



**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR
GENISTEIN EKSTRAK EDAMAME (*Glycine max* L. Merrill)
TERFERMENTASI *Rhizopus oligosporus* DENGAN
METODE KLT DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Oleh :

**Dewi Novitasari
NIM 142210101120**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR
GENISTEIN EKSTRAK EDAMAME (*Glycine max* L. Merrill)
TERFERMENTASI *Rhizopus oligosporus* DENGAN
METODE KLT DENSITOMETRI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

**Dewi Novitasari
NIM 142210101120**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah Subhanahu wa ta'ala dengan segala petunjuk, rahmat, hidayah, anugerah serta kasih-Nya telah memberikan kemudahan sehingga penulis dapat mengerjakan skripsi ini dengan baik;
2. Kedua orang tua tercinta, Ibu Winarsih, Bapak Suhairik, terimakasih atas kasih sayang, doa, kesabaran, perjuangan, motivasi, nasihat, dukungan mental, dan materiil, serta didikan yang telah diberikan selama ini. Semoga lulus menjadi seorang Sarjana Farmasi menjadi salah satu yang dapat dibanggakan dari penulis;
3. Kakak dan adik tersayang, Kakak Eny Nurmamik, Kakak Nanang Sugiarto, Kakak Hilmiyatul Ulfa, Adik Ghiby, Adik Gibran, Adik Vando dan Adik Farouq atas segala semangat, doa, dan dukungan yang telah diberikan;
4. Guru-guru penulis sejak Taman Kanak-kanak sampai SMA, dosen, dan segenap civitas akademika Fakultas Farmasi Universitas Jember atas ilmu dan bimbingan yang diberikan kepada penulis dengan penuh kesabaran;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Barang siapa yang melakukan perbuatan baik, maka ia akan mendapatkan pahala (dalam perbuatan itu) dan pahala orang yang menirunya tidak di kurangi pahalanya sedikitpun. Dan barang siapa yang melakukan perbuatan yang buruk, maka ia akan menanggung dosa dan orang-orang yang menirunya dengan tidak di kurangi dosanya sedikitpun.

(HR. Imam Muslim)

“Bermimpilah seakan kau akan hidup selamanya
Hiduplah seakan kau akan mati hari ini”

(James Dean)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dewi Novitasari

NIM : 142210101120

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Validasi Metode Penetapan Kadar Genistein Ekstrak Edamame (*Gycine max* L. Merrill) Terfermentasi *Rhizopus oligosporus* dengan Metode KLT-Densitometri” adalah benar-benar hasil karya diri sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus di junjung tinggi.

Demikian pernyataan yang dibuat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Juli 2018

Yang menyatakan,

Dewi Novitasari

NIM 142210101120

SKRIPSI

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR
GENISTEIN EKSTRAK EDAMAME (*Glycine max* L. Merrill)
TERFERMENTASI *Rhizopus oligosporus* DENGAN
METODE KLT DENSITOMETRI**

Oleh :

Dewi Novitasari

NIM 142210101120

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Endah Pupitasari, S. Farm, M. Sc, Apt .

Dosen Pembimbing Anggota : Dewi Dianasari, S. Farm, M. Farm, Apt

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Validasi Metode Penetapan Kadar Genistein Ekstrak Edamame (*Gycine max* L. Merrill) Terfermentasi *Rhizopus oligosporus* dengan Metode KLT-Densitometri**” karya Dewi Novitasari telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Jumat, 20 Juli 2018

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Anggota I,

Endah Pupitasari, S.Farm, M.Sc, Apt.

Bawon Triatmoko, S.Farm, M.Sc., Apt.

NIP 198107232006042002

NIP 198201292009121003

Anggota II,

Anggota III,

Dewi Dianasari, S.Farm, M.Farm., Apt.

Indah Yulia N., S.Farm, M.Farm, Apt.

NIP 198712082014042002

NIP 198407122008122002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

Lestyo Wulandari, S.Si.,M.Farm.,Apt.

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Validasi Metode Penetapan Kadar Genistein Ekstrak Edamame (*Glycine Max* L. Merrill) Terfermentasi *Rhizopus Oligosporus* dengan Metode KLT-Densitometri; Dewi Novitasari, 142210101120; 2018: 86 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kanker payudara menjadi salah satu jenis kanker yang paling banyak menyerang wanita di negara berkembang, seperti halnya di Indonesia. Salah satu faktor risiko yang dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara yaitu estrogen. Paparan estrogen yang tinggi berperan dalam meningkatkan angka kejadian kanker. Fitoestrogen merupakan senyawa turunan estradiol dari bahan alam seperti isoflavon yang dapat dijadikan sebagai senyawa antikanker. Salah satu senyawa isoflavon aglikon memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang sangat kuat yaitu genistein. Tanaman yang memiliki kandungan isoflavon tertinggi adalah kedelai.

Edamame (*Glycine max*) merupakan jenis kedelai Jepang yang jumlahnya melimpah di Jember dan memiliki kandungan gizi yang sama dengan kedelai. Di dalam edamame, senyawa aktif yang terkandung masih dalam bentuk isoflavon glikosida (genistin, daidzin, dan glisitin) dengan aktivitas biologis yang lebih rendah. Adanya fermentasi dapat mengubah senyawa glikosida menjadi bentuk aglikon (genistein, daidzin dan glisitin) dengan aktivitas biologis yang lebih besar. Genistein merupakan komponen tertinggi dibandingkan aglikon lainnya. Fermentasi dapat meningkatkan kadar genistein hingga dua kali lipat. Kapang yang biasa digunakan dalam fermentasi tempe adalah *Rhizopus oligosporus*.

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode dan penetapan kadar genistein pada edamame varietas *Ship Protection* Mitra Tani (SPM)-1 nonfermentasi dan terfermentasi *R. oligosporus* selama hari ke-1; 2; 3; dan 4 menggunakan metode KLT-densitometri. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini mulai dari pembuatan tempe edamame, pembuatan ekstrak, optimasi kondisi analisis, validasi metode analisis dan penetapan kadar genistein menggunakan metode

analisis yang telah diuji validitasnya. Validasi metode analisis perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya dan memberikan hasil yang valid.

Kondisi analisis menunjukkan kondisi optimum metode analisis genistein ekstrak edamame dengan metode KLT-densitometri yaitu menggunakan pelarut metanol p.a; fase diam Silika Gel 60 F₂₅₄; fase gerak n-heksana : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15); dan konsentrasi uji 15,96 µg/ml. Lempeng dianalisis menggunakan scanner Densitometri WinCATS Camag dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 266 nm. Penilaian terhadap parameter validasi yang diperoleh hasil yang linier ($r_{hitung} = 0,9989$; $r_{tabel} = 0,8822$; $V_{x_0} = 3,5113\%$; dan $X_{p_{value}} = 26,7452$ ng); peka dengan nilai batas deteksi (24,9329 ng) dan batas kuantitasi (74,7986 ng); kurang selektif ($R_s < 1,5$) namun dapat memisahkan puncak genistein dengan puncak lain yang ada dalam sampel dan spesifik dengan nilai korelasi spektra pada uji *purity* dan *identity* lebih dari 0,99; presisi dengan RSD uji presisi repeatabilitas = 3,9642% dan RSD uji presisi antara = 1,8617%; dan akurat dengan $mean\ recovery \pm RSD = 99,2492 \pm 3,0517\%$ (b/b).

Kadar genistein pada edamame nonfermentasi dan terfermentasi pada hari ke-1; 2; 3; dan 4 ± SD secara berturut-turut sebesar $0,01887 \pm 2,6 \times 10^{-4}$; $0,00301 \pm 4,1 \times 10^{-4}$; $0,01545 \pm 5,9 \times 10^{-4}$; $0,00772 \pm 3 \times 10^{-4}$; dan $0,00109 \pm 3,9 \times 10^{-4}\%$ (b/b). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kadar genistein dengan waktu fermentasi (sig. $p < 0,01$). Kadar genistein tertinggi yaitu pada edamame nonfermentasi dan kadar terendah pada hari keempat fermentasi. Kadar genistein edamame nonfermentasi lebih tinggi dibandingkan edamame terfermentasi *R. oligosporus*. Peningkatan kadar genistein pada edamame terfermentasi optimal pada hari kedua fermentasi.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode Penetapan Kadar Genistein Ekstrak Edamame (*Gycine max* L. Merrill) Terfermentasi *Rhizopus oligosporus* dengan Metode KLT-Densitometri”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT dengan segala petunjuk, rahmat, hidayah, anugerah serta kasih-Nya telah memberikan kemudahan sehingga penulis dapat mengerjakan skripsi ini dengan baik;
2. Kedua orang tua tercinta, Ibu Winarsih, Bapak Suhairik, terimakasih atas kasih sayang, doa dan kesabaran yang tidak terbatas, untuk pelajaran dan didikan yang telah diberikan selama ini, motivasi, nasihat, dukungan mental dan materiil, semangat, serta perjuangannya yang tak terhingga selalu berusaha memberikan pendidikan dan segala yang terbaik untuk penulis. Semoga lulus menjadi seorang sarjana farmasi menjadi salah satu yang dapat dibanggakan dari penulis;
3. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si.,Apt.,M.Farm., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
4. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. dan Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing, terimakasih atas segala kesabaran, waktu, arahan, motivasi, ilmu, nasihat yang sangat berharga dan bermanfaat serta semangat yang diberikan dalam membimbing penulis sehingga dapat menyelesaikan naskah skripsi ini;
5. Bapak Bawon Triatmoko., S.Farm., M.Sc., Apt. dan Ibu Indah Yulia Ningsih., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji, terimakasih atas segala kritik, saran dan bimbingannya yang telah diberikan demi kesempurnaan skripsi ini;

6. Bapak Dwi Nurahmanto, S.Farm.,M.Sc., Apt dan Bapak Dian Agung P, S.Farm., M. Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
7. Ibu Widya Trinanda, S.T, dan Ibu Parka Agnita S.Pd., Ibu Ni Wayan Suwandaru, S.Si dan Ibu Hany Indah Kurniati S.Si. selaku teknisi Laboratorium Biologi dan Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember terimakasih atas segala bimbingan, masukan, solusi, nasihat, waktu, serta kesabarannya selama proses penyelesaian skripsi ini;
8. Seluruh dosen dan staff Fakultas Farmasi dengan ikhlas telah memberikan ilmu, tenaga, dan waktu yang sangat berhargadan bermanfaat sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi ini.
9. Kakak dan adik tersayang, Kakak Eny Nurmamik, Kakak Nanang Sugiarto, Kakak Hilmiyatul Ulfa, Adik Ghiby, Adik Gibran, Adik Vando dan Adik Farouq atas segala semangat, doa dan dukungannya yang telah diberikan.
10. Puguh Wiratrama Pratikto S.T, dengan segala kesabaran dan penuh kasih sayang selalu memberikan dorongansemangat, membantu, dan mendengarkan segala keluh kesah penulis dan telah mengajari arti kedewasan dan kesabaran yang sesungguhnya. Terimakasih untuk tidak mengeluh atas segala tindakan penulisdan selalu menjadi diri sendiri;
11. Teman seperjuangan Edamame Squad (Mace, Tika, Tatik, Adinda, Yogi) dan Biologi Squad (Mbak Parka, Bundu Alfia, Hilda, Alfia) yang selalu menemani keseharian di Laboratorium Biologi, berbagi canda, dan tawa;
12. Sahabatku “Keluarga The Pututers” (Erlinda Dwi Jayanti, Leny Rizkiana dan Amelia Kusuma Dewi) yang menjadi penyemangat dalam mengerjakan skripsi ini, terimakasih telah mendengarkan, menasehati dan menghibur penulis serta tumbuh bersama sebagai teman rantau selama di Jember;
13. Keluarga besar Pharmagen 2014 yang tiada tara. Terimakasih atas kebersamaan selama ini di bangku perkuliahan, telah berproses bersama,

dukungan, motivasi, dan doa yang telah diberikan. Semoga kita semua selalu diberikan kemudahan dan kelancaran menuju gelar sarjana dan apoteker dengan segala kesuksesan serta seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu dan yang sangat berperan dalam penyusunan naskah skripsi ini.

14. Keluarga bahagia KKN UMD 26 Ayin, Elik, Nora, Umi, April, Nizam, Hendri, Rendi dan Ronny atas semangat dan kebersamaan selama ini;
15. Guru dan teman-teman sekolah TK Khadijah, SDN 01 Temuguruh, SMPN 01 Sempu, dan SMAN 2 Genteng;
16. Serta untuk setiap nama yang tidak dapat tertulis satu persatu, terimakasih kepada semua pihak yang membantu keberhasilan untuk menyelesaikan skripsi ini

Penulis juga sangat menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 20 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Edamame	5
2.1.1 Klasifikasi Edamame	5
2.1.2 Morfologi Tanaman Edamame	6
2.1.3 Deskripsi Varietas SPM-1	6
2.1.4 Kandungan Kimia Edamame	7
2.2 Tinjauan tentang Isoflavon dan Genistein	7
2.3 Tinjauan Fermentasi	10
2.4 Tinjauan Kapang <i>R. oligosporus</i>	12
2.5 Tinjauan Optimasi Kondisi Analisis	14
2.6 Tinjauan Validasi Metode Analisis	15

2.6.1 Linieritas dan Rentang	17
2.6.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK).....	17
2.6.3 Selektivitas /Spesifisitas	18
2.6.4 Presisi.....	19
2.6.5 Akurasi.....	20
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	22
3.1 Jenis Penelitian.....	22
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.3.1 Alat Penelitian.....	22
3.3.2 Bahan Penelitian	22
3.4 Variabel Penelitian.....	23
3.4.1 Variabel Bebas	23
3.4.2 Variabel Terikat	23
3.4.3 Variabel Terkendali	23
3.5 Definisi Operasional.....	23
3.6 Rancangan Penelitian	24
3.7 Prosedur Penelitian.....	24
3.7.1 Preparasi Kedelai Nonfermentasi	24
3.7.2 Peremajaan Isolat <i>R. oligosporus</i>	24
3.7.3 Pembuatan Suspensi Spora <i>R. oligosporus</i>	25
3.7.4 Perhitungan Kepadatan Spora.....	25
3.7.5 Preparasi Edamame Terfermentasi <i>R. oligosporus</i>	27
3.7.6 Proses Penghilangan Lemak (<i>defatting</i>)	27
3.7.7 Pembuatan Ekstrak Edamame Terfermentasi dan Nonfermentasi.....	28
3.7.8 Optimasi Kondisi Analisis	28
3.7.9 Validasi Metode Analisis.....	30
3.7.10 Penetapan Kadar Genistein.....	32
3.7.11 Analisis Data.....	32
3.8 Skema Penelitian	36

3.8.1 Skema Pembuatan Ekstrak Edamame	
Terfermentasi dan Nonfermentasi	36
3.8.2 Skema Validasi Penetapan Kadar Genistein	
Menggunakan KLT-densitometri	37
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Karakteristik Edamame Terfermentasi <i>R. oligosporus</i>.....	36
4.2 Hasil Rendemen Ekstrak Edamame	37
4.3 Optimasi Kondisi Analisis.....	38
4.3.1 Optimasi Eluen	38
4.3.2 Optimasi Panjang Gelombang	40
4.3.3 Optimasi Konsentrasi Uji.....	41
4.4 Validasi Metode Analisis	42
4.4.1 Linieritas	42
4.4.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK).....	43
4.4.3 Selektivitas/spesifisitas	44
4.4.4 Presisi.....	46
4.4.5 Akurasi.....	47
4.5 Hasil Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame	48
BAB 5. PENUTUP.....	54
5.1 Kesimpulan.....	54
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Biji edamame tanpa kulit ari	6
Gambar 2.2 Struktur kimia isoflavon dan derivatnya dalam kedelai	9
Gambar 2.3 Hidrolisis genistin menjadi genistein.	11
Gambar 2.4. Morfologi kapang <i>R. oligosporus</i>	13
Gambar 3.1 Kamar hitung <i>hemacytometer improved neubauer</i>	26
Gambar 3.2 Cara perhitungan spora.....	27
Gambar 3.3 Skema pembuatan ekstrak edamame terfermentasi dan nonfermentasi	34
Gambar 3.4 Skema validasi penetapan kadar genistein menggunakan KLT- densitometri	35
Gambar 4.1 Karakteristik kedelai fermentasi dengan <i>R. oligosporus</i>	36
Gambar 4.2 Spektra standar genistein pada panjang gelombang 200-400 nm	40
Gambar 4.3 Kromatogram pemisahan genistein.....	44
Gambar 4.4 Spektra uji <i>purity</i> dan uji <i>identity</i>	45
Gambar 4.5 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame terfermentasi <i>R. oligosporus</i>	49
Gambar 4.6 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame nonfermentasi	49
Gambar 4.7 Hasil penetapan kadar genistein ekstrak edamame	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Konsentrasi analit berbanding RSD.....	20
Tabel 2.2 Perolehan kembali (% <i>recovery</i>) analit pada konsentrasi yang berbeda	21
Tabel 4.1 Karakteristik tempe edamame terfermentasi <i>R. oligosporus</i>	36
Tabel 4.2 Hasil rendemen ekstrak edamame.....	38
Tabel 4.3 Perbandingan parameter efisiensi kromatogram pada eluen dengan komposisi yang berbeda	39
Tabel 4.4 Perbandingan parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi analit yang berbeda.....	41
Tabel 4.5 Kondisi analisis optimum genistein ekstrak edamame dengan metode KLT-densitometri	42
Tabel 4.6 Hasil korelasi uji <i>purity</i> genistein	45
Tabel 4.7 Hasil korelasi uji <i>identity</i> genistein.....	45
Tabel 4.8 Hasil uji presisi repeatabilitas genistein.....	46
Tabel 4.9 Hasil uji presisi antara genistein	46
Tabel 4.10 Hasil uji akurasi genistein.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Perhitungan Preparasi Fermentasi	62
Lampiran B. Perhitungan Rendemen Ekstrak.....	63
Lampiran C. Pembuatan Larutan Baku.....	64
Lampiran D. Optimasi Eluen.	65
Lampiran E. Pembuatan Fase Gerak.....	70
Lampiran F. Hasil Pengujian Linieritas.	71
Lampiran G. Hasil Pengujian BD dan BK	72
Lampiran H. Perhitungan Konsentrasi Uji.....	73
Lampiran I. Hasil Pengujian Selektivitas/spesifisitas.....	75
Lampiran J. Hasil Pengujian Presisi.	79
Lampiran K. Hasil Pengujian Akurasi.....	80
Lampiran L. Hasil Penetapan Kadar Genistein.....	82
Lampiran M. Hasil Analisis Statistik.....	83

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker menjadi salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia bahkan di Indonesia. Kanker merupakan penyakit yang timbul akibat pertumbuhan sel jaringan tubuh yang tidak normal berubah menjadi sel kanker. (Kemenkes RI, 2015). Menurut data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2014, sebanyak 195.300 kematian penduduk di Indonesia disebabkan oleh kanker. Kanker payudara menjadi salah satu jenis kanker yang paling banyak menyerang wanita di negara berkembang. Terdapat 21,4% dari 92.200 wanita meninggal akibat kanker payudara. Menurut Infodatin Kemenkes RI (2015), estimasi jumlah kasus baru dan jumlah kematian akibat kanker payudara di RS Kanker Dharmais tahun 2010-2013 meningkat dengan jumlah pasien tertinggi diantara kasus kanker lainnya. Diperkiraan angka kejadian kanker payudara akan terus meningkat.

Menurut *National Institute Cancer* (NIH) pada tahun 2015, salah satu faktor risiko yang dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara yaitu estrogen. Paparan estrogen yang tinggi berperan dalam meningkatkan angka kejadian kanker (Nasution dkk., 2017). Pada wanita menopause yang sedang memperoleh *hormon replacement therapy* (HRT) maupun estrogen sintesis memiliki risiko menderita kanker payudara (Varney dkk., 2004). Oleh karena itu, dibutuhkan asupan estrogen yang berasal dari bahan alam dengan keamanan yang lebih baik. Fitoestrogen merupakan senyawa turunan estradiol dari bahan alam yang dapat dijadikan sebagai senyawa antikanker seperti isoflavon (Michel dkk., 2013). Genistein merupakan salah satu senyawa isoflavon aglikon yang memiliki aktivitas estrogenik sebagai senyawa fitoestrogen yang dikenal memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang sangat kuat (Mebrahtu dkk., 2004; Garlock, 2000). Fitoestrogen memiliki struktur yang serupa dengan estrogen. Fitoestrogen dibandingkan estrogen memiliki ikatan yang lebih baik dengan reseptor estrogen (Muchtaridi dkk., 2011). Oleh karena itu, isoflavon dapat dijadikan sebagai pengganti HRT ataupun estrogen sintesis. Isoflavon banyak terdapat pada

tanaman kacang-kacangan. Tanaman dengan kandungan isoflavon tertinggi adalah kedelai (Dixon, 2004; Hajirahimkhan dkk., 2013).

Edamame (*Glycine max*) merupakan jenis kedelai yang jumlahnya melimpah di Indonesia terutama di Kabupaten Jember, sehingga dapat ditemukan dengan mudah (Wibisono dkk., 2011). Edamame merupakan kedelai sayur yang berasal dari Jepang yang dapat dijadikan lauk atau camilan (Samsu, 2001). Edamame memiliki kandungan gizi yang sama dengan kedelai (Born, 2006). Umumnya kedelai mengandung isoflavon berkisar 2-4 mg/g kedelai. Bentuk utama dari isoflavonyaitu glikosida (genistin, daidzin, dan glisitin) yang memiliki aktivitas biologis rendah, namun aktivitas tersebut dapat ditingkatkan melalui proses fermentasi (Atun, 2009). Salah satu bentuk fermentasi adalah pembuatan tempe (Purwoko, 2004). Fermentasi dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon dengan aktivitas yang lebih tinggi. Senyawa aglikon tersebut adalah genistein, daidzein dan glisitein (Atun, 2009). Aglikon tertinggi dari ketiga senyawa tersebut adalah genistein (Lee dkk., 2011). Fermentasi kedelai dapat meningkatkan kandungan genistein hingga dua kali lipat dibandingkan nonfermentasi (Garlock, 2000).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, fermentasi tempe kedelai varietas baluran dilakukan menggunakan kapang *Rhizopus oligosporus* untuk meningkatkan kandungan isoflavon aglikon. Adanya fermentasi diketahui dapat meningkatkan kadar genistein sebesar 12,759 kali kedelai nonfermentasi (Praharini, 2015). Penelitian Lee dan Chou (2006) menunjukkan pembentukan senyawa aglikon pada fermentasi kedelai oleh *R. oligosporus* lebih baik dibandingkan *A. oryzae*. Penambahan isoflavon aglikon tertinggi pada tempe kedelai terjadi pada hari ke-2 dan 3, yaitu 268,01 – 284,77 µg/g (Purwoko, 2004). Sehingga pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar genistein pada edamame terfermentasi. *R. oligosporus*. Varietas yang digunakan adalah *Ship Protection Mitratani (SPM)-1*. Varietas SPM-1 dipilih karena merupakan varietas hasil seleksi yang dikembangkan oleh PT Mitra Tani Dua Tujuh Jember.

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-densitometri. KLT merupakan suatu metode pemisahan kromatografi

yang fleksibel dan banyak digunakan dibandingkan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Metode KLT-densitometri memiliki keuntungan yaitu analisis beberapa sampel dapat dilakukan secara simultan, fase gerak yang digunakan dalam jumlah yang kecil, menghemat waktu dan biaya analisis, ramah lingkungan, teknik pemisahannya sederhana, dan peralatan yang digunakan minimal (Wulandari, 2011). Untuk membuktikan bahwa parameter-parameter kinerja dalam penetapan kadar genistein KLT-densitometri memberikan hasil yang akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit maka dilakukan validasi metode (Rohman, 2009). Pada penelitian ini, parameter validasi yang diuji meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka perumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana kondisi optimum penetapan kadar genistein ekstrak biji edamame dengan metode KLT-densitometri?
2. Bagaimana hasil validasi metode analisis penetapan kadar genistein dalam ekstrak biji edamame dengan metode KLT-densitometri yang meliputi parameter linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi?
3. Bagaimana hasil penetapan kadar genistein dalam ekstrak biji edamame nonfermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3, dan 4 dengan metode KLT-densitometri?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjawab rumusan masalah yang ada, yaitu sebagai berikut:

1. Mengetahui kondisi optimum penetapan kadar genistein dalam ekstrak biji edamame dengan metode KLT-densitometri.

2. Mengetahui validitas metode yang meliputi parameter linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi pada penetapan kadar genistein dalam ekstrak biji edamame dengan metode KLT-densitometri.
3. Menentukan kadar genistein pada ekstrak biji edamame nonfermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3, dan 4 menggunakan metode KLT-densitometri.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini antara lain:

1. Menghasilkan suatu metode analisis untuk penetapan kadar isoflavon genistein dalam ekstrak edamame dengan metode KLT-densitometri.
2. Memberikan informasi mengenai perbedaan kadar genistein pada edamame terfermentasi *R. oligosporus* dan nonfermentasi sehingga nantinya dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan dari bahan alam untuk penyakit kanker.
3. Menambah pengetahuan mahasiswa tentang optimasi dan validasi metode analisis menggunakan metode KLT-densitometri.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Edamame

Edamame merupakan kedelai yang berasal dari Jepang dan cukup populer di Asia. Edamame merupakan salah satu jenis kedelai yang dipanen saat polongnya masih muda dan berwarna hijau, yaitu saat stadium R6 dimana 80–90% volume biji terisi (Asadi, 2009). Di Indonesia edamame mulai ditanam pada tahun 1990 di Gadog, Bogor Jawa Barat. Pada tahun 1992, edamame dikembangkan di Jember dan hasilnya mulai dipasarkan dalam bentuk segar beku dan diekspor ke Jepang sejak tahun 1995 (Soewanto dkk., 2007). Indonesia dikenal sebagai pengeksport edamame ke negara Jepang dan Amerika Serikat. Ekspor edamame rata-rata tiap tahun 6.152–8.000 ton dengan 12,8 ton per bulan tidak lolos ekspor (Wibisono dan Warsito, 2009).

2.1.1 Klasifikasi Edamame

Tanaman edamame menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS)(2018) memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Rosanae
Orde	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i> Wild.
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.) Merr.

2.1.2 Morfologi Tanaman Edamame

Edamame merupakan tanaman semusim berupa semak rendah, tubuh tegak, berdaun lebat, dengan beragam morfologi. Tinggi tanaman berkisar 30 - 50 cm, dapat bercabang sedikit atau banyak tergantung kultivar lingkungan hidupnya. Daun pertama yang keluar dari buku sebelah atas kotiledon berupa daun tunggal berbentuk sederhana dan letaknya berseberangan (unifoliolat). Daun-daun yang terbentuk kemudian merupakan daun-daun trifoliolat (daun bertiga) dan seterusnya (Samsu, 2001). Biji edamame dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Biji edamame tanpa kulit ari (dokumentasi pribadi)

Ukuran, warna dan berat benih edamame bervariasi, yakni: (i) mempunyai berat antara 30-56 gram/100 biji; (ii) warna kuning hingga hijau; (iii) berbentuk bulat hingga bulat telur, dan (iv) warna hilum gelap hingga terang, warna bunga varietas Ryokkoh putih, sedangkan varietas edamame lainnya (kebanyakan) berwarna hijau (Samsu, 2001). Batang kedelai berbentuk bulat berwarna hijau, warna bulu abu, tekstur biji dan polong lembut, rasa agak manis, aroma bagus (Shanmugasundaram dkk., 1991).

2.1.3 Deskripsi Varietas *Ship Protection* Mitra Tani (SPM)-1

Varietas SPM-1 merupakan varietas edamame yang dikembangkan oleh Mitra Tani sejak tahun 2010. Varietas SPM-1 berasal dari seleksi massa KS3. Edamame var. SPM-1 memiliki ciri-ciri, yakni warna daun, epikotil dan hipokotil hijau; berbulu cokelat; warna bunga putih; warna kulit biji kuning; warna polong muda hijau; warna polong tua cokelat; warna kulit biji muda hijau; warna kulit biji tua kuning; bentuk daun oval; biji agak bulat dan lebih besar dibandingkan

kedelai pada umumnya; bentuk polong lekukan antar biji kelihatan; dipanen saat berumur 63-68 hst sebagai bentuk segar dan 87-95 hst sebagai benih. Bobot edamame tiap 100 biji yakni 35,4 g (Mitratani, 2010).

Syarat tumbuh edamame yaitu memerlukan iklim dengan suhu 26–32°C dengan curah hujan relatif tinggi. Pada umumnya pertumbuhan tanaman akan baik pada tanah dengan ketinggian 0–500 m dpl. Edamame tumbuh baik pada tanah alluvial, regosol, grumosol, latosol, dan andosol. pH tanah 5,8–7 dengan aerasi dan drainase yang sesuai. Edamame menghendaki tanah yang subur, gembur, dan kaya bahan organik (Mitratani, 2010).

2.1.4 Kandungan Kimia Edamame

Edamame kaya akan nutrisi. Dalam setengah gelas edamame matang mengandung lemak total 6 g, protein 11 g, karbohidrat 10 g, natrium 13 mg, fosfor 142 mg, dan rerata total isoflavon 49 mg (*Soyfoods Association of North America*, 2005). Selain itu juga memiliki kandungan mineral, vitamin, dan asam lemak omega 3. Kandungan utama pada edamame adalah isoflavon. Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2-4 mg/g kedelai. Penelitian Lee dkk. (2011) melaporkan kedelai mengandung genistein (60%), daidzein (30%) dan glisitein (10%) yang merupakan senyawa aglikon. Genistein dan daidzein merupakan dua komponen utama isoflavon dalam kedelai. Genistein dan daidzein merupakan antioksidan yang sangat kuat (Mebrahtu dkk., 2004).

Sebanyak 80–90% total isoflavon terdapat di kotiledon dan sebagian kecil di hipokotil (Tsukamoto dkk., 1995). Isoflavon total paling tinggi ketika dipanen pada awal kematangan biji dibandingkan saat biji tua (Mebrahtu dkk., 2004). Dalam seratus gram edamame mengandung genistein 22,57 µg/g, daidzein 20,43 µg/g, glisitein 7,57 µg/g, dan total isoflavon 48,96 µg/g (Bhagwat dkk., 2008).

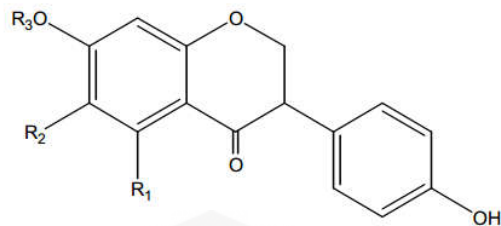
2.2 Tinjauan Isoflavon Aglikon Genistein

Isoflavon tergolong ke dalam senyawa flavonoid. Isoflavon merupakan heterosiklik yang mengandung oksigen yang mengandung 3-fenilkroman skeleton yang terhidroksilasi pada posisi 4' dan 7 (Luthria dkk., 2007). Isoflavon pada

umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa gula melalui ikatan glukosida. Di alam isoflavon terdapat pada lebih dari 300 macam tanaman. Isoflavon banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayur-sayuran, dan biji-bijian. Isoflavon di alam umumnya terdapat pada akar dan biji. Isoflavon juga dapat dihasilkan oleh beberapa jenis bakteri dan jamur. Beberapa bahan pangan yang telah dianalisis, diketahui kedelai menempati urutan pertama mengandung senyawa isoflavon dan derivatnya (Atun, 2009). Jenis senyawa isoflavon utama dalam kedelai dalam bentuk glikosida yaitu genistin, daidzin, dan glisitin (Atun, 2009). Jumlah isoflavon bergantung pada beberapa faktor yakni kondisi tanah, iklim, dan tingkat maturitas atau prosesnya (Pilsakova dkk., 2010). Menurut Nakajima dkk. (2005) kandungan isoflavon pada kacang-kacangan dipengaruhi oleh varietas, waktu panen dan lokasi.

Isoflavon berdasarkan gugus fungsinya dibagi menjadi empat kelompok yaitu aglikon atau non gula (genistein, daidzein, dan glisitein); glikosida (genistin, daidzin dan glisitin); malonil glikosida (malonil genistin, malonil daidzin dan malonil glisitin) dan asetil glikosida (asetil genistin, asetil daidzin dan asetil glisitin) (Dhaubhadel dkk., 2011). Struktur kimia isoflavon dan derivatnya dalam kedelai dapat dilihat pada Gambar 2.4. Bentuk senyawa glikosida mempunyai aktivitas fisiologis kecil. Selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun proses nonfermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi, terutama melalui proses hidrolisa sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon dengan aktivitas lebih tinggi. (Pawiroharsono, 2001; Atun, 2009).

Genistein merupakan difenol heterosiklik dengan tiga gugus hidroksil dengan nama kimia 4',5,7 trihidroksi atau 5,7 dihidroksi 3 (4-hidroksifenil) 4H 1 benzopiran 4 one (Yang dkk., 2012). Struktur molekul genistein dapat dilihat pada Gambar 2.2. Rumus molekul genistein yaitu $C_{15}H_{10}O_5$ (Gambar 2.5), dengan BM 270 g/mol, berbentuk kristal, memiliki titik leleh sebesar 296-298°C. menjadi berwarna kuning jika dilarutkan dalam alkali, dan menjadi berwarna merah tua ketika dilarutkan dalam larutan etanolik besi klorida (III) (*Food Safety Commission*, 2006).



Nama	R1	R2	R3
Daidzein	H	H	H
Glisitein	H	OCH3	H
Genistein	OH	H	H
Daidzin	H	H	Glu
Glisitin	H	OCH3	Glu
Genistin	OH	H	Glu
Asetilaidzin	H	H	Glu-COCH3
Asetilglisitin	H	OCH3	Glu-COCH3
Asetilgenistin	OH	H	Glu-COCH3
Malonilaidzin	H	H	Glu-COCH2COOH
Malonilglisitin	H	OCH3	Glu-COCH2COOH
Malonilgenistin	OH	H	Glu-COCH2COOH

Gambar 2.2 Struktur kimia isoflavon dan derivatnya dalam kedelai (Luthria dkk., 2007).

Saat ini banyak dilakukan penelitian tentang genistein sehubungan dengan aktivitasnya sebagai antiproliferatif, efek estrogenik dan efek antiestrogenik (Istiani, 2010). Genistein merupakan fitoestrogen yang berpotensi mengurangi resiko kanker (Tagliaferri dkk., 2007). Di negara maju, genistein telah digunakan sebagai salah satu terapi bagi penderita kanker prostat, payudara dan paru-paru (Coral, 2008). Selain itu mampu menginduksi apoptosis pada kanker, bersifat antimutagenik (Zdenka dkk., 2006), serta mampu menurunkan trigliserida, LDL, kolesterol dan total kolesterol (Caderroth dan Serge, 2009; Wibisono dan Warsito, 2007); dan menghambat tirosin protein kinase (Wei dkk., 2002; Praharini, 2015; Yunindarwati, 2016). Pada penelitian Praharini (2015) dilakukan perhitungan IC_{50} menunjukkan pada kedelai var. Baluran terfermentasi *R. oligosporus* hari ke-3 mengalami penghambatan tirosinase tertinggi dengan nilai IC_{50} terendah yakni pada konsentrasi $180,153 \pm 2,846 \mu\text{g/ml}$. Pada penelitian Dewi (2015) dilakukan penetapan kadar genistein pada kedelai dengan beberapa macam metode ekstraksi, yakni sonikasi, maserasi kinetik dan soxhletasi. Diuji aktivitas hambatan

tirosinase dan didapatkan nilai IC_{50} secara berturut-turut $93,794 \pm 1,994$ ng/ μ L; $98,794 \pm 2,919$ ng/ μ L; dan $77,112 \pm 2,626$ ng/ μ L dengan kadar genistein secara berturut-turut $0,0252 \pm 2,066$ %b/b; $0,0167 \pm 1,931$ %b/b; dan $0,0436 \pm 1,012$ %b/b. Metode soxhletasi memiliki aktivitas hambatan tertinggi karena mampu mengekstraksi bentuk aglikon lebih besar dan diduga mampu mengkonversi isoflavon bentuk malonil ke bentuk glikosida atau aglikonnya karena adanya pemanasan saat ekstraksi.

2.3 Tinjauan Fermentasi

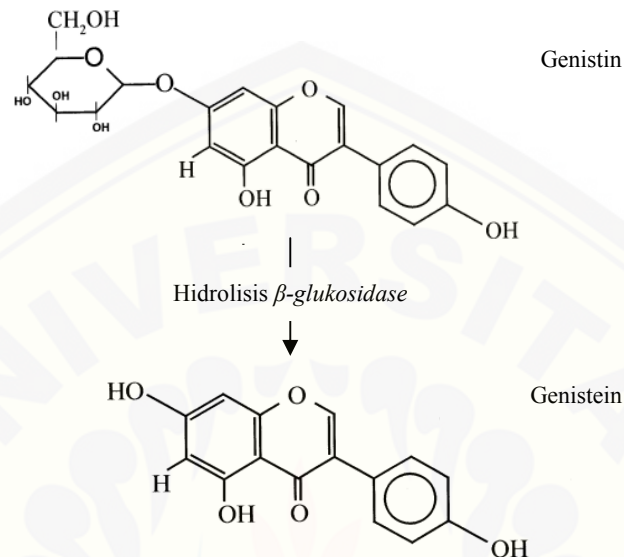
Fermentasi adalah suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Tahap awal pada proses fermentasi yaitu adanya pertumbuhan mikroba yang dikendalikan terutama dalam pengembangan inokulum agar dapat diperoleh sel yang hidup. Mikroorganisme seperti bakteri, khamir maupun kapang berperan dalam proses fermentasi (Suprihatin, 2010).

Teradapat tiga karakteristik penting yang harus dimiliki oleh mikroorganisme antara lain :

1. Mampu tumbuh dan memperbanyak diri dengan cepat dalam suatu substrat dan lingkungan yang cocok;
2. Mampu mengatur ketahanan fisiologis dan memiliki enzim esensial yang mudah dan banyak sehingga terjadi suatu perubahan kimia yang dikehendaki.
3. Kondisi lingkungan diperlukan dalam pertumbuhan untuk mencapai produksi maksimum.

Edamame merupakan salah satu jenis kedelai yang dapat difermentasikan untuk menghasilkan suatu produk makanan seperti tempe. Fermentasi dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon dalam edamame (Yunindarwati, 2016). Peningkatan senyawa aglikon terjadi karena proses hidrolisa (Atun, 2009) ataupun akibat adanya enzim β -glukosidase dari mikroorganisme (Lee dan Chou, 2006). β -glukosidase merupakan enzim yang berperan dalam metabolisme karbohidrat yang dapat dihasilkan oleh kapang *Rhizopus* sp. (Purwoko dkk., 2001). Enzim ini bekerja optimum pada suhu 45 °C dan pH 7,5. Aktivitas enzim β -glukosidase *R.*

oligosporus lebih besar dibandingkan *A. oryzae* dan *R. stolonifer* (Purwoko, 2004). Hidrolisa isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglikon dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Hidrolisis genistin menjadi genistein (Garlock, 2000).

Penelitian Purwoko (2004) menyatakan bahwa fermentasi selama 4 hari, aktivitas enzim β -glukosidase *R. oligosporus* mampu menambah jumlah isoflavon aglikon, yaitu sebesar 552,17 678,23 $\mu\text{g/g}$. Penambahan isoflavon aglikon tertinggi pada hari ke-2 dan 3, yaitu 268,01 284,77 $\mu\text{g/g}$. Hal tersebut karena nilai pH tempe pada fermentasi tersebut sebesar 6,9-7,3. Nilai pH tersebut mendekati nilai pH optimum enzim β -glukosidase yaitu 7,5 (Barz dkk., 1990). Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian Purwoko dkk. (2001) yang menggunakan tempe hasil fermentasi *R. microsporus* var. chinensis. Penambahan isoflavon aglikon terendah terjadi pada fermentasi antara 3 sampai 4 hari, yaitu 70,59-97,50 $\mu\text{g/g}$. Pada fermentasi tersebut *R. microsporus* var. oligosporus melakukan sporulasi, sehingga aktivitas enzim β -glukosidase menurun.

Penelitian Ralston (2005) menunjukkan kedelai terfermentasi jamur *R. oligosporus* memiliki kandungan isoflavon dan derivatnya yang lebih tinggi fengan cara mengubah senyawa flavonoid menjadi isoflavonoid (Atun, 2009). Penelitian Praharini (2015) menunjukkan adanya peningkatan kadar genistein

pada kedelai var. Baluran terfermentasi kapang *R. oligosporus* hari ke-2, 3, dan 4 dibandingkan dengan nonfermentasi berturut-turut sebesar 10,086; 12,759; dan 12, 096 kali. Penelitian Purwoko dkk. (2001) menunjukkan bahwa tempe terfermentasi *R. oryzae* menghasilkan isoflavon aglikon sekitar 300 µg/g, sedangkan tempe terfermentasi *R. oligosporus* lebih tinggi sekitar 2 kali dibandingkan *R. oryzae* yaitu 720 µg/g.

2.4 Tinjauan Kapang *R. oligosporus*

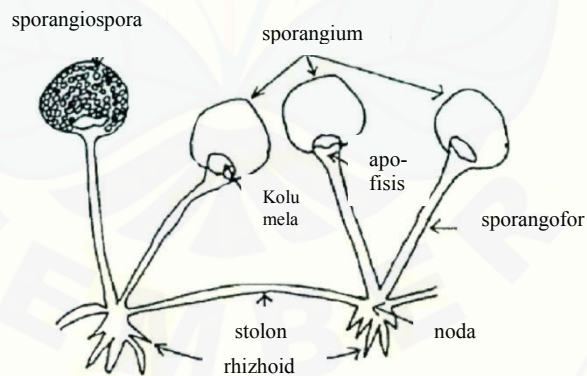
Kapang terdiri dari suatu *thallus* (jamak *thalli*) yang tersusun dari filamen yang bercabang disebut hifa (tunggal = *hypha*, jamak = *hyphae*) (Fardiaz, 1992). Kapang tumbuh dengan cara perpanjangan hifa. Hifa yang terbentuk dapat bersifat multinukleat dengan diameter 2–10 µm. Panjang hifa dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan. Jika tumbuh pada permukaan medium, hifa berukuran sangat panjang, namun apabila tumbuh dibawah permukaan (terendam), hifa akan terputus-putus sehingga ukurannya menjadi lebih pendek tetapi bercabang (Suprihatin, 2010)

Kapang memiliki ukuran yang jauh lebih besar dan lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri dan khamir (Suprapti, 2003). Pertumbuhan kapang biasanya berjalan lambat bila dibandingkan dengan bakteri dan khamir. Oleh karena itu, jika kondisi pertumbuhan memungkinkan semua mikroorganisme lain untuk tumbuh, kapang dapat kalah dalam kompetisi ini. Namun sekali kapang mulai tumbuh ditandai dengan pembentukan miselium, pertumbuhannya akan berlangsung dengan cepat. Pada umumnya kapang dapat tumbuh baik pada suhu ruang atau bersifat mesofilik. Suhu pertumbuhan kapang yang optimum antara 25–30 °C, tetapi beberapa dapat tumbuh pada suhu 35–37 °C atau lebih tinggi, misalnya *Aspergillus* sp. (Fardiaz, 1992). Kebanyakan kapang dapat tumbuh pada pH dengan rentang yang luas, yaitu 2–8,5, namun biasanya pertumbuhan akan lebih baik pada kondisi asam (pH rendah). Selain itu, kapang dapat memproduksi enzim hidrolitik, misalnya amilase, pektinase, proteinase, dan lipase. Oleh karena itu, kapang dapat tumbuh pada makanan-makanan yang mengandung pati, pektin, protein atau lipid (Waluyo, 2005).

R. oligosporus merupakan salah satu kapang yang berperan dalam proses fermentasi tempe. *R. oligosporus* memiliki koloni abu-abu kecoklatan dengan tinggi 1 mm atau lebih. Sporangiofor tunggal atau dalam kelompok dengan dinding halus atau agak sedikit kasar, dengan panjang lebih dari 1000 μm dan diameter 10–18 μm . Sporangia globosa yang pada saat masak berwarna hitam kecoklatan, dengan diameter 100–180 μm (Wipradnyadewi dkk., 2004). Morfologi kapang *R. oligosporus* dapat dilihat pada Gambar 2.4

Klasifikasi kapang *R. oligosporus* menurut New Zeland Organisms Register (2016) :

- Kingdom : Fungi
- Phylum : Zygomycota
- Subphylum : Mucoromycotina
- Order : Mucorales
- Family : Rhizopodaceae
- Genus : *Rhizopus*
- Species : *Rhizopus oligosporus* Saito



Gambar 2.4 Morfologi kapang *R. oligosporus* (Fardiaz, 1992).

Kapang *Rhizopus* memiliki ciri spesifik yaitu mempunyai hifa tidak bersepta dengan stolon dan rizhoid serta spora berwarna gelap ketika sudah tua. Hifa vegetatif pada *Rhizopus* akan melakukan penetrasi pada substrat dan memiliki pertumbuhan yang cepat dalam membentuk miselium (Fardiaz, 1992).

2.5 Tinjauan Optimasi Kondisi Analisis

Prinsip kromatografi adalah pemisahan analit dari campuran dimana perlu dilakukan optimasi proses kromatografi untuk meningkatkan kualitas pemisahan dengan cara mengubah satu atau lebih parameter dari sistem kromatografi (Kowalska & Prus, 2003). Optimasi kondisi analisis yang perlu dilakukan sebelum melakukan penilaian terhadap parameter-parameter validasi metode analisis terdiri dari optimasi eluen dan panjang gelombang pengamatan agar menghasilkan kromatogram yang efisien. Sedangkan optimasi konsentrasi uji dilakukan untuk memilih konsentrasi uji yang mudah cara preparasi sampelnya dan menghasilkan kromatogram yang efisien. Semakin mudah cara preparasinya diharapkan akan semakin memperkecil kesalahan yang dilakukan (Wulandari, 2011). Menurut Ahuja (1989) tujuan optimasi yaitu menghemat biaya; menghemat waktu dan tenaga; menghasilkan efisiensi pemisahan paling bagus dari sampel; memilih fase gerak dan fase diam; dan mendapatkan kecepatan eluasi yang optimum.

Optimasi kondisi analisis dilakukan untuk mendapatkan pemisahan yang baik dengan digunakan kondisi analisis yang optimum. Pemilihan kondisi analisis yang akan digunakan dapat dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi. Adapun parameter yang menentukan efisiensi kromatogram tersebut, antara lain: nilai resolusi (R_s), nilai *theoretical plate* (N), dan nilai *height equivalent of theoretical plate* (H) (Wulandari, 2011).

a. Resolusi (R_s)

R_s merupakan kemampuan kondisi analisis untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$R_s = \frac{2(Z)A - (Z)B}{WA + WB} \quad (2.1)$$

Keterangan :

R_s = pemisahan antara dua puncak kromatogram (zat A dan zat B),

$(Z)A$ = jarak migrasi zat A,

$(Z)B$ = jarak migrasi zat B,

WA = lebar dasar puncak zat A,

WB = lebar dasar puncak zat B.

Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya lebih dari 1,5. Semakin besar nilai resolusi semakin baik pemisahan yang terjadi. Apabila resolusi kromatografi kecil yaitu kurang dari 1,5 maka metode tersebut perlu dilakukan evaluasi kondisi analisis yang digunakan (Wulandari, 2011).

b. Nilai *Theoretical Plate* atau Lempeng Teori (N)

Nilai N merupakan nilai atau angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Semakin besar nilai untuk N maka semakin efisien kromatogramnya (Wulandari, 2011). Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$N = 16 \left[\frac{Zs}{W} \right]^2 \quad (2.2)$$

Keterangan:

N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam,

W = lebar dasar puncak,

Zs = jarak migrasi analit.

c. Nilai *Height Equivalent of Teoritical Plate* (H)

Nilai H merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. Semakin rendah nilai untuk H maka semakin efisien kromatogramnya (Wulandari, 2011). Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$H = \left[\frac{Zf}{N} \right]^2 \quad (2.3)$$

Keterangan :

H = jarak tempuh atau migrasi analit untuk satu kali kesetimbangan dalam fase diam dan fase gerak,

N = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam,

Zf = jarak migrasi fase gerak.

2.6 Tinjauan Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan tindakan penilaian parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter validasi memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode dilakukan

untuk mendapatkan suatu metode analisis yang dapat dipercaya dan hasil dari analisisnya mendekati kebenaran/sahih. Menurut *United States Pharmacopeia* (USP) validasi metode analisis dilakukan untuk menjamin suatu metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Rohman, 2009).

Metode analisis perlu divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter validasi mampu mengatasi masalah analisis. Suatu metode analisis harus divalidasi ketika:

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi masalah analisis tertentu.
- b. Metode baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan, atau karena munculnya suatu masalah yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
- c. Metode baku telah berubah seiring dengan jalannya waktu.
- d. Metode baku dilakukan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan menggunakan alat yang berbeda.
- e. Untuk mensimulasikan 2 metode yang berbeda, misalnya antara metode baku dan metode baru (Rohman (2009)).

Untuk mendapatkan hasil analisis yang baik perlu adanya pertimbangan terhadap semua variable yang terkait dengan metode analisis seperti prosedur pengambilan sampel, tahap penyiapan sampel, jenis penjerap yang digunakan pada kromatografi, fase gerak, dan sistem deteksinya. Banyaknya parameter yang harus divalidasi tergantung pada tujuan analisis. Pada bagian ini, pembahasan validasi difokuskan pada metode kromatografi (Rohman, 2009).

Validasi ulang perlu dilakukan meskipun validasi sebelumnya menghasilkan data yang *reliable*, karena metode yang dinyatakan valid pada kondisi tertentu belum tentu valid pada kondisi lain. Prosedur analisis yang telah dinyatakan sah atau terbukti kebenarannya, maka pada penerapannya setiap petunjuk dan langkah dalam prosedur tersebut harus diikuti dengan seksama. Dalam validasi metode terdapat beberapa parameter yang perlu dipertimbangkan. Parameter-parameter validasi tersebut terdiri dari:

2.6.1 Linieritas dan Rentang

Linearitas merupakan kemampuan metode analisis untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel pada kisaran yang diberikan atau dengan bantuan transformasi matematik (Harmita, 2004). Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linieritas yang dapat diterima. Untuk pengujian linieritas, direkomendasikan menggunakan 5-10 konsentrasi standar dengan rentang 80-120%, 25-200% atau 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $Y = a + bX$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004). Penggunaan nilai r saja sebagai parameter linieritas sudah tidak digunakan lagi karena nilai r tidak mengindikasikan linieritas. Sehingga harus ditambah dengan parameter lain seperti nilai standar deviasi (V_{xo}) dan X_p (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

2.6.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

BD diartikan sebagai jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. BK diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). Penentuan BD dan BK dapat dilakukan dengan menggunakan 5-10 tingkat konsentrasi analit yang relatif rendah (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

Menurut ICH (*International Conference on Harmonization*) (1994), penentuan BD dan BK dapat dilakukan menggunakan 4 cara yaitu:

a. Metode *signal to noise*

BD adalah konsentrasi yang menghasilkan puncak dengan ketinggian minimal dua atau tiga kali lebih tinggi dari noise.

b. Inspeksi visual

BD ditentukan oleh analisis sampel yang berisi konsentrasi analit dan merupakan konsentrasi minimum dimana analit masih dapat terdeteksi.

c. Standar deviasi dari respon berdasarkan standar deviasi blangko

Pengukuran besarnya respon latar belakang analisis dilakukan dengan menganalisis blangko dan menghitung standar deviasi dari respon blangko. Selain itu, BD dan BK juga dapat ditentukan dari rasio standar deviasi respon blangko menggunakan standar deviasi residual dari garis kalibrasi atau standar deviasi *intercept* (s) dan *slope* (S) melalui rumus:

$$\text{Batas deteksi} = 3,3 \frac{s}{S} \quad (2.4)$$

$$\text{Batas kuantitasi} = 10 \frac{s}{S} \quad (2.5)$$

d. Standar deviasi dari respon berdasarkan kemiringan kurva kalibrasi

Sebuah kurva kalibrasi tertentu dievaluasi dengan menggunakan larutan yang mengandung analit dalam kisaran BD. Residual standar deviasi dari garis regresi atau standar deviasi dari intersep dari y dapat digunakan sebagai standar deviasi. Pada pendekatan ini, nilai parameter linieritas seperti r, V_{xo} dan X_p harus terpenuhi terlebih dahulu.

2.6.3 Selektivitas /Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode merupakan kemampuan metode analisis yang dapat mengukur analit secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang memungkinkan terdapat dalam matriks sampel seperti pengganggu, produk degradasi, ataupun komponen matriks. Tujuan pengujian ini adalah untuk menunjukkan bahwa metode tersebut tidak memberikan respon yang positif terhadap senyawa atau analit lain (Harmita, 2004).

Pada metode analisis menggunakan kromatografi, selektivitas ditentukan berdasarkan perhitungan daya resolusinya (R_s) dimana nilai R_s yang baik yaitu $\geq 1,5$ (Harmita, 2004). Sedangkan untuk mengetahui spesifisitas metode ditentukan berdasarkan pengamatan identitas (*identity*) dan kemurnian (*purity*) analit dalam sampel. Uji kemurnian spektra diambil dari lereng puncak pertama berkolerasi

dengan puncak maksimum spektra. Kolerasi ini diidentifikasi sebagai $r(s,m)$ pada winCATS, dengan s menunjukkan mulai puncak dan m puncak maksimum. Korelasi dari spektra diambil pada puncak maksimum dengan salah satu lereng bawah atau akhir puncak, di winCATS bernama $r(m,e)$, dengan m menunjukkan puncak maksimum dan e merupakan akhir puncak (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

2.6.4 Presisi

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran keterdekatan hasil analisis dari serangkaian pengukuran berulang dari ukuran yang sama (Harmita, 2004). Menurut *International Conference on Harmonization (ICH)* (1994), penentuan presisi dapat dilakukan pada 3 kategori yaitu :

a. Repeatabilitas

Repeatabilitas (*Intra-assay precision*) menunjukkan presisi dibawah kondisi percobaan yang sama meliputi laboratorium, analis serta peralatan yang dilakukan pada waktu yang singkat. Repeatabilitas dapat dinilai dengan pengukuran minimal 9 kali yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalnya 3 konsentrasi/3 replikasi) atau dapat dinilai dengan suatu pengukuran sebanyak minimal 6 kali pada 100% dari konsentrasi uji.

b. Presisi Antara

Presisi antara menunjukkan presisi yang dilakukan pada hari yang berbeda atau oleh analis yang berbeda atau dapat juga dilakukan dengan peralatan yang berbeda namun dalam laboratorium yang sama.

c. Reprodusibilitas

Reprodusibilitas menunjukkan presisi yang dilakukan pada laboratorium yang berbeda biasanya untuk menstandarisasi metode (untuk verifikasi bahwa metode tersebut memberikan hasil yang sama dengan menggunakan fasilitas yang berbeda).

Dari ketiga kategori di atas, yang wajib dilakukan adalah repeatabilitas dan presisi antara (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau

kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita, 2004). Menurut AOAC (1998), kriteria presisi penerimaan uji presisi ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Konsentrasi analit berbanding RSD

Analit (%)	Unit	RSD (%)
100	100%	1,3
10	10%	1,9
1	1%	2,7
0,01	0,1%	3,7
0,001	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,0001	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,00001	1 ppm (mg/kg)	11
0,000001	100 ppb ($\mu\text{g/kg}$)	15
0,0000001	10 ppb ($\mu\text{g/kg}$)	21
0,00000001	1 ppb ($\mu\text{g/kg}$)	30

Sumber: AOAC (1998).

2.6.5 Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

a. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*)

Metode simulasi merupakan pengukuran sejumlah analit bahan murni yang ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. Penentuan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80%-120% dari kadar analit yang diperkirakan.

b. Metode penambahan standar atau pembandingan (*standard addition method*)

Metode penambahan standar yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih

kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Penambahan analit ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30, 45, dan 60% dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

$$\text{Perolehan kembali} = \frac{CF - CA}{C'A} \times 100 \quad (2.6)$$

Keterangan:

CF = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran,

CA = konsentrasi sampel sebenarnya,

C'A = konsentrasi analit yang ditambahkan.

(Harmita, 2004).

Rentang nilai *mean recovery* yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada Tabel 2.2

Tabel 2.2 Perolehan kembali (*recovery*) analit pada konsentrasi yang berbeda

Analit (%)	Unit	<i>Mean recovery</i> (%)
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0,01	0,1%	95-105
0,001	100 ppm (mg/kg)	90-107
0,0001	10 ppm (mg/kg)	80-110
0,00001	1 ppm (mg/kg)	80-110
0,000001	100 ppb (µg/kg)	80-110
0,0000001	10 ppb (µg/kg)	60-115
0,00000001	1 ppb (µg/kg)	40-120

Sumber: AOAC (1998).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah *true experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Januari 2018 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Fitokimia, dan Bioteknologi Fakultas Farmasi dan Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah KLT-densitometri (Camag TLC_Scanner 3), *rotary evaporator* (Heildoph), ultrasonikator (Elmasonic), *sentrifuge* (HermLe), seperangkat alat KLT {chamber (Camag), pinset}, mikro pipet (Serana), oven, blender, timbangan analitik digital, alat gelas, soxhlet, mikroskop (Olympus BX53), *haemocytometer* (Neubauer Improved), *lamina air flow* (LAF) (Airtech), autoklaf (ALP), inkubator, vortex, pisau, lampu spiritus dan jarum ose.

3.3.2 Bahan Penelitian

Biji edamame varietas SPM-1 yang dibeli dari tempat pembudidayaan “PT. Mitratani Dua Tujuh Jember” dipanen pada bulan Desember 2017, isolat *R. oligosporus* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember), standar genistein (Sigma-Aldrich), lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), n-heksana teknis, etanol teknis 70%, *Potato Dextrose Agar* (BD difco), akuades steril, metanol p.a (Fluka), tween 80, etil asetat (fluka), toluen (Smartlab), aseton (fluka), asam format (Merck), blue tip, yellow tip, kapas, kertas saring, aluminium foil, dan pipa kapiler.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan fermentasi edamame menggunakan *R. oligosporus* dan lama waktu fermentasi hari ke-1, 2, 3, dan 4.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar isoflavon genistein pada edamame non-fermentasi dan terfermentasi *R. oligosporus* serta parameter validasi yang meliputi linieritas, BD dan BK, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi.

3.4.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan, suhu inkubasi, suhu pengeringan, inokulum fermentasi yang digunakan yakni suspensi spora *R. oligosporus* yang mengandung 10^6 spora/mL dan cara ekstraksi.

3.5 Definisi Operasional

Berikut definisi operasional dari penelitian ini adalah :

- a. Edamame varietas SPM-1 yang digunakan berasal dari PT. Mitratani Dua Tujuh Jember yang dipanen pada bulan Desember 2017 dengan umur 63-68 hst.
- b. Bagian tanaman yang digunakan adalah biji edamame tanpa kulit ari.
- c. Penghilangan lemak (*defatting*) yang terkandung dalam edamame dilakukan menggunakan pelarut n-heksana.
- d. Metode yang digunakan untuk ekstraksi senyawa isoflavon yaitu metode sonikasi selama 1 jam pada suhu ruang dengan pelarut etanol 70%.
- e. Penetapan kadar isoflavon genistein dalam ekstrak edamame menggunakan standar genistein dinyatakan dalam %b/b menggunakan KLT-densitometri.

3.6 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode dan penetapan kadar genistein dalam ekstrak biji edamame menggunakan metode KLT-densitometri. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut :

- a. Pengumpulan biji edamame tanpa kulit ari.
- b. Preparasi sampel biji edamame non fermentasi.
- c. Pembuatan suspensi spora *R. oligosporus* yang mengandung 10^6 spora/mL.
- d. Preparasi sampel biji edamame yang difermentasikan dengan *R. oligosporus*.
- e. Ekstraksi simplisia edamame dengan pelarut etanol 70%.
- f. Optimasi kondisi analisis meliputi panjang gelombang dan konsentrasi uji.
- g. Validasi metode analisis meliputi linieritas, BD dan BK, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi.
- h. Penetapan kadar genistein dari masing-masing ekstrak edamame menggunakan metode KLT-densitometri.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi Kedelai Nonfermentasi

Sebanyak 6 kilogram edamame mentah dicuci kemudian direndam dalam air panas. Setelah itu, kulit ari edamame dikupas. Ditimbang sebanyak 50 gram edamame dan dibungkus dengan kertas saring. Kemudian, edamame disterilkan dan dimatangkan dengan autoklaf suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit lalu didinginkan. Setelah dingin, edamame dipotong tipis dan dikeringkan menggunakan oven suhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama lebih kurang 30 jam. Simplisia dihaluskan menggunakan blender. Kemudian serbuk diayak menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Lee dkk., 2008).

3.7.2 Peremajaan Isolat *R. oligosporus*

Isolat *R. oligosporus* diremajakan dengan mengambil biakan *R. oligosporus* sebanyak satu ose dan dimasukkan ke dalam tabung berisi media miring *potato dextro agar* (PDA), kemudian diinkubasi pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 3 hari (Lee dkk., 2008).

3.7.3 Pembuatan Suspensi Spora *R. oligosporus*

Proses pembuatan suspensi spora *R. oligosporus* dilakukan dibawah *laminar air flow* (LAF). Suspensi spora *R. oligosporus* dibuat dengan cara mencuci miselia dari peremajaan isolat dengan memipet campuran 10 %Tween 80 dalam akuades steril 10 ml. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terdapat *R. oligosporus* pada media miring PDA. Spora *R. oligosporus* di ambil dengan cara mengeruk menggunakan ose steril secara perlahan (jangan sampai media ikut terambil). Spora yang sudah terambil kemudian diresuspensi dengan menggunakan mikropipet dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril. Suspensi spora tersebut kemudian divorteks supaya homogen untuk proses selanjutnya (Lee dkk., 2008).

3.7.4 Perhitungan Kepadatan Spora

Kepadatan spora *R. oligosporus* dihitung dengan menggunakan alat *haemocytometer*. Suspensi spora yang akan digunakan sebagai inokulum edamame yaitu suspensi yang mengandung kepadatan spora sebesar 10^6 spora/mL (Lee dkk., 2008).

Perhitungan spora menggunakan kamar hitung eritrosit *Improved Neubauer*. Langkah-langkah perhitungan kepadatan spora adalah sebagai berikut:

- a. Suspensi spora diteteskan sebanyak 10 μ l pada bidang hitung *haemocytometer*, lalu menutupnya dengan *cover glass*.
- b. Perhitungan spora dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x hingga didapatkan bidang hitung pada *haemocytometer*. Spora yang dihitung hanya yang terletak pada kotak hitung (1 + 2 + 3 + 4 + 5). Perhitungan spora hanya di daerah bertanda kotak seperti yang tersaji dalam Gambar 3.1.

Perhitungan spora mengikuti aturan seperti yang dijelaskan dalam Gambar 3.2. Spora yang terletak pada garis batas kotak hitung yang dihitung hanya pada sisi kiri dan atas kotak hitung tersebut, dari kiri ke kanan dan di bawahnya dari kanan ke kiri.

- c. Setelah didapatkan jumlah spora pada kotak hitung 1, 2, 3, 4, dan 5, lalu dihitung jumlah spora/mL pada bidang hitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$N = \frac{X}{t (mm) \times dx \times dl (mm^2)} \times 10^3 \quad (3.1)$$

Keterangan:

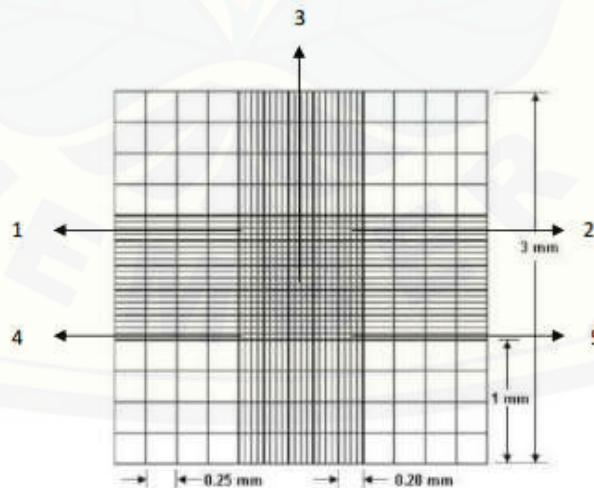
- N : Jumlah spora/ML;
 - X : Jumlah spora yang dihitung (1 + 2 + 3 + 4 + 5);
 - L : Luas kotak hitung (0,04 x 5 = 0,2 mm²);
 - t : Kedalaman bidang hitung (0,1 mm);
 - d : Faktor pengenceran;
 - 10³ : Volum suspensi yang diambil (1 mL = 10³ mm³).
- (Modifikasi dari Tim QC APH Golongan Jamur, 2009).

Apabila suspensi spora yang didapatkan memiliki kepadatan lebih dari 10⁶ spora/mL, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan persamaan (3.2)

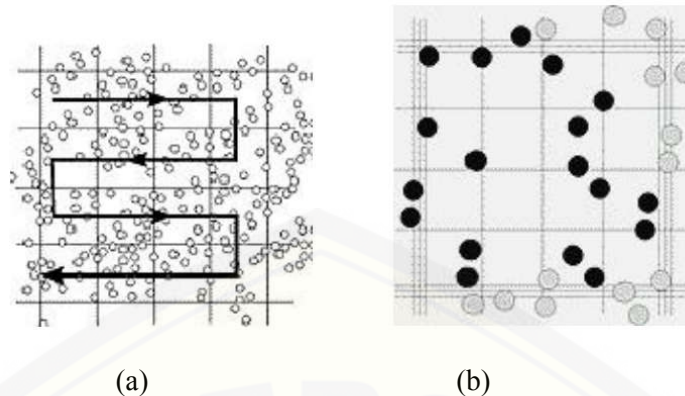
$$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2 \quad (3.2)$$

Keterangan :

- V1 : volum larutan stok (mL)
- N1 : konsentrasi larutan stok (spora/mL)
- V2 : volum larutan yang diharapkan (mL)
- N2 : konsentrasi larutan yang diharapkan (spora/mL).



Gambar 3. 1 Kamar hitung *hemacytometer improved neubauer* (Hansen, 2000).



Gambar 3. 2 Cara perhitungan spora a. Alur perhitungan spora b. Cara perhitungan spora pada kamar hitung (● : spora yang dihitung, ○ : spora tidak dihitung) (Tim QC APH Golongan Jamur, 2009)

3.7.5 Preparasi Edamame Terfermentasi *R. oligosporus*

Sebanyak 2 kilogram edamame dicuci kemudian direndam dalam air panas. Setelah itu, kulit ari edamame dikupas. Ditimbang sebanyak 50 gram edamame dan dibungkus dengan kertas saring. Kemudian, edamame disterilkan dan dimatangkan dengan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit lalu didinginkan. Setelah dingin, dilakukan fermentasi dengan menambahkan 1 mL suspensi spora yang mengandung 10^6 spora/mL *R. oligosporus* (inokulum) pada edamame. Selanjutnya, dilakukan inkubasi selama 1, 2, 3, dan 4 hari pada suhu 30 °C. Setelah diinkubasi, didapatkan edamame terfermentasi seperti tempe yang ditandai dengan tumbuhnya miselia. Setelah itu, edamame terfermentasi diiris tipis dan dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 60 °C selama lebih kurang 30 jam sampai didapatkan massa yang kering. Setelah kering, simplisia edamame terfermentasi dihaluskan menggunakan blender. Kemudian serbuk diayak menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Lee dkk., 2008).

3.7.6 Proses Penghilangan Lemak (*defatting*)

Proses penghilangan lemak (*defatting*) serbuk edamame terfermentasi dan non-fermentasi dilakukan dengan menggunakan metode soxhlet. Sebanyak 40 g dari masing-masing serbuk kedelai dibungkus dengan kertas saring kemudian

dimasukkan ke dalam tabung ekstraktor soxhlet. Pelarut yang digunakan adalah n-heksana dengan perbandingan 1 : 5. Proses *defatting* dilakukan hingga pelarut n-berwarna jernih. Kemudian serbuk edamame yang telah dihilangkan lemaknya diambil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama satu malam dan ditimbang untuk proses selanjutnya (Hui dkk., 2005).

3.7.7 Pembuatan Ekstrak Edamame Terfermentasi dan Nonfermentasi

Serbuk edamame bebas lemak diekstraksi menggunakan ultrasonik dengan pelarut etanol 70 % selama 1 jam. Serbuk bahan ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass dan ditambahkan pelarut etanol 70 % dengan perbandingan 1 : 6 (Hui dkk., 2005), kemudian ditutup dengan alumunium foil. Setelah 1 jam ekstraksi berlangsung, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Residu yang tersisa diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etanol 70 % yang baru. Proses tersebut berlangsung 3 kali. Filtrat hasil sentrifuge dikumpulkan dalam *beaker glass*, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan digunakan untuk proses selanjutnya (Luthria dkk., 2007 dengan modifikasi).

3.7.8 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang dioptimasi pada metode ini meliputi optimasi eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji analit. Optimasi kondisi analisis dilakukan dengan preparasi larutan standar dan sampel ekstrak edamame. Preparasi larutan standar dilakukan dengan membuat larutan induk dengan menimbang genistein sebanyak 5 mg. Kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. 5 mL dan didapat konsentrasi larutan 1000 $\mu\text{g/mL}$. Preparasi ekstrak edamame nonfermentasi dan terfermentasi hari ke 1, 2, 3, dan 4 dengan menimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak, kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. 5 mL, dan diultrasonik selama ± 30 menit kemudian diambil filtratnya dan dianalisis dengan eluen terpilih (Yuan dkk., 2006).

a. Optimasi Eluen

Pada penelelitian ini dilakukan optimasi eluen dengan modifikasi komposisi sebagai berikut:

N-heksan : etil asetat : asam asetat (v/v/v/v) = 2:5:0,15

N-heksan : etil asetat (v/v) = 0,5:5

N-heksan : etil asetat (v/v) = 1:5

N-heksan : etil asetat (v/v) = 2:5

N-heksan : etil asetat (v/v) = 3:5

Optimasi eluen dilakukan dengan cara menotolkan sebanyak 4 μL standar genistein dengan 2 konsentrasi berbeda yaitu konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi. Sampel ditotolkan sebanyak 6 μL pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan masing-masing eluen dan di *scanning* pada panjang gelombang 266 nm. Eluen yang paling optimum didasarkan pada parameter efisiensi kromatogram yang meliputi nilai N (*Theoretical Plate Number*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent A Theoretical Plate*) yang terkecil, nilai R_f (*Retardation factor*) antara 0,2 - 0,8 dan menghasilkan kromatogram dengan puncak genistein yang simetris dengan nilai R_s > 1,5 (Wulandari, 2011)

b. Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* noda analit pada Camag TLC *Scanner* 3 (Densitometer) dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 200-400 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi.

c. Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji menggunakan tiga konsentrasi uji. Penentuan konsentrasi uji didasarkan pada hasil optimasi eluen terpilih yang menunjukkan perkiraan kandungan genistein dalam ekstrak biji edamame. Pembuatan sampel uji dilakukan dengan cara menimbang sejumlah sampel tertentu ekstrak biji edamame dan dipreparasi sesuai dengan yang dijelaskan sebelumnya sehingga didapatkan larutan sampel yang mengandung genistein dengan konsentrasi sesuai dengan yang akan dioptimasi. Larutan sampel kemudian ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 6 μL dan larutan standart sebanyak 6 μL . Lempeng KLT lalu dieluasi menggunakan eluen terpilih dan *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Pemilihan konsentrasi uji optimum dipilih dengan

mempertimbangkan efisiensi kromatogram yang dihasilkan yaitu nilai N yang paling besar dan nilai H yang terkecil, serta kemudahan dalam preparasi sampel.

3.7.9 Validasi Metode Analisis

Parameter yang diuji pada validasi metode analisis penentuan genistein dalam ekstrak edamame dengan metode KLT-densitometri meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

a. Linieritas

Membuat larutan standar induk genistein dalam metanol p.a dan dibuat 5-10 tingkat konsentrasi dalam rentang 20-200% dari konsentrasi uji terpilih. Larutan standar kemudian ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ masing-masing 6 μ L dengan pipa kapiler. Lempeng KLT sebelumnya dibersihkan terlebih dahulu menggunakan metanol kemudian di oven pada suhu 100 °C selama 5 menit. Lempeng KLT yang telah ditotol larutan standar genistein dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dan dieluasi menggunakan eluen n-heksan : etil asetat : asam asetat (2 : 5 : 0,15) hingga mencapai tanda batas. Kemudian lempeng diangin-anginkan sampai kering lalu noda yang terbentuk *scanning* pada panjang gelombang 266 nm. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter linieritas dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan suatu metode dikatakan linier jika koefisien korelasi (r) \geq 0,99 ; r hitung $>$ r tabel; koefisien variasi fungsi (V_{xo}) $<$ 5% serta nilai X_p lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

b. Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Penentuan BD dan BK dilakukan dengan membuat larutan standar genistein dalam metanol dengan 6 tingkat konsentrasi dibawah konsentrasi linieritas. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada pengujian linieritas (poin a). Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis* (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

c. Selektivitas/Spesifisitas

Sebanyak 2 konsentrasi larutan standar genistein dengan konsentrasi yang berbeda ditotolkan sebanyak 6 μ L pada lempeng KLT dan sampel dengan konsentrasi terpilih ditotolkan sebanyak 6 μ L pada lempeng KLT. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada pengujian linieritas (poin a). Selanjutnya kromatogram genistein yang terbentuk diamati dan dicek spektra *purity* dan *identity* puncak standar dan sampelnya. Pada kromatogram sampel, dihitung resolusi puncak genistein terhadap puncak yang lain (*unknown*). Syaratnya yaitu nilai $R_s > 1,5$ dengan nilai korelasi yang diharapkan $> 0,99$ (Harmita, 2004).

d. Presisi

Parameter presisi yang dilakukan meliputi *repeatability* dan *intermediat precision*. Seri konsentrasi standar dengan 6 tingkat konsentrasi antara 80-180% dari konsentrasi uji hasil optimasi ditotolkam sebanyak 6 μ L. Kemudian dilakukan preparasi larutan sampel untuk *repeatability* dengan menimbang sejumlah sampel ekstrak edamame (6x replikasi) dan dilarutkan dalam metanol p.a. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada pengujian linieritas (poin a). Prosedur diatas dilakukan sebanyak tiga kali pada tiga hari yang berbeda untuk menentukan presisi antara. Setelah itu, dihitung nilai parameter presisi dari data hasil scanning dengan program *Validation Method of Analysis* dan dilakukan perhitungan nilai SD dan RSD dimana nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan pada konsentrasi yang digunakan sesuai Tabel 2.1 (AOAC, 1998).

e. Akurasi

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Pengujian akurasi dilakukan dengan dua tahap yaitu pembuatan sampel adisi dengan penambahan standar sebanyak 30; 45; dan 60 % dari konsentrasi genistein dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi (*repeatability*) dan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas.

Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dilarutkan dengan metanol p.a (tidak sampai tanda batas). Selanjutnya dilakukan adisi dengan larutan standar mengandung genistein dengan konsentrasi 30; 45; dan 60 % dari jumlah genistein yang diperkirakan dalam ekstrak edamame. Kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda dan kocok sampai homogen. Masing-masing sampel adisi dibuat sebanyak 3 replikasi. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjujukan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada pengujian presisi (poin d). Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter akurasi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis* (Harmita, 2004). Nilai % *recovery* dan RSD yang dipersyaratkan sesuai dengan Tabel 2.2 (AOAC, 1998).

3.7.10 Penetapan Kadar Genistein

Penetapan kadar kandungan isoflavon genistein yang terdapat dalam masing-masing ekstrak edamame dapat diketahui dengan menggunakan metode KLT-densitometer (Kusumawati., 2015). Penetapan kadar diawali dengan pembuatan seri konsentrasi standar sebanyak 6 tingkat konsentrasi yaitu 5; 15; 20; 25; 35 dan 50 $\mu\text{g/mL}$ ditotolkan pada lempeng KLT Silika gel F₂₅₄ sebanyak 6 μL dan tiga replikasi penotolan ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 4 μL untuk setiap totalan. Lempeng KLT Silika gel F₂₅₄ kemudian dieluasi menggunakan eluen terpilih hasil uji optimasi eluen dan di *scanning* menggunakan panjang gelombang 266 nm. Selanjutnya dihitung perolehan kadar genistein pada masing-masing sampel ekstrak biji edamame dalam % b/b sesuai dengan Tabel 2.2 (AOAC, 1998).

3.7.11 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis statistika dengan uji *one-way* Anova (*Analysis of Varian*) yang memiliki tingkat kepercayaan 99%. Analisis ini digunakan untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang bermakna pada hasil penelitian yang dilakukan yaitu kadar genistein ekstrak edamame terfermentasi R.

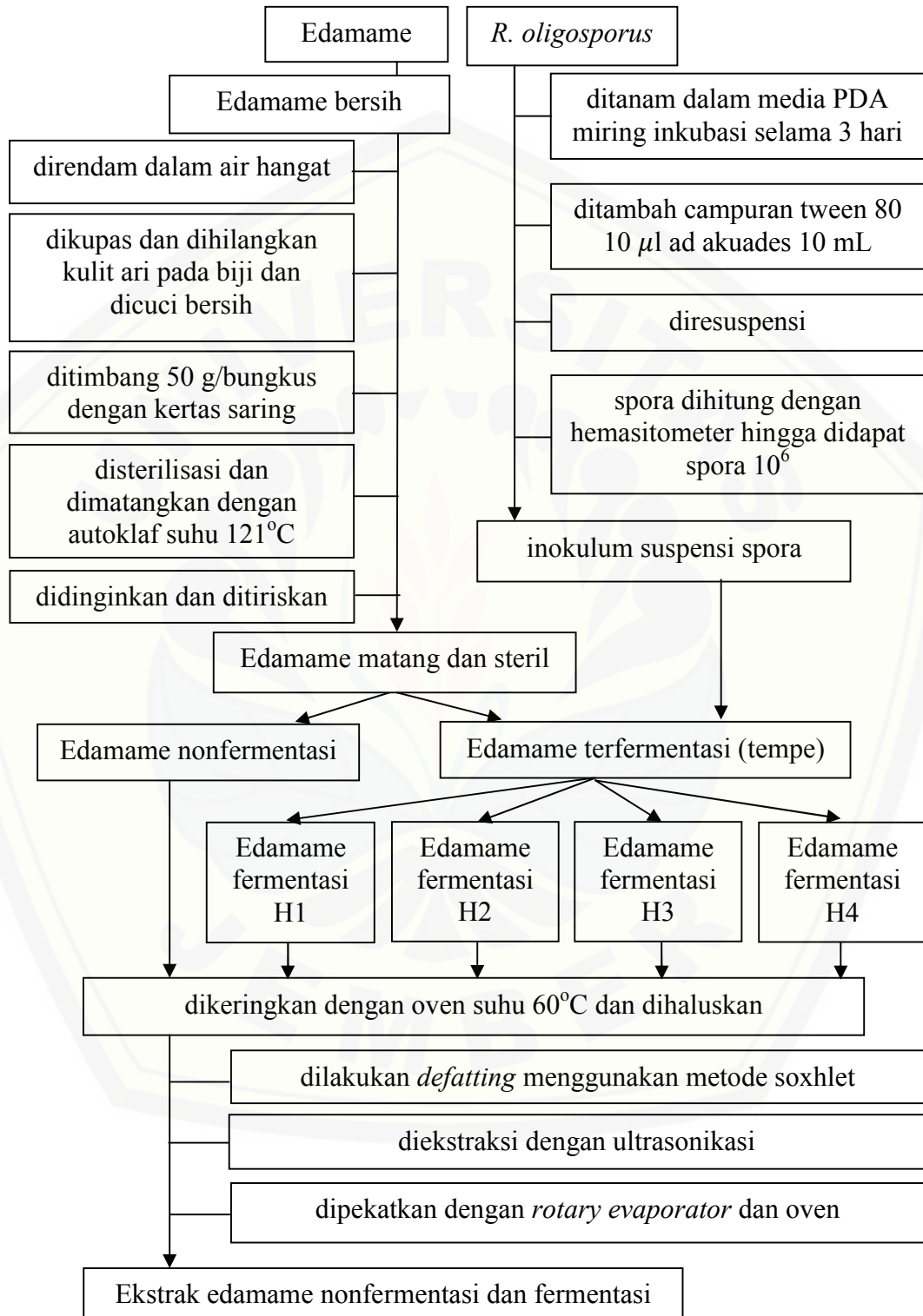
oligosporus hari ke-1; 2; 3; dan 4. Hasil uji Anova disebutkan memiliki perbedaan yang signifikan (bermakna) bila harga $p < 0,01$ (Sopiyudin, 2004)

Apabila terdapat perbedaan yang signifikan pada uji Anova, analisis dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significantly Different*) menggunakan program SPSS 16 *for Windows*. Data hasil uji *one-way* Anova dan LSD dikatakan berbeda signifikan bila didapat harga $p < 0,01$ ($\alpha = 0,01$) (Sopiyudin, 2004).



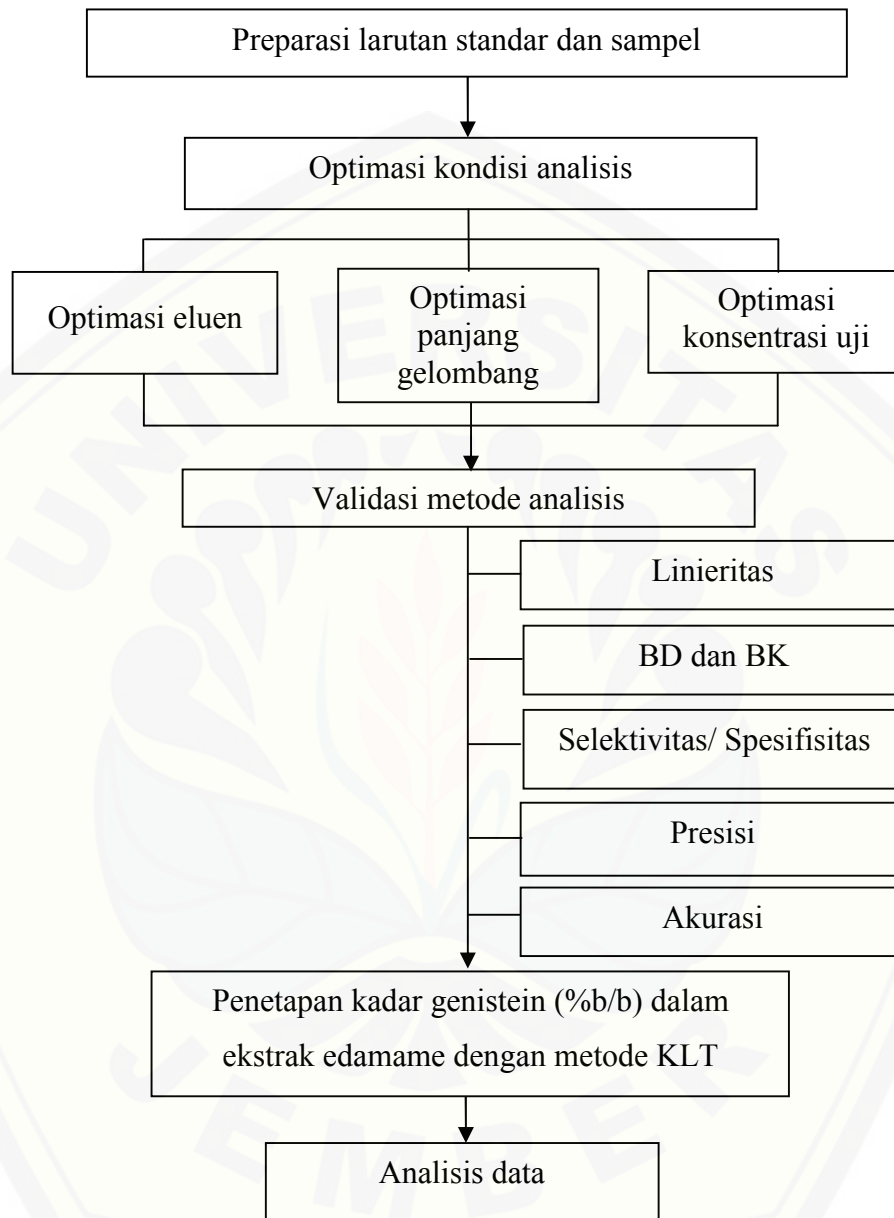
3.8 Skema Penelitian

3.8.1 Skema pembuatan ekstrak edamame terfermentasi dan nonfermentasi.



Gambar 3. 3 Skema pembuatan ekstrak edamame terfermentasi dan nonfermentasi.

3.8.2 Skema validasi penetapan kadar genistein menggunakan KLT-densitometri.



Gambar 3.4 Skema validasi penetapan kadar genistein menggunakan KLT-densitometri

1.2 Saran

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme aksi yang menyebabkan penurunan kadar genistein pada fermentasi edamame menggunakan kapang *R. oligosporus*.
- b. Perlu adanya optimasi kondisi analisis lebih lanjut untuk dapat memisahkan senyawa isoflavon seperti genistein, daidzein dan glisitein mendukung hasil analisis yang lebih valid
- c. Edamame sebaiknya dikonsumsi dalam bentuk segar karena memiliki kandungan genistein yang lebih tinggi dibandingkan difermentasi menggunakan kapang *R. oligosporus*.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1998. *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA : Arlington, Virginia.
- Asadi. 2009. Karakterisasi Plasma Nutfah untuk Perbaikan Varietas Kedelai Sayur (Edamame). *Buletin Plasma Nutfah*. 15(2): 59 – 69.
- Atun, S. 2009. Potensi Senyawa Isoflavon dan Derivatnya dari Kedelai (*Glycine max* L.) serta Manfaatnya untuk Kesehatan. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian*. Yogyakarta: Pendidikan dan Penerapan MIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Balitbang Kemenkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar Riskesdas*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI.
- Barz, W.H., Boger-Papendorf, G. Dan Rehms, H. 1990. Characterization of Glycohydrolases, Phosphatases and Isoflavone Metabolism in Tempe-Forming *Rhizopus*-strains. *Proceeding of the 2nd Asian Symposium on Non-salted Soybean Fermentation*. 13-15.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., dan Holden, J. M. 2008. USDA Database for the isoflavone content of selected foods, release 2.0. U.S. *Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory*. Available at: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/isoflav> [Diakses pada 10 Februari 2018].
- Born, H. 2006. Edamame: vegetable soybean. *ATTRA*. 1–4.
- Caderroth, C. dan N. Serge. 2009. Soy, Phytoestrogens and metabolism: a reviews. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304:30–42.
- Coral AL. 2008. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *American Journal Clinic Nutriron*. 71: 1705–1707.
- Dewi, E. N. A. 2015. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirokinase Edamame (*Glycine max*) in vitro. *Skripsi*. Jember: Digital Repository Universitas Jember.
- Dhaubhadel, S. 2011. *Regulation of Isoflavonoid Biosynthesis in Soybean Seeds*. Kanada: Southern Crop Protection and Food Research Center. 243-258.
- Dixon, R.A., dan Steele, C. L. 1999. Flavonoids and Isoflavone: a gold mine for metablic engineering. *Trends Plant Sci*. 4: 394 -400.

- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Fitriah, A. M. 2018. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame (*Glycine max* L. Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* dengan KLT-Densitometri. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Garlock, T. 2000. The Effect of Various Acidic Solutions on the Concentration of Genistein in Tempeh. *Tesis*. The Graduate College University of Wisconsin-Stout Menomonie.
- Hajirahimkhan, A., Dietz, B.M., dan Bolton, J.L. 2013. Botanical modulation of menopausal symptoms: mechanisms of action?. *Planta Med.* 79: 538–553.
- Hansen, P. J. 2000. *Use of a hemacytometer*. University of Florida: PJ Hansen Laboratory.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 117 – 135.
- Hui, M., Tiansheng, Q., dan Hai, Z. 2005. Methods for extracting, separating, identifying and quantifying daidzein and genistein. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 03. Abstract from: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YHS200503007.htm [22 Januari 2015].
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- International Conference on Harmonisation (ICH). 1994. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. European Union, Japan, USA : ICH Expert Working Group.
- Istiani, Y. 2010. Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*). *Tesis*. Surakarta: Program Studi Biosains Universitas Sebelas Maret.
- Integrated Taxonomic Information System. 2011. *Glycine max*. Online. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26716#null. [diakses tanggal 20 Januari 2018].
- Kartini, F.D. 2015. Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (*Glycine max*) in Vitro. *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.

- Kemenkes RI. 2015. *Infodatin: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Kowalska, T. & Prus, W. 2003. *Optimization of Thin-Layer Chromatography in Encyclopedia of Chromatography*. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Kusumawati, L. A. I. 2015. Formulasi dan Evaluasi Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine max*) sebagai Sediaan Krim Pemutih Kulit. *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Lee, I. dan C. C. Chou. 2006. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *Journal of Agriculture Chemistry*. 54(4): 1309–1314.
- Lee, I. H., Hung, Y. H., dan Chou, C. C. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and antocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*. 121 (2008): 150–156.
- Lee, J., H. Seung Kim., Y. dan Sang S. 2011. Genistein as a Potential Anticancer Agent Against Ovarian Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2(2): 96-104.
- Luthria, D. L., Biswas, R., dan Natarajan, S. 2007. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*. 105 (2007): 325-333.
- Mebrahtu, T., Mohamed, A., Wang, C.Y., dan Andebrhan, T. 2004. Analysis of isoflavone contents in vegetable soybeans. *Plant Foods for Human Nutrition*. 59: 55–61.
- Michel, T., M. Halabalaki, dan A. L. Skaltsounis, 2013. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Med*. 79: 514–532.
- Muchtaridi, Mutalib, A., Levita, J., Diantini, A., dan Musfiroh, I. 2011. Prediksi Aktivitas Antikanker Payudara Senyawa Faviconin dari Biji *Phaleria macrocarpa* Melalui Metode Hubungan Kuantitatif Struktural (Scheff) Boerl. pada ER dan Aktivitas. *Journal of Bionatura*. 13(1): 175.
- Nakajima, N., N. Nozaki., K. Ishihara, A. Ishikawa, dan H. Tsuji. 2005. Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100: 685-687.

- Nasution, W. M., Asriyati, F. A., Siregar. 2018. Pengaruh Pemakaian Kontrasepsi Hormonal dan Riwayat Keluarga terhadap Kejadian Kanker Payudara di RSUD Dr. Pirgadi Medan Tahun 2017. *Jurnal Medika Respati*. 13(2): 39-47.
- National Cancer Institute. www.cancer.gov. [diakses pada 5 Maret 2018].
- Naufalia, A. N. 2018. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max*) Terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* dengan KLT-Densitometri. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- New Zealand Organism Register. tanpa tahun. *Rhizopus Microsporus Var. oligosporus* (Saito). <http://www.nzor.org.nz/>. [diakses tanggal 20 Januari 2018].
- Otieno, D. O., J. F. Ashton, dan N. P. Shah. 2006. Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Food Research International*. 39(4):394–407.
- Pawiroharsono, S. 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Pilsakova, L., I. Riečanský, dan F. Jagla. 2010. The Physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiology Research*. 59: 651-664.
- Praharini, S. R. 2015. Pengaruh Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Isoflavon Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*). *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Punjaisee, C., W. Visessanguan, S. Punjaisee, dan C. Chaiyasut. 2011. Screening of potential *Aspergillus spp.* for production of fermented soybean with high antioxidative activity. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 10(2): 197-212.
- Purwoko, T., S. Pawiroharsono, dan I. Gandjar. 2001. Biotransformasi isoflavon oleh *Rhizopus oryzae*. UICC 524. *BioSMART*. 3(2) : 7-12.
- Purwoko, T. 2004. Kandungan isoflavon aglikon pada tempe hasil fermentasi *Rhizopus microsporus var. oligosporus*: pengaruh perendaman. *BioSMART*. 3(2):85–87.
- Ralston, L. 2005. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in Yeast using soybean type I and II chalcone isomerase. *Plant physiology*. 137: 1375-1388.

- Riyanto. 2014. *Validasi & Verifikasi Metode Uji. Edisi 1*. Yogyakarta: Deepublish.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rukmana, R., dan Y. Yuniarsih. 2012. *Kedelai, Budidaya dan Pasca Panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sarkar, F.H., dan Li, Y. 2003. Soy Isoflavones and Cancer Prevention. *Cancer Investigation*. 21(5):744-757.
- Samsu, H. S. 2001. *Membangun Agroindustri Bernuansa Ekspor: Edamame (vegetable soybean)*. Jember: Graha Ilmu dan Florentina.
- Shanmugasundaram, S. 1991. Vegetable Soybean; Research Needs For Production and Quality Improvemen. *Proceedings of a Workshop held at Kentin*. Taiwan: AVROG.
- Setyaningsih, D., K. Tresnawati, M. T. Soehartono, dan A. Apriyantono. 2006. Pengaruh Aktivitas β -glukosidase Eksternal dari Kapang terhadap Kadar Vanilin Buah Vanili. *J. Teknol Industri Pertanian*. 16(1): 28-35.
- Soewanto, H., A. Prasongko dan Sumarno. 2007. *Agribisnis Edamame untuk Ekspor*. p.416-443. Dalam Sumarno, Suyamto, A. Widjono, Hermanto dan H. Kasim (Eds.): *Kedelai. Teknik Produksi dan Pengembangan*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor. 521 p.
- Sopiyudin, D.M. 2004. *Statistika Untuk Kedokteran Dan Kesehatan*. Jakarta : PT. Arkans.
- Suprpti, M. L. 2003. *Pembuatan Tempe*. Yogyakarta: Kanisius.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. Surabaya: UNESA.
- Syafitri, N. E., M. Bintang, dan S. Falah. 2014. Kandungan Fitokimia, Total Fenol, dan Total Flavonoid Ekstrak Buah Harendong (*Melastoma affine* D. Don). *Current Biochemistry*. 1(3): 105-115.
- Tagliaferri, M., I. Cohen., dan D. Tripathy. 2007. *Kanker Payudara*. Jakarta: PT Indeks.
- Teekachunhatean, S., N. Hanprasertpong, dan T. Teekachunhatean. 2013. Factors affecting isoflavone content in soybeanseeds grown in Thailand. *International Journal of Agronomy*. 2013(163573):1-11.

- Tim QC APH Golongan Jamur. 2009. *Modul Quality Control (QC) APH Golongan Jamur*. Surabaya: Balai Besar Pembenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BPPTP).
- Tsukamoto, C., S. K. Shimada, Igita, S. Kudou, M. Kokubun, K. Okubo, dan K. Kitamura. 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(5):1184–1192.
- USDA. 2008. *USDA Database for The Isoflavone Content of Selected Foods*. Nutrient Data Laboratory. United States of America.
- Varney, H., J. A. N. M. Kriebs, dan C. L. Gegor. 2004. *Varney's Midwifery*. Edisi Fourth. United States: Jones and Bartlett Publishers.
- Waluyo, L. 2005. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- Wibisono Y dan Warsito H, 2009. Optimalisasi, ekstraksi dan produksi genistein secara komersial dari kedelai edamame afkiran (waste product) untuk mengatasi penyakit degeneratif dan terapi kanker di Indonesia. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus: 7A* (149–155).
- Wipradnyadewi, P. A. S., S. R. Endang, dan S. Raharjo. 2004. Isolasi Identifikasi *Rhizopus oligosporus* pada Beberapa Inokulum Tempe. *Laporan Penelitian Tim Pasca Sarjana Angkatan I Tahun ke-2*.
- World Health Organization. 2014. Online. http://www.who.int/cancer/country-profiles/idn_en.pdf?ua=1. [diakses pada 5 Maret 2018].
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Yang, T.S., S.Y. Wang, Yang, Y.C., Su, C.H., Lee, F.K., Chen, S.C., Tseng, C.Y., Jou, H.J., J.P. Huang, dan Huang, K.E., 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women, *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 51 (2): 229- 235.
- Yunindarwati, E., E. U. Ulfa, E. Puspitasari, dan M. A. Hidayat. 2016. Penentuan kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai (*Glycine max*) terfermentasi *Aspergillus oryzae*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 14(1):1–7.
- Zdenka, P., L. Martina, S. Petr, Jirina, B., dan B. Ivo. 2006. Antimutagenic effect of genistein. *Czech Journal of Food Science*. 24(3): 119–126.

LAMPIRAN

A. Perhitungan Preparasi Fermentasi

1. Perhitungan kepadatan suspensi spora
- R. oligosporus*

Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 18 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 22 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 19 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 18 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 12 spora

Rata-rata jumlah spora = 17,8 spora

Perhitungan kepadatan spora/mL (S)

$$S = \frac{17,8}{0,0125 \times 0,1 \times 0,1} \times 10 = 1.424.000$$

$$S = 1,424 \cdot 10^6/\text{mL}$$

2. Pengenceran suspensi spora

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$1,424 \cdot 10^6 \cdot 10 \text{ mL} = 10^6 \cdot V2$$

$$V2 = 14,24 \text{ mL}$$

Maka voume akuades yang ditambahkan adalah sebagai berikut:

$$14,24 \text{ mL} - 10 \text{ mL} = 4,24 \text{ mL}$$

Suspensi yang akan ditambahkan pada 50 g edamame adalah sebanyak 1 mL, maka:

- a. Akuades yang ditambahkan

$$\frac{14,42 \text{ mL}}{4,24 \text{ mL}} = \frac{1 \text{ mL}}{x \text{ mL}}$$

$$X = 0,2977 \text{ mL}$$

- b. Suspensi spora yang akan ditambahkan

$$1 \text{ mL} - 0,2977 \text{ mL} = 0,7023 \text{ mL}$$

B. Perhitungan Rendemen Ekstrak

1. Edamame nonfermentasi

Bobot serbuk kering = 700 gram

Ekstrak kental = 67,83 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu = $\frac{67,83 \text{ gram}}{700 \text{ gram}} \times 100\% = 9,69 \%$

2. Edamame terfermentasi hari ke-1

Bobot serbuk kering = 62,9 gram

Ekstrak kental = 8,73 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu = $\frac{8,73 \text{ gram}}{62,9 \text{ gram}} \times 100\% = 13,8792 \%$

3. Edamame terfermentasi hari ke-2

Bobot serbuk kering = 57,09 gram

Ekstrak kental = 14,89 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu = $\frac{14,89 \text{ gram}}{57,09 \text{ gram}} \times 100\% = 26,0816 \%$

4. Edamame terfermentasi hari ke-3

Bobot serbuk kering = 57,27 gram

Ekstrak kental = 16,69 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu = $\frac{16,69 \text{ gram}}{57,27 \text{ gram}} \times 100\% = 29,1427 \%$

5. Edamame terfermentasi hari ke-4

Bobot serbuk kering = 36,27 gram

Ekstrak kental = 17,23 gram

Rendemen yang diperoleh yaitu = $\frac{17,23 \text{ gram}}{36,27 \text{ gram}} \times 100\% = 47,5048 \%$

C. Pembuatan Larutan Baku

1. Larutan baku induk

- a. Ditimbang 10 mg standar genistein dan dilarutkan dalam 5 mL metanol

$$\frac{5 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Larutan Standar Induk 1

$$500 \text{ } \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$x = 2,25 \text{ mL}$$

maka, untuk mendapatkan konsentrasi larutan induk 500 $\mu\text{g/ml}$ dipipet 2,25 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ ad 5 mL metanol.

Larutan Standar Induk 2

$$400 \text{ } \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

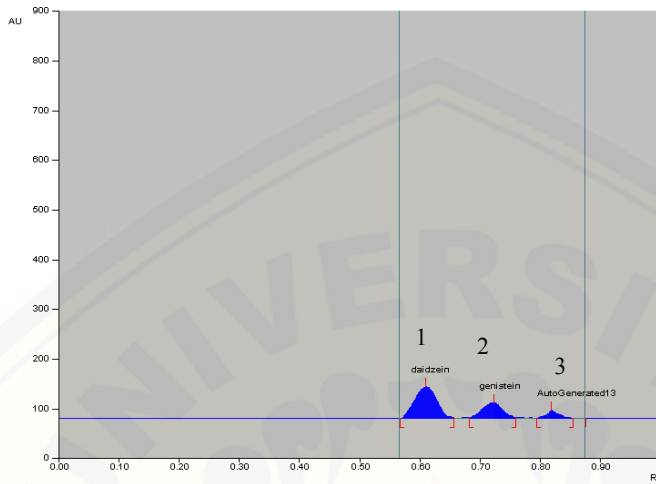
$$x = 2 \text{ mL}$$

maka, untuk mendapatkan konsentrasi larutan induk 400 $\mu\text{g/ml}$ dipipet 2 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ ad 5 mL metanol.

D. Data Optimasi Eluen

1. Optimasi Eluen 1

n-heksana : etil asetat : asam asetat v/v/v (2 : 5 : 0,15)



Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,57 Rf	0,61Rf	0,66 Rf	Daidzein
2	0,68 Rf	0,72 Rf	0,76 Rf	Genistein
3	0,79 Rf	0,82 Rf	0,85 Rf	Unknown

Contoh Perhitungan:

$$Rs_{1.2} = \frac{2(\text{jarak migrasi A} - \text{jarak migrasi B})}{(\text{lebar dasar puncak A} + \text{lebar dasar puncak B})}$$

$$Rs_{1.2} = \frac{2(0,72 - 0,61)}{(0,66 - 0,57) + (0,76 - 0,68)} = 1,29$$

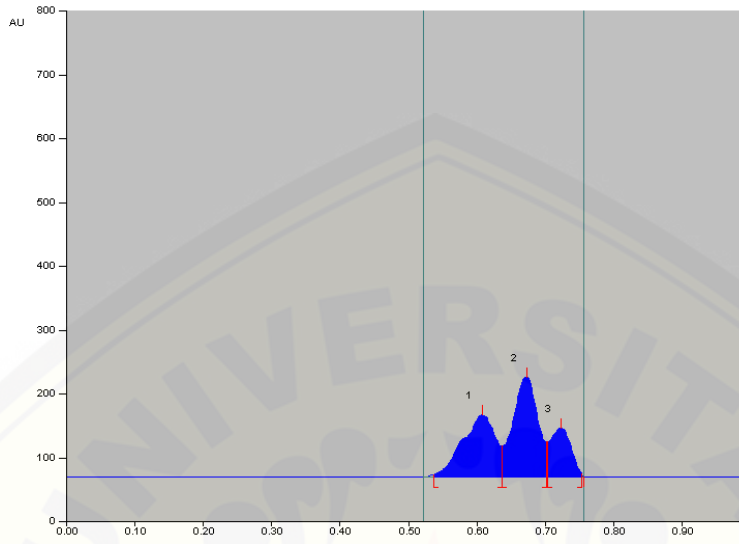
$$Rs_{2.3} = \frac{2(0,82 - 0,72)}{(0,76 - 0,68) + (0,85 - 0,79)} = 1,43$$

$$N = \left[\frac{\text{Max Position}}{\text{End-Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[\frac{0,72}{0,76 - 0,68} \right]^2 \times 16 = 1296$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{1296} = 0,0694$$

2. Optimasi Eluen 2

n-heksana : etil asetat v/v (0,5 : 5)



Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,54 Rf	0,61Rf	0,64 Rf	Glisitein
2	0,64 Rf	0,67 Rf	0,70 Rf	Daidazein
3	0,70 Rf	0,72 Rf	0,75 Rf	Genistein

Perhitungan :

$$R_{S\ 2.3} = \frac{2(\text{jarak migrasi A}-\text{jarak migrasi B})}{(\text{lebar dasar puncak A}+\text{lebar dasar puncak B})}$$

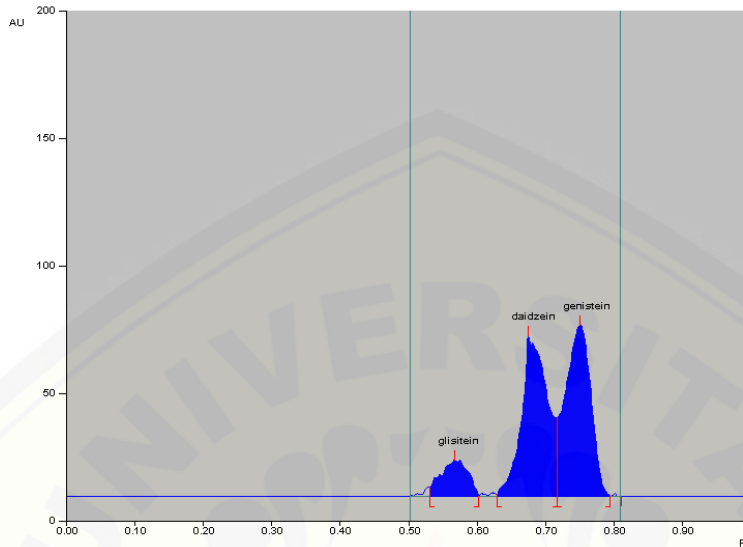
$$R_{S\ 2.3} = \frac{2(0,72-0,67)}{(0,70-0,64)+(0,75-0,70)} = 0,91$$

$$N = \left[\frac{\text{Max Position}}{\text{End-Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[\frac{0,72}{0,75-0,70} \right]^2 \times 16 = 3317,76$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{1836,73} = 0,027$$

3. Optimasi Eluen 3

n-heksana : etil asetat v/v (1 : 5)



Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,53 Rf	0,52Rf	0,60 Rf	Glisitein
2	0,63 Rf	0,68 Rf	0,72 Rf	Daidzein
3	0,72 Rf	0,75 Rf	0,79 Rf	Genistein

Perhitungan :

$$R_{s\ 2.3} = \frac{2(\text{jarak migrasi A} - \text{jarak migrasi B})}{(\text{lebar dasar puncak A} + \text{lebar dasar puncak B})}$$

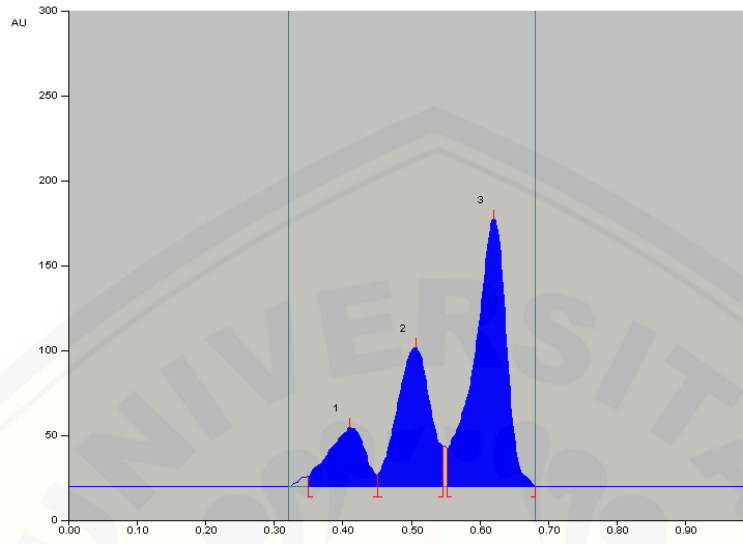
$$R_{s\ 2.3} = \frac{2(0,75 - 0,68)}{(0,72 - 0,63) + (0,79 - 0,72)} = 0,4375$$

$$N = \left[\frac{\text{Max Position}}{\text{End-Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[\frac{0,75}{0,79 - 0,72} \right]^2 \times 16 = 1836,73$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{1836,73} = 0,049$$

4. Optimasi Eluen 4

n-heksana : etil asetat v/v (3 : 5)



Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,35 Rf	0,41 Rf	0,45 Rf	Glisitein
2	0,45 Rf	0,51 Rf	0,55 Rf	Daidazein
3	0,55 Rf	0,62 Rf	0,68 Rf	Genistein

Perhitungan :

$$R_{S\ 2.3} = \frac{2(\text{jarak migrasi A} - \text{jarak migrasi B})}{(\text{lebar dasar puncak A} + \text{lebar dasar puncak B})}$$

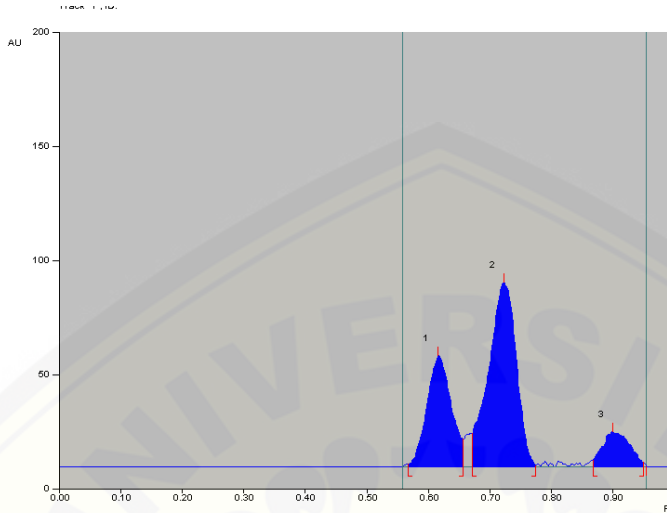
$$R_{S\ 2.3} = \frac{2(0,62 - 0,51)}{(0,55 - 0,45) + (0,68 - 0,55)} = 0,48$$

$$N = \left[\frac{\text{Max Position}}{\text{End-Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[\frac{0,62}{0,68 - 0,55} \right]^2 \times 16 = 363,93$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{1836,73} = 0,247$$

5. Optimasi Eluen 5

n-heksana : etil asetat : asam asetat v/v/v (2 : 5)



Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,57 Rf	0,62 Rf	0,66 Rf	Daidzein
2	0,67 Rf	0,72 Rf	0,78 Rf	Genistein
3	0,86 Rf	0,90 Rf	0,96 Rf	Unknown

Perhitungan :

$$R_{s\ 1.2} = \frac{2(\text{jarak migrasi A} - \text{jarak migrasi B})}{(\text{lebar dasar puncak A} + \text{lebar dasar puncak B})}$$

$$R_{s\ 1.2} = \frac{2(0,72 - 0,62)}{(0,66 - 0,57) + (0,78 - 0,67)} = 1$$

$$R_{s\ 2.3} = \frac{2(0,90 - 0,72)}{(0,78 - 0,67) + (0,96 - 0,86)} = 1,7$$

$$N = \left[\frac{\text{Max Position}}{\text{End-Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[\frac{0,72}{0,78 - 0,67} \right]^2 \times 16 = 685,49$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{685,49} = 0,13$$

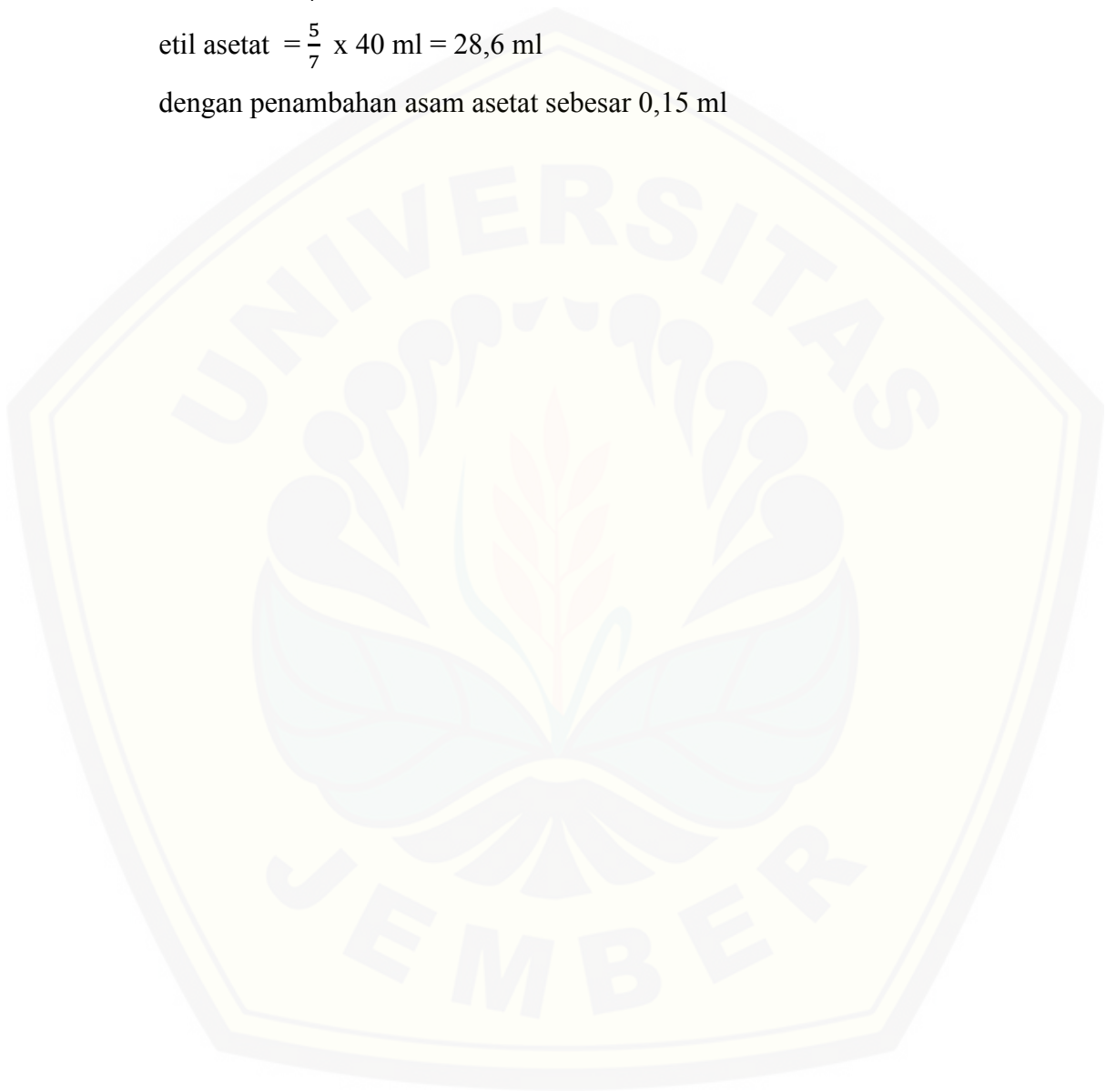
E. Pembuatan Fase Gerak

Eluen yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat : asam asetat (2 : 5 : 6) sebanyak 40 ml.

$$\text{n-heksana} = \frac{2}{7} \times 40 \text{ ml} = 11,4 \text{ ml}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{5}{7} \times 40 \text{ ml} = 28,6 \text{ ml}$$

dengan penambahan asam asetat sebesar 0,15 ml



F. Hasil Uji Linieritas Genistein

1. Data hasil linieritas

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Massa (ng)	Area	r	Vx_0	Xp_{value}
5	30	683,37			
15	90	1787,01			
20	120	3273,95	0,99895	3,5133%	26,74519
25	150	4369,17			
35	210	6123,43			
50	300	8469,75			
		$Y = 28,78111x - 55,48183$			

2. Pembuatan larutan standar untuk linieritas

i. Larutan baku konsentrasi 5 $\mu\text{g/ml}$

$$5 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,05 \text{ mL}$$

ii. Larutan baku konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$

$$15 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,15 \text{ mL}$$

iii. Larutan baku konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$

$$20 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 400 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,25 \text{ mL}$$

iv. Larutan baku konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$

$$25 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,25 \text{ mL}$$

v. Larutan baku konsentrasi 35 $\mu\text{g/ml}$

$$35 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,35 \text{ mL}$$

vi. Larutan baku konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$

$$50 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,5 \text{ mL}$$

G. Hasil Pengujian BD dan BK Genistein

1. Data hasil BD dan BK

Konsentrasi (µg/ml)	Massa (ng)	Area	r	Vx ₀	Xp _{value}
4	48	1020,58			
4,5	54	1392,89			
5,5	66	2110,92	0,99058	4,859484%	24,94901
7	84	2484,23			
8	96	3055,39			
9	108	3532,15			
Y= 39,81011x-759,6383 BD = 24,9329 ng BK = 74,7985 ng					

2. Pembuatan larutan standar untuk BD dan BK

i. Larutan baku konsentrasi 4 µg/ml

$$4 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 400 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,05 \text{ mL}$$

ii. Larutan baku konsentrasi 4,5 µg/ml

$$4,5 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,045 \text{ mL}$$

iii. Larutan baku konsentrasi 5,5 µg/ml

$$5,5 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,055 \text{ mL}$$

iv. Larutan baku konsentrasi 7 µg/ml

$$7 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,075 \text{ mL}$$

v. Larutan baku konsentrasi 8 µg/ml

$$8 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 400 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,1 \text{ mL}$$

vi. Larutan baku konsentrasi 9 µg/ml

$$9 \mu\text{g/ml} = \frac{x \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 500 \mu\text{g/ml} \rightarrow x = 0,5 \text{ mL}$$

H. Perhitungan Konsentrasi Uji

Diketahui sebanyak 0,5 gram yang dilarutkan dalam 5 ml metanol (100 mg/ml.) ekstrak edamame hari ke-0; 1; 2; 3; dan 4 secara berturut-turut mengandung genistein sebesar 44,25; 14,98; 20,36; 23,63; dan 10,23 µg/ml.

Perhitungan konsentrasi uji yang digunakan

1. Perhitungan penimbangan konsentrasi uji yang digunakan

a. $H_0 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 44,25 µg/ml

$$\frac{80}{100} \times 44,25 \text{ µg/ml} = 35,40 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{35,40 \text{ µg/ml}}{44,25 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120}{100} \times 44,25 \text{ µg/ml} = 53,10 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{53,10 \text{ µg/ml}}{44,25 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

b. $H_1 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 14,98 µg/ml

$$\frac{80}{100} \times 14,98 \text{ µg/ml} = 11,98 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{11,98 \text{ µg/ml}}{14,98 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120}{100} \times 14,98 \text{ µg/ml} = 17,98 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{17,98 \text{ µg/ml}}{14,98 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

c. $H_2 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 20,36 µg/ml

$$\frac{80}{100} \times 20,36 \text{ µg/ml} = 16,29 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{16,29 \text{ µg/ml}}{20,36 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120}{100} \times 20,36 \text{ µg/ml} = 24,43 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{24,43 \text{ µg/ml}}{20,36 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

d. $H_3 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 23,63 µg/ml

$$\frac{80}{100} \times 23,63 \text{ µg/ml} = 18,90 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{18,90 \text{ µg/ml}}{23,63 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120}{100} \times 23,63 \text{ µg/ml} = 28,36 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{28,36 \text{ µg/ml}}{23,63 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

e. $H_4 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 10,23 µg/ml

$$\frac{80}{100} \times 10,23 \text{ µg/ml} = 8,18 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{8,18 \text{ µg/ml}}{10,23 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120}{100} \times 10,23 \text{ µg/ml} = 12,28 \text{ µg/ml} \quad \rightarrow \frac{12,28 \text{ µg/ml}}{10,23 \text{ µg/ml}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

Berikut data perbandingan nilai efisiensi kromatogram pada konsentrasi genistein yang berbeda:

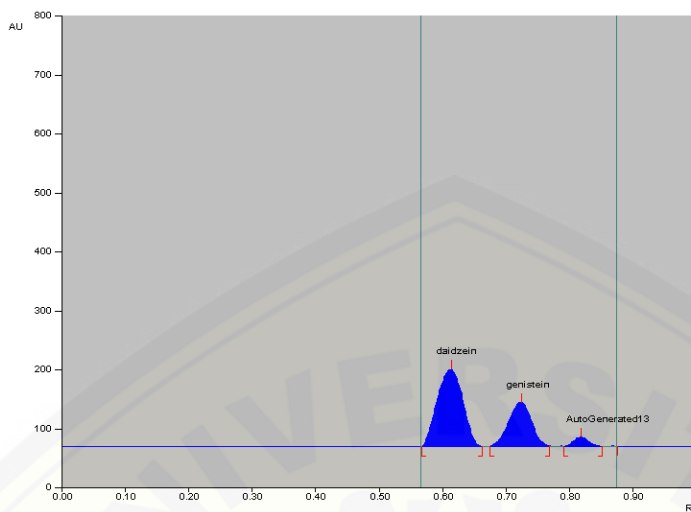
Sampel	Penimbangan ekstrak (g)	Start position	Max position	End position	N	H
H0	0,4	0,70	0,76	0,81	763,769	0,118
	0,5	0,70	0,76	0,82	641,778	0,140
	0,6	0,71	0,77	0,83	658,778	0,137
H1	0,4	0,71	0,77	0,83	658,778	0,137
	0,5	0,70	0,76	0,83	546,840	0,164
	0,6	0,69	0,75	0,81	625,000	0,144
H2	0,4	0,69	0,75	0,80	743,802	0,121
	0,5	0,69	0,75	0,80	743,802	0,121
	0,6	0,69	0,74	0,80	724,099	0,124
H3	0,4	0,70	0,75	0,81	743,802	0,121
	0,5	0,69	0,75	0,80	743,802	0,121
	0,6	0,70	0,75	0,81	743,802	0,121
H4	0,4	0,70	0,75	0,81	743,802	0,121
	0,5	0,70	0,75	0,81	743,802	0,121
	0,6	0,70	0,75	0,80	900,000	0,100

Contoh perhitungan:

$$N = \left[\frac{\text{Max Position}}{\text{End} - \text{Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[\frac{0,76}{0,81 - 0,70} \right]^2 \times 16 = 763,769$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{763,7686} = 0,118$$

I. Hasil Pengujian Selektivitas/spesifisitas



Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,57 Rf	0,61 Rf	0,66 Rf	Daidzein
2	0,68 Rf	0,72 Rf	0,77 Rf	Genistein
3	0,79 Rf	0,82 Rf	0,85 Rf	Autogenerated3 (unknown)

Perhitungan :

$$R_{S \text{ da-gen}} = \frac{2(\text{jarak migrasi A} - \text{jarak migrasi B})}{(\text{lebar dasar puncak A} + \text{lebar dasar puncak B})}$$

$$R_{S \text{ da-gen}} = \frac{2(0,72 - 0,61)}{(0,66 - 0,57) + (0,77 - 0,68)} = 1,22$$

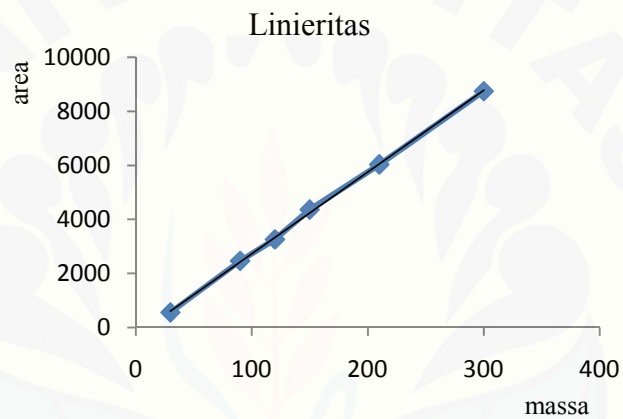
$$R_{S \text{ gen-unknown}} = \frac{2(0,82 - 0,72)}{(0,77 - 0,68) + (0,85 - 0,79)} = 1,33$$

J. Hasil Pengujian Presisi

1. Hasil uji linieritas dari presisi

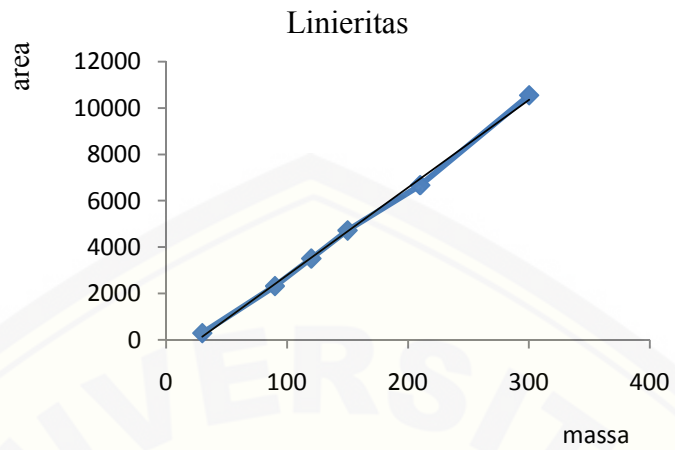
Konsentrasi genistein ($\mu\text{g/ml}$)	Massa standar genistein (ng)	Area presisi replikasi 1	Area presisi replikasi 2	Area presisi replikasi 3
5	30	552,29	298,73	372,28
15	90	2461,00	2323,08	2020,48
20	120	3254,59	3511,16	3197,80
25	150	4362,00	4722,34	3987,06
35	210	6034,49	6676,14	5873,40
50	300	8745,27	10549,98	8423,65

(i) Kurva baku presisi repeatabilitas hari ke-1



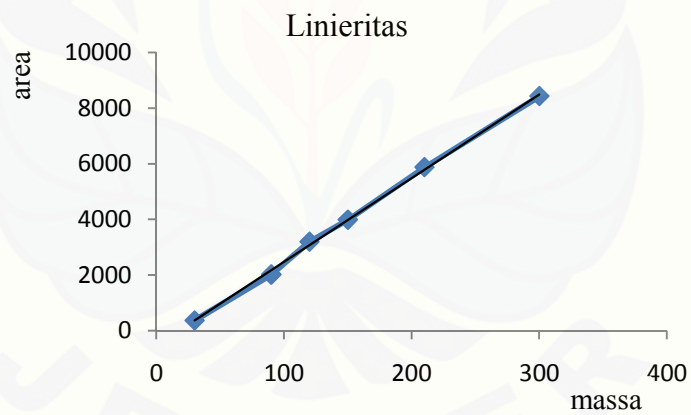
Persamaan regresi $Y = 30,2731X - 306,0179$
 r 0,9997
 V_{X_0} 1.8046 %
 $X_p \text{ value}$ 14,6833

(ii) Kurva baku presisi repeatabilitas hari ke-2



Persamaan regresi	$Y = 37,8333 - 994,755$
r	0,9988
V_{X_0} value	3,3976 %
X_p value	27,2938

(iii) Kurva baku presisi repeatabilitas hari ke-3



Persamaan regresi	$Y = 30,0915 - 534,6056$
R	0,9994
V_{X_0} value	2,5004 %
X_p value	20,2306

2. Hasil uji presisi repeatabilitas genistein hari ke-1, 2, dan 3.

(i) Presisi repeatabilitas hari ke-1

Massa ekstrak (mg)	Area	Massa (ng)	Massa genistein percobaan (mg)	Kadar genistein (% b/b)	Rata-rata (% b/b)	SD (%)	RSD (%)
405,6	2200,54	82,7983	0,0689	0,0170	0,0169	0,00067	3,9642
401,5	2292,00	85,8195	0,0715	0,0178			
403,7	2197,33	82,6923	0,0689	0,0171			
408,1	2084,73	78,9728	0,0658	0,0161			
403,4	2266,58	84,9798	0,0708	0,0176			
405	2087,88	79,0769	0,0659	0,0163			

Contoh perhitungan presisi repeatabilitas hari ke-1:

$$y = 30,2731x - 306,0179$$

$$2200,54 = 30,2731x - 306,0179$$

$$x = 82,7983 \text{ ng} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 6 \mu\text{l} = 0,006 \text{ ml}$$

$$\frac{82,7986 \text{ ng}}{0,006 \text{ ml}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,0689 \text{ mg} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 5 \text{ ml}$$

$$\% \text{ b/b} = \frac{0,0689}{405,6} \times 100 \% = 0,0170 \% \rightarrow \text{kadar genistein dalam } 0,4 \text{ gram ekstrak edamame terfermentasi hari ke-3.}$$

(ii) Presisi repeatabilitas hari ke-2

Massa ekstrak (mg)	Area	Massa (ng)	Massa genistein percobaan (mg)	Kadar genistein (% b/b)	Rata-rata (% b/b)	SD (%)	RSD (%)
405,6	1791,60	73,6482	0,0614	0,0151	0,0150	0,00015	1,0258
401,5	1741,93	72,3354	0,0603	0,0150			
403,7	1794,30	73,7196	0,0614	0,0152			
408,1	1788,49	73,5660	0,0613	0,0150			
403,4	1710,16	71,4956	0,0596	0,0148			
405	1783,70	73,4394	0,0612	0,0151			

(iii) Presisi repeatabilitas hari ke-3

Massa ekstrak (mg)	Area	Massa (ng)	Massa genistein percobaan (mg)	Kadar genistein (% b/b)	Rata-rata (% b/b)	SD (%)	RSD (%)
405,6	1608,90	71,2330	0,0594	0,0146	0,01477	0.000088	0,5952
401,5	1604,62	71,0908	0,0592	0,0148			
403,7	1614,27	71,4115	0,0595	0,0147			
408,1	1661,77	72,9900	0,0608	0,0149			
403,4	1622,30	71,6784	0,0597	0,0148			
405	1625,30	71,7780	0,0598	0,0148			

4. Hasil uji presisi antara genistein

Hari uji presisi	Kadar genistein rata-rata (% b/b)	RSD (%)
1	0,0169	3,9641
2	0,0150	1,0257
3	0,0148	0,5952
Rata-rata		1,8617

Contoh perhitungan :

$$\text{Rata-rata \% b/b} = \frac{0,0169+0,0150+0,0148}{3} = 0,0157 \% \text{ b/b}$$

$$\text{RSD rata-rata} = \frac{3,9641+1,0257+0,5952}{3} = 1,8617 \%$$

K. Hasil Pengujian Akurasi

1. Pembuatan larutan sampel adisi

a. Adisi 30%

$$\frac{30}{100} \times 80 \mu\text{g/ml} = 24 \mu\text{g/ml}$$

$$24 \mu\text{g/ml} = 400 \mu\text{g/ml} \times \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,3 \text{ ml standar genistein}$$

b. Adisi 45 %

$$\frac{45}{100} \times 80 \mu\text{g/ml} = 36 \mu\text{g/ml}$$

$$36 \mu\text{g/ml} = 400 \mu\text{g/ml} \times \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,45 \text{ ml standar genistein}$$

c. Akurasi 60%

$$\frac{60}{100} \times 80 \mu\text{g/ml} = 48 \mu\text{g/ml}$$

$$48 \mu\text{g/ml} = 400 \mu\text{g/ml} \times \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,6 \text{ ml standar genistein}$$

Prosedur kerja:

- (i) Ditimbang sampel sebanyak 0,4 g dan dilarutkan dalam 3 ml metanol p.a;
- (ii) Dimasukkan ekstrak ke dalam labu ukur 5 ml lalu di tambahkan standar sebanyak (a) 0,3 ml; (b) 0,45 ml; dan (c) 0,6 ml;
- (iii) Ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas.

2. Hasil uji akurasi

Adisi (%)	Massa ekstrak (mg)	Area	Massa genistein percobaan (mg)	Massa genistein teoritis (mg)	Kadar genistein (% b/b)	Rata-rata (% b/b)	SD (%)	RSD (%)
30	401,7	6901,83	0,1689	0,1827	92,4502	91,3437	1,0808	1,1832
	401,7	6823,52	0,1668	0,1827	91,2903			
	401,7	6756,03	0,1649	0,1827	90,2907			
45	401,8	8904,98	0,2231	0,2427	91,9197	93,4437	3,7104	3,9707
	401,8	8798,98	0,2202	0,2427	90,7380			
	401,8	9421,06	0,2370	0,2427	97,6734			
60	401,6	13879,67	0,3577	0,3026	118,1785	112,9603	4,5197	4,0011
	401,6	12996,32	0,3338	0,3026	110,2816			
	401,6	13011,87	0,3342	0,3026	110,4206			
Rata-rata						99,2493	3,1034	3,0517

Contoh perhitungan pada Adisi 30 %

a. Massa genistein teoritis:

Rata-rata kadar hasil presisi = 0,0157 % b/b

Penimbangan = 401,7 mg

$$\frac{0,0157g}{100g} \times 401,7 \text{ mg} = 0,0627 \text{ mg} + 0,12 \text{ mg standart} = 0,1827 \text{ mg}$$

b. Massa genistein percobaan = 0,1689 mg

c. Recovery = $\frac{\text{massa hasil percobaan}}{\text{massa teoritis}} \times 100 \%$

$$= \frac{0,1689mg}{0,1827mg} \times 100 \% = 91,3437 \% \text{ b/b}$$

L. Hasil Penetapan Kadar Genistein

Data hasil penetapan kadar

Fermentasi edamame hari ke	Massa ekstrak (mg)	Area	Massa (ng)	Massa genistein percobaan (mg)	Kadar genistein (% b/b)	Rata-rata (% b/b)	SD (%)	RSD (%)
0	402,8	3461,87	90,9635	0,0146	0,0188	0,0189	0,0003	1,3617
	401,7	3428,99	89,8959	0,0148	0,0186			
	401,7	3503,98	92,3307	0,0147	0,0192			
1	401,6	1130,97	16,7063	0,0139	0,0035	0,0030	0,0004	13,7586
	402,0	1040,56	12,8314	0,0107	0,0027			
	401,5	1067,33	13,9787	0,0116	0,0029			
2	401,3	2553,82	77,6879	0,0647	0,0161	0,0155	0,0006	3,8091
	400,4	2433,56	72,5337	0,0605	0,0151			
	401,3	2441,27	72,8641	0,0607	0,0151			
3	400,8	1580,05	35,9533	0,0299	0,0075	0,0077	0,0003	3,8363
	401,7	1600,57	36,8328	0,0307	0,0076			
	401,3	1645,76	38,7696	0,0323	0,0081			
4	400,3	863,22	5,2308	0,0044	0,0011	0,0011	0,00004	3,5970
	401,1	868,75	5,4678	0,0046	0,0011			
	401,1	859,97	5,0915	0,0042	0,0011			

Contoh perhitungan:

Persamaan regresi $y = 23,3324x + 741,7721$

$3461 = 23,3324x + 741,7721$

$x = 90,9635 \text{ ng} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 6 \mu\text{l} = 0,006 \text{ ml}$

$$\frac{90,9635 \text{ ng}}{0,006 \text{ ml}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$x = 0,0146 \text{ mg} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 5 \text{ ml}$

$\% \text{ b/b} = \frac{0,0146}{402,8} \times 100 \% = 0,0188 \% \rightarrow \text{kadar genistein dalam } 0,4 \text{ gram ekstrak edamame nonfermentasi}$

M. Hasil Analisis Data Spss

Tests of Normality

Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
konsentrasi	nonfermentasi	.252	3	.	.966	3	.643
	fermentasi H1	.269	3	.	.949	3	.565
	fermentasi H2	.375	3	.	.775	3	.056
	fermentasi H3	.275	3	.	.943	3	.541
	fermentasi H4	.220	3	.	.986	3	.776

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Konsentrasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.641	4	10	.044

ANOVA

Konsentrasi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	1.331E3	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.001	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Konsentrasi

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
nonfermentasi	fermentasi H1	.01586477*	.00029962	.000	.0149152	.0168143
	fermentasi H2	.00342089*	.00029962	.000	.0024713	.0043705
	fermentasi H3	.01115167*	.00029962	.000	.0102021	.0121012
	fermentasi H4	.01777981*	.00029962	.000	.0168302	.0187294
fermentasi H1	nonfermentasi	-.01586477*	.00029962	.000	-.0168143	-.0149152
	fermentasi H2	-.01244388*	.00029962	.000	-.0133934	-.0114943
	fermentasi H3	-.00471310*	.00029962	.000	-.0056627	-.0037635
	fermentasi H4	.00191503*	.00029962	.000	.0009655	.0028646
fermentasi H2	nonfermentasi	-.00342089*	.00029962	.000	-.0043705	-.0024713
	fermentasi H1	.01244388*	.00029962	.000	.0114943	.0133934
	fermentasi H3	.00773078*	.00029962	.000	.0067812	.0086803
	fermentasi H4	.01435892*	.00029962	.000	.0134094	.0153085
fermentasi H3	nonfermentasi	-.01115167*	.00029962	.000	-.0121012	-.0102021
	fermentasi H1	.00471310*	.00029962	.000	.0037635	.0056627
	fermentasi H2	-.00773078*	.00029962	.000	-.0086803	-.0067812
	fermentasi H4	.00662813*	.00029962	.000	.0056786	.0075777
fermentasi H4	nonfermentasi	-.01777981*	.00029962	.000	-.0187294	-.0168302
	fermentasi H1	-.00191503*	.00029962	.000	-.0028646	-.0009655
	fermentasi H2	-.01435892*	.00029962	.000	-.0153085	-.0134094
	fermentasi H3	-.00662813*	.00029962	.000	-.0075777	-.0056786

Multiple Comparisons

Konsentrasi

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
nonfermentasi	fermentasi H1	.01586477*	.00029962	.000	.0149152	.0168143
	fermentasi H2	.00342089*	.00029962	.000	.0024713	.0043705
	fermentasi H3	.01115167*	.00029962	.000	.0102021	.0121012
	fermentasi H4	.01777981*	.00029962	.000	.0168302	.0187294
fermentasi H1	nonfermentasi	-.01586477*	.00029962	.000	-.0168143	-.0149152
	fermentasi H2	-.01244388*	.00029962	.000	-.0133934	-.0114943
	fermentasi H3	-.00471310*	.00029962	.000	-.0056627	-.0037635
	fermentasi H4	.00191503*	.00029962	.000	.0009655	.0028646
fermentasi H2	nonfermentasi	-.00342089*	.00029962	.000	-.0043705	-.0024713
	fermentasi H1	.01244388*	.00029962	.000	.0114943	.0133934
	fermentasi H3	.00773078*	.00029962	.000	.0067812	.0086803
	fermentasi H4	.01435892*	.00029962	.000	.0134094	.0153085
fermentasi H3	nonfermentasi	-.01115167*	.00029962	.000	-.0121012	-.0102021
	fermentasi H1	.00471310*	.00029962	.000	.0037635	.0056627
	fermentasi H2	-.00773078*	.00029962	.000	-.0086803	-.0067812
	fermentasi H4	.00662813*	.00029962	.000	.0056786	.0075777
fermentasi H4	nonfermentasi	-.01777981*	.00029962	.000	-.0187294	-.0168302
	fermentasi H1	-.00191503*	.00029962	.000	-.0028646	-.0009655
	fermentasi H2	-.01435892*	.00029962	.000	-.0153085	-.0134094
	fermentasi H3	-.00662813*	.00029962	.000	-.0075777	-.0056786

*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

DOKUMETASI EKSTRAK



Ekstrak edamame nonfermentasi



Ekstrak edamame terfermentasi H1



Ekstrak edamame terfermentasi H2



Ekstrak edamame terfermentasi H3



Ekstrak edamame terfermentasi H4