



**EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI CONCANAVALIN A
DARI KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)**

SKRIPSI

Oleh

**Nirmala Yulisningati
NIM 121710101064**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI CONCANAVALIN A
DARI KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

oleh

Nirmala Yulisningati
NIM 121710101064

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT atas segala rahmat, hidayah serta inayahNya sehingga pada akhirnya diberikan kelancaran dalam menyelesaikan skripsi ini. Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda Martulis dan Ibunda Yulmina atas cinta dan kasih yang selalu mengalir tanpa batas, selalu sabar, mendoakanku dan selalu memberikan dukungan dalam segala hal;
2. Nenekku Alm. Khoiriyah, kakekku Alm. Nazar dan Kamar yang pernah mengajarkan apa arti hidup dan rasa kasih sayang yang tulus;
3. Adikku Candrani Yulis Rohmatulloh dan Adikku Maulidina Yulis Rohimah yang selalu memberikan dukungan dan senyuman padaku;
4. Keluarga besar Yulis serta para sahabat yang selalu memberikan semangat dimanapun dan kapanpun;
5. Pembimbing dan guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
6. Jajaran Dekanat Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
7. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

MOTTO

“Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhanmu yang Menciptakan, Dia telah menciptakan manusia dari segumpal darah. Bacalah, dan Tuhanmu yang Maha Pemurah. Yang mengajarkan (manusia) dalam perantara kalam. Dia mengajarkan kepada manusia apa yang tidak diketahuinya.”

(QS. Al-‘Alaq, {96} : 1-5)

“Apa gunanya ilmu kalau tidak memperluas jiwa seseorang sehingga ia berlaku seperti samudera yang menampung sampah-sampah? Apa gunanya kepandaian kalau tidak memperbesar kepribadian manusia sehingga ia makin sanggup memahami orang lain?”

(Emha Ainun Nadjib/Cak Nun)

“Teruslah berkarya dan berproses sampai tak bisa lagi melihat jejak”

(Penulis)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nirmala Yulisningati

NIM : 121710101064

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Ekstraksi dan Karakterisasi Concanavalin A dari Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.)**” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Dengan pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 11 Mei 2017

Yang menyatakan,

Nirmala Yulisningati

NIM.121710101064

SKRIPSI

**EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI CONCANAVALIN A
DARI KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)**

oleh

**Nirmala Yulisningati
NIM 121710101064**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : **Ahmad Nafi', S.TP., M.P.**

Dosen Pembimbing Anggota : **Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P.**

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Ekstraksi dan Karakterisasi Concanavalin A dari Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.)” karya Nirmala Yulisningati NIM 121710101064 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada :

Hari, tanggal :

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Ahmad Nafi’, S.TP., M.P.
NIP. 197804032003121003

Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P.
NIP. 196507081994032002

Tim Penguji,

Ketua

Anggota

Dr. Triana Lindriati S.T., M.P.
NIP. 196808141998032001

Nurul Isnaini Fitriyana S.TP., M.P.
NIP. 197809202012122001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Dr. Siswoyo Soekarno S.TP., M.Eng.
NIP. 196869231994031009

RINGKASAN

Ekstraksi dan Karakterisasi Concanavalin A dari Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.); Nirmala Yulisningati, 121710101064; 2017; 55 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.) merupakan salah satu komoditas pertanian yang memiliki potensi besar sebagai alternatif bahan pangan pokok berbasis bahan lokal yang tidak banyak dimanfaatkan padahal koro pedang memiliki kandungan karbohidrat sebesar 70,2 g/100 g berat kering dan protein paling tinggi sebesar 21,7% dibandingkan dengan jenis koro lainnya seperti koro komak (*Lablab purpureus*) dan kratok (*Phaseolus lunatus*) masing-masing sebesar 17,1% dan 14,1%. Koro pedang memiliki kandungan dan manfaat komponen bioaktif dimana merupakan sumber senyawa fenolik dan flavonoid yang keduanya memiliki aktifitas anti oksidan sebagai penangkal radikal bebas yang sangat efektif. Di dalam biji koro pedang mengandung senyawa anti gizi yang paling tinggi yaitu Concanavalin A (Con A) sebanyak 1500-3500 mg/100 g yang memiliki manfaat fungsional, yakni sebagai molekul anti viral dan imuno modulator untuk terapi kanker.

Koro pedang dapat dibuat menjadi tepung koro pedang, dan *Modified Legume Flour* (MOLEF). Ketiga sumber bahan tersebut sangat diharapkan masih mengandung concanavalin A agar ketika dalam pengolahannya nanti dapat merasakan manfaat dari komponen bioaktif tersebut. Total Con A akan berbeda dalam setiap sumber bahan, sehingga perlu diketahui karakterisasi Con A didalamnya menggunakan teknik ekstraksi yang sesuai. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui teknik yang terbaik pada ekstraksi Concanavalin A berbahan biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF koro pedang.

Penelitian ini dilakukan dengan tiga tahap, yaitu tahap ekstraksi concanavalin A, purifikasi concanavalin A, dan karakterisasi concanavalin A. Rancangan penelitian menggunakan 2 faktor dengan 3 pengulangan. Faktor-faktor yang digunakan yaitu faktor pertama yaitu variasi bahan; biji koro pedang, tepung koro pedang) dan MOLEF koro pedang dan faktor kedua yaitu variasi suhu

ekstraksi; 27°C, 40°C, dan 50°C. Pengujian yang dilakukan meliputi total protein, kadar protein terlarut, rendemen hasil ekstraksi concanavalin A, total concanavalin A, dan berat molekul. Pengolahan data penelitian menggunakan uji deskriptif yang dilengkapi dengan data dalam bentuk tabel, grafik, dan histogram serta dikomparasi dengan studi literatur.

Hasil analisis menunjukkan bahwa variasi bahan dan suhu ekstraksi menghasilkan total concanavalin A yang berbeda. Perlakuan terbaik yaitu pada suhu ekstraksi 27°C dikarenakan struktur sekunder dan tersier yang terdapat dalam struktur protein masih terjaga dengan baik dibandingkan pada saat ekstraksi suhu 40°C dan 50°C selama 12 jam, dengan nilai terbesar total protein pada koro pedang 36.80%, kadar protein terlarut pada MOLEF 26,43 mg/ml, rendemen hasil ekstrak Con A pada biji koro pedang 20,4%, total concanavalin A pada MOLEF koro pedang 10,15 mg/g. Berat molekul concanavalin A terlihat di pita gel menggunakan konsentrasi gel 15% pada *eluted* tepung koro pedang, MOLEF dan biji koro pedang berturut-turut adalah 32,54 kDa, 34,68 kDa, dan 33,60 kDa.

SUMMARY

Extraction and Characterization of Concanavalin A from Jack Bean (*Canavalia ensiformis* L.); Nirmala Yulisningati, 121710101064; 2017; 55 pages; Departement of Agricultural Product Technology Faculty of Agricultural Technology University of Jember.

Jack bean (*Canavalia ensiformis* L.) is one of the agricultural commodities that show great potency as an alternative of food ingredients which is under-utilized legumes, even though it has high carbohydrate content of 70,2 g / 100 g (db) and protein of 21,7 g / 100 g (db), compare with the other legumes such as *Lablab purpureus* and *Phaseolus lunatus* which the value respectively 17,1% and 14,1%. Jack bean contains bioactive components which are sources of phenolic compounds and flavonoids and both have anti-oxidant activity as an effective antidote to free radicals. Jack bean contains the highest anti-nutrient compounds, called Concanavalin A (Con A). It contains 1500-3500 mg / 100 g which has functional benefits as anti-viral molecules and immuno modulators for cancer therapy.

Jack bean has been developed as food ingredient such as protein rich flour and *Modified Legume Flour* (MOLEF). All three sources of the materials are expected still containing the benefits of concanavalin A after the processing. Total of concanavalin A in each sources are different, thus need to know the characterization of Con A using the appropriate extraction technique. The objective is obtaining the best technique on extraction of concanavalin A from the jack bean seed, jack bean flour, and *modified legume flour* (MOLEF). This research was conducted in three stages, they are the extraction of concanavalin A, purification of concanavalin A, and the characterization of concanavalin A. In order to adrese the objectives, a factorial research design was applied. The experiments used 2 factors with 3 repetetions. The factors are factor materials sources; jack bean seeds, jack bean flour, and MOLEF, and factor temperature of extraction, 27°C, 40°C, 50°C. The assay are total protein, the solubility of protein

content, yield of Con A extract, total of Con A and weight molecular. Data research using descriptive test equipped, the data served on form of tables, graphs, and histogram and compared with study literature.

The results of the analysis showed that the material variation and the extraction temperature have differences on total of concanavalin A. The best technique is on the temperature 27°C because the secondary and tertiary structures contained in the protein structure are still well preserved which compared to the extraction temperature of 40°C and 50°C for 12 hours, the greatest value of total protein on jack bean seed 36,80%, the solubility on MOLEF 26,43 mg/ml, the high value is yield of Con A extract on jack bean seed 20,4%, the greatest of total Concanavalin A on MOLEF 10,15 mg/g. The weight molecular of Concanavalin A show on bands of protein by using 15% gel. The assay inject eluate of jack bean flour, MOLEF, jack bean seed. Each weight molecular are 32,54 kDa, 34,68 kDa, and 33,60 kDa.

PRAKATA

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan hidayahNya penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekstraksi dan Karakterisasi Concanavalin A dari Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.). Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Selama dalam menyusun skripsi ini, tidak jarang penulis mengalami kesulitan, kekalutan serta kekecewaan, namun puji syukur kepada Allah SWT, karena banyak bantuan yang tidak ternilai dari berbagai pihak baik moral maupun spiritual, fasilitas maupun bimbingan. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih setinggi-tingginya kepada :

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M. Eng. selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc. selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Ahmad Nafi', S.TP., M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang selalu membimbing dan selalu melancarkan setiap usaha saya;
4. Dr. Ir, Sih Yuwanti, M.P. selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang selalu membimbing dan memberikan saran bagi penulisan skripsi ini;
5. Dr. Triana Lindriati S.T., M.P selaku penguji utama yang meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan saran serta arahan yang bermanfaat;
6. Nurul Isnaini Fitriyana S.TP., M.P selaku penguji anggota yang meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan saran serta arahan yang bermanfaat;
7. Segenap teknisi Laboratorium Kimia dan Biokimia, Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, dan Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;

8. Segenap supervisor (Tomoyuki Yoshino dan Ota) serta anggota laboratorium Departement Science dan Enviromental Technology, Prefectural University of Hiroshima, Jepang;
9. Bapak dan ibu dosen beserta segenap civitas akademik dilingkup Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
10. Ayahanda Martulis dan Ibunda Yulmina atas cinta dan kasih yang selalu mengalir tanpa batas, selalu sabar, terus mendoakanku dan selalu memberikan dukungan dalam segala hal;
11. Nenekku Alm. Khoiriyah, kakekku Alm. Nazar dan Kamar yang pernah mengajarkan apa arti hidup dan rasa kasih sayang yang tulus;
12. Adikku Candrani Yulis Rohmatulloh dan Adikku Maulidina Yulis Rohimah yang selalu memberikan dukungan dan keceriaan padaku;
13. Keluarga besar Yulis dan pada saudara yang selalu memberikan semangat dimanapun dan kapanpun;
14. Sahabat-sahabat terkasih Mila Damanik, Abduh Amiruddin, Robby Dharmawan, Rizaldy Adhisky, Dheni Antra, Yunita Anin, Gholib Aulia, Fatmalika Fikria, Riang Putut, Merrynda Kurnianthy, Bella Martha, Erni Titis, Vica Metha Lavella yang selalu memberikan semangat dan dukungan, hal yang membangun di setiap langkah;
15. Sahabat yang selalu mewarnai hari-hariku, memotivasi dan banyak membantu selama kuliah Fatkhur Rohman;
16. Sahabat yang banyak memotivasi dan menumbuhkan spirit dari jauh Hari Purnomo;
17. Dulur-dulur UKM-K Dolanan, Komunitas Perupa Jember, Sanggar Seni Banitas, dan Pawon Carklacer yang menemani, mendukung, dalam berproses dan berkarya;
18. Teman-teman THP-B (The Bida), FTP angkatan 2012, dan lingkungan FTP yang telah memberikan semangat, doa, dan motivasi;
19. Semua pihak yang telah memberikan dukungan serta membantu pelaksanaan skripsi ataupun dalam penulisannya sehingga dapat terselesaikan dengan baik.

Dengan sepenuh hati penulis menyadari bahwa dalam penulisan ini terdapat banyak kekurangan dan ketidak sempurnaan. Oleh karena itu penulis selalu membuka diri terhadap kritik dan saran demi penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat dan sumbangan ilmiah yang sebesar-besarnya bagi penulis dan pembaca.

Jember, 11 Mei 2017

Penulis



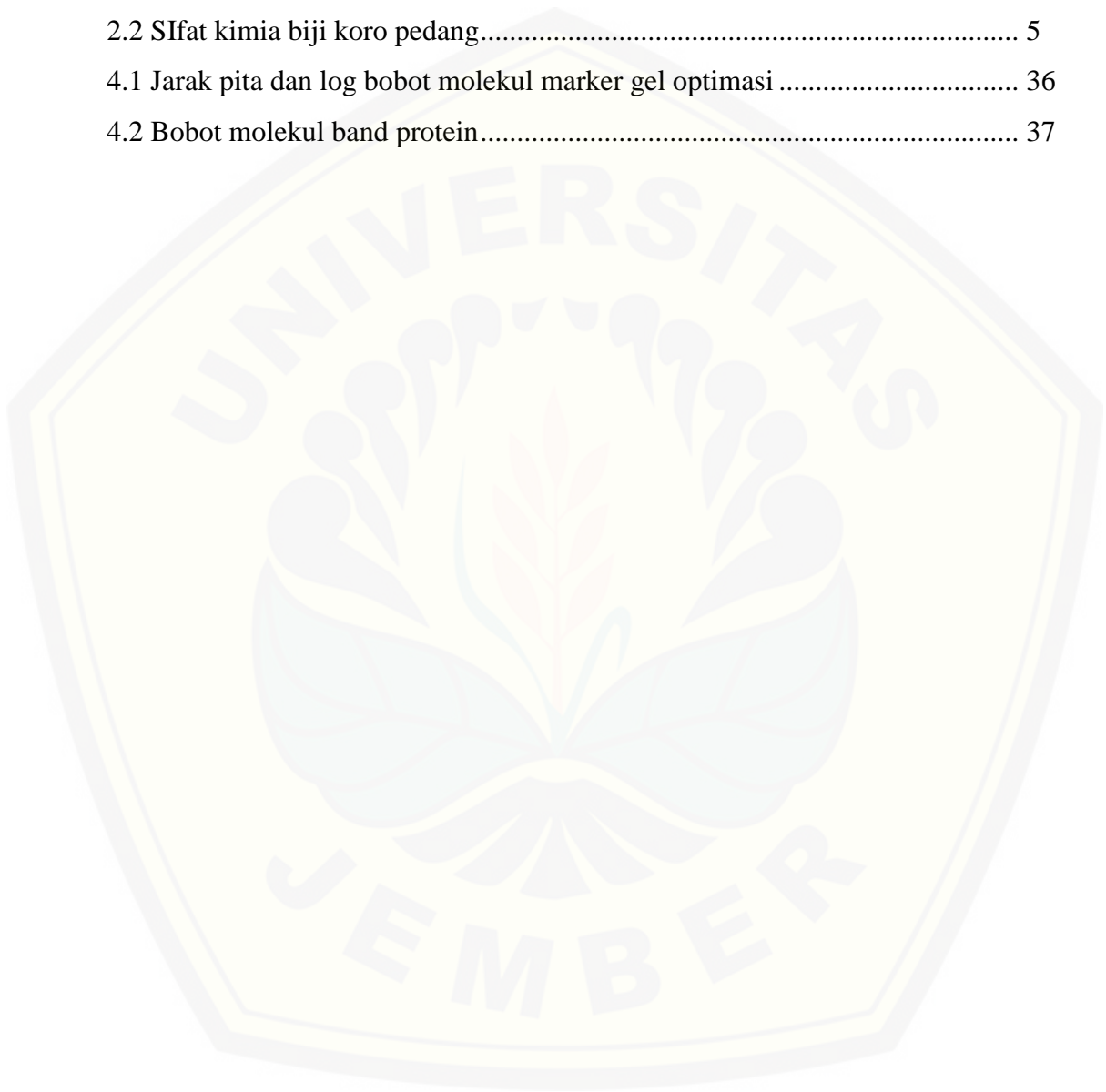
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
PRAKATA.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTARLAMPIRAN.....	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Koro Pedang (<i>Canavalia ensiformis</i> L.)	4
2.2 Kandungan Senyawa Gizi Koro Pedang	5
2.3 Kandungan Senyawa Antigizi Koro Pedang	6
2.4 Concanavalin A	7
2.5 Modifikasi Nutrisional dan Fungsional Koro Pedang	8
2.6 Bakteri Asam Laktat	10

2.7 Ekstraksi	11
2.7.1 Ekstraksi secara dingin	12
2.7.2 Ekstraksi secara panas.....	12
BAB 3. METODE PENELITIAN	15
3.1 Bahan dan Alat Penelitian	15
3.1.1 Bahan Penelitian	15
3.1.2 Alat Penelitian.....	15
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.3 Metode Penelitian	16
3.3.1 Rancangan Penelitian.....	16
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian.....	16
3.4 Parameter Pengamatan	26
3.5 Prosedur Analisis	26
3.5.1 Total Protein	26
3.5.2 Kadar Protein Terlarut	26
3.5.3 Rendemen Hasil Ekstraksi Con A	27
3.5.4 Total Concanavalin A	27
3.5.5 Berat Molekul	27
3.6 Analisis Data	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Total Protein	29
4.2 Kadar Protein Terlarut	30
4.3 Rendemen Hasil Ekstraksi	33
4.4 Total Concanavalin A	34
4.5 Berat Molekul	36
BAB 5. PENUTUP	42
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Sifat fisik biji koro pedang.....	5
2.2 Sifat kimia biji koro pedang.....	5
4.1 Jarak pita dan log bobot molekul marker gel optimasi	36
4.2 Bobot molekul band protein.....	37



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Biji koro pedang	4
2.2 Struktur concanavalin A	8
3.1 Diagram alir penyiapan biji koro pedang	16
3.2 Diagram alir pembuatan tepung koro pedang.....	19
3.3 Diagram alir kultur kerja MOLEF koro pedang	20
3.4 Diagram alir produksi MOLEF koro pedang (<i>Canavalia ensiformis</i> L.) dengan fermentasi terkendali	21
3.5 Diagram alir ekstraksi concanavalin A.....	23
3.5 Diagram alir purifikasi concanavalin A.....	25
4.1 Total protein koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF.....	29
4.2 Kadar protein terlarut biji koro pedang, tepung koro pedang, MOLEF dengan perlakuan perbedaan suhu ekstraksi.....	30
4.3 Rendemen hasil ekstraksi Con A dari biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF	33
4.4 Total concanavalin A biji koro pedang, tepung koro pedang, MOLEF dengan perlakuan perbedaan suhu ekstraksi.....	34
4.5 Hasil elektroforesis pada suhu ekstraksi 27°C.....	38
4.6 Kurva regresi linier gel optimasi	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A DATA DAN PERHITUNGAN ANALISIS TOTAL PROTEIN	49
A.1 Data Analisis Total Protein	49
B DATA DAN PERHITUNGAN ANALISIS KADAR PROTEIN TERLARUT	49
B.1 Kurva Standart BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	49
B.2 Data Analisis Kadar Protein Terlarut	50
B.3 Contoh Perhitungan Kadar Protein Terlarut	51
C DATA DAN PERHITUNGAN ANALISIS RENDEMEN HASIL EKSTRAKSI DAN TOTAL CONCANAVALIN A	52
C.1 Data <i>Wash Solution</i> Tepung Koro Pedang	52
C.2 Data <i>Eluted Solution</i> Tepung Koro Pedang	52
C.3 Data <i>Wash Solution</i> Koro Pedang	53
C.4 Data <i>Eluted Solution</i> Koro Pedang	53
C.5 Data <i>Wash Solution</i> MOLEF	54
C.6 Data <i>Eluted Solution</i> MOLEF	54
C.7 Data Hasil Concanavalin A	55
C.8 Contoh Perhitungan Rendemen dan Total Con A	56
D DATA DAN PERHITUNGAN SDS-PAGE	57
D.1 Kurva standart gel optimasi	57
D.2 Berat molekul sampel	58
D.3 Contoh perhitungan berat molekul	58
E GAMBAR EKSTRAKSI CONCANAVALIN A	58

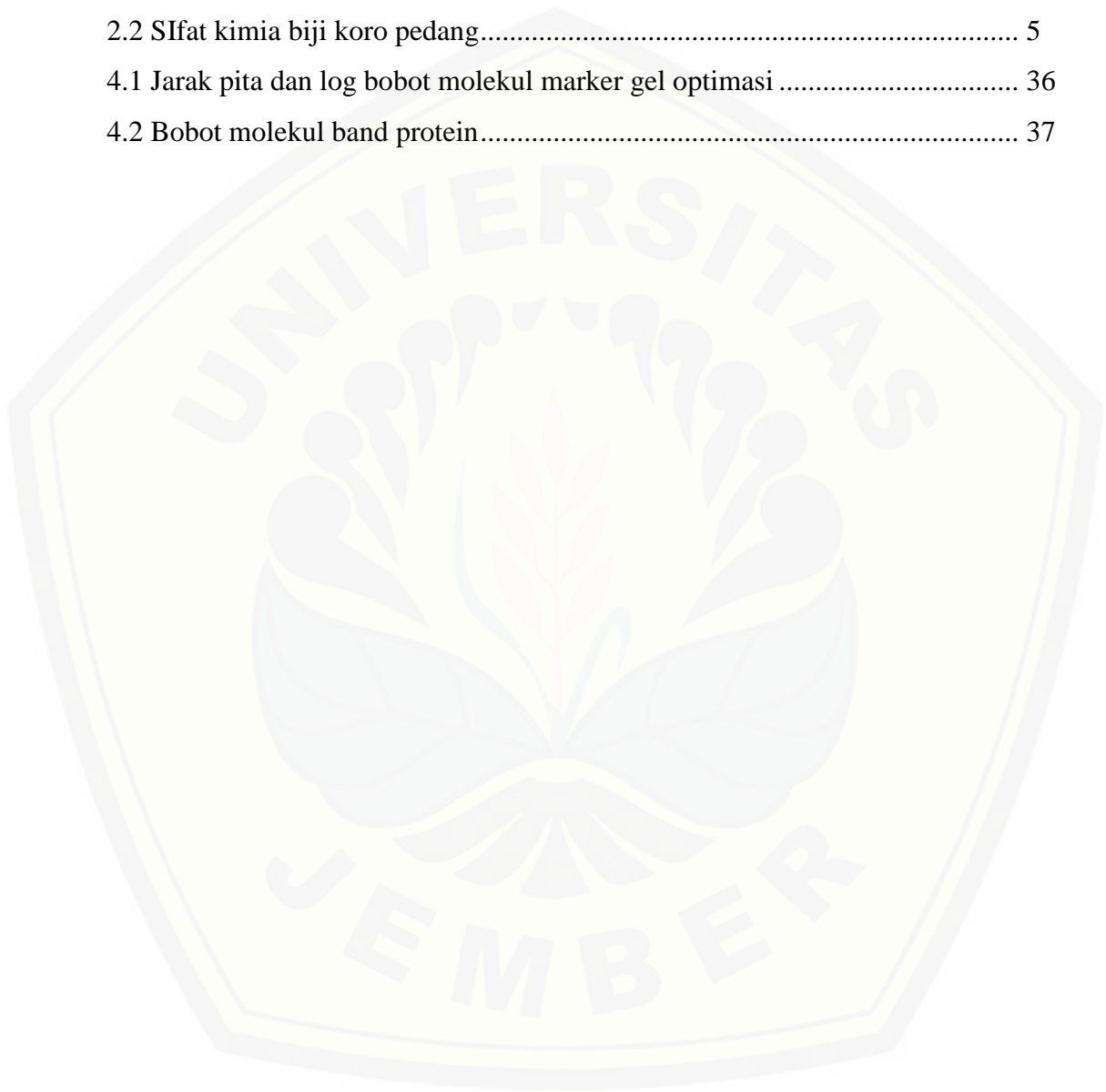
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Koro Pedang (<i>Canavalia ensiformis</i> L.)	4
2.2. Kandungan Senyawa Gizi Koro Pedang	5
2.3 Kandungan Senyawa Antigi Koro Pedang	6
2.4 Concanavalin A	7
2.5 Modifikasi Nutrisional dan Fungsional Koro Pedang	8
2.6 Bakteri Asam Laktat	10
2.7 Ekstraksi	11
2.7.1 Ekstraksi secara dingin	12
2.7.2 Ekstraksi secara panas.....	12

BAB 3. METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Bahan dan Alat Penelitian	15
3.1.1 Bahan Penelitian	15
3.1.2 Alat Penelitian.....	15
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.3 Metode Penelitian.....	16
3.3.1 Rancangan Penelitian.....	16
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian.....	16
3.4 Parameter Pengamatan	26
3.5 Prosedur Analisis	26
3.5.1 Total Protein	26
3.5.2 Kadar Protein Terlarut	26
3.5.3 Rendemen Hasil Ekstraksi Con A	27
3.5.4 Total Concanavalin A	27
3.5.5 Berat Molekul	27
3.6 Analisis Data	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Total Protein.....	28
4.2 Kadar Protein Terlarut	30
4.3 Rendemen Hasil Ekstraksi	33
4.4 Total Concanavalin A	34
4.5 Berat Molekul	37
BAB 5. PENUTUP.....	42
5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Sifat fisik biji koro pedang.....	5
2.2 Sifat kimia biji koro pedang.....	5
4.1 Jarak pita dan log bobot molekul marker gel optimasi	36
4.2 Bobot molekul band protein.....	37



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Biji koro pedang	4
2.2 Struktur concanavalin A	8
3.1 Diagram alir penyiapan biji koro pedang	16
3.2 Diagram alir pembuatan tepung koro pedang.....	19
3.3 Diagram alir kultur kerja MOLEF koro pedang	20
3.4 Diagram alir produksi MOLEF koro pedang (<i>Canavalia ensiformis</i> L.) dengan fermentasi terkendali	21
3.5 Diagram alir ekstraksi concanavalin A.....	23
3.5 Diagram alir purifikasi concanavalin A.....	25
4.1 Total protein koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF.....	29
4.2 Kadar protein terlarut biji koro pedang, tepung koro pedang, MOLEF dengan perlakuan perbedaan suhu ekstraksi.....	30
4.3 Rendemen hasil ekstraksi Con A dari biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF	33
4.4 Total concanavalin A biji koro pedang, tepung koro pedang, MOLEF dengan perlakuan perbedaan suhu ekstraksi.....	34
4.5 Hasil elektroforesis pada suhu ekstraksi 27°C.....	38
4.6 Kurva regresi linier gel optimasi	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A DATA DAN PERHITUNGAN ANALISIS TOTAL PROTEIN	49
A.1 Data Analisis Total Protein	49
B DATA DAN PERHITUNGAN ANALISIS KADAR PROTEIN TERLARUT	49
B.1 Kurva Standart BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	49
B.2 Data Analisis Kadar Protein Terlarut	50
B.3 Contoh Perhitungan Kadar Protein Terlarut	51
C DATA DAN PERHITUNGAN ANALISIS RENDEMEN HASIL EKSTRAKSI DAN TOTAL CONCANAVALIN A	52
C.1 Data <i>Wash Solution</i> Tepung Koro Pedang	52
C.2 Data <i>Eluted Solution</i> Tepung Koro Pedang	52
C.3 Data <i>Wash Solution</i> Koro Pedang	53
C.4 Data <i>Eluted Solution</i> Koro Pedang	53
C.5 Data <i>Wash Solution</i> MOLEF	54
C.6 Data <i>Eluted Solution</i> MOLEF	54
C.7 Data Hasil Concanavalin A	55
C.8 Contoh Perhitungan Rendemen dan Total Con A	56
D DATA DAN PERHITUNGAN SDS-PAGE	57
D.1 Kurva standart gel optimasi	57
D.2 Berat molekul sampel	58
D.3 Contoh perhitungan berat molekul	58
E GAMBAR EKSTRAKSI CONCANAVALIN A	58

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Koro pedang (*Canavalia ensiformis*) merupakan salah satu komoditas pertanian yang memiliki potensi besar sebagai alternatif bahan pangan pokok berbasis bahan lokal. Produktivitas koro pedang sebesar 5 – 7 ton/ha, lebih tinggi dibandingkan dengan kedelai yang berkisar 1,3 – 2 ton/ha (Nasution, 2008). Potensi koro pedang yang cukup tinggi ini menjadi alternatif substitusi kedelai yang sekarang masih impor (Ariyanti, 2002). Prospek masa depan tanaman koro pedang sangat bagus, disamping memiliki kandungan protein yang tinggi, juga memiliki manfaat fungsional sebagai bahan baku industri farmasi dan nutrisi (Munip, 2001).

Di Indonesia koro pedang tidak banyak dimanfaatkan padahal koro pedang memiliki kandungan karbohidrat sebesar 70,2 g/100 g berat kering dan protein paling tinggi sebesar 21,7% dibandingkan dengan jenis koro lainnya seperti koro komak dan kratok masing-masing sebesar 17,1% dan 14,1% (Subagio, *et al.*, 2003). Selain itu, koro pedang juga memiliki zat antigizi antara lain fenolik, saponin, tanin, glikosida sianogenik, canatoxin, concanavalin A dan B (Con A dan B), dan HCN. Pada 100 gram biji koro pedang terdapat tanin sebanyak 0-900 mg, saponin 571 mg, Con A 1500 -3500 mg, dan asam sinida 0-11,2 mg. (Suciati, 2012). Koro pedang memiliki kandungan dan manfaat komponen bioaktif yaitu sumber senyawa fenolik dan flavonoid yang keduanya memiliki aktivitas anti oksidan sebagai penangkal radikal bebas yang sangat efektif (Doss *et al.* 2011).

Seperti halnya alternatif kacang lainnya, hal yang menjadi penghambat pengembangan pangan berbahan baku kacang-kacangan ini adalah kandungan zat antinutrisinya. Koro pedang mengandung salah satu antinutrisi yaitu Concanavalin A (Con A) yang dapat menyebabkan efek hemaglutinasi darah. Mendez *et al.* (1998) mengemukakan bahwa pengaruh hemaglutinin ini dapat menghambat pertumbuhan akibat penurunan kemampuan dinding usus untuk menyerap nutrisi. Namun, aktivitas hemaglutinin Con A ini dapat berkurang melalui proses pengolahan menjadi bahan pangan. Menurut Badan Litbang

Pertanian (2014) aktivitas hemaglutinasi protein tersebut dapat dihilangkan secara sempurna melalui perendaman yang diikuti dengan pemanasan tinggi maupun fermentasi. Proses pengolahan koro pedang yang dilakukan pada penelitian ini adalah perendaman, pengeringan, dan proses fermentasi menggunakan bakteri asam laktat untuk menjadi tepung koro pedang. Con A di satu sisi merupakan zat anti gizi, namun Con A juga memiliki manfaat fungsional. Con A dilaporkan sebagai molekul anti viral dan imuno modulator untuk terapi kanker (Shridahr dan Seena, 2006). Con A juga memiliki efek positif dalam meningkatkan sistem imun. Con A telah dilaporkan dapat menstimulir imunitas *innate* dan *TLR expression* di dalam makrofag (Sodhi *et al.* 2007; Conchon-Costa *et al.* 2007) dan menginduksi proliferasi sel mononuclear perifer darah (Renner *et al.* 2011).

Koro pedang telah diolah menjadi tepung kaya protein (*protein rich flour*) (Nafi *et al.*, 2013) dan MOLEF (*Modified Legume Flour*) (Laily, 2014). *Lactobacillus plantarum* sebagai bakteri asam laktat berperan dalam fermentasi koro pedang untuk dijadikan MOLEF. Tepung kaya protein dan MOLEF telah diaplikasikan pada banyak produk makanan, seperti bakso, nugget, sosis, dan es krim.

Teknologi yang dapat digunakan untuk mendapatkan Con A dari koro pedang yaitu ekstraksi. Ekstraksi Con A dari biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF dapat dilakukan dengan berbagai teknik, salah satunya yaitu dengan variasi suhu ekstraksi. Suhu ekstraksi mempengaruhi total Con A dalam bahan tersebut. Belum ada penelitian mengenai Con A yang terkandung dalam koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF koro pedang. Oleh karena itu, diperlukan teknik terbaik menggunakan suhu ekstraksi untuk karakterisasi Con A.

1.2 Rumusan Masalah

Con A terbukti bertindak sebagai anti bodi yang dapat mengaktifkan sel anti kanker atau sel T (Gantner, 1999). Selain itu juga mampu menggumpalkan virus dan spermatozoa serta dapat mengisolasi subtansi immunoglobulin dan glikoprotein darah (Sridhar dan Seena, 2006). Koro pedang dapat dibuat menjadi tepung koro pedang, dan MOLEF. Total Con A akan berbeda dalam bahan-bahan

tersebut, sehingga perlu diketahui karakteristik Con A didalamnya menggunakan teknik ekstraksi dengan penggunaan suhu yang sesuai. Oleh karena itu perlu dikaji total Con A yang paling tinggi pada biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Mengetahui karakteristik Con A meliputi total protein, kadar protein terlarut, rendemen hasil ekstraksi, total Concanavalin A, dan berat molekul berbahan biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF koro pedang.
2. Mengetahui teknik yang terbaik menggunakan variasi suhu pada ekstraksi Concanavalin A berbahan biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF koro pedang.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini yaitu :

1. Mengangkat potensi komoditi bahan pangan lokal (*indigenous resources*).
2. Menghasilkan informasi tentang Con A di koro pedang yang berpotensi dalam penerapan pangan fungsional.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*)

Tanaman koro pedang (*Canavalia ensiformis*) berasal dari Amerika Tengah dan Hindia barat. Tanaman koro pedang dikenal dengan nama antara lain : *chickasaw lima bean*, *brazilian broad bean*, *coffee bean*, *ensiform bean*, *horse bean*, *mole bean*, *go-ta-ki*, *overlook bean*, *pearson bean*, *watanka*, dan *raba de burro*. DI Indonesia terkenal dengan nama kacang parang, kekara pedang, kara bendo, kara pedang, krandang (Jawa) (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998)

Koro pedang tumbuh pada dataran rendah dengan ketinggian 0-800 m di atas permukaan laut, daerah tropis dengan curah hujan 1000-1500 mm (Robert, 1985). Koro pedang termasuk tanaman tahunan berbentuk semak- semak dengan tinggi sekitar 1- 2,5 meter. Polong tanaman koro pedang berisi sekitar 8-20 biji. Tanaman ini tumbuh merambat dan ketinggiannya mencapai 10 m (Lindriati, 2007). Gambar koro pedang dapat dilihat pada **Gambar 2.1** berikut :



Gambar 2.1 Biji koro pedang (Dokumentasi Pribadi)

Ketersediaan koro pedang di masyarakat petani cukup tinggi, tergantung wilayahnya. Koro pedang akan mampu menggantikan ketersediaan kedelai impor, apabila diperdagangkan secara baik (Ariyanti, 2002). Prospek masa depan tanaman koro pedang untuk komoditi ekspor sangat terbuka, antara lain untuk memenuhi kebutuhan bahan baku industri farmasi dan nutrisi di negara- negara maju seperti Jepang dan Amerika Serikat (Munip, 2001). Sifat fisik koro pedang memiliki

panjang biji 1,84 cm, lebar 1,27 cm, dan warna putih bersih. Secara keseluruhan sifat fisik koro pedang dapat dilihat pada **Tabel 2.1**

Tabel 2.1 Sifat fisik biji koro pedang

Sifat fisik	Maks.	Min.
Panjang biji (cm)	2,05	1,61
Lebar biji (cm)	1,39	1,08
Tebal biji (cm)	0,98	0,70
Berat 100 biji (g)	132,60	122,7

Sumber : Subagio, *et al.*, 2003.

2.2 Kandungan Senyawa Gizi Koro Pedang

Koro pedang memiliki zat gizi yang diperlukan manusia seperti protein 21,7 %, lemak 4%, dan karbohidrat 70,2 % (Subagio *et al.*, 2002). Koro pedang memiliki kandungan proteinnnya yang tinggi, menjadikan protein koro-koroan mempunyai potensi sebagai alternatif pengganti protein hewani. Secara keseluruhan sifat kimia biji koro pedang dapat dilihat pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2.2 Sifat kimia biji koro pedang

Sifat kimia	Rerata \pm Standar Deviasi
Air (%)	8,4 \pm 0,1
Protein (%)	21,7 \pm 2,1
Lemak (%)	4 \pm 0,3
Karbohidrat (%)	70,2 \pm 4,2
Abu (%)	2,9 \pm 0,1

Sumber : Subagio, *et al.*, 2002.

Koro pedang telah terbukti dapat dimanfaatkan untuk bahan dasar tempe, kecap, substitusi tahu, dan penambah gizi flake umbi (Tamtarini, *et al.*, 1997; Maryanto, *et al.*, 2003). Tempe koro pedang memiliki rasa alkoholis akibat terfermentasinya pati koro pedang. Pada substitusi pembuatan tahu, maksimum penambahan koro pedang adalah 20%. Apabila lebih dari 20% akan membuat tekstur tahu lembek dan mudah hancur. Hal ini diakibatkan kandungan protein 7S dan 11S dari koro pedang rendah (Tamtarini, *et al.*, 1997). Selain itu, sebagai bahan tambahan dalam pembuatan flake umbi, penambahan koro dapat meningkatkan kandungan protein (Maryanto, *et al.*, 2003).

2.3 Kandungan Senyawa Antigizi Koro Pedang

Pada umumnya biji koro-koroan memiliki zat antigizi. Zat antigizi yang terkandung dalam biji koro pedang antara lain fenolik, saponin, tanin, glikosida sianogenik, canatoxin, concanavalin A dan B (Con A dan B), dan HCN. Pada 100 gram biji *C. ensiformis* terdapat tanin sebanyak 0-900 mg, saponin 571 mg, Con A 1500 -3500 mg, dan asam sianida 0-11,2 mg. Kebanyakan dari antigizi tersebut tidak tahan panas. Kandungan HCN memiliki batas normal konsumsi yaitu < 50 ppm atau 50 mg/kg (Suciati, 2012).

Asam sianida (HCN) merupakan senyawa racun yang dapat mengganggu kesehatan. Gangguan kesehatan dapat berupa pusing, lemah badan, kekacauan mental, sianosis, dan koma. Senyawa ini terikat pada tanaman sebagai glikosida diantaranya amigdalin, durrin, dan linamarin. Racun ini dapat larut dalam air dan dapat dihilangkan dengan pemitungan, pencucian, perendaman, fermentasi, dan perebusan (Noor, 1992). Metode perendaman biasanya dilakukan untuk menghilangkan atau mengurangi kandungan antinutrisi. Media perendaman dapat berupa air, larutan garam, atau alkali. Perendaman dapat dilakukan untuk menurunkan asam sianida (Murni, *et al.*, 2008).

Asam fitat mempunyai sifat rakhitogenik (menimbulkan penyakit tulang karena kekurangan kalsium). Asam fitat membentuk garam yang tidak larut apabila berikatan dengan kalsium atau mineral lain, sehingga mineral- mineral tersebut tidak dapat diserap oleh usus (Noor, 1992). Inaktivasi asam fitat dapat dilakukan dengan hidrolisis enzimatis oleh enzim fitase yang terdapat pada bahan itu sendiri. Perebusan, fermentasi, dan penggorengan dapat diketahui menurunkan kandungan asam fitat (Rokhmah, 2008).

Hemaglutinin dan toksalbumin merupakan antigizi yang bersifat menghambat pertumbuhan. Ekstrak hemaglutinin murni menunjukkan sifat penghambatan yang kuat dan mampu mengakibatkan kematian pada hewan apabila konsentrasi dalam diet melebihi 1% (Noor, 1992). Hemaglutinin juga menyebabkan aglutinasi sel- sel darah merah melalui pengikatan membran plasma

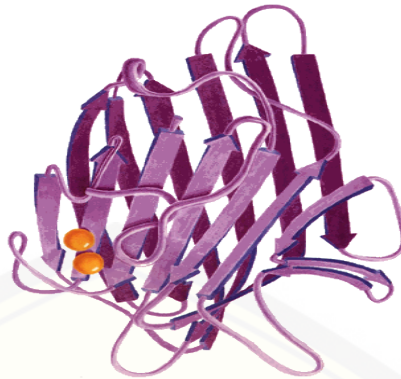
eritrosit. Hemaglutinin bersifat mudah dirusak oleh panas. Perlakuan dengan autoklaf dapat menginaktifkan senyawa ini keseluruhan (Noor, 1992).

Senyawa fenol seperti tannin bersifat mengikat protein dengan membentuk ikatan silang partial sehingga senyawa protein tidak dapat dicerna. Tanin juga menyebabkan *astringency* dan pencoklatan. Senyawa ini dapat hilang melalui perendaman, fermentasi, dan perebusan. Secara umum, keberadaan senyawa antigizi menyebabkan cita rasa yang kurang disukai, mengurangi bioavailabilitas nutrisi, dan keracunan tubuh. Koro- koroan perlu diperlakukan proses pendahuluan untuk menghilangkan senyawa antigizi tersebut. Proses tersebut dapat meliputi perendaman, pemanasan, fermentasi, dan perkecambahan (Noor, 1992).

2.4 Concanavalin A

Concanavalin A adalah suatu kelompok protein tanaman yang disebut sebagai lektin (Boyd, 1963). Con A merupakan lektin kacang-kacangan yang dimurnikan dan dikristalisasi dari biji koro pedang (*Canavalia ensiformis*). Con A merupakan protein sel tunggal. Sebagian besar, Con A ditemukan di penyimpanan vakuola protein, lektin ini terdapat dalam bentuk dimer atau trimerik, masing-masing subunit (25-40 kDa) (Etzler, 1986).

Para peneliti telah mengeksplorasi kandungan dan manfaat komponen bioaktif di dalam biji koro pedang. Koro pedang dilaporkan merupakan sumber senyawa fenolik dan flavonoid dimana keduanya memiliki aktivitas anti oksidan sebagai penangkal radikal bebas yang sangat efektif (Doss *et al.* 2011). Con A disatu sisi merupakan zat anti gizi, namun Con A juga memiliki manfaat fungsional. Con A dilaporkan sebagai molekul anti viral dan imuno modulator untuk terapi kanker (Shridahr dan Seena, 2006). Concanavalin merupakan lektin yang ada pada tanaman *Canavalia Enfisormis*, terdapat kira-kira 20% dari protein yang ada dalam bijinya. Concanavalin B berkisar lebih kurang 0,9% dari total protein. Struktur Concanavalin A dapat dilihat pada **Gambar 2.2**



Gambar 2.2 Struktur Concanavalin A (Jain *et al.*, 2000)

Pengikatan Con A ke mukosa glikolipid di saluran cerna akan menghambat aktivitas dari enzim-enzim di enterosit, yang dipengaruhi oleh bakteri usus di dinding usus dan efek sampingnya pada fungsi imun, metabolisme protein, aktivitas enzim dan regulasi hormonal (Sridhar dan Seena, 2006). Con A dapat mengaktifkan sel limfosit T secara *in vitro* dan menyebabkan kerusakan hati *T-cell-dependent* pada hewan uji mencit (Gantner, 1999). Con A yang terkandung dalam *C. ensiformis* ternyata diketahui berefek sebagai hemaglutinin. Hemaglutinin ini mungkin akan terdistribusi sampai jaringan usus (Jaffe, 1969). Mekanisme aksi toksik hemaglutinin kemungkinan diperantarai oleh ikatan antara hemaglutinin dan membran sel, sehingga terjadi perubahan fungsi sel. Dugaan ini dilandasi oleh kenyataan bahwa absorpsi zat hara oleh usus dihambat oleh hemaglutinin yang diberikan secara oral (Donatus, 1990). Berdasarkan data dari J-Oil Mills Inc. (2007) LD50 dari Con A melalui intraperitoneal adalah 41500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BB dan bila melalui intravena adalah 50 mg/kg BB.

Con A dapat berfungsi sebagai antiviral, mitogenisitas, isolasi imunoglobulin, dan terapi tumor dengan imunomodulasi. Con A juga bisa digunakan sebagai marker spesifik dari sel sperma dan segmen epididimal, juga sebagai marker dari perubahan struktural pada diferensiasi sel-sel epidermis. (Sridhar dan Seena, 2006).

2.5 Modifikasi Nutrisional dan Fungsional Koro Pedang dengan Fermentasi

Fermentasi secara teknik dapat didefinisikan sebagai suatu proses oksidasi anaerobik atau partial anaerobik karbohidrat yang menghasilkan alkohol serta beberapa asam, namun terdapat juga fermentasi yang menggunakan substrat protein dan lemak (Muchtadi dan Ayustaningwarno, 2010). Fermentasi merupakan suatu cara pengolahan dengan memanfaatkan penguraian senyawa dari bahan-bahan kompleks. Senyawa kompleks tersebut terdapat dalam bahan yang diubah menjadi senyawa-senyawa lebih sederhana dengan bantuan enzim yang berasal dari bahan tersebut atau dari mikroorganisme serta berlangsung dalam keadaan yang terkontrol (Adawyah, 2007).

Fermentasi terbagi menjadi dua, yaitu fermentasi spontan dan terkendali (memerlukan starter). Fermentasi spontan merupakan fermentasi yang biasa dilakukan menggunakan bakteri *indigenus*. Sedangkan, fermentasi terkendali merupakan fermentasi yang dilakukan dengan penambahan kultur organisme bersama media penyeleksi sehingga fermentasi dapat berlangsung lebih cepat (Rahayu, *et al.*, 1992). Hasil fermentasi diperoleh sebagai akibat metabolisme mikroba-mikroba pada suatu bahan pangan dalam keadaan anaerob. Mikroba yang melakukan fermentasi membutuhkan energi yang umumnya diperoleh dari glukosa. Pada keadaan aerob, mikroba mengubah glukosa menjadi air, CO₂, dan energi (ATP). Beberapa mikroba hanya dapat melangsungkan metabolisme dalam keadaan anaerob dan hasilnya adalah substrat yang setengah terurai. Hasil penguraiannya adalah air, CO₂, energi, dan sejumlah asam organik lainnya, seperti asam laktat, asam asetat, etanol serta bahan-bahan organik yang mudah menguap. Perkembangan mikroba-mikroba dalam keadaan anaerob biasanya dicirikan sebagai fermentasi (Muchtadi dan Ayustaningwarno, 2010).

Fermentasi glukosa pada prinsipnya terdiri dari dua tahap, yaitu : (1) pemecahan rantai karbon dari glukosa dan pelepasan paling sedikit dua pasang atom hidrogen, menghasilkan senyawa karbon lainnya yang lebih teroksidasi daripada glukosa, (2) senyawa yang teroksidasi tersebut direduksi kembali oleh atom hidrogen yang dilepaskan dalam tahap pertama, membentuk senyawa-senyawa lain sebagai hasil fermentasi (Fardiaz, 1989). Tahap pertama fermentasi

glukosa selalu menghasilkan asam piruvat. Jasad renik melakukan pemecahan glukosa menjadi asam piruvat melalui empat jalur, yaitu:

1. Jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) atau glikolisis, ditemukan pada fungi dan kebanyakan bakteri, serta hewan dan manusia.
2. Jalur Entner-Doudoroff (ED), hanya ditemukan pada beberapa bakteri.
3. Jalur Heksosamonofosfat (HMF), ditemukan pada berbagai organisme.
4. Jalur Fosfoketolase (FK), hanya ditemukan pada bakteri yang tergolong laktobasili heterofermentatif .

Perbedaan nilai akhir nutrisi dari produk fermentasi tergantung pada apakah biji atautkah suspensi tepung dengan berbagai rasio air yang digunakan. Fermentasi dikombinasikan dengan perlakuan lain seperti perendaman, pemasakan, atau perkecambahan untuk meningkatkan nilai nutrisi produk. Perlakuan panas dapat mengurangi kandungan senyawa antigizi dan memperbaiki kualitas nutrisi serta sifat organoleptik produk makanan. Asama amino bebas, peptida, dan gula reduksi yang terbentuk selama fermentasi merupakan prekursor bagi profuk. Reaksi mailard yang terbentuk selama perlakuan panas dan berpengaruh pada cita rasa dan aroma makanan.

Fermentasi pada MOLEF menggunakan fermentasi secara induksi menggunakan *Lactobacillus plantarum*. Aktivitas mikroba tersebut berperan untuk memperoleh energi melalui pemecahan substrat yang berguna untuk keperluan metabolisme dan pertumbuhannya sehingga dapat menyebabkan perubahan sifat bahan sebagai akibat dari pemecahan kandungan zat makanan dalam bahan tersebut. Winarno *et al.* (1980) menyatakan bahwa pada proses fermentasi mikroba akan membutuhkan sejumlah energi untuk pertumbuhannya dan perkembangbiakkannya yang akan diperoleh melalui perombakan zat makanan di dalam substrat. Perubahan kimia yang terjadi di dalam substrat diakibatkan oleh aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba tersebut yang meliputi perubahan molekul kompleks seperti karbohidrat, protein, dan lemak menjadi molekul yang mudah dicerna.

2.6 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, maka disebut *food grade microorganism* atau mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (Daeschel dan Nes, 1995). BAL telah digunakan sejak lama dalam preparasi dan proses dari makanan dan minuman, dan sekarang telah digunakan pada berbagai industri fermentasi. BAL mempunyai keragaman yang besar yang dapat dicirikan dengan *Gram-positive, catalase negative, non-sporulating, non-pigmented mesophils* (Rahayu, 2000).

Terdapat berbagai genus BAL antara lain *Streptococcus* meliputi *Enterococcus* (*E.*), *Lactococcus* (*Lc.*), dan *Streptococcus* (*St.*) (Salminen dan Wright, 1998), *Lactococci*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan lain sebagainya. Salah satu genus yang banyak ditemukan pada fermentasi spontan yaitu *Lactobacillus*. Bakteri asam laktat (BAL) menghasilkan berbagai produk metabolisme yaitu asam organik, komponen flavor, dan komponen antimikroba. Komponen - komponen hasil metabolisme BAL yang bersifat antimikroba adalah asam organik (asam laktat, asam asetat, asam kaproat, asam format, asam benzoat, dan asam fenillaktat), hidrogen peroksida, diasetil, bateriosin, dan metabolit sekunder yang lain (Lavermicocca dan Valerio, 2003).

Metabolisme pokok dari bakteri asam laktat adalah kemampuannya untuk memfermentasikan karbohidrat. Jalur fermentasi gula oleh bakteri asam laktat dapat dibedakan menjadi dua, yaitu jalur glikolisis (Embden-Meyerhoff Pathway) menghasilkan asam laktat (homolacticfermentation / homofermentatif) dan jalur 6-fosfoglukonat / fosfoketolase menghasilkan etanol, asetat, CO₂, dan asam laktat (*heterolactic fermentation* / heterofermentatif). Selain itu, monosakarida selain glukosa antara lain manosa, galaktosa, dan fruktosa yang difermentasi oleh bakteri asam laktat masuk jalur metabolisme pada glukosa-6-fosfat atau fruktosa-6-fosfat atau jalur Leloir. Sedangkan disakarida akan dihidrolisa terlebih dahulu menjadi monosakarida / baru kemudian memasuki jalur metabolisme tersebut (Salminen dan Wright, 1998).

Bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* juga berperan dalam fermentasi pada serelia dan umbi-umbian. Pada proses ekstraksi pati (Gonzalez, *et al.*, 1993). Mikroba tersebut akan menghasilkan enzim pektunolitik dan sellulotik yang dapat menghancurkan dinding sel singkong, sehingga patinya akan keluar. Bakteri asam laktat jenis *L. plantarum* dilaporkan juga banyak berperan dalam fermentasi berbagai sumber pati seperti singkong dan sereal (Oyewole and Odunfa, 1990). Bakteri ini merupakan Amilolitik – BAL (ABAL) yang mempunyai kemampuan mendegradasi pati secara langsung dan secara *facultative heterofermentative* dengan temperatur lingkungan optimal lebih rendah dari 37°C. Bakteri asam laktat ini ternyata juga berperan dalam fermentasi pada makanan tradisional Indonesia, yaitu *gatot* (Hartanti, *et al.*, 2003).

2.7 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat.

2.7.1 Ekstraksi secara dingin

Pembagian metode ekstraksi menurut Direktorat Jenderal POM (2000)

yaitu:

a) Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (kamar). Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel maka larutan terpekat didesak keluar.

b) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat). Cara perkolasi lebih baik dibandingkan dengan cara maserasi karena:

- Aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan yang terjadi dengan larutan yang konsentrasinya lebih rendah, sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi.
- Ruang antara butir-butir serbuk simplisia membentuk saluran tempat mengalir cairan penyari. Karena kecilnya saluran kapiler tersebut, maka kecepatan pelarut cukup untuk mengurangi lapisan batas, sehingga dapat meningkatkan perbedaan konsentrasi.

2.7.2 Ekstraksi secara panas

Ekstraksi secara panas menurut Andrian (2000) yaitu :

a) Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Pada kondisi ini jika dilakukan pemanasan biasa maka pelarut akan menguap sebelum reaksi berjalan sampai selesai. Prinsip dari metode refluks adalah pelarut volatil yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang tadinya dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan turun lagi ke dalam wadah reaksi, sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung. Sedangkan aliran gas N₂ diberikan agar tidak ada uap air atau gas oksigen yang masuk terutama pada senyawa organologam untuk sintesis senyawa anorganik karena sifatnya reaktif.

b) Sokletasi

Sokletasi adalah suatu metode atau proses pemisahan suatu komponen yang terdapat dalam zat padat dengan cara penyaringan berulang-ulang dengan menggunakan pelarut tertentu, sehingga semua komponen yang diinginkan akan

terisolasi. Sokletasi digunakan pada pelarut organik tertentu. Dengan cara pemanasan, sehingga uap yang timbul setelah dingin secara kontinyu akan membasahi sampel, secara teratur pelarut tersebut dimasukkan kembali ke dalam labu dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi tersebut.

c) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50 °C. Cara maserasi ini hanya dapat dilakukan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan. Dengan pemanasan akan diperoleh keuntungan antara lain kekentalan pelarut berkurang, yang dapat mengakibatkan berkurangnya lapisan-lapisan batas, daya melarutkan cairan penyari akan meningkat, sehingga pemanasan tersebut mempunyai pengaruh yang sama dengan pengadukan, koefisien difusi berbanding lurus dengan suhu absolut dan berbanding terbalik dengan kekentalan, hingga kenaikan suhu akan berpengaruh pada kecepatan difusi. Umumnya kelarutan zat aktif akan meningkat bila suhu dinaikkan.

d) Infundasi

Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya dilakukan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Proses ini dilakukan pada suhu 90°C selama 15 menit.

e) Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air, yakni 30 menit pada suhu 90-100°C.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian pembuatan tepung koro pedang dan MOLEF adalah biji koro pedang (*Canavalia ensiformis L.*) yang diperoleh dari Jember, *de Mann Rigorose Sharp* agar (MRSA), *Mann Rigorose Sharp Broth* (MRSB-Merck), CaCO_3 1%, susu skim, gula halus, kultur *Lactobacillus plantarum*, asam sitrat, NaOH, HCl, benzena, iodine, etanol 95%, selenium, etanol, SDS gel ET15L, elektroda buffer, larutan bradford, buffer H_3PO_4 , bubuk selulosa, protein marker *Millipore 69079-3 Broad Range* 15-150 kDa, larutan *Staining Ez Stain Aqua*, Con A standar LKR1260, NH_2 filter, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCO_3 , NaCl, PBS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_4$, dan akuades.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi spektrofotometer UV-VIS Pharo 300 Spevtroquant, SDS Atto Power 500 AE-8150, AE-6530 miniPAGE chamber, Sentrifugasi Sigma 3K30C Kubota, Micro pipet Gilson AK55762, *food processor*, mixer, peralatan gelas pyrex Wako dan Iwaki TE-32, vortex, *laminar air flow* AireGard ES NU-126, pH meter, neraca analitik, kantong slovan, shaker water bath Sigma-Aldrich SW23.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan Hasil Pertanian, Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan Departement Science and Enviromental Technology, Prefectural University of Hiroshima, Jepang. Waktu penelitian dilaksanakan mulai Mei tahun 2016 sampai selesai.

3.3 Metode Penelitian

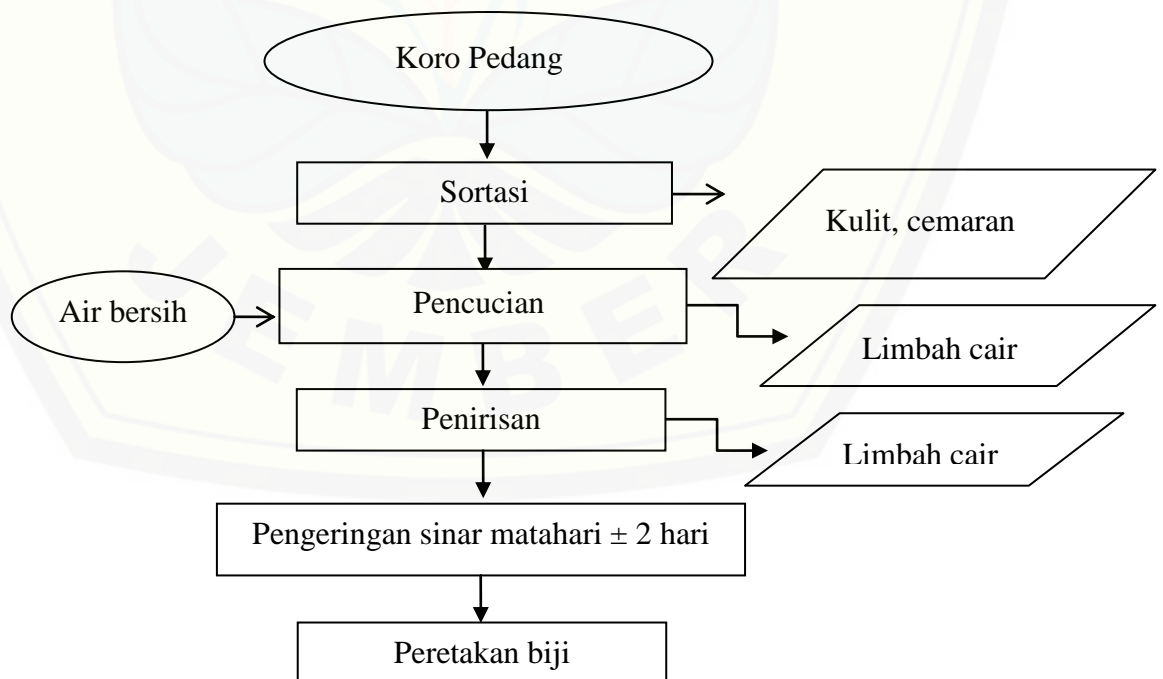
3.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan 2 faktor dengan 3 pengulangan. Faktor pertama adalah variasi bahan koro (biji koro pedang, tepung koro pedang, dan MOLEF). Faktor kedua adalah variasi suhu ekstraksi (27°C, 40°C, dan 50°C).

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

a) Penyiapan biji koro pedang

Koro pedang disortasi untuk mendapatkan biji dengan karakteristik seragam (menghilangkan cacat bahan). Koro pedang dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian ditiriskan. Koro pedang yang telah dicuci selanjutnya dikeringkan dengan sinar matahari selama ± 2 hari untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam biji. Biji koro pedang diretakkan dengan cara dipukul dengan palu untuk membantu jalan masuk air dan kultur kerja pada proses fermentasi. Diagram alir penyiapan biji koro pedang (*C. ensiformis*) dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Diagram alir penyiapan biji koro pedang (*Canavalia ensiformis*)

b) Pembuatan tepung koro pedang

Koro pedang dicuci untuk menghilangkan kotoran. Koro pedang yang telah dicuci kemudian ditiriskan dan direndam dalam air selama \pm 24 jam dengan perbandingan air 3 : 1 (b/v) untuk mengurangi kadar HCN yang terdapat dalam koro pedang. Koro pedang dicuci kembali untuk menghilangkan kadar HCN dan dilanjutkan dengan penggilingan untuk memperkecil ukuran sehingga mempercepat dalam pengovenan. Setelah itu koro pedang dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 24 jam untuk mengurangi kandungan air yang terdapat dalam biji koro pedang dan memperpanjang umur simpan bahan. Koro pedang kering digiling dan diayak menggunakan ayakan 70 mesh. Diagram alir pembuatan tepung koro pedang dapat dilihat pada **Gambar 3.2**

c) Pembuatan MOLEF Koro Pedang

(i) Penyiapan kultur kerja MOLEF

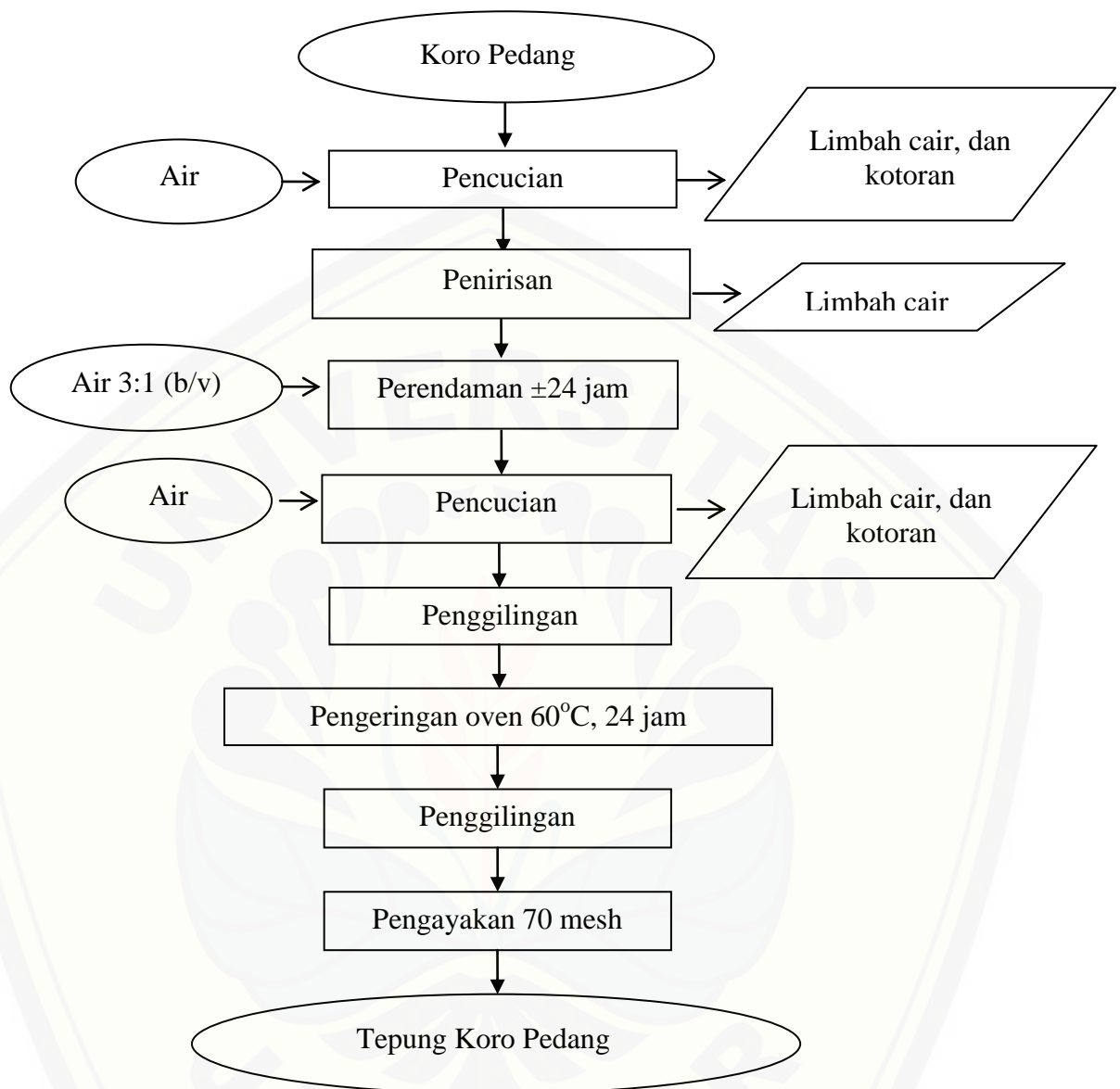
Kultur *L. Plantarum* diremajakan pada media MRSB 37 °C selama 24 jam (Rohmi, 2010). Kultur hasil penyegaran sebanyak 2% v/v diinokulasikan pada 10% b/v larutan media buatan steril yang terdiri dari MOLEF fermentasi spontan 5%, gula 3%, dan susu skim 2%. Media buatan ini kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam, yang disebut sebagai kultur induk. Sebanyak 2% v/v kultur induk diinokulasikan pada larutan media buatan steril. Sebanyak 2% v/v kultur antara diinokulasikan kembali sebagai kultur kerja (Ouwehand, *et al.*, 2001 dengan modifikasi). Kultur kerja diencerkan dalam larutan fisiologis dengan perbandingan 1:9 (untuk 1 ml kultur membutuhkan 9 ml larutan fisiologis), kemudian ditumbuhkan pada media MRSA. Kultur yang memenuhi syarat untuk siap dijadikan kultur kerja yaitu yang memiliki populasi BAL $\geq 10^8$ cfu/ml, dan formula penentuan jumlah koloni yang siap digunakan dengan rentang jumlah koloni antara 25 - 250 cfu/ml (BAM, 2002). Diagram alir penyiapan kultur kerja MOLEF dapat dilihat pada **Gambar 3.3**

(ii) Pembuatan MOLEF Koro Pedang

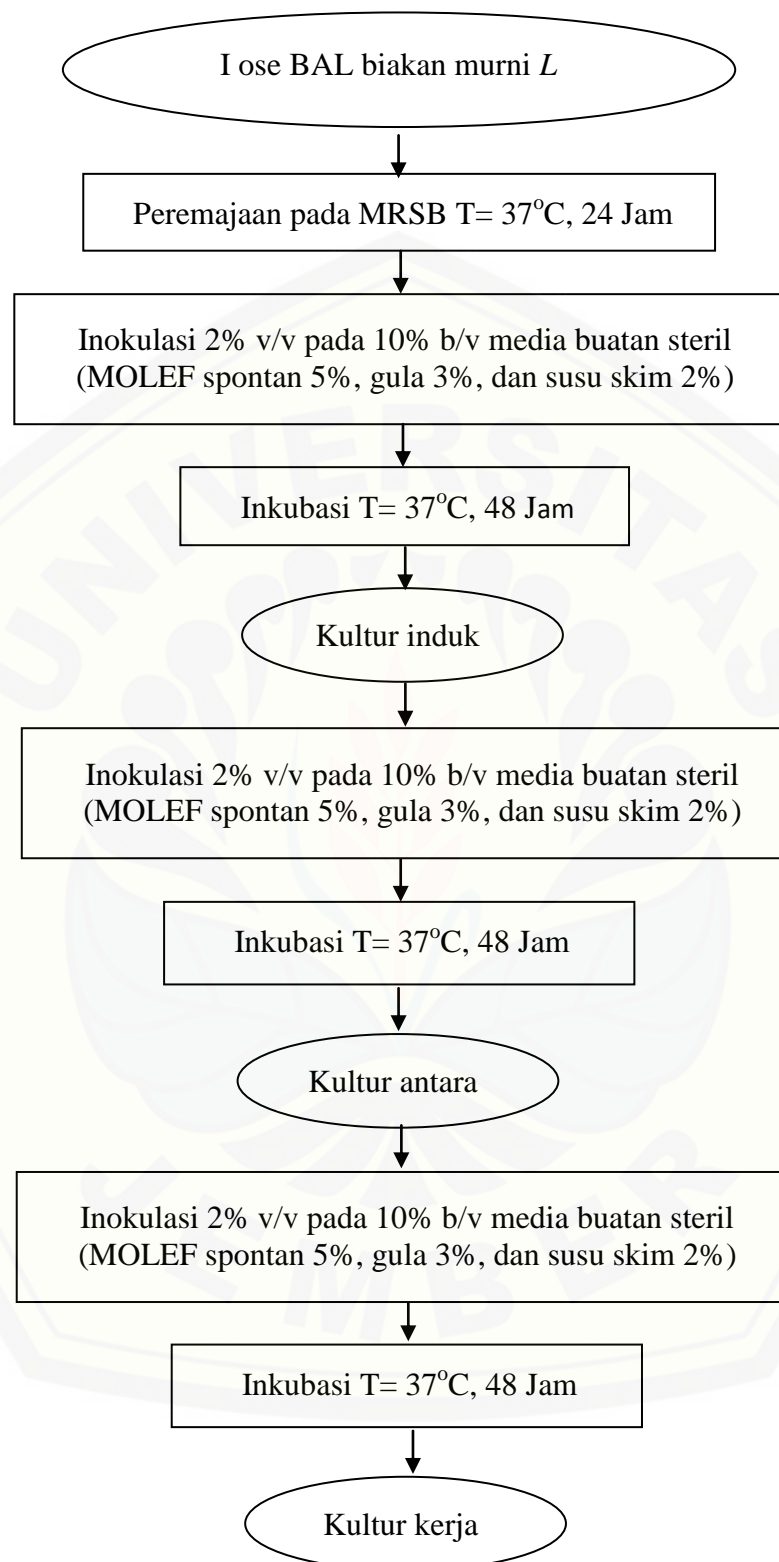
Produksi MOLEF dilakukan dengan fermentasi terkendali. Koro pedang direndam dalam larutan asam sitrat dengan pH 4 (1:3), kemudian diberi sinar UV selama 30 menit untuk mematikan bakteri patogen. Setelah itu diinokulasi kultur BAL 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah fermentasi, koro pedang dicuci kemudian direndam dengan larutan NaCl 10% dengan perbandingan (1:3) selama 15 menit untuk menghentikan fermentasi. Kemudian dicuci dua kali lalu ditiriskan untuk menghilangkan NaCl pada bahan. Setelah itu, koro pedang digiling lalu dikeringkan menggunakan sinar matahari ±1 jam dan dilanjutkan dengan pengeringan oven 60°C selama ±24 jam yang berfungsi untuk mengurangi kadar air pada bahan. Koro pedang yang telah kering digiling lalu diayak dengan ayakan 70 mesh. Diagram alir pembuatan MOLEF koro pedang (*Canavalia ensiformis*) dengan fermentasi terkendali dapat dilihat pada **Gambar 3.4**.

d) Ekstraksi Con A

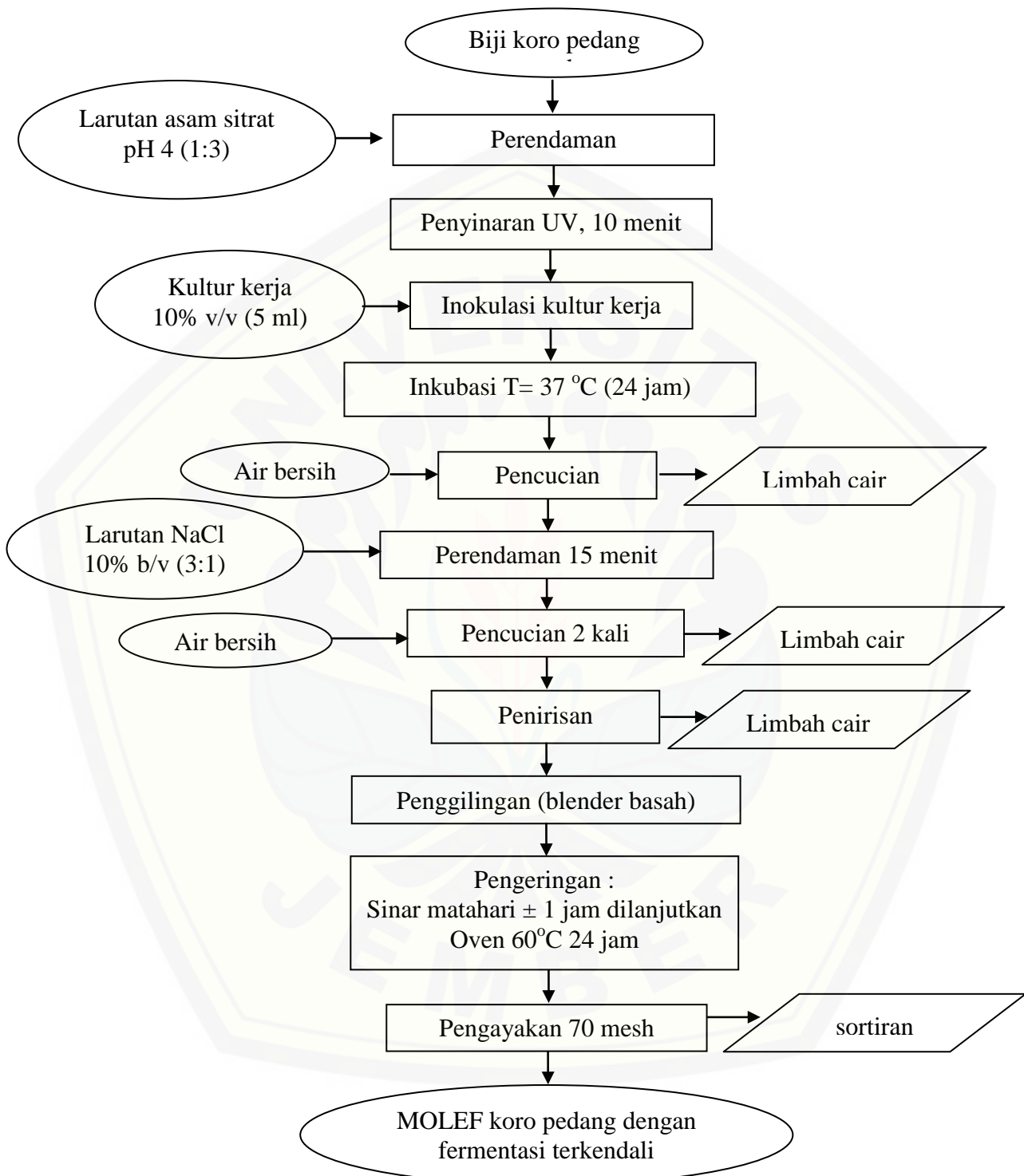
10 gr bahan (koro pedang atau tepung koro pedang atau MOLEF) direndam dalam 30 ml larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) selama 16 jam pada variasi suhu 27°C, 30°C, dan 40 °C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 ° C. Supernatan yang diperoleh diambil 50 ml dan dijenuhkan dengan 2,46 g (NH₄)₂SO₄ dengan tingkat kejenuhan 30% lalu disimpan pada suhu 4°C selama 12 jam. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm pada suhu 4 ° C selama 20 menit. 45ml supernatan diambil dan kejenuhan ditingkatkan menjadi 90% dengan 3,62 g (NH₄)₂SO₄ lalu disimpan pada suhu 4 ° C selama 16 jam. Hari berikutnya akan terjadi peningkatan volume, suspensi disentrifugasi pada 7500 rpm pada suhu 4 ° C selama 20 menit. Endapan kemudian dicampur dengan 4 ml akuades lalu divortex agar homogen selanjutnya ditambah akuades 3 ml. Sampel ini disimpan untuk dialisis selama 2 hari pada akuades kemudian dipindah di PBS selama 1 hari. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 7500 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit dan supernatan yang diperoleh dikumpulkan dan disimpan pada suhu 4°C. Diagram alir ekstraksi Con A dapat dilihat pada **Gambar 3.5**



Gambar 3.2 Diagram alir pembuatan tepung koro pedang
(Aisah, 2014)



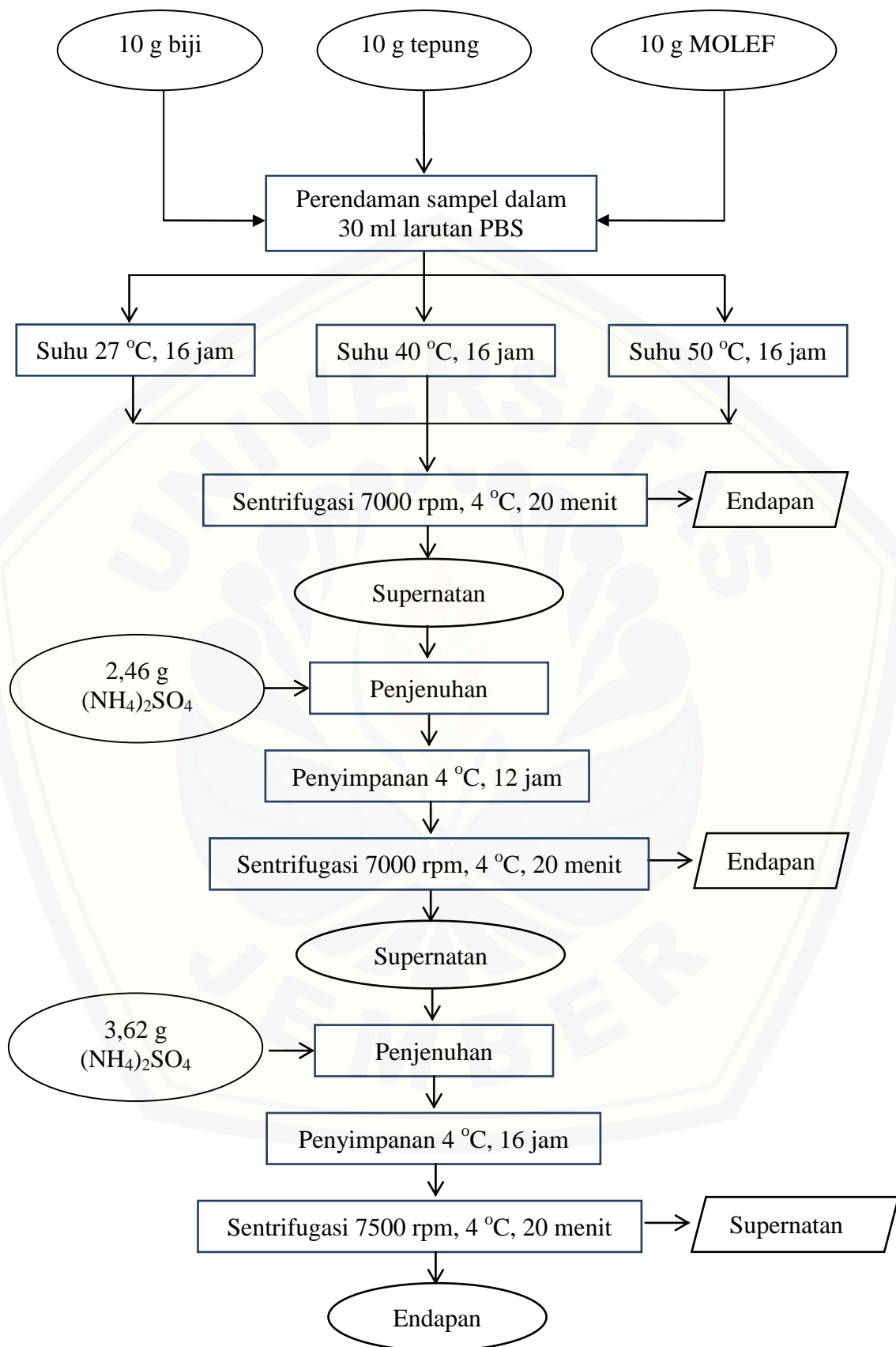
Gambar 3.3. Diagram alir penyiapan kultur kerja MOLEF Koro Pedang (Laily, 2014)

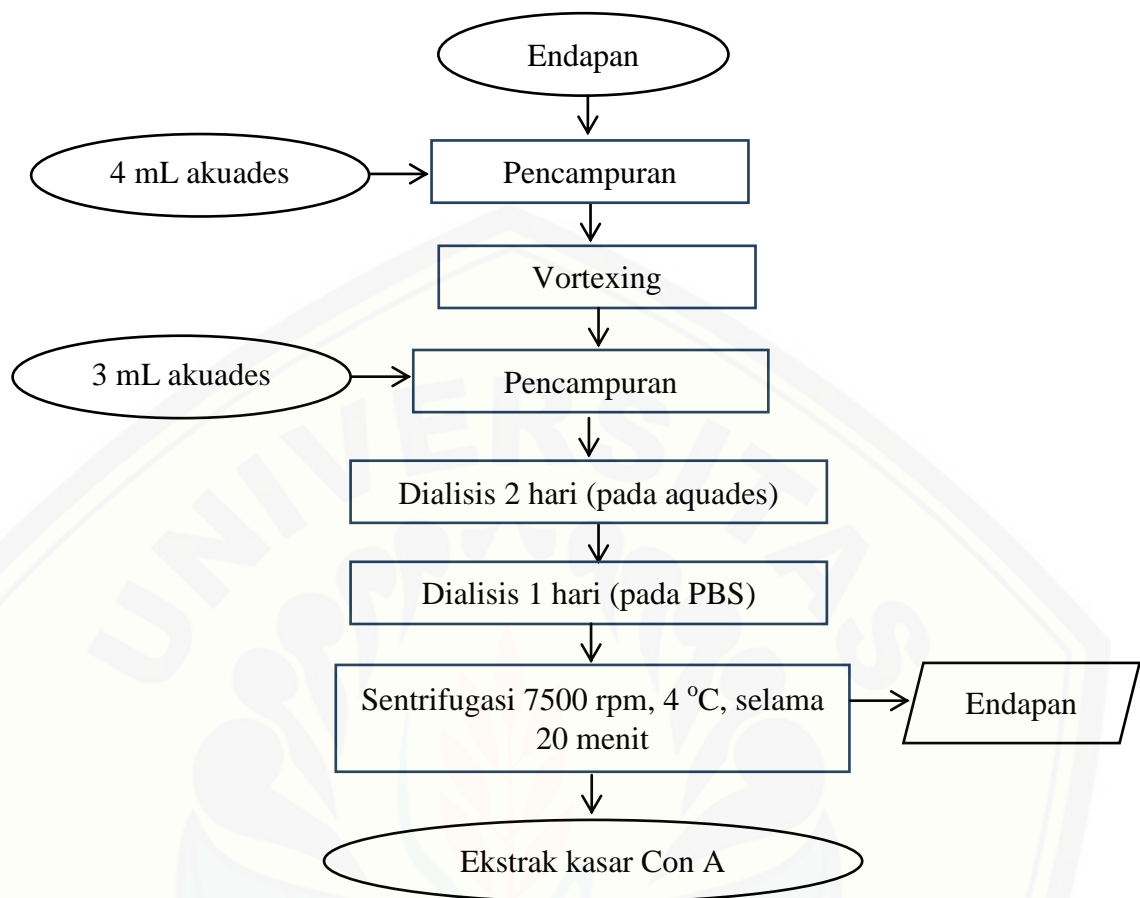


Gambar 3.4. Diagram alir produksi MOLEF koro pedang dengan fermentasi terkendali (Laily, 2014)

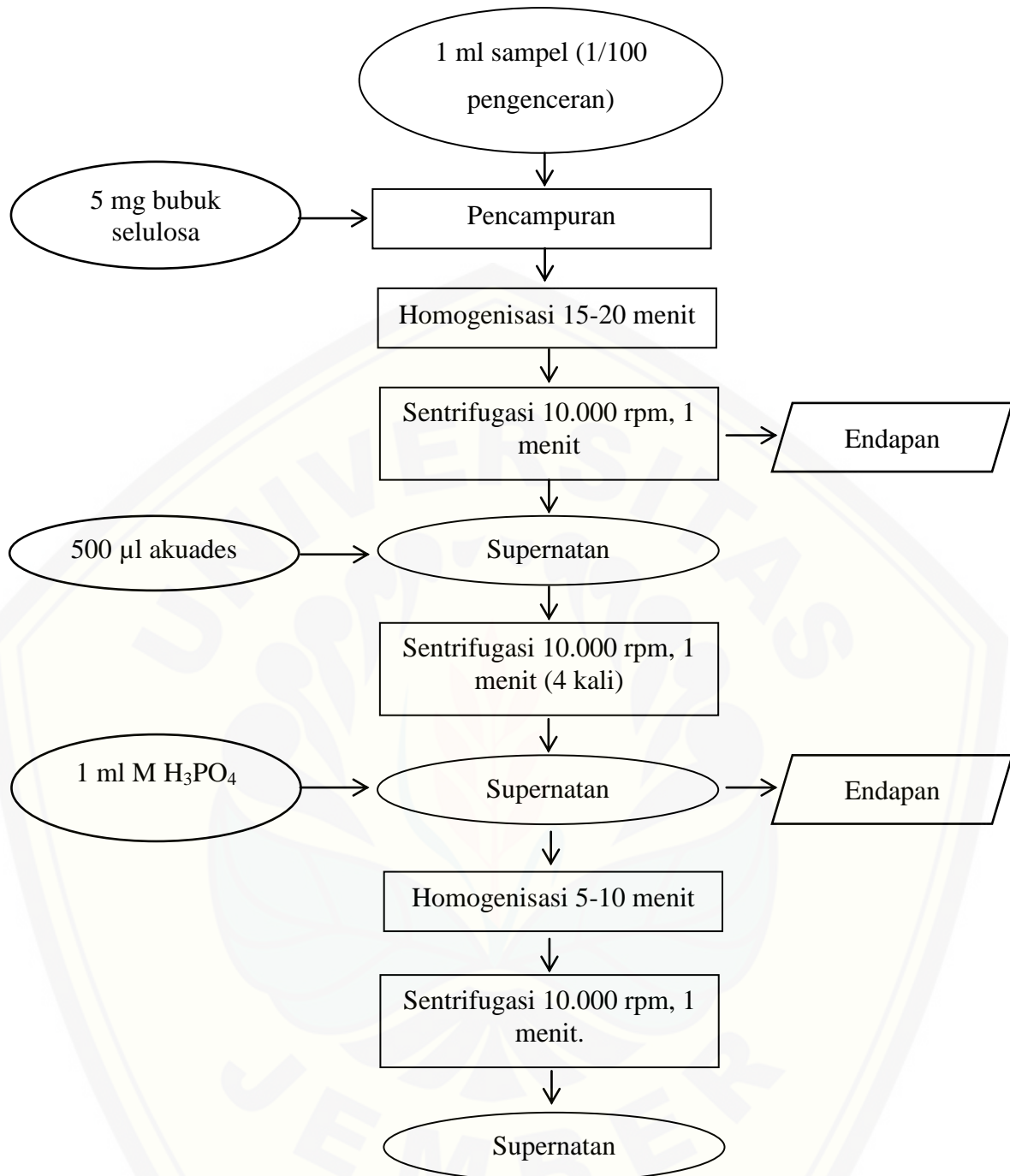
e) Purifikasi Con A

Con A dipurifikasi dengan cara 1 ml ekstrak larutan Con A diencerkan sebanyak 1/100 pengenceran, kemudian ditambah 5 mg bubuk selulosa. Larutan dihomogenisasi secara perlahan selama 15-20 menit di suhu ruang. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan diperoleh supernatant (*pass trough solution*). Tambahkan 500 μ l akuades dan dihomogenisasi. Larutan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan diperoleh supernatant (*wash solution*). Ulangi langkah di atas selama 4 kali. Tambahkan 1 ml 0,1 M H_3PO_4 dan dihomogenisasi selama 5-10 menit di suhu ruang lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan supernatant dikumpulkan (*eluted solution*). Diagram alir purifikasi Con A dapat dilihat pada **Gambar 3.6**





Gambar 3.5. Diagram alir ekstraksi Cocanavalin A
(Marndi, 2012)



Gambar 3.6. Diagram alir purifikasi Cocanavalin A (Ota, 2016)

3.4 Parameter Pengamatan

Parameter yang akan diamati pada ekstraksi dan karakterisasi Con A ini antara lain :

- a) Total protein pada bahan baku, metode mikrokjeldahl (AOAC, 2006)
- b) Kadar protein terlarut, metode *Bradford* (Bradford, 1976)
- c) Rendemen hasil ekstraksi Concanavalin A (Ota, 2016)
- d) Total Concanavalin A, metode *Cellulose Binding* (Ota, 2016)
- e) Berat molekul, metode SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3.5 Prosedur Analisis

3.5.1 Total Protein

Kadar protein ditentukan menggunakan metode mikro Kjeldahl (AOAC, 2006), dilakukan dengan menimbang sampel koro pedang (biji, tepung, dan MOLEF) sebanyak 0,1 g kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl lalu ditambahkan 10 ml H₂SO₄ dan 1 g selenium. Destruksi selama 60 menit, ditambahkan 50 ml akuades. Larutan didestilasi dan destilat ditampung di erlenmeyer berisi 30 ml larutan asam borat 4% dan beberapa tetes indikator metil biru dan metil merah (MM dan MB). Titrasi dengan larutan HCl 0,01 N hingga berubah warna ungu. Blanko diperoleh dari cara sama namun tanpa menggunakan sampel dan diganti dengan akuades. Kadar protein dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar Protein} = \frac{(\text{ml HCl sampel} - \text{ml blanko})}{\text{g} \times 1000} \times \text{N HCl} \times 100\% \times 14.008$$

$$\text{Kadar Protein} = \text{Kadar Nitrogen} \times \text{FK}$$

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = 6.25$$

3.5.2 Kadar Protein Terlarut

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976), menggunakan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar protein. Sebanyak 50 µl ekstrak biji koro pedang, tepung koro pedang, MOLEF ditambahkan ke dalam tabung yang

berisi 950 µl pereaksi Bradford. Selanjutnya larutan tersebut diaduk dengan vorteks dan didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang. Absorbans larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar protein menggunakan BSA Fraksi V dengan kisaran konsentrasi 0,1–1,0 mg/ml. Konsentrasi protein ditentukan berdasarkan persamaan garis linier hubungan antara konsentrasi standar protein dan absorbansi.

3.5.3 Rendemen Hasil Ekstraksi Con A

Con A yang diekstraksi kemudian dipurifikasi, terdiri dari 3 tahap yaitu *pass through*, *wash*, dan *eluted solution*. Masing-masing tahap dihitung absorbansinya menggunakan spektrofotometer.

Rendemen dalam *eluted* (%) : Protein terlarut *Eluted* / Protein terlarut 1/100 kali pengenceran x 100%

3.5.4 Total Con A

Con A dipurifikasi dengan cara 1 ml ekstrak larutan Con A (pengenceran 1/100) kemudian ditambah 5 mg bubuk selulosa. Larutan dihomogenisasi secara perlahan selama 15-20 menit di suhu ruang. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan diperoleh supernatant (*pass trough solution*). Tambahkan 500 µl akuades dan dihomogenisasi. Larutan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan diperoleh supernatant (*wash solution*). Ulangi langkah di atas selama 4 kali. Tambahkan 1 ml 0,1 M H₃PO₄ dan dihomogenisasi selama 5-10 menit di suhu ruang lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan supernatant dikumpulkan (*eluted solution*). Total con A didapatkan dari total protein dikurangi dengan total protein *wash solution*.

3.5.5 Berat Molekul

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dilakukan sesuai dengan menggunakan 12% akrilamida gel. Elektroforesis gel poliakrilamida dilakukan menurut metode Laemmli (1970)

dengan mempersiapkan stacking gel (5%), resolving gel (12%), elektrode buffer (pH 8,3) yang mengandung 0,025 M Tris, 0,192 M glisin, dan 0,1% SDS, gel buffer loading (5x) yang mengandung 50 mm Tris-Cl (pH 6,8), etanol 100 mM β -mercapto, 2% (w / v) SDS, 10% (v / v) gliserol dan 0,1% bromophenol biru. Protein dalam buffer sampel yang dipanaskan selama 3 menit pada 90°C sebelum elektroforesis. Elektroforesis dilakukan sampai bromophenol penanda biru mencapai bagian bawah gel. Gel susun dijalankan pada tegangan 90V dan resolving gel pada 140V.

Pewarnaan gel dilakukan untuk lokalisasi dan visualisasi dari pita sampel protein. Pembuatan gel SDS-PAGE dilakukan dengan membuat larutan (50 ml) mengandung metanol (25ml), asam asetat (6ml), formaldehida (25 μ l) dan akuades selama 1 jam. Kemudian dicuci dengan 50% etanol dengan dishaker (3 kali) selama 10 menit. Kemudian dilakukan destaining dengan Sodium Thiosulphate (0,01%) selama 1 menit dan dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. Kemudian gel diresapi dengan silver nitrate solution (0.06g) dan formaldehid (20 μ l) dilarutkan dalam akuades 30 ml selama 20 menit dan dibilas dengan akuades 2 kali selama 20 detik sekali. Gel ditambahkan larutan sebanyak 30ml mengandung Sodium Carbonate sebanyak 1.8g. Sodium Thiosulphate kristal dan formaldehida (15 μ l) dan dishaker selama 10 menit kemudian dibilas dengan akuades 3 kali selama 20 detik setiap kali dan diberhentikan dengan larutan (50ml) selama 10 menit. *Beads* protein yang diamati pada gel dan gel kemudian diletakkan pada doc gel untuk menentukan berat molekul yang sesuai. Dilakukan penghitungan Rf (*Retention factor*) pada sampel yang telah terpisah yang kemudian digunakan untuk mencari berat molekul dari sampel (Laemmli, 1970).

3.6 Analisis Data

Pengolahan data penelitian menggunakan uji deskriptif yang dilengkapi dengan data dalam bentuk tabel, grafik, dan histogram serta dikomparasi dengan studi literatur.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Total protein tertinggi yaitu pada biji koro pedang 36,80%, kadar protein terlarut pada hasil ekstrak MOLEF koro pedang 26,43 mg/ml, rendemen hasil ekstrak Con A pada biji koro pedang 20,4%, total Con A pada hasil ekstrak tertinggi yaitu MOLEF koro pedang 10,15 mg/g. Berat molekul Con A konsentrasi gel 15% pada *eluate* tepung koro pedang, MOLEF koro pedang, dan biji koro pedang berturut-turut adalah 32,54 kDa, 34,68 kDa, dan 33,60 kDa.
2. Suhu ekstraksi yang paling banyak menghasilkan Con A yaitu suhu 27°C, dikarenakan struktur sekunder dan tersier yang terdapat dalam struktur protein masih terjaga dengan baik dibandingkan pada saat ekstraksi suhu 40°C dan 50°C selama 12 jam.

5.2 Saran

Karakterisasi lebih lanjut pada ekstak kasar Con A yang dihasilkan dan dilakukan purifikasi kembali agar dihasilkan ekstrak Con A yang benar-benar murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Abha, J. 2015. Purification, identification and preliminary crystallographic studies of an allergenic protein from *Solanum melongena*. *Acta Cryst* : ISSN 2053-230X
- Adawyah, R. 2007. *Pengolahan dan Pengawetan Ikan*. Jakarta : Bumi Aksara.
- Aisah, R. 2014. *Karakteristik Nutrisional dan Fungsional Tepung Koro Pedang (Canavalia ensiformis L.) Terfermentasi Spontan*. Skripsi. Teknologi Hasil Pertanian: Universitas Jember.
- Akbar, M.R; Yuniarta. 2014. Effect of Soaking Time of Na₂S₂O₃ and Yeast Fermentation on Physicochemical Properties of Corn Flour. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol.2 No.2 : 91-102
- Andarti, I.Y; Wardani, A.K. 2015. The Influence of Fermentation Time to Chemical, Microbiological, and Organoleptic Characteristic of Black Soybeans (*Glycine max L.*). Miso. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.3 No 3 (889-898)
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2006. *Official Methods of Analysis of The Association of Official Agriculture Chemist 16th edition*. Virginia.
- Adrian, P. 2000. *Analisa Ekstraktif Tumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Pusat Penelitian. Universitas Negeri Andalas : hal 37-53
- Ariyanti, F. 2002. *Koro Legume Lokal Bergizi Tinggi*. [on line]. <http://liputan6.com/daftar/pertanian/koro-pedang-sayur/>. [Diakses 10 Maret 2016]
- Bhutani M, Pathak AK, Nair AS, Kunnumakkara AB, Guha S, Sethi G, et al. 2007. Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin-6-inducible STAT3 activation. *Clin Cancer* ; 13:3024–3032.
- Dasschel, M.A. dan Nes, I.F. 1995. *Lactobacillus plantarum: physiology, genetics and applications in foods*, in *Food Biotechnology Microorganisms*, Hui, Y.H. and Khachatourians, G.G., Eds. New York : VCH Publishers Inc. : chap. 21, 721 – 743
- Doblado, R.; Frias, J.; Munoz, R.; Vidal-Valverde, C. 2005. Effect of processing on the antioxidant vitamins and antioxidant capacity of *Vigna sinensis* var. *carilla*. *J. Agric. Food Chem* 53 : (1215–1222).

- Doss A, Pugalenti M, Vadivel VG, Subbashini G, Anitha SR. 2011. Effects of processing technique on the nutritional composition and antinutrients content of under-utilized food legume *Canavalia ensiformis* L.DC. *International Food Research Journal*.18(3):965-970.
- Dwyer J.M., Johnson C.1981. *The use of Concanavalin A to study the immune regulation of human T cells*", *Clinical Experimental Immunology* ; 46: 237–249.
- Esfied, U. J. Lewis, and D. E. William.1962. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*195, 281-283 food sources: effects of *Canavalia ensiformis* seeds on growth and development of domestic rats and effects of fungal infection on nutritional composition to the seeds. *Journal of Daiying, Foods and Home Sciences* 12 (2) 62-66.
- Ewusia, J.Y. 1990. *Pengantar Ekologi Tropika*. Terjemahan oleh Usman Tanuwidjaja. Bandung: Penerbit ITB. hal. 161, 312.
- Fachirah. 2013. *Karakterisasi Nugget yang Dibuak dengan Varisi Rasio Jamur Merang dan Tepung Koro Pedang*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian : Universitas Jember.
- Fardiaz , D., Apriyantono, Anton, Puspitasari, L., Sedarnawati, dan Budiyanto, S. 1989. *Analisis Pangan*. Bogor : Institut Pertanian Bogor Press.
- Fagbenro OA, Adeparusi EO, Jimoh WA. 2004. *Nutrient quality of detoxified jackbean (*Canavalia ensiformis* L. DC) seeds cooked in distilled water or trona solution and evaluation of the meal as a substitute for soybean in practical diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings*. Didalam: New Dimensions on Farmed Tilapia, Proceedings of the 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture Philippine International Convention Center Roxas Boulevard, Manila, Philippines September 12-16, 2004, 289-300..
- Harliansyah, R. 2011. Efek Penghambatan Gingerol Terhadap 8-Hidroksideoksiganosin (8-OHdG) Penginduksi Sel Kanker, HepG2. *PharmaMedika*. Vol.3 No.2 : 3-4
- Inbar N. and Sachs L., *Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells*. *National Academical Science* 1969; 63 : 1418-1425
- Joseph D. Ng, Tzu-Ping Ko, Alexander McPherson.1993. Cloning, Expression, and Crystallization of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) Conavalin. *Plant Physiol*. 101: 713-728

- Kieliszewski M.J., O'Neill M., Leykam J., Orlando R., *Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline-O-arabinosylation*, *J Biol Chem* 1995; 270: 2541–2549.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* (London) 227 : 680-685
- Laily, M. 2014. “Karakteristik Fisik, Kimia, dan Fungsional Tepung Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) Termodifikasi dengan Fermentasi Menggunakan *Lactobacillus plantarum*”. Skripsi. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember
- Lindriati, T. 2007. “Edibel Film dari Tepung Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) Studi : Jumlah Penambahan Gliserol”. Laporan Penelitian Pengembangan Dosen. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
- Ling Huang, E.N. Clare Mills, Jane M. Carter, Michael R.A. Morgan. 1998. Analysis of thermal stability of soya globulins using monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta* :215-226
- M. Rimona, Ezra D. 1977. Sub Unit Structure of Canavalin. *Phytochemistry*, 1978, Vol. 17, pp. 1015-1016 : Pergamon Press Ltd. Printed in England.
- Marndi, R. 2012. *Isolation and Characterization of Concanavalin A from the seeds of Canavalia Ensiformis*. Department of Life Science National Institute of Technology Rourkela-769008. India : Oshida 17-28
- Maryanto dan Tamtarini. 2003. *Pengembangan Flake Gethuk Umbi Kaya Gizi*. Laporan Penelitian. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
- Mendez-Natera J. R., A. Rondon, J. Hernandez and Merazo-Pinto J. F. 1998. Genetic studies in upland cotton .III. Genetic parameters, correlation and path analysis. *SABRAO J. Breed. Genet.* 44 (1) : 112-128.
- Munip, A. 2001. Potensi Tanaman Koro Pedang (*Canavalia* sp.) dalam Upaya Meningkatkan Kegiatan Agribisnis. Simposium Nasional Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Tanaman Indonesia, Yogyakarta. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, Vol.6 : 145.

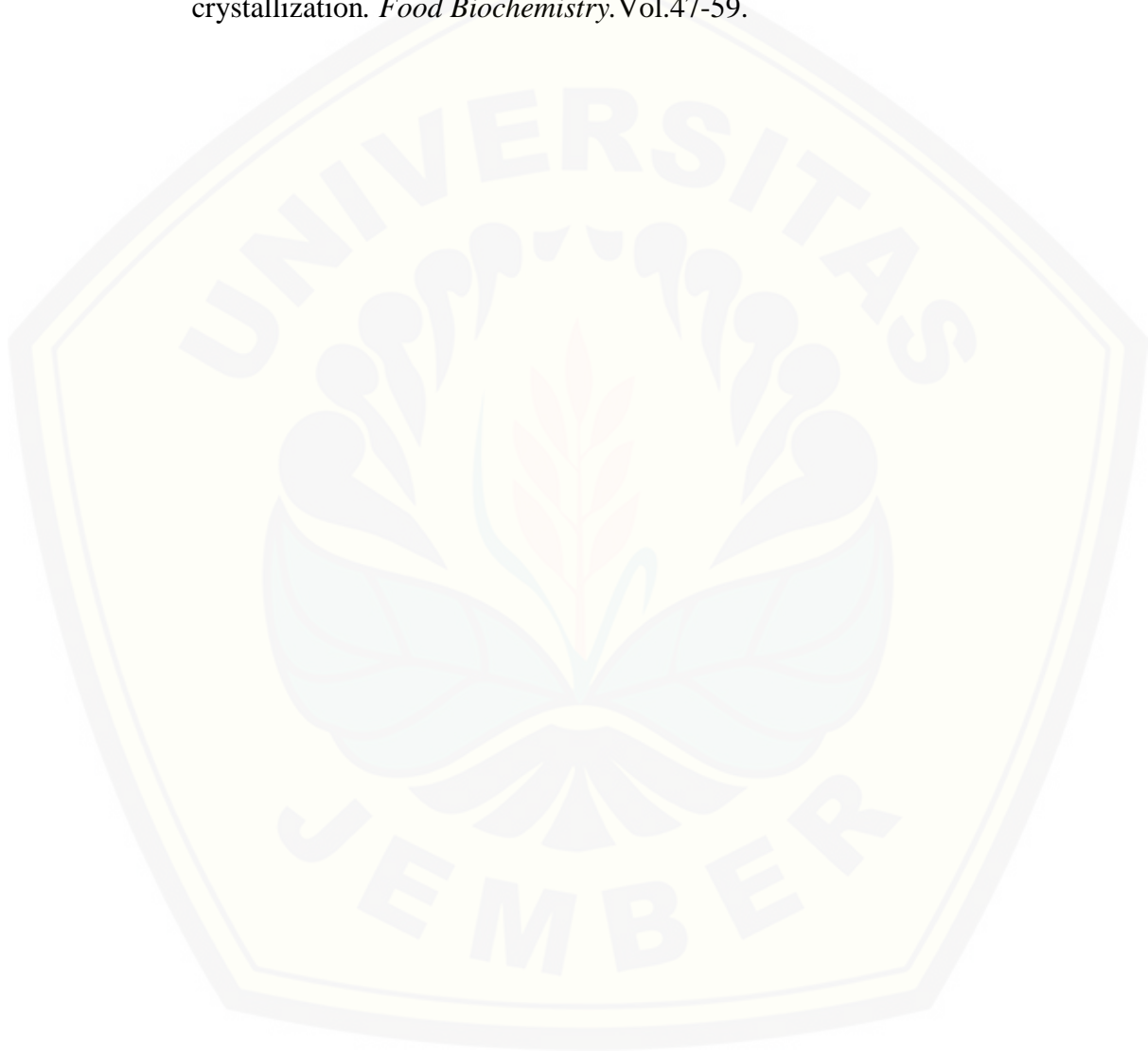
- Murni, R., Suparjo, Akmal, B.L., dan Ginting. 2008. *Buku Ajar Pengolahan Limbah Pakan Ternak*. Jambi : Laboratorium Makanan Ternak Fakultas Peternakan, Universitas Jambi.
- Amruthr,N.J, Preetam,J.P, Saraj, S, Saravan, L. Antoine Label.2014.In Vitro Studies on Anticancer Activity of Capsaicinoids from CapsicumchinenseAgainst Human HepatocelularCarcinoma Cells.*International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol.6 : 2-4
- Singh, N., J. Singh, L. Kaur, N. S. Sodhi, dan B. S. Gill. 2007. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical source. *Food Chemistry*. 81 : 219-231.
- Shojiro,N, Ryosuke,S.1965.Cystallization of Concanavalin A and B and Canavalin from Japanese Jack Bean.*Archives of Bhiochemistry and Biophysic*. 111, 499605
- Nasution, M. Syurbainy. 2008. *Kacang Koro Bisa Jadi Substitusi Kedelai*. [On line]. <http://groups.yahoo.com/group/sa-roha/message/1288>. [diakses tanggal 5 Juli 2016]
- Ohler. 1979. Chahew. di dalam Wahyuni, L. 2000. Mempelajari Pengaruh Suhu, Waktu dan Tekanan Pengempaan Terhadap Rendemen dan Mutu Minyak Kulit Biji Mete.*Jurnal Pangan.ITB*. Bogor. Vol 4 : 8-9
- Ohwoavworhua, F.O. 2005. Phosphoric Acid-Mediated Depolymerization and Decrystallizationof a Cellulose Obtained from CornCob : Preparation of Low Crystallinity Cellulose and Some Physicochemical Properties.*Tropical Journal of Pharmaceutical*. Nigeria :University of Benin Vol 125 : 5-8.
- Oyewole, O.B. dan Odunfa, S.A. 1990. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *Journal Application Bacteriology*. 68: 145-152.
- DeMattei, R.C, Feigelson, R.S.1991.The solubility dependence of canavalin on pH and temperature.1998.The solubility dependence of canavalin on pH and temperature.*Journal of Cwstal Growth* Vol 110 :34 40
- Mallika,R.Krishnakali,N.Manoranjana,S.1987.*Temporal Regulation in The Synthesis of Concanavalin A and a-Mannosidasi in The Seeds of Canavaliaensiformis*.Phytochemirry, Vol. 26. No. 12. pp. 3201-320
- Rahayu, E. S. 2000. Bakteri Asam Laktat dan Fermentasi Tradisional Indonesia, Nilai Gizi, dan Kajian Manfaatnya.*Jurnal Widya Karya Nasional Khasiat Makanan Tradisional* : 34 – 37.

- Rubatzky, V.E. dan M. Yamaguchi. 1998. *Sayuran Dunia : Prinsip, Produksi, dan Gizi. Jilid 2*. Bandung : Penerbit ITB.
- Bernhard,S, Van Hai,Christiant H,Michael.1995. Sequence Analysis of Concanavalin B from *CanavaliaEnsiformis* Reveals Homology to Chitinases. *Plant Physiol* Vol. 147. pp. 665-674
- Ekanayake,S, Jansz E. R,Baboo M. Nair and Abeysekera,A.M.1999. A Review on an underutilized legume *Canavaliagladiata*. *idyodaya1. of Sci.*, (1999) Vol, 8, pp 1-25
- Saono, S., 1976. *Metabolisme dari Fermentasi*. Ceramah Ilmiah Proceeding Lokakarya Bahan Pangan Berprotein Tinggi. LKN-LIPI, Bandung. Hal 5-7.
- Song, F. 2008. Immunoreactivity Reduction of Soybean Meal by Fermentation, Effect on Amino Acid Composition and Ntigenicity of Commercial Soy Products. *Food Chemistry 108* : (571–581)
- Sharma V and Surolia A.1997.Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins : size of the combining site loops and their primary specificity.*J.Mol.Biol* Vol 267: 433-445
- Sridhar, K.R., dan Seenaa S. 2006. *Nutritional and antinutritional significance of Four Unconventional Legumes of The Genus Canavalia – A Comparative Study*. Food Chemistry Vol 99: 267-288
- Stephanie, J.Stephen,A.James,M.Alexander.1982.Biochemical Characterization of Canavalin, the Major Storage Protein of Jack Bean. *American Society of Plant Biologists*.Vol 70 : 34-56
- Subagio, A., Windrati, W. S., dan Witono, Y. 2003. Development of Functional Proteins from some Local Non-oilseed Legumes as Food Additivies. *Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Infonesia (PATPI)* 22-23 Juli : Yogyakarta.
- Subagio, A., Witono, Y., dan Windrati, S. W., 2002.Protein Albumin dan Globulin dari Beberapa Jenis Koro di Indonesia. *Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Infonesia (PATPI)* 30-31 Juli Malang : 135 – 140.
- Suciati, A. 2012. “Pengaruh Lama Perendaman Dan Fermentasi Terhadap Kandungan HCN Pada Tempe Kacang Koro (*Canavalia ensiformis L*)”. Skripsi. Makasar : Fakultas Pertanian, Universitas Hasanudin.

Suzanne, M. 1977. *Extraction of concanavalinAfromcrat testicular and affinity material epididymalspermatozoa*.Ann.Biolanim Vol 50 : 207-213

Winarno, F.G., S. Fardiaz dan D. Fardiaz, 1980. *Pengantar Teknologi Pangan*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.

W.Maxim, J.Mathew, U.Joachim.2008.Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization. *Food Biochemistry*.Vol.47-59.



LAMPIRAN

A. Data dan Perhitungan Analisis Total Protein

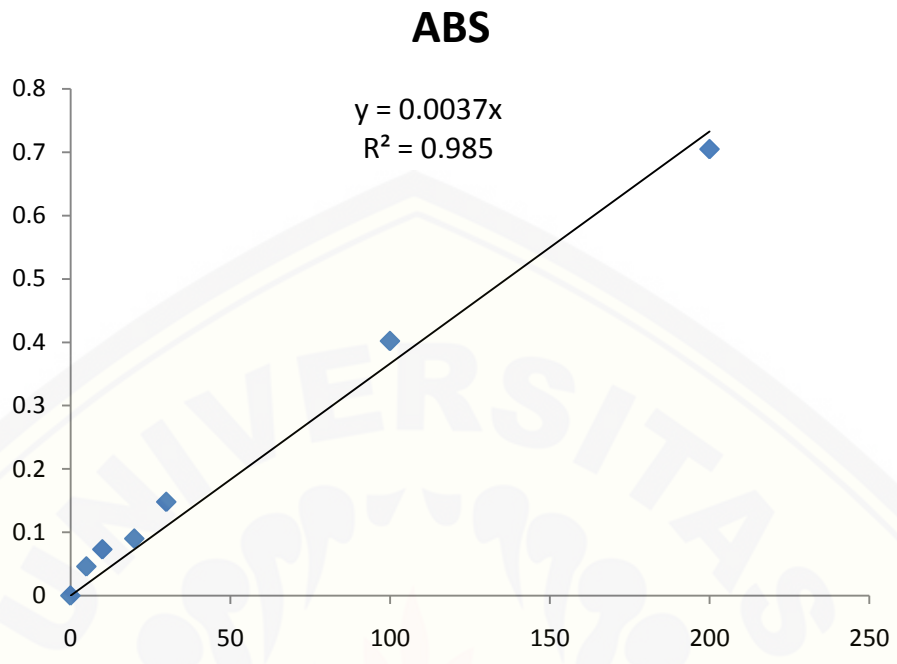
A.1 Data Analisis Total Protein

Sampel	Berat sampel	Titration sampel	Titration Blanko	Selisih	Hasil % N	Kadar Protein	Rata-rata
TKP	0.1035	18	0.3	17.7	4.791142029	29.94463768	32.14
	0.103	20.5	0.3	20.2	5.4944	34.34	
MOLEF	0.1027	19.5	0.3	19.2	5.237655307	32.73534567	33.71
	0.102	20.5	0.3	20.2	5.548266667	34.67666667	
KP	0.1031	23	0.3	22.7	6.168411251	38.55257032	36.80
	0.1034	21	0.3	20.7	5.608618956	35.05386847	

B. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Protein Terlarut

B.1 Kurva Standart BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Reagent (µg/ml)	Volume (µl)	Aquadest (µl)	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi
20 µg/ml BSA	20 µl	1980 µl	200 µg/ml BSA	0.705
200 µg/ml BSA	1000 µl	1000 µl	100 µg/ml BSA	0.402
100 µg/ml BSA	1200 µl	800 µl	60 µg/ml BSA	0.291
60 µg/ml BSA	1000 µl	1000 µl	30 µg/ml BSA	0.148
30 µg/ml BSA	1200 µl	600 µl	20 µg/ml BSA	0.09
20 µg/ml BSA	800 µl	800 µl	10 µg/ml BSA	0.073
10 µg/ml BSA	600 µl	600 µl	5 µg/ml BSA	0.046



B.2 Data Analisis Kadar Protein Terlarut

SAMPSEL	Absorbansi (595 nm)		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
KP-27	0.358	0.117	0.455
KP-40	0.260	0.242	0.275
KP-50	0.013	0.324	0.161
MOLEF-27	0.501	0.491	0.475
MOLEF-40	0.345	0.518	0.409
MOLEF-50	0.378	0.445	0.387
TKP-27	0.431	0.467	0.561
TKP-40	0.351	0.317	0.578
TKP-50	0.343	0.334	0.407

Sampel	Protein Terlarut ($\mu\text{g/mL}$)				Protein Terlarut (mg/mL)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata	
KP-27	19351.35	6297.3	24567.57	16738.74	16.74
KP-40	14054.05	13054.05	14837.84	13981.98	13.98
KP-50	702.70	17513.51	8675.68	8963.96	8.96
MOLEF-27	27081.08	26540.54	25675.68	26432.43	26.43
MOLEF-40	18648.65	28000.00	22108.11	22918.92	22.92
MOLEF-50	20432.43	24054.05	20918.92	21801.80	21.80
TKP-27	23297.30	25243.24	30324.32	26288.29	22.29
TKP-40	18972.97	17135.14	31243.24	22450.45	22.45
TKP-50	18540.54	18054.05	22000.00	19531.53	19.53

B.3 Contoh Perhitungan Kadar Protein Terlarut

Diketahui : persamaan $y = 0.0037x$

Absorbansi (y) = 0.358

maka,

$$0.358 = 0.0037x$$

$$x = 0.358 / 0.0037$$

$$x = 96.76$$

Protein Terlarut = $x \cdot \text{FP} \cdot \text{volume sampel}$

$$= 96.76 \cdot 100 \cdot 2$$

$$= 19351.35 \mu\text{g/mL}$$

$$= 19.35 \text{ mg/mL}$$

C. Data dan Perhitungan Analisis Rendemen Hasil Ekstraksi dan Total Concanavalin A

C.1 Data Wash Solution TKP (Volume 2 ml)

SAMPLE	ABS 595	PROTEIN TERLARUT($\mu\text{g/mL}$)	PROTEIN TERLARUT (mg/mL)	RATA-RATA
Blank	0.518	560.00	0.56	
27 (1)	0.104	112.43	0.11	
27 (2)	0.078	84.32	0.08	
27 (3)	0.124	134.05	0.13	0.11
40 (1)	0.11	118.92	0.12	
40 (2)	0.117	126.49	0.13	
40 (3)	0.103	111.35	0.11	0.12
50 (1)	0.139	150.27	0.15	
50 (2)	0.107	115.68	0.12	
50 (3)	0.093	100.54	0.10	0.12

C.2 Data Eluted Solution TKP (Volume 1 ml)

SAMPLE	ABS 595	PROTEIN TERLARUT ($\mu\text{g/mL}$)	PROTEIN TERLARUT (mg/mL)	RATA-RATA
Blank	0.518	140.00	0.14	
27 (1)	0.294	79.46	0.08	
27 (2)	0.321	86.76	0.09	
27 (3)	0.343	92.70	0.09	0.09
40 (1)	0.348	94.05	0.09	
40 (2)	0.376	101.62	0.10	
40 (3)	0.338	91.35	0.09	0.10
50 (1)	0.349	94.32	0.09	
50 (2)	0.357	96.49	0.10	
50 (3)	0.296	80.00	0.08	0.09

C.3 Data *Wash Solution* Koro Pedang (Volume 2 ml)

SAMPLE	ABS 595	PROTEIN TERLARUT ($\mu\text{g/mL}$)	PROTEIN TERLARUT (mg/mL)	RATA- RATA
Blank	0.555	600.00	0.60	
27 (1)	0.082	88.65	0.09	
27 (2)	0.11	118.92	0.12	
27 (3)	0.125	135.14	0.14	0.11
40 (1)	0.069	74.59	0.07	
40 (2)	0.31	335.14	0.34	
40 (3)	0.104	112.43	0.11	0.17
50 (1)	0.095	102.70	0.10	
50 (2)	0.053	57.30	0.06	
50 (3)	0.069	74.59	0.07	0.08

C.4 Data *Eluted Solution* Koro Pedang (Volume 1 ml)

SAMPLE	ABS 595	PROTEIN TERLARUT ($\mu\text{g/mL}$)	PROTEIN TERLARUT (mg/mL)	RATA- RATA
Blank	0.555	150.00	0.15	
27 (1)	0.701	189.46	0.19	
27 (2)	0.657	177.57	0.18	
27 (3)	0.662	178.92	0.18	0.18
40 (1)	0.658	177.84	0.18	
40 (2)	0.668	180.54	0.18	
40 (3)	0.669	180.81	0.18	0.18
50 (1)	0.656	177.30	0.18	
50 (2)	0.658	177.84	0.18	
50 (3)	0.656	177.30	0.18	0.18

C.5 Data *Wash Solution* MOLEF (Volume 2 ml)

SAMPLE	ABS 595	PROTEIN TERLARUT ($\mu\text{g/mL}$)	PROTEIN TERLARUT (mg/mL)	RATA- RATA
Blank	0.478	516.76	0.52	
27 (1)	0.074	80.00	0.08	
27 (2)	0.036	38.92	0.04	
27 (3)	0.025	27.03	0.03	0.05
40 (1)	0.017	18.38	0.02	
40 (2)	0.044	47.57	0.05	
40 (3)	0.045	48.65	0.05	0.04
50 (1)	0.039	42.16	0.04	
50 (2)	0.042	45.41	0.05	
50 (3)	0.065	70.27	0.07	0.05

C.6 Data *Eluted Solution* MOLEF (Volume 1 ml)

SAMPLE	ABS 595	PROTEIN TERLARUT ($\mu\text{g/mL}$)	PROTEIN TERLARUT (mg/mL)	RATA- RATA
Blank	0.478	129.19	0.13	
27 (1)	0.618	167.03	0.17	
27 (2)	0.603	162.97	0.16	
27 (3)	0.607	164.05	0.16	0.16
40 (1)	0.643	173.78	0.17	
40 (2)	0.632	170.81	0.17	
40 (3)	0.633	171.08	0.17	0.17
50 (1)	0.639	172.70	0.17	
50 (2)	0.628	169.73	0.17	
50 (3)	0.649	175.41	0.18	0.17

C.7 Data Hasil Concanavalin A

Sampel	Protein Terlarut (mg)	Yield (%)	Con A* (mg)	Con A Recovery (%)	Purification (fold)
KP 27					
1/100 diluted extract	16.74		16.63		
Wash solution	0.11	0.66			
Eluted solution	0.18	1.08	0.18	0.011	93.00
KP 40					
1/100 diluted extract	13.98		13.81		
Wash solution	0.17	1.22			
Eluted solution	0.18	1.29	0.18	0.013	77.67
KP 50					
1/100 diluted extract	8.96		8.88		
Wash solution	0.08	0.89			
Eluted solution	0.18	2.01	0.18	0.020	49.78
MOLEF 27					
1/100 diluted extract	26.43		26.38		
Wash solution	0.05	0.19			
Eluted solution	0.16	0.61	0.16	0.006	165.19
MOLEF 40					
1/100 diluted extract	22.45		22.41		
Wash solution	0.04	0.18			
Eluted solution	0.17	0.76	0.17	0.008	132.06
MOLEF 50					
1/100 diluted extract	21.80		21.75		
Wash solution	0.05	0.23			
Eluted solution	0.17	0.78	0.17	0.008	128.24
TKP 27					
1/100 diluted extract	26.29		26.18		
Wash solution	0.11	0.42			
Eluted solution	0.09	0.34	0.09	0.003	292.11
TKP 40					

1/100 diluted extract	22.45		22.33		
Wash solution	0.12	0.53			
Eluted solution	0.10	0.45	0.10	0.004	224.50
TKP 50					
1/100 diluted extract	19.53		19.41		
Wash solution	0.12	0.61			
Eluted solution	0.09	0.46	0.09	0.005	217.00

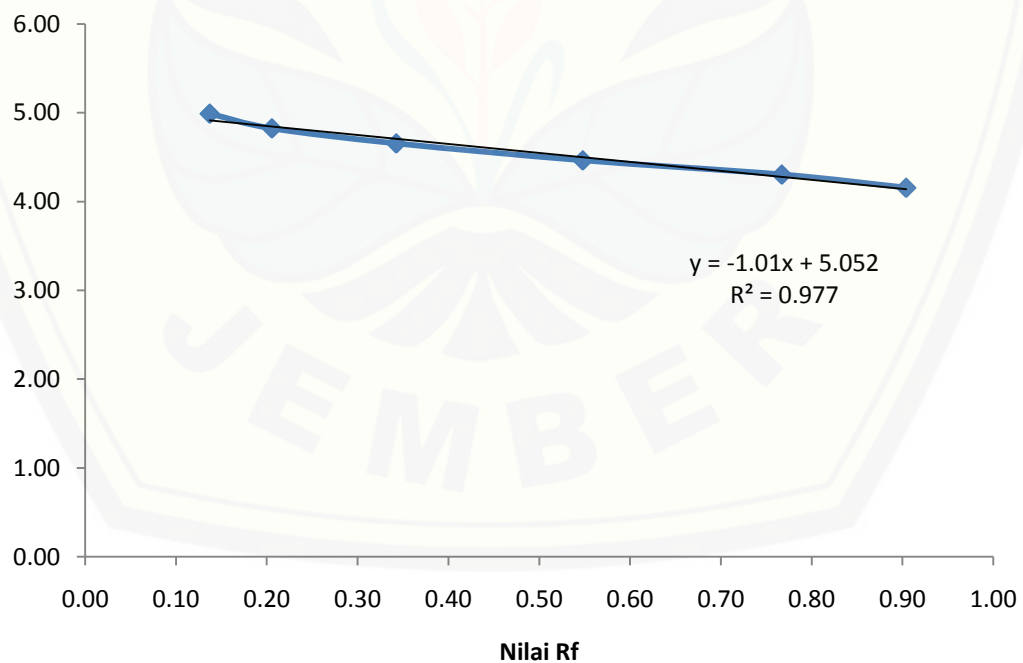
C.8 Contoh Perhitungan Rendemen dan Total Con A.

- Rendemen (*Yield*) = (Total Con A/Berat awal bahan yang diekstrak)*100 = %
 Rendemen (KP 27) = 1.75g/10g*100 = 17.5%
- Con A recovery (KP 27) = 0.18/16.74
 = 0.011 %
- Total Con A = Total Protein 1/100 diluted extraction – Total Protein of wash solution
 Total Con A (KP 27) = 16,74 – 0,11
 = 16,63 mg
- Fold (purifikasi) = Total protein 1/100 pengenceran/total protein of eluted solution
 = 16.74/0.18
 = 93

D. Data dan Perhitungan SDS-PAGE

D 1. Kurva standart gel optimasi

Berat Molekul (Da)	Jarak (r)	Rf (x/jarak total lintasan)	y (size protein)
97200	1.23	0.14	4.99
66400	1.85	0.21	4.82
45000	3.08	0.34	4.65
29000	4.93	0.55	4.46
20100	6.90	0.77	4.30
14300	8.14	0.90	4.16



D 2. Berat molekul sampel

Sampel	Jarak (r)	Rf (x)	y	BM (Da)
Concanavalin A				
*1/50 TKP	4.56	0.51	4.540082192	34680.25
*1/50E TKP	4.81	0.53	0.539589041	32539.51
*1/50E KP	4.68	0.52	4.526246575	33592.83
Kontrol	4.93	0.55	4.498575342	31519.21
*1/50E MOLEF	4.56	0.51	4.540082192	34680.25
*1/100E MOLEF	4.44	0.49	4.553917808	35802.87
Globulin				
*1/50 TKP	2.84	0.32	4.733780822	54172.74
*1/50E TKP	3.08	0.34	4.706109589	50828.77
*1/50E KP	2.96	0.33	4.719945205	52474.12
*1/50E MOLEF	3.08	0.34	4.706109589	50828.77
*1/100E MOLEF	2.96	0.33	4.719945205	52474.12

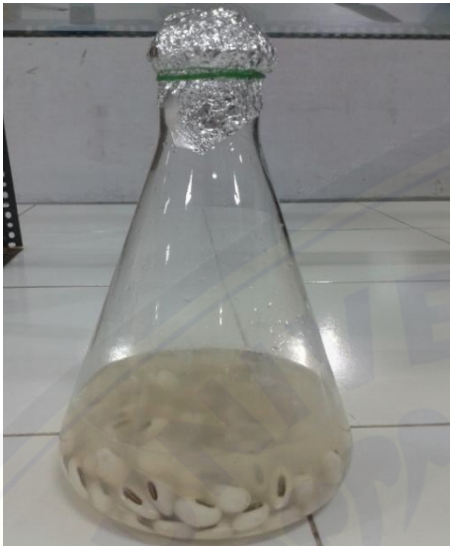
D.3 Contoh perhitungan berat molekul

$$\begin{aligned}
 R_f(x) \text{ *1/50 TKP} &= r/\text{lebar gel} \\
 &= 4,56/9 \\
 &= 0,51
 \end{aligned}$$

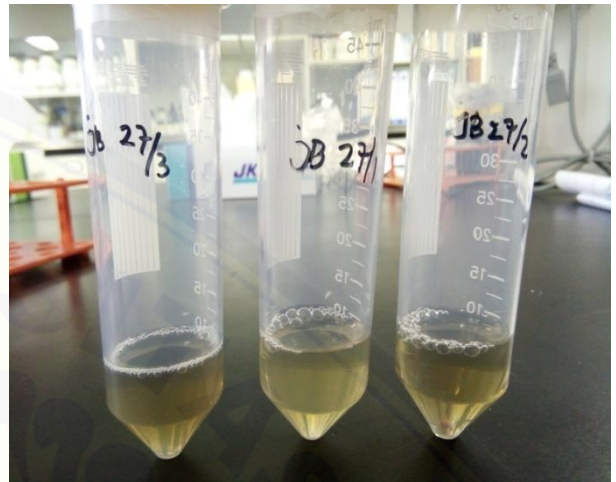
$$\begin{aligned}
 y &= -1,01x + 5.052 \\
 &= -1,01 (0,51) + 5,052 \\
 &= 4.540082192
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BM} &= \text{Anti log } (y) \\
 &= \text{Anti log } (4.540082192) \\
 &= 34680.25 \text{ Da} \\
 &= 34,68 \text{ kDa}
 \end{aligned}$$

E. GAMBAR EKSTRAKSI CONCAVAVALIN A



Fermentasi koro pedang menggunakan *L. Plantarum*



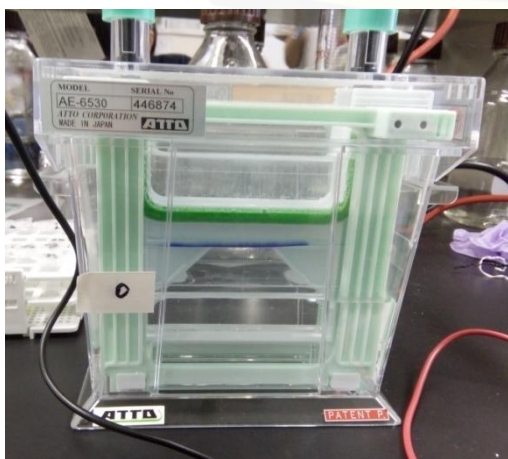
Hasil ekstraksi sampel tepung koro pedang suhu 27°C



Hasil freeze drying sampel yang sudah diekstraksi



Uji protein terlarut



Uji elektroforesis



Dialisis sampel dalam PBS