

**UJI KANDUNGAN SENYAWA ISOFLAVON KALUS KEDELAI (*Glycine max* (L) Merr) PADA MEDIA B5 DENGAN PENAMBAHAN PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000**

**SKRIPSI**

Oleh :

**FIRDA AMALIAH NUR  
NIM. 06520054**



**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM**

**MALANG**

**2010**

**UJI KANDUNGAN SENYAWA ISOFLAVON KALUS KEDELAI (*Glycine max* (L) Merr) PADA MEDIA B5 DENGAN PENAMBAHAN PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:**

**Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh :**

**FIRDA AMALIAH NUR  
NIM. 06520054**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2010**

**UJI KANDUNGAN SENYAWA ISOFLAVON KALUS KEDELAI (*Glycine max* (L) Merr) PADA MEDIA B5 DENGAN PENAMBAHAN PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000**

**SKRIPSI**

Oleh :

**FIRDA AMALIAH NUR**  
**NIM. 06520054**

Telah Disetujui oleh :

**Dosen Pembimbing I**

**Dosen Pembimbing II**

**Evika Sandi Savitri, M.P**  
**NIP. 19741018 200312 2 002**

**Achmad Nasihuddin, M.Ag**  
**NIP. 19730705 200003 1 002**

**Tanggal 13 Oktober 2010**

**Mengetahui,**

**Ketua Jurusan Biologi**

**Drs. Eko Budi Minarno, M.Pd**  
**NIP. 19630114 199903 1 001**

**UJI KANDUNGAN SENYAWA ISOFLAVON KALUS KEDELAI (*Glycine max* (L) Merr) PADA MEDIA B5 DENGAN PENAMBAHAN PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000**

**SKRIPSI**

Oleh:

**FIRDA AMALIAH NUR  
NIM. 06520054**

**Telah Dipertahankan di Depan Dosen Penguji Skripsi dan  
Telah Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Tanggal, 13 Oktober 2010**

<b>Susunan Dewan Penguji</b>	<b>Tanda Tangan</b>
<b>1. Penguji Utama : <u>Dwi Suherivanto, S.Si, M.P</u> NIP. 1974325 200312 1 001</b>	( )
<b>2. Ketua : <u>Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd</u> NIP. 19630114 199903 1 001</b>	( )
<b>3. Sekretaris : <u>Evika Sandi Savitri, M.P</u> NIP. 19741018 200312 2 002</b>	( )
<b>4. Anggota : <u>Achmad Nasihuddin, M.Ag</u> NIP. 19730705 200003 1 002</b>	( )

**Mengetahui dan Mengesahkan  
Ketua Jurusan Biologi**

**Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd  
NIP.19630114 199903 1 001**

## MOTTO

بَطْلًا بَيْنَهُمَا وَمَا وَآلِ الْأَرْضِ السَّمَاءَ خَلَقْنَا وَمَا

Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah(Q.S Shaad : 27)

# PERSEMBAHAN

Puji Syukur ku ucapkan kepada Mu ya Robbi atas segala cinta, Kasih Sayang yang sudah Engkau berikan Kepada hambaMu Ini.

Shalawat serta salam tetap kita limpahkan kepada junjungan kita Nabi Besar Muhammad SAW Karena beliau yang telah membawa kita pada jalan kebenaran

Karya kecilku ini kupersembahkan untuk :

Ayahanda dan Ibunda tercinta (Drs. Zainul Musthofa dan Khususiyah S.H) yang selalu menjadi motivasi dalam hidupku. Tanpa perjuangan kalian aku takkan bisa seperti ini, terimakasih Ayah... Ibu...

Adik-adikku tersayang (Anita Nur Maulidiyah, Nur Avidha Suraiyyah, Vira Nir Lina) dan adik sepupuku (Irfad Faiq Abdillah, Rofikoh Fitri Kamala, Zulfa Iklilatul Musyarrofah) mutiara kecil yang selalu menjadi sumber inspirasiku...

Keluarga besar Bani ABdurriyat,  
dengan segala kehangatan dalam  
kebersamaan-Nya.....

Seluruh Guru, Dosen, dan ustadz-  
ustadzah, Jasamu sungguh mulia,  
tanpamu aku takkan bisa seperti ini,  
Engkau adalah pahlawan tanpa tanda  
jasa...

Untuk Sahabat yang pernah ada (Atul,  
Wiwik, Inny, Via, Tutik, Ulika,  
Tayun, Lia (alm), Eny (alm), Rina, )  
aku selalu merindukan kalian,,,,,

Teman-teman Gen\_Bio'06 (Ike, MbK Zie,  
Uyun, V3, Ari, Fida, Any, Teteh Rimah,  
Hawin, Denik, Eka, Mega, Fenty, Hefni,  
Rizal, Fatoni, Aroby, Di2k, Arif) & 3I  
(Ayik, Boyke, Selep) teman-teman IKABIO  
'06 yang lainnya, terima kasih atas  
kesetiaan dan kekompakannya.....

Teman-teman kos "Kos2an GD" ( Vi2,  
Lia, Arfi, MbK Diah, V3, MbK Neni, MbK  
Dika, MbK Diah, Dewi, Nurul, Dian,  
Alit) & "Wisma Catalonia" (Yunis,  
Inonk, Iza, Vina, Betty) kalian  
selalu menjadi obat bosanku ketika ku

mulai penat dengan semua aktivitasku.  
Aku pasti merindukan masa-masa ini....

Sahabat-Sahabati PMII "Rayon Galileo" & Pengurus Komisariat Sunan Ampel Malang periode 2009-2010 (Mbk Lely, Refqi, Wafa, Agus) serta semua anggota yang tidak bisa disebutkan satu persatu, teruskan perjuangan kalian.....

Kawan...Terimakasih telah mengajarku segala hal yang tak pernah aku tahu sebelumnya, dan Kalian semua adalah sebagian kisah dalam hidupku yang takkan pernah aku lupakan, yang akan menjadi sejarah terindah dalam setiap perjalanan hidupku selanjutnya...  
Salam JUANG!!!

## KATA PENGANTAR



Puji syukur bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“UJI KANDUNGAN SENYAWA ISOFLAVON KALUS KEDELAI (*Glycine max* (L) Merr) PADA MEDIA B5 DENGAN PENAMBAHAN PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000”**. Shalawat serta salam tetap tercurahkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini. Untuk itu, iringan doa' dan ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr.H. Imam Suprayogo, selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Drs.H. Sutiman Bamabang Sumitro, S.U.DSc, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Eko Budi Minarno M.Pd, selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. Suyono M.P, selaku Koordinator Laboraturium dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing, dan memberikan pengarahan selama penulis menempuh studinya hingga selesai.
5. Evika Sandi Savitri, M.P selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Ach. Nashichuddin, M.Ag, selaku Dosen Pembimbing Agama yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
7. Ir. Tintrim Rahayu, M.Si dan Ahmad Faridi W, S.Si selaku konsultan kultur jaringan tumbuhan yang telah membimbing, memberikan arahan, serta motivasinya kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
8. Bapak Ibu Dosen Biologi yang telah mengajarkan banyak hal dan memberikan pengetahuan yang luas kepada penulis.
9. Ayahanda dan Ibunda tercinta (Drs. Zainul Musthofa dan Khususiyah S.H), adik-adikku tersayang (Anita Nur Maulidiyah, Nur Avidha Suraiyyah, Vira Nir Lina), dan keluarga yang selalu menjadi kekuatan dalam diri dan doa bagi setiap langkah, serta dengan sepenuh hati memberikan dukungan spirituil maupun materil sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
10. Teman-teman seperjuangan *Genetic Plant Tissue Culture* (Ike Shofiatul Azizah, Siti Nor Azizah, dan Qurrotul Uyun) terimakasih atas motivasi,

kerjasama, kekompakan dan kesabarannya sehingga penelitian ini bisa selesai sesuai harapan.

11. Segenap Staf Administrasi Jurusan Biologi (mbak Lil, mas Zulfan, mas Smile, mas Soleh dan mas Basyar) yang telah memberikan dukungan, motivasi dan semangatnya. Semoga kesuksesan menyertai kalian.
12. Teman-teman Biologi yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu khususnya teman-teman angkatan 2006 yang memberikan motivasi dan dukungan, sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
13. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang memberikan doa', semangat, dukungan, saran dan pemikiran sehingga penulisan ini menjadi lebih baik dan terselesaikan.

Semoga Allah memberikan balasan atas bantuan dan pemikirannya. Sebagai akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dan dapat menjadi inspirasi bagi pembaca pada umumnya.

*Wassalamu'alaikum Wr.Wb*

Malang, 13 Oktober 2010

Penulis

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	i
DAFTAR ISI .....	iii
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	viii
ABSTRAK .....	ix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan .....	6
1.4 Hipotesis.....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
1.6 Batasan Masalah .....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Umum Kedelai ( <i>Glycine max</i> (L) Merr) .....	9
2.1.1 Klasifikasi Kedelai ( <i>Glycine max</i> (L) Merr) .....	9
2.1.2 Morfologi Kedelai ( <i>Glycine max</i> (L) Merr).....	9
2.2 Pertumbuhan Secara <i>In Vitro</i> .....	12
2.2.1 Faktor-Faktor yang Menentukan Keberhasilan Kultur <i>In Vitro</i> .....	15
2.2.2 Zat Pengatur Tumbuh.....	16
2.3 Metabolit Sekunder .....	19
2.4 Produksi Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan.....	21

2.5 Senyawa Isoflavon .....	23
2.6 Struktur dan Biosintesis Isoflavon .....	24
2.7 Manfaat Isoflavon .....	26
2.8 Produksi Metabolit Sekunder Pada Kondisi Cekaman Kekeringan.....	28
2.9 PEG ( <i>Polyethylena glycol</i> ) <b>6000</b> .....	31
2.10 Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon dengan Kromatografi Kolom .....	32
2.11 Tumbuhan Sebagai Obat dalam Prespektif Islam .....	34
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Rancangan Percobaan .....	40
3.2 Variabel Penelitian.....	40
3.2.1 Variabel Bebas .....	40
3.2.2 Variabel Terikat .....	40
3.2.2 Variabel Terkendali .....	41
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	41
3.4 Alat dan Bahan Penelitian.....	41
3.4.1 Alat.....	41
3.4.2 Bahan .....	42
3.5 Prosedur Kerja.....	42
3.5.1 Sterilisasi Alat.....	42
3.5.2 Pembuatan Media.....	43
3.5.3 Sterilisasi Media .....	43
3.5.4 Sterilisasi Ruang Tanam .....	44
3.5.5 Sterilisasi dan Perkecambahan Biji.....	44
3.5.6 Inisiasi dan Pemeliharaan Eksplan.....	44
3.5.7 Pemberian Perlakuan pada Kalus.....	45

3.5.8 Analisis Kandungan Senyawa Isoflavon Kalus Kedelai.....	45
3.6 Analisis Data .....	46
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Beberapa Varietas Kedelai.....	48
4.1.1 Inisiasi Kalus.....	48
4.1.2 Induksi Kalus Pada Media PEG 6000 .....	50
4.2 Identifikasi Senyawa Isoflavon.....	51
4.2.1 Ekstraksi .....	51
4.2.2 Kromatografi Kolom .....	52
4.3 Pengaruh Penambahan PEG 6000 Pada Media Terhadap Kandungan Isoflavon Kalus Beberapa Varietas Kedela .....	53
4.4 Manfaat Kedelai Prespektif Islam.....	62
<b>BAB V PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan .....	69
5.2 Saran .....	69
DAFTAR PUSTAKA .....	71
LAMPIRAN.....	78

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Beberapa metabolit sekunder yang ditemukan pada kultur jaringan tumbuhan.....	23
Tabel 4.1	Hasil ANOVA Kandungan Isoflavon kalus beberapa varietas kedelai pada media PEG 6000 .....	54
Tabel 4.2	Rata-rata Pengaruh Dari Penambahan PEG 6000 Pada Media Terhadap Produksi Isoflavon (1 ppm/gr berat basah) Kalus Beberapa Varietas Kedelai.....	54
Tabel 4.3	Rata-rata Pengaruh Penambahan PEG 6000 Pada Media terhadap Kandungan Isoflavon Kalus beberapa Varietas Kedelai.....	58
Tabel 4.4	Rat-rata Pengaruh perbedaan Varietas krdelai Terhadap Kandungan Isoflavon .....	59

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tipe perkecambahan epigeal.....	11
Gambar 2.2 Struktur Kimia 2,4-D .....	18
Gambar 2.3 Struktur Dasar Isoflavon .....	24
Gambar 2.4 Struktur Isoflavon daidzein dan genistein.....	25
Gambar 2.5 Jalur-jalur Biosintesis Senyawa Isoflavon .....	25
Gambar 2.6 Struktur Kimia PEG ( <i>polyethylene glycol</i> ) .....	31
Gambar 2.7 Alat Kromatografi Kolom.....	33
Gambar 4.1 Morfologi kalus beberapa varietas kedelai pada awal inisiasi sampai pada akhir subkultur .....	49
Gambar 4.2 Morfologi kalus beberapa varietas kedelai pada pengamatan hari ke-14 setelah perlakuan PEG 6000 .....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Alur Kerja Penelitian.....	78
Lampiran 2	Proses Sterilisasi.....	79
Lampiran 3	Komposisi Larutan Media B5 .....	80
Lampiran 4	Perhitungan Konsentrasi PEG .....	81
Lampiran 5	Deskripsi Kedelai Varietas Wilis, Tanggamus dan Grobogan.....	82
Lampiran 6	Data Uji Isoflavon Kalus Beberapa Varietas Kedelai .....	86
Lampiran 7	Perhitungan manual hasil penelitian kandungan isoflavon kalus beberapa varietas kedelai setelah perlakuan.....	87
Lampiran 8	Perhitungan SPSS ANOVA Faktorial.....	92
Lampiran 9	Alat-Alat kultur Jaringan Tumbuhan.....	98
Lampiran 10	Bahan-bahan Kultur Jaringan Tanaman .....	100
Lampiran 11	Kegiatan Penelitian.....	101

## ABSTRAK

Nur, Firda Amaliah. 2010. **Uji Kandungan Senyawa Isoflavon Kalus Kedelai (*Glycine max* (L) Merr) Pada Media B5 Dengan Penambahan PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000**. Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Evika Sandi Savitri M.P. Pembimbing II : Ach. Nasihuddin M.Ag.

**Kata Kunci** : Isoflavon, Kedelai (*Glycine max* (L) Meril), PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000.

Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang disintesis oleh tanaman. Senyawa isoflavon yang konsentrasinya lebih tinggi terdapat pada tanaman *Leguminoceae*, khususnya pada tanaman kedelai yang terdapat pada biji dengan konsentrasi antara 2-4 mg/g kedelai terutama pada bagian hipokotil dan sebagian lagi terdapat pada kotiledon. Metabolit sekunder biasanya diperoleh dengan cara ekstraksi langsung dari tanamannya. Namun cara ini dianggap kurang efektif dan kurang menguntungkan jika digunakan dalam skala besar sebab metabolit sekunder yang diperoleh sedikit, sehingga dibutuhkan bahan baku tanaman yang cukup besar. Metode kultur jaringan merupakan salah satu cara yang digunakan untuk menginduksi metabolit sekunder pada tanaman dengan menggunakan PEG 6000 yang bersifat mencekam lingkungan (cekaman kekeringan) sehingga hal ini diharapkan mampu menginduksi metabolit sekunder, karena metabolit sekunder tanaman akan dihasilkan pada kondisi yang mencekam.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Genetic and Plant Tissue Culture* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Juni-Agustus 2010. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah perlakuan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000 yaitu 0 g/L, 20 g/L, 40 g/L, dan 60 g/L. Faktor yang kedua yaitu varietas kedelai yang terdiri dari 3 varietas yaitu Wilis, Tanggamus, dan Grobogan. Untuk mengetahui kandungan Isoflavon dalam kalus kedelai dilakukan dengan pemisahan kromatografi kolom.

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis dengan Analisis Variansi (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf 5%. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ada pengaruh pemberian PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000 terhadap kandungan isoflavon kalus beberapa varietas kedelai (Wilis, Tanggamus, dan Grobogan). Kandungan senyawa isoflavon tertinggi dihasilkan oleh kultur kalus varietas Grobogan pada konsentrasi 60 g/L yaitu sebanyak 6179,1 ppm. Perbedaan varietas berpengaruh terhadap kandungan isoflavon. Varietas Grobogan merupakan varietas yang menghasilkan senyawa isoflavon tertinggi, jika dibandingkan pada varietas Tanggamus dan varietas Wilis.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dalam Alqur'an telah dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan segala macam yang ada di bumi ini termasuk tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam. Tumbuhan yang menghasilkan biji-bijian seperti padi, gandum, dan kacang-kacangan. Sebagai tanda kekuasaan-Nya, Allah memberikan sumber makanan protein alternatif yang berasal dari biji-bijian (Herdiansyah, 2007). Firman Allah SWT dalam surat Yasin ayat 33, yang berbunyi :

وَأَيُّهُمُ الْأَرْضُ الْمَيِّتَةُ أَحْيَيْنَاهَا وَأَخْرَجْنَا مِنْهَا حَبًّا فَمِنْهُ يَأْكُلُونَ ﴿٣٣﴾

Artinya : *Dan suatu tanda (kekuasaan Allah yang besar) bagi mereka adalah bumi yang mati. Kami hiduskan bumi itu dan Kami keluarkan dari padanya biji-bijian, Maka daripadanya mereka makan (QS Yasin : 33).*

Ayat di atas menunjukkan bukti kebesaran Allah SWT, bahwa Allah SWT telah menghidupkan bumi yang gersang dengan menurunkan air hujan dan menumbuhkan berbagai macam tetumbuhan yang indah yang bermanfaat bagi makhluk hidup di bumi ini. Tumbuhan merupakan sumber kekayaan alam yang banyak dijumpai di lingkungan sekitar kita. Tumbuhan itu sendiri terdiri dari akar, batang, daun, dan biji. Setiap akar, batang, daun dan biji memiliki senyawa kimia yang berbeda.

Metabolit sekunder adalah suatu senyawa kimia yang diproduksi oleh sel atau tumbuhan jika ada kelebihan karbon untuk aktivasi metabolit primer.

Senyawa metabolit sekunder biasanya terbentuk akibat keterbatasan nutrisi dalam medium pertumbuhannya. Keterbatasan nutrisi dalam medium akan merangsang dihasilkannya enzim–enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan kelangsungan hidupnya. Senyawa metabolit sekunder juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidup. Kandungan metabolit sekunder inilah yang banyak dimanfaatkan sebagai obat (Pawiroharsono, 2001).

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat ialah kedelai (*Glycine max*). Khasiat sebagai obat disebabkan oleh adanya senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk menjaga dan memperbaiki sistem fisiologis maupun untuk pencegahan penyakit (Asih, 2005). Pada bagian biji kedelai ini mengandung senyawa-senyawa antioksidan diantaranya adalah vitamin E, vitamin A, provitamin A, vitamin C dan senyawa flavonoid golongan isoflavon, genistein, dan daidzein. Senyawa antioksidan yang mempunyai fungsi dapat mencegah penyakit kanker terutama kanker prostat pada kaum laki-laki dan kanker payudara pada kaum wanita adalah flavonoid golongan isoflavon, genistein dan daidzein (Aak, 1989).

Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman. Kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada tanaman *Leguminoceae*, khususnya pada tanaman kedelai yang terdapat pada biji antara 2-4 mg/g kedelai terutama pada bagian hipokotil dan sebagian lagi terdapat pada kotiledon (Anderson, 1997 dalam Pawiroharsono, 2001). Sedangkan (Berners, 1998, dalam Rahayu 2000) menyebutkan kandungan isoflavon pada biji kedelai

berkisar 0,5 – 2 mg/g tergantung dari varietasnya. Hasil analisis awal pada biji kedelai menunjukkan kandungan isoflavon per 100 g biji pada varietas Kaba untuk daidzein adalah 0,133 % dan genistein 0,021%, varietas Ijen mengandung daidzein 0,063% dan genistein 0,053% dan varietas Anjasmoro mengandung daidzein sebesar 0,094% dan genistein 0,11%. Pada penelitian ini menggunakan tiga varietas yang berbeda yaitu Wilis, Grobogan, dan Tanggamus, yang masing – masing mempunyai sifat genetik yang berbeda.

Metabolit sekunder biasanya diperoleh dengan cara ekstraksi langsung dari tanamannya. Namun cara ini kurang efektif dan kurang menguntungkan jika digunakan dalam skala besar. Hal itu dikarenakan hasil metabolit sekunder yang diperoleh sedikit sehingga dibutuhkan bahan baku tanaman yang cukup besar. Selain itu, penyediaan bahan baku tanaman juga sangat dipengaruhi oleh iklim, ketersediaan lahan, umur, hama, dan penyakit tanaman. Oleh karena itu perlu adanya langkah alternatif untuk mengatasi hal itu diantaranya yaitu dengan teknik kultur jaringan tumbuhan (Kartini, 2008).

Teknik kultur jaringan tumbuhan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma sel, sekelompok sel jaringan dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian – bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Gunawan, 1998). Metode kultur jaringan memiliki banyak keunggulan diantaranya yaitu dapat membentuk senyawa bioaktif secara terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat, tidak tergantung kondisi lingkungan, dan setiap sel dapat diperbanyak untuk menghasilkan senyawa

metabolit tertentu, pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional (Fitriani, 2003).

Kultur kalus merupakan tipe kultur jaringan yang banyak digunakan untuk mempelajari biosintesis metabolit sekunder (Mukarlina *dkk*, 2005). Kalus adalah massa sel yang aktifitas pembelahannya tidak terorganisasi dan belum terdiferensiasi. Sel-sel ini secara alamiah dapat terbentuk dari bagian tanaman yang terluka atau dari kultur jaringan yang dilukai (Dodds dan Robert, 1995). Dalam bentuk kalus, kedelai ternyata sudah mampu mensintesis senyawa isoflavon. Isoflavonoid disintesis oleh tanaman sebagian besar bertindak sebagai fitoaleksin yakni semacam antibodi untuk mempertahankan diri ketika tanaman tersebut mengalami gangguan eksternal seperti adanya serangan pathogen, pencemaran logam berat, perubahan suhu lingkungan atau radiasi ultraviolet, yang dikenal faktor cekaman (Dixon dan Paiva, 1995). Hal ini mengacu pada penelitian Utomo (2000) untuk mengindikasikan potensi kalus kedelai dalam produksi senyawa isoflavon, dengan memberikan cekaman pada lingkungan tumbuh tanaman pada tanaman kacang hijau (*Phaeolus aureus Roxb*) dan kacang tanah (*Arachis hypogaea*) yang berumur 7 hari akibat pengaruh penambahan garam NaCl pada lingkungan tumbuhnya. Pada penelitian ini digunakan PEG 6000 untuk menginduksi metabolit sekunder dengan adanya cekaman pada lingkungan (media) pada 3 varietas kedelai yaitu Wilis, Tanggamus, dan Grobogan.

Lingkungan atau kondisi tertentu pada tanaman dapat memicu sel untuk menghasilkan suatu metabolit sekunder, satu diantaranya kondisi cekaman

kekeringan. Tumbuhan membentuk metabolit sekunder dalam kondisi tertekan, karena salah satu fungsi dari metabolit sekunder tersebut adalah sebagai bentuk respon tubuh tumbuhan terhadap kondisi lingkungan untuk mempertahankan hidupnya (Knoss, 1997). Cekaman kekeringan ini diharapkan mampu menginduksi produksi senyawa isoflavon.

Simulasi cekaman kekeringan dalam kultur jaringan dapat dibuat dengan penambahan senyawa osmotikum yaitu PEG 6000, karena senyawa ini bersifat stabil, polimer panjang, non ionik, dan larut dalam air (Lawyer, 1970). Senyawa PEG 6000 ini merupakan senyawa osmotikum yang bersifat larut dalam air dan dapat menyebabkan penurunan potensial air yang homogen sehingga menyebabkan terjadinya cekaman kekeringan pada tanaman. Besarnya penurunan air sangat tergantung pada konsentrasi dan berat molekul PEG 6000. PEG yang digunakan dalam penelitian ini adalah PEG dengan berat molekul 6000. Menurut Lawyer (1970) penggunaan PEG 6000 lebih disarankan karena dengan berat molekul lebih dari 4000 tidak dapat diserap oleh sel tanaman dan tanpa menyebabkan keracunan. Verslues *dkk* (1998) melaporkan juga bahwa PEG 6000 lebih unggul dibandingkan manitol, sorbitol, atau garam karena tidak bersifat toksik terhadap tanaman, tidak dapat diserap oleh sel akar (Chazen dan Neumann, 1994), dan secara homogen menurunkan potensial osmotik larutan. Konsentrasi PEG 6000 yang digunakan yaitu 0 g/L, 20 g/L, 40 g/L, dan 60 g/L, hal ini mengacu dalam jurnal Kulkarni (2007) yang menggunakan keempat konsentrasi PEG 6000 tersebut untuk menapis kekeringan pada tanaman tomat. Sedangkan pada penelitian (Dian, 2005) konsentrasi PEG 6000 digunakan dalam satuan %

(persen) pada tanaman kedelai untuk mengetahui pertumbuhan Embrio Somatik. Untuk penggunaan konsentrasi PEG 6000 g/L pada kedelai masih belum pernah dilakukan.

Berdasarkan latar belakang diatas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai respon beberapa kalus varietas kedelai dalam produksi senyawa isoflavon pada media PEG 6000 dengan konsentrasi yang berbeda.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, permasalahan yang perlu diteliti yaitu:

1. Apakah penambahan PEG 6000 pada media dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap kandungan isoflavon kalus beberapa varietas kedelai?
2. Apakah perbedaan varietas berpengaruh terhadap kandungan isoflavon dalam kultur kalus kedelai?

### **1.3 Tujuan**

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh penambahan PEG 6000 pada media dengan konsentrasi yang berbeda terhadap produksi kandungan isoflavon kalus beberapa varietas kedelai.
2. Untuk mengetahui pengaruh perbedaan varietas terhadap produksi senyawa isoflavon dalam kultur kalus kedelai.

#### **1.4 Hipotesis**

Adapun hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penambahan PEG 6000 pada media dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap kandungan isoflavon kalus beberapa varietas kedelai.
2. Perbedaan varietas berpengaruh terhadap produksi senyawa isoflavon dalam kultur kalus kedelai.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk meningkatkan produksi senyawa isoflavon pada kedelai yang berguna dalam bidang kesehatan.
2. Dapat digunakan sebagai langkah alternatif memproduksi metabolit sekunder melalui teknik kultur jaringan pada kalus kedelai.

#### **1.6 Batasan Masalah**

1. Bagian tanaman yang digunakan adalah eksplan kotiledon kedelai.
2. Parameter pertumbuhan yang diteliti adalah warna serta kandungan senyawa isoflavon.
3. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4 D.

4. Menggunakan PEG 6000 dengan konsentrasi 0 gr/L, 20 gr/L, 40 gr/L, 60 gr/L.
5. Varietas kedelai yang di gunakan adalah Wilis, Tanggamus, dan Grobogan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Deskripsi Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L) Merr)

Kedelai merupakan salah satu tanaman penting di Indonesia karena memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi dibandingkan jenis tanaman sereal lainya. Kedelai memiliki kandungan protein sebesar 35%, lebih tinggi dibandingkan padi yang hanya sebesar 7%. Selain itu kedelai juga mengandung asam amino seperti metionin, tripsin, dan lisin yang cukup tinggi sehingga dapat diandalkan untuk memenuhi kebutuhan gizi dan bahan pangan bagi manusia (Suprpto, 1997).

##### 2.1.1 Klasifikasi Kedelai

Menurut Steenis (1988), klasifikasi tanaman kedelai dapat ditulis sebagai berikut :

Divisio	Spermatophyta
Sub Devisio	Angiospermae
Kelas	Dicotyledoneae
Ordo	Polypetales
Family	Leguminoseae
Sub Famili	Papilionoidae
Genus	Glycine
Species	<i>Glycine max</i> (L) Merr

##### 2.1.2 Morfologi Kedelai

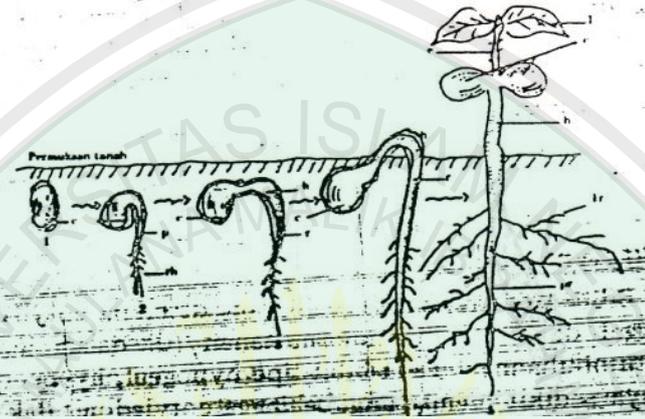
Kedelai merupakan tanaman semusim, berupa perdu, tumbuh tegak berdaun lebat dengan sifat morfologinya yang berperan, tinggi tanaman berkisar antara 10

cm sampai dengan 200 cm, dapat bercabang sedikit atau banyak tergantung dari kultivar dan lingkungan hidup. Batang, daun dan polong ditumbuhi bulu-bulu berwarna abu-abu atau coklat, namun ada juga kultivar yang tidak ditumbuhi bulu (Susila, 2003).

Sistem perakaran kedelai terdiri dari 2 macam, yaitu akar tunggang dan akar sekunder (serabut) yang tumbuh dari akar tunggang. Selain itu, kedelai juga sering membentuk akar adventif yang tumbuh dari bagian bawah hipokotil. Pada umumnya, akar adventif terjadi karena cekaman tertentu, misalnya kadar air yang terlalu tinggi (Adisarwanto, 2005). Pada akar kedelai terdapat bintil-bintil akar, yang merupakan koloni dari bakteri *Rhizobium japonicum*. Pada tanah yang belum pernah ditanami kedelai, bakteri *Rhizobium* dapat mengikat nitrogen dari udara yang kemudian dapat digunakan untuk pertumbuhan tanaman (Sumarno, 1986).

Biji kedelai berkeping dua terbungkus kulit biji dan tidak mengandung jaringan endosperm. Embrio terletak diantara keping biji. Warna kulit biji kuning, hijau atau coklat. Puser biji (hilum) adalah jaringan bekas biji melekat pada dinding buah, berwarna coklat tua, kuning, putih atau hitam. Bentuk biji kedelai pada umumnya bulat lonjong, tetapi ada yang bundar atau bulat agak pipih. Besar biji seragam tergantung pada varietasnya (Sumarno, 1986). Biji kedelai yang kering akan berkecambah bila memperoleh air yang cukup. Kecambah kedelai tergolong epigeous (Gambar 2.1), yaitu keping biji muncul di atas tanah. Warna hipokotil kedelai ungu akan berbunga ungu, sedang yang berhipokotil hijau berbunga putih.

Menurut Nunung (2000), terangkatnya kotiledon ini keatas permukaan tanah disebabkan karena pertumbuhan dan perpanjangan hipokotil, hipokotil membengkok, kemudian menembus dan merekah, lalu muncul kepermukaan.



Gambar 2.1 Tipe perkecambahan epigeal

Urutan tahap pertumbuhan bibit tipe epigeal tanaman kedelai:

1. Biji kedelai, cadangan disimpan pada kotiledon.
2. Radikal keluar, cadangan disimpan pada kotiledon.
3. Hipokotil (bagian antara radikal dan kotiledon) memanjang agak membesar.
4. Hipokotil membengkok karena aktivitas hormon kemudian mengangkat kotiledon keatas permukaan tanah.
5. Radikal tumbuh menjadi akar primer darimana akar lateral keluar, sehingga berbentuk sistem perakaran permanen yang menjadi pertumbuhan dan kehidupan bibit atau tanaman selanjutnya.

Tipe pertumbuhan tanaman kedelai dibedakan menjadi 2 macam yaitu determinate dan indeterminate. Adapun yang dimaksud dengan tipe determinate adalah tipe pertumbuhan tanaman yang ujung batangnya berakhir dengan rangkaian bunga dan batang atau cabang tumbuhnya tidak melilit. Sedangkan yang dimaksud dengan tipe indeterminate adalah tipe pertumbuhan tanaman yang batangnya tidak diakhiri dengan rangkaian bunga sedangkan ujung batangnya melilit (Susila, 2003).

## **2.2 Pertumbuhan *In Vitro***

Pertumbuhan merupakan peristiwa pembelahan dan pembesaran sel. Pertumbuhan menunjukkan suatu proses perubahan secara kuantitatif berupa penambahan jumlah sel, ukuran panjang, lebar serta berat dari organisme yang sedang mengalami pertumbuhan. Tumbuhan mengalami pertumbuhan karena sel-selnya bertambah banyak atau mengalami penambahan panjang karena ada perubahan volume serta berat basah atau berat kering yang merupakan perubahan secara kuantitatif. Parameter pertumbuhan sangat bervariasi dan bersifat kuantitatif (Lukiati, 2001).

Salisbury (1995) menyatakan bahwa pertumbuhan berarti penambahan ukuran. Pertambahan bukan hanya dalam volume, tetapi juga dalam bobot, jumlah sel, banyak protoplasma, dan tingkat kerumitan. Ada dua pengukuran yang lazim digunakan untuk mengukur pertumbuhan volume atau massa. Pertambahan volume (ukuran) ditentukan dengan mengukur perbesaran ke satu atau dua arah,

seperti panjang dan diameter. Pertambahan massa biasanya ditentukan dengan memanen seluruh tumbuhan atau bagian yang diinginkan.

Kultur jaringan adalah istilah umum yang ditujukan pada budidaya secara *in vitro* terhadap berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas dan embrio. Bagian-bagian tersebut yang diistilahkan sebagai eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada medium buatan yang steril sehingga dapat beregenerasi dan berdeferensiasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009). Hartmann (1990) menggunakan istilah yang lebih spesifik, yaitu mikropropagasi terhadap pemanfaatan teknik kultur jaringan dalam upaya perbanyak tanaman, dimulai dari pengkulturan bagian tanaman yang sangat kecil (eksplan) secara aseptik di dalam tabung kultur atau wadah lain yang serupa.

Dua kemungkinan yang terjadi setelah eksplan dikulturkan adalah mengalami pertumbuhan teratur (*organized growth*) dan pertumbuhan tidak teratur (*diorganized growth*). Bentuk-bentuk teratur yang muncul setelah eksplan ditanam pada media kultur nantinya akan berkembang menjadi tunas-tunas kecil yang disebut sebagai tunas aksiler. Kemungkinan lain yang dapat muncul setelah eksplan ditanam pada media kultur adalah mengalami pertumbuhan tidak teratur berupa kumpulan sel yang disebut sebagai kalus (Katuuk, 1989). Wetter dan Constabel (1991) menyebutkan bahwa jaringan dapat dikultur pada media agar padat dan media hara cair. Jaringan yang ditanam dalam media agar padat akan membentuk kalus yaitu massa atau sel yang tidak tertata.

Tunas atau kalus yang muncul pada eksplan setelah dikultur disebut propagul. Propagul dapat dikembangkan menjadi banyak propagul lagi. Proses multiplikasi ini memungkinkan menghasilkan propagul yang dapat langsung berakar dan akhirnya menjadi satu tanaman. Tanaman steril yang baru yang sudah mempunyai akar dan sistem pertumbuhan vegetasi (tunas) dihasilkan dari eksplan disebut dengan planlet (Katuuk, 1989).

Pembentukan organ adventif (tunas dan embriosomatik) secara langsung dapat dihasilkan dari eksplan. Multiplikasi jenis ini diawali dengan terbentuknya organ adventif atau organ palsu yang tumbuh bukan pada tempat semestinya. Tunas yang muncul berasal dari jaringan tanaman. Bagian tanaman yang dapat dikultur yang nantinya akan menghasilkan tunas adalah batang, umbi, rizoma, hipokotiledon maupun kotiledon (Katuuk, 1989).

Pembentukan organ adventif disebut dengan organogenesis. Tunas adventif yang terbentuk adalah kalus yang muncul langsung dari eksplan bukan tunas muncul dari kalus. Pembentukan organ adventif (tunas dan embriosomatik) secara tidak langsung berdiferensiasi tetapi membentuk sel yang belum teratur fungsinya yaitu kalus (Katuuk, 1989). Jadi kalus adalah suatu kumpulan sel amorf yang terjadi dari sel-sel yang membelah diri secara terus menerus secara *in vitro*. Kalus dapat diperoleh dari bagian tanaman seperti akar, batang, dan daun. Bila kalus ini mengalami regenerasi maka akan terbentuk tunas dan akar yang akhirnya akan terbentuk tanaman lengkap (Winata, 1992).

Penerapan kultur jaringan tumbuhan mempunyai beberapa keuntungan, antara lain (a) dapat dibentuk senyawa bioaktif, (b) bebas dari kontaminasi

mikroba, (c) setiap sel dapat diperbanyak untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder tertentu, (d) pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional, (e) tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim dan musim (Fitriani, 2003).

### **2.2.1 Faktor-Faktor Yang Menentukan Keberhasilan Kultur *In Vitro***

Menurut Street (1972), keberhasilan dari kultur jaringan ditentukan oleh berbagai faktor seperti pemilihan eksplan, keadaan yang steril, kecukupan nutrisi dan pengaruh faktor lingkungan.

#### **a. Eksplan**

Eksplan adalah bagian tanaman (dapat berupa sel, jaringan atau organ) yang digunakan sebagai bahan inokulum awal yang ditanam dalam media kultur *in vitro*. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan sebaiknya merupakan bagian yang mempunyai sel aktif membelah, berasal dari tanaman induk yang sehat dan berkualitas tinggi. Meskipun pada prinsipnya semua sel dapat ditumbuhkan, tetapi sebaiknya eksplan dipilih dari bagian tanaman yang masih muda, yaitu daun muda, ujung akar, ujung batang, keping biji atau tunas (Ambarwati, 1987). Menurut George dan Sherrington (1984), ukuran eksplan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan eksplan *in vitro*. Apabila eksplan terlalu kecil menyebabkan ketahanan eksplan yang kurang baik dalam kultur dan apabila eksplan terlalu besar, akan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme.

#### **b. Medium**

Komposisi media kultur sangat berpengaruh terhadap proses pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditanam secara *in vitro*. Medium yang digunakan

sebagai sumber makanan adalah senyawa organik dan anorganik yang diperlukan untuk pertumbuhan eksplan. Media kultur yang memenuhi syarat adalah media yang mengandung nutrient makro dan nutrient mikro dalam kadar dan perbandingan tertentu, sumber tenaga, air, asam amino, vitamin, zat pengatur tumbuh. Kadang-kadang diperlukan penambahan zat lain seperti yeast, ekstrak malt, atau cairan tanaman sebagai zat perangsang pertumbuhan (Wetherell, 1982).

Hendaryono dan Wijayani (1994) menyebutkan bahwa media padat digunakan untuk tujuan mendapatkan kalus (induksi kalus), dan kemudian dengan medium deferensiasi yang berguna untuk menumbuhkan akar serta tunas, sehingga kalus dapat menjadi planlet. Media padat adalah media yang mengandung semua komponen kimia yang dibutuhkan oleh tanaman dan dipadatkan dengan menambahkan zat pematat, yang dapat berupa agar-agar batang, agar-agar bubuk, atau agar-agar dalam kemasan kaleng yang memang khusus digunakan untuk keperluan laboratorium.

### **2.2.3 Zat Pengatur Tumbuh Auksin**

Menurut Abidin (1983), auksin adalah salah satu hormon tumbuh yang tidak terlepas dari proses pertumbuhan dan perkembangan. Pembesaran sel dapat diatur oleh auksin, giberelin, sitokinin dan beberapa zat penghambat, di alam stimulasi auksin pada organ pucuk suatu tanaman. Auksin (NAA, IAA, IBA, dan auksin lainnya) berperan pada berbagai aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman antara lain :

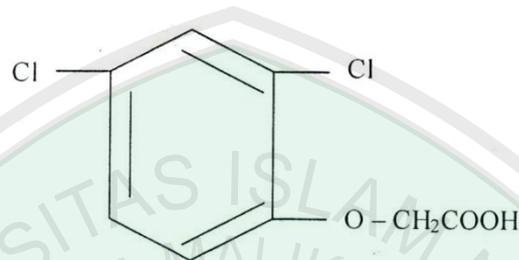
1. Perkembangan mata tunas samping, pertumbuhan dari tunas mata samping dihambat oleh IAA yang diproduksi pada meristem apikal

yang diangkut secara basipetal. Konsentrasi auksin yang tinggi akan menghambat pertumbuhan mata tunas tersebut. Jika sumber auksin dihilangkan dengan jalan memotong meristem apical maka tunas samping akan tumbuh menjadi tunas.

2. Absisi (pengguguran daun), adalah suatu proses secara alami terjadinya pemisahan bagian/organ tanaman dari tanaman. Konsentrasi auksin yang tinggi akan menghambat proses absisi.
3. Aktifitas dari cambium, pembelahan sel-sel didaerah cambium dirangsang oleh IAA.
4. Pertumbuhan akar, auksin sintetis (NAA) mempunyai aktifitas biologis seperti IAA digunakan sebagai hormone akar (Abidin, 1983).
5. Menurut Leopold dan Kriederman (1983), dalam Baswarsiaty dan Husen (1998) menyebutkan bahwa auksin berperan terhadap pengembangan sel, dormansi pucuk pertumbuhan akar, pembentukan kalus, respirasi dan sebagainya. Hendaryono dan Wijayanti (1994), mengemukakan golongan auksin yang sering ditambahkan dalam medium adalah : 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4 D), Indol Asam Asetat (IAA), Naftalen Asam Asetat (NAA), Indole Butirik Asetat (IBA).

Pembentukan kalus embrionik dari kultur antera padi juga dipengaruhi oleh komposisi hormone tumbuh dalam media. Kalus dengan media yang mengandung kombinasi hormone NAA dan Kinetin atau 2,4 D dan Kinetin menghasilkan kalus embrionik yang mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi embrio

somatic yang dapat berkembang menjadi tanaman. penambahan auksin NAA ke dalam medium ternyata dapat lebih meningkatkan aktifitas dalam melakukan proses deferensiasi (Ishak, 1997).



Gambar 2.2 Struktur Kimia 2,4-D

Pemakaian zat pengatur tumbuh asam 2,4-D biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat, antara 2 – 4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Sebab pada suatu dosis tertentu asam 2,4-D sanggup membuat mutasi-mutasi (Suryowinoto, 1996). Menurut Wattimena (1988) asam 2,4-D mempunyai sifat fitotoksitas yang tinggi sehingga dapat bersifat herbisida. Hasil penelitian tentang pertumbuhan kalus pada *Daucus carota* menunjukkan bahwa untuk pembentukan kalus diperlukan auksin asam 2,4-D 1 mg/l (Ammirata, 1983). Litz (1986), menggunakan asam 2,4-D antara 1-2 mg/l sebagai zat pengatur tumbuh pada *Mangifera indica*.

### 2.3 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang memiliki karakteristik khusus untuk setiap makhluk hidup dan dibentuk melalui jalur khusus dari metabolit primer seperti karbohidrat, lemak, asam amino. Metabolit sekunder dibentuk untuk meningkatkan pertahanan diri (Herbert, 1995), dan juga merupakan sumber senyawa yang mempunyai aktivasi farmatikal yang penting (Rao, 2002). Senyawa ini tidak berpengaruh langsung terhadap pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan itu sendiri. Senyawa metabolit sekunder tidak berperan dalam mengarahkan fotosintesis, respirasi, pengangkutan, translokasi, sintesis protein, asimilasi nutrisi, pembentukan karbohidrat, protein dan lemak (Taiz dan Zeigler, 2002). Sebagian ahli mengatakan bahwa metabolit sekunder mempunyai peran ekologis di dalam tubuh tumbuhan diantaranya yaitu :

- a. Melindungi tumbuhan dari serangan herbivora dan infeksi oleh mikroba patogen.
- b. Metabolit dapat bertindak sebagai pollinator pada benih yang penyerbukannya dibantu oleh binatang.

Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, senyawa metabolit sekunder dapat juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidup. Menurut Rahmawati (1999) dalam Palupi *dkk* (2004), sebelum inisiasi kultur jaringan, terjadi 3 fase, 1) fase penyesuaian, fase 2) fase pembelahan sel, fase 3) fase stasioner (fase dimana tidak ada lagi pertumbuhan). Senyawa metabolit sekunder biasanya terbentuk pada fase stasioner, sebagai akibat

keterbatasan nutrien dalam medium akan merangsang dihasilkannya enzim–enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan kelangsungan hidup.

Metabolit sekunder tanaman dibedakan menjadi 3 golongan berdasarkan kimiawinya, satu diantaranya yaitu senyawa fenol. Tumbuhan memproduksi banyak variasi dari metabolit sekunder yang termasuk golongan fenol suatu kelompok hidroksil yang berfungsi pada cincin aromatik. Senyawa fenol membantu tanaman dalam melawan serangan herbivora dan patogen. Selain itu senyawa fenol mampu menarik serangga penyerbuk dan menyerap radiasi sinar ultraviolet yang sangat berbahaya. Biosintesis senyawa fenol pada tumbuhan melewati jalur yang berbeda dengan metabolisme, dengan dibantu oleh adanya asam sikimit. Asam sikimit membentuk asam fenilalanin. Asam ini akan membantu biosintesis senyawa fenol menjadi beberapa turunannya yakni : Antosianin dan flavon, dari senyawa flavon akan terbentuk senyawa isoflavon (Taiz dan Zeigler, 2002).

Sintesis metabolit sekunder merupakan salah satu fungsi protektif tanaman ketika ada beberapa patogen dengan meningkatkan fitoaleksin. Mekanisme pertahanan tanaman meliputi: 1) deteksi sinyal patogen, 2) aktivasi  $H^+$ -ATPase, 3) peningkatan aliran kalsium ke dalam sel, 4) aktivasi CDPK (*calcium strep dependent proteinkinase*), 5) aktivasi NADPH oksidase. Radikal oksigen yang aktif dihasilkan oleh NADPH oksidase yang akan mengaktifkan MAP kinase sehingga terjadi peningkatan tingkat ekspresi gen biosintesis metabolit sekunder (Bulgakov *dkk*, 2003).

## 2.4 Produksi Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan

Salah satu strategi untuk meningkatkan metabolit sekunder adalah melalui teknik kultur jaringan. Teknik ini merupakan teknik mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, dan bagian lainnya lalu menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan yang kaya akan nutrisi dan zat pengatur tumbuh secara aseptik dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap (Herbert, 1995). Sel tumbuhan memiliki totipotensi, yaitu apabila sel tersebut diletakkan pada lingkungan yang sesuai akan dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Chawla, 2002).

Kultur jaringan dapat digunakan sebagai sarana penghasil metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena metabolit sekunder merupakan hasil dari proses-proses biokimia yang terjadi dalam tubuh tanaman, sedangkan proses tersebut juga terjadi pada kultur jaringan. Senyawa ini terdapat pada kalus atau bagian yang lain, misalnya akar (Dalimonthe, 1987 dalam Parti, 2004). Menurut Hendaryono dan Ari (1994) metabolit yang dihasilkan dari kalus ternyata juga memiliki kadar yang lebih tinggi daripada dengan cara biasa (langsung dari tanaman).

Menurut Amini, *dkk* (1987) dalam Parti (2004), penggunaan metode kultur jaringan untuk menghasilkan metabolit sekunder memiliki beberapa keuntungan antara lain :

- a. Metabolit sekunder dapat langsung diambil dari kalus atau suspensi sel sehingga tidak perlu dari tanaman asal.

- b. Waktu yang diperlukan untuk memperoleh metabolit sekunder dalam kultur jaringan lebih singkat.
- c. Kadar metabolit sekunder dalam kultur jaringan dapat ditingkatkan dengan beberapa cara antara lain penambahan zat pengatur tumbuh ke dalam media, memakai media lain yang lebih sesuai atau mengubah komponen media.

Kultur jaringan tumbuhan terdiri dari sejumlah teknik untuk menumbuhkan organ, jaringan, dan sel tanaman. Jaringan dapat dikulturkan pada agar padat atau dalam medium hara cair. Jika ditanam dalam agar, jaringan akan membentuk kalus, yaitu massa atau sel-sel yang tak teratur (Wetter dan Constabel, 1991).

Kalus dapat dipergunakan untuk berbagai tujuan diantaranya adalah untuk bahan kultur suspensi, regenerasi tumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder dapat lebih tinggi dibandingkan tanaman induknya (Santoso dan Nursandi, 2001 *dalam* Parti, 2004). Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, banyak metabolit sekunder yang dapat dihasilkan melalui kultur jaringan, beberapa metabolit sekunder dapat dilihat pada tabel sebagai berikut :

Tabel 2.1 Beberapa metabolit sekunder yang ditemukan pada kultur jaringan tumbuhan

No	Jenis Tanaman	Senyawa Metabolit Sekunder
1.	Tembakau	Asam ferolat, skopoletin dan nikotin
2.	Terong	Solasodin dan asam kloropenat
3.	Teh	Katekin, epikatekin, dan leukoanthosianin
4.	Bunga matahari	Kolesterol
5.	Tomat	Tomatin
6.	Kina	Quinine dan quinidin
7.	Datural stranonium	Skopolanin
8.	Coklat	Theobronin
9.	Ganja	Tetrahydroconabinol

Sumber : Butcher (1997), Yuele hsing *et all* (1983), Yumanda (1986).

## 2.5 Senyawa Isoflavon

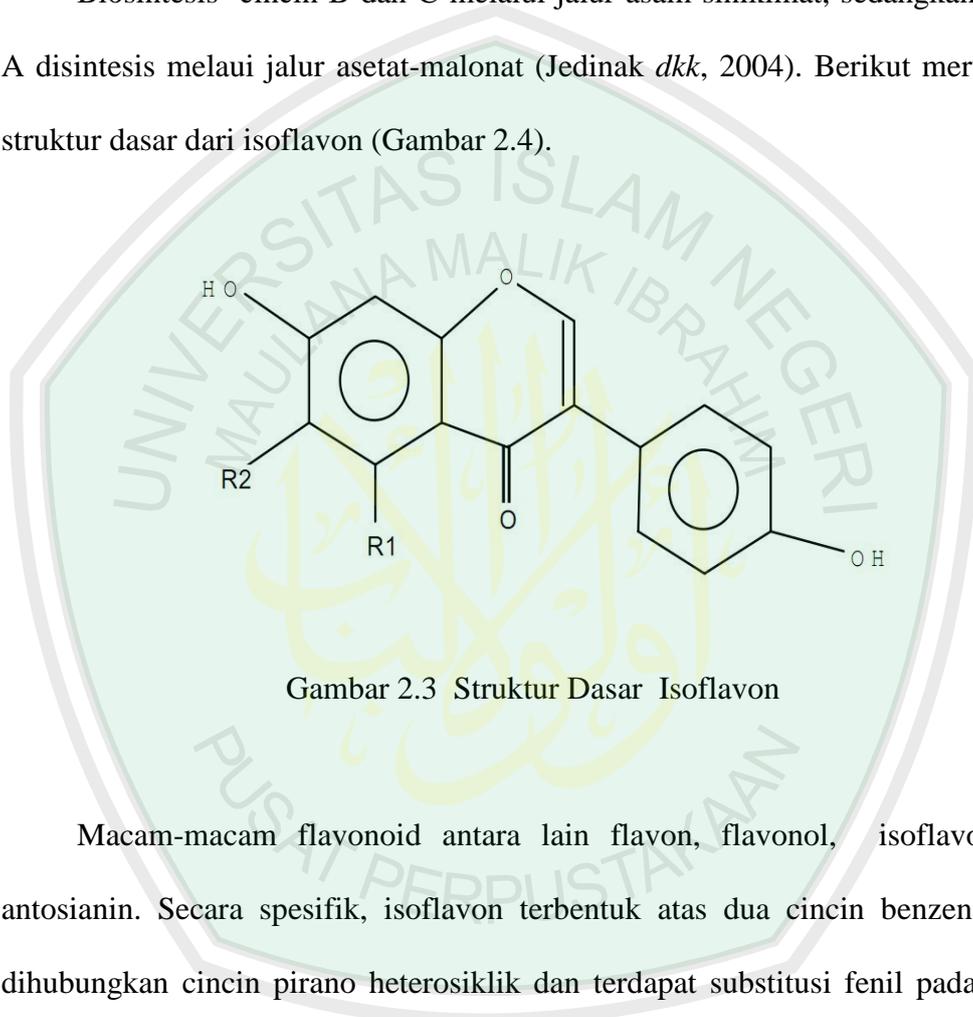
Isoflavon tergolong kelompok flavonoid, senyawa polifenolik yang banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayur-sayuran, dan biji-bijian (Yulinato, 2006). Senyawa isoflavon merupakan salah satu komponen yang juga mengalami metabolisme. Senyawa isoflavon ini pada kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O- glikosidik. Selama proses fermentasi, ikatan -O- glikosidik terhidrolisis, sehingga dibebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon yang bebas. Senyawa isoflavon aglikon ini dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa transforman baru. Hasil transformasi lebih lanjut dari senyawa aglikon ini justru menghasilkan senyawa-senyawa yang mempunyai aktifitas biologi lebih tinggi.

Flavonoid merupakan kelompok terbesar penyusun senyawa fenol. Karakteristik flavonoid terdapat pada susunan rantai karbon C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> dan terdiri

atas struktur tiga cincin, yaitu cincin A, B, dan C. Pada isoflavon cincin A dan B dihubungkan oleh tiga unit karbon, serta dihubungkan oleh oksigen pada cincin C

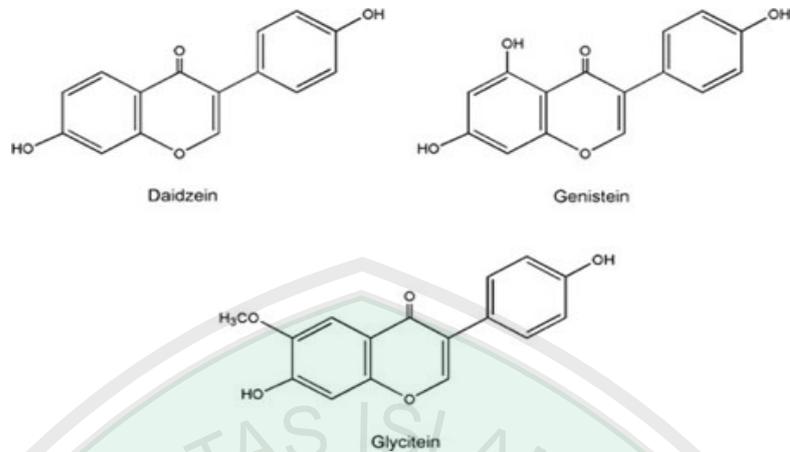
### 2.5.1 Struktur dan Biosintesis Isoflavon

Biosintesis cincin B dan C melalui jalur asam sinikimat, sedangkan cincin A disintesis melalui jalur asetat-malonat (Jedinak *dkk*, 2004). Berikut merupakan struktur dasar dari isoflavon (Gambar 2.4).



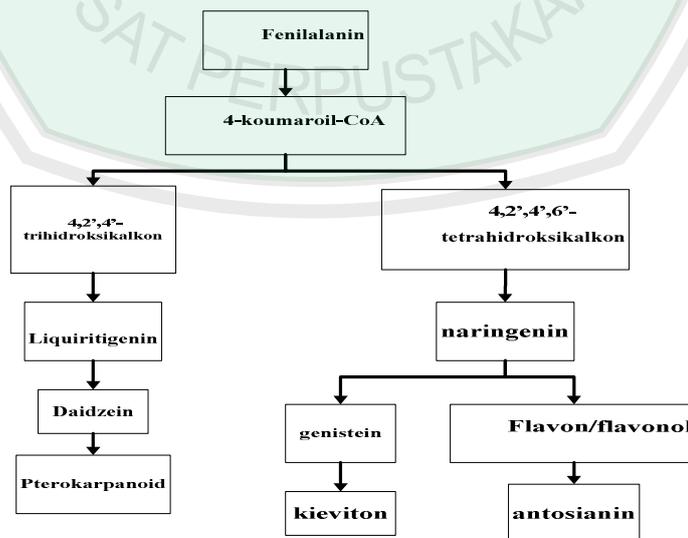
Gambar 2.3 Struktur Dasar Isoflavon

Macam-macam flavonoid antara lain flavon, flavonol, isoflavon dan antosianin. Secara spesifik, isoflavon terbentuk atas dua cincin benzena yang dihubungkan cincin pirano heterosiklik dan terdapat substitusi fenil pada posisi tiga cincin pirano (Bhat *dkk*, 2005). Satu gugus hidroksi dapat dijumpai pada tiap cincin benzena. Isoflavon terdiri atas daidzein, genistein, dan glisitein (Chen dan Anderson, 2002).



Gambar 2.4 Struktur Isoflavon daidzein dan genistein (Chen dan Anderson, 2002)

Daidzein dan genistein bersifat larut dalam air dan dapat diekstrak dengan pelarut yang polar seperti butanol, methanol, dll. Sedangkan aglikolnya yaitu daidzein dan genistein bersifat tidak larut dalam air dan dapat diekstrak dengan pelarut non polar seperti eter, kloroform, atau etil asetat (Health, 2003). Adapun skema biosintesis isoflavon adalah sebagai berikut



Gambar 2.5 Jalur-jalur biosintesis isoflavon (Dixon and Paiva, 1995)

Biosintesis isoflavon diawali dari pembentukan fenilalanin sebagai prekursor utamanya yang dihasilkan dari asam shikimat, kemudian akan membentuk cincin B aromatic yang terikat pada rangkaian 3 atom karbon melalui jalur shikimat (Durango, *et.al.* 2002). Deaminasi enzimatis yang dikatalis oleh FAL terjadi dengan hilangnya gugus amina dan pro-hidrogen-S dari asam amino tersebut sehingga menghasilkan trans-sinamat sebagai prekursor cincin B. asam trans sinamat diubah menjadi kumarat melalui hidroksilasi dan kondensasi p-kumaril koenzim A dengan tiga molekul molekul malonil koenzim A( unit asetat). Reaksi ini dikatalis oleh enzim kalkon sintase (*chalkon synthase/CHS*) dan menghasilkan kalkon. Kalkon merupakan senyawa intermediet biosintesis isoflavon. Kalkon dapat menjadi genistein maupun daidzein. Kalkon mengalami reaksi isomerasi menjadi naringenin (5,7,4-trihidroksiflavonon), yang selanjutnya menjadi genistein dengan katalis isoflavon sintase. Kalkon juga dapat mengalami reduksi menjadi isoliquiritigenin (4,2,4-trihidroksikalkon), yang selanjutnya mengalami perubahan struktur dengan katalis enzim kalkon isomerase menjadi liquiritigenin (7,4- dihiroksiflavonon), yang akhirnya menghasilkan daidzein (Bhat *et al*, 2005).

### **2.5.2 Manfaat Isoflavon**

Isoflavon dikenal sebagai fitoestrogen yang memiliki sifat estrogenik (Winarsi, 2005). Menurut Hernawati (2001) Jenis senyawa isoflavon di alam sangat bervariasi. Diantaranya telah berhasil diidentifikasi struktur kimianya dan diketahui fungsi fisiologisnya, serta telah dapat dimanfaatkan untuk obat-

obatan. Berbagai potensi senyawa isoflavon untuk keperluan kesehatan antara lain:

a. Anti-inflamasi

Mekanisme anti-inflamasi menurut Loggia *et al.* (1986), terjadi melalui efek penghambatan jalur metabolisme asam arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamin, atau aktivitas „radical scavenging’ suatu molekul. Melalui mekanisme tersebut, sel lebih terlindung dari pengaruh negatif, sehingga dapat meningkatkan viabilitas sel.

b. Anti-tumor/Anti-kanker

Senyawa isoflavon yang berpotensi sebagai antitumor/antikanker adalah genistein yang merupakan isoflavon aglikon (bebas). Genistein merupakan salah satu komponen yang banyak terdapat pada kedelai dan tempe.

c. Anti-virus

Senyawa flavonoida tersebut berpotensi untuk penyembuhan pada penyakit demam yang disebabkan oleh *Rhinovirus*, yaitu dengan cara pemberian intravena dan juga terhadap penyakit hepatitis B.

d. Anti-alergi

Aktivitas anti-alergi bekerja melalui mekanisme sebagai berikut : (1) penghambatan pembebasan histamin dari sel-sel mast, yaitu sel yang mengandung granula, histamin, serotonin, dan heparin; (2) penghambatan pada enzim oksidatif nukleosid-3',5' siklik monofosfat fosfodiesterase, fosfatase, alkalin, dan penyerapan Ca<sup>2+</sup> berinteraksi dengan pembentukan fosfoprotein.

e. Penyakit kardiovaskuler

Isoflavon pada tempe yang aktif sebagai antioksidan, yaitu 6,7,4-trihidroksi isoflavon (Faktor-II), terbukti berpotensi sebagai anti kotriksi pembuluh darah (konsentrasi 5µg/ml) dan juga berpotensi menghambat pembentukan LDL (low density lipoprotein). Dengan demikian isoflavon dapat mengurangi terjadinya arterosclerosis pada pembuluh darah.

f. Estrogen dan Osteoporosis

Senyawa isoflavon terbukti mempunyai efek hormonal, khususnya efek estrogenik. Efek estrogenik ini terkait dengan struktur isoflavon yang dapat ditransformasikan menjadi equol. Dimana equol mempunyai struktur fenolik yang mirip dengan hormon estrogen. Mengingat hormon estrogen berpengaruh pula terhadap metabolisme tulang, terutama proses kalsifikasi, maka adanya isoflavon yang bersifat estrogenik dapat berpengaruh terhadap berlangsungnya proses kalsifikasi. Isoflavon juga dapat melindungi proses osteoporosis pada tulang sehingga tulang tetap kuat.

g. Anti kolesterol

Mekanisme penurunan kolesterol oleh isoflavon dijelaskan melalui pengaruh peningkatan katabolisme sel lemak untuk pembentukan energi yang berakibat pada penurunan kandungan kolesterol.

## **2.6 Produksi Metabolit Sekunder Pada Kondisi Cekaman Kekeringan**

Cekaman didefinisikan sebagai faktor eksternal yang dapat memberikan pengaruh yang kurang menguntungkan pada tanaman (Taiz & Zeiger 1991).

Salah satu bentuk cekaman tersebut dapat disebabkan oleh faktor lingkungan seperti kekeringan. Kekeringan dapat menjadi faktor pembatas pertumbuhan dan produktivitas suatu tanaman dan akan berpengaruh terhadap respons fisiologi, biokimia dan molekuler tanaman (Kalefetoğlu & Ekmekçi 2005). Cekaman kekeringan dapat berakibat pada penurunan laju transpirasi serta penurunan potensial air dalam jaringan tanaman (Yordanov *et al* 2003). Selain itu, cekaman kekeringan juga dapat menyebabkan terjadinya akumulasi asam absisat (ABA) yang akan menstimulasi penutupan stomata sehingga akan mengurangi ketersediaan CO<sub>2</sub> untuk fotosintesis (Taiz & Zeiger 1991).

Penurunan CO<sub>2</sub> dapat menyebabkan terjadinya gangguan pada reaksi fotosintesis. Hal ini akan mengakibatkan terbentuknya reactive oxygen species (ROS) pada tingkat seluler yang akan mengarah pada terjadinya kerusakan oksidatif dan fotoinhibisi (Kalefetoğlu & Ekmekçi 2005). ROS merupakan molekul oksigen yang sangat reaktif seperti superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oksigen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), dan radikal hidroksida (OH<sup>-</sup>) yang berperan dalam peroksidasi lipid dan kerusakan membran yang akan mengarah pada percepatan proses senescens (Prochazkova *et al*, 2001).

Selain itu, cekaman kekeringan mungkin juga dapat menginduksi cekaman oksidatif (Borsani *et al*, 2001; Iturbe-Ormaetxe *et al*, 1998). Cekaman oksidatif merupakan suatu kondisi saat lingkungan seluler mengalami peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat over-reduksi dari sistem cahaya fotosintesis karena senyawa reduktan yang tidak termanfaatkan akibat terhambatnya CO<sub>2</sub> selama cekaman kekeringan, cekaman

suhu, intensitas cahaya yang tinggi dan polusi (Borsani *et al.* 2001).

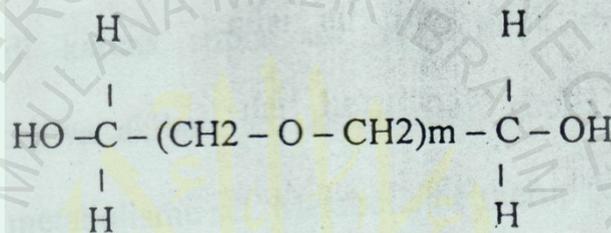
Tanaman mempunyai toleransi yang berbeda terhadap stres kekeringan karena perbedaan dalam mekanisme morfologi, fisiologi, biokimia dan molekuler (Perez-Molphe- Balch *et al.* (1996) dalam Abdulkadir (2006)). Tanaman dapat menahan cekaman air karena protoplasma mempunyai toleransi dehidrasi, sehingga terjadinya dehidrasi tidak menyebabkan kerusakan yang permanen. Saat dehidrasi viskositas protoplasma meningkat, maka jika dehidrasi terus berlanjut akan terjadi pengerasan, kaku dan rapuh pada protoplasma (Gupta, 1995).

Akibat dari kekurangan suplai air menyebabkan terganggunya metabolisme sel. Metabolisme merupakan reaksi kimia yang terjadi didalam sel yang melibatkan enzim. Metabolisme tersebut berupa reaksi penyusunan (anabolisme) dan reaksi penguraian (katabolisme). Metabolisme sel dilakukan untuk memperoleh energi, menyimpan energi, menyusun bahan makanan, merombak bahan makanan, membentuk struktur sel, merombak struktur sel, memasukkan atau mengeluarkan zat-zat, melakukan gerakan, menanggapi rangsangan dan bereproduksi (Lakitan, 2004). Islami dan Utomo (1995) menambahkan bahwa cekaman kekeringan akan menyebabkan terjadinya perubahan anatomi dan morfologi tanaman. Cekaman kekeringan juga mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sel melalui pengaruhnya pada pembelahan sel, pertumbuhan sel dan protoplasma.

Menurut Utomo dkk (2009) faktor cekaman dapat memicu dibentuknya senyawa-senyawa turunan isoflavon bila ditemukan senyawa daidzein dan genistein pada suatu jaringan tanaman.

## 2.7 PEG (*Polyethylene Glykol*) 6000

*Polyethylene Glykol* merupakan senyawa yang stabil, non ionic, polymer panjang yang larut dalam air dan dapat digunakan dalam sebaran bobot molekul yang luas. Polietilena glikol juga merupakan satu jenis osmotikum yang biasa digunakan untuk mensimulasi kondisi kekeringan, karena sifatnya yang dapat menghambat penyerapan air oleh sel atau jaringan tanaman (Lawyer, 1970).



Gambar 2.6 Struktur Kimia PEG (*Polyethylene glycol*)

Adapun ciri-ciri PEG menurut Haris (1997) yaitu akan menjadi kental jika dilarutkan, tidak berwarna, dan berbentuk kristal putih. PEG juga disebut sebagai polyethyleneoxide (PEO), polyoxyethylene (POE) dan polyoxirane. PEG memiliki sifat-sifat diantaranya : 1) larut dalam air, 2) tidak larut dalam ethyl eter, hexane, dan ethylene glikol, 3) tidak larut dalam air yang memiliki suhu tinggi, 4) tidak beracun, 5) dan digunakan sebagai agen seleksi sifat ketahanan gen terutama gen toleran terhadap kekeringan.

Polietilena oksida atau sering disebut polietilena glikol (PEG) adalah non ionik, polimer yang larut dalam air, secara luas digunakan sebagai koloid penstabil dalam makanan, cat dan dalam formula obat-obatan dan kosmetika (Golander, 1992 dalam Rita, 2005). Senyawa PEG bersifat larut dalam air dan

menyebabkan penurunan potensial air. Besarnya penurunan air sangat bergantung pada konsentrasi dan berat molekul PEG. Keadaan seperti ini dimanfaatkan untuk simulasi penurunan potensial air. Potensial air dalam media yang mengandung PEG dapat digunakan untuk meniru besarnya potensial air tanah (Michel and Kaufman, 1973).

Agen penyeleksi yang digunakan untuk mencari varietas yang toleran terhadap kekeringan adalah senyawa osmotikum. Senyawa osmotikum yang banyak digunakan untuk mensimulasi cekaman kekeringan akhir-akhir ini adalah *polietilena glikol* (PEG) (Santos dan Ochoa, 1994 dalam Sutrahjo, 2007). Mexal (1975) menambahkan bahwa PEG dengan berat molekul 6000 dipilih karena mampu bekerja lebih baik pada tanaman daripada PEG dengan berat molekul yang lebih rendah. Konsentrasi PEG antara 0%, 5%, 10%, 15%, dan 20% masing-masing setara dengan potensial osmotik 0, -0,03; -0,19; -0,41 dan -0,67.

## **2.8 Ekstraksi Dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dengan Kromatografi Kolom**

Ekstraksi adalah salah satu metode pemisahan senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Brian, 1989). Isoflavon merupakan senyawa yang larut dalam air, sehingga dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap berada dalam lapisan air setelah ekstrak dikocok dengan eter. Flavonoid merupakan senyawa fenol, sehingga bila ditambah basa atau amonia dapat dengan mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan (Harborne, 1987). Pelarut

terbaik yang dapat dipergunakan untuk ekstraksi isoflavon adalah metanol (Filago, 2002 dalam Sukmaningrum, 2006).

Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase stasioner dan cairan (pereaksi) sebagai fase mobil untuk mengetahui banyaknya komponen contoh yang keluar melalui kolom (Adnan, 1997). Pengisian kolom dilakukan dengan memasukkan adsorben dalam bentuk larutan (slurry), dan partikelnya dibiarkan mengendap. Berikut ini merupakan alat yang digunakan dalam kromatografi kolom (Gambar 2.7).



Gambar 2.7 Alat Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom atau tabung merupakan salah satu jenis pemisahan dengan menggunakan prinsip aliran zat cair (pelarut) yang dipengaruhi oleh gaya tarik bumi (gravitasi bumi) atau dikenal dengan sistem bertekanan rendah

biasanya terbuat dari kaca yang dilengkapi keran jenis tertentu pada bagian bawahnya untuk mengatur aliran pelarut (Gritter, 1991) . Pada isolasi flavonoida sebaiknya digunakan kolom skala besar karena hal ini dapat meningkatkan proses pemisahan yang baik. Pada dasarnya cara ini meliputi penempatan campuran flavonoida (berupa larutan) di atas kolom yang berisi serbuk penyerap (seperti selulose, silika, atau poliamida), dilanjutkan dengan elusi beruntun setiap komponen memakai pelarut yang cocok. Kolom yang digunakan umumnya terbuat dari kaca yang dilengkapi dengan keran pada salah satu ujung, dan ukurannya sedemikian rupa sehingga nisbah garis tengah terhadap panjang kolom dalam rentang 1:10 sampai 1:30. Kemasan kolom harus dipilih dari jenis yang dipasarkan khusus untuk kromatografi kolom karena ukuran partikel penting. Jika ukuran partikel terlalu kecil, laju aliran pengelusi mungkin terlalu lambat, sedangkan bila terlalu besar, mungkin pemisahan komponen secara kromatografi tidak baik. Kemasan niaga biasanya dalam ukuran 100-300 mesh (Markham, 1988).

## **2. 9 Tumbuhan Sebagai Obat Dalam Prespektif Islam**

Alqur'an adalah kitab suci yang diturunkan Allah Swt, Sebagai kitab suci terakhir, Alqur'an bagaikan miniatur alam raya yang memuat segala disiplin ilmu, Alqur'an merupakan karya Allah SWT yang Agung dan bacaan mulia serta dapat dituntut kebenarannya oleh siapa saja, sekalipun akan menghadapi tantangan

kemajuan ilmu pengetahuan yang semakin canggih (*sophisticated*). Allah berfirman dalam Q.S Ibrahim ayat 52 :

هَذَا بَلَّغٌ لِلنَّاسِ وَلِيُنذِرُوا بِهِ ۗ وَيَلْعَلُمُوا أَنَّمَا هُوَ إِلَهُهُ وَاحِدٌ وَلِيَذَّكَّرُ أُولُو الْأَلْبَابِ

*Artinya : (Al Quran) ini adalah penjelasan yang sempurna bagi manusia, dan supaya mereka diberi peringatan dengan-Nya, dan supaya mereka mengetahui bahwasanya Dia adalah Tuhan yang Maha Esa dan agar orang-orang yang berakal mengambil pelajaran (Q.S Ibrahim ayat 52).*

Alqur'an bukan hanya petunjuk bagi orang-orang yang bertaqwa, tetapi juga petunjuk bagi orang-orang yang berakal yang mau menggunakan akal pikirannya untuk mempelajari segala sesuatu yang telah Allah SWT ciptakan diseluruh jagad raya. Allah SWT telah menciptakan segala macam yang ada di bumi ini termasuk tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam, yang masing masing diantaranya mempunyai manfaat bagi makhluknya. Tumbuhan yang baik dalam hal ini adalah tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup, termasuk tumbuhan berpotensi sebagai obat. Tumbuhan yang bermacam - macam jenisnya dapat digunakan sebagai obat berbagai penyakit, hal ini merupakan anugrah Allah SWT yang harus dipelajari dan dimanfaatkan. Keragaman jenis tumbuhan menjadikan tumbuhan memiliki berbagai potensi yang berbeda satu sama lain. Seperti yang dijelaskan pada ayat dibawah ini.

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا مَخْرُجًا مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِن طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ

مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۚ أَنْظُرُوا إِلَىٰ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۚ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ



Artinya : "Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman"(QS.Al-An'aam: 99).

Firman Allah SWT dalam surat Al-An'am ayat 99 yang artinya ...*Kami menumbuhkan darinya kebun-kebun kurma, zaitun dan delima, ada yang serupa dan tidak serupa*", menjelaskan bahwa Allah menciptakan beragam jenis buah. Setiap jenis buah memiliki rasa dan harum tersendiri meskipun semuanya tumbuh di tanah yang sama. Selain itu, buah-buahan dan sayur-sayuran juga merupakan sumber-sumber vitamin dan nutrisi esensial yang melimpah. Allah SWT menutup surat Al-An'am ayat 99 dengan firman-Nya ...*sesungguhnya pada demikian itu, terdapat tanda-tanda yang nyata bagi orang-orang yang beriman*,.. karena orang-orang yang beriman itu hidup, bekerja, berfikir dan memahami sehingga untuk mendapatkan bukti dari ayat tersebut yang dapat menunjukkan kepada mereka kepada perbuatan mengesakan Allah SWT (Al-Jazairi, 2007).

Tafsir Muyassar menjelaskan tentang kandungan surat Al-An'am ayat 99 bahwasannya hanya Allah semata yang menumbuhkan setiap tumbuhan hijau dalam air hujan dan mengeluarkan setiap yang tertanam. Kemudian mengeluarkan

biji yang bersusun dari tanaman itu, sebagiannya di atas sebagian yang lain. Setiap biji ditata sedemikian rupa dengan bijinya dalam keindahan yang menakjubkan dan ciptaan yang mantap. Allah SWT mengeluarkan kurma basah yang indah lagi mudah dipetik, nikmat rasanya, indah warnanya, bertata seperti permata, manis seperti madu dari mayang kurma. Dengan air, Allah SWT menumbuhkan kebun-kebun anggur, zaitun dan delima yang beraneka warna yang menakjubkan cita rasa yang bervariasi. Semua itu menunjukkan kebijaksanaan Allah yang merancang-Nya, kekuasaannya-Nya Yang membuatnya. Meskipun warna-warna tidak jauh berbeda, namun rasanya bervariasi. Terkadang, ada yang sama dalam sebagian bentuk, namun rasa dan warnanya berbeda (Al-Qarni, 2008). Banyak diantara tanaman yang sudah dijelaskan dalam Al Qur'an bermanfaat untuk pengobatan, diantaranya yaitu :

- a. Anggur, keutamaan buah anggur dijelaskan Firman Allah SWT Q.S An-Nahl ayat 67:

وَمِنْ ثَمَرَاتِ النَّخِيلِ وَالْأَعْنَابِ تَتَّخِذُونَ مِنْهُ سَكَرًا وَرِزْقًا حَسَنًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ

يَعْقِلُونَ ﴿٦٧﴾

*Artinya : Dan dari buah korma dan anggur, kamu buat minuman yang memabukkan dan rezki yang baik. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang memikirkan (Q.S An-Nahl: 67).*

Anggur termasuk buah-buahan yang terbaik dan paling banyak kegunaannya, bisa dimakan dalam keadaan kering maupun basah, yang hijau dan masak maupun

yang masih mengkal. Anggur akan menjadi obat bila dicampurkan dengan obat (Savitri, 2008).

b. Kurma, Selain anggur dalam hadits Rosulullah SAW bersabda :

*”Barangsiapa yang mengkonsumsi tujuh butir kurma di pagi hari (dalam riwayat lain: tujuh butir kurma al-Aliyyah) pada hari itu ia tidak akan terganggu oleh racun ataupun sihir”.*

Menurut penelitian yang telah dilakukan bahwa menyantap tujuh butir kurma Ajwah dari kota Madinah dapat memelihara tubuh dari bahaya racun dan sihir. Padahal Rosulullah telah menyampaikan hal tersebut ratusan tahun lalu, dan kini telah menjadi pembuktian dikalangan medis (Al-Khuzaim 2005 dalam Savitri 2008).

c. Zaitun, Penggunaan zaitun dijelaskan dalam hadist yang diriwayatkan oleh al-Baihaqi dan Ibnu Majah dari abdulah (bin Umar) bahwa Rosulullah SAW bersabda :

*” Gunakanlah minyak zaitun sebagai lauk dan gunakanlah sebagai minyak rambut, karena ia berasal dari pohon yang penuh dengan berkah.”*

Kegunaan minyak zaitun yaitu untuk mengobati keracunan, kanker, menahan munculnya uban, mengobati luka infeksi, meminyaki bibir yang pecah-pecah dan mengobati sakit encok (Fattah, 2004 dalam Savitri, 2008)

d. Delima, dalam hadits dijelaskan bahwa Rasulullah SAW bersabda :

*” Makanlah buah delima dan bagian dagingnya sekaligus, karena buah ini berfungsi membersihkan lambung.”*

Buah delima berguna untuk tenggorokan, dada dan paru-paru, selain juga baik untuk mengobati batuk. Airnya dapat memperbaiki lambung, memberikan suntikan gizi pada tubuh sedikit lebih banyak. Dan sebagian bahan campuran celak bersama madu dan mengobati luka lama (Savitri, 2008).

Penjelasan ayat diatas mengisyaratkan agar kita sebagai makhluk ciptaan Allah yang ada di bumi diharuskan untuk mencari dan mempelajari berbagai tumbuhan yang menjadi rezeki yaitu yang memberikan manfaat bagi makhluk hidup karena merupakan bahan pangan, bahan sandang, papan dan bahan obat – obatan. Adanya senyawa kimia dalam tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat itu hanyalah satu dari banyak tanda-tanda kekuasaan Allah yang diciptakan-Nya di alam semesta. Ketika manusia mulai berpikir tidak hanya menggunakan akal, akan tetapi juga dengan hati mereka, maka mereka akan sampai pada pemahaman bahwa seluruh alam semesta ini adalah bukti keberadaan dan kekuasaan Allah SWT.



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor, yaitu :

1. Faktor pertama: konsentrasi PEG 6000 yang terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu (0 gr/L, 20 gr/L, 40 gr/L, 60 gr/L ).
2. Faktor kedua adalah varietas kedelai (Wilis, Tanggamus, dan Grobogan).

Penelitian ini menggunakan 12 kombinasi perlakuan dengan 3 ulangan. Dengan demikian dalam penelitian secara keseluruhan terdapat 36 kombinasi.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Pada penelitian ini terdapat 3 variabel, yaitu : variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

##### **3.2.1 Variabel bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah PEG 6000 dengan konsentrasi yang berbeda.

##### **3.2.2 Variabel terikat**

Variable terikat dalam penelitian merupakan variable yang dapat diukur yaitu : warna kalus dan produksi senyawa isoflavon kalus kedelai.

### **3.2.3 Variabel terkontrol**

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah hormon 2,4-D, suhu, cahaya, medium B5, pH, kelembaban serta Varietas kedelai yang berbeda yaitu : Wilis, Tanggamus, dan Grobogan.

### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni 2010 hingga Agustus 2010 di laboratorium *Genetic and Plant Tissue Culture* Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

### **3.4 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.4.1 Alat**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : gelas piala, gelas ukur, elenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (scalpel, pinset, gunting) "*Laminair Air Flow Cabinet*"; timbangan analitik, pipet, alat sterilisasi (autoklaf, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*)), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, alat pemotret, thermometer, lampu flouresence, lux meter, kertas label, plastik, karet, hot plate, kertas tissue, korek, aluminium foil, waterbath, bejana elusi, vakum, pipa kapiler.

### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : larutan stok makronutrien medium B5, larutan stok mikronutrien medium B5, larutan stok sumber besi, larutan stok hormon 2,4-D, aquades steril, agar, larutan stok organik yaitu sukrosa, vitamin, asam amino, bahan sterilisasi yaitu alkohol 70%, spiritus, tipol, detergen sunlight, dan sunclin 10%. Bahan buffer pH: NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N. Bahan eksplan: biji kedelai yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Ballitkabi) Malang, kotiledon kedelai yang diperoleh dari kecambah yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Bahan ekstraksi : 1 ml methanol 80%, HCL 2 ml, Etil asetat, aquades, metanol 0,25 ml, eluen (toluen: dietil eter : asam asetat).

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Sterilisasi Alat

1. Alat-alat *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting), alat-alat dari gelas dan logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikering anginkan.
2. Kemudian alat-alat *dissecting set* (pinset, gunting, scalpel) disterilisasi dengan alkohol 90% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF.
3. Alat-alat gelas ditutup aluminium foil, sedangkan alat-alat logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup> C selama 20 menit.

### 3.4.2 Pembuatan Media

Pembuatan media perkecambahan dilakukan dengan melarutkan agar batang sebanyak 8,5 gram dengan aquades hingga mencapai volume 1 liter ke dalam elenmeyer. Larutan agar dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih sambil dilarutkan dengan *sterrer*. Larutan mendidih dituang ke dalam botol kultur.

Pembuatan media induksi dan subkultur kalus sebanyak 1 liter dilakukan dengan mengisikan stok makronutrien dan mikronutrien B5 (Lampiran 3) ke dalam elenmayer beserta zat pengatur tumbuh 2,4-D, dan gram sukrosa. Sebanyak 500 ml aquades ditambahkan.

Keasaman media diatur pada pH 5,8 dengan menggunakan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika pH lebih dari 5,8 maka media ditambahkan larutan HCl 0,1 N. Pada medium tersebut ditambahkan agar 8 g (tidak dibuat stok). Selanjutnya medium dipanaskan sampai mendidih dan diaduk, kemudian diangkat. Kemudian medium diisikan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml. Setiap botol ditutup dengan plastik dan diikat menggunakan karet.

Pembuatan media untuk perlakuan sama dengan media induksi dan media pemeliharaan kalus. Akan tetapi pada media perlakuan ditambahkan PEG 6000 dengan konsentrasi (0 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L) (Lampiran 4).

### 3.5.3 Sterilisasi Media

Media dalam setiap botol kultur disterilisasi dengan cara di autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup> C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

### **3.5.4 Sterilisasi Ruang Tanam**

*Laminair Air Flow* disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Kemudian alat-alat yang dimasukkan ke dalam LAF juga harus disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Selanjutnya ruang tanam disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam sebelum LAF digunakan, ketika LAF digunakan maka sinar UV harus dimatikan. Saat LAF digunakan, maka blower dihidupkan.

### **3.5.5 Sterilisasi dan Perkecambahan Biji**

Perkecambahan diawali dengan sterilisasi biji kedelai (Willis, Grobogan, Tanggamus), yaitu dengan menggojog biji dalam larutan kloroks yang telah diencerkan sebanyak 30% selama 10 menit. Penggojokan dilanjutkan dengan pembilasan dengan aquades steril sebanyak tiga kali, masing-masing selama 2 menit. Biji kedelai yang sudah steril ditanam dalam media perkecambahan selama 7 hari. Kotiledon hasil perkecambahan dipergunakan sebagai eksplan untuk induksi kalus.

### **3.5.6 Inisiasi dan Pemeliharaan Eksplan**

Sebelum ditanam, eksplan kotiledon hasil perkecambahan kedelai yang telah steril diletakkan dalam petridish steril yang telah dilapisi kertas tissue/kertas serap steril untuk menyerap aquades. Kemudian eksplan dipotong-potong di atas petridish dengan ukuran 0,5 cm dan ditanam dalam media induksi kalus selama 2 minggu. Eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur diatur pada rak-rak kultur. Selanjutnya eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  dan kelembaban ruang 70%. Subkultur dilakuakn pada umur kultur 2 minggu. Kalus

dipotong, kemudian ditanam ke media subkultur. Subkultur dilakukan sebanyak satu kali dan selanjutnya kalus tersebut merupakan eksplan untuk perlakuan.

### **3.5.7 Pemberian perlakuan pada kalus**

Kalus yang diperoleh dari satu kali subkultur kemudian ditimbang dan ditanam dalam media perlakuan PEG 6000 dengan konsentrasi yang berbeda. Perlakuan dilakukan sebanyak tiga ulangan (3 botol), masing-masing botol diisi 1 *clump* (potongan kecil kalus). Sebagai kontrol, kalus ditanam pada media B5 yang ditambah 2,4-D sebanyak 2 ppm. Kalus dipanen setelah 2 minggu perlakuan pada kondisi terang dengan temperatur 28°C untuk dianalisis pertumbuhannya dengan kandungan isoflavonnya.

### **3.5.8 Analisis Kandungan Senyawa Isoflavon Kalus Kedelai**

Sampel dimaserasi dengan etanol yang berisi 0,1% asam asetat selama 24 jam, kemudian saring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak yang didapat kemudian di tambah dengan enzim  $\beta$ -glucanase/ $\beta$ -xylanase. Ekstrak yang didapatkan kemudian disentrifuge pada kecepatan 13500 rpm selama 10 menit pada suhu 10 C. Ambil 10 ml supernatan kemudian dimasukkan dalam kolom kromatografi yang berisi alumina dan Na sulfat. Kemudian ditambah dengan 25 ml asetonitril yang didalamnya berisi asam asetat 0,1 % sebagai fase gerak. Tampung eluat yang didapat kemudian dilarutkan dengan asetonitril. Amati absorbansi pada panjang gelombang 365 nm. Sebagai standar penentuan kadar isoflavon, digunakan standar genistein dengan kisaran konsentrasi 0 – 0,01 mg/ml.

### 3.6 Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan uji ANAVA (*Analisis Variansi*) Bila terdapat perbedaan yang signifikan, uji dilanjutkan dengan uji BNT (beda nyata terkecil) pada selang kepercayaan 5%.



## BAB IV

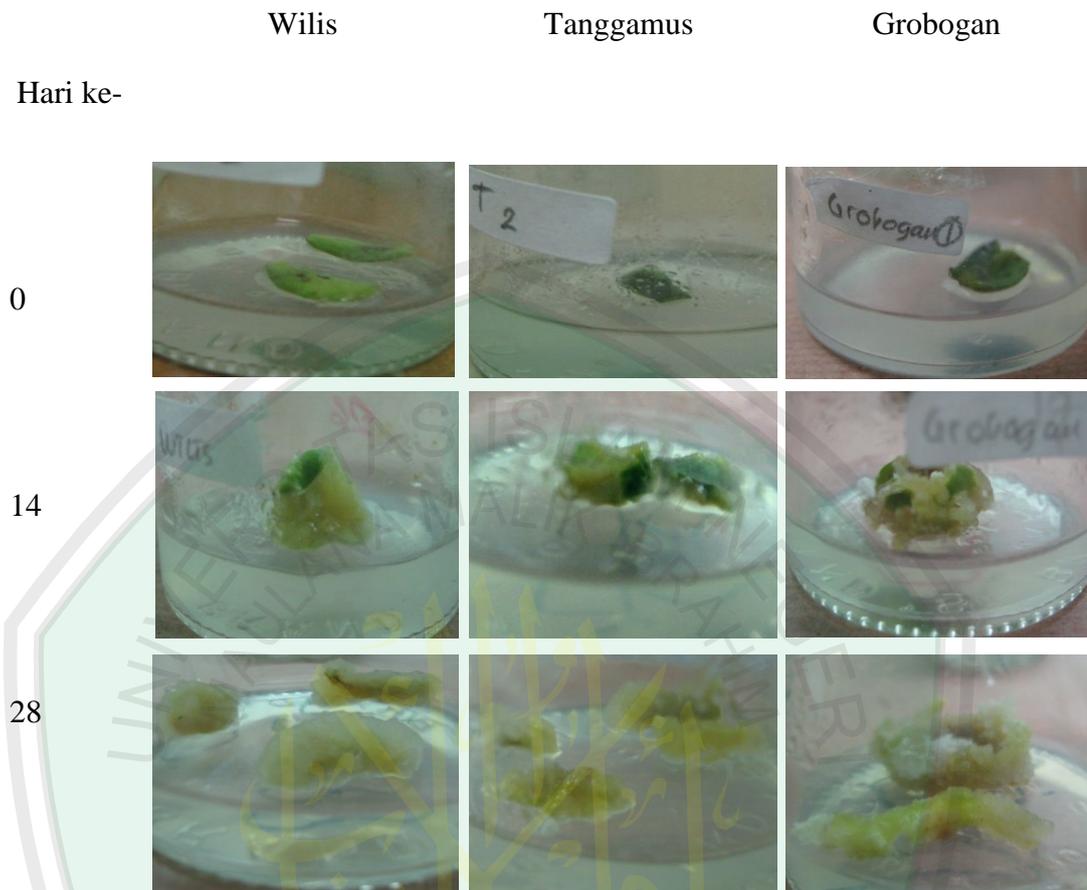
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Beberapa Varietas Kedelai

##### 4.1.1 Inisiasi Kalus

Eksplan yang digunakan pada tahap inisiasi yaitu kotiledon dari kecambah biji 3varietas kedelai (Wilis, Tanggamus, dan Grobogan) umur 7 hari yang ditumbuhkan pada media agar kosong tanpa penambahan hormon yang dilakukan secara aseptik. Menurut Leclerg and Heuson (1999) kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada biji kedelai, khususnya pada bagian hipokotil yang akan tumbuh menjadi bahagian tanaman, sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama pada tanaman. Eksplan kotiledon biji kedelai dipotong pada kedua bagian ujungnya, dan ditumbuhkan pada media B5 dengan penambahan hormon 2,4-D sebanyak 4 ppm. Menurut Kadir (2007) auksin kuat, seperti 2,4-D dapat memacu pembelahan sel. Munculnya kalus pada tahap inisiasi pada hari ke-3 pada varietas Wilis dan Grobogan, dan pada varietas Tanggamus mulai muncul pada hari ke-4. Kalus tumbuh pada bagian yang dilukai, ditandai dengan munculnya bercak-bercak putih. Menurut Evans *dkk* (2003) menyebutkan bahwa ketika tanaman dilukai maka kalus akan terbentuk akibat selnya mengalami kerusakan dan terjadi outolisis (pemecahan), dan dari sel yang rusak tersebut dihasilkan senyawa-senyawa yang merangsang pembelahan sel di lapisan berikutnya sehingga terbentuk gumpalan sel-sel yang terdeferensiasi.

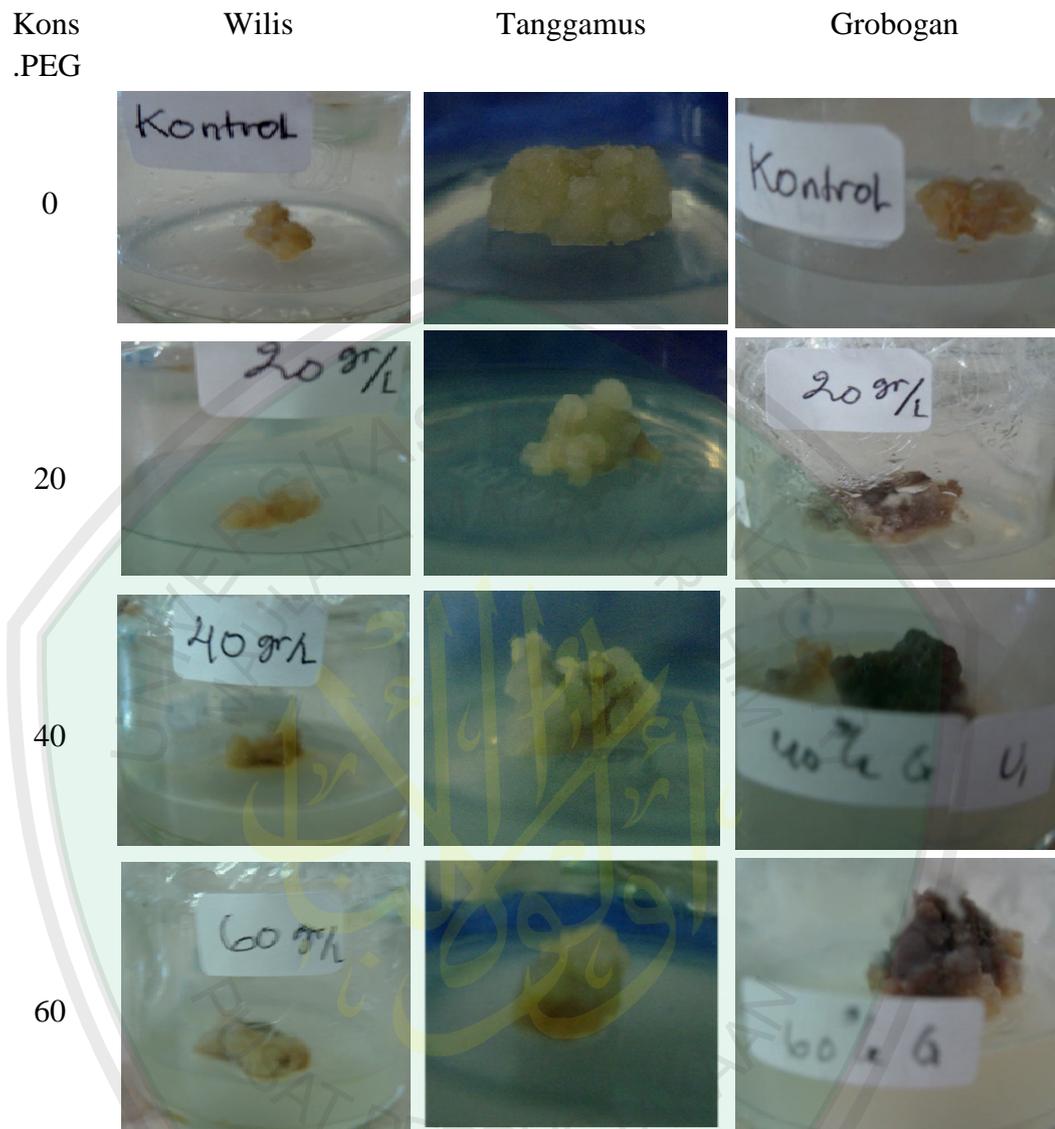
Kalus berkembang dan mengalami perubahan warna sampai pada hari ke-14. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) warna kalus yang bervariasi disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Selanjutnya pada hari ke-14 setelah inisiasi kalus, eksplan akan disubkultur pada media B5 dengan penambahan hormon 2,4 D sebanyak 2 ppm. Subkultur pada kalus yang sedang berkembang bertujuan untuk memenuhi nutrisi yang telah berkurang pada media sebelumnya. Oleh karena itu eksplan perlu dipindah supaya mendapatkan nutrisi baru dalam perkembangan berikutnya. Perkembangan morfologi kalus dari 3 varietas kedelai tersebut dapat dilihat pada (Gambar 4).



Gambar 4.1 Morfologi kalus beberapa varietas kedelai pada awal inisiasi sampai pada akhir subkultur.

#### 4.1.2 Induksi Kalus Pada Media PEG 6000

Setelah akhir subkultur yaitu pada hari ke-28, kalus siap dipindahkan pada media perlakuan PEG 6000 dengan tingkat konsentrasi yang berbeda yaitu (0 g/l, 20 g/l, 40 g/l, dan 60 g/l). Kalus kedelai yang dipindahkan pada media PEG 6000 mengalami perubahan dari segi warna yang disajikan pada (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Morfologi kalus pada pengamatan hari ke-14 setelah perlakuan PEG 6000.

Dari (Gambar 4.2) jelas terlihat bahwa kalus mengalami perubahan warna yang lebih gelap dibandingkan dengan kontrol. Terjadinya pencoklatan pada kalus dimungkinkan merupakan suatu respons hipersensitif yang ditunjukkan oleh jaringan tumbuhan karena adanya cekaman dalam hal ini yaitu penambahan PEG

6000, karena PEG 6000 mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen sehingga diharapkan dapat menciptakan kondisi cekaman karena ketersediaan air bagi tanaman menjadi berkurang (Suwarsi dan Guhardja, 2005).

Astutik (2003) menyatakan bahwa warna coklat pada kalus menandakan sintesis senyawa fenolik karena dipicu oleh cekaman atau gangguan sel tanaman. Hal ini sesuai dengan pendapat Isaac (1992) yang menyatakan bahwa jaringan yang mengalami cekaman akan mengalami pencoklatan dan hambatan pertumbuhan, dan pada sel-sel yang mengalami cekaman terjadi peningkatan akumulasi metabolit sekunder tertentu. Fitriani (2003) menambahkan bahwa cekaman atau gangguan yang terjadi pada sel tanaman tersebut diakibatkan karena berkurangnya nutrisi yang ada dalam media, sebab nutrisi yang tersedia tidak hanya digunakan untuk pertumbuhan kalus tetapi juga untuk kepentingan lain seperti sintesis metabolit sekunder.

## **4.2 Identifikasi Senyawa Isoflavon**

### **4.2.1 Ekstraksi**

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Anonim, 1986). Kalus dari beberapa varietas kedelai ini dipanen setelah hari ke-14 untuk diidentifikasi kandungan isoflavonnya. Sampel kalus kedelai (basah) dengan berat  $\pm 0,20$  digerus kemudian dimasukkan ke dalam wadah piala dan ditambahkan 0,1% asam asetat dalam etanol. Selanjutnya, dikocok dengan menggunakan shaker dan didiamkan selama 24 jam. Filtrat hasil ekstraksi disaring dan dievaporasi (diuapkan dengan rotary

*evaporator*) hingga diperoleh ekstrak pekat etanol. Mengacu pada pendapat Markham (1988) bahwa senyawa yang termasuk dalam golongan flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), sehingga etanol ini yang digunakan untuk pelarut ekstrak kalus kedelai. Ekstrak yang didapat kemudian di tambah dengan enzim  $\beta$ -glucanase/b-xylanase. Ekstrak yang didapatkan kemudian disentrifuge pada kecepatan 13500 rpm selama 10 menit pada suhu 10 C.

#### **4.2.2 Kromatografi Kolom**

Sampel yang telah diekstrak selanjutnya akan diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi kolom. Sebagai standar penentuan kadar isoflavon, digunakan standar genistein dengan kisaran konsentrasi 0 – 0,01 mg/ml.

Pada pengisian bagian bawah kolom dimasukkan sedikit kapas, wol kaca dan pasirlaut kemudian dimasukkan bubuk silica gel 70-230 meshsambil diaduk agar tidak terdapat rongga udara di tengah-tengah kolom. Timbunan bubuk silica gel dalam kolom mencapai tiga perempat tinggi kolom.

Pemisahan komponen dengan menggunakan kromatografi kolom, Diambil 10 ml supernatan kemudian dimasukkan dalam kolom kromatografi yang berisi alumina dan Na sulfat. Kemudianditambahdengan 25 ml asetonitril yang didalamnyaberisiasamasetat 0,1 % sebagaifasegerak. Tampungeluar yang didapatkemudiandilarutkandenganasetonitril.

Amatiabsorbansipadapanjanggelombang 365 nm. Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan campuran beberapa senyawa yang diperoleh dari isolasi tumbuhan. Dengan menggunakan fasa padat dan fasa cair maka fraksi-fraksi senyawa akan nmenghasilkan kemurnian yang cukup tinggi (Lenny, 2006).

Menurut Adnan (1997) pengisian kolom harus dikerjakan dengan seragam. Setelah adsorben dimasukkan dapat diseragamkan kepadatannya dalam kolom dengan menggunakan vibrator atau dengan plunger (pemadat). Selain itu dapat juga dikerjakan dengan memasukkan adsorben dalam bentuk larutan (slurry) dan partikelnya dibiarkan mengendap. Pengisian kolom yang tidak seragam akan menghasilkan rongga-rongga di tengah-tengah kolom. Cara untuk mengatasi masalah ini adalah dengan mengadakan back fushing, sehingga terjadi pengadukan, yang seterusnya dibiarkan lagi mengendap. Pada bagian bawah (dasar) dan atas dari isian kolom diberi wol kaca (glass wool) atau sintered glass disc untuk menyangga isian. Bila kolom telah diberi bahan isian, permukaan cairan tidak boleh dibiarkan turun dibawah permukaan bahan isian bagian atas, karena akan memberikan peluang masuknya gelembung udara masuk ke kolom.

#### **4.3 Pengaruh Penambahan PEG 6000 Pada Media Terhadap Kandungan Isoflavon Kalus Beberapa Varietas Kedelai**

Berdasarkan hasil penelitian dan Analisis Variansi (ANAVA) tentang pengaruh penambahan PEG 6000 pada media terhadap produksi isoflavon kalus beberapa varietas kedelai, diperoleh data yang menunjukkan bahwa  $F_{hitung} > F_{tabel}$  0,05. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh perbedaan varietas dan penambahan PEG 6000 pada media terhadap produksi isoflavon kalus beberapa varietas kedelai. Hasil ini dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 4.1 Hasil ANAVA Kandungan Isoflavon kalus beberapa varietas kedelai pada media PEG 6000

Sk	db	JK	KT	F hit	F 5%
Ulangan	2	30233,407	15116,707	0,228	
Perlakuan	(11)	8,956	6,397	963,968	2,26
PEG	3	1,321	4402112,761	66,337**	3,05
Varietas	2	2200226,487	1100113,243	16,578**	3,44
Varietas*PEG	12	1046173,473	174362,245	2,628*	2,55
Galat	22	1459923,224	66360,147		
Total	35	535,679			

Keterangan : \* = menunjukkan berpengaruh nyata

\*\* = menunjukkan berpengaruh sangat nyata

ns = non signifikan / tidakadapengaruh

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan yang diberikan, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) 5% .Berdasarkan uji BNT 5% dari rata-rata hasil produksi isoflavon kalus beberapa varietas kedelai, maka didapatkan notasi BNT sebagai berikut :

Tabel 4.2 Rata-rata Pengaruh Dari Penambahan PEG 6000 Pada Media Terhadap Produksi Isoflavon (1 ppm/gr berat basah) Kalus Beberapa Varietas Kedelai

Kons.PEG \ Varietas	0 g/L	20 g/L	40 g/L	60 g/L
wilis	4080,5 a	4779,5 b	5076,8 bc	5469,2 cd
Tanggamus	4092,0 a	4337,8 a	4852,3 b	5483,7 cd
Grobogan	4141,7 a	4925,7 b	5869,9 de	6179,1 e

Pada tabel 4.2 terlihat bahwa interaksi antara PEG 6000 dengan varietas menunjukkan konsentrasi 0 g/L varietas Wilis berbeda nyata dengan konsentrasi 60 g/L varietas Grobogan. Nilai isoflavon paling tinggi yaitu pada konsentrasi 60 g/L varietas Grobogan dan tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 40 g/L varietas Grobogan. Nilai rata-rata isoflavon yang paling rendah yaitu pada perlakuan PEG 0 gr/L varietas Wilis dan tidak berbeda nyata dengan konsentrasi PEG 0 gr/L Grobogan, 0 gr/L Tanggamus dan 20 gr/L Tanggamus.

Berdasarkan analisis interaksi yang terjadi antara PEG dengan beberapa varietas menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi PEG 6000 berpengaruh nyata pada kandungan senyawa isoflavon dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Efektivitas penggunaan PEG 6000 untuk menginduksi metabolit sekunder secara *in-vitro* dapat dilihat dari produksi senyawa isoflavon kalus beberapa varietas kedelai.

Pada penelitian ini morfologi kalus juga berpengaruh terhadap kadar isoflavon pada kalus kedelai. Kalus berwarna putih kekuningan menandakan bahwa kandungan isoflavon yang rendah, sedangkan kalus yang berwarna coklat kehitaman kandungan isoflavonnya lebih tinggi, dengan kata lain kandungan senyawa isoflavon berbanding terbalik dengan kualitas warna kalus yang baik.

Pencoklatan pada jaringan terkait dengan akumulasi fenol yang berlebihan (Dubravina *dkk.* 2005). Fenol yang teroksidasi akan membentuk kuinon dan kuinon adalah senyawa yang menyebabkan adanya warna coklat pada kultur kalus. Intensitas warna coklat berkorelasi dengan hiperaktifitas enzim oksidatif

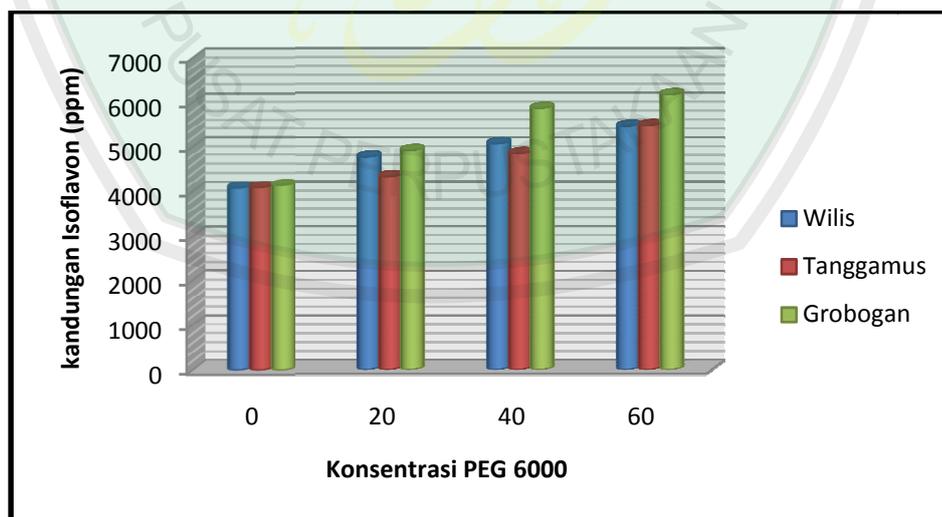
(Naz dkk. 2008), sedangkan peningkatan aktifitas enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stres oksidatif (Lee dan Withaker. 1995) berdasarkan hal tersebut maka dapat diduga bahwa dengan adanya peningkatan intensitas warna coklat seiring dengan konsentrasi perlakuan PEG 6000 menunjukkan tingkat stres yang semakin tinggi.

Fenolik merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Fenolik memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksi (OH-) dan gugus-gugus lain penyertanya. Senyawa ini diberi nama berdasarkan nama senyawa induknya, fenol. Senyawa fenol kebanyakan memiliki gugus hidroksi lebih dari satu sehingga disebut sebagai polifenol. Kelompok terbesar dari senyawa fenolik adalah flavonoid,

Cekaman kekeringan pada media PEG 6000 ternyata mampu mengakumulasi senyawa isoflavon kalus kedelai. Karena senyawa PEG ini bersifat larut dalam air dan menyebabkan penurunan potensial air. Keadaan seperti ini dimanfaatkan untuk simulasi penurunan potensial air sehingga terjadi cekaman kekeringan dalam media (Michel and Kaufman, 1973). Menurut Kalefetoğlu dan Ekmekçi (2005), kekeringan dapat menjadi factor pembatas pertumbuhan dan produktivitas suatu tanaman dan akan berpengaruh terhadap respons fisiologi, biokimia dan molekuler tanaman.

Hal ini sesuai dengan penelitian Hamim (2008) yang menunjukkan bahwa perlakuan cekaman kekeringan menyebabkan peningkatan kandungan prolin daun semua tanaman baik kedelai budidaya maupun kedelai liar. Peningkatan prolin

terjadi sangat tinggi pada akhir periode cekaman (12 dan 14 hari). Kandungan prolin tertinggi dicapai oleh kedelai varietas Panderman (peka), sedangkan terendah dicapai oleh kedelai varietas Tidar (toleran), yang menguatkan dugaan bahwa tingginya prolin lebih ditentukan oleh beratnya tingkat cekaman kekeringan. Hal ini menandakan bahwa respon tanaman terhadap cekaman kekeringan bergantung pada sifat dari suatu tanaman tersebut. Prolin merupakan asam amino yang lebih nampak terekspresi ketika tanaman mengalami cekaman misalnya stres garam, dimana tekanan turgor merupakan pemacu utama akumulasi prolin. Akumulasi prolin ini menunjukkan adanya peningkatan aktivitas jalur biosintesis fenilalanin yang merupakan pintu gerbang utama pembentukan senyawa-senyawa flavonoid dan isoflavonoid (Gedean, dkk., 2004). Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2–4 mg/g kedelai (Leclerg and Heuson, 1999).



Gambar 4.4 Diagram Pengaruh Penambahan PEG 6000 Pada Media dalam Berbagai Konsentrasi Terhadap Kandungan Isoflavon Pada Kultur Kalus Kedelai (14 HST)

Metabolit sekunder Isoflavon pada kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O- glikosidik. Selama proses fermentasi, ikatan -O- glikosidik terhidrolisa, sehingga dibebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon yang bebas. Senyawa isoflavon aglikon tersebut dapat mengalami transformasi lebih lanjut dengan membentuk senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas biologi tinggi. Hal tersebut ditunjukkan oleh Murata (1985) yang membuktikan bahwa faktor-II (6, 7, 4-tri-hidroksi isoflavon) mempunyai aktivitas antioksidan dan antihemolisis lebih baik dari daidzein dan genistein. Faktor-II (6, 7, 4-tri-hidroksi isoflavon) merupakan senyawa yang terbentuk akibat proses fermentasi oleh aktivitas mikroorganisme. Selain itu, Jha (1985) menemukan bahwa senyawa isoflavon lebih aktif 10 kali lipat dari senyawa karboksi kroman (vitamin A). Menurut penelitian Barz, *et al.* (1993) biosintesa Faktor-II dihasilkan melalui demetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui reaksi hidroksilasi daidzein.

Tabel 4.3 Rata-rata Pengaruh Penambahan PEG 6000 Pada Media terhadap Kandungan Isoflavon Kalus beberapa Varietas Kedelai

Kons.PEG 6000	Rata-Rata Kandungan Isoflavon (ppm)
Kontrol	4104,7 a
20 g/L	4681,3 b
40 g/L	5269,7 c
60 g/L	5710,7 d

Dari (tabel 4.3) maka dapat diketahui hasil notasi BNT 5% bahwa penambahan PEG 6000 pada media yang diberikan dapat direspon dengan peningkatan kandungan isoflavon. Hal ini dapat dilihat dari peningkatan kandungan isoflavon pada perlakuan PEG 6000 (20 g/L, 40 g/L, dan 60 g/L) disbanding kontrol (0 g/L). Semakin tinggi perlakuan PEG 6000 maka semakin tinggi pula akumulasi senyawa isoflavon yang terkandung.

Dalam penelitian ini menunjukkan hasil bahwa dengan meningkatkan konsentrasi PEG 6000 dalam media senyawa isoflavon semakin meningkat. Hal ini dikarenakan pada media PEG 6000 terjadi persaingan memperoleh nutrisi dalam membentuk metabolit sekunder. Jika nutrisi yang ada lebih banyak digunakan untuk pembentukan metabolit primer maka akan menyebabkan pertumbuhan kalus meningkat. Namun, jika nutrisi yang ada lebih banyak digunakan untuk pembentukan metabolit sekunder maka kandungan isoflavon pada kalus akan meningkat. Menurut Lindsey dan Yeoman (1983) terjadinya persaingan prazat antara jalur metabolisme primer dengan jalur metabolisme sekunder, sehingga bila jalur metabolisme primer aktif, maka jalur metabolisme sekunder akan terhambat (Endress, 1994).

Tabel 4.4 Rat-rata Pengaruh perbedaan Varietas kedelai Terhadap Kandungan Isoflavon

Varietas	Rerata Kandungan Isoflavon (ppm)
Tanggamus	4694,3 a
Wilis	4851,5 a
Grobogan	5279,1 b

Berdasarkan uji BNT 5% tentang pengaruh varietas terhadap kandungan isoflavon menunjukkan bahwa varietas Tanggamus memiliki kandungan isoflavon yang paling rendah, akan tetapi varietas Tanggamus ini tidak jauh berbeda dengan varietas Wilis, sedangkan antara kedua varietas tersebut berbeda nyata dengan varietas Grobogan. Adapun kandungan isoflavon pada varietas Grobogan yaitu 5279,1 ppm. Berdasarkan analisis diatas tampak bahwa varietas juga berpengaruh dalam merespon adanya PEG 6000 untuk menghasilkan senyawa isoflavon. Hal ini sesuai dengan pendapat Astuti (2007) yang menyatakan bahwa kalus kedelai tiap varietas itu berbeda, dari 5 varietas yang diteliti kandungan isoflavon dalam 100 g sampel yang paling tinggi adalah varietas Burangrang yaitu daidzein (0,243%) dan ginestein (0,361%), sedangkan pada senyawa lain hanya dapat dideteksi satu senyawa saja.

Pemanenan kalus kedelai dari ke-3 varietas ini dilakukan dalam waktu yang relative singkat yaitu pada fasa lag. Pada Fasa ini merupakan fasa pertumbuhan paling rentan terhadap perubahan lingkungan sehingga perubahan biosintesis pada tanaman ini akan diarahkan ke pembentukan metabolit primer atau sekunder. Hal ini dapat dilihat dari pola-pola akumulasi kedua metabolit tersebut.

Menurut Smith (2000), kurva pertumbuhan kalus tanaman terdiri atas beberapa fase berbeda, yaitu fase lag, fase eksponensial, dan fase stasioner. Fase lag merupakan fase adaptasi dan periode produksi energi (Scaagdan Allan, 1993

dalam Bajaj, 1933). Fase kedua, yakni fase eksponensial atau fase biosintetik merupakan fase terjadinya pembelahan selular maksimal dengan laju pertumbuhan yang paling tinggi. Fase terakhir adalah fase stasioner, yakni pada saat terjadi penurunan jumlah nutrisi pada medium kultur dan reduksi jumlah oksigen di dalam sel. Sel mengalami laju pertumbuhan tertinggi pada fase eksponensial dan terendah pada fase stasioner (Smith, 2000).

Berdasarkan hasil analisis kandungan isoflavon pada beberapa varietas kedelai, diketahui bahwa tanaman yang toleran mengandung senyawa isoflavon yang rendah jika dibandingkan dengan tanaman yang peka terhadap cekaman kekeringan. Varietas Tanggamus dan Wilis dalam penelitian ini merupakan varietas yang merespon cekaman kekeringan lebih lambat jika dibandingkan varietas Grobogan. Hal ini dapat dilihat dari kandungan isoflavon pada varietas Tanggamus dan Wilis lebih rendah dari kandungan isoflavon varietas Grobogan. Sehingga dapat diketahui bahwa varietas Grobogan menghasilkan senyawa fitoestrogen yaitu isoflavon yang lebih tinggi dilihat dari perubahan warna kalus yang semakin coklat dan mengarah pada kematian kalus. Jika dibandingkan dengan warna kalus kedelai varietas Tanggamus dan Wilis. Maka diasumsikan kalus varietas Grobogan secara genetic memiliki potensi yang lebih baik akan tetapi dalam menghasilkan isoflavon dibandingkan dengan varietas Tanggamus dan Wilis. Menurut Nakamura, *et.al* (2001) isoflavon terakumulasi dalam jaringan tanaman bias disebabkan berbagai faktor internal maupun eksternal. Faktor internal berasal dari aktivitas genetic dari tanaman tersebut, sedangkan factor

eksternal adalah kondisi lingkungan dimana tanaman itu tumbuh. Kandungan senyawa isoflavon sendiri dalam tanaman sangat rendah, yaitu sekitar 0,25% .

Hal ini sesuai dengan penelitian Harsono *dkk* (2003) yang menyatakan pada kacang tanah varietas singa memiliki ketahanan terhadap kekeringan yang paling tinggi dari pada varietas kacang tanah yang lain. Karena ketahanan inilah kacang tanah mudah toleran terhadap lingkungan sehingga ada kemungkinan tidak meningkatkan akumulasi fitoaleksin secara signifikan.

#### **4.2 Manfaat Kedelai Prespektif Islam**

Tumbuhan merupakan sumber kekayaan alam yang banyak dijumpai di lingkungan sekitar kita. Allah SWT telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik untuk manusia agar manusia selalu bersyukur atas segala nikmat dan memanfaatkan segala pemberian-Nya, tercantum dalam Q.S As-Syuara: 7

﴿ كَرِيمٌ زَوْجٌ كُلِّ مِنْ فِيهَا أَنْبَتْنَا كَمَا الْأَرْضِ إِلَى يَرَوْنَ أَوْلَمَ ﴾

Artinya : *Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?* (Q.S As-Syuara: 7).

Sebagai tanda kekuasaan-Nya, Allah memberikan sumber makanan protein alternatif yang berasal dari biji-bijian. Satu diantaranya yaitu tanaman kedelai (*Glycine Max*), selain sebagai sumber makanan nabati, kedelai juga bisa dimanfaatkan sebagai obat. Menurut (Savitri, 2008) tumbuhan yang dapat

dimanfaatkan sebagai obat adalah bagian daun, batang akar, rimpang, buah dan bijinya, Firman Allah SWT dalam Q.S Yaasiin: 33 :

يَا كُلُّونَ فَمِنْهُ حَبًّا مِمَّا وَآخَرَ جَنَّا أَحْيَيْنَاهَا الْمَيِّتَةَ الْأَرْضَ لَهُمْ وَآيَةٌ

Artinya : *Dan suatu tanda (kekuasaan Allah yang besar) bagi mereka adalah bumi yang mati. Kami hidupkan bumi itu dan Kami keluarkan dari padanya biji-bijian, Maka daripadanya mereka makan.*

Meskipun protein yang berasal dari biji-bijian atau kacang-kacangan termasuk protein setengah sempurna, tetapi Allah memberikan kelebihan juga pada makanan sumber nabati ini. Kacang kedelai yang sering kita konsumsi sudah dalam bentuk olahan seperti tempe, tahu dan susu kedelai, ternyata mengandung banyak khasiat. kandungan ginestein pada kacang kedelai mampu menurunkan kadar kolesterol jahat (LDL). Asam lemak omega-3 pada kacang kedelai bermanfaat untuk menurunkan tekanan darah, sebagai pengencer darah alami yang bermanfaat untuk mencegah penyumbatan pembuluh darah, dan menurunkan kadar kolesterol darah. Kandungan asam fenolik kacang kedelai berfungsi sebagai antioksidan yang dapat mencegah masuknya radikal bebas yang merusak sel-sel normal. Asam fitat pada kacang kedelai mampu menghentikan kegiatan hormon steroid yang menimbulkan tumor.

Kedelai banyak dimanfaatkan karena adanya metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Metabolit sekunder ini biasanya diekstrak langsung dari

tanaman itu sendiri. Namun meningkatnya kebutuhan bahan alami sebagai bahan obat, diperlukan langkah alternatif yaitu untuk memperoleh senyawa tersebut dalam skala besar, satu diantaranya melalui teknik kultur jaringan. Firman Allah SWT dalam Q.S Ar Ra'du: 11:

بِأَنْفُسِهِمْ مَا يُغَيِّرُوا حَتَّىٰ بِقَوْمٍ مَا يُغَيِّرُ إِلَّا اللَّهُ ۗ إِنَّ

*Artinya : Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan mereka sendiri.*

Allah SWT tidak akan menghilangkan nikmat yang telah ia berikan kepada suatu kaum berupa keselamatan, keamanan dan kesejahteraan sebab keimanan dan amal baik mereka, sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada mereka (Al-Jazair, 2007). Menurut penafsiran At-Thobari (2009), Sesungguhnya Allah tidak akan merubah kondisi kesehatan dan kenikmatan suatu kaum jika mereka merubah keadaan yang ada pada mereka dengan perubahan aniaya dan permusuhan kepada sesamanya, sehingga hukuman-Nya menimpa mereka dan perubahan pun terjadi.

Dalam Surah Ar-Ra'du (11) yang telah tersebut diatas dapat mengindikasikan bahwa Allah SWT akan memberikan kenikmatan dan kemudahan bagi umatnya, jika mereka sendiri melakukan usaha untuk mendapatkannya. Alternatif dalam meningkatkan kandungan senyawa bioaktif dalam kedelai merupakan salah satu usaha manusia untuk mendapatkan senyawa

tersebut dalam skala besar, yang sebelumnya telah Allah SWT tetapkan kadarnya dalam tumbuh-tumbuhan.

Pada penelitian ini kedelai dalam bentuk kalus tidak hanya mampu menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan dirinya untuk tetap hidup, tetapi senyawa metabolit sekunder ini juga bisa bermanfaat bagi manusia untuk digunakan sebagai obat. Manusia sebagai hamba Allah SWT dalam menghadapi hal ini haruslah bisa mengambil hikmah dari proses pembentukan metabolit sekunder pada kedelai, dimana dalam keadaan strespun kedelai mampu menghasilkan senyawa yang bermanfaat bagi manusia. Begitupula dengan manusia dalam keadaan tertekan atau mengalami stres karena banyaknya masalah, haruslah bisa melakukan tindakan dalam dirinya sehingga perbuatannya atau usaha yang dilakukannya tidak hanya bermanfaat bagi dirinya akan tetapi dapat bermanfaat juga untuk orang lain yang ada disekitarnya. Maha besar Allah dengan segala nikmat-Nya, kita bisa mengambil hikmah dari salah satu fenomena alam yang menakjubkan ini.

Tumbuh-tumbuhan sebagaimana halnya benda-benda langit dan makhluk Allah SWT yang lain, bisa merasakan, mendengar, dan memberikan respon negatif maupun positif terhadap pengaruh eksternal disekelilingnya. Firman Allah Q.S Ar-Rahman ayat 6 :

﴿يَسْجُدَانِ وَالشَّجَرُ وَالنَّجْمُ﴾

*Artinya : "Dan tumbuh-tumbuhan dan pohon-pohonan Kedua-duanya tunduk kepada nya" (Q.s Ar-Rahman : 6).*

Dalam kaitannya dengan hasil penelitian ini, kalus dari 3 varietas kedelai yang telah diinduksi pada media PEG 6000 memberikan respon yang positif dengan menunjukkan peningkatan akumulasi senyawa bioaktif isoflavon.

Satu diantara tanaman yang digunakan sebagai obat sejak zaman Nabi yaitu Jintan hitam atau habbatussauda. Pengobatan dengan jintan hitam termasuk salah satu dari pengobatan Nabi (*Thibbun Nabawiy*). *Thibbun Nabawiy* menggunakan habbatussauda sebagai salah satu penanganan berbagai macam penyakit dan pemeliharaan kesehatan tubuh yang telah disunahkan oleh Nabi Muhammad SAW. *Thibbun Nabawiy* telah dianjurkan oleh Nabi Muhammad untuk menghindari terjadinya berbagai penyakit (Hendrik, 2009).

Allah SWT juga menganjurkan untuk mengikuti segala tingkah laku yang diajarkan Nabi, baik berupa perkataan, perbuatan, dan ketetapanannya, sebagaimana Allah SWT berfirman :

يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا اتَّقُوا اللَّهَ وَابْنُوا الصَّالِحَاتِ لِلَّذِينَ أَحْسَنَ لَكُمْ فِي الدُّنْيَا وَالْآخِرَةِ وَأُوذِيَ لَكُمْ وَالَّذِينَ كَفَرُوا هُمُ الْمَكِيدُونَ  
يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا اتَّقُوا اللَّهَ وَابْنُوا الصَّالِحَاتِ لِلَّذِينَ أَحْسَنَ لَكُمْ فِي الدُّنْيَا وَالْآخِرَةِ وَأُوذِيَ لَكُمْ وَالَّذِينَ كَفَرُوا هُمُ الْمَكِيدُونَ  
يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا اتَّقُوا اللَّهَ وَابْنُوا الصَّالِحَاتِ لِلَّذِينَ أَحْسَنَ لَكُمْ فِي الدُّنْيَا وَالْآخِرَةِ وَأُوذِيَ لَكُمْ وَالَّذِينَ كَفَرُوا هُمُ الْمَكِيدُونَ

العقَابِ شَدِيدٍ

*Artinya : Apa saja harta rampasan (fai-i) yang diberikan Allah kepada RasulNya (dari harta benda) yang berasal dari penduduk kota-kota Maka adalah untuk Allah, untuk rasul, kaum kerabat, anak-anak yatim, orang-orang miskin dan orang-orang yang dalam perjalanan, supaya harta itu jangan beredar di antara orang-orang Kaya saja di antara kamu. apa yang*

*diberikan Rasul kepadamu, Maka terimalah. dan apa yang dilarangnya bagimu, Maka tinggalkanlah. dan bertakwalah kepada Allah. Sesungguhnya Allah Amat keras hukumannya ( Q.S Al Hasyr : 7).*

Anjuran pengobatan yang diajarkan Rasulullah SAW, perlu kita contoh dan diterapkan. Sebagai khalifah di muka bumi, manusia dibekali akal oleh Allah SWT, disamping sebagai instink yang mendorong manusia untuk mencari segala sesuatu yang di butuhkan untuk melestarikan hidupnya seperti makan, minum dan tempat berlindung. Dalam mencari hal-hal tersebut, manusia akan mendapat pengalaman yang baik dan yang kurang baik maupun yang membahayakan. Maka akal lah yang mengolah, meningkatkan serta mengembangkan pengalaman tersebut untuk memperoleh hasil yang lebih baik. Banyak ayat Alqur'an yang mengisyaratkan tentang pengobatan karena Alqur'an itu sendiri diturunkan sebagai penawar dan rahmat bagi orang-orang mukmin. Allah berfirman :

خَسَارًا إِلَّا الظَّالِمِينَ يَزِيدُ وَلَا لِلْمُؤْمِنِينَ وَرَحْمَةً شِفَاءً هُوَ مَا الْقُرْآنُ مِنْ وَنُزِّلُ

*Artinya :“Dan kami menurunkan Al-Qur'an sebagai penawar dan rahmat bagi orang-orang yang mukmin”.(QS Al-Isra': 82).*

Menurut para ahli tafsir bahwa nama lain dari Alqur'an yaitu “Asyasyifa” yang artinya secara terminologi adalah obat penyembuh. “Hai manusia, telah datang kepadamu kitab yang berisi pelajaran dari Tuhan mu dan sebagai obat

*penyembuh jiwa, sebagai petunjuk dan rahmat bagi orang-orang yang beriman”.*(QS Yunus:57).

Alqur’an tidak hanya menjelaskan tentang pengobatan akan tetapi juga menceritakan tentang keindahan alam semesta yang dapat kita jadikan sumber dari pembuat obat-obatan. Allah berfirman :

بَلِّغُوا لَهُمْ آيَاتِهِ ذَلِكُمْ فَانكروا إِنَّ آيَاتِ اللَّهِ لَتُكذَّبُونَ  
بَلِّغُوا لَهُمْ آيَاتِهِ ذَلِكُمْ فَانكروا إِنَّ آيَاتِ اللَّهِ لَتُكذَّبُونَ

*Artinya : “Dengan (air hujan) itu Dia menumbuhkan tanaman-tanaman untukmu, seperti zaitun, kurma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang-orang yang berfikir.(QS An-Nahl:11).*

Berdasarkan uraian diatas diketahui bahwa ayat – ayat yang terdapat dalam Alqur’an maupun As-Sunnah terbukti secara ilmiah bahwa tumbuh-tumbuhan juga berpotensi sebagai obat, dan hal itu sudah lama di ajarkan pada zaman Rosulullah SAW. Penerapan pengobatan yang telah diterapkan sejak zaman Rasulullah ini dapat dijadikan sebagai bukti bahwa Al-quran dan segala yang telah Rasul ajarkan adalah benar adanya. Namun hanya orang-orang yang memfungsikan akal pikirannya dengan benar yang dapat melihat kebenaran ini. Oleh sebab itu, penerapan pengobatan yang diterapkan Rasul ini dapat membuka mata hati setiap manusia untuk menampik keraguannya terhadap Alqur’an dan As-sunnah sehingga dapat meningkatkan keimanannya.



## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut

1. Pemberian PEG 6000 berpengaruh terhadap peningkatan kandungan senyawa isoflavon pada kultur kalus beberapa varietas kedelai. Semakin tinggi konsentrasi PEG 6000 dapat meningkatkan kandungan isoflavon. Kandungan senyawa isoflavon tertinggi dihasilkan oleh kultur kalus varietas Grobogan pada konsentrasi 60 g/l yaitu sebanyak 6179,1 ppm/ gr berat basah.
2. Perbedaan varietas berpengaruh terhadap kandungan isoflavon. Varietas Grobogan merupakan varietas yang menghasilkan senyawa isoflavon tertinggi, jika dibandingkan pada varietas Tanggamus dan varietas Wilis.

#### **5.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan penambahan lama pengamatan untuk mengetahui fase-fase dalam produksi isoflavon.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar daidzein dan genistein pada kalus beberapa varietas kedelai tersebut.

3. Perlu penelitian lebih lanjut pada varietas kedelai yang lain.
4. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai penambahan konsentrasi dengan waktu pemanenan yang dipercepat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Asih. 2005. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (Glycine max)* . Bukit Jimbaran : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.
- Astutik. S. 2007. *Pengaruh Varietas Kedelai (Glycine max) Terhadap Pertumbuhan Kalus Dan Kandungan Senyawa Isoflavon (Daidzein dan Genistein)*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang. Jurusan Biologi Lingkungan Fakultas dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Malang.
- Aljazairi, S.A.B.J. 2007. *Tafsir Alqur'an Anasair*. Jakarta : Darus Sunah Press.
- Abidin, Z. 1987. *Dasar Pengetahuan Ilmu Tanaman*. Bandung : Angkasa.
- Al-Qarni, A. 2008. *Tafsir Muyasar, Jilid I*. Terjemahan Tim Qisthi Press. Jakarta: Qisthi Press.
- Abidin, Z. 1983. *Dasar-Dasar Penegetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Angkasa.
- Aak. 1989. *Kacang Tanah dan Kedelai*. Kanisius : Yogyakarta dalam I. A. R. Astiti Asih. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (Glycine max)* . Bukit Jimbaran : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.
- Bulgakov, V. P, G. K Tehernoded, N. P. Mischenko, Yu. N. Shkryl, V. P. Glazunov, S. A. Fedoreyev dan Yu. N. Zhuravlev. 2003. *Increase in Anthraquinonane Content in Rubia cordifolia Cell Transformed by rol Genes Does Not Involve Activation of the NADPH Oxidase Signaling Pathway*. Biochemistry (Moscow). 68 (7) : 795-801.

- Bajaj, Y.P.S. 1988. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4, Medicinal and Aromatic Plants I*. Springer Verlag. New York, London, Paris: Berlin Heidelberg.
- Bhat, S. V., B.A. Nagasampi dan M. Sivakumar. 2005. *Chemistry of Natural Products*. Narosa Publishing House. New Delhi.
- Chawla, H. S. 2002. *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publisher. Inc. USA.
- Charlton, S. 2004. *TLSee Manual*. Charlton Scientific Independent Laboratory Suppliers.
- Chen X. 2002. Isovlafores and Bone: Animal and Human Evidence of Efficacy : A Review Article, *J. Musculoskel Neuron Interact*. 2 (4) : 352-359.
- Clark, J. 2007. Thin Layer Chromatography. [www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk). Tanggal akses Januari 2010.
- Dixon, R. A. 1985. *Plant cell Culture A Practical Approach*. Washington DC: Department of Biochemistry, Royal Holloway College. IRL Press Oxford.
- Dian. R. W. 2005. *Skrining In Vitro Untuk Toleransi Terhadap Cekaman Kekeringan Dengan Menggunakan Polyetylena Glycol Pada Beberapa Varietas Kedelai (Glycin max (L.) Merr.) Berdaya Hasil Rendah. Tugas akhir* Tidak Diterbitkan. Malang. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Brawijaya.
- Doods, J. H. dan Robert, I. W. 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press

Fitriani, A. 2003. *Kandungan ajmalisin pada kultur kalus Catharanthus roseus (L) G. Don setelah Dielistasi homogen jamur phythium aphanidermatum edson fitzp.* Diakses pada tanggal 1 November 2009.

[http://tumoutou.net/6\\_sem2\\_023/any\\_fitriani.htm](http://tumoutou.net/6_sem2_023/any_fitriani.htm).

Firdiana. 2008. Pengaruh elisitor ion logam  $AL^{3+}$  dan  $Pb^{2+}$  pada akumulasi senyawa isoflavon daizein dan genistein kalus kacang tanah (*Arachis hypogea* L). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Gunawan, L. W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman: PAU IPB.

Golonder, C. 1992. *Properties of Immobilized Peg Film and The Interaction with Protein*. Pleum Prees New york. 185.p.

Harborne. J, B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Bandung : Penerbit ITB.

Herbert, R. B. 1995. *Biosintesis Metabolisme Sekunder Edisi kedua*. Alih Bahasa Bambang Srigandono. Semarang : IKIP Semarang Press.

Hendrik. 2009. *Habbatus Sauda'. Tibbun Nabawiy Untuk Mencegah dan Mengobati Berbagai Penyakit*. Solo: Pustaka Iltizam

Hendaryono, dan Wijayani. 1998. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.

Hernawati .2001. *Perbaikan kinerja reproduksi akibat pemberian Isoflavon dari tanaman kedelai*Jurusan. Jurnal. Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

Hendaryono, D. P. S dan Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif Modern*. Yogyakarta: Kanisius.

Heinnermen, J. 2003. *Khasiat Kedelai Bagi Kesehatan Anda*. Prestasi Pustakarya: Jakarta dalam I. A. R. Astiti Asih. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (Glycine max)* . Bukit Jimbaran : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.

Herdiansyah. 2007. *The Miracle, Mengungkap Rahasia Makanan Dan Minuman Berhasiat*. Jakarta : Zikrul.

Hidayat, O.S. 1985. *Morfologi tanaman kedelai. Dalam kedelai. Badan penelitian dan pengembangan pertanian*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan.

Jedinak, A, J. Farago, I Psenakova dan T. Maliar. 2004. *Approaches to Flavonoid Production in Plant Tissue Culture*. Biol., Bratislava. 59 : 697-710.

Kadir, A. 2006. *Induksi dan Perbanyakkan Populasi Kalus, Regenerasi Tanaman Serta Uji Respon Kalus Terhadap Konsentrasi PEG dan Dosis Iradiasi Sinar Gamma*. Makassar. Fakultas Pertanian Universitas Islam Makassar.

Katuuk. 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman. Jurusan Budidaya Pertanian*. Yogyakarta : Fapetra UGM.

Kalefetoğlu & Ekmekçi. 2005 dalam Asypini Yusi. 2008. *Peroksidase Lipid Aktifitas Glutation Reduktase dan Kandungan Prolin Pada Tanaman Kedelai dan Jagung yang mendapat cekaman kekeringan & herbisida Praquat*. Jurnal. Departemen Biologi Fakultas MIPA IPB. Bogor

Lawyer, D.W. 1970. *Absorption of PEG by plant enther effect on plant growth*. New Physiol. 69:501-503.

Lamina. 1989. *Kedelai dan Pengembangannya*. Jakarta : CV. SIMPLEX dalam I. A. R. Astiti Asih. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (Glycine max)* . Bukit Jimbaran : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.

Liu, K. S. 1999. *Soybeans: Chemistry, Teknologi and Utilization*. An Aspen Publication dalam I. A. R. Astiti Asih. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (Glycine max)* . Bukit Jimbaran : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.

Michel, B.E and M.R Kaufman. 1973. *The Osmotic Potential of PEG 6000*. Plant Physiol.

Markham, K.R. 1988. Cara mengidentifikasi flafonoid. Alih bahasa : Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB : Bandung.

Pawiroharsono, S. 2001. *Prospek Dan Manfaat Isoflavon Pada Kalus Yang Berasal Dari Dua Macam Eksplan Kedelai (Glycine max Merr)*. Skripsi. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Islam Malang. Malang.

Parti. 2004. Identifikasi senyawa isoflavon pada *Kalus Yang Berasal Dari Dua Macam Eksplan Kedelai (Glycine max Merr)*. Skripsi. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Islam Malang. Malang.

Pangastuti, E.H. 2002. Analisis Komposisi Isoflavon Dalam Daging dan Kulit Umbi Tebi (*Pueraria lobata*) Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Skripsi. Tidak diterbitkan. Jurusan Kimia, FMIPA. Universitas Brawijaya : Malang.

Rao, R. 2002. Biotechnological Production of Phytopharmaceuticals. J. Biochem. Mol. Bio. Biophys. 4: 73- 102.

Rahayu T. 2005. *Usul Penelitian Hibah Bersaing XIV Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2005 : Produksi Estrogen Nabati Berupa Isoflavon Genistein dan Daidzein Melalui Kultur Kalus Kedelai (Glycine max Merr)*. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Islam Malang. Malang.

Rahayu, T, Yetti dan Parti. 2000. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Kultur In Vitro Kalus Kedelai dan In Vivo Biji Kedelai dengan KLT. Jurnal Hayati.

Rahmawati, P. D. 2007. *Pengaruh Konsentrasi 2,4 D Terhadap Pertumbuhan Dan Kandungan Senyawa Isoflavon (Daidzein Dan Genistein) Dari Kalus Kedelai (Glycine max Merr)*. Skripsi Jurusan Biologi Lingkungan Fak. MIPA UNISMA. Malang

Salisbury, F.B. dan C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan I*. Penerjemah: Lukman, D.R. dan Sumaryono. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Santoso, U, dan F. Nursandi. 2001. *Kultur Jaringan Tanaman*. UMM Press : Malang

Susila S.D. 2003. *Kedelai, Deskripsi, Budidaya dan Sertifikasi Benih*. Surabaya : Expert JICA-SSP.

Steenis. 1988. *Flora*. Jakarta : PT Pradnya Paramita.

Street, H. E. 1972. *Plant Tissue and Cell Culture*. England: Botanical Laboratories. University of Leicerster.

Samsudin dan D.S Djakamiharjo. 1985. *Budidaya Kedelai*. Bandung : Pustaka Buana.

Suprpto. H.S. 1997. *Bertanam kedelai*. Jakarta : Penebar Swadaya.

Sukmaningrum, A. 2006. *Pengaruh Ion Logam Co, Cu, dan Mn Terhadap Akumulasi Isoflavon Pada Kalus Bengkoang*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Universitas brawijaya Malang.

Street, H. E. 1972. *Plant Tissue and Cell Culture*. England: Botanical Laboratories. University of Leicerster.

Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro*. Yogyakarta: Kanisius.

Savitri, E. S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*, Malang : UIN Press.

Staba, E. J. 1988. *Plant Tissue Culture as Source of Biochemical*. Florida: CRC Press Inc. Boca Raton. Wetherell, D. F. (Penerjemah: Koensumardiyah).

1982. *Pengantar Propagasi Tanaman Secara in Vitro*. New Jersey: Avery Publishing Group Inc.

Trilaksani, 2003 dalam Pawiroharsono, 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon Untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.

Taiz dan Zeigler. 2000 dalam Peni. 2007. *Pengaruh Konsentrasi 2,4 D Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Senyawa Isoflavon dari Kalus Kedelai*. Skripsi Jurusan Biologi Lingkungan Fak. MIPA UNISMA. Malang

Utomo. 2000. *Pengaruh Kadar Garam Terhadap Akumulasi Isoflavon Tumbuhan Kacang Hijau (*Phaeolus aureus* Roxb) dan Kacang Tanah (*Arachis hypogea*)*. Jurnal. Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.

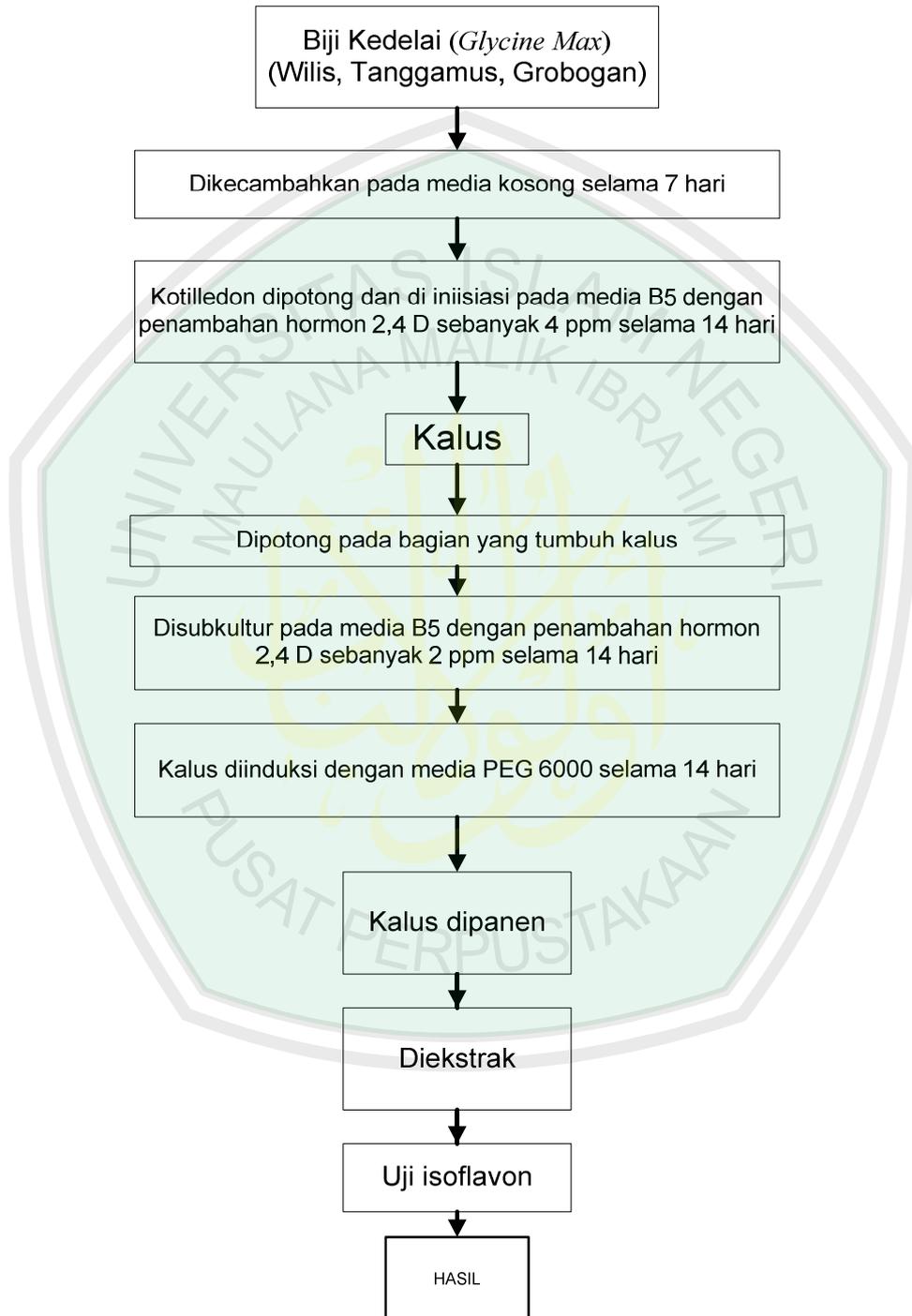
Winata, L. G. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor: Dirjen Perguruan Tinggi PAK Bioteknologi IPB.

Wetter, L.R., dan Constabel, F. 1991, *Metode Kultur Jaringan Tanaman Edisi kedua*. Bandung: Penerbit ITB.

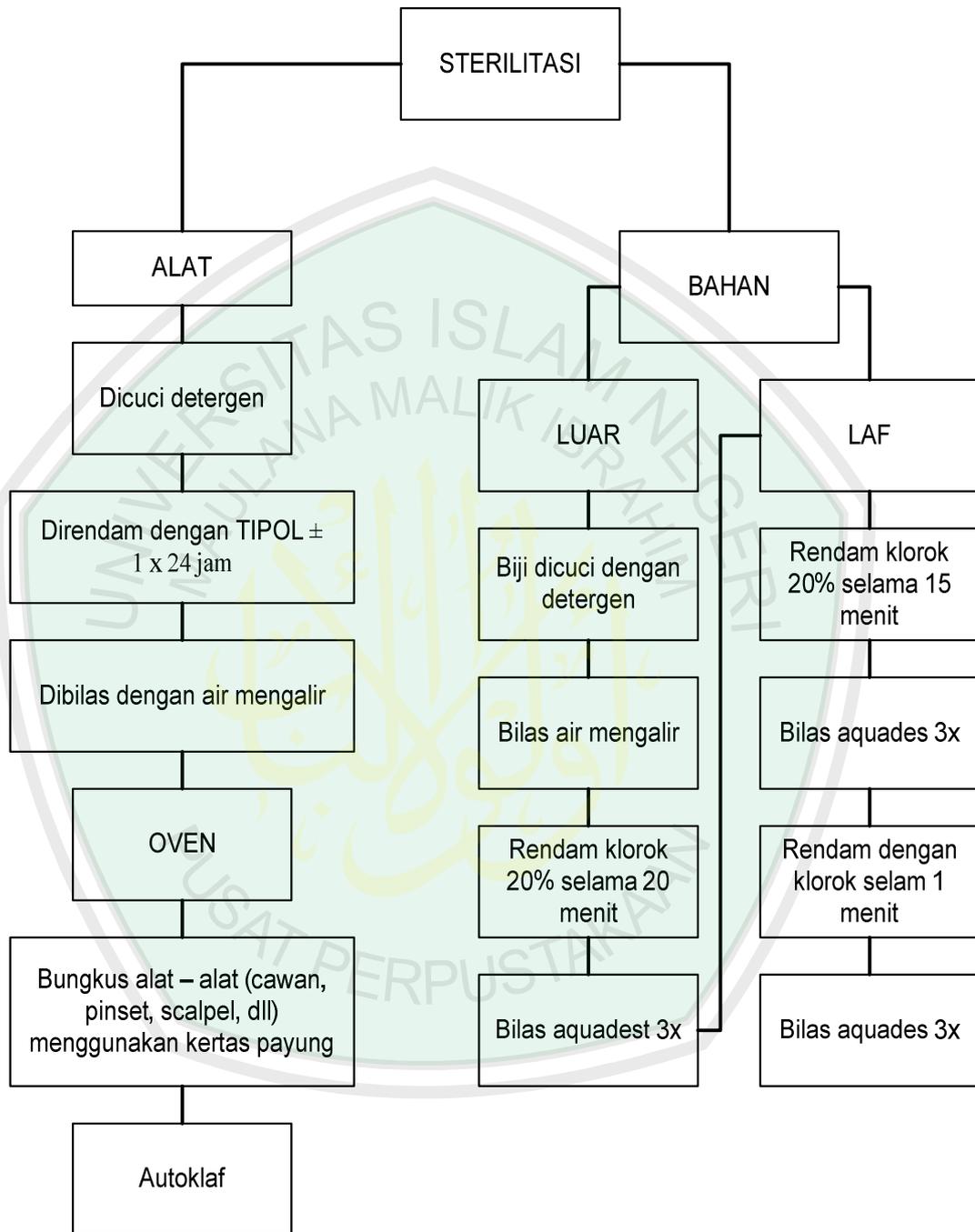
Wattimena, G. A. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU IPB.

.Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara

Lampiran 1. Alur Kerja Peneliti

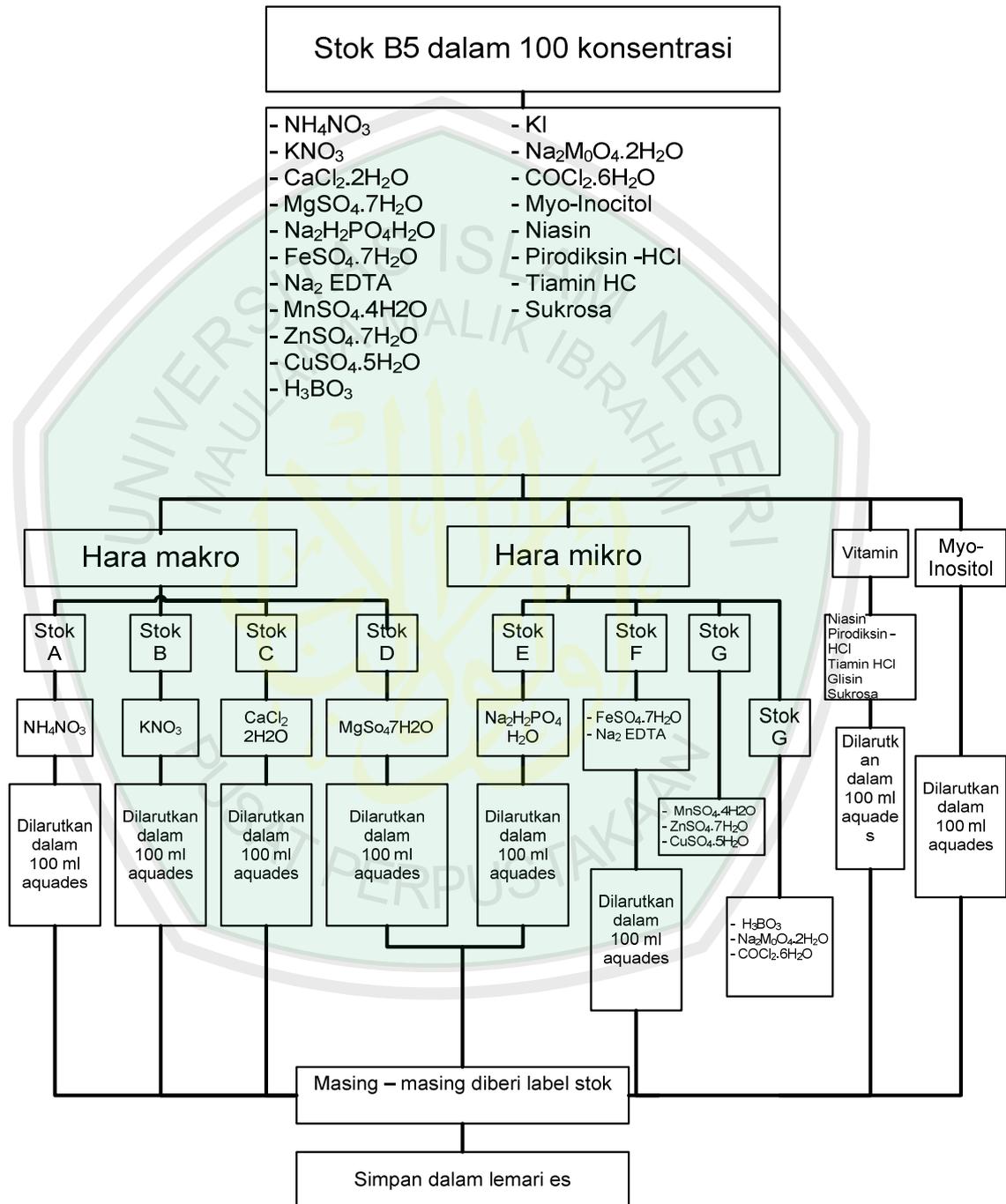


Lampiran 2. Proses Sterilisasi



NB : Untuk sterilisasi botol langsung disimpan tanpa diautoklaf kecuali akan digunakan dalam LAF

Lampiran 3. Komposisi Larutan Stok Media B5



#### Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi PEG

1. **Konsentrasi PEG 20 gr/L**

$$\frac{20}{1000} = \frac{x}{252}$$

$$x = \frac{5000}{1000}$$

$$x = 5.04 \quad am$$

2. **Konsentrasi PEG 40 gr/L**

$$\frac{40}{1000 \text{ m}} = \frac{x}{252}$$

$$x = \frac{10080}{1000 \text{ m}}$$

$$x = 10.08 \quad am$$

3. **Konsentrasi PEG 60 gr/L**

$$\frac{60}{1000 \text{ m}} = \frac{x}{252}$$

$$x = \frac{15120}{1000 \text{ m}}$$

$$x = 15.12 \quad am$$

Keterangan : 252 = Jumlah media yang digunakan

x = Konsentrasi PEG 6000 yang dicari

Lampiran 4.DeskripsiKedelaiVarietas (Wilis, Tanggamus, danGrobogan)

**Wilis**

Dilepas tahun	: 21 Juli 1983
SK Mentan	: TP 240/519/Kpts/7/1983
Nomor induk	: B 3034
Asal	: hasilseleksiketurunanpersilanganOrba X no. 1682
Hasil rata-rata	: 1,6 t/ ha
Warna hipokotil	: Ungu
Warnabatang	: Hijau
Warnadaun	: Hijau-hijautua
Warnabulu	: Coklattua
Warnabunga	: Ungu
Warnakulitbiji	: Kuning
Warnapolongtua	: Coklattua
Warnahylum	: Coklattua
Tipetumbuh	: Determinet
Umurberbunga	: ±39 hari
Umur matang	: 85-90 hari
Tinggi tanaman	: ±50 cm
Bentukbiji	: Oval, agakpipih
Bobot 100 biji	: ±10 g
Kandungan protein	: 37,0 %
Kandungan minyak	: 18,0 %
Kerebahan	: Tahan rebah
Ketahanan terhadap penyakit	: Agak tahan karat daun dan virus
Benih penjenis	: Dipertahankan di Balittan Malang dan Bogor

Pemulia : Sumarno, Darman M Arsyad, Rodiah dan Ono Sutrisno

### TANGGAMUS

Dilepas tahun : 22 Oktober 2001  
SK Mentan : 536/Kpts/TP.240/10/2001  
Nomor induk : K3911-66  
Asal : Hibrida (persilangantunggal) ;Kerinci X No. 3911  
Hasil rata-rata : 1,22 t/ ha  
Warna hipokotil : Ungu  
Warna epikotil : Hijau  
Warna Kotiledon : Kuning  
Warnabulu : Coklat  
Warnabunga : Ungu  
Warnakulitbiji : Kuning  
Warnapolongmasak : Coklat  
Warna hylum : Coklat tua  
Bentuk biji : Oval  
Bentukdaun : Lancet  
Tipe tumbuh : Determinet  
Umur berbunga : 35 hari  
Umur saat panen : 88 hari  
Tinggitanaman : 67cm  
Percabangan : 3-4 cabang  
Bobot 100 biji : 11,0 g  
Ukuranbiji : Sedang  
Kandungan protein : 44,5 %

Kandungan lemak : 12,9 %  
Kandungan air : 6,1 %  
Kerebahan : Tahan rebah  
Ketahanan terhadap penyakit : Moderat karat daun  
Sifat-sifat lain : Polongtidakmudahpecah  
Wilayah adaptasi : LahanKeringmasam  
Pemulia : Muchlish Adie, HeruKuswantoro, Darman MA danPurwantoro

### GROBOGAN

Dilepastahun : 2008  
SK Mentan : 238/Kpts/SR.120/3/2008  
Asal : Pemurnianpopulasi local Malabar Grobogan  
Tipe tumbuh : Determinet  
Warnahipokotil : Ungu  
Warnaepikotil : Ungu  
Warnadaun : Hijauagaktua  
Warnabulubatang : Coklat  
Warnabunga : Ungu  
Warnakulitbiji : Kuningmuda  
Warnapolongtua : Coklat  
Warnahylum : Coklat  
Bentukdaun : Lancet  
Percabangan : -  
Umurberbunga : 30-32 hari  
Umurpolongmasak : ±76 hari  
Tinggitanaman : 50-60 cm

Bobot 100 biji	: ±18g/100 biji
Hasil rata-rata	: 2,77 t/ ha
Potensi hasil	: 3,40 t/ha
Ukuran biji	: Sedang
Kandungan protein	:43,9 %
Kandungan lemak	: 18,4 %
Daerah sebaran	: Beradaptasi baik pada beberapa kondisi lingkungan tumbuh yang berbeda cukup besar, pada musim hujan dan daerah beririgasi baik
Sifat lain	: Polong masak tidak mudah pecah dan saat panen >95% daun luruh
Pemulia	: Suhartini dan Muchlis Adie
Peneliti	: Adisarwanto, Sumarsono, Sunardi, Tjandramukti, Ali Muchtar, Sihono, Purwanto, Siti Khawarij, Murbantoro, Alrodi, Tino Vihara
Pengusul Tengah	: Pemerintah Daerah KabutenGrobogan BPSB Jawa

Lampiran5 . Data Uji Isoflavon Kalus Beberapa Varietas Kedelai

Varietas	Kons PEG 6000	Ulangan	m smpl	absorbansi	Isoflavon (ppm)
Wilis	0 gr/l	1	0.203	0.322	3812.343
		2	0.208	0.376	4344.668
		3	0.203	0.345	4084.653
	20 gr/l	1	0.206	0.396	4620.193
		2	0.207	0.388	4504.986
		3	0.201	0.436	5213.418
	40 gr/l	1	0.204	0.462	5443.070
		2	0.208	0.438	5061.076
		3	0.209	0.411	4726.369
	60 gr/l	1	0.203	0.482	5706.675
		2	0.205	0.465	5451.691
		3	0.201	0.439	5249.290
Tanggamus	0 gr/l	1	0.202	0.328	3902.605
		2	0.207	0.345	4005.722
		3	0.208	0.378	4367.778
	20 gr/l	1	0.202	0.366	4354.736
		2	0.206	0.389	4538.522
		3	0.203	0.348	4120.172
	40 gr/l	1	0.201	0.406	4854.696
		2	0.205	0.416	4877.211
		3	0.204	0.415	4855.255
	60 gr/l	1	0.207	0.455	5282.909
		2	0.203	0.475	5623.798
		3	0.202	0.466	5544.554
Grobogan	0 gr/l	1	0.207	0.363	4214.717
		2	0.206	0.357	4165.174
		3	0.202	0.34	4045.383
	20 gr/l	1	0.208	0.425	4910.862
		2	0.203	0.394	4664.792
		3	0.201	0.435	5201.461
	40 gr/l	1	0.209	0.479	5508.348
		2	0.203	0.526	6227.616
		3	0.205	0.501	5873.757
	60 gr/l	1	0.204	0.526	6197.088
		2	0.201	0.511	6110.221
		3	0.206	0.534	6230.260

Lampiran 6. Perhitungan manual hasil penelitian kandungan isoflavon kalus beberapa varietas kedelai setelah perlakuan

**RAL - ANOVA Faktorial**

Perlakuan		Ulangan			Total	Rata-rata
Kons	Varietas	I	II	III		
0 g/l	Wilis	3812.343	4344.668	4084.653	12241.66	4080.5547
	Tanggamus	3902.605	4005.722	4367.778	12276.11	4092.035
	Gerobogan	4214.717	4165.174	4045.383	12425.27	4141.758
20 g/l	Wilis	4620.193	4504.986	5213.418	14338.6	4779.5323
	Tanggamus	4354.736	4538.522	4120.172	13013.43	4337.81
	Gerobogan	4910.862	4664.792	5201.461	14777.12	4925.705
40 g/l	Wilis	5443.07	5061.076	4726.369	15230.52	5076.8383
	Tanggamus	4854.696	4877.211	4855.255	14587.16	4862.3873
	Gerobogan	5508.348	6227.616	5873.757	17609.72	5869.907
60 g/l	Wilis	5706.675	5451.691	5249.29	16407.66	5469.2187
	Tanggamus	5282.909	5623.798	5544.554	16451.26	5483.7537
	Gerobogan	6197.088	6110.221	6230.26	18537.57	6179.1897
Total		58808.242	59575.48	59512.35	177896.1	

$$x = \frac{\text{total jumlah}}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}}$$

$$= \frac{178194.169}{36} = 4949.838$$

$$= \frac{\text{kuadrat total jumlah}^2}{\text{perlakuan} \times \text{ulangan}}$$

$$= \frac{177896,1}{36}$$

$$= \frac{31647029155}{36}$$

$$= 879084143,2$$

$$\text{JK Total Percobaan} = 3812.343^2 + \dots + 6230,26^2 - Fk = 897026944 - 879084143,2$$

$$= 17942801,29$$

$$\text{JkUlangan} = \frac{58808,24^2 + \dots + 59512,35^2}{12} - Fk$$

$$= \frac{1054372547}{12} - 879084143,2$$

$$= 879114378,9 - 879084143,2$$

$$= 30235,71334$$

$$\text{JK PerlakuanKombinasi} = \frac{12241.664^2 + \dots + 18537,569^2}{3} - Fk$$

$$= 895536796 - 879084143,2$$

$$= 16452653,29$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK Galat} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} - \text{JK Ulangan} \\
 &= 17942801,29 - 16452653,29 - 30235,71334 \\
 &= 1459912,228
 \end{aligned}$$

Kons.PEG	Varietas			JmlhKons. PEG
	Wilis	Tanggamus	Grobogan	
0 g/l	12241,66	12276,11	12425,27	36943,04
20 g/l	14338,6	13013,43	14777,12	42129,15
40 g/l	15230,52	14587,16	17609,72	47427,4
60 g/l	16407,66	16451,26	18537,57	51396,49
JmlhVarietas	56328,008	58218,432	63349,679	177896,08

$$\text{JK P} = \frac{36943,09^2 + \dots + 51396,49^2}{3 \times 3} - \text{Fk}$$

TarafVar x ulangan

$$= \frac{36943,09^2 + \dots + 51396,49^2}{3 \times 3} - \text{Fk}$$

3 x 3

$$= \frac{8030613580}{9} - \text{Fk}$$

9

$$= 892290397,8 - 879084143,2$$

$$= 13206254,61$$

$$JK V = \underline{58218,432^2 + \dots + 63349,679^2} - FK$$

Taraf PEG x ulangan

$$= \underline{58218,432^2 + \dots + 63349,679^2} - FK$$

4 x 3

$$= \underline{10575412139} - 879084143,2$$

12

$$= 881284344 - 879084143,2$$

$$= 2200201,731$$

$$JK PV = JK PerlakuanKombinasi - JK P - JK V$$

$$= 16452653,29 - 13206254,61 - 2200201,731$$

$$= 1046196,954$$

Sk	db	Jk	Kt	Fhit	Ftab
Ulangan	2	30235,71334	15117,8567	0,2278	3,44
Perlakuan	(11)	16452653,29	1495695,754	22,539	2,26
P	3	13206254,61	4402084,868	66,337	3,05
V	2	2200201,731	1100100,865	16,578	3,44
PV	6	1046196,954	174366,1591	2,6275	2,55
Galat	22	1459912,228	66359,64945		
Total	35				

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 0,05 &= 2,074 \times \frac{\sqrt{2 \cdot 66359,6 \cdot 9 \cdot 5}}{3} \\
 &= 2,074 \times 210,3325137 \\
 &= 436,2296334
 \end{aligned}$$

Perlakuan		hasil	Notasi 5%
PEG	Varietas		
0 g/L	Wilis	4080,55467	a
0 g/L	Tanggamus	4092,035	a
0 g/L	Grobogan	4141,758	a
20 g/L	Tanggamus	4337,81	a
20 g/L	Wilis	4779,53233	b
40 g/L	Tanggamus	4925,705	b
20 g/L	Grobogan	5004,93867	b
40 g/L	Wilis	5076,83833	bc
60 g/L	Wilis	5440,569	cd
60 g/L	Tanggamus	5469,21867	cd
40 g/L	Grobogan	5869,907	de
60 g/L	Grobogan	6179,18967	e

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 0,05 \text{ untuk } P &= Q_{0,05 (4 : 22)} \times \frac{\sqrt{KT \text{ Ga } at}}{\text{Ulangan} \times \text{level } V} \\
 &= 3,96 \times \frac{\sqrt{66359,6 \cdot 9 \cdot 5}}{3 \times 3} \\
 &= 3,96 \times 25,64733573 \\
 &= 101,5634
 \end{aligned}$$

Ringkasan BNJ 5% Tentang Pengaruh Dari Penambahan PEG Pada produksi isoflavon kalus beberapa varietas kedelai

Perlakuan P	Rata-Rata	Notasi
0 g/L	4104,7	a
20 g/L	4681,3	b
60 g/L	5269,7	c
40 g/L	5710,7	d

$$\begin{aligned}
 \text{BNJ 5\% untuk V} &= 3,96 \times \frac{\frac{KTGa}{at}}{\text{Ulangan} \times \text{level V}} \\
 &= 3,96 \times \frac{66359,64945}{3 \times 4} \\
 &= 3,96 \times 23,51183585 = 931,0686
 \end{aligned}$$

Ringkasan BNJ 5% Tentang Pengaruh Varietas terhadap produksi isoflavon kalus beberapa varietas kedelai

Perlakuan V	Rata-Rata	Notasi
Tanggamus	4694,3	a
Wilis	4851,5	a
Grobogan	5279,1	b

Lampiran 6. Perhitungan SPSS ANOVA Faktorial

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		data
N		36
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	4.94156E3
	Std. Deviation	7.159987E2
Most Extreme Differences	Absolute	.094
	Positive	.094
	Negative	-.064
Kolmogorov-Smirnov Z		.565
Asymp. Sig. (2-tailed)		.907

a. Test distribution is Normal.

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
peg	1	9
	2	9
	3	9
	4	9
var	1	12
	2	12
	3	12
ulangan	1	12
	2	12
	3	12

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: data

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	8.956E8 <sup>a</sup>	14	6.397E7	963.968	.000
peg	1.321E7	3	4402112.761	66.337	.000
var	2200226.487	2	1100113.243	16.578	.000
peg * var	1046173.473	6	174362.245	2.628	.045
ulangan	30233.407	2	15116.703	.228	.798
Error	1459923.224	22	66360.147		
Total	8.970E8	36			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .997)

### Post Hoc Tests

peg

#### Multiple Comparisons

data

Tukey HSD

(I) peg	(J) peg	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-576.23322	1.214360E2	.001	-913.44102	-239.02542
	3	-1164.92833	1.214360E2	.000	-1502.13613	-827.72053
	4	-1605.93811	1.214360E2	.000	-1943.14591	-1268.73031
2	1	576.23322	1.214360E2	.001	239.02542	913.44102
	3	-588.69511	1.214360E2	.000	-925.90291	-251.48731
	4	-1029.70489	1.214360E2	.000	-1366.91269	-692.49709
3	1	1164.92833	1.214360E2	.000	827.72053	1502.13613
	2	588.69511	1.214360E2	.000	251.48731	925.90291
	4	-441.00978	1.214360E2	.007	-778.21758	-103.80198
4	1	1605.93811	1.214360E2	.000	1268.73031	1943.14591
	2	1029.70489	1.214360E2	.000	692.49709	1366.91269
	3	441.00978	1.214360E2	.007	103.80198	778.21758

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 66360.147.

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Homogeneous Subsets

data

Tukey HSD

peg	N	Subset			
		1	2	3	4
1	9	4.10478E3			
2	9		4.68102E3		
3	9			5.26971E3	
4	9				5.71072E3
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 66360.147.

var

## Multiple Comparisons

data

Tukey HSD

(I) var	(J) var	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	157.53950	1.051667E2	.311	-106.64578	421.72478
	3	-427.60392	1.051667E2	.001	-691.78920	-163.41863
2	1	-157.53950	1.051667E2	.311	-421.72478	106.64578
	3	-585.14342	1.051667E2	.000	-849.32870	-320.95813
3	1	427.60392	1.051667E2	.001	163.41863	691.78920
	2	585.14342	1.051667E2	.000	320.95813	849.32870

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 66360.147.

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### Homogeneous Subsets

data

Tukey HSD

var	N	Subset	
		1	2
2	12	4.69400E3	
1	12	4.85154E3	
3	12		5.27914E3
Sig.		.311	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 66360.147.

### Post Hoc Tests

interaksi

### Homogeneous Subsets

data

Duncan

interaksi	N	Subset				
		1	2	3	4	5
1	3	4.08055E3				
2	3	4.09204E3				
3	3	4.14176E3				
5	3	4.33781E3				
4	3		4.77953E3			
8	3		4.86239E3			
6	3		4.92570E3			
7	3		5.07684E3	5.07684E3		
10	3			5.46922E3	5.46922E3	
11	3			5.48375E3	5.48375E3	
9	3				5.86991E3	5.86991E3
12	3					6.17919E3
Sig.		.259	.193	.069	.073	.142

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

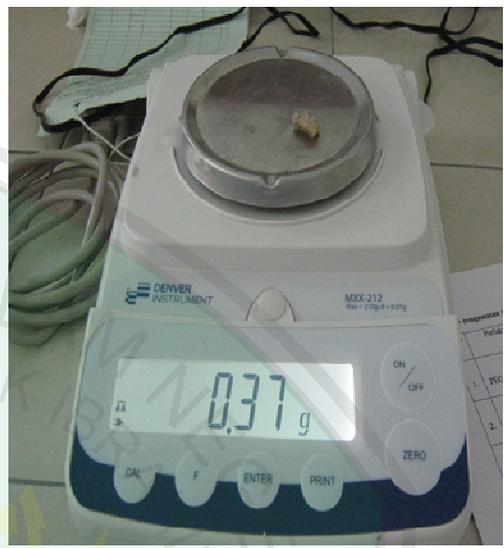
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 62089.860.

Lampiran 7. Alat – Alat kultur Jaringan Tumbuhan



Autoklaf Digital



Timbangan Analitik



pH meter



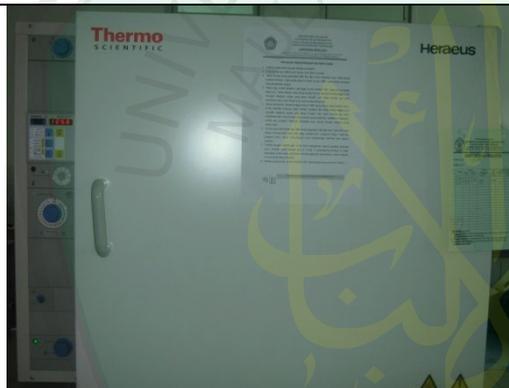
Hot Plate



Rak Kultur



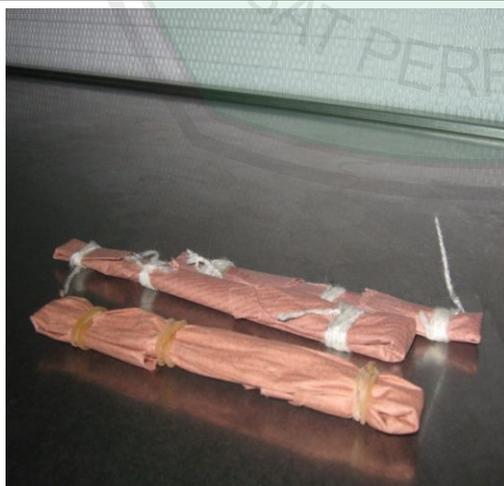
Laminar Air Flow



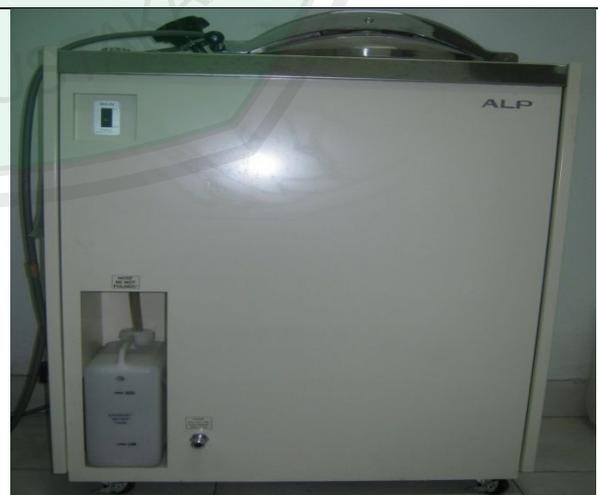
Oven



Kulkas



Pinset



Autoklaf

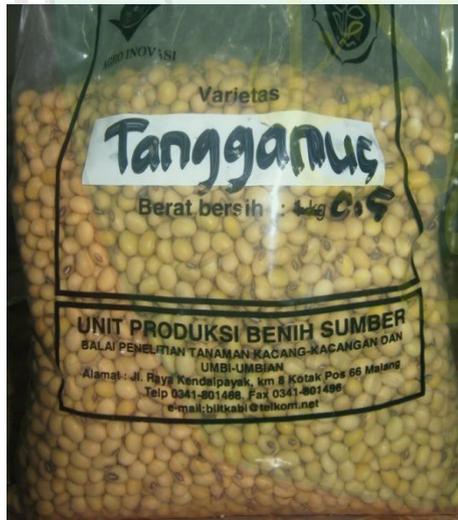
Lampiran 8. Bahan-bahan Kultur Jaringan Tanaman



PEG



Bahan Tanam



Sampel Biji Kedelai

Lampiran 9. kegiatan Penelitian



Pembuatan Stok



Penanaman eksplan



Penimbangam bahan



Sub kultur