

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Isoflavon dalam Kedelai dan Tempe serta Prospeknya untuk Obat

Isoflavon merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan khususnya dari golongan kacang-kacangan (Leguminoceae). Kandungan senyawa isoflavon dalam tanaman sangat rendah yaitu sekitar 0,25 % dan senyawa tersebut pada umumnya dalam keadaan terikat dengan senyawa gula^[5].

Di antara jenis kacang-kacangan, kacang kedelai (*Glicine max* Merril) merupakan sumber protein yang paling baik. Kacang kedelai juga mengandung lemak, karbohidrat, vitamin, mineral dan serat^[6]. Disamping itu kacang kedelai mengandung banyak senyawa bioaktif yang disebut isoflavon. Tempe adalah produk fermentasi kedelai yang telah diketahui mengandung senyawa aktif isoflavon yang berpotensi sebagai antioksidan^[1,2,5], antihaemolitik^[2,5], antijamur^[3], antibakteri^[4] dan antikanker^[2,5].

Salah satu sifat bioaktivitas yang dimiliki oleh senyawa isoflavon adalah antioksidan. Senyawa isoflavon yang telah diketahui memiliki bioaktivitas antioksidan adalah daidzein^[1,2,5], genestein^[1,2,5], glisitein^[5], faktor-2^[5] dan isoflavan^[5]. Faktor-2 dan isoflavan terbentuk dari transformasi lebih lanjut dari isoflavon aglikon pada tempe^[5]. Hasil transformasi lebih lanjut dari senyawa aglikon ini justru menghasilkan senyawa yang mempunyai bioaktivitas lebih

tinggi. Faktor-2 mempunyai bioaktivitas antioksidan lebih baik daripada daidzein dan genestein^[5].

Potensi senyawa isoflavon yang lain adalah menurunkan kandungan kolesterol dalam darah, terutama senyawa faktor-2^[5]. Isoflavon berperan terhadap penurunan tekanan darah dan antikonstriksi pembuluh darah^[5]. Senyawa faktor-2 juga berfungsi sebagai antihemolitik (pecahnya sel-sel darah merah)^[5,7]. Aktivitas antihemolitik dari faktor-2 lebih baik daripada daidzein dan genestein^[7]. Dari sejumlah senyawa isoflavon yang paling berpotensi sebagai antikanker adalah genestein^[5], potensi tersebut antara lain menghambat perkembangan sel kanker payudara, sel kanker hati, dan sel kanker prostat^[5].

Senyawa isoflavon juga dikenal sebagai zat adaptogenik bagi tubuh, yang membantu menjaga kondisi fisiologis tubuh agar tetap normal^[8]. Genestein dan daidzein mempunyai aktivitas estrogenik yang menjaga stabilitas kadar hormon estrogen pada wanita^[5].

Isoflavon terdapat dalam makanan kedelai dalam keadaan terikat (glikosida) dan tidak terikat (aglikon) dengan senyawa gula. Kacang kedelai telah diketahui mengandung sembilan isoflavon glikosida dan tiga isoflavon aglikon^[9], struktur dan nama senyawa isoflavon tersebut disajikan pada Lampiran 3. Pada umumnya, hasil transformasi isoflavon baik dalam biakan kultur murni jamur maupun biakan campuran, jamur dan bakteri pada tempe menunjukkan bahwa konstituen terbesar adalah daidzein diikuti genestein, glisitein dan kandungan terendah adalah faktor-2^[5]. Umumnya, penambahan bakteri ke dalam formula inokulum jamur dapat meningkatkan jumlah total senyawa isoflavon faktor-2, daidzein, dan

glisitein pada tempe. Kandungan genestein dalam tempe dipengaruhi oleh spesies jamur yang digunakan dalam fermentasi serta kondisi kebersihan lingkungan proses itu sendiri^[8]. Tempe yang dibuat dengan inokulum *Rizhopus oligosporus* di laboratorium dengan kondisi proses dikontrol ketat mengandung genestein hampir 14 mg/100 g tempe^[8].

2.2 Mikrobiologi pada Fermentasi Tempe

2.2.1 Perlakuan Pendahuluan terhadap Kedelai sebelum Fermentasi^[10]

Tempe merupakan produk fermentasi kedelai oleh jamur. Pembuatan tempe ini didahului dengan perlakuan pendahuluan dengan maksud mempersiapkan bahan sehingga siap difermentasi. Perlakuan pendahuluan ini meliputi pencucian, perendaman, perebusan, penghilangan kulit, penirisan dan pendinginan.

Perendaman kedelai dimaksudkan untuk mempermudah penghilangan kulit biji kedelai, menghilangkan zat anti jamur, dan memperlunak biji kedelai. Pelunakan biji kedelai dalam proses pembuatan tempe sangat penting agar miselia jamur dapat menembus jauh ke dalam biji kedelai. Perendaman dimaksudkan untuk mengaktifkan enzim-enzim yang ada dalam biji dan bakteri yang mampu bertahan dalam lingkungan berkadar oksigen rendah. Selama perendaman akan terjadi fermentasi asam laktat yang mengakibatkan penurunan pH air perendaman hingga 5,0. Tingkat keasaman ini mampu membatasi macam dan jumlah mikroba yang aktif selama perendaman. *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium*, dan *Staphylococcus epidermidis* berperan dalam penurunan pH selama perendaman kedelai^[11]. *Streptococcus dysgalactiae*, *K. Pneumoniae*, *Klebsiella ozonena*,

Enterobacter agglomerans, *Citrobacter diversus*, dan *Bacillus brevis* terdapat bersama-sama dengan beberapa jenis ragi, yaitu *Pichia burtonii*, *Candida diddensiae*, dan *Rhodotorula rubra*^[11] Perebusan kedelai dimaksudkan untuk melunakkan biji dan menghilangkan rasa mentah kedelai sehingga diperoleh rasa yang lebih enak. Perlakuan ini juga membebaskan beberapa nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan jamur dan membunuh bakteri kontaminan. Perebusan biji kedelai dilakukan untuk mempermudah hidrolisis oleh enzim-enzim jamur, karena protein dan karbohidrat dalam keadaan alami sulit dihidrolisis oleh enzim-enzim jamur.

Penghilangan kulit perlu dilakukan karena kulit biji kedelai mengandung senyawa anti jamur, selain itu jamur tidak mempunyai enzim selulase sehingga tidak dapat tumbuh pada kulit. Penirisan dan pendinginan pada suhu kamar diperlukan untuk mendapatkan kondisi yang sesuai bagi pertumbuhan jamur.

2.2.2 Fermentasi Tempe^[10]

Fermentasi kedelai oleh jamur berlangsung dalam kondisi aerob, sebab jamur merupakan mikroba aerob. Fermentasi dalam keadaan kurang oksigen dapat menyebabkan pertumbuhan jamur terhambat. Bahkan apabila kondisinya benar-benar anaerob akan tumbuh bakteri anaerob penghasil racun, seperti *Botulinus*. Adanya oksigen berlebihan juga merugikan karena akan menyebabkan permukaan biji kedelai menjadi cepat kering sehingga pertumbuhan jamur juga terhambat. Selain oksigen, faktor yang mempengaruhi pertumbuhan jamur selama fermentasi adalah kadar air. Kadar air yang berlebihan akan menghambat difusi oksigen ke

dalam biji kedelai dan mengakibatkan pertumbuhan jamur terhambat. Untuk menghindari hal itu maka kadar air kedelai harus dibawah 45 % yang merupakan batas pertumbuhan bakteri.

Fermentasi dalam tahap ini dapat dilakukan secara spontan (tanpa memberi inokulum) atau dengan menggunakan usar (ragi tempe). Jamur yang paling dominan fermentasi ini adalah *Rhizopus sp.*, dan *Aspergillus sp.*, yaitu, *R. oligosporus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. stolonifer*, *R. achlamidasporus*, *R. formosacensis*, *R. chinensis*, *R. cohnii*, dan *A. oryzae*.

Selama fermentasi jamur terjadi perubahan-perubahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana. Hal ini disebabkan oleh enzim-enzim yang dihasilkan oleh jamur. *Rhizopus oligosporus* merupakan jamur yang aktivitas protease dan lipase-nya paling tinggi, sehingga paling sesuai untuk memecah protein dan lemak dalam kedelai. *Rhizopus sp.* Juga menghasilkan enzim amilase dan pektinase. Enzim amilase terutama diproduksi oleh *R. oryzae*. *Rhizopus oligosporus* hanya mensintesis sedikit, sedangkan *R. stolonifer* tidak mensintesis sama sekali. *R. arrhizus* merupakan salah satu penghasil enzim pektinase.

Fermentasi jamur ini berlangsung antara 2-5 hari. Fermentasi jamur dihentikan saat jamur mulai berspora. Pada saat jamur mulai berspora berarti enzim sudah seluruhnya dikeluarkan dari sel dan produksi enzim cenderung menurun.

2.3 Mikrobiologi pada Fermentasi Tauco^[10]

Tauco adalah produk fermentasi kedelai oleh jamur yang dilanjutkan dengan fermentasi oleh bakteri halofilik dan jamur halofilik dalam larutan garam. Fermentasi ini dilakukan dalam larutan garam dengan konsentrasi 18-22 %. Fermentasi dalam larutan garam merupakan proses fermentasi anaerob. Mikroorganisme yang mampu tumbuh dalam tauco adalah bakteri halofilik dan ragi halofilik, antara lain *Pediococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Hansenulla sp.*, *Zygosaccharomyces sp.* dan *Saccharomyces sp.*

Pertumbuhan bakteri asam laktat akan menaikkan jumlah asam organik, yang akan memberikan kondisi asam pada larutan tersebut. Selama fermentasi dalam larutan garam, terjadi penurunan pH dari 6,5 sampai 7,0 menjadi 4,8 sampai 5,0. Pada saat itulah fermentasi jamur berlangsung.

Larutan garam merupakan media selektif bagi pertumbuhan mikroba halofilik, oleh karenanya konsentrasi larutan garam sangat penting bagi fermentasi tahap kedua ini. Jumlah garam yang ditambahkan akan menentukan kecepatan pembentukan asam, jenis dan jumlah bakteri yang tumbuh. Makin tinggi konsentrasi larutan garam, kecepatan pembentukan asam akan makin lambat dan jenis maupun jumlah bakteri yang tumbuh makin sedikit^[12]. Kadar garam yang paling baik adalah 20 % dan minimum 18 %.

Pertumbuhan *Salmonella* dapat dihambat pada konsentrasi garam 6 %. Semua tipe *Clostridium botulinum* dihambat pada konsentrasi garam 10 % sampai 12 %. *Staphylococcus aureus* dapat tahan hidup sampai kadar garam 15 % atau kadang-kadang sampai 20 %, tetapi pembentukan toksin pada kadar garam 5 %.

Pada kadar garam kurang dari 16 % akan timbul mikroba kontaminan yang dapat menyebabkan pembusukan.

2.4 Transformasi Isoflavon pada Fermentasi Tempe^[5]

Senyawa-senyawa isoflavon dalam kedelai adalah daidzein, genestein, dan glisitein berada dalam keadaan bebas (aglikon) maupun dalam keadaan terikat (konjugasi) melalui ikatan glikosida dengan senyawa gula.

Hasil transformasi senyawa isoflavon selama fermentasi tempe telah banyak dipelajari dan ternyata tidak hanya jamur pemeran utamanya, tetapi mikroba lain yang dianggap sebagai mikroba kontaminan juga memberikan kontribusi pembentukan transforman baru. Selama fermentasi, terjadi proses metabolisme dan dalam hal ini peran enzim di dalam sel sangat menentukan pembentukan transforman ini. Selama fermentasi terjadi reaksi-reaksi transformasi isoflavon yang dapat dikategorikan sebagai berikut:

- Reaksi hidrolisis senyawa isoflavon glikosida oleh jamur *Rhizopus oligosporus*, sehingga dibebaskan senyawa aglikon dan senyawa gula.
- Reaksi reduksi senyawa isoflavon oleh jamur menjadi senyawa isoflavan.
- Reaksi derivatisasi dari senyawa aglikon menjadi senyawa aglikon lainnya oleh bakteri, contoh: hidrosilasi senyawa daidzein atau demetilasi glisitein menjadi faktor-2 (6,7,4'-trihidroksil isoflavon).

Senyawa isoflavon dalam kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O-glikosida. Selama proses fermentasi ikatan -O-glikosida terhidrolisis, membebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon

yang bebas. Senyawa aglikon ini dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa transforman baru. Reaksi transformasi isoflavon disajikan pada Gambar 4.5, 4.6 dan 4.7. Senyawa-senyawa aglikon merupakan senyawa aktif, dan sebaliknya senyawa glikosida merupakan senyawa yang tidak aktif. Hasil transformasi lebih lanjut dari senyawa aglikon ini justru menghasilkan senyawa-senyawa yang mempunyai bioaktivitas yang lebih tinggi, Faktor-2 mempunyai bioaktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding daidzein^[5].

2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk Mikroanalisis Isoflavon

Kromatografi lapis tipis (KLT) hampir selalu dipakai dalam proses isolasi hingga identifikasi senyawa. Pada KLT, fase diam yang sering dipakai adalah silika gel. Meskipun demikian ada pula yang berupa alumina, selulosa, kieselgel. Pemilihan fase gerak yang sesuai dilakukan dengan mencari dari literatur atau dengan mencoba beberapa pelarut dengan kepolaran berbeda, misalnya n-heksana, toluena, dietileter dan metanol^[6].

Kombinasi pelarut/penjerap yang dianjurkan untuk senyawa isoflavon adalah selulose-asam asetat 10-30 %^[13], silika-kloroform:metanol (15:1 sampai 3:1)^[3], kieselgel-kloroform:metanol (9:1)^[3], kieselgel-benzen:etil asetat:petroleum eter (bp 40-60°C):metanol (6:4:3:1)^[3], kieselgel-eter:petroleum eter (bp 40-60°C) (7:3)^[3].

Dalam proses isolasi isoflavon, KLT terutama berguna untuk tujuan, mencari pelarut untuk kromatografi kolom, analisis fraksi yang diperoleh dari

kromatografi kolom, identifikasi isoflavon dan isolasi isoflavon murni skala kecil^[13].

2.6 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) untuk Analisis Isoflavon

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), setidaknya pada saat ini, merupakan metode kromatografi cair paling akhir. Dalam beberapa tahun ini terakhir ini teknologi KCKT dan aplikasinya telah sangat berkembang, KCKT telah menjadi metode analisis rutin dan bahkan preparatif pada banyak laboratorium.

Kromatografi cair kinerja tinggi telah banyak dipilih oleh peneliti sebagai metode untuk analisis kualitatif dan kuantitatif isoflavon dari berbagai sumber. Teknik KCKT telah digunakan untuk menganalisis isoflavon dalam kedelai dan produk fermentasinya^[1,2,9].

Kromatografi cair kinerja tinggi pada dasarnya adalah kromatografi kolom yang menggunakan kolom yang terbuat dari bahan kemasan dengan partikel berukuran kecil dan berbentuk teratur. Cara ini memungkinkan bagi peneliti menganalisis komponen flavonoid dalam suatu campuran secara kuantitatif dengan kepekaan yang tinggi ($< 50 \mu\text{g}$)^[13].

2.7 Hidrolisis Asam dan Analisis Isoflavon

Senyawa isoflavon dalam kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O-glikosida. Selama fermentasi tempe, ikatan

-O-glikosida terhidrolisis oleh enzim β -glikosidase membebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon^[2].

Waktu yang diperlukan untuk memutuskan suatu gula dari suatu flavonoid -O-glikosida dengan hidrolisis asam tidak ditentukan hanya oleh kekuatan asam, tetapi juga oleh sifat gula (misalnya, glukuronida > glukosida = galaktosida > ramnosida) dan oleh posisi gula itu terikat pada inti flavonoid (misalnya, 7-O-glikosida > 4'-O-glikosida > 3-O-glikosida)^[13].

