

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kedelai

2.1.1. Deskripsi dan Kegunaan

Kedelai merupakan salah satu tanaman yang termasuk dalam golongan kacang-kacangan (*Leguminoceae*). Tanaman kedelai termasuk tanaman tahunan dengan tinggi pohon antara 64–127 cm. Kedelai merupakan salah satu sumber protein. Protein yang terdapat dalam kedelai adalah albumin (10 %), dan globulin (90 %). Selain protein, kedelai juga mengandung karbohidrat, saponin, vitamin (terutama vitamin E, B₁, B₂, B₆, asam pantotenat, nikotinamida), dan mineral¹².

Kedelai selain berguna untuk mencukupi kebutuhan gizi tubuh, juga berkhasiat sebagai obat beberapa jenis penyakit. Disamping itu kadar lecithin dalam kedelai dapat menghancurkan timbunan lemak dalam tubuh, sehingga secara tidak langsung dapat menekan penyakit darah tinggi dan menekan diare.

Kedelai amat diminati oleh masyarakat luas di dunia, karena kadar asam aminonya termasuk paling lengkap. Tiap satu gram asam amino kedelai mengandung 340 mg Isoleusin, 480 mg Leusin, 400 mg Lisin, 310 mg Fenilalanin, 200 mg Tirosin, 80 mg Metionin, 110 mg Sistin, 250 mg Treonin, 90 mg Triptofan, dan 330 mg Valin.

Bagian yang paling penting dari tanaman kedelai adalah bijinya. Biji kedelai dapat diolah menjadi berbagai jenis makanan; misalnya dibuat

tahu, tempe, tauco, kecap, dan susu sari kedelai. Dalam industri pengolahan hasil-hasil pertanian, kedelai merupakan bahan baku pakan ternak, minyak nabati, dan lain-lain^[20].

Tabel 2.1 Kandungan gizi dalam tiap 100 gram bahan kedelai

Kandungan gizi	Banyaknya dalam	
	Kedelai Basah	Kedelai Kering
Kalori	286,00 kal	331,00 kal
Protein	30,20 g	34,90 g
Lemak	15,60 g	18,10 g
Karbohidrat	30,10 g	34,80 g
Kalsium	196,00 mg	227,00 mg
Fosfor	506,00 mg	585,00 mg
Zat besi	6,90 mg	8,00 mg
Vitamin A	95,00 S.I	110,00 S.I
Vitamin B ₁	0,93 mg	1,07 mg
Vitamin C	-	-
Air	20,00 g	10,00 g
Bagian yang dapat dimakan	100,00 %	100,00 %

Sumber : Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI

2.1.2. Taksonomi^[27]

Kedudukan tanaman kedelai dalam sistematik tumbuhan (taksonomi) diklasifikasikan sebagai berikut :

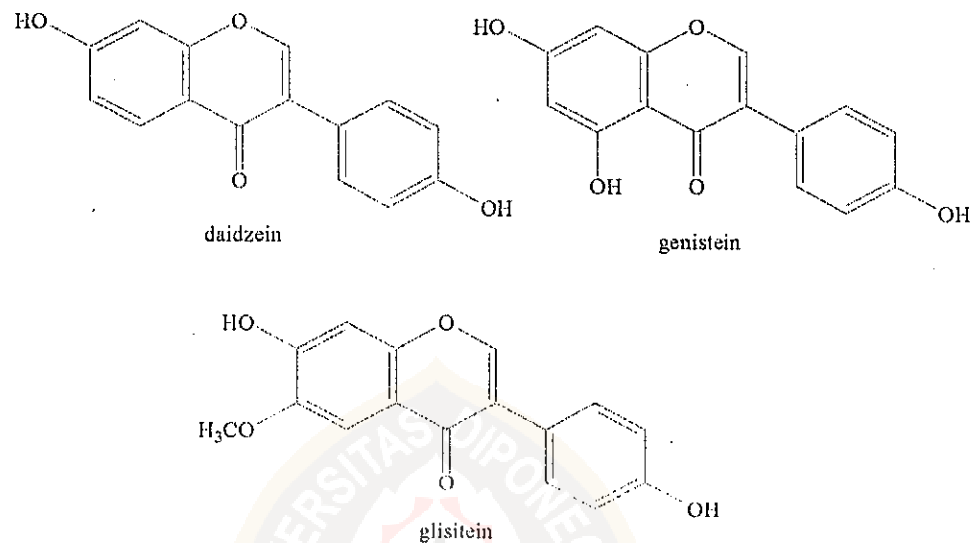
Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermathophyta
Sub – divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Ordo	: Polypetales
Famili	: Leguminoceae (Papilionaceae)
Sub – famili	: Papilionoideae
Genus	: Glycine
Species	: <i>Glycine max</i> L.

2.1.3. Kandungan Senyawa

Selain nutrisi, kedelai juga mengandung senyawa-senyawa yang tergolong metabolit sekunder. Penelitian-penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa biji kedelai mengandung daidzein, daidzein 7-O-glukosida^[17], 6''-O-asetildaidzein^[18], genistein, genistein 7-O-glukosida^[17], 6''-O-asetilgenistein^[19], glisitein^[16], glisitein 7-O-glukosida^[17], koumestrol^[2].

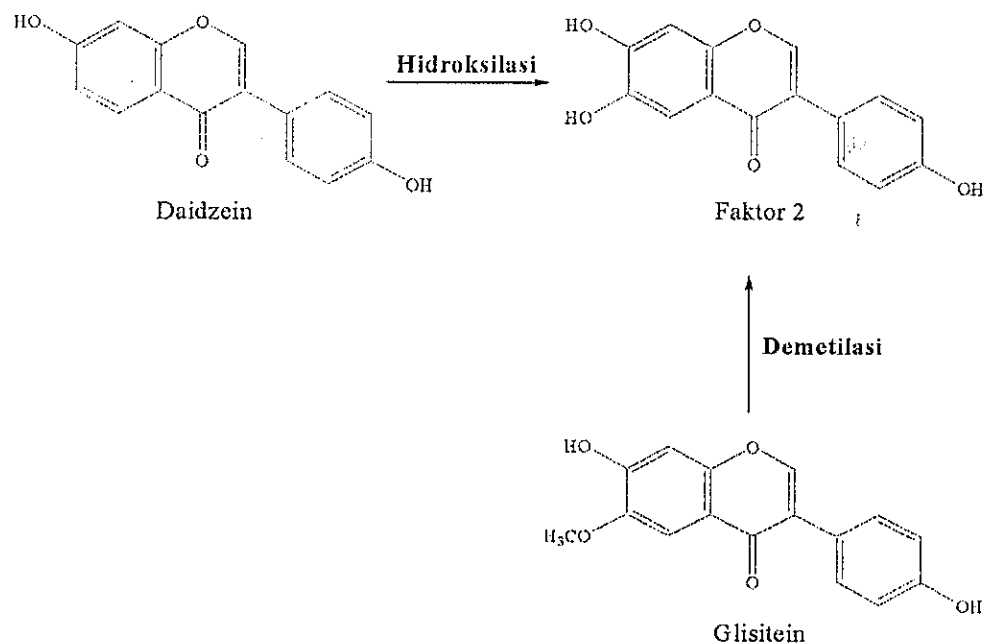
Tempe yang merupakan hasil fermentasi kedelai, juga mengandung senyawa metabolit sekunder terutama isoflavan. Selama proses fermentasi, ikatan O-glikosida pada isoflavan terhidrolisis oleh aktivitas jamur

Rhizopus sp. sehingga menghasilkan aglikon isoflavon bebas. Aglikon isoflavon yang terdapat pada tempe adalah genistein, daidzein, dan glisitein^[5].



Gambar 2.1 Struktur senyawa isoflavon aglikon

Aglikon-aglikon isoflavon pada tempe dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa transforman baru. Salah satu senyawa hasil transformasi lanjut pada tempe yakni senyawa faktor 2 (6,7,4'-trihidroksi isoflavon) terbentuk melalui reaksi biotransformasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui hidroksilasi daidzein oleh bakteri *Microbacterium arborescens*^[1,8].



Gambar 2.2 Struktur biotransformasi daidzein dan glisitein

2.2. Tauco^[9]

Tauco adalah salah satu hasil olahan kedelai melalui fermentasi, baik fermentasi kapang/cendawan (*mold fermentation*) maupun fermentasi dalam larutan garam (*brine fermentation*).

Tauco merupakan bahan makanan yang berbentuk pasta, berwarna kekuningan sampai coklat, dan mempunyai rasa spesifik yang asin, serta dibuat dari campuran kedelai dan tepung beras ketan melalui dua tahap fermentasi.

Salah satu faktor yang paling menonjol dari tauco ini adalah aroma dan rasanya yang sangat khas. Selain itu, kandungan gizi dan asam-asam aminonya masih cukup tinggi sehingga layak dikonsumsi oleh manusia.

Pembuatan tauco 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 tauco sangat penting agar miselia jamur dapat menembus jauh ke dalam biji kedelai. Menurut Arbianto (1977) 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.

Perebusan kedelai dimaksudkan untuk melunakkan biji dan menghilangkan rasa mentah kedelai sehingga diperoleh rasa yang lebih enak. Selain itu, perebusan biji kedelai juga 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.

Fermentasi 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 persen yang merupakan batas pertumbuhan bakteri.

Fermentasi dalam tahap ini dilakukan secara spontan (tanpa memberi inokulum) atau dengan menggunakan usar (ragi tempe). Jamur yang paling dominan dalam fermentasi ini adalah : *Rhizopus sp.*, dan *Aspergillus sp.*, yaitu *R. oligosporus*, *R. oryzae*, 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. *R. oligosporus* merupakan jamur yang aktivitas protease dan lipasenya paling tinggi, sehingga paling sesuai untuk memecah protein dan lemak dalam kedelai. *Rhizopus oryzae* juga menghasilkan enzim amilase dan 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.

Bahan dasar tauco tidak kedelai saja, tetapi campuran kedelai dengan tepung ketan. Adanya tepung akan menurunkan kandungan nitrogen tauco, namun demikian ada beberapa keuntungan yang diperoleh. Tepung dapat menurunkan kadar air kedelai yang telah direbus dari 60 persen menjadi 45 persen, dapat meningkatkan pertumbuhan jamur dan produksi enzim, serta penting dalam pembentukan flavor.

Setelah fermentasi jamur selesai dilanjutkan fermentasi tahap kedua dalam larutan garam. Fermentasi ini dilakukan dalam larutan garam dengan konsentrasi 18-22 persen. Fermentasi dalam larutan garam merupakan proses fermentasi tauco anaerob.

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 yeast mulai berlangsung.

Larutan garam merupakan media selektif bagi pertumbuhan mikroba halofilik, oleh karenanya konsentrasi larutan garam sangat penting pada fermentasi tahap kedua ini.

Besarnya kadar garam sangat berpengaruh pada proses fermentasi dalam larutan garam ini, kadar garam yang paling baik adalah 20 persen dan minimum 18 persen.

Tabel 2.2 Kandungan zat gizi tauco dalam 100 gram

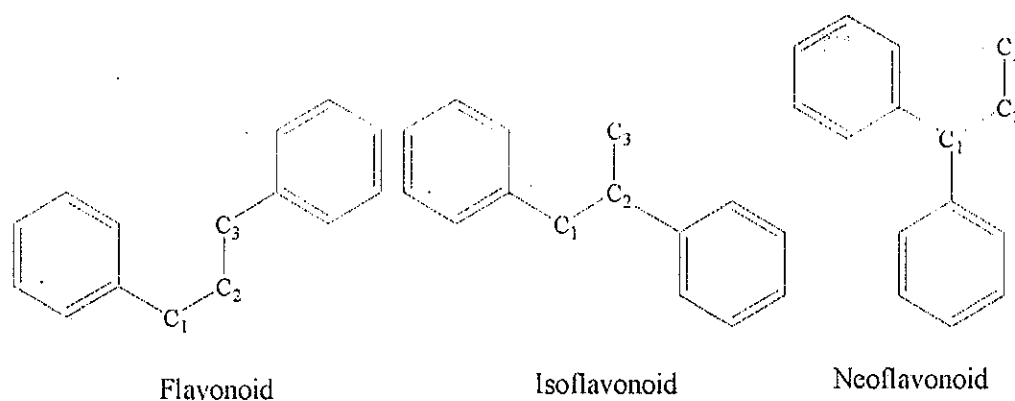
No.	Zat Gizi	Tauco
1	Energi	166 kalori
2	Air	64,4 g
3	Protein	10,4 g
4	Lemak	4,9 g
5	Karbohidrat	24,1 g
6	Kalsium	55 mg
7	Besi	1,3 mg
8	Vitamin B ₁	0,05 mg

Sumber : Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI

2.3. Flavonoid

2.3.1. Tinjauan Umum

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzen (C_6) terikat pada suatu rantai propan (C_3) sehingga membentuk suatu susunan $C_6-C_3-C_6$. Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yakni 1,3-diarilpropan atau flavonoid; 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid; dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid^[25].



Gambar 2.3 Struktur senyawa flavonoid

Banyaknya senyawa dalam flavonoid ini, bukanlah disebabkan karena banyaknya variasi struktur, akan tetapi lebih disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi, atau glikosilasi dari struktur tersebut. Flavonoid biasanya terdapat sebagai flavonoid O-glikosida, dimana pada senyawa tersebut satu gugus hidroksil flavonoid (atau lebih) terikat pada satu gula (atau lebih) dengan ikatan hemiasetal yang tak tahan asam^[25].

Kegunaan flavonoid pada tumbuhan adalah sebagai penarik serangga dalam proses fertilasi. Fungsi lain yang penting adalah sebagai senyawa pelindung terhadap cahaya ultraviolet atau terhadap infeksi^[10].

2.3.2. Sifat Kimia Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa polifenol dan oleh sebab itu bersifat agak asam sehingga dapat bereaksi dengan basa^[16]. Karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil, atau suatu gula, maka flavonoid merupakan

senyawa polar, sehingga larut dalam pelarut-pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, air, dan lain-lain. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air. Sebaliknya, aglikon-aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform^[12].

2.3.3. Isoflavon^[6]

Isoflavon merupakan flavonoid minor karena penyebarannya terbatas. Mereka terdapat secara sporadis atau terbatas pada sangat sedikit golongan tumbuhan. Isoflavon, yang telah dikenal dari 200 senyawa, merupakan isomer flavon, tetapi terdapat jauh lebih langka. Hampir semuanya terdapat dalam anak suku *Leguminoceae (Papilionoideae)*. Isoflavonoid dapat dibagi menjadi tiga kelas berdasarkan sifat fisiologisnya. Senyawa seperti 7,4'-dihidroksi isoflavon (daidzein) dan 5,7,4'-trihidroksi isoflavon (genistein) merupakan estrogen alam lemah. Isoflavon rumit, misalnya rotenon, merupakan insektisida alam yang kuat, sementara kumestan yang sekerabat, misalnya pisatin, adalah fitoaleksin, yaitu senyawa pelindung yang terbentuk dalam tumbuhan sebagai tanggapan terhadap serangan penyakit.

2.3.4. Isoflavon dalam Tempe Kedelai

Tempe adalah produk fermentasi kedelai oleh jamur *Rhizopus oligosporus* yang telah diketahui mengandung senyawa aktif isoflavon yang berpotensi sebagai antioksidan^[14,20,21], antihemolitik^[20,21], antijamur^[19], antibakteri, dan antikanker^[20,21].

Salah satu sifat bioaktivitas yang dimiliki oleh senyawa isoflavon adalah antioksidan. Senyawa isoflavon yang telah diketahui memiliki bioaktivitas antioksidan adalah daidzein^[14,20,21], genistein^[14,20,21], glisitein^[20], faktor 2^[20], dan isoflavan^[20]. Faktor 2 dan isoflavan terbentuk dari transformasi lebih lanjut dari isoflavon aglikon pada tempe^[20]. 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 genistein^[20].

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 genistein, glisitein, dan kandungan terendah adalah faktor 2^[20]. Umumnya, penambahan bakteri ke dalam formula inokulum jamur dapat meningkatkan jumlah total senyawa isoflavon faktor 2, daidzein, dan glisitein dalam tempe. Kandungan genistein dalam tempe dipengaruhi oleh spesies jamur yang digunakan dalam fermentasi serta kondisi kebersihan lingkungan proses itu sendiri.

Tabel 2.3 Konsentrasi daidzein dan genistein dalam tempe kedelai^[30]

Senyawa	Konsentrasi (mg/100 g)	
	Tempe Bandung	Tempe London
Daidzein	10,20	21,20
Genistein	21,60	16,50

2.4. Teknik Ekstraksi dan Isolasi

2.4.1. Pendahuluan^[6]

Ragam ekstraksi yang tepat, bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Prosedur klasik untuk memperoleh kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering (galih, biji kering, akar daun) ialah dengan mengekstraksi sinambung serbuk bahan dengan alat soxhlet dengan menggunakan sederet pelarut secara berganti-ganti, mulai dengan eter, lalu eter minyak bumi, dan kloroform (untuk memisahkan lipid). Kemudian digunakan alkohol dan etil asetat (untuk senyawa yang lebih polar). Ekstrak yang diperoleh dijernihkan dengan menyaring menggunakan celite dan pompa air, lalu dipisahkan dalam hampa. Sekarang hal ini biasanya dilakukan dalam penguap putar yang akan memekatkan larutan menjadi volume kecil tanpa terjadi percikan pada suhu antara 30°C dan 40°C. Ekstrak yang pekat mungkin mengkristal bila dibiarkan. Bila hal ini terjadi, ekstrak harus disaring dan keseragamannya diuji dengan kromatografi menggunakan beberapa pengembang.

2.4.2. Ekstraksi Sinambung Menggunakan Soxhlet^[10]

Metode ini berguna jika kuantitas senyawa yang akan dipisahkan dalam satuan gram, tetapi tidak dapat digunakan untuk pemisahan secara sempurna karena senyawa yang sama dapat ditemukan dalam berbagai fraksi.

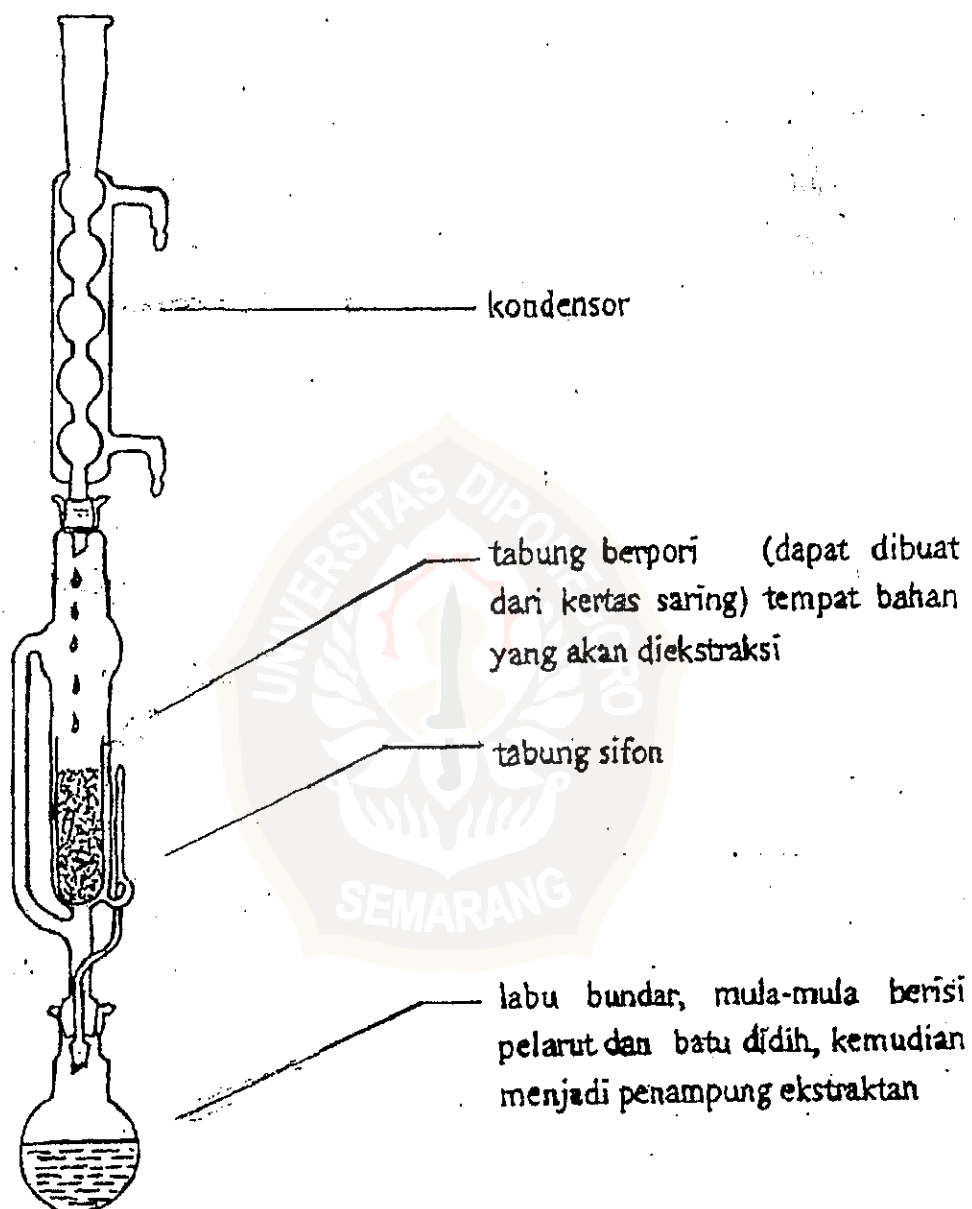
Seperti terlihat pada Gambar 2.4 bahan padat yang akan diekstraksi mula-mula dimasukkan ke dalam tabung berpori (dapat dibuat dari kertas saring dengan ukuran yang sesuai) kemudian ditempatkan pada bagian dalam alat soxhlet. Alat ini kemudian dipasang pada sebuah labu bundar yang berisi pelarut dan batu didih, sedangkan pada bagian atasnya dipasang kolom pendingin (kondensor). Pada saat pelarut dididihkan, uap pelarut akan melewati pipa samping alat soxhlet tempat diletakkannya bahan yang akan diperiksa yang kemudian akan mengisi seluruh bagian dalam alat tersebut hingga mencapai bagian atas tabung sifon. Selanjutnya seluruh bagian linarut tersebut akan tertarik dan segera tertampung pada labu tempat awal pelarut tadi. Proses ini terjadi secara berulang hingga diperoleh hasil ekstraksi yang dikehendaki. Sedikit masalah dalam penggunaan alat ini ialah suhu cairan pada tempat bahan yang akan diekstraksi berbeda dari titik didih pelarut. Proses ekstraksi menjadi kurang efektif, yaitu lebih lama karena berlangsung dalam kondisi suhu yang lebih rendah. Untuk mengatasi hal tersebut, biasanya dapat digunakan modifikasi alat soxhlet yaitu dimana suhu di sekitar bagian dalam tempat bahan yang akan diekstraksi tersebut diatur dengan cara

merancang tabung berisi aliran uap pelarut. Perlu diperhatikan untuk bahan yang bobot jenisnya rendah agar bagian atas tabung kertas saring diusahakan lebih tinggi dari tabung sifon, karena jika tidak demikian dapat menyebabkan bahan padat ikut tertarik ke dalam labu penampung, atau untuk mencegah hal tersebut sebaiknya diletakkan lembaran kapas penutup di atas bahan yang akan diekstraksi.

Tahap pengerjaan selanjutnya ialah menjernihkan ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan penyaringan dan bantuan pompa air, kemudian memekatkan ekstrak dengan menggunakan pompa vakum. Penguapan yang lazim digunakan ialah menggunakan penguap berputar ("rotary evaporator") yang dapat memekatkan sejumlah banyak larutan sampai didapatkan volume yang kecil, pengerjaannya aman dalam arti tidak menimbulkan "bumping", dan suhu yang digunakan hanya 30°C sampai 40°C. Perlu diperhatikan bahwa ekstraksi senyawa-senyawa yang mudah menguap memerlukan tindakan khusus.

Ada beberapa cara khusus yang dapat digunakan untuk membantu berhasilnya suatu pengerjaan ekstraksi. Misalnya untuk isolasi komponen larut air dari jaringan daun, maka komponen lipid harus dihilangkan lebih dulu dengan cara mencuci ekstrak berulang-ulang menggunakan petroleum. Jika ekstraksi dilakukan dengan etanol langsung tanpa pencucian dengan petroleum, maka pada saat pemekatan ekstrak menggunakan penguap berputar akan didapatkan komponen klorofil dan lipid melekat pada sisi labu. Dalam hal ini pemisahan dapat dikerjakan

dengan baik yaitu memisahkan fraksi air bebas lipid jika berhasil memipet larutan pekat dalam air tersebut keluar dari labu.



Gambar 2.4 Alat soxhlet

2.5. Teknik Pemisahan

Pemisahan dan pemurnian kandungan tumbuhan dilakukan dengan menggunakan beberapa teknik kromatografi. Pemilihan teknik kromatografi sebagian besar bergantung pada sifat kelarutan dan keatsirian senyawa yang akan dipisahkan^[6].

2.5.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Nilai utama KLT pada penelitian flavonoid ialah sebagai cara analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit. KLT terutama berguna untuk tujuan berikut :^[12]

- a. Mencari pelarut untuk kromatografi kolom,
- b. Analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom,
- c. Menyigi arah atau perkembangan reaksi seperti hidrolisis atau metilasi,
- d. Identifikasi flavonoid secara ko-kromatografi,
- e. Isolasi flavonoid murni skala kecil.

Pada pelat KLT, cuplikan dilarutkan dalam sedikit pelarut sebelum ditotolkan, dan pelarut yang baik adalah pelarut atsiri (heksana, diklorometana, etil asetat), karena jika pelarutnya kurang atsiri maka akan terjadi pelebaran pita. Konsentrasi cuplikan harus sekitar 5 – 10 %. Penotolan dapat dilakukan dengan tangan (pipet) tetapi lebih baik dengan penotol otomatis (Camag, Desaga)^[7]. Di samping selulosa dan silika gel, sejumlah penjerap yang berbeda-beda dapat disaputkan pada pelat kaca atau penyangga lainnya dan digunakan untuk kromatografi. Dua sifat yang

penting dari penjerap adalah besar partikel dan homogenitasnya, karena adhesi terhadap penyokong sangat tergantung pada mereka. Besar partikel yang biasa digunakan adalah 1 – 25 mikron. Partikel yang butirannya sangat kasar, tidak akan memberikan hasil yang memuaskan dan salah satu alasan untuk menaikkan hasil pemisahan adalah menggunakan penjerap yang butirannya halus. Sedangkan dalam kolom partikel yang sangat halus akan mengakibatkan aliran pelarut menjadi lambat, pada lapisan tipis butiran yang halus memberikan aliran pelarut yang lebih cepat.

Kebanyakan penjerap yang digunakan adalah silika gel. Silika gel yang digunakan biasanya diberi pengikat (binder) yang dimaksudkan untuk memberikan kekuatan pada lapisan, dan menambah adhesi pada gelas penyokong. Pengikat yang digunakan kebanyakan adalah Kalsium sulfat tetapi biasanya dalam perdagangan silika gel telah diberi pengikat. Jadi tak perlu mencampur sendiri, dan diberi nama silika gel G^[22].

Data yang diperoleh dari KLT adalah bilangan R_f, yang didefinisikan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

Oleh karena itu, bilangan R_f selalu lebih kecil dari 1,0^[12].

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam kromatografi lapis tipis, yang juga mempengaruhi harga R_f adalah :^[22]

- 1) Struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan
- 2) Sifat dari penjerap dan derajat aktifitasnya
- 3) Tebal dan kerataan dari lapisan penjerap

- 4) Pelarut (dan derajat kemurniannya) yang digunakan sebagai fasa gerak
- 5) Derajat kejenuhan dari uap di dalam bejana pengembang yang digunakan
- 6) Teknik percobaan
- 7) Jumlah cuplikan yang digunakan
- 8) Temperatur
- 9) Keseimbangan

2.5.2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi pada dasarnya ialah suatu bentuk kromatografi kolom yang menggunakan kolom dari bahan kemasan dengan partikel berukuran kecil dan berbentuk teratur. Karena kehalusan kemasan, maka untuk mendapatkan laju aliran yang memadai, digunakan tekanan sampai 5000 lb/inci atau sekitar 2000 kg/cm. Pengukuran kuantitatif dilakukan dengan menyigi eluat yang keluar dari kolom secara otomatis menggunakan spektromonitor UV berpanjang gelombang berubah dan “kromatogram” direkam pada kertas gaftar berupa deretan puncak. Kekurangan cara ini ialah tingginya biaya yang dikeluarkan untuk pompa/detektor/perekam/kolom, dan persyaratan yang harus dipenuhi dalam hal penyuntikan larutan, yaitu harus bebas dari partikel untuk mencegah penyumbatan dan kerusakan kolom^[12]. Sebagian besar pemisahan dengan KCKT modern menggunakan kolom siap pakai, dan berbagai jenis kolom ini disediakan oleh pabrik. Tetapi, kebanyakan

pemisahan dapat dilakukan dengan menggunakan kolom partikel silika mikropori (untuk senyawa non-polar) atau kolom fase-balik, yaitu fase-ikat C_{18} (untuk senyawa polar). Terlepas dari biaya alat dan pelarut, KCKT memberi harapan sebagai alat terpenting dan serba guna pada analisis kuantitatif tumbuhan^[6].

2.6. Teknik Identifikasi

Pada identifikasi suatu kandungan tumbuhan, setelah kandungan itu diisolasi dan dimurnikan pertama-tama harus kita tentukan dahulu golongannya, kemudian barulah ditentukan jenis senyawa dalam golongan tersebut. Golongan senyawa biasanya dapat ditentukan dengan uji warna, penentuan kelarutan, bilangan R_f , dan ciri spektrum UV. Untuk senyawa yang pernah diketahui dapat diidentifikasi berdasarkan data diatas. Namun pemastian akhir harus dilakukan perbandingan langsung dengan senyawa autentik (bila ada). Bila senyawa autentik tidak ada, perbandingan seksama dengan data pustaka sudah cukup untuk menentukan cirinya^[6].

Biasanya kebanyakan senyawa flavonoid tidak terlihat pada plat KLT, kecuali antosianin (bercak jingga sampai lembayung yang menjadi biru bila diuapi NH_3) dan khalkon, auron, dan 6-hidroksi flavonol (kuning). Karena alasan tersebut, untuk mendeteksi bercak noda pada plat KLT dilakukan dengan sinar UV (366 nm, bukan 254 nm). Untuk memeriksa, sinar UV dapat ditempatkan diatas atau dibawah kromatogram, tetapi kepekaan yang lebih besar dicapai bila sinar berasal dari bawah. Menguapi kromatogram (pelat

KLT) yang sudah betul-betul kering dengan uap NH_3 (dari botol yang berisi NH_4OH 0,88 : H_2O , 1 : 1) umumnya akan meningkatkan kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna yang ada kaitannya dengan struktur senyawa yang bersangkutan. Bila semua bercak noda yang tampak telah ditandai dengan pensil, kita dapat memulai dengan mempertimbangkan sifat kimia setiap bercak. Larutan AlCl_3 5% juga bisa digunakan untuk spektroskopi UV-tampak bila disemprotkan pada pelat KLT yang kemudian dikeringkan. Dimana semua 5-hidroksi flavonoid ditunjukkan dengan bercak berfluoresensi kuning bila dilihat dibawah sinar UV (366nm). Selain itu, bercak yang semula tak tampak menjadi terlihat^[12].

2.7. Aktivitas Antioksidan^[13]

Di dalam tubuh manusia terdapat suatu radikal bebas yang bersifat sangat reaktif, yang akan berinteraksi dengan bagian-bagian tubuh maupun sel-sel tertentu dan menyebabkan sel tersebut menjadi tidak normal.

Dengan demikian, akan dicari suatu zat aktif yang dapat bereaksi dengan radikal bebas tersebut dan membentuk suatu senyawa yang normal yang tidak reaktif serta tidak berbahaya bagi tubuh manusia.

Aktivitas antiradikal dapat diuji dengan cara melawan larutan DPPH dalam pelarut etanol. Tingkat pelunturan warna dari larutan DPPH tersebut mengindikasikan suatu efisiensi scavenging pada penambahan substansi. Untuk tiap-tiap komponen, ke dalam 750 μL dari larutan ditambahkan larutan DPPH (20 mg/L) sebanyak 1,5 mL. Lima menit kemudian, diukur

serapannya pada 517 nm, yang dilakukan juga untuk larutan blanko yang berisi air sebanyak 750 μ L.

Persentase pelunturan warna dari larutan DPPH dapat dihitung menurut persamaan :

$$\text{Persentase pelunturan warna} = [1 - (\text{serapan dengan adanya komponen tertentu})] \times 100 \%$$

Analisa diatas merupakan analisa kuantitatif dari aktivitas antiradikal secara spektrofotometri. Sedangkan analisa kualitatifnya dapat dilakukan dengan cara menyemprotkan larutan DPPH ke atas plat KLT yang telah digunakan untuk memisahkan senyawa yang dianalisis, dimana plat KLT yang dipakai adalah plat KLT dengan pemisahan terbaik.

