

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tauco

Tauco (*chaing*: China; *jang* atau *doenjang*: Korea; *miso*: Jepang; *tao-chico*: Thailand; *tao-si*: Filipina) adalah bahan makanan yang berbentuk pasta, berwarna kekuningan sampai coklat dan mempunyai rasa spesifik yang asin, dibuat dari campuran kedelai dan tepung beras ketan, melalui 2 tahap fermentasi, yaitu fermentasi oleh kapang (*mold fermentation*), dan fermentasi dalam larutan garam (*brine fermentation*) (Sulistiyowati, 1978; Beuchat, 1984). Hasil fermentasi biasanya berbeda, karena perbedaan penggunaan jenis kapang dan lama fermentasinya, serta konsentrasi garam dan lama perendamannya (Hartadi dan Jutono, 1978; Sulistiyowati, 1978).

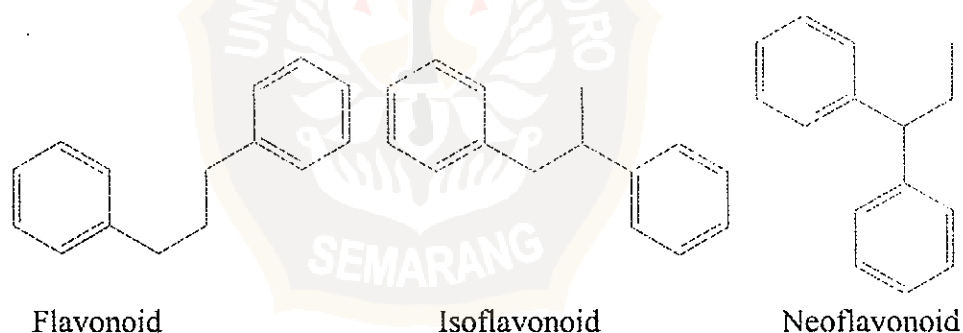
Kapang yang digunakan pada fermentasi adalah *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus achlamidasporus*, *Rhizopus formosacensis*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus cohnii*, *Aspergillus oryzae*. Fermentasi oleh kapang termasuk fermentasi aerob yang membutuhkan waktu sekitar 2-5 hari (Elizabeth, 1990).

Fermentasi dalam larutan garam adalah fermentasi anaerob, membutuhkan waktu 1-2 bulan. Larutan garam yang digunakan berkadar 18-22%. Mikroba yang membantu proses tersebut adalah bakteri halofilik dan *yeast* halofilik/osmofilik, seperti *Pediococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Hansenella sp.*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Tomplotopsis sp.* (Elizabeth, 1990; Sulistiyowati, 1978).

2.2 Flavonoid dan Isoflavon

2.2.1 Tinjauan umum flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok fenol terbesar yang ditemukan di alam. Banyaknya senyawa flavonoid bukanlah disebabkan banyaknya variasi struktur, akan tetapi lebih disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi, atau glikosilasi dari struktur tersebut (Achmad, 1986; Harborne, 1996). Kerangka dasar flavonoid terdiri atas 15 atom C, yaitu 2 cincin benzen (C₆) terikat pada suatu rantai propan (C₃), sehingga membentuk susunan C₆-C₃-C₆. Dengan demikian dapat dihasilkan tiga struktur, yaitu flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid. Struktur flavonoid (1,3-diarilpropan), isoflavonoid (1,2-diarilpropan), dan neoflavonoid (1,1-diarilpropan) di-tunjukkan oleh Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid

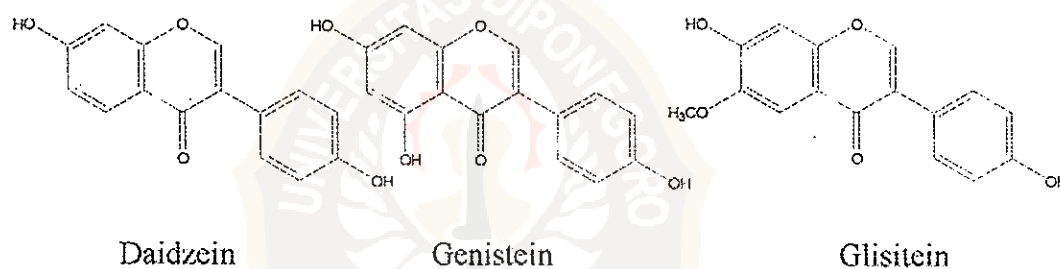
Flavonoid di alam biasanya terdapat sebagai flavonoid-O-glikosida. Pada senyawa tersebut satu (atau lebih) gugus hidroksil dari flavonoid terikat pada satu (atau lebih) gula dengan ikatan hemiasetal yang tidak tahan asam. Pengaruh glikosilasi ini menyebabkan flavonoid menjadi kurang reaktif dan lebih mudah larut dalam air (Markham, 1988)

2.2.2 Senyawa Isoflavon

Isoflavon merupakan salah satu jenis isoflavonoid. Penyebaran metabolit sekunder tersebut lebih terbatas pada *Leguminosae* (Achmad, 1986; Markham, 1988; Priatni dkk, 1998, Kusmardiyani dkk, 1992). Berikut ini adalah contoh beberapa isoflavon yang banyak terdapat di dalam *Leguminosae*:

1. Daidzein (7,4'-dihidroksiisoflavon)
2. Genistein (5,7,4'-trihidroksi isoflavon)
3. Glisitein (7,4dihidroksi, 6-metoksiisoflavon)

Struktur daidzein, genistein dan glisitein ditunjukkan oleh Gambar 2.2.

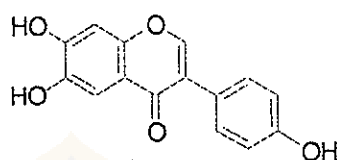


Gambar 2.2 Struktur daidzein, genistein dan glisitein

Senyawa isoflavon pada kedelai membentuk konjugat dengan gula melalui ikatan O-glikosidik dapat terhidrolisis oleh enzim β -glukosidase yang dihasilkan *Rhizopus oligosporus* sedemikian rupa membebaskan gula dan isoflavon aglikon (Prawiroharsono, 1997; Priatni dkk, 1998). Selain itu, ikatan tersebut juga dapat terhidrolisis oleh asam (Hutriadi, 2001).

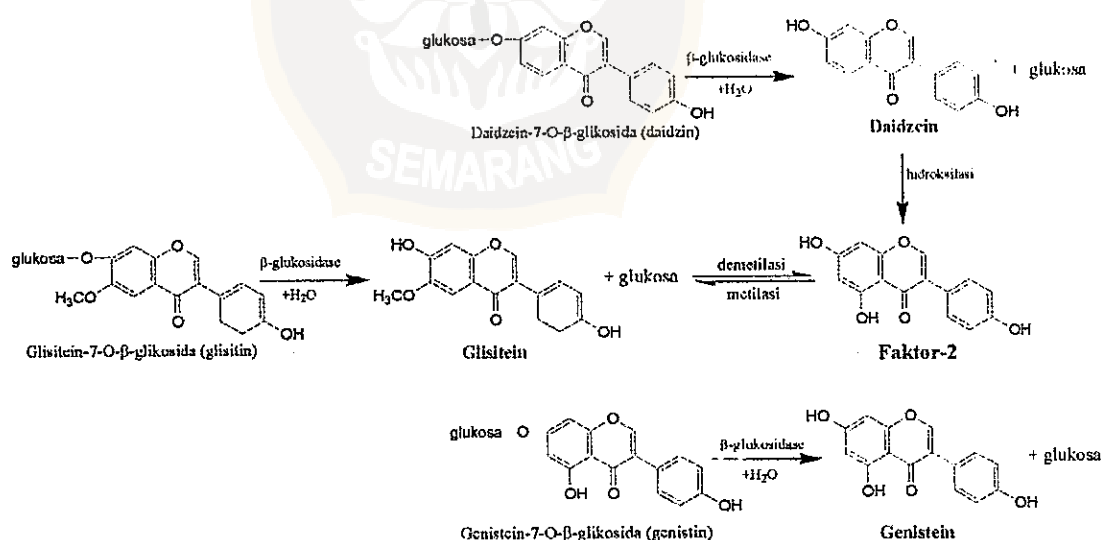
Mikroorganisme yang berperan dalam proses transformasi isoflavon tidak hanya *R. oligosporus*, tetapi ada mikroorganisme lain yang turut berperan di dalamnya, seperti ragi (*yeast*) dan bakteri kontaminan lainnya. Selama proses fermentasi,

senyawa aglikon isoflavon bisa mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa isoflavon baru yang mempunyai aktivitas lebih tinggi, yaitu faktor-2 (Gyorgy, 1964; Prawiroharsono, 1995 dan 1997; Priatni dkk, 1998; Suzery dkk, 2000). Faktor-2 dapat terbentuk melalui proses hidrosilasi daidzein oleh *Microbacterium arborescent*, dan melalui proses metilasi glisitein oleh *Brevibacterium epidermidis* atau *Micro-coccus luteus* (Prawiroharsono, 1995). Struktur senyawa Faktor-2 ditunjukkan oleh Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Faktor-2

Proses biotransformasi isoflavon ditunjukkan oleh Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Biotransformasi isoflavon (Prawiroharsono, 1995; Priatni dkk, 1998)

2.2.3 Sifat kimia isoflavon.

Isoflavon termasuk golongan polifenol. Oleh karena itu, isoflavon juga mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut di dalam basa. Akan tetapi bila dibiarkan di dalam larutan basa dan di dalam lingkungan yang terdapat banyak oksigen, isoflavon akan mengalami penguraian. Isoflavon di alam banyak terdapat sebagai glikosida. Adanya sejumlah gugus hidroksil tak tersubstitusi, dan / atau yang tersubstitusi gula, isoflavon glikosida bersifat polar, maka umumnya isoflavon aglikon cukup larut dalam metanol, etanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, air, dll. Adanya gula yang terikat pada isoflavon menyebabkan isoflavon semakin polar, dan semakin larut dalam air. Sebaliknya, isoflavon aglikon bersifat kurang polar, sehingga cenderung lebih mudah larut dalam kloroform dan eter (Markham, 1988).

2.3 Metode Isolasi

2.3.1 Ekstraksi pelarut.

Ekstraksi pelarut merupakan proses pemisahan dimana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sujadi, 1988). Pada prinsipnya, zat tersebut terdistribusi dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak bercampur tersebut (ekstraksi cair-cair) (Khopkar, 1990). Dua pelarut yang tidak bercampur tersebut tentu saja berbeda kepolarannya, sehingga zat-zat yang polar akan terlarut dalam pelarut polar, sedangkan zat-zat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Hal ini dikatakan sebagai *like dissolves like* (Sujadi, 1988).

Besarnya perbandingan zat yang terdistribusi dalam dua pelarut tersebut dinyatakan dengan koefisien distribusi (K) :

$$K = \frac{C_1}{C_2} \quad (1)$$

K adalah koefisien distribusi suatu zat dalam cuplikan, yang besarnya sama dengan perbandingan antara konsentrasi zat tersebut dalam pelarut 1 (C₁) dan dalam pelarut 2 (C₂) (Day dan Underwood, 1999; Khopkar, 1990)

2.3.2 Ekstraksi berkesinambungan menggunakan soxhlet

Cara yang umum digunakan untuk menarik senyawa organik dari jaringan tanaman adalah dengan cara ekstraksi padat berkesinambungan menggunakan alat soxhlet. Metode ini berguna jika kuantitas senyawa yang akan dipisahkan dalam satuan gram. Metode ini termasuk dalam ekstraksi panas, karena pelarutnya dididihkan sehingga terbentuk uap. Uap pelarut selanjutnya terkondensasi dan jatuh pada alat soxhlet yang di dalamnya telah diletakkan bahan yang akan diekstraksi (Kusmardiyani, 1992).

2.3.3 Kromatografi kolom

Pemisahan secara kromatografi didasarkan pada perbedaan migrasi dan penyebaran sepanjang kolom. Jika ada perbedaan penahanan secara selektif, maka masing-masing komponen penyusun cuplikan akan bergerak sepanjang kolom dengan laju yang tergantung pada karakteristik interaksi yang terjadi. Jika pemisahan terjadi, masing-masing komponen akan keluar dari kolom pada interval waktu yang berbeda-beda (Day dan Underwood, 1999; Khopkar, 1990).

Banyak hal yang dapat digunakan untuk menggambarkan kromatografi, diantaranya adalah koefisien distribusi (K) dan faktor retardasi (R_f) (Sujadi, 1988; Johnson dan Stevenson, 1991). Pemisahan secara kromatografi yang berhasil dengan baik sangat tergantung pada efisiensi fasa gerak dan fasa diam, serta efisiensi kolom (Johnson dan Stevenson, 1991).

Pemilihan fasa diam dan fasa gerak yang tepat akan menghasilkan puncak-puncak dengan keterpisahan yang baik. Fasa gerak yang dipilih adalah yang selektif terhadap komponen-komponen cuplikan, dan tidak dapat melarutkan fasa diamnya. Sedangkan fasa diam yang dilapiskan tipis ke penyangga harus menunjukkan aktivitas permukaan yang seragam, supaya tidak terbentuk puncak yang berckor. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan fasa gerak dan fasa diam yang tepat adalah pertimbangan waktu retensi (t_R), faktor selektivitas (α), dan daya pisah (R) (Day dan Underwood, 1999; Khopkar, 1990; Johnson dan Stevenson, 1991).

Untuk memperbaiki daya pisah yang buruk, pertama kali yang harus dilakukan adalah memeriksa efisiensi kolom. Efisiensi kolom secara kuantitatif dinyatakan sebagai banyaknya plat teoritis (N). Kolom yang efisien adalah kolom yang tidak menyebabkan pelebaran pita. Jumlah plat teoritis (N) sebanding dengan panjang kolom (L). Ukuran efisiensi kolom per-unit panjang kolom disebut juga tebal ekivalen plat teoritis (High Equivalent of Theoretical Plate atau HETP) (Day dan Underwood, 1999; Khopkar, 1990; Johnson dan Stevenson, 1991).

2.4. Metode Analisis

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (TLC) untuk mikroanalisis isoflavon

KLT merupakan kromatografi serapan, tetapi juga merupakan kromatografi partisi karena bahan penyerap telah dilapisi air dari udara. Sistem ini memberikan banyak keuntungan, misalnya peralatan yang diperlukan sedikit, murah, sederhana, waktu analisisnya cepat, dan daya pisahnya cukup baik (Sujadi, 1988).

Pemisahan dilakukan oleh keseimbangan berurutan cuplikan dalam dua fasa, satu diantaranya bergerak terhadap yang lainnya. Derajat retensi pada KLT biasanya dinyatakan dalam faktor retardasi (R_f) yang menyatakan perbandingan kecepatan pergeseran zat terlarut terhadap senyawa standar ideal yang tidak terlarutkan apapun dan tidak teradsorpsi fasa diam. (Sujadi, 1988; Day dan Underwood, 1999).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{jarak yang ditempuh fasa gerak}} \quad (2)$$

Menurut Markham (1988), KLT berguna untuk mencari pelarut untuk kromatografi kolom, analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, identifikasi isoflavon, dan isolasi dalam skala kecil. Seringkali bercak pada kromatogram yang terlihat (dengan sinar UV) kebanyakan disebabkan oleh flavonoid, walaupun bercak berfluoresensi biru, merah jambu, keputihan, jingga, dan kecoklatan harus dianggap bukan flavonoid sebelum diperiksa lebih lanjut dengan spektroskopi UV-Vis.

Kepekaan deteksi warna noda hasil KLT dapat diperkuat dengan cara diuapi kromatogram dengan NH_3 , kemudian diamati lagi di bawah sinar UV. Penafsiran warna noda dari segi struktur flavonoid ditunjukkan Tabel 2.1

Tabel 2.1 Penafsiran warna noda dari segi struktur flavonoid

	Warna noda		Keterangan
	Sinar UV	Sinar UV dengan NH ₃	
Lembayung gelap		Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya 5-OH flavon atau flavonol (tersubstitusi pada 3-O dan mempunyai 4'-OH) b. Kadang 5-OH flavanon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
		perubahan sedikit atau tanpa perubahan	a. Biasanya flavon atau flavonol tersubstitusi pada 3-O dengan 5-OH tanpa 4'-OH bebas b. Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersubstitusi pada 3-O dan ada 5-OH c. Isoflavon, dihidroflavonol, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH d. Khalkon yang mengandung 2' atau 6'-OH tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas
Fluoresensi biru muda		Biru muda Merah atau jingga	Beberapa 5-OH flavanon khalkon dengan 2- dan/ atau 4-OH bebas
		Fluoresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon tanpa 5-OH misal: 5-OH-glikosida b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tapi tersubstitusi pada 3-OH
Tak tampak		perubahan sedikit atau tanpa perubahan Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas Isoflavon tanpa 5-OH bebas
		Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning redup atau furesensi jingga		perubahan sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol dengan 3-OH bebas dengan/tanpa 5-OH bebas (kadang dari dihidroflavonol)
Fluoresensi kuning		Jingga atau merah	Auron dengan 4'-OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
Hijau-kuning, hijau-biru atau hijau		perubahan sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron tanpa 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol dengan 3-OH bebas dengan atau tanpa 5-OH bebas

Tabel 2.1 Penafsiran warna noda dari segi struktur flavonoid (lanjutan)

Warna noda		Keterangan
Sinar UV	Sinar UV dengan NH ₃	
Merah jingga redup	Biru	Antosianidin 3-glikosida
Merah jambu atau fluoresensi kuning	Biru	Sebagian besar antosianidin 3,5-diglikosida

Sumber: Mabry (1970) dan Markham (1988)

2.4.2 Spektroskopi UV-VIS

Spektroskopi UV-VIS digunakan untuk mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Kedudukan gugus hidroksi fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. (Markham, 1988)

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum UV dan tampak tergantung pada struktur elektronik dari molekul (Sastrohamidjojo, 1991). Spektrum khas flavonoid terdiri atas dua pita yang terentang pada 240-285 nm (pita II), serta 300 dan 550 nm (pita I). Rentangan spektrum UV-Vis flavonoid ditunjukkan Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Rentangan Spektrum UV-Vis Flavonoid

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis Flavonoid
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH bebas)
245-275	310-330 (bahu)	Isoflavon
	± 320 puncak	Isoflavon (5-deoksi-6,7-dioksidasi)
275-295	300-330 (bahu)	Flavanon dan dihidroflavonol
230-270 (A rendah)	340-390	Khalkon
230-270 (A rendah)	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianidin dan antosianin

Sumber: Mabry (1970) dan Markham (1988)