pertumbuhan jamur menurun dan pada kadar air tertentu pertumbuhan jamur terhenti, terjadi perubahan flavor karena degradasi protein lanjut sehingga terbentuk amoniak dan mikroba pembusuk mulai tumbuh.

Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH melalui pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil uji aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai, tempe koro pedang utuh, dan tempe koro pedang rajang hasil fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari disajikan pada Gambar 2.

Tabel 1. Ekstrak senyawa isoflavon kedelai dan koro pedang (per 100 g)

Sampel	Kedelai kuning			Koro pedang utuh		Koro pedang rajang	
	Lama fermentasi (hari)	Hasil ekstraksi (g)	Warna	Hasil ekstraksi (g)	Warna	Hasil ekstraksi (g)	Warna
Biji mentah		3.422	Coklat	2.581	Coklat kehitaman	2.581	Coklat kehitaman
Tempe	0	0.677	Kuning muda	0.693	Kuning muda	0.693	Kuning muda
hasil	1	2.933	Kuning kecokelatan	1.635	Kuning kecokelatan	1.778	Kuning kecokelatan
fermentasi	2	4.982	Kuning kecokelatan	2.179	Kuning kecokelatan	3.532	Kuning kecokelatan
	3	3.421	Coklat	2.183	Coklat	3.371	Coklat
	4	5.192	Coklat tua	3.044	Coklat tua	3.610	Coklat tua

Tabel 2. Hasil identifikasi isoflavon dari kedelai dan koro pedang biji utuh dan rajang (per 100 g)

Jenis sampel	Lama waktu fermentasi (hari)	Kandungan Isoflavon (g)				Isoflavon total (g)
		Faktor-2	Daidzein	Glisitein	Genistein	
Koro pedang utuh 100 g	Mentah	-	0.075	0.006	-	0.081
	0	0.003	0.016	0.020	0.035	0.074
	1	0.009	0.228	0.079	0.469	0.785
	2	-	0.091	0.009	0.461	0.561
	3	0.011	0.102	0.035	0.248	0.396
	4	-	0.101	0.029	0.153	0.283
Koro pedang rajang 100 g	Mentah	-	0.075	0.006	-	0.081
	0	0.003	0.016	0.020	0.035	0.074
	1	-	0.226	0.077	0.287	0.590
	2	0.005	0.036	0.006	0.071	0.118
	3	-	0.045	0.007	-	0.052
	4	0.003	0.023	0.004	-	0.030
Kedelai 100 g	Mentah	-	0.034	0.009	0.136	0.179
	0	0.001	0.075	0.013	0.106	0.195
	1	0.083	0.442	0.085	0.677	1.287
	2	0.064	0.586	0.306	0.856	1.812
	3	0.025	0.499	0.091	0.568	1.183
	4	0.058	0.632	0.232	0.755	1.677

Tabel 3. Aktivitas antioksidan (%) pada koro pedang dan kedelai dengan lama waktu fermentasi

Lama waktu fermentasi	Aktivitas antioksidan (%)		
	Kedelai	Koro pedang utuh	Koro pedang rajang
Mentah	67.45f	47.13c	47.13c
0 hari	76.06hi	60.40e	60.40e
1 hari	72.08gh	51.57cd	31.90a
2 hari	76.06hi	53.61d	41.72b
3 hari	81.43j	77.32ij	68.63fg
4 hari	77.14ij	48.26c	61.61e

Note: *) superscrib yang berbeda menunjukkan terdapat adanya perbedaan yang signifikan

Tabel 4. Perbandingan aktivitas antioksidan (%) tempe koro pedang utuh dan rajang serta sumber lain

Sampel	Aktivitas antioksidan (%)
Tempe kedelai kuning fermentasi 3 hari	81.43 ^D
Tempe koro pedang rajang fermentasi 3 hari	68.63 ^b
Tempe koro pedang utuh fermentasi 3 hari	77.32 ^c
<i>α</i> -tokoferol	76.41 ^c
<i>β</i> -karoten	43.25 ^a
BHT	81.16 ^d
Vitamin C	75.62 ^C

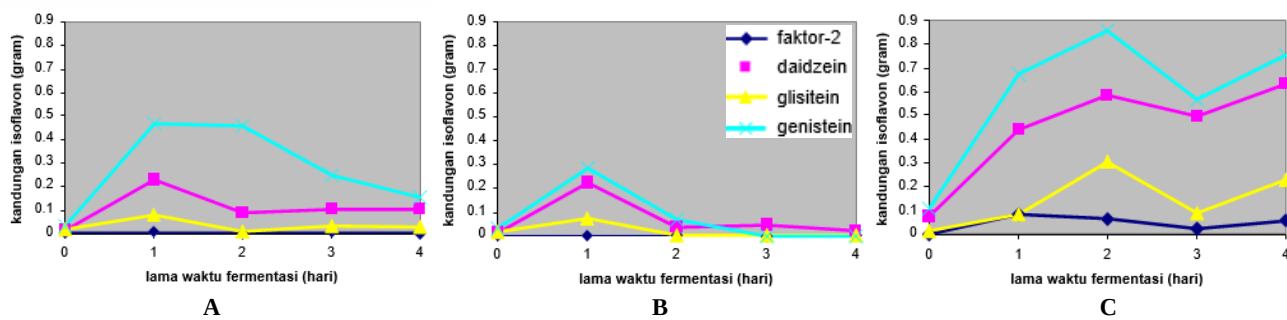
Note: *) superscrib yang berbeda menunjukkan terdapat adanya perbedaan yang signifikan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2 difenil 1 picril hidrazil). Metode yang dipilih adalah metode DPPH karena sederhana, mudah,

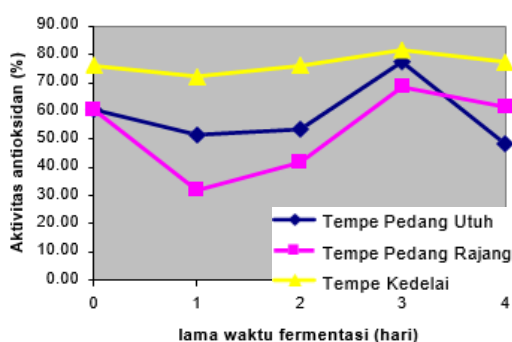
cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Metode aktivitas antiradikal bebas DPPH merupakan metode terpilih untuk menapis aktivitas antioksidan bahan alam (Molyneux 2004). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.

Hasil uji aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai, tempe koro pedang utuh, dan tempe koro pedang rajang hasil fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari terangkum dalam Tabel 3. Dari tiga kali perulangan percobaan, hasil uji aktivitas antioksidan diperoleh rata-rata aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai kuning, tempe koro pedang utuh dan rajang hasil fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari. Pada Gambar 2 terlihat bahwa rata-rata aktivitas antioksidan dari tertinggi ke terendah berturut-turut adalah tempe kedelai, tempe pedang utuh, kemudian tempe pedang rajang. Pada Tabel 3 huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=5\%$. Pada aktivitas antioksidan koro pedang mentah dengan koro pedang utuh fermentasi 4 hari tidak berbeda nyata yaitu antara 47-48%, sedangkan pada koro pedang utuh dan rajang fermentasi 0 hari tidak berbeda nyata dengan koro pedang rajang fermentasi 4 hari yaitu antara 60-61%. Pada kedelai fermentasi 0 hari dan 2 hari juga tidak berbeda nyata yaitu 76%, demikian juga dengan kedelai fermentasi 4 hari tidak berbeda nyata dengan koro pedang utuh fermentasi 3 hari yaitu sebesar 77%.

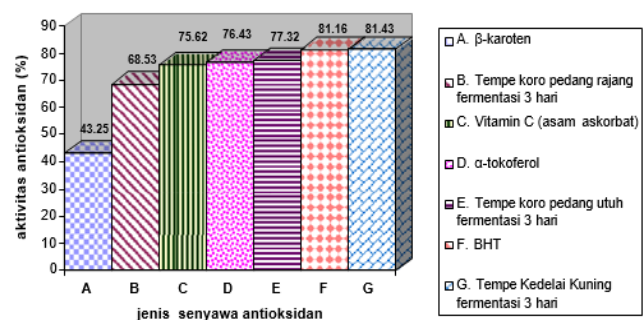
Dari Tabel 3 juga dapat diketahui bahwa koro pedang rajang fermentasi 1 hari sangat berbeda nyata dengan kedelai fermentasi 3 hari, yaitu masing-masing 31.90% dan 81.43%. Sehingga dengan demikian dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan terendah terjadi pada koro pedang rajang fermentasi 1 hari sedangkan aktivitas antioksidan tertinggi terjadi pada kedelai fermentasi 3 hari.



Gambar 1. Kandungan isoflavon. A. tempe koro pedang utuh, B. tempe koro pedang rajang, C. tempe kedelai



Gambar 2. Aktivitas antioksidan (%) beberapa jenis tempe



Gambar 3. Perbandingan Aktivitas Antioksidan (%) Antara Tempe Koro Pedang dengan Senyawa Antioksidan Lain

Namun aktivitas antioksidan tertinggi rata-rata terjadi pada fermentasi 3 hari dan aktivitas antioksidan terendah terjadi saat kondisi mentah, kecuali pada koro pedang rajang aktivitas antioksidan terendah terjadi pada fermentasi 1 hari. Hal ini terlihat dalam Tabel 3 bahwa sampel tempe hasil fermentasi 3 hari memiliki aktivitas antioksidan tertinggi. Untuk tempe kedelai aktivitas antioksidan maksimum 81,43%, tempe koro pedang utuh aktivitas antioksidan maksimum 77,32% dan tempe koro pedang rajang aktivitas antioksidan maksimum 68,63%. Sedangkan untuk aktivitas antioksidan kedelai mentah dan koro pedang mentah adalah 67,45% dan 47,13%.

Hal ini kemungkinan disebabkan karena terhidrolisisnya senyawa isoflavon glukosida menjadi senyawa isoflavon bebas yang disebut aglukon oleh enzim β -glukosidase. Enzim ini selain terdapat di dalam biji kedelai dan koro pedang juga dihasilkan oleh mikroorganisme selama proses fermentasi. Aktivitas antioksidan menurun pada sampel tempe kedelai hasil fermentasi 4 hari kemungkinan disebabkan oleh reaksi lebih lanjut senyawa isoflavon menjadi senyawa lain yang aktivitasnya belum diketahui dan perlu dikaji lebih mendalam.

Lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan senyawa isoflavon, karena fermentasi adalah proses yang memanfaatkan mikroba untuk menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder dalam suatu lingkungan yang dikendalikan. Hal ini dapat dilihat dari hasil uji aktivitas antioksidan yang dilakukan. Terjadi

kenaikan aktivitas antioksidan seiring bertambahnya waktu fermentasi, hingga mencapai maksimum pada hari ketiga.

Dari pembahasan diatas dapat diketahui hubungan kandungan isoflavon dengan aktivitas antioksidan dari masing-masing sampel dengan variasi lama waktu fermentasi. Kandungan total isoflavon pada kedelai mentah adalah yang paling rendah jika dibanding dengan kedelai yang difermentasi demikian pula untuk aktivitas antioksidannya. Hal ini berbeda dengan koro pedang, pada koro pedang utuh kandungan total isoflavon paling rendah terjadi pada fermentasi 0 hari. Begitu pula dengan koro pedang rajang, kandungan total isoflavon terendah terjadi pada fermentasi 4 hari, namun aktivitas antioksidan keduanya cenderung tinggi dibandingkan dengan yang lain kecuali pada fermentasi 3 hari. Untuk kandungan total isoflavon tertinggi pada koro pedang utuh dan rajang terjadi pada fermentasi 1 hari, sedangkan pada kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari. Dimana hal tersebut tidak diikuti dengan aktivitas antioksidannya. Karena baik kedelai maupun koro pedang utuh dan rajang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi pada fermentasi 3 hari, dan aktivitas antioksidan terendah rata-rata terjadi pada kondisi masih mentah atau belum terjadi pengolahan, kecuali pada koro pedang rajang, dimana pada fermentasi 1 hari justru aktivitas antioksidannya paling rendah.

Dari uraian diatas dapat disimpulkan kandungan jenis-jenis isoflavon yang optimum rata-rata pada fermentasi 1 hari sedangkan untuk aktivitas antioksidan yang optimum

adalah pada fermentasi 3 hari. Namun ada beberapa jenis kandungan isoflavon yang rendah bahkan tidak muncul, padahal aktivitas antioksidannya relatif tinggi. Hal ini dikarenakan walaupun senyawa isoflavon mempunyai aktivitas sebagai antioksidan namun dimungkinkan ada senyawa fenolik lain yang bukan dalam golongan flavanoid yang terdapat pada ekstrak etanol yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Menurut Pratt dan Hudson (1990) serta Shahidi dan Naczk (1995), senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, komarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional.

Sebaliknya ada beberapa jenis kandungan isoflavon yang relatif tinggi namun aktivitas antioksidannya rendah. Hal ini dimungkinkan karena aktivitas antioksidan pada isoflavon memang rendah. Rendahnya kemampuan isoflavon sebagai antioksidan ini dimungkinkan pada waktu ekstraksi telah terjadi oksidasi, karena isoflavon merupakan senyawa yang sangat reaktif.

Kedudukan isolat tempe koro pedang sebagai antioksidan dibandingkan beberapa antioksidan yang sudah ada yaitu α -tokoferol, β -karoten dan vitamin C sebagai antioksidan alami maupun BHT yang merupakan antioksidan sintetis ditampilkan dalam Gambar 3.

Dari Gambar 3, dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tempe koro pedang utuh tidak berbeda nyata dengan α -tokoferol, β -karoten dan vitamin C tetapi lebih rendah dari BHT. Pada koro pedang rajang juga memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada β -karoten tetapi lebih kecil dibanding dengan yang lainnya. Dari Gambar 3 juga diketahui bahwa aktivitas antioksidan koro pedang utuh dan rajang lebih rendah dari BHT akan tetapi mengingat efek samping BHT tempe koro pedang memiliki potensi untuk digunakan sebagai antioksidan alami. Menurut Chang et al. (1977), penggunaan zat antioksidan sintetis tertentu misalnya BHT dapat menimbulkan akibat buruk terhadap kesehatan konsumen seperti gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan. Dari hasil tersebut, maka ekstrak tempe koro pedang sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami.

Dari Tabel 4 dapat diketahui aktivitas antioksidan tempe koro pedang utuh dan rajang bila dibandingkan dengan sumber lain dimana yang ditandai dengan huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=5\%$. Berdasarkan Tabel 4 diketahui aktivitas antioksidan pada tempe kedelai tidak berbeda nyata dengan BHT yaitu pada kisaran 81%, dan tempe koro pedang utuh tidak berbeda nyata dengan vitamin C dan α -tokoferol yaitu antara 75-77%. Untuk aktivitas antioksidan tempe koro pedang rajang lebih kecil berbeda nyata yaitu 69%, dan terendah β -karoten yaitu 43%. Berdasarkan Tabel 4 dapat disimpulkan bahwa koro pedang dan produk tempenya berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami dibandingkan dengan kedelai dan beberapa produk antioksidan alami lainnya seperti α -tokoferol, β -karoten, dan vitamin C dan BHT.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa: Kandungan total isoflavon tertinggi untuk tempe koro pedang utuh dan rajang adalah pada fermentasi 1 hari, sedang pada tempe kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari. Pada tempe koro pedang utuh kandungan isoflavon total tertinggi adalah 0.786% yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.009%, daidzein 0.228%, glisitein 0.079%, dan genistein 0.469%. Pada tempe koro pedang rajang kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.590% yang terdiri dari kandungan isoflavon daidzein 0.226%, glisitein 0.077%, genistein 0.287%. Kandungan total isoflavon tertinggi pada tempe kedelai adalah 1.812% yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.064%, daidzein 0.586%, glisitein 0.306% dan genistein 0.856%. Aktivitas antioksidan yang tertinggi untuk koro pedang utuh, koro pedang rajang dan kedelai adalah pada fermentasi 3 hari yaitu masing-masing 77.32%, 68.63%, dan 81.43%. Koro pedang serta produk tempenya berpotensi dalam upaya pemanfaatan sebagai antioksidan alami walaupun kandungan isoflavonnya lebih kecil bila dibandingkan dengan kedelai dan produk tempenya, namun aktivitas antioksidannya lebih tinggi bila dibandingkan dengan β -karoten dan tidak berbeda nyata dengan vitamin C dan α -tokoferol.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson JW, Diwadkar VA, Bridges SR. 1998. Selective Effect Of Different Antioxidants on Oxidation of Lipoprotein from rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 218: 376 -381.
- Ariani SRD, Hastuti W. 2009. Analisis Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Tempe dengan Variasi Lama Waktu Fermentasi dan Metode Ekstraksi. *Prosiding Kimia Organik, Bahan Alam, dan Biokimia. FKIP UNS, Surakarta*.
- Ariani SRD. 1997. Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung Faktor-2 sebagai Alternatif Pengembangan Hasil Olahan Pangan dari Tahu. [Tesis]. Magister Kimia ITB. Bandung.
- Aussenac T, Lacombe S, Dayde J. 1988. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effect of variety and environment. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1480s -1485s.
- Barz W, Heskamp Klus K, Rehms H, Steinkamp R. 1993. Recent Aspect of Protein, Phytate and Isoflavone Metabolism by Microorganisms Isolated from Tempe-Fermentation. *Tempo Workshop, Jakarta*, 15 February.
- Barz W, Papendorf GB. 1991. Metabolism of isoflavones and formation of factor-2 by tempeh producing microorganism. *Tempo Workshop, Cologne*. 20 May 1991.
- Chang SS, Bostic-Matijasevic O, Hsieh AL, Huang CL. 1977. Natural Antioxidants from Rosemary and Sage. *J Food Sci* 42:574.
- Gyorgy P, Murata K, Ikehata H. 1964. Antioxidants isolated from fermented soybeans tempeh. *Nature* 203: 872-875.
- Handajani S, Atmaka W. 1993. Analisis sifat Fisik-Kemis Beberapa Biji Kacang-Kacangan, kekerasan, Kualitas Tanak, Protein, dan Kandungan Mineralnya. *Lembaga Penelitian Universitas Sebelas Maret, Surakarta*.
- Handajani S, Supriyono, Triharyanto E, Marwanti S, Astuti DW, Pujiasmanto B. 1996. Pengembangan Budidaya dan Pengolahan Hasil Kacang-Kacangan Sebagai Usaha Produktif Wanita di Lahan Kering Daerah Tangkapan Hujan Waduk Kedung Ombo. *Lembaga Penelitian Universitas Sebelas Maret, Surakarta*.
- Harbone JB. 1996. *The Flavonoid: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, Inc., London.
- Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K. 1991. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seed (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* 55: 2227 -2233.

- Mazur WM, Duke JA, Wahata K, Rasku S, Adlercreutz H. 1998. Isoflavonoids and Lignans in Legume: Nutritional and Health Aspects in Humans. *J Nutr Biochem* 9: 193-200.
- Nara EX, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita N, Nagao A. 2001. Carotenoids effect proliferation of human prostate cancer cells research communications. *J Nuts* 131: 3303-3306.
- Pawiroharsono S. 1995. Metabolisma Isoflavon dan Faktor-II Pada Proses Pembuatan Tempe. Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe Dalam Industri Pangan Modern. UGM Yogyakarta.
- Pawiroharsono S. 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong.
- Prakash A. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress* 19 (2): 1-4.
- Pratt DE, Hudson BJF. 1990. Natural Antioxidants not Exploited Commercially. In: Hudson BJF (ed.). *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London
- Shahidi F, Naczk M. 1995. *Food Phenolics*. Technomic Pub. Co. Inc. Lavester-Basel.
- Suharyanto. 2008. Ketahanan Pakan untuk Ketahanan Pangan. <http://unib.ac.id/blog/suharyanto/2008/03/13/ketahanan-pakan-untuk-ketahanan-pangan/>. [20 Mei 2009]
- Suryo I, Tohari I. 1995. Aktivitas Antioksidan Buah Jambu Mete dan Penerapannya pada Abon. *Biosains*. 1(7): 50-61.
- Susanto T, Zubaidah E, Wijanarko S B. 1998. Studi tentang aktivitas antioksidan pada tempe terhadap lama fermentasi jenis pelarut dan ketahanan terhadap proses pemanasan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi. Yogyakarta 15 Desember 1998.
- Tsukamoto C, Shimada S, Igita K, Kudou S, Kokubun M, Okubo K, Kitamura K. 1995. Factors effecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agric Food Chem* 43: 1184 -1192.

Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar serat kasar dan aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai

The effect of fermentation time to crude fiber contents and antioxidant activities in several soybean varieties of tempeh

SYLVITRIA WIDOYO, SRI HANDAJANI, NANDARIYAH

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 8 Mei 2015. Revisi disetujui: 8 Juli 2015.

Abstract. Widoyo S, Handajani S, Nandariyah. 2015. *The effect of fermentation time to crude fiber contents and antioxidant activities in several soybean varieties of tempeh Biofarmasi 13: 59-65.* Indonesia was the biggest producer of tempeh in the world and it became the biggest market of soybean in Asia. Tempeh used as antioxidant, antibacterial, anticancer, antihemolytic, antiallergy, antiinfection, and it contains crude fiber. Tempeh belonging to functional food and recommended as food for the future because of it antioxidant. The objectives of this research were known the effect of fermentation time on crude fiber contents and antioxidant activities in several soybean varieties of tempeh and selected the highest crude fiber contents and antioxidant activities of them. This research used Completely Randomized Design (CRD) with two factors and repeated twice. The first factor was fermentation time (30 hours, 42 hours, and 54 hours) and the second factor was soybean varieties (Sibayak, Wilis, Tanggamus, Kaba, Ijen, Hitam). Crude fiber contents and antioxidant activities in several soybean varieties of tempeh which fermentation time variation was analyzed in laboratorium. The result of them analyzed by ANOVA and continued with *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) in $\alpha = 5\%$. The result of the research showed that fermentation time affect crude fiber contents and antioxidant activities in several soybean varieties of tempeh. The longer fermentation time of tempeh caused higher crude fiber contents and antioxidant activities. Ijen tempeh and Kaba tempeh with 54 hours fermentation had the highest crude fiber contents (20,02% and 19,79%) and Black soybean tempeh with 42 hours fermentation had the highest of antioxidant activities (67,4026%).

Keywords: Antioxidant activities, crude fiber contents, fermentation time, soybean varieties, tempeh

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara produsen tempe terbesar di dunia dan menjadi pasar kedelai terbesar di Asia. Saat ini konsumsi tempe rata-rata di Asia sekitar 12,5 kg tiap orang/tahun (USSEC 2010). Menurut SNI 3144:2009, tempe kedelai adalah produk yang diperoleh dari fermentasi biji kedelai dengan menggunakan kapang *Rhizopus* sp, berbentuk padatan kompak, berwarna putih sedikit keabu-abuan dan berbau khas tempe. *Cooked tempeh* mengandung kalori 1340 kJ, kadar protein 18,55%, kadar lemak 10,78% dan kadar karbohidrat 9,39% (USDA 2009).

Keunggulan yang diperoleh dari pengolahan kedelai menjadi tempe adalah peningkatan nilai gizi, peningkatan *digestibility* dan pengurangan senyawa antinutrisi. Meningkatnya *digestibility* ini diakibatkan oleh proses fermentasi tempe yang mengubah senyawa kompleks seperti karbohidrat, protein dan lemak menjadi senyawa-senyawa sederhana seperti glukosa, asam amino dan asam lemak sehingga mudah diserap oleh usus. Pengurangan senyawa antinutrisi yang terjadi selama proses pembuatan tempe diantaranya adalah pengurangan kadar asam fitat, pengurangan enzim lipoksigenase (enzim yang menyebabkan bau langu), pengurangan senyawa penyebab flatulensi dan lain-lain (Kasmidjo 1990). Keunggulan lain

yang dimiliki oleh tempe tetapi tidak terdapat dalam kedelai adalah kandungan vitamin B12. Vitamin B12 diproduksi oleh *Citrobacter freundii* atau *Micrococcus luteus* (Baumann dan Bisping 1995) dan *Klebsiella pneumonia* selama proses perendaman dalam pembuatan tempe (Babu et al. 2009).

Tempe bukan hanya memiliki nilai gizi yang tinggi tetapi juga memiliki efek antioksidan, antibakteri, antikanker, antihaemolitik (Pawiroharsono 1997) antialergi (Kasmidjo 1990) dan antiinfeksi (Karyadi dan Hermana 1995), selain itu serat dalam tempe berperan dalam menurunkan kolesterol darah (Brata dan Arbai 1999). Tempe digolongkan sebagai pangan fungsional dan direkomendasikan sebagai *food for the future* karena kandungan antioksidannya. Antioksidan yang terkandung dalam tempe adalah isoflavon, superoksida dismutase, tokoferol dan sebagainya (Astuti 2000; Karyadi 2000). Antioksidan tersebut berperan melawan radikal bebas, sehingga menghambat proses penuaan dan mencegah penyakit degeneratif (aterosklerosis, jantung koroner, diabetes melitus, kanker dan lain-lain) (Supriyono 1999). Faktor II (6,17,4-trihydroxy-isoflavon) merupakan antioksidan turunan isoflavon yang terkandung dalam kedelai (terkandung dalam jumlah yang tidak signifikan) tetapi terbentuk selama fermentasi tempe. Faktor II

memiliki aktivitas antioksidan 10 kali lebih besar dibandingkan dengan vitamin A (Handajani 2002).

Kedelai merupakan bahan baku utama pembuatan tempe. Departemen Pertanian (2005) menargetkan produksi kedelai Indonesia tahun 2010 sebesar 1.352.682 ton sedangkan kebutuhan kedelai mencapai 2.085.265 ton, oleh karena itu untuk mencukupi kebutuhan tersebut Indonesia harus mengimpor kedelai sebesar 732.583 ton. Harga kedelai impor setiap tahun meningkat dari Rp 3.450/kg menjadi Rp 7.500/kg pada tahun 2008 (Ginting 2008) dan pada tahun 2010 meningkat lagi menjadi Rp 9.750/kg (Setneg 2010). Ketergantungan terhadap kedelai impor ini dapat melemahkan ketahanan pangan nasional. Dengan kata lain, ketahanan pangan nasional yang berkelanjutan harus bertumpu pada pengadaan pangan dalam negeri.

Upaya untuk menindaklanjuti hal tersebut adalah mengembangkan varietas unggul kedelai lokal Indonesia. Beberapa varietas kedelai lokal yang telah dikembangkan diantaranya adalah Kedelai Sibayak, Wilis, Tanggamus, Kaba, Ijen dan Kedelai Hitam. Kedelai lokal tersebut ternyata masih memiliki beberapa kekurangan yaitu harganya mahal, kualitasnya kurang terjamin dan produktivitasnya rendah (Suryana 2005).

Mengingat kedelai merupakan bahan baku pembuatan tempe maka perlu dilakukan penelitian tentang pembuatan tempe dari beberapa varietas kedelai lokal dalam rangka memilih varietas kedelai yang paling baik untuk bahan baku tempe ditinjau dari kadar serat kasar dan aktivitas antioksidannya. Serat kasar dan aktivitas antioksidan perlu diteliti karena kedua hal tersebut merupakan parameter pangan fungsional. Berkaitan dengan tujuan tersebut, juga perlu diketahui pengaruh lama fermentasi terhadap kadar serat kasar dan aktivitas antioksidan tempe dari beberapa varietas kedelai (*Glycine* sp.). Penelitian ini dilakukan untuk menggali potensi kedelai lokal sebagai alternatif bahan baku pembuatan tempe.

Tujuan dari penelitian ini adalah: Mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai (*Glycine* sp.). Mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai (*Glycine* sp.). Memilih tempe yang memiliki kadar serat kasar tertinggi. Memilih tempe yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Wonosari, Klaten dan Laboratorium CV. Chem-Mix Pratama, Kretek, Jambidan, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta dalam jangka waktu 6 bulan.

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan dalam pembuatan tempe adalah beberapa varietas kedelai yaitu kedelai Sibayak (*Glycine max* (L.) Merrill), kedelai Wilis (*Glycine max* (L.) Merrill), kedelai Tanggamus (*Glycine max* (L.) Merrill), kedelai Kaba (*Glycine max* (L.) Merrill), kedelai Ijen

(*Glycine max* (L.) Merrill) yang diperoleh dari Balai Penelitian Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian Malang, sedangkan kedelai Hitam (*Glycine soja* (L.) Sieb) diperoleh dari Pasar Gedhe Surakarta. Bahan pembantu yang digunakan adalah ragi tempe merk "Raprima" yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi Industri (Bandung), daun pisang dan air bersih.

Tempe yang dihasilkan dari beberapa varietas kedelai tersebut kemudian dianalisis kadar serat kasar dan aktivitas antioksidannya. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis kadar serat kasar dan aktivitas antioksidan adalah produk Merck. Secara rinci, bahan kimia yang digunakan untuk uji kadar serat kasar adalah petroleum eter, larutan H₂-SO₄, larutan NaOH, larutan K₂SO₄ 10%, alkohol 95% dan aquadest. Bahan kimia yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah methanol, larutan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 mM dan aquadest.

Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah spektrofotometer *thermo spectronic* GENESYS 20, kuvet, tabung reaksi, mikropipet, pipet volume 5 ml, propipet, *vortex mixer* Minishaker IKA, timbangan analitik (Denfer Instrumen buatan USA). Alat-alat yang digunakan dalam analisis kadar serat kasar adalah cawan porselin, ayakan, timbangan analitik (Denfer Instrumen buatan USA), erlenmeyer 600 ml, pendingin balik, kertas saring *Whatman 41*, spatula, oven (Mettler), desikator (RRC) sedangkan alat yang digunakan dalam pembuatan tempe kedelai adalah panci, baskom (rantang), pisau, talenan, kompor dan tampah.

Perancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu: (i) Faktor 1: Lama fermentasi yaitu 30 jam, 42 jam dan 54 jam (F1, F2, F3), (ii) Faktor 2: Varietas kedelai yaitu Sibayak, Tanggamus, Wilis, Kaba, Ijen dan Hitam (K1, K2, K3, K4, K5, K6), Ulangan: 2 kali. Kombinasi dua faktor tersebut dapat disusun sebagai berikut:

F1K1.1	F1K1.2	F1K2.1	F1K2.2	F1K3.1	F1K3.2
F2K1.1	F2K1.2	F2K2.1	F2K2.2	F2K3.1	F2K3.2
F3K1.1	F3K1.2	F3K2.1	F3K2.2	F3K3.1	F3K3.2
F1K4.1	F1K4.2	F1K5.1	F1K5.2	F1K6.1	F1K6.2
F2K4.1	F2K4.2	F2K5.1	F2K5.2	F2K6.1	F2K6.2
F3K4.1	F3K4.2	F3K5.1	F3K5.2	F3K6.1	F3K6.2

Pembuatan tempe

Cara pembuatan tempe merujuk pada Kasmidjo (1990) yang dimodifikasi. Kedelai disortasi dari cemaran fisik kemudian ditimbang 50 gram. Kedelai yang telah ditimbang kemudian dicuci menggunakan air bersih. Kedelai direndam dalam air selama 12 jam. Perbandingan air dan kedelai adalah 10: 1. Kedelai direbus sampai mendidih (sekitar 30 menit). Perbandingan air dan kedelai adalah 10: 1. Setelah direbus, kedelai diganti air untuk perendaman selama 12 jam. Perbandingan air dan kedelai adalah 10: 1. Kedelai dikupas secara manual dan kulitnya dirajang dengan pisau. Kedelai dan kulit direbus

sampai mendidih (sekitar 30 menit). Perbandingan air dan kedelai adalah 10: 1. Kedelai ditiriskan dan didinginkan selama 12 jam dalam kain yang dapat menyerap air. Inokulasi dilakukan dengan menggunakan ragi tempe dengan perbandingan 2 gr ragi tempe dalam 1 kg kedelai. Setelah itu dicampur sampai merata menggunakan sendok. Kemasan yang dipergunakan untuk membungkus tempe adalah daun pisang. Inkubasi dilakukan dengan menempatkan tempe yang telah dibungkus ke dalam kain tebal (agar lingkungan inkubasi menjadi hangat) selama 30 jam, 42 jam dan 54 jam.

Analisis kadar serat kasar analisis kadar serat kasar dilakukan dengan metode perlakuan

Asam dan Basa Panas (Apriyanton et al. 1989). Prinsip analisis ini adalah mencuci sampel dengan asam, basa dan air mendidih serta alkohol 95% sehingga didapatkan residu serat kasar. (Osawa dan Namiki 1981)

Analisis aktivitas antioksidan ini dilakukan dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Osawa dan Namiki 1981). Prinsip analisis ini yaitu senyawa antioksidan dalam sampel bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu menjadi pudar yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Blois 1958). Semakin pudar warna yang dihasilkan maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi, begitu pula sebaliknya. Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \left| 1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right| \times 100\%$$

Analisis data

Pengujian statistik untuk parameter kadar serat kasar dan aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengaplikasikan software SPSS 17.0 dengan menggunakan analisis variansi (ANOVA), jika terdapat perbedaan antar sampel maka akan dilanjutkan dengan uji beda nyata menggunakan analisis *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada tingkat $\alpha = 5\%$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar serat kasar

Serat kasar merupakan residu dari bahan makanan atau bahan pertanian yang terdiri dari selulosa dan lignin setelah diperlakukan dengan asam dan alkali mendidih (Apriyanton et al. 1989). Serat kasar tidak memiliki nilai gizi bagi manusia karena manusia tidak memiliki enzim selulase untuk mencernanya (Fardiaz et al. 1997), namun serat kasar berperan menghindari terjadinya konstipasi (susah buang air besar), mengencerkan zat-zat beracun dalam kolon dan mengabsorpsi zat karsinogenik dalam pencernaan yang kemudian akan terbuang dari dalam tubuh bersama feses (Silalahi 2006). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan yang kemudian dianalisis menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan DMRT

pada $\alpha 5\%$ (terlampir) diperoleh kadar serat kasar tempe (% db) beberapa varietas kedelai dengan beberapa perlakuan lama fermentasi yang ditunjukkan pada Tabel 1, Tabel 2, Tabel 3.

Tabel 1. memperlihatkan kadar serat kasar tempe pada beberapa perlakuan lama fermentasi. Kadar serat kasar tempe dinyatakan dalam bentuk persen (%). Kadar serat kasar tempe pada 30 jam fermentasi sebesar 16,16%, artinya jumlah serat kasar yang terkandung dalam 100 gram tempe adalah 16,16 gram.

Lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai. Semakin lama fermentasi semakin tinggi kadar serat kasar tempe. Pernyataan ini sesuai dengan pernyataan Kasmidjo (1990) yang mengatakan bahwa akibat pengolahan kedelai menjadi tempe, kadar nitrogen dan kadar selulosa meningkat. Stephen et al. (1997) juga mengatakan bahwa selulosa bersifat inert dan tidak dapat terfermentasi selama proses fermentasi tempe karena *Rhizopus* sp tidak memproduksi enzim selulase.

Menurut Kasmidjo (1990) selama 0-50 jam fermentasi tempe, pertumbuhan *Rhizopus* sp. terus meningkat dengan menghasilkan miselia pada permukaan biji kedelai yang semakin lama semakin lebat sehingga membentuk massa tempe yang lebih kompak. Peningkatan jumlah miselia yang dibentuk oleh *Rhizopus* sp. selama proses fermentasi tempe mengindikasikan kenaikan kadar serat kasar tempe. Miselia tersusun dari hifa yang mengandung protoplasma dan dilapisi dinding sel. Komponen dinding sel hifa adalah selulosa dan kitin (Dwidjoseputro 1978). Telah diketahui bahwa selulosa merupakan salah satu komponen penyusun serat kasar, oleh karena itu semakin lama fermentasi semakin banyak miselia yang terbentuk dari hifa maka semakin banyak pula jumlah selulosa sehingga semakin tinggi kadar serat kasarnya.

Tabel 2. memperlihatkan bahwa varietas kedelai berpengaruh terhadap kadar serat kasar tempe. Urutan kadar serat kasar tempe dari yang terendah sampai yang tertinggi adalah tempe kedelai Wilis (13,95%), tempe kedelai Hitam (15,09%), tempe kedelai Sibayak (16,03%), tempe kedelai Tanggamus (17,77%), tempe kedelai Ijen (18,95%), tempe kedelai Kaba (19,00%). Perbedaan kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai tersebut dipengaruhi oleh perbedaan kadar serat kasar awal yang telah terdapat secara alami dalam kedelai, selain itu juga dipengaruhi oleh karakteristik kulit kedelai seperti kandungan serat kasar, tebal kulit dan proporsi kulit dengan kotiledon. Kulit kedelai memiliki kandungan serat 4-6 gram/100 gram (Winarno dan Reddy 1986). Tempe kedelai Kaba dan Ijen memiliki kadar serat kasar yang tidak berbeda nyata, hal ini mengindikasikan bahwa serat kasar yang terkandung secara alami dalam kedelai Kaba dan Ijen juga hampir sama.

Tabel 3. memperlihatkan kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai dengan beberapa perlakuan lama fermentasi. Semakin lama fermentasi, kadar serat kasar tempe kedelai Sibayak, tempe kedelai Ijen dan tempe kedelai Hitam semakin tinggi. Semakin lama fermentasi semakin banyak miselia yang terbentuk dari hifa maka semakin banyak pula jumlah selulosa sehingga semakin

tinggi kadar serat kasarnya (Kasmidjo 1990 dan Dwidjoseputro 1978). Tempe kedelai Ijen dan tempe kedelai Kaba dengan perlakuan lama fermentasi 54 jam memiliki kadar serat kasar tertinggi yaitu sebesar 20,02% dan 19,79%, hal ini dikarenakan oleh tingginya kadar serat kasar awal yang telah terdapat secara alami dalam kedelai Ijen dan Kaba.

Kadar serat kasar tempe kedelai Wilis yaitu 13,66% pada 30 jam fermentasi, turun menjadi 13,02% pada 42 jam fermentasi kemudian meningkat menjadi 15,19% pada 54 jam fermentasi. Kadar serat kasar tempe kedelai Kaba yaitu 18,53% pada 30 jam fermentasi tidak berbeda nyata dengan 42 jam fermentasi (18,06%) kemudian turun menjadi 19,79% pada 54 jam fermentasi. Kadar serat kasar tempe kedelai Tanggamus yaitu 17,32% pada 30 jam fermentasi, meningkat menjadi 18,06% pada 42 jam fermentasi tetapi tidak berbeda nyata dengan 54 jam fermentasi (18,06%). Penurunan kadar serat kasar ataupun jumlah serat kasar yang tidak berbeda nyata pada tempe-tempe tersebut mengindikasikan aktivitas *Rhizopus* sp. mulai terhambat atau berhenti sehingga tidak terjadi proses pembentukan miselia, oleh karena itu jumlah selulosa pada dinding sel hifa tetap dan kadar serat kasar tempe pun jumlahnya tetap (tidak berbeda nyata).

Aktivitas antioksidan

Antioksidan pangan adalah suatu zat dalam makanan yang menghambat akibat buruk dari efek senyawa oksigen yang reaktif (ROS), senyawa nitrogen yang reaktif (SNR) atau keduanya, dalam fungsi fisiologis normal pada manusia. Antioksidan dalam makanan dapat berperan dalam pencegahan berbagai penyakit, meliputi penyakit kardiovaskular, serebrovaskular, kanker, penyakit yang berhubungan dengan penuaan dan lain-lain (Silalahi 2006).

Senyawa antioksidan yang terkandung dalam tempe adalah isoflavon, superoksida dismutase (Astuti 2000), 6,7,4'-trihidroksi isoflavon (Pawiroharsono (1995), tokoferol (Kasmidjo 1990) dan lain-lain. Senyawa antioksidan tersebut telah terkandung dalam kedelai maupun terbentuk ketika proses pembuatan tempe. Akumulasi komponen aktif dalam tempe tersebut yang akhirnya terdeteksi sebagai antioksidan dan diuji aktivitas antioksidannya.

Metode pengujian aktivitas antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH digunakan secara luas untuk pengujian kemampuan penangkapan radikal bebas dari beberapa komponen alam seperti komponen fenolik, flavonoid, antosianin dan lain-lain. Metode DPPH sering digunakan untuk mendeteksi kemampuan antiradikal suatu senyawa karena hasilnya terbukti akurat, reliabel, relatif cepat dan praktis (Pezzuto 2002 dalam Yuswantina 2009).

Prinsip metode DPPH adalah pengukuran penangkapan radikal bebas sintetik dalam pelarut organik polar seperti etanol atau metanol pada suhu kamar oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan. Proses penangkapan radikal ini melalui mekanisme pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh radikal bebas sehingga radikal bebas menangkap satu elektron dari antioksidan. Radikal bebas sintetik yang digunakan DPPH

(2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Senyawa DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan melalui pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron (Pokorny et al. 2001).

Senyawa yang aktif sebagai antioksidan mereduksi radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) menjadi *difenil pikril hidrazin* sehingga warna sampel berubah dari ungu menjadi pudar (Blois 1958). Semakin tinggi aktivitas antioksidan dalam suatu sampel semakin pudar warna yang dihasilkan karena semakin besar jumlah radikal bebas direduksi oleh antioksidan. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan yang kemudian dianalisis menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan DMRT pada α 5% (terlampir) diperoleh aktivitas antioksidan tempe (%) beberapa varietas kedelai dengan beberapa perlakuan lama fermentasi yang ditunjukkan pada Tabel 4-6.

Tabel 4. memperlihatkan bahwa semakin lama fermentasi semakin tinggi aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai (*Glycine* sp.). Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam bentuk persen (%). Aktivitas antioksidan tempe pada 30 jam fermentasi adalah 36,35%, artinya antioksidan dalam tempe tersebut memiliki kemampuan untuk menangkap radikal DPPH sebesar 36,35%.

Telah diketahui bahwa antioksidan dalam tempe terdiri dari antioksidan yang secara alami terkandung dalam kedelai dimana selama proses pembuatan tempe, antioksidan tersebut mengalami peningkatan kuantitas dan atau berubah menjadi senyawa turunan yang aktivitas antioksidannya lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas antioksidan kedelai. Menurut Winarsi (2008), antioksidan dikelompokkan menjadi dua yaitu antioksidan non-enzimatis dan enzimatis. Antioksidan non-enzimatis dalam tempe diantaranya isoflavon, faktor II dan tokoferol sedangkan antioksidan enzimatis dalam tempe adalah superoksida dismutase (SOD). Menurut Handayani (2002), antioksidan yang paling menonjol dalam tempe adalah isoflavon, oleh karena itu senyawa yang paling dominan terukur dalam uji aktivitas antioksidan adalah isoflavon.

Kedelai mengandung isoflavon glukosida yang terdiri dari 65% genistin, 23% daidzin dan 15% glisitin. Senyawa isoflavon pada kedelai tersebut berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O-glikosidik (Naim 1973). Pratt dan Hudson (1992) menjelaskan bahwa daidzin, genistin dan glisitin yang terdapat pada biji kedelai dapat dihidrolisis oleh β -glukosidase yang secara alami terdapat dalam kedelai selama proses perendaman menjadi isoflavon aglikon dan glukosanya yaitu genistein (5,7,4'-trihidroksi isoflavon) dan glukosa (1:1), daidzein (7,4'-trihidroksi isoflavon) dan glukosa (1:1) serta glisitein (6-metoksi-7,4'-dihidroksi isoflavon) dan glukosa (1:1).

Menurut Wang dan Murphy (1996) dan Wuryani (2009) setelah 22 jam fermentasi, isoflavon aglikon yang terkandung dalam tempe meningkat 6,5 kali dan glukosidanya turun 57% dari kedelai rebus. Pembentukan aglikon selama fermentasi tempe disebabkan oleh aktivitas hidrolitik enzim β -glukosidase yang diproduksi oleh *Rhizopus* sp.

Tabel 1. Kadar Serat Kasar Tempe pada Beberapa Perlakuan Lama Fermentasi

Lama fermentasi	Kadar serat kasar (% db)
30 jam	16,16 _a
42 jam	16,68 _b
54 jam	17,57 _c

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%

Tabel 2. Kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai

Varietas	Kadar serat kasar (% db)
Sibayak	16,03 _c
Wilis	13,95 _a
Tanggamus	17,77 _d
Kaba	19,00 _e
Ijen	18,95 _e
Hitam	15,09 _b

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%

Tabel 3. Kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai dengan beberapa perlakuan lama fermentasi

Varietas	Kadar serat (% db)		
	Lama fermentasi 30 jam	Lama fermentasi 42 jam	Lama fermentasi 54 jam
Sibayak	15,50 _e	15,99 _f	16,61 _g
Wilis	13,66 _b	13,02 _a	15,19 _d
Tanggamus	17,32 _h	18,06 _i	17,94 _i
Kaba	18,53 _j	18,69 _j	19,79 _i
Ijen	17,48 _h	19,36 _k	20,02 _i
Hitam	14,48 _c	14,96 _d	15,86 _f

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%

Tabel 4. Aktivitas antioksidan tempe pada beberapa perlakuan lama fermentasi

Lama fermentasi	Aktivitas antioksidan (%)
30 jam	36,35 _a
42 jam	39,03 _b
54 jam	42,12 _c

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%

Tabel 5. Aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai

Varietas	Aktivitas Antioksidan (%)
Sibayak	35,13 _c
Wilis	34,94 _c
Tanggamus	32,25 _a
Kaba	35,11 _c
Ijen	34,45 _b
Hitam	63,12 _d

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%

Tabel 6. Aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai dengan beberapa perlakuan lama fermentasi

Varietas	Kadar serat (% db)		
	Lama fermentasi 30 jam	Lama fermentasi 42 jam	Lama fermentasi 54 jam
Sibayak	28,77 _a	34,94 _f	41,69 _j
Wilis	33,12 _e	34,30 _f	37,40 _h
Tanggamus	29,61 _b	32,21 _d	34,94 _f
Kaba	32,34 _d	34,94 _f	38,05 _i
Ijen	35,71 _g	30,37 _c	37,27 _h
Hitam	58,57 _k	67,40 _m	63,38 _l

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan α 5%

Handajani (2002) mengatakan bahwa fermentasi tempe telah mengubah bentuk isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglikon yaitu daidzein, genistein, glisitein dan faktor II (6,7,4 tri-hidroksiisoflavon). Senyawa-senyawa turunan tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isoflavon glukosida. Pawiroharsono (1995) menjelaskan bahwa proses pembentukan Faktor II terjadi melalui dua reaksi yaitu (1) melalui reaksi dimetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* dan (2) melalui reaksi hidrosilasi daidzein oleh bakteri *Micrococcus arborescens*. Faktor II berperan sebagai antioksidan, antihemolisis, antikolesterol dan antikanker. Faktor II sangat menarik perhatian karena aktivitas antioksidannya 10 kali lebih besar daripada vitamin A dan 3 kali lebih besar dari aglikon lain (Jha 1985). Pernyataan tersebut mengindikasikan bahwa semakin lama fermentasi semakin tinggi aktivitas antioksidan tempe terutama ditinjau dari komponen isoflavonnya.

Tokoferol juga meningkat selama fermentasi terutama β -tokoferol meningkat 222,5% sehingga meningkatkan aktivitas antioksidan alami pada tempe. Superoksida dismutase (SOD) juga terbentuk selama fermentasi tempe. SOD terbentuk setelah 24 jam fermentasi dan jumlahnya terus meningkat sampai 60 jam fermentasi dan setelah itu akan mulai menurun, hal ini disebabkan karena pertumbuhan *Rhizopus* menurun dan SOD memiliki aktivitas optimum pada pH 7-7,5 dan suhu 37°C (Astuti et al. 2000). Akumulasi dari komponen-komponen antioksidan yang meningkat seiring dengan semakin lama waktu fermentasi tersebut yang mengakibatkan semakin lama fermentasi semakin tinggi aktivitas antioksidan tempe.

Tabel 5. memperlihatkan bahwa varietas kedelai berpengaruh pada aktivitas antioksidan tempe. Urutan aktivitas antioksidan tempe dari yang terendah sampai yang tertinggi adalah tempe kedelai Tanggamus (32,25%), tempe kedelai Ijen (34,45%), tempe kedelai Wilis (34,94%), tempe kedelai Kaba (35,11%), tempe kedelai Sibayak (35,13%), tempe kedelai Hitam (63,12%). Tempe kedelai Wilis, Kaba dan Sibayak memiliki aktivitas antioksidan yang tidak berbeda nyata, hal ini mengindikasikan bahwa aktivitas antioksidan awal yang secara alami terdapat pada kedelai Wilis, Kaba dan Sibayak hampir sama.

Pernyataan tersebut sesuai dengan pernyataan Sihono (2004) yang menjelaskan bahwa jumlah isoflavon yang terkandung secara alami dalam kedelai bervariasi tergantung pada jenis kedelai dan daerah geografis budidaya. Isoflavon dalam kedelai terdiri dari tiga komponen yaitu daidzin, glisitin dan genistin. Kandungan daidzin, glisitin dan genistin kedelai hitam yang ditanam di Amerika berturut-turut adalah 40.5 mg/g, 2.6 mg/g, 56.9 mg/g, sedangkan yang ditanam di Cina berturut-turut adalah 52.9 mg/g, 7.8 mg/g dan 39.2 mg/g. Kandungan daidzin, glisitin dan genistin kedelai kuning yang ditanam di Amerika berturut-turut adalah 42.7 mg/g, 2.6 mg/g, 54.7 mg/g, sedangkan yang ditanam di Cina berturut-turut adalah 53.5 mg/g, 8.1 mg/g, 38.4 mg/g.

Tempe yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi adalah tempe kedelai Hitam. Tempe kedelai Hitam memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan varietas-varietas lain karena senyawa antioksidan dalam kedelai hitam berupa senyawa-senyawa fenolik (genistin, daidzin, glisitin, epikatekin dan antosianin) yang lebih banyak dan beragam daripada kedelai kuning (genistin, daidzin dan glisitin). Kedelai hitam mengandung senyawa flavonoid selain isoflavon yaitu berupa epikatekin 129 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ dan antosianin 18 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (Sakakibara et al. 2003).

Tabel 6. memperlihatkan aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai dengan beberapa perlakuan lama fermentasi. Semakin lama fermentasi, aktivitas antioksidan tempe kedelai Sibayak, tempe kedelai Wilis, tempe kedelai Tanggamus dan tempe kedelai Kaba semakin tinggi. Aktivitas antioksidan tempe kedelai Ijen yaitu 35,71% pada 30 jam fermentasi turun menjadi 30,37% pada 42 jam fermentasi kemudian meningkat menjadi 37,27% pada 54 jam fermentasi.

Aktivitas antioksidan tempe kedelai Hitam yaitu 58,57% pada 30 jam fermentasi meningkat menjadi 67,40% pada 42 jam fermentasi kemudian turun menjadi 63,38% pada 54 jam fermentasi. Komponen antioksidan yang menonjol dalam kedelai hitam selain isoflavon adalah antosianin (Sakakibara et al. 2003), sehingga dapat dikatakan bahwa penurunan aktivitas antioksidan tempe kedelai Hitam dari 67,40% (42 jam fermentasi) menjadi 63,38% (54 jam fermentasi) dikarenakan semakin lama waktu fermentasi, pH tempe semakin meningkat sampai pH 8,4 (Pangastuti dan Triwibowo 1996).

Peningkatan pH sampai pH 8,4 mengakibatkan antosianin tidak stabil. Antosianin umumnya lebih stabil dalam keadaan asam dibandingkan dalam keadaan netral atau alkali. Dalam keadaan asam, struktur dominan antosianin berada dalam bentuk inti kation flavilium yang terprotonisasi dan kekurangan elektron. Peningkatan nilai pH menyebabkan kation flavilium menjadi tidak stabil dan mudah mengalami transformasi struktural menjadi senyawa tidak berwarna seperti kalkon (Satyatama 2008). Transformasi antosianin menjadi senyawa tidak berwarna juga mengakibatkan menurunnya aktivitas antioksidan (Stintzing et al. 2002). Kirca et al. (2007) juga menjelaskan bahwa peningkatan pH meningkatkan degradasi antosianin, dengan demikian kenaikan pH pada tempe mengakibatkan penurunan aktivitas antioksidan.

KESIMPULAN

Dari pembahasan “Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Serat Kasar dan Aktivitas Antioksidan Tempe Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine* sp.)” dapat diambil kesimpulan sebagai berikut: Lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai. Semakin lama fermentasi semakin tinggi kadar serat kasar tempe beberapa varietas kedelai. Lama fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai. Semakin lama fermentasi semakin tinggi aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai. Tempe kedelai Ijen dan tempe kedelai Kaba dengan perlakuan lama fermentasi 54 jam memiliki kadar serat kasar tertinggi yaitu sebesar 20,02% dan 19,79%. Tempe kedelai Hitam dengan perlakuan lama fermentasi 42 jam memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu sebesar 67,40%.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budiyo S. 1989. Analisis Pangan. IPB Press. Bogor.
- Astuti M. 2000. Superoksida Dismutase dalam Tempe dan Modulasi Tempe. Prosiding Seminar Masa Depan Industri Tempe Menghadapi Milenium Ketiga.
- Astuti M, Meliala A, Dalais FS. 2000. Tempe, A Nutritious And Healthy Food From Indonesia. Asia Pacific J Clin Nutr 9 (4): 322-325.
- Babu DP, Bhakharaj R, Vidhyalakshmi. 2009. A Low Cost Nutritious Food “Tempeh”. World J Dairy Food Sci 4 (1): 22-27.
- Baumann U, Bisping B. 1995. Proteolysis during tempe fermentation. Food Microbiol 1995 12: 39-47.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200.
- Brata AM, Arbai. 1999. Cholesterol Lowering Effect of Tempe. The Complete Handbook of Tempe: The Unique Fermented Soyfood of Indonesia. Hal 51-70.
- Dwidjoseputro D. 1978. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta.
- Fardiaz D, Andarwulan N, Wijaya H, Puspitasari NL. 1997. Teknik Analisis Sifat Kimia dan Fungsional Komponen Pangan. IPB Press. Bogor.
- Ginting E. 2008. Mutu Kedelai Nasional Lebih Baik dari Kedelai Impor. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian 30: (1) 8- 10.
- Handayani D, Bantacut T, Munandar J.M, Budijanto S. 2009. Simulasi Kebijakan Daya Saing Kedelai Lokal pada Pasar Domestik. Jurnal Teknologi Industri Pertanian 19 (1): 7-15.
- Hutkins RW. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. IFT Press. USA.
- Jha HC. 1985. Novel isoflavonoids and its derivatives, new antioxidant derived from fermented soybean (tempe). Asian Symposium Non-salted Soybean Fermentation, Tsukuba, Japan, July 14-16, 1985.
- Karyadi D, Hermans H. 1995. Potensi Tempe Untuk Gizi dan Kesehatan. Puslitbang Gizi, Bogor.
- Karyadi D. 2000. Ciri Fungsional Tempe dalam Kerangka Nilai Tambah Gizi, Kesehatan, Pencegahan dan Pengobatan. Prosiding Seminar Masa Depan Industri Tempe Menghadapi Milenium Ketiga.
- Kasmidjo RB. 1990. Tempe: Mikrobiologi dan Biokimia Pengolahan Serta Pemanfaatannya. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Kirca A, Zkan MO, Cemerog B. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. J Food Chem 101: 212-218.
- Naim M. 1973. A new isoflavone from soybeans. Phytochemistry 12: 169-171.
- Osawa T, Namiki MA. 1981. A Novel Type of Antioxidant Isolated from Leaf Wax of Eucalyptus Leaves. Agric Biol Chem 45: 735- 739.
- Pangastuti HP, Triwibowo S. 1996. Proses Pembuatan Tempe Kedelai: III. Analisis Mikrobiologi. Jurnal Cermin Dunia Kedokteran 109: 1996.

- Pawiroharsono S. 1995. Metabolisme Isoflavon dan Faktor II (6,7,4' Trihidroksi Isoflavon) pada Proses Pembuatan Tempe. Simposium Nasional Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern. Hal 165- 174.
- Pokorny J, Yanishlieva N, and Gordon M. 2001. Antioxidant in Food. CRC Press. England.
- Pratt DE, Hudson B.J.F. 1992. Natural Antioxidants Not Exploited Commercially. Elsevier Applied Science Publisher LTD, India.
- Rukmana R, Yuniarsih Y. 1996. Kedelai: Budidaya dan Pasca Panen. Kanisius. Yogyakarta.
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ahida H, Kanazawa K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J Agric Food Chem* 51: 2866-2887.
- Satyatama D.I. 2008. Pengaruh Kopigmentasi terhadap Stabilitas Warna Antosianin Buah Duwet (*Syzygium cumini*). [Tesis]. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Setneg. 2010. Upaya Peningkatan Produksi Kedelai. Sekretariat Negara Republik Indonesia, Jakarta
- Sihono. 2004. Evaluasi Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine max* L). [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Silalahi J. 2006. Makanan Fungsional. Kanisius. Yogyakarta.
- SNI [Standar Nasional Indonesia]. 01-3922-1995. Standar Nasional Indonesia: Kedelai. KAN, Jakarta.
- SNI [Standar Nasional Indonesia]. 3144:2009. Standar Nasional Indonesia: Tempe Kedelai. KAN, Jakarta.
- Stephen AM, Dahl WJ, Johns DM, Englyst HN. 1997. Effect of oat hull fiber on human colonic function and serum lipids. *Cereal Chem J* 74 (4):379-383.
- Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. 2002. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J Agric Food Chem* 50:6172-6181.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 2003. Analisis Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Supriyono. 1999. Wacana Tempe Indonesia. Universitas Katolik Widya Mandala Press. Surabaya.
- Suryana. 2005. Prospek dan Arah Pengembangan kedelai. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- USDA. 2009. Nutrition Fact of Tempeh. <http://www.nutritiondata.com/facts/legumes-and-legume-products/4381/2>. [5 September 2009].
- USSEC. 2010. Tempe Project in Indonesia Creating Demand for High Quality U.S. Soybeans. <http://mea.ussec.org/docs/publications/jan-22-2010.pdf>. [Diakses pada hari Senin, 1 Maret 2010 pukul 09.00 WIB].
- Wang HJ, Murphy P. 1994. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *J. Agric. Food Chem.* 42: 666-673.
- Winarno FG, Reddy NR. 1986. Legume-Based Fermentation. *Journal of Food Science* 40: 168-170.
- Winarsi H. 2008. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Kanisius. Yogyakarta.
- Wuryani. 2009. Isoflavones: The Destrogenic Compounds In Tempe. <http://www.biotek.lipi.go.id/annales/v3n1%201994/wuryani.pdf>. [31 Agustus 2009].
- Yuswantina R. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal dari Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Rhizoma Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrihidrazil). [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta
- Yuswantina, R. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal dari Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Rhizoma Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil). [Skripsi]. Fakultas Farmasi UMS. Surakarta.

Aktivitas antimikroba fraksi dari ekstrak metanol daun senggani (*Melastoma candidum*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Sa. typhimurium* serta profil kromatografi lapis tipis fraksi teraktif

Antimicrobial activity of fraction from methanolic extract of senggani (*Melastoma candidum*) leaves towards *Staphylococcus aureus* and *Sa. typhimurium* and thin layer chromatography profile of the most active fraction

IDA LIANA, OKID PARAMA ASTIRIN, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI

Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 14 Juni 2015. Revisi disetujui: 21 Agustus 2015.

Abstract. Liana I, OP Astirin, Nugraheni ER. 2015. Antimicrobial activity of fraction from methanolic extract of senggani (*Melastoma candidum*) leaves towards *Staphylococcus aureus* and *Sa. typhimurium* and thin layer chromatography profile of the most active fraction. *Biofarmasi* 13: 66-77. Controlling pathogen bacteria is important to prevent the spread of disease and infection. One of the solution is by antibiotic therapy. However, the use of antibiotic with inappropriate dose and time can cause bacterial resistance. Therefore, it is necessary to discover new antimicrobial compounds which can be used to control pathogen bacteria. One of the new antimicrobial compounds is secondary metabolites of Senggani (*Melastoma candidum* D. Don). The aim of this research is to know antimicrobial effect, percentage of MIC and MBC from the most active fraction of Senggani leaves towards *S. aureus* and *Sa. typhimurium*, and to know the most active fraction KLT profile of methanol extract of Senggani leaves. Separating bioactive components of Senggani leaves was done by macerating them with methanol solvent, then partitioning the solid and liquid matter using ether solvent, and fractionating them using chloroform, ethyl acetate and methanol solvent due to some proportions. Antimicrobial test was conducted using Kirby-Bauer diffusion method on MHA media towards *S. aureus* and *Sa. typhimurium*, whereas the determination of the percentage of MIC and MBC was conducted using dilution method on MHB media. The determination of chemical compounds group was done by KLT on the most active fraction using some specific spray reagents. The result of the research showed that Senggani leaves have antimicrobial activity towards *S. aureus* on F6 and *Sa. typhimurium* on F5. Both F5 and F6 have chemical compounds which belong to phenolic group, that is tannin, with the value R_f 9,40. MIC and MBC test shows that the percentage of MIC F6 towards *aureus* is 400 mg/mL, while the percentage of MBC can not be determined. Similarly, on MIC and MBC test towards *Sa. typhimurium*, the percentage MIC, and MBC cannot be determined.

Keywords: *Melastoma candidum*, antimicrobial test, MIC and MBC, phenols, tannins

PENDAHULUAN

Staphylococcus auerus dan *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri patogen, yaitu bakteri yang memiliki kemampuan menimbulkan penyakit pada manusia. Pengendalian bakteri patogen penting dilakukan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, serta membasmi bakteri patogen pada inang yang terinfeksi. Bakteri patogen dapat dihambat pertumbuhannya atau dibunuh dengan proses fisik (misalnya dengan pemanasan) atau bahan kimia (misalnya dengan antibiotik).

Terapi antibiotik beberapa tahun lalu dinyatakan berhasil dalam mengatasi penyebaran bakteri patogen. Akan tetapi, penggunaan antibiotik dengan dosis dan waktu terapi yang tidak tepat dapat menimbulkan masalah tersendiri, yaitu resistensi bakteri. Pada tahun 1944 hampir seluruh *Staphylococcus* yang diisolasi dari rumah sakit sensitif terhadap antibiotik penisilin, tetapi pada tahun 1948 sekitar 65%-85% menjadi resisten terhadap penisilin-G karena banyaknya penggunaan preparat penisilin di

rumah sakit. Pada tahun 1984, *Staphylococcus* resisten penisilin tidak hanya ditemukan di rumah sakit, tetapi juga pada 80% *Staphylococcus* yang diisolasi dari masyarakat (Sjahrurahman et al. 1999; Jawetz et al. 2001). Selain itu, *S. aureus* yang diisolasi dari susu segar kambing kini juga resisten terhadap tetrasiklin sefotaksim, ampicilin dan eritromisin (Purnomo et al. 2006). Ada pula strain *S. aureus* yang resisten terhadap metisilin yaitu strain *Meticillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Strain ini juga resisten terhadap sparfloksasin, sefaklor, asam nalidiksat dan eritromisin (Sjahrurahman et al. 1999; Mycek et al. 2001; Syarif et al. 2001).

Bakteri *Salmonella* pada binatang juga berkembang menjadi resisten, terutama terhadap tetrasiklin yang digunakan dalam makanan ternak. *Sa. typhi* strain *Multi Drug Resistance* (MDR) resisten terhadap dua atau lebih jenis antibiotik yang sering digunakan, yaitu ampicilin, kloramfenikol, dan kotrimoksazol (Mycek et al. 2001, Hadinegoro 1999). Mengacu pada permasalahan di atas, diperlukan adanya penemuan senyawa-senyawa antimikroba

baru yang dapat digunakan untuk mengendalikan bakteri patogen, diantaranya adalah senyawa metabolit sekunder dari senggani (*Melastoma candidum* D. Don).

Menurut Retnaningtyas dan Mulyani (2008), ekstrak metanol daun senggani dengan konsentrasi 20-100% memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambatan sebesar 17,44-23,99 mm terhadap *S. aureus*, serta memiliki aktivitas penghambatan yang kuat hingga sangat kuat terhadap pertumbuhan beberapa bakteri lain seperti *Sa. typhi*, *Bacillus subtilis*, *Shigella dysenteriae*, dan *E. coli*. Wang dan Hsu (2007) juga melaporkan bahwa ekstrak aseton daun senggani memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. cereus*. Daun senggani memiliki kandungan senyawa golongan tanin terhidrolisis yaitu Nobotanin B yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Helicobacter pylori* (Funatogawa et al. 2004). Selain tanin, kandungan kimia daun senggani yang telah diketahui antara lain flavonoid dan saponin (Hariaman 2008; Sentra Informasi IPTEK 2009).

Flavonoid yang merupakan senyawa fenol dapat menyebabkan penghambatan terhadap sintesis dinding sel (Mojab et al. 2008). Flavonoid yang merupakan senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein (Dwijoseputro. 1994). Protein yang menggumpal tidak akan dapat berfungsi lagi sehingga akan mengganggu pembentukan dinding sel bakteri. Pada konsentrasi yang biasa digunakan (larutan dalam air 1-2%), fenol dan derivatnya menimbulkan denaturasi protein (Jawetz et al. 2001). Saponin merupakan zat hemolitik yang kuat serta memiliki sifat seperti sabun. Saponin juga bersifat spermisida, antimikrobia, antiperadangan dan memiliki aktivitas sitotoksik (Tjay dan Rahardja 2002). Kandungan senyawa kimia lain, yaitu tanin, mempunyai sifat sebagai pengelat berefek spasmolitik, yang dapat mengerutkan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Ajizah 2004).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antimikroba fraksi dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Mengetahui nilai MIC dan MBC fraksi teraktif dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*; serta mengetahui profil Kromatografi Lapis Tipis fraksi teraktif dari ekstrak metanol daun senggani.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat MIPA dan Laboratorium Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta selama Bulan Juni-November 2009.

Alat dan bahan

Lampu UV254 dan UV366, chamber, rotary evaporator (Heidolph vv 2000, Germany), oven (Memert, Germany),

gelas beker dan alat-alat gelas lainnya. Tabung reaksi, pinset, cawan petri, pipet volume, mikropipet, gelas beker, jarum ose, bunsen, perforator (pencetak lubang), LAF, sarung tangan dan masker.

Bahan utama untuk penelitian ini adalah serbuk kering daun senggani yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T) Tawangmangu. Metanol (untuk maserasi), eter (untuk partisi padat-cair), Silika gel GF254 (E. Merck) berukuran lebih dari 60 µm sebagai fase diam, dan fase gerak yang digunakan yaitu kloroform, etil asetat dan metanol (untuk VLC). Plat silika gel 60 GF254, kloroform, n-heksan, etil asetat, wasbensin, pereaksi semprot serum (IV) sulfat, AlCl₃, FeCl₃, SbCl₃, Lieberman-Burchard dan vanilin asam sulfat. Biakan murni *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311, media NA, NB, MHA, MHB, amoksisilin (2,5 mg/mL), CMC (1 mg/mL) dan akuades.

Cara kerja

Penyiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah serbuk kering daun senggani. Simplisia daun senggani diperoleh dan dideterminasi di B2P2TO2T Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada tahun 2009.

Penyiapan bakteri uji

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311. Biakan murni *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311 terlebih dahulu diregenerasikan pada media NA untuk memperbanyak jumlah (stok) bakteri yang akan digunakan untuk uji.

Regenerasi bakteri dilakukan dengan menumbuhkan 1-2 ose bakteri ke dalam 10 mL media cair NB kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dengan pengocokan di atas shaker pada kecepatan 150 rpm. Pengocokan dilakukan agar bakteri dapat tumbuh optimal dalam media NB. Setelah 24 jam, bakteri dari media NB diinokulasi dengan metode agar miring pada media NA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C agar bakteri dapat tumbuh dengan optimal. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kultur bakteri kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C agar pertumbuhan bakteri tidak terjadi dan bakteri tidak segera mati.

Pemisahan komponen bioaktif

Pada penelitian ini untuk memisahkan komponen bioaktif digunakan ekstraksi, partisi, dan fraksinasi. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Tahap selanjutnya dilakukan partisi menggunakan pelarut eter dengan sentrifugasi. Selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan VLC dengan sistem fase gerak bertingkat dengan kepolaran yang berbeda.

Ekstraksi

Serbuk kering daun senggani dimaserasi menggunakan metanol selama 24 jam. Setelah 24 jam, rendaman disaring dengan corong gelas, ampasnya dipisahkan dan filtrat I yang diperoleh diuapkan dengan bantuan rotary evaporator sehingga didapat ekstrak metanol yang kemudian

dikeringanginkan dan disimpan di eksikator. Ampas kemudian dimaserasi kembali seperti cara di atas sebanyak tiga kali sehingga diperoleh filtrat II dan III lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Tahap selanjutnya seperti pada filtrat I sehingga diperoleh ekstrak metanol.

Partisi

Proses partisi yang dilakukan merupakan partisi padat-cair dengan menggunakan pelarut eter. Ekstrak metanol yang didapatkan dari proses maserasi dipartisi dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh bagian yang larut dan tidak larut pada eter. Bagian yang larut dan tidak larut masing-masing diuapkan sehingga diperoleh bagian kering. Selanjutnya kedua bagian masing-masing dipantau profil kandungan senyawa kimianya menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak kloroform:etil asetat (1:9 v/v). Profil KLT yang menunjukkan hasil pemisahan kandungan kimia yang tidak tumpang tindih antara bagian yang larut dan bagian tidak larut dipilih untuk proses *scalling up* pada tahap partisi. Bagian ini kemudian diuji aktivitas antimikrobanya terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Bagian yang menunjukkan luas zona hambat terbesar merupakan bagian aktif yang selanjutnya dipilih untuk difraksinasi agar didapatkan komponen senyawa yang lebih sederhana.

Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan terhadap hasil partisi teraktif menggunakan VLC dengan sistem fase gerak bertingkat menurut kepolarannya yaitu dari pelarut yang kurang polar ke pelarut yang lebih polar, sehingga dihasilkan beberapa fraksi. Masing-masing fraksi yang dihasilkan kemudian diuji antibakteri terhadap *aureus* dan *Sa. typhimurium*. Fraksi teraktif kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis untuk penentuan golongan senyawa fraksi teraktifnya serta ditentukan nilai MIC dan MBC-nya. Perbandingan pelarut yang digunakan pada VLC yaitu:

1. CHCl₃ 100%
2. CHCl₃: EtoAc (2:1 v/v)
3. CHCl₃: EtoAc (1:1 v/v)
4. CHCl₃: EtoAc (1:3 v/v)
5. CHCl₃: EtoAc (1:5 v/v)
6. CHCl₃: EtoAc (1:9 v/v)
7. CHCl₃: EtoAc (1:15 v/v)
8. CHCl₃: MeOH (1:1 v/v)
9. CHCl₃: MeOH (2:1 v/v)
10. CHCl₃: MeOH (3:1 v/v)
11. CHCl₃: MeOH (6:1 v/v)
12. MeOH 100%

Uji antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*

Pengujian daya hambat terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dilakukan dengan metode difusi sumuran (*well diffusion method*) dari Kirby-Bauer (1966). Biakan murni *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* masing-masing diregenerasi dalam media NA dengan metode agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji antibakteri dilakukan dalam kondisi yang steril agar tidak terjadi kontaminasi. Sterilisasi dilakukan terhadap alat, bahan dan ruangan yang akan digunakan. Sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C. Sterilisasi media membutuhkan waktu 15-20 menit sedangkan sterilisasi alat membutuhkan waktu 30 menit. Uji antimikroba dilakukan dalam LAF pada keadaan steril sehingga diperlukan adanya penyinaran sinar UV selama 2 jam dan disemprot dengan alkohol 70% sebagai disinfektan.

Sebanyak 1-2 ose bakteri uji dikulturkan dalam 10 mL media MHB, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dengan dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm. Konsentrasi kultur sel diencerkan dalam 100 mL media MHA steril hingga mencapai 1 X 10⁶ CFU/mL. Media MHA sebanyak 10 mL dituangkan dalam cawan petri kemudian didiamkan hingga memadat. Setelah memadat, media MHA dalam cawan petri yang telah diinokulasi *S. aureus* atau *Sa. typhimurium* tersebut kemudian dibuat lubang/sumuran dengan menggunakan perforator dengan diameter 7 mm. Dalam satu cawan petri dapat dibuat dua atau tiga sumuran sesuai dengan keperluan atau jumlah pengulangan yang dilakukan.

Sampel uji sebanyak 25 µL dimasukkan dalam tiap sumuran pada media MHA dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 mg/mL. Masing-masing konsentrasi dibuat sebanyak dua pengulangan (duplo). Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati dan diukur besarnya diameter zona hambat yang terbentuk berupa zona bening di sekeliling sumuran.

Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan 3 kali pada sisi yang berbeda atau pada ketiga titik daerahnya. Dari kedua pengulangan untuk konsentrasi yang sama kemudian dibuat hasil rata-rata. Sebagai kontrol digunakan metanol, eter, akuades, CMC (1 mg/mL) dan amoksisilin (2,5 mg/mL).

Kromatografi Lapis Tipis dan penentuan golongan fraksi teraktif

Setiap proses pemisahan pada tahap ekstraksi, partisi dan fraksinasi dipantau profil kandungan senyawa kimianya dengan KLT. Hasil ekstraksi, partisi maupun fraksinasi dilarutkan pada pelarut kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel 60 GF254 menggunakan pipa kapiler. Pengembangan dilakukan dalam bejana pengembangan dengan jarak pengembangan 8 cm dan menggunakan fase gerak yang sesuai.

Spot-spot yang terbentuk pada plat KLT diamati di bawah sinar UV254 dan UV366. Selanjutnya plat KLT disemprot dengan serum (IV) sulfat untuk mendeteksi keberadaan senyawa organik secara umum dan berbagai pereaksi semprot spesifik untuk menentukan golongan senyawa aktif. Pereaksi semprot spesifik yang digunakan adalah sebagai berikut:

FeCl₃ 1%: sebanyak 0,1 g FeCl₃ dilarutkan dalam 10 mL akuades. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa tanin dan fenolat. Sampel

dinyatakan positif mengandung tanin dan fenolat jika terbentuk warna hijau, merah atau biru setelah penyemprotan (Harborne 2006).

AlCl_3 1%: sebanyak 0,1 g AlCl_3 dilarutkan dalam 10 mL etanol 95%. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid. Sampel dinyatakan positif mengandung flavonoid jika terbentuk fluoresensi hijau kuning dengan sinar UV366 setelah penyemprotan (Harborne 2006).

Vanillin asam sulfat: terdiri atas 5% H_2SO_4 dalam etanol dan 1% vanilin dalam etanol. Deteksi dilakukan dengan menyemprot plat silika dengan larutan 5% H_2SO_4 dalam etanol kemudian disemprot kembali dengan larutan 1% vanilin dalam etanol. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung senyawa terpenoid jika terbentuk warna ungu, biru, biru-ungu, atau orange ke merah ungu setelah dilakukan penyemprotan (Harborne 2006).

SbCl_3 20% dalam kloroform: sebanyak 2 g serbuk SbCl_3 dilarutkan dalam 10 mL kloroform. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa saponin. Sampel dikatakan positif mengandung saponin jika terbentuk warna merah violet setelah disemprot dengan SbCl_3 (Santosa dan Hertiani 2005).

Lieberman-Burchard: sebanyak 5 mL anhidrida asam asetat dicampurkan dengan 5 mL asam sulfat pekat. Campuran ini kemudian ditambahkan dalam 50 mL etanol absolut. Setiap pencampuran zat dilakukan dengan pendinginan. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa steroid dan terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung steroid jika terbentuk warna biru dan dinyatakan positif mengandung terpenoid jika terbentuk warna merah (Permana 2009).

Setelah disemprot dengan pereaksi semprot spesifik, plat KLT dipanaskan dalam oven selama 10 menit dengan suhu 100°C. Penentuan golongan senyawa aktif dilakukan terhadap fraksi teraktif dari uji daya hambat terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Uji MIC dan MBC

Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan metode dilusi. Inokulum dari *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* diperoleh dari koloni segar yang tumbuh pada media NA. Masing-masing spesies bakteri diinokulasi pada 10 mL MHB dalam erlenmeyer (50 mL), kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan *shaker* pada kecepatan 150 rpm. Setelah 24 jam, sebanyak 200 μL inokulum dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 5 mL media MHB.

Fraksi teraktif daun senggani dipersiapkan dalam bentuk pengenceran berseri dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 mg/mL. Masing-masing pengenceran ditambahkan sebanyak 100 μL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi inokulum bakteri. Selanjutnya tabung reaksi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri dalam tabung yang tidak menunjukkan pertumbuhan kemudian disubkultur dalam media tanpa senyawa uji untuk menentukan apakah hambatan ini permanen atau tidak. Apabila pada uji lanjut terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MIC.

Sebaliknya, apabila pada uji lanjut tidak terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MBC.

Analisis data

Analisis deskriptif dilakukan terhadap profil KLT pada komponen senyawa ekstrak metanol, hasil partisi serta hasil fraksinasi sebelum digunakan untuk uji antimikroba. Hasil pengukuran dari zona hambat pada uji antimikroba dibandingkan antara satu dengan yang lainnya. Komponen senyawa teraktif pada uji antimikroba adalah yang memiliki diameter zona hambat terbesar.

Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan pada hasil fraksi yang memiliki aktivitas antimikroba terbesar. Nilai MIC dan MBC ditentukan setelah dilakukan uji lanjut. Apabila pada uji lanjut terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MIC. Sebaliknya, apabila pada uji lanjut tidak terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MBC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk simplisia daun senggani. Simplisia menurut Depkes RI (1995a) didefinisikan sebagai bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun, serta kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Proses pengeringan daun senggani dilakukan di B2P2TO2T menggunakan alat pengering dengan suhu 40°C selama 30 jam. Pengeringan dilakukan agar reaksi enzimatis tidak berjalan dan mencegah pertumbuhan mikroba pada simplisia daun senggani. Daun yang telah kering kemudian dibuat serbuk untuk memperluas daerah penarikan kandungan kimia, sehingga pada proses ekstraksi, kontak antara pelarut dengan sampel lebih efektif dan senyawa dapat terekstrak dengan optimal.

Menurut Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (Depkes RI 2000) dan Sembiring et al. (2006), proses pembuatan serbuk simplisia dapat mempengaruhi kualitas ekstrak sehingga harus dilakukan dengan hati-hati. Apabila serbuk terlalu kasar, maka daerah penyerapan kandungan kimia oleh pelarut akan semakin sempit sehingga proses ekstraksi kurang optimal. Namun sebaliknya, apabila serbuk terlalu halus, maka akan semakin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi karena senyawa yang tidak diinginkan maupun debris sel pada simplisia akan terikut pada ekstrak sehingga mempengaruhi kualitas ekstrak. Selain itu, selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras, misalnya logam, maka akan timbul panas yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan. Selain dipengaruhi oleh proses penyerbukan dan interaksi dengan logam, kualitas ekstrak juga dipengaruhi oleh stabilitas senyawa dalam ekstrak itu sendiri, oksidasi, cahaya, derajat keasaman (Depkes RI 2000), pemanasan dan jenis pelarut (Srijanto et al. 2004; Tensiska et al. 2007). Setelah

didapatkan serbuk simplisia daun senggani, kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi.

Ekstraksi dan uji antimikroba ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI. 1995b). Pelarut metanol digunakan untuk proses ekstraksi pada penelitian ini. Menurut Noor et al. (2006), metanol banyak digunakan untuk ekstraksi tanaman obat dan dapat menarik zat aktif yang terkandung di dalamnya sebanyak-banyaknya. Hasil ekstraksi berupa ekstrak kental berwarna hijau kecoklatan. Menurut Retnaningtyas dan Mulyani (2008), ekstrak metanol daun senggani memiliki aktivitas penghambatan yang kuat terhadap *S. aureus*, *Sa. typhi*, *B. subtilis*, *Sh. dysenteriae* dan *E. coli*.

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi. Maserasi merupakan suatu metode ekstraksi simplisia cara dingin (tanpa pemanasan) yang dilakukan dengan menggunakan pelarut, disertai dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruang (Depkes RI 2000). Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia daun senggani dalam pelarut hingga seluruh serbuk simplisia terendam seluruhnya. Larutnya kandungan kimia simplisia saat proses maserasi, umumnya akan terjadi apabila pelarut menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel. Di dalam rongga sel terdapat senyawa aktif yang dapat larut di dalam pelarut. Perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam sel dengan diluar sel menyebabkan larutan dengan konsentasi tinggi didesak keluar ke konsentrasi rendah. Apabila telah terjadi keseimbangan konsentrasi di dalam dan di luar sel, maka proses ekstraksi berhenti. Maka, pada proses maserasi disertai pula dengan pengadukan agar terjadi perputaran pelarut sehingga akan merubah profil konsentrasinya dan proses ekstraksi akan terjadi secara optimal.

Struktur kimia berbagai senyawa berbeda yang terkandung dalam daun senggani akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap berbagai faktor seperti pemanasan, udara, cahaya, serta logam berat (Depkes RI 2000; Srijanto et al. 2004; Tensiska et al. 2007). Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan, sehingga pengaruh negatif akibat pemanasan terhadap senyawa termolabil yang mungkin terdapat dalam daun senggani dapat dihindari. Proses maserasi dilakukan menggunakan wadah terbuat dari kaca untuk menghindari terjadinya reaksi kimia antara pelarut maupun senyawa kimia yang tersari dengan wadahnya, karena sifat kaca yang lebih stabil (tidak mudah bereaksi) daripada plastik maupun logam. Selama proses maserasi, wadah selalu dalam keadaan tertutup untuk menghindari kemungkinan terjadinya proses oksidasi oleh udara luar. Maserasi juga dilakukan di dalam ruangan tertutup untuk menghindari pengaruh cahaya (sinar matahari) terhadap stabilitas senyawa-senyawa yang akan diambil.

Hasil maserasi (maserat) kemudian disaring dan dilakukan pemekatan. Pemekatan berarti peningkatan

jumlah *partial solute* (senyawa terlarut) hingga terbentuk ekstrak yang pekat atau kental, sehingga tidak terdapat lagi pelarut dalam ekstrak. Pemekatan dilakukan dengan bantuan *rotary evaporator*. *Rotary evaporator* digunakan agar proses pemekatan menjadi lebih cepat serta pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali sehingga lebih efisien. Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disimpan dalam eksikator untuk menghindari kerusakan senyawa kimia dalam ekstrak.

Ekstrak kemudian diuji aktivitas penghambatannya terhadap *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311. Uji antimikroba ekstrak metanol daun senggani terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion method*) dari Kirby-Bauer (1966) menggunakan media MHA. Ekstrak metanol daun senggani diujikan pada *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 mg/mL. Sebagai kontrol digunakan CMC (1 mg/mL), metanol dan antibiotik amoksisilin (2,5 mg/mL). Amoksisilin digunakan karena merupakan antibiotik yang berspektrum luas, meliputi bakteri Gram positif dan negatif, aerobik dan anaerobik, serta dapat larut dalam air (Mutschler. 1991; Tjay dan Rahardja 2002) sehingga lebih memudahkan dalam penggunaannya.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa seluruh konsentrasi ekstrak daun senggani yang diujikan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*. Aktivitas penghambatan ini ditunjukkan dengan adanya zona bening (zona hambat) di sekitar sumuran. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* seperti disajikan pada Tabel 1.

Davis dan Stout (1971) menyatakan bahwa apabila zona hambat yang terbentuk pada uji difusi agar berukuran kurang dari 5 mm, maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah. Apabila zona hambat berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, 10-19 mm dikategorikan kuat dan 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Hasil pengukuran zona hambat (Tabel 1) menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun senggani memiliki aktivitas penghambatan yang sedang terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada konsentrasi 100 mg/mL, sedangkan konsentrasi 200-1000 mg/mL menunjukkan adanya aktivitas penghambatan yang kuat, dimana zona hambat terbesar pada konsentrasi 900 mg/mL dengan diameter zona hambat 13,835 mm. Aktivitas penghambatan ekstrak metanol terhadap pertumbuhan *Sa. typhimurium* pada konsentrasi 100-300 mg/mL tergolong sedang dan pada konsentrasi 400-1000 mg/mL tergolong kuat dengan zona hambat terbesar pada konsentrasi 900 mg/mL dengan diameter zona hambat sebesar 14,615 mm.

Tabel 1 menunjukkan bahwa kontrol metanol dan CMC (1 mg/mL) tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan baik terhadap *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*. Sebaliknya, amoksisilin (2,5 mg/mL) menunjukkan aktivitas penghambatan yang tergolong sedang terhadap *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 5,400 mm dan tergolong kuat terhadap *Sa. typhimurium* dengan diameter zona hambat sebesar 12,030

mm. Hal ini mengindikasikan bahwa walaupun memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong kuat, namun jika dibandingkan dengan amoksisilin, maka aktivitas penghambatan ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *S. typhimurium* masih tergolong kecil. Gambar 1 menunjukkan diameter zona hambat terbesar ekstrak metanol terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Sensitivitas *S. aureus* terhadap ekstrak metanol daun senggani tergolong kuat mulai dari konsentrasi 200 mg/mL, sedangkan pada *Sa. typhimurium* diperlukan konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi, yaitu 400 mg/mL. Hal ini juga dilaporkan oleh Rahayu (2000), Yuharmen (2002), Kusmiyati dan Agustini (2007), serta Handayani et al. (2008) yang menyatakan bahwa bakteri Gram positif pada umumnya memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap senyawa antimikroba dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Perbedaan sensitivitas bakteri Gram positif dan Gram negatif terhadap antimikroba ini dapat dipengaruhi karena adanya perbedaan struktur dinding sel pada kedua golongan bakteri tersebut.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif, dimana dinding selnya tersusun atas peptidoglikan yang sangat tebal (Williams et al. 1996, Jawetz et al. 2001). Proses perakitan dinding sel diawali dengan pembentukan rantai peptida yang akan membentuk jembatan silang peptida dan menggabungkan rantai glikan dari peptidoglikan pada rantai lain sehingga menyebabkan dinding sel terakrit sempurna. Penghambatan pada perakitan dinding sel mengakibatkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang ke dalam peptidoglikan dinding sel menuju suatu struktur yang lemah dan menyebabkan kematian bakteri (Morin dan Gorman 1995). Kerusakan pada dinding sel atau hambatan pada pembentukannya dapat berakibat lisis pada sel (Jawetz et al. 2001). Lisisnya sel bakteri tersebut dikarenakan tidak berfungsinya lagi dinding sel yang mempertahankan bentuk dan melindungi bakteri (Ajizah et al. 2007). Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun senggani memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong sedang hingga kuat terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Oleh karena itu, daun senggani diteliti lebih lanjut dengan memisahkan ekstrak metanol menjadi dua bagian dengan cara partisi. Pemisahan ini bertujuan untuk memperoleh senyawa antimikroba daun senggani yang lebih sederhana.

Partisi dan uji antimikroba hasil partisi

Proses partisi yang dilakukan merupakan partisi padat-cair, yaitu pemisahan senyawa berdasarkan kemampuan kelarutannya dalam suatu pelarut, sehingga dihasilkan bagian yang larut dan tidak larut pada pelarut yang digunakan. Partisi dilakukan dengan menggunakan alat sentrifugasi, dengan pelarut berupa eter. Eter memiliki indeks kepolaran 2,8 di bawah indeks kepolaran metanol yaitu 5,1 sehingga dengan perbedaan tingkat kepolaran diantara keduanya diharapkan partisi dengan eter ini dapat memisahkan senyawa yang bersifat semipolar agar masuk dalam bagian larut eter sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat lebih polar masuk dalam bagian tidak larut eter.

Kromatogram menunjukkan bahwa partisi dengan eter dapat memisahkan ekstrak metanol menjadi dua bagian

yang tidak saling tumpang tindih, dimana bagian larut eter kurang dapat terelusi dibandingkan bagian tidak larut eter dengan fase gerak kloroform: etil asetat (1:9 v/v). Deteksi dengan UV254 menunjukkan bahwa adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau yang mengindikasikan adanya senyawa ikatan rangkap. Kromatogram juga menunjukkan bahwa bagian yang larut eter memiliki satu bercak dengan nilai R_f 0,97 sedangkan pada bagian yang tidak larut eter memiliki sekitar empat bercak dengan nilai R_f 0,10; 0,17; 0,65 dan 0,92. Hasil dari proses partisi didapatkan sebanyak 3,75 g bagian yang larut eter dan 105,2 g bagian yang tidak larut eter. Kedua bagian tersebut kemudian diuji aktivitasnya penghambatannya terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Uji antimikroba hasil partisi terhadap pertumbuhan bakteri menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion method*) Kirby-Bauer (1966). Bagian larut dan tidak larut eter masing-masing diujikan pada *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 mg/mL. Sebagai kontrol digunakan eter, metanol, CMC (1 mg/mL) dan amoksisilin (2,5 mg/mL). Hasil pengujian menunjukkan bahwa bagian larut dan tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*.

Hasil pengukuran diameter zona hambat (Tabel 2) menunjukkan bahwa bagian larut eter maupun tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong sedang hingga kuat terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Aktivitas penghambatan terbesar ditunjukkan bagian tidak larut eter konsentrasi 900 mg/mL terhadap *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 17,15 mm. Sedangkan pada *Sa. typhimurium*, diameter zona hambat terbesar ditunjukkan pada bagian larut eter konsentrasi 700 mg/mL, yaitu sebesar 14, 53 mm. Pengukuran zona hambat hasil partisi larut eter dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* seperti ditunjukkan pada Tabel 2. Gambar 3 menunjukkan diameter zona hambat terbesar dari *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Tabel 2 juga menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama, bagian tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang lebih kuat terhadap *S. aureus* dibandingkan dengan bagian larut eter. Sebaliknya, bagian larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang lebih kuat terhadap *Sa. typhimurium* dibandingkan dengan bagian tidak larut eter. Hal ini mengindikasikan bahwa *Sa. typhimurium* lebih sensitif terhadap senyawa-senyawa yang bersifat semipolar, sedangkan *S. aureus* lebih sensitif terhadap senyawa-senyawa yang bersifat polar dari daun senggani. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama, diameter zona hambat bagian tidak larut eter terhadap *S. aureus* lebih besar yaitu mencapai 17,15 mm pada konsentrasi 900 mg/mL, dibandingkan dengan diameter zona hambat bagian larut eter terhadap *Sa. typhimurium* yang diameter zona hambat terbesarnya hanya mencapai 14,53 mm pada konsentrasi 900 mg/mL. Selain itu, jumlah rendemen bagian tidak larut eter yang dihasilkan juga jauh lebih besar, yaitu sebanyak 105,20 g (96,56 %), dibandingkan dengan bagian larut eter yang hanya mencapai 3,75 g (3,44 %). Bagian tidak larut eter

kemudian dipilih untuk diteruskan ujinya ke tahap selanjutnya, yaitu fraksinasi dengan metode VLC.

Fraksinasi dan uji antimikroba hasil fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode VLC terhadap bagian tidak larut eter. Fraksinasi dilakukan dengan fase gerak bertingkat dari pelarut yang kurang polar ke pelarut yang lebih polar sehingga didapatkan sebelas fraksi. Kandungan kimia dari kesebelas fraksi yang dihasilkan kemudian dipantau menggunakan KLT dengan fase gerak metanol: etil asetat (1:7 v/v). Profil kromatografi hasil fraksinasi ditunjukkan pada Gambar 4.

Fraksi yang memiliki persamaan bercak dan nilai R_f digabungkan menjadi satu karena memiliki kandungan kimia yang sama. Enam fraksi gabungan dihasilkan dari tahap fraksinasi dengan menggunakan perbandingan pelarut seperti yang tersaji pada Tabel 3

Enam fraksi tersebut kemudian dipantau profil kandungan senyawa kimianya menggunakan KLT dengan fase gerak metanol: etil asetat (1:7 v/v). Deteksi dengan UV254 menunjukkan adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau yang mengindikasikan adanya senyawa dengan minimal dua ikatan rangkap. Deteksi dengan UV366 menunjukkan adanya pendaran bercak berwarna merah lembayung, mengindikasikan adanya senyawa rangkap terkonjugasi (Harborne 2006). Kromatogramnya seperti tampak pada Gambar 5.

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 300 mg/mL bagian tidak larut eter memiliki diameter zona hambat yang lebih besar dari 10 mm. Sesuai dengan yang dikemukakan oleh Davis dan Stout (1971), hal ini berarti bahwa bagian tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong kuat, baik terhadap *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*. Oleh karena itu, enam fraksi yang didapatkan kemudian diujikan terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dengan menggunakan metode Kirby-Bauer (1966) dengan konsentrasi 300 mg/mL. Hasil pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk seperti tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4 menunjukkan bahwa *S. aureus* sensitif terhadap hampir semua fraksi kecuali F1, dengan sensitivitas terbesar ditunjukkan terhadap F6 dengan diameter zona hambat 14,17 mm. Berbeda dengan sensitivitas *Sa. typhimurium*, semua fraksi yang diujikan menunjukkan adanya zona hambat dengan diameter zona hambat terbesar terhadap F5 dengan diameter zona hambat sebesar 13,07 mm. Aktivitas penghambatan yang ditunjukkan F1 terhadap *Sa. typhimurium* tidak terdapat pada *S. aureus*. Sesuai dengan hasil uji difusi sebelumnya (Tabel 2), hal ini diduga disebabkan karena pada F1 masih terdapat senyawa-senyawa yang bersifat semipolar, dimana *Sa. typhimurium* lebih sensitif terhadap senyawa kimia dalam daun senggani yang bersifat semipolar. Fraksi 5 dan F6 dipilih untuk selanjutnya dilakukan uji penetapan nilai MIC dan MBC terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Uji MIC dan MBC fraksi teraktif

Pelczar dan Chan (1988) menyatakan bahwa pertumbuhan bakteri dan mikroorganisme lain merupakan perubahan di dalam hasil panen sel (penambahan total

massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Pertumbuhan menyatakan pertambahan jumlah atau massa melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya. Pengukuran diameter zona hambat pada uji difusi hasil fraksinasi (Tabel 4) menunjukkan bahwa F6 memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap pertumbuhan *S. aureus*, sedangkan F5 memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap pertumbuhan *Sa. typhimurium*. Aktivitas penghambatan tersebut dapat berupa bakteristatik maupun bakterisidal. Menurut Jawetz et al. (2001) dan Mycek et al. (2001), bakteristatik merupakan kemampuan suatu senyawa untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dimana bakteri akan mampu melakukan pertumbuhan kembali jika senyawa tersebut dihilangkan. Bakteri akan terhambat pertumbuhannya selama senyawa tersebut masih ada. Bakterisidal merupakan kemampuan suatu senyawa untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dimana bakteri tetap tidak akan memiliki kemampuan untuk melakukan pertumbuhan kembali walaupun senyawa tersebut telah dihilangkan.

Uji MIC dan MBC dilakukan untuk mengetahui apakah senyawa antimikroba pada F5 dan F6 bersifat bakteristatik atau bakterisidal, serta menentukan nilai MIC dan MBC dari F5 terhadap *Sa. typhimurium* dan F6 terhadap *S. aureus*. Penetapan nilai MIC dan MBC penting dilakukan sebagai patokan untuk pemilihan konsentrasi yang tepat dan efektif bagi senyawa yang akan digunakan untuk keperluan pengobatan (Lim et al. 2006).

Uji MIC dan MBC dilakukan pada konsentrasi 100-500 mg/mL. Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F5 terhadap *Sa. typhimurium* seperti tersaji pada Tabel 5. Hasil pengukuran absorbansi (Tabel 5) menunjukkan bahwa F5 pada konsentrasi 100-500 mg/mL menunjukkan nilai ΔOD positif. Hal ini berarti bahwa masih terdapat pertumbuhan bakteri setelah inkubasi, bahkan pada F5 pada konsentrasi 500 mg/mL. Oleh karena itu, pada penelitian ini nilai MIC dan MBC F5 dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* tidak dapat ditetapkan.

Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F6 terhadap *S. aureus* seperti tersaji pada Tabel 6. Hasil pengukuran absorbansi menunjukkan bahwa setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, pada konsentrasi 100-300 mg/mL nilai ΔOD positif. Hal ini berarti bahwa pada tersebut masih terdapat pertumbuhan *S. aureus*. Sebaliknya, hasil pengukuran absorbansi pada konsentrasi 400 dan 500 mg/mL menunjukkan bahwa nilai ΔOD negatif (dalam hal ini dianggap nol), yang berarti bahwa pertumbuhan *S. aureus* tidak terjadi. Oleh karena itu, dapat ditetapkan bahwa nilai MIC F6 terhadap *S. aureus* sebesar 400 mg/mL. Berikutnya dilakukan uji lanjut untuk menetapkan nilai MBC F6 terhadap *S. aureus*.

Uji lanjut dilakukan dengan mensubkultur bakteri dalam tabung konsentrasi 400 dan 500 mg/mL pada media MHA selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa bakteri yang diambil dari konsentrasi 400 maupun 500 mg/mL masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Hal ini berarti bahwa F6 pada konsentrasi 400 dan 500 mg/mL bersifat bakteristatik terhadap *S. aureus*, sehingga nilai MBC tidak dapat ditetapkan.

Tabel 1. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak metanol daun senggani terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*

Sampel yang diuji	Konsentrasi (mg/mL)	Diameter zona hambat (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>Sa. typhimurium</i>
Ekstrak metanol	100	7,985	5,600
daun senggani	200	10,600	8,730
	300	10,735	9,635
	400	11,435	12,700
	500	12,350	12,665
	600	13,065	13,930
	700	12,715	10,685
	800	12,835	13,085
	900	13,835*	14,615*
	1000	13,320	13,500
Kontrol methanol		0,000	0,000
Kontrol CMC (1 mg/mL)		0,000	0,000
Kontrol amoksisilin (2,5 mg/mL)		5,400	12,030

Keterangan: *diameter zona hambat terbesar

Tabel 2. Hasil pengukuran zona hambat hasil partisi dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*

Sampel yang diuji		Diameter zona hambat (mm)			
		<i>S.aureus</i>		<i>Sa. typhimurium</i>	
		L	TL	L	TL
Hasil partisi (mg/mL)	100	5,65	9,70	10,27	6,85
	200	8,00	11,58	10,88	10,42
	300	9,42	15,35	14,17	11,68
	400	10,67	14,75	13,95	12,45
	500	11,18	14,17	11,55	12,40
	600	11,49	15,22	11,44	13,03
	700	13,02	16,07	14,53*	12,94
	800	12,72	16,48	13,35	14,04*
	900	13,10*	17,15*	14,30	13,32
	1000	12,27	16,59	12,62	13,32
Kontrol eter		0,00		0,00	
Kontrol metanol		0,00		0,00	
Kontrol CMC (1 mg/mL)		0,00		0,00	
Kontrol amoksisilin (2,5 mg/mL)		8,43		25,60	

Keterangan: L: bagian larut eter, TL: bagian tidak larut eter, *: diameter zona hambat terbesar

Tabel 3. Fraksi gabungan bagian tidak larut eter dari ekstrak metanol daun senggani

Perbandingan pelarut	Fraksi ke-	Massa total fraksi (g)
CHCl ₃ 100%		
CHCl ₃ : EtoAc (2:1 v/v)	1	0,461
CHCl ₃ : EtoAc (1:1 v/v)		
CHCl ₃ : EtoAc (1:3 v/v)	2	0,594
CHCl ₃ : EtoAc (1:5 v/v)	3	0,290
CHCl ₃ : EtoAc (1:9 v/v)		
CHCl ₃ : EtoAc (1:15 v/v)		
CHCl ₃ : MeOH (1:1 v/v)	4	0,357
CHCl ₃ : MeOH (2:1 v/v)		
CHCl ₃ : MeOH (3:1 v/v)		
CHCl ₃ : MeOH (6:1 v/v)	5	8,870
MeOH 100%	6	2,628

Tabel 4. Hasil pengukuran zona hambat fraksi daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* pada konsentrasi 300 mg/mL

Sampel yang diuji	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>Sa. typhimurium</i>
F1	0,00	1,27
F2	5,19	7,82
F3	8,85	3,02
F4	8,00	8,42
F5	9,59	13,07*
F6	14,17*	9,77
Kontrol eter	0,00	0,00
Kontrol metanol	0,00	0,00
Kontrol CMC (1 mg/mL)	0,00	0,00
Kontrol amoksisilin (2,5 mg/mL)	14,07	13,03

Keterangan: *: diameter zona hambat terbesar

Tabel 5. Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F5 terhadap *Sa. typhimurium*

Fraksi 5 (mg/mL)	OD1	OD2	ΔOD	Pertumbuhan bakteri		Aktivitas
				Setelah inkubasi	Uji lanjut	
100	0,2932	1,5120	1,2188	Tumbuh	-	-
200	0,9045	2,3118	1,4073	Tumbuh	-	-
300	1,0585	2,7372	1,6787	Tumbuh	-	-
400	2,1279	2,9597	0,8318	Tumbuh	-	-
500	2,7668	3,3113	0,5445	Tumbuh	-	-

Keterangan: OD1: optical density sebelum inkubasi OD2: optical density setelah inkubasi, ΔOD: selisih nilai OD1 dan OD2, -: tidak ada

Tabel 6. Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F6 terhadap *S. aureus*

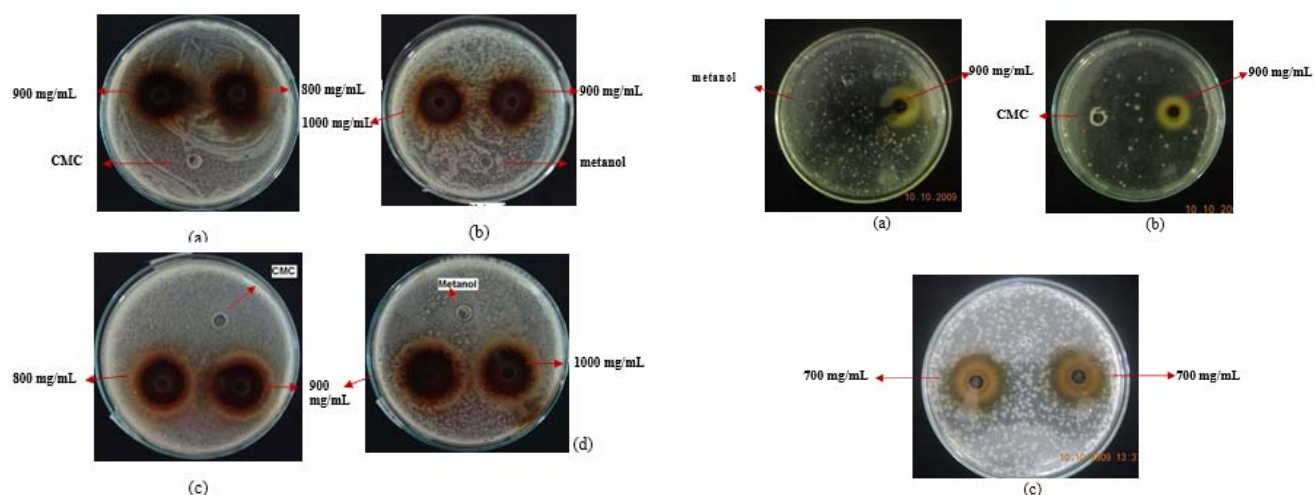
Fraksi 6 (mg/mL)	OD1	OD2	ΔOD	Pertumbuhan bakteri		Aktivitas
				Setelah inkubasi	Uji lanjut	
100	0,29321	3,0681	0,136	Tumbuh	-	-
200	0,90451	5,6270	6,582	Tumbuh	-	-
300	1,05851	6,0990	5,514	Tumbuh	-	-
400	2,12792	0,8760		Tidak tumbuh	Tumbuh	Bakteriostatik
500	2,76682	1,3510		Tidak tumbuh	Tumbuh	Bakteriostatik

Keterangan: OD1: optical density sebelum inkubasi OD2: optical density setelah inkubasi, ΔOD: selisih nilai OD1 dan OD2, -: tidak ada

Tabel 7. Hasil uji golongan senyawa kimia pada F5 dan F6

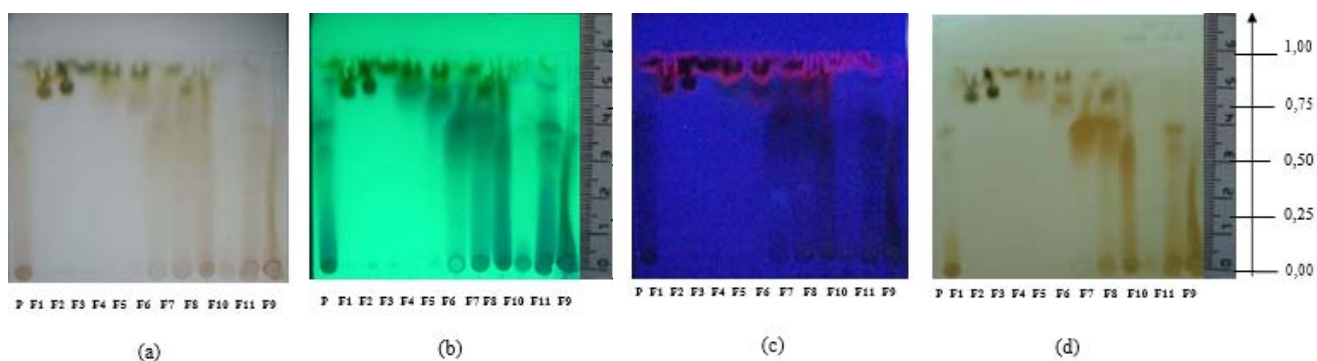
Fraksi yang diuji	Pereaksi semprot spesifik					
	FeCl ₃	AlCl ₃	Vanilin H ₂ SO ₄	SbCl ₃	Lieberman Burchad	Serium (IV) sulfat
F5	+	-	-	-	-	+
F6	+	-	-	-	-	+

Keterangan: +: hasil positif, -: hasil negatif

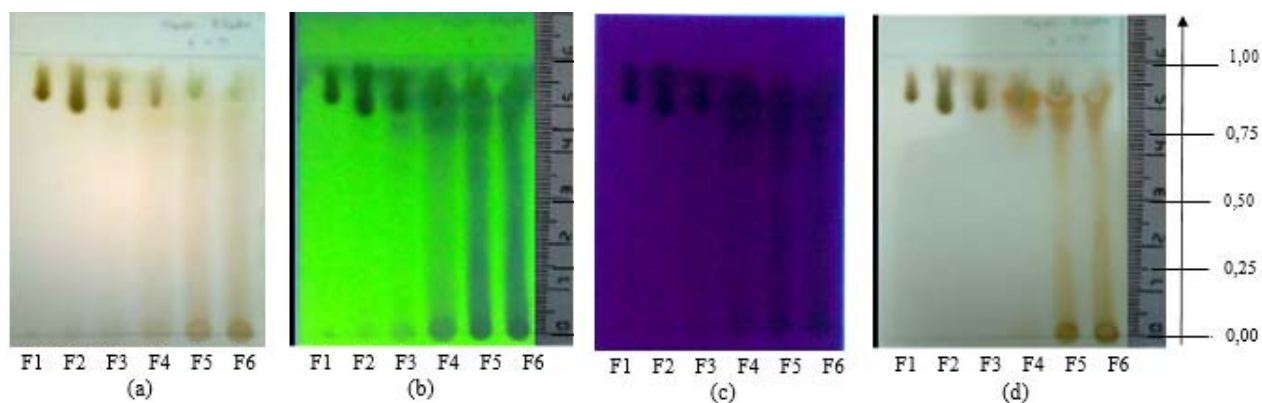


Gambar 1. Hasil uji antimikroba (a) ekstrak metanol konsentrasi 800 dan 900 mg/mL terhadap *S. aureus*, (b) ekstrak metanol konsentrasi 900 dan 1000 mg/mL terhadap *S. aureus*, (c) ekstrak metanol konsentrasi 800 dan 900 mg/mL terhadap *Sa. typhimurium* dan (d) ekstrak metanol konsentrasi 900 dan 1000 mg/mL terhadap *Sa. typhimurium*

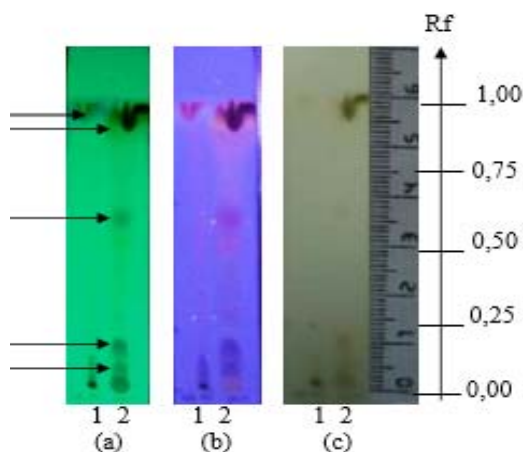
Gambar 3. Hasil uji antimikroba (a) bagian tidak larut eter konsentrasi 900 mg/mL dan kontrol metanol terhadap *S. aureus* (b) bagian tidak larut eter konsentrasi 900 mg/mL dan kontrol CMC (1 mg/mL) terhadap *S. aureus*, dan (c) bagian larut eter 700 mg/mL terhadap *Sa. typhimurium*.



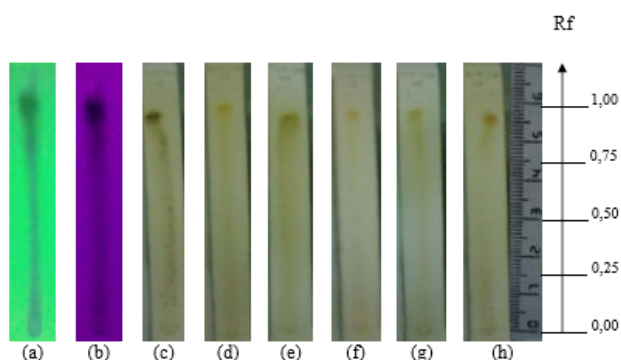
Gambar 4. Kromatogram fraksi daun senggani dengan deteksi (a) sinar visibel, (b) UV254, (c) UV366, dan (d) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: kloroform:etil asetat 1:9 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm



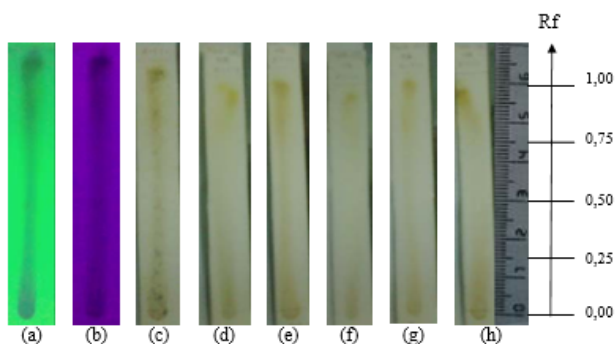
Gambar 5. Kromatogram enam fraksi daun senggani dengan deteksi (a) sinar visibel, (b) V254, (c) UV366, dan (d) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: kloroform:etil asetat 1:9 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm



Gambar 2. Kromatogram bagian larut dan tidak larut eter dengan deteksi (a) UV254 (b) UV366 (c) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: kloroform:etil asetat 1:9 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm, Keterangan: 1. Larut eter dan 2. Tidak larut eter



Gambar 6. Kromatogram F5 dengan deteksi (a) UV254, (b) UV 366, (c) FeCl_3 , (d) AlCl_3 , (e) Vanilin H_2SO_4 , (f) SbCl_3 , (g) Lieberman- Burchad dan (h) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: metanol:etil asetat: wasbensin = 2:1:1 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm



Gambar 7. Kromatogram F6 dengan deteksi (a) UV254, (b) UV 366, (c) FeCl_3 , (d) AlCl_3 , (e) Vanilin H_2SO_4 , (f) SbCl_3 , (g) Lieberman-Burchad dan (h) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: metanol:etil asetat: wasbensin = 2:1:1 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm

Deteksi golongan senyawa fraksi teraktif

Deteksi golongan senyawa dilakukan terhadap F5 dan F6 dari ekstrak metanol daun senggani. Deteksi golongan senyawa dilakukan dengan KLT, dengan fase gerak metanol: etil asetat: wasbensin (2:1:1 v/v) untuk F5 dan metanol: kloroform: wasbensin (2:1:1 v/v) untuk F6. Pengamatan yang dilakukan pada UV254 dan UV366 belum memberikan informasi yang lengkap, terutama untuk mengetahui keberadaan senyawa yang tidak dapat berpendar. Oleh karena itu untuk memperoleh informasi keberadaan senyawa yang tidak dapat berpendar, pengamatan dilakukan dengan memberikan pereaksi semprot pada lempeng KLT tersebut.

Pereaksi semprot yang digunakan yaitu FeCl_3 untuk mendeteksi adanya senyawa tanin dan fenolat, AlCl_3 untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid, vanilin asam sulfat untuk mendeteksi adanya senyawa terpenoid, SbCl_3 untuk mendeteksi adanya senyawa saponin, Lieberman-Burchad untuk mendeteksi adanya senyawa steroid dan terpenoid, serta serum (IV) sulfat untuk mendeteksi adanya senyawa organik (Santosa dan Hertiani 2005, Harborne 2006, Permana 2009). Hasil uji golongan senyawa kimia pada F5 dan F6 seperti tersaji pada Tabel 7.

Pereaksi semprot AlCl_3 digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid. Sampel dinyatakan positif mengandung senyawa golongan flavonoid jika terbentuk fluoresensi hijau kuning dengan sinar UV366 setelah penyemprotan (Harborne 2006). Deteksi dengan AlCl_3 menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa baik F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan flavonoid.

Pereaksi semprot vanilin asam sulfat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung senyawa golongan terpenoid jika terbentuk warna ungu, biru, biru-ungu, atau orange ke merah ungu setelah dilakukan penyemprotan (Harborne 2006). Deteksi dengan vanilin asam sulfat menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa baik F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan terpenoid.

Pereaksi semprot SbCl_3 digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa saponin. Sampel dikatakan positif mengandung saponin jika terbentuk warna merah violet setelah disemprot dengan SbCl_3 (Santosa dan Hertiani 2005). Deteksi dengan SbCl_3 menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan saponin.

Lieberman-Burchad digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa steroid dan terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung steroid jika terbentuk warna biru dan dinyatakan positif mengandung terpenoid jika terbentuk warna merah (Permana 2009). Deteksi dengan Lieberman-Burchad menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan steroid dan terpenoid.

Kromatogram (Gambar 6) menunjukkan bahwa uji golongan senyawa kimia terhadap F5 menunjukkan hasil negatif terhadap semua pereaksi spesifik yang diujikan kecuali FeCl_3 dan serum (IV) sulfat. Fraksi 5 menunjukkan adanya reaksi positif terhadap reagen FeCl_3 dengan terbentuk warna biru-kehitaman. Deteksi dengan

sinar UV254 menunjukkan adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau, sedangkan deteksi dengan sinar UV366 menunjukkan adanya pendaran berwarna merah lembayung dengan harga Rf 0,94.

Kromatogram F6 seperti tampak pada Gambar 7. Seperti pada F5, kromatogram (Gambar 7) menunjukkan bahwa uji golongan senyawa kimia terhadap F6 menunjukkan hasil negatif terhadap semua pereaksi spesifik yang diujikan kecuali FeCl_3 dan serum (IV) sulfat. Fraksi 6 menunjukkan adanya reaksi positif terhadap reagen FeCl_3 dengan terbentuk warna biru-kehitaman. Deteksi dengan sinar UV254 menunjukkan adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau, sedangkan deteksi dengan sinar UV366 menunjukkan adanya pendaran berwarna merah lembayung dengan harga Rf 0,94.

Menurut Syarifuddin (1994), perubahan warna yang terjadi pada penambahan FeCl_3 dimungkinkan karena terbentuknya kompleks Fe^{3+} -tanin atau Fe^{3+} -polifenol. Atom oksigen pada tanin dan polifenol mempunyai pasangan elektron bebas yang dapat mendonorkan elektronnya pada Fe^{3+} yang mempunyai orbital d kosong membentuk ikatan kovalen koordinat sehingga menjadi suatu kompleks. Kompleks ini akan menimbulkan warna hijau, merah, biru atau hitam yang kuat apabila mengandung senyawa fenolat.

Menurut Jawetz et al. (2001), senyawa fenol dan derivatnya mampu menimbulkan denaturasi protein. Fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu. Gangguan integritas sitoplasma berakibat pada lolosnya makromolekul, dan ion dari sel. Sel bakteri menjadi kehilangan bentuknya, dan terjadilah lisis.

Tanin terhidrolisis akan menunjukkan warna biru-hitam sedangkan tanin terkondensasi akan membentuk warna biru-hijau setelah penyempitan FeCl_3 pada plat KLT (Permana 2009). Warna biru kehitaman yang terbentuk mengindikasikan bahwa tanin yang terdapat pada F5 maupun F6 daun senggani adalah tanin terhidrolisis. Hal ini seperti yang telah dilaporkan Funatogawa et al. (2004) yang menyatakan bahwa daun senggani memiliki kandungan tanin terhidrolisis yang disebut sebagai Susanti et al. (2008) memaparkan bahwa selain nobotanin B, kandungan senyawa golongan tanin terhidrolisis yang terdapat pada daun senggani antara lain malabathrin B, malabathrin C, malabathrin D, 1,4,6-tri-O-galloyl-D-glukosida, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-glukosida, strictinin, casuarictin, pedunculagin, nobotanin D, pterocaritin, nobotanin G, nobotanin H, nobotanin J, β -sitosterol, α -amyrin, uvaol, sitosterol-3-O- β -D-glukopiranosid, quercetin, quercitrin dan rutin.

Penelitian yang dilakukan oleh Funatogawa et al. (2004) melaporkan bahwa Senggani merupakan salah satu tumbuhan obat penghasil tanin terhidrolisis, yaitu nobotanin B, yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap

Helicobacter pylori. Lim et al. (2006) memaparkan bahwa tanin terhidrolisis yang diekstrak dari *Rhizophora apiculata* memiliki sifat antimikroba yang lebih besar terhadap bakteri dan yeast daripada tanin terkondensasi maupun campuran keduanya (tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi). Selain pengujian kualitatif berdasarkan KLT, pengujian adanya tanin dapat dilakukan dengan uji tabung menggunakan larutan garam gelatin dan FeCl_3 sehingga diharapkan dengan adanya pengujian ini dapat memastikan bahwa tanin yang terkandung pada F5 dan F6 merupakan tanin terhidrolisis atau tanin terkondensasi.

Tanin mempunyai sifat sebagai pengelat, yang mampu mengerutkan selaput lendir usus sehingga gerak peristaltik usus berkurang (Ajizah 2004). Selain itu, zat pengelat juga dapat mengerutkan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Lim et al. (2006) memaparkan bahwa tanin terhidrolisis mampu menghambat pertumbuhan yeast dengan menghambat sintesis pembentukan membran sel dari dinding sel. Abnormalitas yang terjadi pada membran sel ini kemudian menyebabkan perubahan pada permeabilitas sel. Terganggunya permeabilitas membran sel menyebabkan terganggunya transport nutrisi (senyawa dan ion) melalui membran sel sehingga sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhannya. Sebagai akibatnya, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Selain melalui reaksi dengan membran sel, efek antimikroba tanin juga melalui inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Ajizah 2004). Kemungkinan mekanisme inilah yang menyebabkan efek antimikroba yang ditimbulkan oleh daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Hasil metabolit sekunder yang diisolasi dari daun senggani diketahui memiliki aktivitas yang signifikan dalam memproteksi jaringan mukosa pada tikus putih, memiliki aktivitas antiviral, antihelmintik, antispasmodik, antioksidan, antifungal, antikanker, antihipertensi (Hussain et al. 2008), antiinflamatori, antinosisseptik, dan antipiretik (Zakaria et al. 2007, Mazura et al. 2007), memiliki aktivitas antifungal terhadap berbagai fungi patogen seperti *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium equiseti*, *Botrydiplodia theobromae* dan *Colletotrichum corchori* (Begum et al. 2007) serta kandungan fenolnya memiliki aktivitas alelopati terhadap *Raphanus sativus* dan *Echinochloa crus galli* (Faravani et al. 2008). Ekstrak metanol 70% dari daun senggani juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap sintesis nitrit oksida yang berperan terhadap proses inflamasi (Ryu et al. 2001). Antosianin yang diekstrak dari bunga Senggani, yaitu sianidin, memiliki aktivitas antioksidan, antikarsinogenik, antibakteri, antiviral serta banyak digunakan sebagai pewarna alami (See 2008).

KESIMPULAN

Komponen senyawa daun senggani memiliki aktivitas antimikroba teraktif terhadap *S. aureus* pada fraksi 6 konsentrasi 300 mg/mL dengan diameter zona hambat

sebesar 14,17 mm dan terhadap *Sa. typhimurium* pada fraksi 5 konsentrasi 300 mg/mL dengan diameter zona hambat sebesar 13,07 mm. Nilai MIC fraksi 6 terhadap *S. aureus* adalah 400 mg/mL dengan nilai MBC tidak dapat ditentukan, sedangkan nilai MIC dan MBC fraksi 5 terhadap *Sa. typhimurium* juga tidak dapat ditentukan. Komponen senyawa daun senggani yang berperan sebagai antimikroba termasuk dalam golongan fenolik, yaitu tanin dengan harga Rf 0,94.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. Bioscientiae 1 (1): 31-38.
- Ajizah A, Thihana, Mirhanuddin. 2007. Potensi Ekstrak Kayu Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Bioscientiae 4 (1): 37-42.
- Begum J, Yusuf M, Chowdhury JU, Khan S, Anwar MN. 2007. Antifungal activity of forty higher plants against phytopathogenic fungi. Bang J Microbiol 24 (1): 76-78.
- Davis WW, TR Stout. 1971. Disc plate methode of microbiological antibiotic assay. Microbiol 22: 659-665.
- Depkes RI. 1995a. Materi Medika Indonesia edisi VI. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Depkes RI. 1995b. Farmakope Indonesia edisi IV. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Depkes RI. 2000. Parameter Umum Standar Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Dwidjoseputro D. 1994. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta.
- Faravani M, Baki HB, Khalijah A. 2008. Assessment of allelopathic potential of *Melastoma malabathricum* on Radish *Raphanus sativus* and Barnyard Grass *Echinochloa crus-galli*. Not Bot Hort Agrobot Cluj 36 (2):54-60.
- Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y. 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. Microbiol Immunol 48 (4), 251-261.
- Hadinegoro SR. 1999. Masalah Multi Drug Resistance pada Demam Tifoid. CDK 124: 5-8.
- Handayani D, Sayuti N, Dachriyanus. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksi Sterol dari Spon Laut *Petrosia nigrans* Asal Sumatera Barat. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II: 297-305
- Harbone JB. 2006. Metode Fitokimia Cetakan Keempat Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata, Iwang Sudiro. Terbitan II. Penerbit ITB, Bandung.
- Hariaman A. 2008. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hussain F, Abdulla MA, Noor SM, Ismail S, Ali HM. 2008. Gastroprotective effects of *Melastoma malabathricum* aqueous leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. Am J Biochem Biotech 4 (4): 438-441.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2001. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Mikrobiology) Diterjemahkan oleh Tomang H. Penerbit EGC, Jakarta.
- Kusmiyati NWS, Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. Biodiversitas 8 (1): 48-53.
- Lim SH, Darah I, Jain K. 2006. Antimicrobial of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* Barks. J Trop For Sci 18 (1): 59-65.
- Mazura MP, Susanti D, Radasah MA. 2007. Anti-inflammatory action of components from *Melastoma malabathricum*. Pharmacol Biol 45 (5): 372-375.
- Mojab F, M. Poursaeed, H Mehrgan, S Pakdaman. 2008. Antibacterial activity of *Thymus daenensis* methanolic extract. Pak J Pharm Sci 21 (3): 210-213.
- Morin RB, Gorman M. 1995. Kimia dan Biologi Antibiotik β -Lactam (Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics). Edisi III. Diterjemahkan oleh Mulyani S. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Mutschler E. 1991. Dinamika Obat Edisi 5. Penerbit Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. 2001. Farmakologi Ulasan Bergambar. edisi kedua. Diterjemahkan oleh Agoes A. Penerbit Widya Medika, Jakarta.
- Noor SM, Poeloengan M, Yulianti T. 2006. Analisis senyawa kimia sekunder dan uji daya antibakteri ekstrak daun tanjung (*Mimusops elengi* L) terhadap *Salmonella typhi* dan *Shigella boydii*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi 2. UI Press, Jakarta.
- Permana AR. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Buah Pare Belut (*Trichosanthes anguina* L.). [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Purnomo A, Khusnan H, Salasia SIO, Soegiyono. 2006. Isolasi dan karakterisasi *Staphylococcus aureus* asal susu kambing peranakan ettawa. MKH 22 (3): 142-146.
- Purwoko T. 2007. Fisiologi Mikrobial. Bumi Aksara, Jakarta.
- Rahayu WP. 2000. Aktivitas antimikroba bumbu masakan tradisional hasil olahan industri terhadap bakteri patogen dan perusak. Bul Teknol dan Industri Pangan 11 (22): 42-48.
- Retnaningtyas E, Mulyani S. 2008. Uji antibakteri ekstrak metanol daun senggani (*Melastoma candidum*, D. Don) terhadap bakteri *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli*. [Laporan Penelitian]. LPPM UNS, Surakarta.
- Ryu JH, Ahn H, Lee HJ, Feng L, Qun WH, Han YN, Han BH. 2001. Inhibitory activity of chinese medical plants of nitric oxide synthesis in lipopolysaccharide-activated macrophages. J Pharmacol 9: 183-187.
- Santosa CM, Hertiani T. 2005. Kandungan senyawa kimia dan efek ekstrak air daun bangun-bangun (*Coleus amboinicus*, L.) pada aktivitas fagositosis netrofil tikus putih (*Rattus norvegicus*). Majalah Farmasi Indonesia 16 (3): 141-148.
- See KS. 2008. Establishment of Cell Suspension Culture of *Melastoma malabathricum* L. for the Production of Anthocyanin. [Thesis]. Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang.
- Sembiring BB, Ma'mun, Ginting EI. 2006. Pengaruh kehalusan bahan dan lama ekstraksi terhadap mutu ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). Bul Littro 17 (2): 53-58.
- Sentra Informasi IPTEK. 2009. Senggani (*Melastoma candidum* D. Don). http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?mnu=2&id=156. [09 April 2009]
- Sjaajurrahman A, Kumala W, Nurjadi T. 1999. Kepekakaan kuman terhadap antibiotika golongan kuinolon dan sefalosporin. CDK 124: 17-20.
- Srijanto B, Rosidah I, Ris E, Syabirin G, Aan, Mahreni. 2004. Pengaruh Waktu, Suhu dan Perbandingan Bahan Baku-Pelarut pada Ekstraksi Kurkumin dari Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan Pelarut Aseton. Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses: 1-5.
- Susanti D, Sirat HM, Ahmad F, Ali RM. 2008. Bioactive constituents from the leaves *Melastoma malabathricum*. Jurnal Ilmiah Farmasi 5 (1): 1-7.
- Syarifuddin N. 1994. Ikatan Kimia cetakan pertama. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Tensiska, Marsetio, Yudiastuti SON. 2007. Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu. Laporan Penelitian. FTIP Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Tjay TH, Rahardja K. 2002. Obat-obat Penting Khasiat Penggunaann dan Efek Sampingnya. Edisi Kelima. PT Gramedia, Jakarta.
- Triatmodjo P. 1994. Distribusi geografis pola resistensi salmonella terhadap khloramfenikol dan antibiotik pilihan lainnya di daerah Jakarta dan Palembang. CDK 93: 56-59.
- Wang YC, Hsu HW. 2007. Inhibitory effect of *Melastoma candidum* D. Don acetone extract on foodborne pathogenic bacteria survival in food products. J Food Protection 79 (7): 1600-1606.
- Williams RAD, Lambert PA, Singleton P. 1996. Antimicrobial Drug Action. Information Press Ltd., Oxford.
- Yuharmen, Y Ernayati, Nurbalatif. 2002. Uji Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri dan Ekstrak Metanol Legkuas (*Alpinia galanga*). [Laporan Penelitian]. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru, Riau.
- Zakaria ZA, Noor RNSRM, Kumar GH, Ghani ZDFA, Sulaiman MR, Devi GR, Jais AMM, Somchit MN, Fatimah DA. 2007. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic properties of *Melastoma malabathricum* leaves aqueous extract in experimental animals. Can J Physiol Pharmacol 84 (12): 1291-1299.

Identifikasi senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah (*Pandanus conoideus*)

Identification of compounds in red fruit (*Pandanus conoideus*) seed ethanol extract

IDA SUNDARI, FAJAR RAKHMAN WIBOWO

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 3 Maret 2015. Revisi disetujui: 29 Juli 2015.

Abstract. Sundari, Wibowo FR. 2015. *Identification of compounds in red fruit (Pandanus conoideus) seed ethanol extract*. Biofarmasi 13: 78-89. Identification of polar compound in red fruit seed has been done. Non- polar compound was isolated by soxhlet method using petroleum ether. Then polar compound was isolated from residues of red fruit seed soxhletation by maceration method using ethanol 96%. As much as 10.953 g of concentrate ethanol extract was yielded from 150 g dry powder red fruit seed. Compound of red fruit seed ethanol extract was identified by phytochemical screening. The result showed that ethanol extract contains tannin, anthraquinone glycoside, phenolic compound glycoside, and fatty acid glycoside. Then ethanol extract was separated by various separation methods, included flash column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and HPLC. Flash column chromatography was not able to separate all the polar compound of red fruit seed. Chromatogram profile of HPLC showed that ethanol extract has minimal 5 compounds. Sephadex chromatography separation was considered the most effective than another separation method because it is able to separate all compounds on ethanol extract of red fruit seeds. The result of Sephadex chromatography separation showed that phenolic glycosides dominate polar component of red fruit seeds (57.375%), followed by tannin (22.345%) and anthraquinone glycoside (18.732%). In general, the results of this study indicated that compounds of ethanol extract have potential as a drug because tannins and glycosides (anthraquinone and phenolic compounds) are generally antioxidant compounds.

Keywords: Glycosides, *Pandanus conoideus*, red fruit, seed, sephadex column chromatography, tannin

PENDAHULUAN

Buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) merupakan tumbuhan endemik Papua yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai salah satu sumber fitofarmaka Indonesia. Buah yang termasuk dalam famili *Pandanaceae* ini oleh masyarakat lokal Papua secara empiris telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Sari buah merah yang diambil dari daging buah telah digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit degeneratif, seperti misalnya diabetes mellitus, asam urat, hipertensi, stroke, dan kanker (Budi dan Paimin 2005).

Sari buah merah mengandung senyawa antioksidan dengan kandungan yang cukup tinggi yaitu karotenoid (12.000 ppm), beta-karoten (700 ppm), dan tokoferol (11.000 ppm) (Budi 2001). Sari buah merah dapat menghambat proliferasi sel limfosit dan pertumbuhan sel penyebab kanker sehingga angka kematian karena kanker di Indonesia dapat ditekan (Wahyuniari et al. 2009; Mu'nim et al. 2006). Konsumsi beta-karoten rutin membuat tubuh dapat memperbanyak sel-sel alami pembasmi penyakit. Bertambahnya sel-sel tersebut akan menekan kehadiran sel kanker dengan menetralkan radikal bebas senyawa karsinogen penyebab kanker (Sofia 2005). Bahkan, uji *in vivo* menggunakan hewan percobaan tikus *Sparague Dawley* menunjukkan bahwa buah merah mampu berperan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan jaringan pada tikus secara optimal (Sari 2008).

Sampai saat ini, pemanfaatan buah merah hanya terfokus pada daging buahnya. Padahal, selain daging merah, bagian lain dari buah merah adalah biji buahnya. Jumlah biji buah merah cukup melimpah karena buah merah tersusun atas ribuan biji yang membentuk kulit buah. Selama ini, bijinya dibuang begitu saja setelah daging buahnya diambil. Padahal, buah dan biji saling berkaitan erat karena keduanya mempunyai susunan struktur hampir sama dan sama-sama berfungsi sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan dalam tumbuhan (Suharto 2004). Selain itu, biji juga mengandung bahan makanan utama misalnya karbohidrat, protein, lipid, dan beberapa senyawa metabolit sekunder (Tjitrosoepomo 2005). Oleh karena itu, kandungan senyawa yang terdapat dalam daging buah merah diduga juga terdapat dalam biji buah merah.

Kemampuan antimikroba biji buah atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk) lebih baik dibandingkan pada daging buah atung (Murhadi et al. 2004). Bahkan, uji toksisitas tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) menunjukkan bahwa biji buah nyamplung lebih toksik dibandingkan daging buahnya (Santi 2009). Fakta ini menunjukkan bahwa pemanfaatan biji dapat setara bahkan dapat juga lebih baik dibanding pada daging buahnya. Sehingga tidak menutup kemungkinan bahwa biji buah merah dapat juga dimanfaatkan seperti pada daging buah merah yang telah dilakukan pemanfaatan lebih dahulu. Hal inilah yang mendorong dilakukan identifikasi kandungan

senyawa dalam biji buah merah sebagai tahapan awal pemanfaatan biji buah merah.

Komponen non polar dari biji buah merah telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi oleh Septiyaningsih (2010). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa komponen non polar biji buah merah didominasi oleh asam lemak. Asam lemak ini merupakan kandungan utama dari daging buah merah (Budi 2001). Etanol merupakan pelarut polar yang banyak digunakan untuk mengekstrak komponen polar suatu bahan alam dan dikenal sebagai pelarut universal. Ekstrak etanol buah merah mengandung golongan senyawa asam lemak, steroid/terpenoid, karotenoid, minyak atsiri, glikosida jantung, antrakuinon, flavonoid dan kumarin (Marliyana et al. 2009). Kasus ini membuktikan bahwa etanol tidak hanya melarutkan komponen polar, tetapi komponen non polar juga ikut terekstrak di dalamnya. Komponen polar dari suatu bahan alam dalam ekstrak etanol dapat diambil dengan teknik ekstraksi lebih lanjut dan atau melalui proses pemisahan lanjut (Santana et al. 2009). Pemilihan teknik pemisahan ini merupakan salah satu faktor yang menentukan berhasil atau tidaknya proses identifikasi yang dilakukan. Pemilihan metode pemisahan sendiri bergantung pada senyawa yang terkandung dalam bahan alam (Harborne 1984), dalam hal ini biji buah merah. Oleh karena itulah, dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi, pemisahan, dan identifikasi komponen polar biji buah merah sebagai tahap awal pendahuluan pemanfaatan biji buah merah, khususnya dalam ilmu kesehatan.

Tujuan penelitian ini adalah (i) Mengetahui kadar masing-masing golongan senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan skrinning fitokimia. (ii) Mengetahui metode pemisahan yang tepat untuk memisahkan komponen polar biji buah merah. (iii) Mengetahui senyawa polar yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah setelah dilakukan pemisahan.

BAHAN DAN METODE

Metode penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen di laboratorium kimia. Untuk mengisolasi komponen polar biji buah merah dilakukan dengan metode ekstraksi dengan cara mengisolasi komponen non polarnya terlebih dahulu untuk mempermudah metode pemisahan. Isolasi komponen non polarnya dilakukan dengan cara ekstraksi sokhlet dengan pelarut petroleum eter. Residu sokhlet tersebut di maserasi dengan pelarut etanol untuk diambil komponen polarnya. Untuk mengetahui teknik pemisahan yang tepat, ekstrak etanol dilakukan uji skrinning fitokimia. Pemisahan komponen polar ekstrak etanol dilakukan dengan metode kromatografi. Metode kromatografi yang dimaksud meliputi Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Kolom *Flash*, Kromatografi Filtrasi Gel (Sephadex LH-20), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang dipisahkan dengan kromatografi, fraksi hasil pemisahan

dilakukan skrinning fitokimia lebih lanjut untuk memperoleh golongan senyawa yang lebih spesifik.

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2009 – Mei 2010 di Laboratorium Kimia Dasar FMIPA dan SubLab Kimia Laboratorium Pusat Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Alat dan Bahan

Alat utama yang digunakan adalah Sokhlet, *vacuum rotary evaporator*, *Buchner*, Plat KLT, TLC Chamber, Lampu UV 254 nm dan 365 nm, alat kromatografi kolom *flash* dan HPLC. Bahan tumbuhan yang digunakan adalah biji buah merah dari Papua. Bahan lain yang digunakan antara lain

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: asetonitril for HPLC grade (Merck), CH_3COOH anhidrat (Merck), dietil eter p.a (Merck), etanol 96% (Merck), etil asetat p.a (Merck), FeCl_3 p.a (Merck), H_2SO_4 p.a (Merck), H_3PO_4 p.a (Merck), HCl p.a (Merck), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ p.a (Merck), Kertas saring (bratachem), kloroform p.a (Merck), KOH p.a (Merck), logam Mg, metanol p.a (Merck), mikrofilter 0.45 μm , Na_2SO_4 anhidrat (Merck), NaOH p.a (Merck), n-heksan (Merck), Petroleum eter p.a (Merck), plat KLT silika gel GF254 (Merck), Silika gel for column (Merck).

Prosedur penelitian

Persiapan sampel biji buah merah

Biji buah merah dibersihkan dari kotoran/sisa daging yang menempel pada biji buah merah dengan air kemudian dicuci kembali dengan aseton. Biji buah merah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam suhu kamar selama 2 hari/sampai benar-benar kering. Setelah kering, biji digiling menjadi serbuk dengan ukuran 50-60 mesh.

Ekstraksi

Sebanyak 150 g serbuk biji buah merah diekstraksi sokhlet dengan pelarut petroleum eter dengan perbandingan 1:10 (w/v) pada T :40-60°C. proses sokhlet dapat diakhiri apabila filtrat/pelarut berwarna jernih (setelah terjadi 16-20 sirkulasi).

Residu hasil sokhlet dikeringkan, kemudian di maserasi dengan pelarut etanol 1500 mL selama 7 hari dan disertai pengadukan setiap hari. Filtrat hasil maserasi dipisahkan dari residunya dengan cara disaring dengan penyaring *buchner*. Filtrat etanol dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada 60-75°C sampai diperoleh ekstrak pekat etanol.

Skrinning fitokimia

Skrinning fitokimia (uji tabung) terhadap ekstrak etanol, sebagai berikut:

Glikosida: Lebih kurang 20 mL ekstrak etanol ditambahkan 15 mL HCl 10%, kemudian direfluks selama 30 menit. Larutan didinginkan kemudian diekstrak 3 x 8 mL eter dengan corong pisah. Lapisan eter dipisahkan dan ditambah dengan Na_2SO_4 anhidrat. Lapisan eter ini merupakan bagian aglikon (bebas gula).

Senyawa fenolik: Lebih kurang 1 mL ekstrak eter diuapkan kemudian ditetesi dengan kalium heksasianoferrat (III) dan larutan FeCl_3 . Larutan hitam kehitaman yang terbentuk menunjukkan adanya senyawa fenolik

Flavonoid: Lebih kurang 3 mL ekstrak eter diuapkan. Sisa dilarutkan dalam 1-2 mL metanol 50%. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan logam Mg dan 4 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

Antrakuinon: Lebih kurang 3 mL ekstrak eter ditambahkan NaOH 10% kemudian dikocok. Bila terbentuk warna merah sampai jingga menunjukkan adanya antrakuinon.

Asam Lemak: Lebih kurang 5 mL ekstrak eter diuapkan. Jika sisa berminyak maka dalam sari eter tersebut mengandung asam lemak.

Saponin: Lebih kurang 2 mL ekstrak etanol diuapkan kemudian diencerkan dengan aquades dengan perbandingan (1:1). Dikocok selama 15 menit. Apabila buih/busa bertahan selama 30 menit, berarti ekstrak mengandung saponin.

Tanin: Lebih kurang 1 mL ekstrak etanol diencerkan dengan 2 mL aquades. Ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 . timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekin.

Antosianin: Lebih kurang 1 mL ekstrak etanol ditambahkan/dibuat dalam suasana asam, netral dan basa. Jika dalam suasana asam berwarna merah, dalam suasana netral berwarna ungu dan dalam suasana basa berwarna hijau atau ungu maka dalam ekstrak etanol mengandung antosianin

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sistem eluen yang akan digunakan dalam kromatografi kolom flash ditentukan terlebih dahulu dengan KLT. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana-etil asetat. Ekstrak etanol ditotolkan pada plat KLT dan dielusikan dalam larutan pengembang *n*-heksana : etil asetat (1:1; 1:2; 2:1; 1:3; 1:4; 2:3; 3:7; 10:0; 0:10). Deteksi bercak diamati dalam lampu UV 254 nm dan 365 nm. Sistem eluen terpilih yaitu sistem yang memberikan profil pemisahan paling baik dan memberikan *spot* paling banyak. Sistem eluen tersebut kemudian digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi cair *flash*.

Kromatografi Kolom Flash

Kromatografi kolom *flash* dilakukan dengan eluen yang memberikan profil KLT paling baik. Fase diamnya berupa silika gel *for column chromatography* sebanyak 30 g yang diaktivasi 24 jam pada suhu 110°C. Kolom kromatografi *flash* yang dipakai berdiameter 2 cm. silika gel teraktivasi dibuat kolom dengan cara basah/dibuat bubur dengan pelarut *n*-heksan. Kolom tersebut dikondisikan selama 24 jam sebelum digunakan untuk elusi.

Proses elusi dimulai dari pelarut yang diperoleh dari KLT kemudian ditingkatkan kepolarannya untuk menyempurnakan proses elusi sampel. Setiap pengelusan, kolom ditekan dengan *flash*. Eluat ditampung dalam 50

vial, dengan 4 mL eluat per vial. Masing-masing eluat diuapkan pelarutnya dengan cara diangin-anginkan. Masing-masing vial ditimbang untuk mengetahui beratnya. Kemudian masing-masing vial tersebut dilakukan uji KLT dan dicocokkan R_f -nya dengan hasil KLT sebelumnya untuk memastikan bahwa sampel dapat memisah dengan baik. vial yang mempunyai R_f identik dengan hasil KLT sebelumnya dilakukan pemisahan lebih lanjut.

Kromatografi kolom Sephadex

Kromatografi ini menggunakan sephadex LH-20. Sebanyak 1,356 g sampel dielusikan dalam kolom sephadex siap pakai. Sampel dielusikan gravitasi dengan pelarut metanol 100% sampai seluruh sampel dapat terelusikan keluar dari kolom.

Eluat ditampung dalam 50 vial, dengan 4 mL eluat per vial. Masing-masing eluat diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*. Masing-masing vial ditimbang untuk mengetahui beratnya. Setelah itu sampel dilakukan skrining fitokimia untuk memastikan semua golongan senyawa dapat memisah dengan cara ini.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kondisi operasi alat HPLC : Fase diam: kolom C18, Fase gerak: asetonitril : 0.4 % H_3PO_4 dalam aquabides (10:90), Kecepatan alir: 1 mL/menit, Detektor UV pada λ 280 nm, Jumlah sampel : 20 μL /injeksi. Sampel yang diinjeksi meliputi pelarut etanol 95% (standar) dan ekstrak etanol biji buah merah.

Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol dari hasil skrining fitokimia. Penentuan fase diam dan eluen dengan menggunakan KLT akan diperoleh data berupa spot-spot hasil pemisahan dan nilai R_f untuk tiap perbandingan eluen *n*-heksan dan etil asetat, yang selanjutnya hasil pemisahan yang baik akan digunakan dalam pemisahan kromatografi kolom *flash*.

Pemisahan komponen polar ekstrak etanol menggunakan kromatografi *flash* maupun kolom sephadex akan dihasilkan eluat. Tiap eluat diuji dengan KLT dan menghasilkan nilai R_f yang kemudian dibandingkan dengan nilai R_f awal. Selain itu masing-masing eluat juga dilakukan skrining fitokimia terhadap golongan metabolit sekunder yang positif pada ekstrak etanol awal (sebelum dipisahkan dengan kolom) untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder tersebut dapat terpisah dengan baik atau tidak serta untuk mengetahui bagaimana pola pemisahan dan analisis kuantitatif masing-masing senyawanya.

Pemisahan komponen polar biji buah merah menggunakan HPLC menghasilkan data berupa profil kromatogram, waktu retensi, dan luas puncak. Jumlah puncak menunjukkan jumlah komponen senyawa dalam ekstrak etanol (kualitatif). Luas puncak digunakan untuk menghitung % kandungan masing-masing komponen polar senyawa dalam biji buah merah (kuantitatif).

Masing-masing metode pemisahan (kromatografi kolom *flash*, kromatografi kolom sephadex, dan HPLC) dibandingkan satu sama lain untuk mendapatkan metode

pemisahan yang paling tepat. Metode pemisahan yang paling tepat untuk memisahkan komponen polar biji buah merah adalah metode yang menghasilkan data terbaik baik dari sisi kualitatif maupun kuantitatifnya. Komponen polar yang teridentifikasi baik dengan menggunakan metode pemisahan tersebut kemudian dianalisis golongan senyawa lebih lanjut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Budi (2001) menyatakan bahwa komponen non polar dari buah merah sebagian besar terdiri dari asam lemak. Komponen non polarnya, terutama asam lemak harus dihilangkan terlebih dahulu. Proses sokhlet dilakukan untuk menghilangkan komponen non polar. Ekstraksi sokhlet 150 g biji buah merah dilakukan dalam 1500 mL petroleum eter. Biji buah merah yang telah disokhlet dimaserasi dan diperoleh ekstrak etanol yang berwarna coklat kekuningan. Ekstrak etanol tersebut dipekatkan dan diperoleh ekstrak pekat etanol berwarna coklat kehitaman sebanyak 10,953 g.

Ekstrak pekat etanol diduga hanya mengandung senyawa yang bersifat polar karena senyawa non polarnya telah diambil terlebih dahulu dengan ekstraksi sokhlet. Ekstrak etanol diduga mengandung senyawa kimia antara lain garam alkaloid, alkaloid basa kuartern, antosianin, glikosida, saponin, dan tanin. Menurut Moeljopawiro et al. (2007), Ekstrak buah merah tidak mengandung alkaloid. Sehingga dalam penelitian ini tidak dilakukan skrinning fitokimia alkaloid terhadap ekstrak etanol biji buah merah. Glikosida adalah senyawa yang terdiri atas gabungan dua bagian senyawa, yaitu gula dan bukan gula (aglikon). Aglikon dari glikosida ini dapat berupa flavonoid, antrakuinon, senyawa fenolik bebas, dan asam lemak (Rohman 2009).

Skrinning Fitokimia

Skrinning fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam penelitian fitokimia. Skrinning fitokimia dilakukan dengan uji tabung. Skrinning fotokimia ini dilakukan untuk identifikasi awal golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol biji buah merah. Adapun hasil skrinning fitokimia ekstrak etanol biji buah merah dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji di atas sama dengan hasil skrinning fitokimia ekstrak etanol biji buah merah yang telah dilakukan oleh Septiyaningsih (2010). Ekstrak etanol biji buah merah setidaknya 4 senyawa yaitu tanin katekin, glikosida antrakuinon, glikosida senyawa fenolik, dan asam lemak. Tanin katekin merupakan *condensed tanin* yang tidak dapat dihidrolisis menjadi bagian molekul yang lebih kecil. Tanin katekin sering kali dijumpai dalam bentuk polimer, yang tersusun atas senyawa polifenol (Manito 1985). Kandungan senyawa kimia dalam biji buah merah memiliki beberapa persamaan dengan kandungan kimia dalam buah merah, yaitu sama-sama mengandung asam lemak dan antrakuinon meskipun dalam biji buah merah keduanya dalam bentuk glikosida. Ekstrak etanol buah merah mengandung

golongan senyawa asam lemak, steroid/terpenoid, karotenoid, minyak atsiri, glikosida jantung, antrakuinon, flavonoid dan kumarin (Marliyana et al. 2009)

Pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak etanol

Hasil skrinning fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji buah merah mengandung golongan tanin katekin, glikosida antrakuinon, glikosida asam lemak dan glikosida senyawa fenolik. Keempat golongan senyawa tersebut adalah golongan metabolit sekunder yang umumnya memiliki titik didih tinggi dan memiliki rantai yang panjang. Selain itu, masing-masing golongan tersebut memiliki karakteristik pemisahan yang berbeda-beda sehingga dalam penelitian ini akan digunakan beberapa metode kromatografi untuk memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak etanol. Metode yang digunakan dalam pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah adalah Kromatografi Kolom *Flash*, Kromatografi Filtrasi Gel (Sephadex), dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Masing-masing metode kromatografi tersebut akan dilakukan untuk mengetahui metode kromatografi mana yang efektif untuk memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah.

Kromatografi kolom flash

Penentuan Sistem Eluen dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Penentuan sistem eluen dengan KLT bertujuan untuk mencari sistem eluen yang mampu memberikan pemisahan yang paling baik dan sekaligus untuk mengetahui profil pemisahannya. Sistem eluen yang menghasilkan pemisahan paling baik akan digunakan sebagai sistem eluen dalam proses pemisahan dengan kromatografi kolom *flash* dan untuk analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom *flash*.

Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana dan etil asetat yang divariasi tingkat kepolarannya dengan memvariasi perbandingan volume hingga diperoleh perbandingan volume yang memberikan pemisahan paling baik. Campuran pelarut *n*-heksana dan etil asetat merupakan sistem eluen universal yang sering direkomendasikan sebagai fase gerak dalam kromatografi karena mudah diuapkan dan mudah mengatur tingkat kepolaran eluen.

Sistem eluen yang dipakai adalah sistem eluen yang dapat memberikan pemisahan yang paling baik, ditandai dengan spot-spot yang terpisah nyata. Penentuan sistem eluen dengan KLT dilakukan dengan metode *trial and error*. Ekstrak etanol awal ditotolkan pada plat KLT kemudian dielus dengan berbagai variasi perbandingan *n*-heksana : etil asetat (v/v). Variasi terdiri dari perbandingan *n*-heksana 100%, etil asetat 100%, *n*-heksana-etil asetat (1:1; 1:2; 2:1; 1:3; 1:4; 2:3; 3:7). Spot hasil elusi dilihat dalam lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm untuk dilihat pola pemisahannya.

Hasil pemisahan terbaik pada perbandingan *n*-heksana : etil asetat (1:3) yang dapat dilihat pada Gambar 1. Sistem eluen ini menghasilkan 3 spot yang seolah-olah hanya menghasilkan 2 spot. Hal ini disebabkan karena hanya 2

spot dapat naik/terelusi oleh pelarut, sedangkan 1 spot ada pada titik awal penotolan (spot tidak dapat naik). Spot 1 berwarna orange memiliki R_f 0,87 dan spot 2 berwarna kuning memiliki R_f 0,72.

Menurut Still et al. (1978), pemilihan sistem eluen dengan KLT sebaiknya harus memiliki ΔR_f 0,15-0,20. Sistem eluen ini memiliki ΔR_f 0,15 sehingga sistem eluen ini dapat digunakan untuk pemisahan kromatografi kolom *flash*. Jika eluen 1:3 diaplikasikan dalam kromatografi kolom *flash*, spot 1 akan terelusi bersama dengan sistem eluen ini, sedangkan spot 2 yang bersifat lebih polar akan tertinggal terlebih dahulu dalam fase diam. Spot 2 dielusi dengan sistem eluen yang cenderung lebih polar. Sedangkan, spot 3 dielusi oleh pelarut yang paling polar (etil asetat 100%). Campuran senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah cukup sederhana karena profil KLTnya hanya menghasilkan 3 spot. Jumlah spot KLT mengindikasikan setidaknya ada 3 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah sehingga dapat digunakan elusi isokratik dalam kromatografi kolom *flash*.

Pemisahan Komponen Senyawa dalam Ekstrak Etanol dengan Kromatografi Kolom Flash

Kromatografi kolom *flash* merupakan kromatografi dengan tekanan rendah (pada umumnya <20 psi) yang digunakan sebagai kekuatan bagi elusi bahan pelarut melalui suatu ruangan atau kolom yang lebih cepat. Kualitas pemisahan sedang, tetapi dapat berlangsung cepat (10-15 menit). Jenis kromatografi ini merupakan modifikasi dari kromatografi kolom gravitasi dan Kromatografi Vakum Cair (KVC). Selain lebih cepat, kromatografi *flash* ini membutuhkan sampel yang relatif lebih kecil. Karena kolomnya lebih ramping dibandingkan kolom yang digunakan dalam KVC sehingga jumlah fase diam (silika gel) dan fase geraknya lebih kecil sehingga biaya yang dikeluarkan lebih sedikit pula.

Kromatografi kolom *flash* ini menggunakan fase normal karena fase diamnya (silika gel) jauh lebih polar dibanding pelarutnya (*n*-heksan:etil asetat 1:3). Sistem elusi dilakukan secara isokratik karena profil KLT menunjukkan hanya terdapat 2-3 spot, sehingga pemisahan secara gradien dinilai belum perlu.

Sebanyak 0,8g (800 mg) ekstrak etanol dimasukkan di atas permukaan kolom. Kemudian secara perlahan, *n*-heksan-etil asetat (1:3) dimasukkan ke dalam kolom untuk mengelusi sampel sambil diberi *flash* untuk mempercepat proses elusi. Untuk dapat mengelusi sampel secara sempurna, proses elusi ditingkatkan kepolarannya dengan diakhiri elusi etil asetat 100 %. Eluat yang dihasilkan ditampung tiap 3-4 mL dalam 50 vial. Eluat diangin-anginkan untuk menghilangkan pelarutnya, kemudian ditimbang untuk mengetahui berat masing-masing hasil pemisahan tiap vialnya. Berat masing-masing hasil pemisahan kromatografi kolom *flash* dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan profil kromatogram hasil pemisahan. Senyawa yang dihasilkan saat dilakukan pemisahan *flash* cukup kompleks. Setidaknya 5 golongan senyawa hasil pemisahan terdapat dalam ekstrak etanol biji buah merah. Vial 1-7 digolongkan sebagai fraksi 1 (F1),

vial 8-14 digolongkan sebagai fraksi 2 (F2), vial 15-23 digolongkan sebagai fraksi 3 (F3), vial 24-33 digolongkan sebagai fraksi 4 (F4), dan vial 34-50 digolongkan sebagai fraksi 5 (F5). Jumlah fraksi yang diduga ini (5 fraksi) berbeda dengan jumlah fraksi yang terdapat dalam profil KLT pra kolom (3 fraksi). Hal ini diduga karena pemisahan kromatografi kolom *flash* memiliki resolusi yang lebih baik meskipun awalnya menggunakan sistem eluen yang sama saat dilakukan KLT. Sistem eluen dalam kromatografi kolom *flash* tidak bersifat statis seperti dalam KLT karena kepolaran pelarutnya ditingkatkan agar komponen senyawa dalam kolom dapat terelusi keluar kolom.

Berat ekstrak etanol biji buah merah hasil pemisahan dengan kromatografi kolom *flash* adalah 165 mg atau 20,625% dari berat awal ekstrak etanol biji buah merah yang dielusikan. Sisanya, sampel masih terjebak dalam kolom atau masih tetap berada di atas permukaan adsorben, tidak dapat dielusi secara sempurna oleh sistem eluennya meskipun telah di elusi dengan etil asetat 100 %. Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor, antara lain karena pemilihan sistem eluen *n*-heksan-etil asetat (1:3) belum sepenuhnya tepat. Sistem eluen tersebut tidak dapat mengelusi seluruh senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol. Hal ini diperkuat dengan masih ada spot pekat yang tidak ikut terelusi pada lokasi penotolan pertama kali pada plat KLT (Gambar 1). Faktor lain adalah keberadaan tanin katekin (*condensed tannin*) dalam ekstrak etanol mempengaruhi pemisahannya. Tanin katekin merupakan suatu polimer. Karena golongan ini sangat ruah dan memiliki gugus hidroksi, sehingga golongan ini tidak dapat terelusi karena bentuknya dan dapat menjerat golongan/senyawa lain dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen dapat terjadi karena golongan senyawa metabolit sekunder hasil skrinning seperti glikosida asam lemak, antrakuinon dan senyawa fenolik sama-sama memiliki gugus hidroksil, sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus hidroksi tanin katekin. Oleh karena itulah sebagian sampel tidak dapat terelusi dan tetap berada di atas permukaan kolom. Untuk membuktikan apakah tanin katekin dapat terelusi atau tidak, uji tanin katekin dilakukan dengan uji tabung dengan FeCl_3 sebagai pereaksi penampak warnanya. Hasilnya, semua hasil pemisahan kromatografi kolom *flash* uji negatif terhadap tanin. Itu artinya tanin benar-benar tidak dapat dipisahkan dengan kromatografi kolom *flash*. Hasil uji tanin menunjukkan bahwa pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah menggunakan kromatografi kolom *flash* dengan fase diam silika gel dan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (1:3) menggunakan fase normal dinilai masih belum tepat.

Kromatografi kolom Sephadex

Kromatografi kolom Sephadex merupakan metode pemisahan senyawa kimia yang didasarkan pada ukuran molekul. Metode ini dilakukan untuk membandingkan hasilnya dengan metode pemisahan yang pertama. Skrinning fitokimia ekstrak etanol masih menunjukkan adanya asam lemak sehingga dilakukan pemisahan terhadap komponen polarnya lagi dengan ekstraksi partisi cair-cair untuk mempermudah proses pemisahannya.

Sebelum dilakukan pemisahan dengan kromatografi Sephadex, ekstrak etanol di partisi dengan *n*-heksan untuk mengambil asam lemaknya terlebih dahulu. *n*-heksan dipilih sebagai pelarut karena terdapat perbedaan sifat kepolaran dengan etanol. *n*-heksan merupakan pelarut paling non polar dan asam lemak bersifat non polar. Oleh karena itu, nantinya asam lemak yang berada dalam ekstrak etanol diharapkan dapat terekstrak ke dalam *n*-heksan.

Ekstraksi cair-cair ini menghasilkan 2 ekstrak yaitu ekstrak etanol dan ekstrak *n*-heksan. Untuk memastikan bahwa asam lemak telah benar-benar terekstrak ke dalam *n*-heksan, dilakukan skrinning fitokimia. Hasil skrinning fitokimia menunjukkan bahwa asam lemak telah terekstrak ke dalam *n*-heksan dan ekstrak etanol hanya mengandung komponen polar saja. Skrinning fitokimia ekstrak etanol hasil partisi dapat dilihat pada Tabel 2.

Kromatografi filtrasi gel ini menggunakan Sephadex LH-20. Prinsip dari jenis kromatografi ini adalah ukuran molekul-molekul yang kecil akan memasuki pori-pori dari gel sedangkan molekul besar akan melewati sela-sela gel lebih cepat bila dibandingkan dengan molekul yang melewati pori-porinya. Jadi, urutan elusi mula-mula adalah molekul yang lebih besar, molekul sedang, dan terakhir molekul yang paling kecil. Metode pemisahan ini dipilih karena hasil skrinning fitokimia ekstrak etanol positif mengandung tanin, glikosida antrakuinon dan glikosida senyawa fenolik. Ketiga golongan senyawa tersebut memiliki keruan geometrik dan berat molekul yang besar. Kromatografi kolom Sephadex ini sangat efektif untuk memisahkan golongan glikosida dan senyawa dengan berat molekul yang besar hasil isolasi (Kristanti et al. 2008). Pegg et al. , (2008) mengisolasi fraksi tanin dan komponen fenolik dalam daun bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) dengan kromatografi kolom sephadex LH-20. *Condensed tannin* standar yang telah murni dalam *Castanea sativa* diperoleh dengan pemisahan kromatografi Sephadex LH-20 (Zirkovic et al. 2009).

Sebanyak 1,356 g ekstrak etanol biji merah dipisahkan dengan kromatografi kolom Sephadex LH-20 dengan metanol 100%. Eluat ditampung dalam 50 vial setiap 4 mL. Eluat yang dihasilkan mula-mula berwarna orange, kemudian semakin memudar dan akhirnya bening pada vial ke-50. Hal ini menandakan bahwa sampel dalam kolom Sephadex LH-20 telah habis terelusi oleh metanol. Eluat yang dihasilkan diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya. Setelah pelarutnya hilang, sisa evaporasi pada vial 1-50 ditimbang untuk mengetahui berat hasil pemisahan tiap vialnya. Diagram no.vial vs berat dapat dilihat pada Gambar 3.

Secara umum, hasil pemisahan kromatografi kolom sephadex LH-20 cukup baik karena jumlah ekstrak etanol yang dielusikan relatif sama dengan jumlah ekstrak etanol hasil elusi. Gambar 3 menunjukkan bahwa senyawa yang berberat molekul tinggi merupakan komponen senyawa yang mendominasi dalam ekstrak etanol biji buah merah. Hal ini disebabkan karena fraksi yang keluar lebih dahulu hasil pemisahan sephadex adalah senyawa-senyawa dengan berat molekul besar yang kemudian diikuti oleh senyawa berberat molekul lebih kecil (dalam hal ini senyawa pada no.vial awal (no. vial <20) memiliki berat yang jauh lebih

besar bila dibandingkan senyawa pada no.vial akhir). Apabila Gambar 3 diibaratkan sebagai profil kromatogram, setidaknya ada 5 golongan senyawa yang diduga terdapat dalam ekstrak etanol biji buah merah. Vial 1-6 diduga sebagai fraksi 1(F1), vial 7-23 diduga sebagai fraksi 2 (F2), vial 24-32 diduga sebagai fraksi 3 (F3), vial 33-40 diduga sebagai fraksi 5 (F4), dan vial 41-50 diduga sebagai fraksi 5 (F5).

Untuk membuktikan pendugaan sebelumnya, hasil pemisahan kromatografi kolom sephadex dilakukan skrinning fitokimia untuk senyawa-senyawa yang uji positif pada ekstrak etanol bebas lemak. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah komponen senyawa dalam ekstrak etanol tersebut dapat terpisah baik atau tidak dengan kromatografi kolom sephadex. Hasil skrinning fitokimia ini dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil diatas menunjukkan bahwa tanin katekin, glikosida antrakuinon, dan glikosida senyawa fenolik telah berhasil dielusi dan dipisahkan dengan cara kromatografi filtrasi gel sephadex LH-20. Secara umum, glikosida senyawa fenolik merupakan senyawa yang mendominasi dalam ekstrak etanol biji buah merah. Hasil pemisahan sephadex ekstrak etanol biji buah merah dapat digolongkan berdasarkan senyawa yang keluar dari kolom menjadi beberapa fraksi utama. Komponen senyawa pada vial 1-15 merupakan glikosida senyawa fenolik (Fraksi 1). Senyawa pada vial 16-18 terdiri dari senyawa fenolik dan glikosida antrakuinon (Fraksi 2), vial 19-35 terdiri dari senyawa tanin dan glikosida senyawa fenolik yang kadang pada vial tertentu juga mengandung glikosida antrakuinon (Fraksi 3). Setelah tanin keluar, glikosida antrakuinon keluar lagi bersama glikosida senyawa fenolik pada vial 36-38 (Fraksi 4). Setelah itu glikosida fenolik kembali keluar kolom dari vial 39 sampai pada vial ke-50 (Fraksi 5). Meskipun penggolongan fraksi berada pada vial yang berbeda, namun diperoleh kesimpulan yang sama, yakni hasil pemisahan sephadex menunjukkan bahwa setidaknya ada 5 fraksi/senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah.

Hasil pemisahan kromatografi kolom sephadex menunjukkan bahwa tanin keluar bukan di fraksi awal melainkan di fraksi tengah. Padahal prinsip pemisahan pada kromatografi kolom sephadex adalah senyawa dengan berat molekul besar akan keluar lebih dulu sedangkan senyawa dengan berat molekul yang lebih kecil akan terjebak ke dalam pori sephadex dahulu. Kasus ini seperti pemisahan senyawa dalam bahan alam yang dilakukan oleh Amarowicz et al. , (2009) dengan kromatografi Sephadex LH-20. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa fraksi 1 merupakan molekul gula yang mengikat senyawa fenolik dengan berat molekul kecil dan fraksi 2 merupakan tanin. Senyawa dalam vial 1 sampai vial 18 ekstrak etanol bijibuah merah diduga merupakan glikosida fenolik yang terdiri dari gula dan senyawa fenolik berberat molekul kecil pula. Penelitian tersebut tidak dapat memberi penjelasan fenomena penyebab mengapa fraksi tanin keluar di tengah.

Tabel 1. Hasil skrinning fitokimia (uji tabung) ekstrak etanol biji buah merah

Uji fitokimia	Pereaksi uji	Perubahan	Kesimpulan
Saponin	Ditambah air lalu dikocok	Tidak terbentuk buih/busa	-
Tanin	H ₂ O, FeCl ₃	Hijau kehitaman	+
Antosianin	Suasana asam	Merah bata	-
Glikosid:			
- fenol,	FeCl ₃	Hijau	+
- flavonoid,	Mg(s) dan HCl	Tidak ada	-
- antrakuinon,	NaOH 10%	Merah bata	+
- asam lemak	-	Sisa berminyak	+

Keterangan: (+) uji positif; (-) uji negatif

Tabel 2. Hasil skrinning fitokimia partisi ekstrak etanol biji buah merah

Kandungan kimia	Ekstrak etanol	Ekstrak <i>n</i> -heksan
Tanin katekin	+	-
Senyawa fenolik bebas	+	-
Antrakuinon	+	-
Asam lemak	-	+

Pendugaan lain yang menyebabkan tanin muncul pada fraksi tengah adalah tanin yang dielusi berupa monomer bukan polimer seperti yang diduga sebelumnya. Tanin yang terdapat dalam ekstrak etanol ini berupa katekin sederhana yang hanya berupa monomer, akan tetapi monomer katekin ini sulit ditemukan di alam (Robinson 1993). Tanin katekin merupakan *condensed tannin* yang apabila terhidrolisis tidak menghasilkan senyawa dengan bobot molekul rendah, tetapi hanya menghasilkan suatu zat amorf dan tak larut (Manito 1985). Identifikasi yang dilakukan oleh Plazonic et al. 2009 menunjukkan bahwa tanin yang teridentifikasi terikat dengan suatu molekul gula membentuk suatu glikosida. Hasil ini berdasarkan fragmentasi yang diperoleh dari data HPLC-ESI-MS. Sehingga tanin dalam ekstrak etanol biji buah merah diduga kuat bergabung dengan glikosida senyawa fenolik membentuk molekul glikosida dengan berat molekul yang lebih besar.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Metode ini dipilih karena hasil skrinning fitokimia menunjukkan bahwa kandungan senyawa ekstrak etanol biji buah merah sebagian besar merupakan senyawa non volatil. Tanin katekin tidak memiliki titik didih karena biasanya tanin jenis ini berupa suatu polimer dan berbobot molekul yang cukup tinggi. Selain itu, kebanyakan glikosida, baik glikosida antrakuinon maupun glikosida senyawa fenolik memiliki titik didih yang cukup tinggi pula. Aglikon antrakuinon dikenal sebagai suatu golongan senyawa yang bertitik didih tinggi. *SIDS Initial Assessment Report* (1996) melaporkan bahwa 1-Aminoanthraquinone memiliki titik didih di atas 300 °C. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang cakupannya cukup luas, sehingga sulit diprediksi titik didihnya. Oleh karena itu dipilih HPLC sebagai salah satu alternatif metode

pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah.

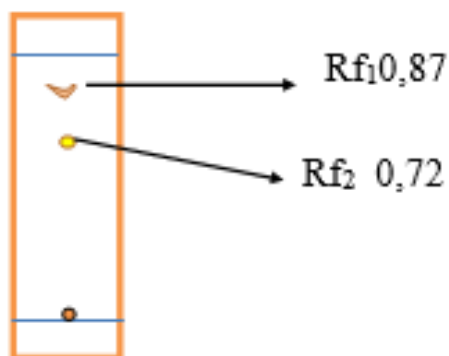
HPLC adalah suatu metode deteksi dan kuantifikasi yang sensitifitasnya sangat tinggi untuk berbagai senyawa kimia dalam suatu sampel partikular menggunakan absorbansi UV-Vis (Hanachi 2009). HPLC dengan fase normal kurang umum dibanding dengan fase terbalik (Rohman 2007). Yang dimaksud Fase terbalik adalah fase diamnya lebih non polar dibanding fase gerak. Li et al. , (2009) berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi Rubiacordone A, suatu jenis glikosida antrakuinon baru dari akar *Rubia cordifolia* menggunakan HPLC fase terbalik dengan sistem elusi isokratik pada panjang gelombang 280 nm. Zhang and Lin (2008) menganalisis *condensed tannin* dari *L. glaber* menggunakan HPLC pada panjang gelombang yang sama.

Sebanyak 25 µL sampel cair ekstrak etanol yang telah bebas asam lemak diinjeksikan ke dalam HPLC untuk dianalisis. Fase diam yang digunakan adalah C18. Fase gerak yang sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan buffer-metanol atau campuran air-asetonitril (Rohman 2007). Dalam penelitian ini digunakan sistem pelarut asetonitril dan 0,4% H₃PO₄ dalam aquabides (10:90) (v/v). Sampel dielusi pada panjang gelombang 280 nm. Tanin dan antrakuinon dapat dideteksi pada panjang gelombang tersebut. Senyawa fenolik dapat dideteksi pada range panjang gelombang 270-290 nm (Tsimogiannis et al. 2007) sehingga senyawa fenolik bebas juga dapat terdeteksi pada panjang gelombang 280 nm. Semua golongan metabolit sekunder kecuali antosianin dapat terdeteksi pada panjang gelombang 280 nm (Harris et al. 2007). Oleh karena itulah, ekstrak etanol dielusi pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang tersebut, senyawa-senyawa yang diduga dalam ekstrak etanol dapat terdeteksi.

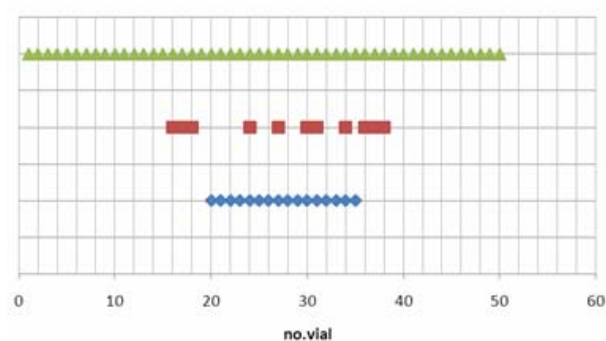
Kromatogram HPLC ekstrak etanol biji buah merah pada Gambar 5, menunjukkan adanya 7 puncak utama yang terpisah dengan baik. Akan tetapi puncak I yang terdeteksi diduga merupakan serapan senyawa dari pelarutnya (etanol 96%) karena waktu retensinya (Tr) sama dengan waktu retensi hasil penginjeksian etanol 96% (waktu retensi puncak mayor 2 dan 3 ekstrak etanol = 3.668 dan 3.838 dan waktu retensi puncak 1 dan 2 etanol 96% = 3.51 dan 3.817). Pelarut etanol dapat memberikan serapan karena pelarut yang digunakan bukan pelarut murni, dalam hal ini etanol 96%. Sehingga, serapan tersebut diduga merupakan serapan dari senyawa pengotor atau komponen senyawa (4%) yang terkandung dalam etanol. Sehingga, setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan tingkat kemurnian 17, 35 % pada puncak 5 yang terdeteksi setelah dilakukan pemisahan komponen polar ekstrak etanol biji buah merah menggunakan HPLC.

Analisis golongan senyawa ekstrak etanol biji buah merah

Profil KLT hanya dapat mendeteksi atau membuktikan bahwa komponen senyawa ekstrak etanol biji buah merah dapat memisah atau tidak. Data ini menjadi acuan untuk metode pemisahan menggunakan kromatografi kolom *flash*.

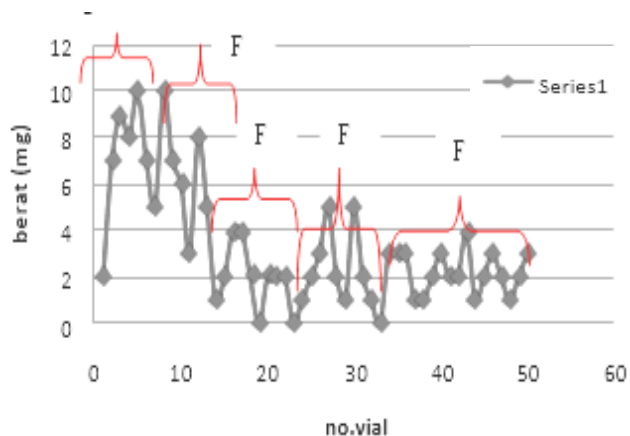


Gambar 1. Profil KLT Ekstrak Etanol Biji Buah Merah dengan Sistem Eluen *n*-heksan : Etil Asetat (1 : 3)

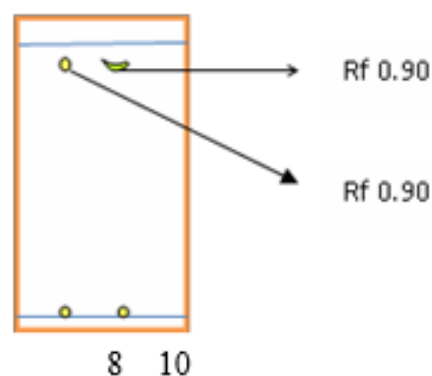


an : ◆ tanin katekin ■ antrakuinon ▲ Senyawa fenolik

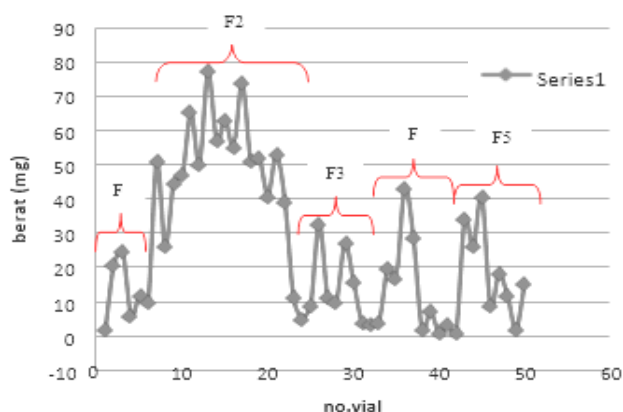
Gambar 4. Diagram hasil skrining fitokimia hasil pemisahan kromatografi kolom Sephadex



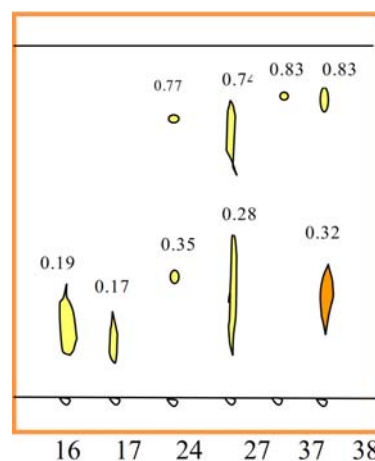
Gambar 2. Diagram no.vial vs berat hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*, menunjukkan setidaknya ada 5 fraksi dalam ekstrak etanol biji buah merah



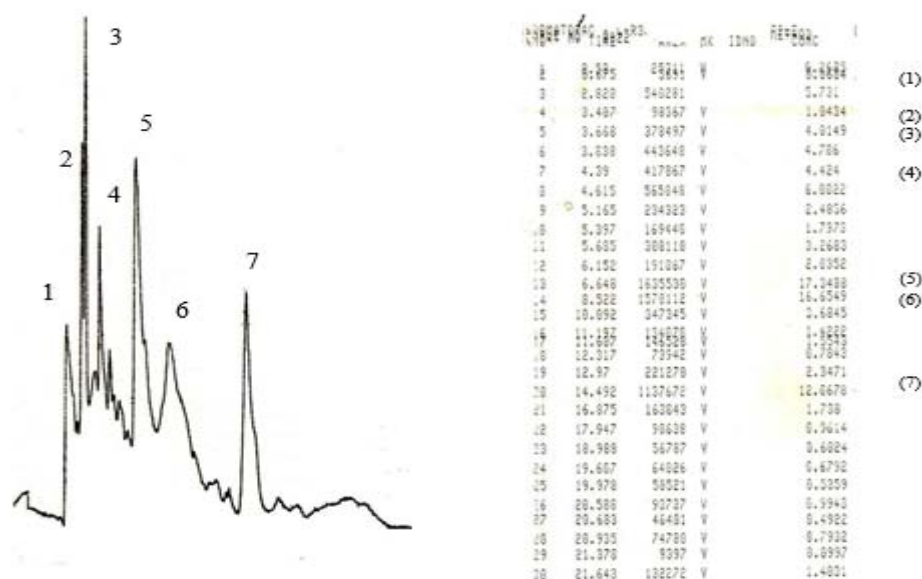
Gambar 6. Profil KLT senyawa pada vial no. 8 dan 10 hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*, R_f spot KLT yang dihasilkan serupa dengan spot 1 KLT pra kolom



Gambar 3. Diagram no.vial vs berat hasil pemisahan kromatografi kolom Sephadex, menunjukkan setidaknya terdapat 5 fraksi dalam ekstrak etanol biji buah merah



Gambar 7. Uji Antrakuinon vial 16, 17, 24, 27, 37, 38 Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom Sephadex (gambar asli pada Lampiran 3), memiliki spot-spot dengan R_f yang berbeda. R_f yang berbeda mengindikasikan jenis antrakuinon yang berbeda-beda pula.



Gambar 5. Kromatogram HPLC ekstrak etanol biji buah merah, menunjukkan adanya 7 puncak utama yang terdiri dari 2 puncak serapan dari pelarut dan 5 puncak serapan dari senyawa dalam ekstrak etanol

Pola pemisahan dengan eluen *n*-heksana-etil asetat 1:3 (Gambar 1) menunjukkan bahwa setidaknya terdapat 3 senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan KLT sistem eluen ini. Jumlah senyawa yang terdeteksi dengan KLT berbeda dan jauh lebih sedikit dengan jumlah senyawa yang teridentifikasi dengan skrining fitokimia. Apabila mengacu dengan skrining fitokimia, jumlah minimal spot yang ada saat dilakukan KLT adalah 4 spot. 3 Spot yang dihasilkan dalam Gambar 1 (terdiri dari 2 spot yang dapat naik atau terelusi oleh sistem eluen dan 1 spot yang tidak dapat naik) diduga disebabkan karena sebagian besar senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol biji buah merah merupakan senyawa yang sangat polar yang dapat saling melakukan interaksi (ikatan hidrogen misalnya, karena kebanyakan senyawa polar memiliki gugus hidroksil) dan atau terikat dengan fase diamnya (silika gel) sehingga pemisahan sulit terjadi. Hal ini ditunjukkan oleh masih adanya 1 spot tebal pada titik awal penotolan (tidak dapat naik/tidak terelusi) yang mengindikasikan masih adanya senyawa yang belum terpisah pada titik tersebut dengan pelarut etil asetat: *n*-heksan (3:1). Oleh karena itu senyawa yang berhasil dipisahkan dengan KLT jauh lebih sedikit dibandingkan saat dilakukan skrining fitokimia awal.

Analisis hasil pemisahan kromatografi kolom *flash* dilakukan dengan uji KLT setelah kolom yang diperoleh dan datanya diperkuat dengan skrining fitokimia, baik dengan uji tabung maupun uji penegasan KLT. Hasil pemisahan pada 8 dan 10 memiliki *Rf* 0,90 berwarna orange pada sinar biasa dan kuning kehijauan di bawah lampu UV 365 nm (Gambar 6). Setelah dicocokkan dengan profil KLT ekstrak etanol pra kolom (Gambar 1), warna spotnya sama sedangkan harga *Rf* yang dihasilkan hampir sama dengan spot 1 pada profil KLT pra kolom. Harga *Rf*

pada spot 1 pra kolom adalah 0,87 dan warna spotnya adalah orange. Sehingga senyawa pada vial 8 dan 10 dapat terjadi pemisahan karena spot 1 KLT pra kolom dapat muncul pada profil KLT vial 8 dan 10 dengan sistem eluen yang sama.

Sedangkan, hasil pemisahan pada vial diluar no 8 dan 10 menghasilkan *Rf* yang mendekati 1. Hal ini diduga dapat terjadi karena senyawa satu dan senyawa lain saling berinteraksi di dalam kolom, sehingga memperlambat proses elusi. Hasil ini menunjukkan bahwa kromatografi kolom *flash* belum mampu memisahkan komponen senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol dengan baik meskipun ada sebagian senyawa yang terpisah pada vial 8 dan 10.

Hasil pemisahan pada vial 8 dan 10 dilakukan skrining fitokimia menggunakan uji penegasan KLT menggunakan sistem pelarut etil asetat:metanol:air (100:13,5:10). Sistem eluen ini spesifik untuk golongan senyawa fenolik, antrakuinon, dan tanin. Spot yang dihasilkan berwarna kuning kehijauan di bawah sinar lampu UV 365 nm. Warna spot kuning kehijauan menunjukkan bahwa senyawa pada vial 8 dan 10 ekstrak etanol biji buah merah mengandung aglikon antrakuinon yang telah tereduksi menjadi antron. Antron merupakan bentuk antrakuinon tereduksi. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa senyawa yang dapat terelusi dan terdeteksi pada spot 1 KLT pra kolom adalah glikosida dengan aglikon antron sedangkan spot 2 KLT pra kolom adalah senyawa yang lebih polar, dalam hal ini adalah glikosida dengan aglikon senyawa fenolik atau tanin.

Analisis hasil kromatografi kolom Sephadex menunjukkan bahwa semua golongan yang terdeteksi dalam skrining fitokimia dapat dipisahkan dengan metode ini dan setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah. Senyawa fenolik mendominasi ekstrak etanol

biji buah merah. Senyawa pada vial 1 sampai 50 positif mengandung senyawa fenolik. Tanin berada di fraksi tengah sedangkan antrakuinon berada disekitar dan atau pada daerah tanin. Robinson (1993) menyatakan bahwa kebanyakan antrakuinon terdapat pada ekstrak tanin tumbuhan telah terbukti pada ekstrak etanol biji buah merah. Glikosida antrakuinon yang terkandung dalam ekstrak etanol digolongkan pada 3 fraksi yang berbeda. Ini menunjukkan bahwa glikosida antrakuinon ini memiliki jenis yang berbeda-beda. Meskipun demikian ketiga fraksi glikosida antrakuinon ini sama-sama mengikat gugus fenolik.

Untuk menunjukkan bahwa aglikon antrakuinon dalam ekstrak etanol berjenis sama atau tidak, fraksi yang mengandung glikosida antrakuinon dilakukan skrining lagi dengan uji penegasan KLT menggunakan sistem eluen etil asetat : metanol : air (100:13,5:10) menggunakan pereaksi tampak KOH 10% pada fraksi no 16, 17, 24, 27, 37, 38. Fraksi-fraksi ini dipilih secara acak untuk membuktikan apakah antrakuinon yang keluar di awal, tengah, maupun di paling akhir keluarnya merupakan jenis antrakuinon yang sama atau tidak seperti yang diduga sebelumnya. Hasil uji penegasan KLT golongan antrakuinon dapat dilihat pada Gambar 7.

Gambar 7 menunjukkan bahwa vial 16 dan 17 memiliki antrakuinon identik karena nilai Rfnya hampir sama (masing-masing 0.19 dan 0.17). Vial 24 dan 27 memiliki 1 jenis antrakuinon yang berbeda karena nilai Rfnya 0.74-0.77 meskipun nilai Rf2nya relatif sama dengan spot 16 dan 17. Vial 38 memiliki 2 spot sehingga diduga pada vial 38 mengandung 2 jenis antrakuinon. Spot 2 vial 38 memiliki Rf yang berbeda dengan yang lain sedangkan spot 2 identik dengan dengan spot yang dimiliki oleh vial 37 karena memiliki Rf yang sama. Antrakuinon pada vial 37 dan 38 ini juga berbeda dengan jenis antrakuinon sebelumnya karena Rf yang dihasilkan berbeda sehingga ekstrak etanol biji buah merah setidaknya memiliki 3 jenis antrakuinon yang berbeda. Meskipun demikian, warna spot uji penegasan KLT untuk antrakuinon ini adalah relatif sama, yaitu kuning kehijauan. Warna ini adalah menunjukkan bahwa aglikon antrakuinon dalam ekstrak etanol biji buah merah adalah jenis antron. Apabila hasil ini dibandingkan dengan hasil identifikasi senyawa hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*, hasil identifikasinya adalah sama karena senyawa yang teridentifikasi adalah antron. Apabila hasil uji penegasan KLT dan uji tabung skrining fitokimia digabung, antron dalam ekstrak etanol biji buah merah ini mempunyai gugus hidroksil fenolik, itu artinya antron mengikat gugus hidroksil fenolik.

HPLC adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis senyawa dengan cara membandingkan dengan data standar golongan senyawa yang diduga terkandung di dalam sampel dengan syarat kondisi pemisahan yang dilakukan sama dengan kondisi pemisahan data standar. HPLC yang dilakukan untuk ekstrak etanol biji buah merah menggunakan sistem elusi isokratik. Sedangkan, data standar menggunakan sistem elusi gradien. Selain itu waktu analisis yang dilakukan untuk data standar minimal 1 jam sedangkan waktu analisis yang dilakukan untuk ekstrak etanol biji buah merah ini hanya 25 menit. Karena syarat yang harus dipenuhi untuk analisis

senyawa dengan membandingkan data standar tidak terpenuhi sehingga senyawa apa saja yang terdeteksi dalam HPLC tidak dapat dilakukan.

Kromatogram HPLC menunjukkan setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah. Hasil analisis senyawa yang terdeteksi setelah dilakukan pemisahan HPLC sama dengan analisis data pemisahan kromatografi sephadex, yaitu setidaknya ada 5 senyawa yang berhasil dipisahkan dengan kedua metode tersebut. Prinsip HPLC bertolak belakang dengan kromatografi kolom *flash* (Kromatografi kolom *flash* menggunakan fase normal sedangkan HPLC menggunakan fase terbalik) sehingga senyawa keluar terakhir kali saat *flash* akan menjadi senyawa yang keluar pertama kali saat HPLC. Panjang gelombang 280 nm merupakan panjang gelombang untuk tanin, antrakuinon, dan senyawa fenolik sehingga ketiga senyawa ini dapat dipisahkan dengan HPLC. Tanin merupakan senyawa yang tidak dapat terelusi keluar dari kolom *flash* sehingga diduga senyawa ini keluar terlebih dahulu dibandingkan glikosida antrakuinon, karena glikosida antrakuinon dapat terdeteksi lagi setelah dilakukan pemisahan kromatografi kolom *flash*. Apabila profil kromatogram HPLC (Gambar 5) dan diagram no. vial vs berat hasil pemisahan sephadex (Gambar 3) dibandingkan, profil/kurva keduanya memiliki pola yang hampir sama. Oleh karena itu, senyawa yang teridentifikasi setelah dilakukan kromatografi kolom sephadex dapat dianalogikan dengan senyawa yang dapat dipisahkan dengan HPLC. Puncak 1 merupakan puncak dari glikosida senyawa fenolik, puncak 4 merupakan puncak glikosida antrakuinon fenolik, puncak 5 merupakan puncak dari tanin, puncak 6 merupakan puncak dari glikosida antrakuinon fenolik yang lebih non polar, dan puncak 7 adalah puncak glikosida senyawa fenolik yang lebih non polar (puncak 2 dan 3 adalah terdeteksi puncak dari senyawa yang terkandung dalam etanol 96%).

Bila hasil pemisahan dari metode pemisahan yang dilakukan (Kromatografi kolom *flash*, kromatografi kolom Sephadex, dan HPLC) saling dihubungkan diperoleh kesimpulan yang sama, yaitu setidaknya ada 5 senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol biji buah merah. Selain itu, antrakuinon dalam ekstrak etanol tersebut dapat dipisahkan dengan ketiga metode tersebut dan jenis antrakuinon dalam ekstrak etanol tersebut beraneka macam. Kesimpulan ini diperkuat dengan hasil uji penegasan KLT golongan antrakuinon fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom *flash* dan Sephadex. Data HPLC juga dapat digunakan sebagai data pendukung keanekaragaman antrakuinon dalam ekstrak etanol biji buah merah.

Kebanyakan antrakuinon dari tumbuhan tinggi dihidroksilasi pada C-1, meskipun antrakuinon sendiri dilaporkan terdapat dalam berbagai ekstrak tanin tumbuhan. Hasil pemisahan Sephadex ekstrak etanol biji buah merah juga menunjukkan bahwa antrakuinon kebanyakan ditemukan bergabung dengan golongan tanin. Antrakuinon terhidroksilasi jarang terdapat dalam tumbuhan secara bebas, tetapi sebagai glikosida. Semua antrakuinon berupa senyawa kristal bertitik leleh tinggi,

larut dalam pelarut organik biasa, senyawa ini biasanya berwarna merah, sisanya berwarna kuning sampai coklat.

Banyak antrakuinon yang terdapat sebagai glikosida dengan bagian gula terikat dengan salah satu gugus hidroksil fenolik, contohnya alizarin dari *Rubia tinctorium* (Robinson 1993). Alizarin mempunyai kerangka dasar antrakuinon yang mengikat 2 gugus hidroksil. Data ini sesuai dengan hasil skrinning fitokimia pada ekstrak etanol biji buah merah dimana antrakuinon yang terdapat dalam biji buah merah berupa glikosida, kebanyakan berada pada daerah/fraksi yang positif mengandung tanin, dan semua mengandung gugus fenol bebas (hidroksil fenol). Fakta lain adalah dalam banyak kasus, tampaknya aglikon glikosida asli berbentuk antrakuinon tereduksi yang dikenal sebagai antron (Robinson 1993). Hal ini juga sesuai dengan skrinning fitokimia terhadap antrakuinon dengan uji penegasan KLT (Gambar 7), spotnya berwarna kuning kehijauan yang menunjukkan bahwa antrakuinon yang terdeteksi telah tereduksi menjadi antron. Apabila proses reduksi ini berlanjut antron tereduksi menjadi antranol.

Berdasarkan uji skrinning fitokimia fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom Sephadex, dilakukan analisis kuantitatif senyawa yang berhasil dipisahkan. Jumlah tanin dalam 1,356 g ekstrak etanol biji buah merah adalah $\pm 303\text{mg}$ (22,345%), antrakuinon adalah $\pm 254\text{mg}$ (18,732%), sedangkan jumlah glikosida fenol bebas adalah $\pm 778\text{mg}$ (57,375%) (perhitungan kadar masing-masing senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah tidak ditunjukkan). Apabila dalam satu vial terdiri dari 2 senyawa atau lebih, fraksi tersebut dihitung sebagai satu senyawa saja yang memiliki berat/ukuran molekul yang lebih besar. Ukuran molekul tanin lebih besar dibanding glikosida antrakuinon, namun ukuran molekul glikosida antrakuinon lebih besar dibanding glikosida senyawa fenolik. Sebagai contoh, satu vial mengandung tanin, glikosida antrakuinon, dan glikosida senyawa fenolik sehingga dalam perhitungannya hanya dihitung sebagai tanin karena ukuran molekulnya lebih besar dibandingkan senyawa yang lain. Perhitungan ini tidak bersifat spesifik karena dalam satu fraksi ada yang mengandung lebih dari 1 senyawa sehingga perhitungan secara pasti sulit dilakukan dan hanya berupa nilai pendekatan saja.

Ekstrak etanol biji buah merah mengandung tanin, glikosida antrakuinon, dan glikosida senyawa fenolik bebas. Antrakuinon, tanin, dan senyawa fenolik bebas baik yang berupa glikosida maupun sebagai senyawa bebas sudah banyak digunakan dalam ilmu kesehatan. Antrakuinon dikenal sebagai senyawa aktif dalam obat pencahar. Beberapa jenis tanin terbukti mempunyai aktivitas antioksidan dan menghambat pertumbuhan tumor, (Robinson 1993). Bahkan, uji aktivitas antioksidan tanin lebih besar dari antioksidan standar, BHT (Thitilertdech et al. 2010). Senyawa fenolik bebas kebanyakan bergabung dalam antrakuinon dan tanin, sehingga diduga bahwa senyawa fenolik bebas juga memiliki aktivitas antioksidan. Menurut Mitic et al. (2010), semua jenis senyawa fenolik memiliki aktivitas antioksidan namun dengan tingkatan yang berbeda-beda. Oleh karena itu, biji buah merah juga memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai obat.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dengan pembahasan sebelumnya dapat diambil kesimpulan bahwa: Hasil skrinning fitokimia ekstrak etanol menunjukkan bahwa biji buah merah mengandung glikosida senyawa fenolik ($\pm 57,375\%$), tanin katekin ($\pm 22,345\%$), glikosida antrakuinon ($\pm 18,732\%$) dan glikosida asam lemak. Kromatografi kolom Sephadex merupakan metode pemisahan yang tepat untuk memisahkan komponen polar ekstrak etanol biji buah merah. Setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah yang berhasil dipisahkan dengan metode pemisahan yang digunakan (kromatografi kolom *flash*, kromatografi kolom sephadex, dan HPLC). Aglikon antrakuinon yang teridentifikasi dalam bentuk antron (bentuk antrakuinon tereduksi) yang mengikat gugus hidroksil fenolik.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz R, Estella I, Hernandez T, Duenas M, Troszynska A, Kosinska A, Pegg RB. 2009. Antioxidant activity of a red lentil extract and its fractions. *Intl J Mol Sci* 10: 5513- 5527
- Budi IM. 2001. Kajian Kandungan Zat Gizi dan Sifat Fisiko Kimia Berbagai Jenis Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk) Hasil Ekstraksi secara Tradisional di Kab. Jayawijaya Irian Jaya. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Budi IM, Paimin FR. 2005. Buah Merah. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hanachi P. 2009. Using HPLC to determination the composition and antioxidant activity of *Berberis vulgaris*. *Eur J Sci Res* 29: 47-54.
- Harris CS, Burt AJ, Saleem A, Lee PM, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SAL, Arnason JT. 2007. A Single HPLC-PAD-APCI/MS Method for the Quantitative Comparison of Phenolic Compounds Found in Leaf, Stem, Root, and Fruit Extract of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis Journal* Vol. 18. Hal. 161-169.
- Manito P. 1985. Biosynthesis of Natural Products. John Wiley and Sons, London.
- Kristanti AN, Aminah NS, Tanjung M, Kurniadi B. 2008. Fitokimia. Airlangga University Press. Surabaya.
- Li X, Liu Z, Chen Y, Wang LJ, Zheng ZN, Sun GZ, Ruan CC. 2009. Rubiacordone A : A New Anthraquinone Glycoside from The *Rubia cordifolia*. *Molecules* 14: 2986-2997.
- Marliyana SD, Wibowo FR, Handayani N, Rahmawati R. 2010. Penentuan Kandungan Kimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). Penelitian DP2M Hibah bersaing 2009 LPPM UNS.
- Moeljopawiro S, Anggelia MR, Ayuningtyas D, Widaryanti B, Sari Y, Budi IM. 2007. Pengaruh sari buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) terhadap pertumbuhan sel kanker payudara dan sel kanker usus besar. *Jurnal Berkala Ilmiah Biologi* 2: 121-130.
- Mitic MN, Obradović MV, Grahovac ZB, Pavlović AN. 2010. Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of serbian white wines. *Molecules* 15: 2016-2027.
- Mu'nim A, Andrajati R, Susilowati H. 2006. Uji hambatan tumorigenesis sari buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) terhadap tikus putih betina yang diinduksi 7, 12 dimetilbenz (a) dan antrasen (DMBA). *Majalah Ilmu Kefarmasian* 3: 153-161.
- Murhadi, Soewarno TS, Jennie BSL, Apriyantono A, Yasni S. 2004. Karakteristik Spektroskopi Isolat Antibakteri Biji Atung (*Parinari glaberrimum* Hassk). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 15: 1-10.
- Harborne JB. 1984. Phytochemical Methods. Chapman and Hall Ltd, London.
- Pegg RB, Rybarczyk A, Amarowicz R. 2008. Chromatographic Separation of Tannin Fraction from A. Bearberry Leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) Extract by SE-HPLC. A short Report. *Polish J Food Nutr Sci* 58: 485-490.
- Plazonic A, Bucar F, Males Ž, Mornar A, Nigović B, Kujundžić N. 2009. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance

- Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* 14: 2466-2490.
- Robinson T. 1993. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB Press. Bandung.
- Rohman A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. PustakaPelajar. Yogyakarta
- Santana CM, Ferrera ZS, Padron MET, Rodriquez JJS. 2009. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from enviromental samples : new approaches. *Molecules* 14: 298- 320.
- Santi SR. 2009. Penelusuran senyawa sitotoksik pada kulit biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) dan kemungkinan korelasinya sebagai anti kanker. *Jurnal Kimia* 2: 101-108.
- Sari EK. 2008. Mempelajari Khasiat Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) Terhadap Kualitas Pertumbuhan dan Fungsi Hati Secara in Vivo. [Skripsi]. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Septiyaningsih D. 2010. Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). [Skripsi]. Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.
- Still C, Kahn M, Mitra A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparatives separations with moderate resolution. *J Org Chem* 43 (14):-.
- Suharto E. 2004. Struktur biji, sifat fisik biji, dan karakteristik benih kayu afrika (*Maesopris eminii* Engl) Provenan Padang Jaya. *Jurnal Akta Agrosia* 7 (1): 24-32.
- Thitilertdecha N, Teerawutgulrag A, Killburn JD, Rekariyatham N. 2010. Identification of major phenolic compounds from *Nephetium lappaceum* L. and their antioxidant activities. *Molecules* 15: 1453-1465.
- Tjitrosoepomo G. 2005. *Morfologi Tumbuhan*. Edisi ke-15. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. 2007. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12: 593-606.
- Wahyuniari I, Soesatyo MHNE, Ghufro M, Yustina, Sumiwi AA, Wiryawan S. 2009. Minyak buah merah meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit limpa mencit setelah infeksi listeria monocytogenes. *Jurnal Veteriner* 10: 143-149.
- Zhang LL, Lin YM. 2008. HPLC, NMR, and MALDI-TOF MS analysis of condensed tannins from *Lithocarpus glaber* leaves with potent free radical scavenging activity. *Molecules* 13: 2986-2997.

PEDOMAN UNTUK PENULIS

Format penulisan pada nomor ini merupakan acuan utama bagi para penulis, adapun pedoman ini hanya merupakan ringkasannya. Setiap naskah harus disertai surat pengantar yang menyatakan bahwa tulisan merupakan hasil karya penulis atau para penulis dan belum pernah dipublikasikan. Penulis diminta mengirimkan dua kopi naskah dan satu disket ukuran 3½", kecuali naskah yang dikirim melalui e-mail. Pada koreksi terakhir kembali diminta satu disket untuk pencetakan.

Tulisan diketik pada satu sisi kertas putih, ukuran A4 (210x297 mm²), dalam satu kolom, menggunakan spasi ganda, jenis huruf *Times New Roman*, ukuran 12 point, dengan jarak tepi 2 cm di semua sisi. Program pengolah kata atau jenis huruf tambahan dapat digunakan, namun harus *PC compatible* dan berbasis *Microsoft Word*. **Nama ilmiah** (genus, spesies, author), dan kultivar atau strain disebutkan secara lengkap pada penyebutan pertama kali. Nama genus dapat disingkat setelahnya penyebutan yang pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tata nama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butirat hidrositoluen (BHT) selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya tidak diikuti titik. Indeks minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telaah pustaka menyesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

Judul ditulis secara padat, jelas, dan informatif, maksimum 20 kata. Judul ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. Naskah yang terlalu panjang dapat dibuat berseri, tetapi naskah demikian jarang diterbitkan jurnal ini. **Judul pelari** (*running title*) sekitar 5 kata. **Nama penulis** atau para penulis pada naskah kelompok ditulis secara lengkap dan tidak disingkat. **Nama dan alamat institusi** ditulis lengkap dengan nama dan nomor jalan (lokasi), kode pos, nomor telepon, nomor faksimili, alamat e-mail dan website. Pada naskah kelompok perlu ditunjukkan penulis untuk korespondensi beserta alamat dengan urutan seperti di atas. **Abstract** sebaiknya tidak lebih dari 200 kata, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. **Kata kunci** (*Keywords*) sekitar 5 kata, meliputi nama ilmiah dan daerah (apabila ada), topik penelitian, dan metode-metode khusus yang digunakan.

Pendahuluan (*Introduction*) sekitar 400-600 kata, meliputi latar belakang, tinjauan pustaka, dan tujuan penelitian. **Bahan dan Metode** (*Materials and Methods*) sebaiknya ditekankan pada cara kerja dan cara analisis data. **Hasil dan Pembahasan** (*Results and Discussion*) ditulis sebagai satu rangkaian, pada tulisan yang cukup panjang sebaiknya dibuat beberapa sub judul. Pembahasan merupakan jawaban pertanyaan *mengapa* dan *bagaimana* hasil penelitian dapat terjadi, bukan sekedar mengungkapkan kembali hasil penelitian dalam bentuk kalimat. Pembahasan yang lengkap dan menyeluruh lebih disukai dari pada pembahasan yang tidak tuntas. Naskah telaah pustaka tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan, meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan terima kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul tabel ditulis di atas tabel. Foto dicetak pada kertas glossy dan diberi keterangan. Gambar berwarna dapat diterima apabila informasi ilmiah dalam naskah dapat hilang tanpa gambar tersebut. Setiap gambar dan foto

sebaiknya menyertakan file digital. Penulis dianjurkan menyertakan foto atau gambar untuk sampel depan meskipun tidak dimuat dalam naskah sendiri. **Tidak ada lampiran**, semua data atau analisis data dimasukkan dalam Hasil dan Pembahasan.

Pustaka dalam naskah ditulis dalam bentuk nama belakang penulis dan tahun. Pada kalimat yang diacu dari beberapa penulis, nama penulis diurutkan berdasarkan kebaruan pustaka. Pada naskah yang ditulis oleh dua penulis, nama keduanya disebutkan, sedangkan pada naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, hanya nama penulis pertama yang ditulis diikuti et al. atau dkk., misalnya: Sprent dan Sprent (1990) atau (Suranto et al. 1998; Baker and Manwell 1991; Smith 1982a, b). Pada sitasi bertingkat digunakan kata *cit* atau dalam, misalnya (Gyorgy 1991 *cit* Coward 1999) atau Gyorgy (1991, dalam Coward 1999).

Daftar Pustaka diketik dengan spasi ganda. Sitasi mengikuti CBE-ELSE-Vancouver style dengan modifikasi sebagai berikut:

Jurnal:

Suranto S, Gough KH, Shukla DD et al. 1998. Coat protein sequence of Krish-infecting strain of Johnson-grass mosaic potyvirus. Arch Virol 143: 1015-1020.

Buku:

Sprent JI, Sprent P. 1990. Nitrogen fixing organisms: Pure and applied aspects. Chapman and Hall, London.

Bab dalam buku:

Baker CMA, Manwell C. 1991. Population genetics, molecular markers and gene conservation of bovine breeds. In: Hickman CG (ed). Cattle Genetic Resources. Elsevier, Amsterdam.

Abstrak:

Liu Q, Salih S, Ingersoll J et al. 2000. Response of transgenic 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots, containing the modified cecropin MB39 gene to *Erwinia amylovora* [084]. Abstracts of 97th Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. Lake Buena Vista, FL, 23-26 July 2000.

Prosiding:

Alikodra HS. 2000. Keanekaragaman hayati bagi pembangunan daerah otonom. In: Setyawan AD, Sutarno (eds). Menuju Taman Nasional Gunung Lawu, Prosiding Semiloka Nasional Konservasi Biodiversitas untuk Perlindungan dan Penyelamatan Plasma Nutfah di Pulau Jawa. Surakarta, 17-20 Juli 2000.

Skripsi, Tesis, Disertasi:

Purwoko T. 2001. Biotransformasi Isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524 dan Aktivitas Antioksidan Isoflavon Aglikon dari Tempe terhadap Oksidasi Minyak Kedelai. [Tesis]. Universitas Indonesia, Jakarta.

Informasi dari Internet:

Rosauer D. 1998. Forest disturbance and succession. <http://www.anu.edu.au/Forestry/silviculture/daniel/chapter1/1.1.html>

Naskah publikasi "*in press*" dapat disitasi dan dicantumkan dalam daftar pustaka. "Komunikasi pribadi" dapat disitasi, tetapi tidak dapat dicantumkan dalam daftar pustaka. Penelitian yang tidak dipublikasikan atau sedang dalam tahap pengajuan publikasi tidak dapat disitasi.

Beberapa catatan tambahan. Naskah diketik tanpa tanda hubung (-), kecuali kata ulang. Penggunaan huruf "l" (el) untuk "1" (satu) atau "O" (oh) untuk "0" (nol) perlu dihindari. Simbol α , β , χ , dan lain-lain dimasukkan melalui fasilitas insert, bukan mengubah jenis huruf. Kata-kata dan tanda baca sesudahnya tidak diberi spasi.

Kemajuan Naskah. Pemberitahuan naskah dapat diterima atau ditolak akan diberitahukan sekitar satu bulan setelah pengiriman. Naskah dapat ditolak apabila materi yang dikemukakan tidak sesuai dengan misi jurnal, kualitas materi rendah, format tidak sesuai, gaya bahasa terlalu rumit, terjadi ketidakjujuran keaslian penelitian, dan korespondensi tidak ditanggapi. Penulis atau penulis pertama pada naskah kelompok akan mendapatkan satu eksemplar jurnal yang memuat tulisannya selambat-lambatnya sebulan setelah naskah diterbitkan. Penulis akan kembali mendapatkan satu eksemplar jurnal nomor penerbitan berikutnya.

PENTING: Penulis atau para penulis dalam naskah kelompok masih memegang hak cipta (*copyright*) dan mempertahankan hak penerbitan tanpa pembatasan atas naskah yang diterbitkan **Biofarmasi**. Penulis atau pihak lain diperkenankan memperbanyak naskah dalam jurnal ini selama tidak untuk tujuan komersial. Untuk penemuan baru, penulis disarankan mengurus hak patennya sebelum mempublikasikan dalam jurnal ini.

Kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i>) pada berbagai teknik pengeringan dan proporsi pelarutan	41-49
• PRIMA RISKA OKTAVIANA, KAWIJI, WINDI ATMAKA	
Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku koro pedang (<i>Canavalia ensiformis</i>)	50-58
• YURINA ISTIANI, SRI HANDAJANI, ARTINI PANGASTUTI	
Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar serat kasar dan aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai	59-65
• SYLVITRIA WIDOYO, SRI HANDAJANI, NANDARIYAH	
Aktivitas antimikroba fraksi dari ekstrak metanol daun senggani (<i>Melastoma candidum</i>) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Sa. typhimurium</i> serta profil kromatografi lapis tipis fraksi teraktif	66-77
• IDA LIANA, OKID PARAMA ASTIRIN, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI	
Identifikasi senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah (<i>Pandanus conoideus</i>)	78-89
• IDA SUNDARI, FAJAR RAKHMAN WIBOWO	

