



**VALIDASI METODE DAN PENETAPAN KADAR  
DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max*) TERFERMENTASI  
OLEH *Rhizopus oligosporus* DENGAN KLT-DENSITOMETRI**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Adinda Nadia Naufalia**  
**NIM 142210101079**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**VALIDASI METODE DAN PENETAPAN KADAR  
DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max*) TERFERMENTASI  
OLEH *Rhizopus oligosporus* DENGAN KLT-DENSITOMETRI**

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi (S1) serta gelar Sarjana Farmasi

Oleh  
**Adinda Nadia Naufalia**  
**NIM 142210101079**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah Subhanahu wa ta'ala dan Nabi Muhammad Shalallahu alaihi wassalam;
2. Orang tua tercinta, Ibu Lidya Noerma, SE dan Bapak Ir. Ainurrofiq, yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dorongan, motivasi, nasihat dan senantiasa mendampingi setiap langkah;
3. Mbah Sasmantri, Mbahuti Maimunah, Pakde Charis Mardiyanto, SH. MH., Tante Dr. Ir. Entin Hidayah, M. UM. dan Om dr. Ali Santosa, Sp. PD yang selalu memberikan doa, kasih sayang, nasihat dan pengorbanan demi kebahagiaan, keberhasilan serta kesuksesan;
4. Para pengajar sejak Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmu dan bimbingan dengan penuh ketulusan;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

“Barang siapa bersungguh-sungguh, sesungguhnya kesungguhannya itu adalah untuk dirinya sendiri.”

(QS. Al-Ankabut Ayat 6)

“Sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan, maka apabila kamu selesai (dari satu urusan) kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Allah-lah hendaknya kamu berharap.”

(QS. Al-Insyiraah Ayat 6-8)

Tidak ada pengorbanan dan usaha yang sia-sia, kesuksesan dan kebahagiaan akan datang pada waktunya. Hal tersebut bergantung pada keikhlasan, kesabaran serta doa.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Adinda Nadia Naufalia

NIM : 142210101079

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Gycine max*) Terfermentasi Oleh *Rhizopus oligosporus* dengan 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 dijunjung 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, 19 Juli 2018

Yang menyatakan,

Adinda Nadia Naufalia

NIM 142210101079

**SKRIPSI**

**VALIDASI METODE DAN PENETAPAN KADAR  
DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max*) TERFERMENTASI  
OLEH *Rhizopus oligosporus* DENGAN KLT-DENSITOMETRI**

Oleh  
**Adinda Nadia Naufalia**  
**142210101079**

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M. Farm., Apt

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max*) Terfermentasi Oleh *Rhizopus oligosporus* dengan KLT-Densitometri” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 19 Juli 2018

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Endah Pupitasari, S.Farm., M.Sc., Apt  
NIP 198107232006042002

Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt  
NIP 198712082014042002

Anggota II,

Anggota III,



Indah Yulia N., S.Farm., M.Farm., Apt  
NIP 198307122008122002

Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt  
NIP 198201292009121003

Mengesahkan  
Dekan

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

NIP 197604142002122001

## RINGKASAN

**Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max*) Terfermentasi Oleh *Rhizopus oligosporus* dengan KLT-Densitometri:** Adinda Nadia Naufalia, 142210101079; 2018, 55 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Jumlah penderita penyakit jantung koroner (PJK) semakin meningkat dari tahun ke tahun. Wanita yang telah memasuki masa menopause menjadi salah satu individu yang berisiko terhadap PJK. Hal ini terjadi karena adanya penurunan produksi estrogen dalam tubuh dan telah diketahui hormon estrogen memiliki efek proteksi terhadap arterosklerosis. Hasil dari riset kesehatan dasar tahun 2013 menunjukkan berdasarkan diagnosa dokter jumlah penderita PJK pada wanita yang memasuki masa menopause sebesar 0,8% sedangkan jumlah penderita gejalanya sebesar 1,6% dari total penduduk. Untuk mengurangi risiko dari penurunan estrogen, diperlukan asupan estrogen dari luar tubuh. Edamame (*Glycine max*) yang mengandung isoflavon tinggi. Isoflavon ini merupakan senyawa tumbuhan yang berasal dari tanaman dengan struktur yang serupa dengan estrogen, sehingga disebut juga senyawa fitoestrogen. Sebagian besar senyawa fitoestrogen dalam kedelai dalam bentuk glukosida. Isoflavon aglikon memiliki aktivitas fitoestrogen yang lebih besar daripada bentuk glukosidanya.

Proses fermentasi edamame menjadi tempe menyebabkan peningkatan kadar isoflavon aglikon melalui perubahan isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglikon dan glukosa dengan adanya enzim  $\beta$ -glukosidase dari mikroorganisme. Edamame yang terfermentasi oleh *R. oligosporus* telah terbukti secara signifikan mengandung isoflavon aglikon yang lebih tinggi daripada edamame non fermentasi. Isoflavon aglikon merupakan bentuk isoflavon paling aktif dalam tubuh manusia, salah satunya yaitu daidzein. Edamame terfermentasi dimungkinkan mengandung isoflavon aglikon yang berpotensi sebagai penambah asupan estrogen untuk menurunkan efek menopause, khususnya mencegah PJK.



Pada penelitian ini akan dilakukan fermentasi edamame dengan *R. oligosporus*, optimasi kondisi analisis, validasi metode analisis dan penetapan kadar isoflavon aglikon daidzein.

Pembuatan ekstrak edamame dilakukan menggunakan metode ekstraksi ultrasonikasi dengan pelarut alkohol 70%. Sebelum diekstraksi edamame yang telah diinokulasi dengan *R. oligosporus* didefatting terlebih dahulu dengan soxhlet menggunakan *n*-heksana. Lalu ekstrak cair dipekatkan menggunakan rotavapour. Kemudian dilakukan optimasi kondisi analisis berupa optimasi eluen, optimasi panjang gelombang dan optimasi konsentrasi uji. Dilanjutkan dengan validasi metode yang berupa linieritas, LOD dan LOQ, selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi. Terakhir, ekstrak edamame non fermentasi dan edamame terfermentasi ditetapkan kadar daidzeinnya.

Pada penelitian ini, hasil rendemen ekstrak terbanyak diperoleh dari sampel H-4 sebesar 47,50 % dan yang terkecil diperoleh dari sampel H-0 sebesar 9,69 %. Kondisi optimum analisis daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* yaitu pelarut metanol p.a, fase diam berupa silika gel 60 F<sub>254</sub>, eluen berupa *n*-heksana: etil asetat: asam asetat (2:5:0,15), panjang gelombang 273 nm dan konsentrasi uji 80 µg/mL. Pengujian parameter validasi yang telah dilakukan, yaitu linieritas, LOD dan LOQ, selektivitas/ spesifisitas, presisi dan akurasi. Dapat diketahui bahwa metode analisis daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* valid, tetapi nilai resolusi pada parameter selektivitas kurang dari 1,5 sehingga perlu diperbaiki untuk penelitian selanjutnya.

Kadar daidzein menurun signifikan dengan adanya fermentasi pada hari pertama tetapi kadarnya meningkat pada hari kedua, ketiga dan secara signifikan pada hari keempat fermentasi. Besar nilai kadar daidzein dalam sampel ekstrak edamame H-0, H-1, H-2, H-3, dan H-4 secara berurutan yaitu  $0,0720 \pm 7,4 \times 10^{-3}$ ;  $0,0179 \pm 2,4 \times 10^{-3}$ ;  $0,0291 \pm 4,1 \times 10^{-3}$ ;  $0,0381 \pm 2,5 \times 10^{-3}$ ; dan  $0,0613 \pm 4 \times 10^{-4}$  %.

## PRAKATA

Bismillahirrohmanirohim

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max*) Terfermentasi Oleh *Rhizopus oligosporus* dengan KLT-Densitometri”. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada nabi Muhammad Shalallahu alaihi wassalam. Dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis menyadari dan mengakui bahwa upaya, doa, arahan, bimbingan dan dukungan dari keluarga maupun dosen pembimbing serta pihak-pihak lainnya yang sangat membantu dalam terselesaikannya skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, dengan sepuh hati penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari S. Si, M. Farm., Apt atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Ibu Endah Puspitasari, S. Farm., M. Sc., Apt selaku dosen ketua, Ibu Indah Yulia Ningsih selaku dosen anggota I, Ibu Dewi Dianasari, S. Farm., M. Farm., Apt selaku dosen anggota II, dan Bapak Bawon Triatmoko, S. Farm., M. Sc., Apt selaku dosen anggota III yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dan perhatiannya dalam membantu dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Ema Rachmawati, S. Farm., M. Sc., Apt selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswi;
4. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat selama masa kuliah;
5. Pimpinan dan para karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas bantuannya selama menempuh masa kuliah;

6. Orang tua tercinta, Ibu Lidya Noerma, SE dan Bapak Ir. Ainurrofiq, yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dorongan, motivasi, nasihat dan senantiasa mendampingi setiap langkah;
7. Mbah Sasmantri, Mbahuti Maimunah, Pakde Charis Mardiyanto, SH. MH., Tante Dr. Ir. Entin Hidayah, M. UM. dan Om dr. Ali Santosa, Sp. PD yang selalu memberikan doa, kasih sayang, nasihat dan pengorbanan demi kebahagiaan, keberhasilan serta kesuksesan;
8. Seluruh keluarga besar yang tidak dapat disebutkan satu persatu;
9. Rekan kerja dan sahabat seperjuangan Sutatik, Fanitika, Yogi, Ayu Maulida, Novita, Alfiatur, Rizka Illa, Hilda dan Finda yang telah memberikan semangat, kebersamaan, kekompakan dan bantuan selama ini;
10. Mbak Parka, Ibu Wayan, Mbak Hany dan Ibu Widi selaku teknisi laboratorium biologi dan kimia atas bantuannya;
11. Teman dan keluarga angkatan 2014 “Pharmagen” Gold Generation;
12. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas bantuan dan perhatiannya baik langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini;

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

Jember, 19 Juli 2018

Yang menyatakan

Adinda Nadia Naufalia

NIM 142210101079

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ivi</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR PERSAMAAN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Tinjauan tentang Edamame</b> .....	<b>5</b>
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Edamame.....	<b>5</b>
2.1.2 Deskripsi Varietas Tanaman Edamame .....	<b>5</b>
2.1.3 Morfologi Tanaman Edamame .....	<b>6</b>
2.1.4 Kandungan Kimia Edamame .....	<b>6</b>
2.1.5 Aktivitas Farmakologi Edamame yang Telah Diteliti .....	<b>7</b>
2.1.6 Isoflavon Aglikon Daidzein .....	<b>8</b>
<b>2.2 Tinjauan tentang Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon ..</b>	<b>9</b>

<b>2.3</b>	<b>Tinjauan tentang Validasi Metode Analisis .....</b>	<b>10</b>
2.3.1	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri.....	10
2.3.2	Optimasi Kondisi Analisis .....	11
2.3.3	Validasi Metode Analisis .....	12
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>17</b>
3.1.1	Jenis Penelitian.....	17
3.1.2	Tempat dan Waktu Penelitian .....	17
<b>3.2</b>	<b>Variabel Penelitian .....</b>	<b>17</b>
3.2.1	Variabel Bebas .....	17
3.2.2	Variabel Terikat .....	17
3.2.3	Variabel Terkendali.....	17
<b>3.3</b>	<b>Rancangan Penelitian.....</b>	<b>18</b>
3.3.1	Rancangan Operasional.....	18
3.3.2	Definisi Operasional.....	19
<b>3.4</b>	<b>Alat dan Bahan .....</b>	<b>19</b>
3.4.1	Bahan Penelitian.....	19
3.4.2	Alat Penelitian.....	19
<b>3.5</b>	<b>Prosedur Penelitian .....</b>	<b>19</b>
3.5.1	Preparasi Edamame Non Fermentasi .....	19
3.5.2	Peremajaan Isolat <i>R. oligosporus</i> .....	20
3.5.3	Pembuatan Suspensi Spora <i>R. oligosporus</i> .....	20
3.5.4	Perhitungan Kepadatan Spora .....	20
3.5.5	Preparasi Edamame Fermentasi <i>R. oligosporus</i> .....	21
3.5.6	Proses Penghilangan Lemak ( <i>Defatting</i> ).....	22
3.5.7	Pembuatan Ekstrak Edamame Non Fermentasi dan Fermentasi.....	22
3.5.8	Preparasi Optimasi Kondisi Analisis .....	22
3.5.9	Preparasi Validasi Metode Analisis .....	24
3.5.10	Penetapan Kadar Daidzein .....	27

<b>3.6</b>	<b>Analisis Data .....</b>	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Skema Pelaksanaan Penelitian.....</b>	<b>29</b>
3.7.1	Skema Pembuatan Ekstrak Edamame .....	29
3.7.2	Skema Optimasi Kondisi Analisis .....	30
3.7.3	Skema Validasi Metode Uji .....	30
3.7.4	Skema Penetapan Kadar Daidzein .....	31
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Karakterisasi Edamame .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Ekstraksi Daidzein Edamame .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Optimasi Kondisi Analisis .....</b>	<b>32</b>
4.3.1	Optimasi eluen .....	33
4.3.2	Optimasi panjang gelombang.....	35
4.3.3	Optimasi konsentrasi uji.....	35
<b>4.4</b>	<b>Validasi Metode .....</b>	<b>36</b>
4.4.1	Linieritas .....	36
4.4.2	LOD dan LOQ.....	37
4.4.3	Selektivitas/Spesifisitas.....	38
4.4.4	Presisi .....	41
4.4.5	Akurasi .....	42
<b>4.5</b>	<b>Penetapan Kadar Daidzein Dalam Ekstrak Edamame .....</b>	<b>43</b>
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran.....</b>	<b>49</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>51</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>56</b>

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman edamame.....	6
Gambar 2.2 Biji edamame.....	6
Gambar 2.3 Struktur daidzein .....	9
Gambar 3.1 Rancangan penelitian .....	18
Gambar 3.2 Kamar hitung hemositometer <i>Naubauer Improved</i> .....	21
Gambar 3.3 Skema pembuatan ekstrak edamame.....	29
Gambar 3.4 Skema optimasi kondisi analisis .....	30
Gambar 3.5 Skema validasi metode analisis.....	30
Gambar 3.6 Skema penetapan kadar daidzein .....	31
Gambar 4.1 Karakteristik edamame.....	32
Gambar 4.2 Spektra daidzein pada panjang gelombang 200-400 nm.....	35
Gambar 4.3 Kurva linieritas massa vs area daidzein .....	37
Gambar 4.4 Kurva Linieritas massa vs area LOD dan LOQ daidzein.....	38
Gambar 4.5 Kromatogram pemisahan daidzein.....	39
Gambar 4.6 Spektra uji <i>purity</i> daidzein .....	40
Gambar 4.7 Spektra uji <i>identity</i> daidzein.....	40
Gambar 4.8 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame terfermentasi.....	43
Gambar 4.9 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame non fermentasi.....	44
Gambar 4.10 Hasil penetapan kadar .....	45

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Konsentrasi analit berbanding RSD.....	16
Tabel 4.1 Karakteristik edamame .....	33
Tabel 4.2 Rendemen ekstrak.....	33
Tabel 4.3 Perbandingan komposisi optimasi eluen.....	34
Tabel 4.4 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram .....	36
Tabel 4.5 Kondisi optimum analisis daidzein.....	36
Tabel 4.6 Hasil uji linieritas daidzein .....	37
Tabel 4.7 Hasil pengujian linieritas pada uji LOD dan LOQ daidzein .....	38
Tabel 4.8 Korelasi spektra uji <i>purity</i> daidzein .....	40
Tabel 4.9 Korelasi spektra uji <i>identity</i> daidzein.....	40
Tabel 4.10 Hasil uji preisisi repeatabilitas daidzein.....	41
Tabel 4.11 Hasil uji preisisi antara daidzein .....	42
Tabel 4.12 Hasil uji akurasi daidzein.....	42



**DAFTAR PERSAMAAN**

	Halaman
Persamaan 2.1 Resolusi ( $R_s$ ).....	11
Persamaan 2.2 <i>Theoretical Plate Number</i> ( $N$ ).....	12
Persamaan 2.3 <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> (HETP atau $H$ ).....	12
Persamaan 2.4 $SD$ .....	13
Persamaan 2.5 $RSD$ .....	13
Persamaan 2.6 $CV$ .....	13
Persamaan 2.2 <i>Recovery</i> .....	16
Persamaan 3.1 Perhitungan spora .....	21
Persamaan 3.2 Perhitungan pengenceran suspensi spora.....	21

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran A.1 Data perhitungan kepadatan suspensi spora <i>R. oligosporus</i> .....	56
Lampiran A.2 Data pengenceran spora.....	56
Lampiran A.3 Data jumlah spora yang digunakan.....	56
Lampiran A.4 Data perhitungan rendemen ekstrak .....	57
Lampiran A.5 Data optimasi eluen .....	57
Lampiran A.6 Data pembuatan fase gerak.....	61
Lampiran A.7 Data optimasi konsentrasi uji.....	62
Lampiran A.8 Data pembuatan larutan standar .....	63
Lampiran A.9 Data pembuatan larutan sampel.....	64
Lampiran A.10 Data linieritas.....	64
Lampiran A.11 Data LOD dan LOQ.....	65
Lampiran A.12 Data selektivitas/spesifisitas .....	67
Lampiran A.13 Data presisi .....	67
Lampiran A.14 Data akurasi .....	71
Lampiran A.15 Data penetapan kadar.....	74
Lampiran B Hasil analisis statistik.....	76

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Jumlah penderita penyakit jantung koroner (PJK) semakin meningkat dari tahun ke tahun. Hingga saat ini penyakit tersebut masih menjadi salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia (Utari dkk., 2010). Dari hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) yang dilakukan pada tahun 2013 berdasarkan diagnosa dokter jumlah penderita PJK sebesar 0,5% sedangkan jumlah penderita gejala PJK sebesar 1,5% dari total penduduk (Ghani dkk., 2016). Wanita yang telah memasuki masa menopause menjadi salah satu individu yang berisiko terhadap PJK. Hal ini terjadi karena adanya penurunan produksi estrogen dalam tubuh (Utari dkk., 2010) dan telah diketahui hormon estrogen memiliki efek proteksi terhadap arterosklerosis (Susilo, 2015). Berdasarkan Sensus Penduduk tahun 2000, jumlah wanita yang memasuki masa menopause pada usia  $\pm$  50 tahun mencapai 7,6% dari total penduduk dan diperkirakan akan semakin meningkat pada tahun 2020 sebesar 11,5% dari total penduduk (Aprilia, 2007). Menurut diagnosa dokter jumlah penderita PJK pada wanita yang memasuki masa menopause sebesar 0,8% sedangkan jumlah penderita gejalanya sebesar 1,6% dari total penduduk (Riskesdas, 2013).

Untuk mengurangi risiko dari penurunan estrogen, diperlukan asupan estrogen dari luar tubuh. Dari beberapa penelitian, telah diketahui bahwa tanaman jenis kacang-kacangan dapat menambah asupan estrogen. Salah satunya yaitu kedelai (*Glycine max*) yang mengandung isoflavon tinggi (Praharini, 2015). Isoflavon ini merupakan senyawa tumbuhan yang berasal dari tanaman dengan struktur yang serupa dengan estrogen, memiliki afinitas untuk reseptor estrogen, menunjukkan aktivitas agonis estrogen dan estrogen-antagonis. Oleh karena itu, isoflavon ini juga disebut sebagai senyawa fitoestrogen (Amato dkk., 2012). Sebagian besar senyawa fitoestrogen dalam kedelai dalam bentuk glukosida.

Bentuk aktif dari glukosida adalah aglikon. Isoflavon aglikon memiliki aktivitas fitoestrogen yang lebih besar daripada bentuk glukosidanya (Chang, 2009).

Di Indonesia, kedelai merupakan tanaman yang populer. Kedelai dapat dikonsumsi secara langsung maupun diolah menjadi produk makanan tertentu. Salah satu varietas kedelai yang sangat diminati yaitu edamame. Edamame termasuk dalam varietas kedelai sayur yang dipanen ketika polongnya masih muda dan hijau. Edamame banyak ditanam di daerah Jember, sehingga menjadi tanaman konsumsi yang melimpah dan menarik digunakan sebagai obyek penelitian (Dewi, 2015).

Proses fermentasi edamame menjadi tempe menyebabkan peningkatan kadar isoflavon. Kandungan isoflavon akan meningkat dengan adanya enzim  $\beta$ -glukosidase dari mikroorganisme pada proses fermentasi (Punjaisee dkk., 2011), sehingga dapat mengubah isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglikon dan glukosa (Purwoko dkk., 2001). Isoflavon merupakan kelompok fenol heterosiklik yang terdiri dari bentuk glukosida (daidzin, genistin, glisitin), aglikon (genistein, daidzein, glisitein), asetilglukosida dan malonilglukosida (Huang dkk., 2010).

Tempe merupakan makanan tradisional Indonesia yang diproses melalui fermentasi. *Rhizopus oligosporus* merupakan spesies kapang yang banyak digunakan dalam proses produksi tempe di Indonesia. Kedelai yang terfermentasi oleh *R. oligosporus* telah terbukti secara signifikan mengandung isoflavon aglikon yang lebih tinggi daripada kedelai non fermentasi. Nilai kadar genistein kedelai non fermentasi dan terfermentasi hari ke-2, 3 dan 4 berturut-turut sebesar  $0,00952 \pm 0,00049$ ;  $0,09602 \pm 0,00053$ ;  $0,12147 \pm 0,0014$ ; dan  $0,11515 \pm 0,00425$  % (b/b) (Praharini, 2015). Isoflavon aglikon merupakan bentuk isoflavon paling aktif dalam tubuh manusia (Yunindarwati, 2015), salah satunya yaitu daidzein. Daidzein di dalam tubuh dapat menghasilkan produk metabolit aktif yang disebut equol. Dimana equol dapat meningkatkan aktivitas isoflavon karena afinitasnya yang lebih besar terhadap reseptor estrogen, memiliki sifat antiandrogenik yang unik dan aktivitas antioksidan yang besar (Pubchem, 2004a). Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian baru tentang isoflavon aglikon daidzein agar dapat diketahui manfaatnya bagi manusia.

Berdasarkan uraian di atas, edamame terfermentasi dimungkinkan mengandung isoflavon aglikon yang berpotensi sebagai penambah asupan estrogen untuk menurunkan efek menopause, khususnya mencegah PJK. Pada penelitian ini akan dilakukan fermentasi edamame dengan *R. oligosporus*, optimasi kondisi analisis, validasi metode analisis dan penetapan kadar isoflavon aglikon daidzein. Fermentasi edamame dengan *R. oligosporus* dilakukan karena terbukti memiliki kadar isoflavon yang lebih tinggi dibanding fermentasi edamame dengan *A. oryzae* (Purwoko, 2004). Dilakukan optimasi kondisi dan validasi metode analisis untuk mendapatkan kondisi analisis yang selektif, metode analisis yang dapat dipercaya dan hasil analisisnya mendekati kebenaran (Wulandari, 2011). Serta, alasan mengapa dipilih daidzein sebagai senyawa yang diteliti karena penelitian ini merupakan penelitian yang beranggotakan banyak orang, sehingga dibagi menjadi beberapa cabang dan terpilih daidzein untuk saya teliti.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka perumusan masalah yang didapat pada penelitian ini adalah:

- a. Bagaimanakah kondisi optimum penetapan kadar daidzein dalam ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* dengan metode KLT-densitometri?
- b. Bagaimanakah validitas metode uji kadar daidzein dalam ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* dengan metode KLT-densitometri?
- c. Bagaimanakah perbedaan kadar daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- a. Menentukan kondisi optimum penetapan kadar daidzein dalam ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* dengan metode KLT-densitometri.

- b. Menentukan validitas metode uji kadar daidzein dalam ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* dengan metode KLT-densitometri.
- c. Menentukan perbedaan kadar daidzein dalam ekstrak edamame yang non fermentasi dan edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus*.

### 1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapatkan dari penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi ilmiah mengenai validitas metode uji penetapan kadar daidzein dalam ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus*.
- b. Memberikan informasi ilmiah mengenai kadar daidzein dalam edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan tentang Edamame

#### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman Edamame

Klasifikasi tanaman edamame adalah sebagai berikut (USDA, 2003):

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

#### 2.1.2 Deskripsi Varietas Tanaman Edamame

Dasar-dasar penentuan varietas edamame adalah menurut umur, warna biji dan tipe batang. Edamame yang digunakan pada penelitian ini termasuk dalam edamame varietas SPM 1. Varietas ini banyak ditemukan di daerah Jember. Ciri-ciri dari varietas ini yaitu tinggi tanaman 45-55 cm, tipe tumbuh determinit, bentuk polong lekukan antar biji kelihatan, warna polong muda hijau, bentuk biji agak bulat, warna kulit biji muda hijau, warna hipokotil dan epikotil hijau (Gambar 2.1). Varietas ini dipanen untuk dikonsumsi saat berumur 63-68 hari dan dipanen untuk pembibitan pada umur 87-95 hari.



Gambar 2.1 Tanaman edamame (Dewi, 2015)

### 2.1.3 Morfologi Tanaman Edamame

Edamame merupakan tanaman semusim berupa semak rendah, tumbuh tegak dan berdaun lebat. Tinggi tanaman berkisar antara 30–50 cm, berdaun lebat dan dapat bercabang sedikit atau banyak bergantung varietas. Bunga edamame berbentuk kupu-kupu berwarna putih atau ungu. Bentuk bunga tersebut merupakan ciri-ciri tanaman yang termasuk dalam famili Fabaceae. Polong berbentuk bulat agak pipih berwarna hijau terang hingga hijau tua, biji yang telah tua berbentuk elips dengan warna coklat muda (Gambar 2.2). Edamame memiliki ukuran panjang polong 6–7 cm dengan jumlah biji antara 2-4 tiap polongnya (Kartini, 2015).



Gambar 2.2 Biji edamame (dokumentasi pribadi)

Batang edamame berbentuk bulat berwarna hijau kekuningan. Edamame memiliki warna bulu abu-abu, tekstur biji dan polong lembut, rasa agak manis, aroma sedap dan daya hasil polong muda 7–10 ton/ha (Dewi, 2015).

### 2.1.4 Kandungan Kimia Edamame

Edamame mengandung protein 40%, lemak (tanpa kolesterol) 20%, karbohidrat 33%, dan serat 6%. Edamame juga mengandung kalsium, zat besi, kalium, asam askorbat dan vitamin E (Widati dan Iteu, 2012). Kandungan utama



pada edamame yaitu isoflavon. Genistein dan daidzein merupakan dua komponen utama isoflavon pada edamame. Genistein dan daidzein merupakan antioksidan yang kuat (Mebrahtu dkk., 2004).

Hampir 90% kandungan total isoflavon terdapat di kotiledon dan sebagian kecil terdapat di hipokotil. Selain itu, kandungan total isoflavon paling tinggi saat dipanen pada awal kematangan biji. Alangkah baiknya bila ingin mendapatkan kandungan genistein dan daidzein yang tinggi bisa diperoleh saat biji mengalami pematangan awal (Kartini, 2015). Seratus gram edamame mengandung daidzein 20,43 mg; genistein 22,57 mg; glisitein 7,57 mg; dan total isoflavon sebanyak 48,95 mg (Bhagwat dkk., 2008).

#### 2.1.5 Aktivitas Farmakologi Edamame yang Telah Diteliti

Edamame merupakan salah satu jenis kedelai yang memiliki kandungan utama isoflavon. Penelitian yang dilakukan Chae dan Ha (2011) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kedelai terfermentasi dan non fermentasi memiliki aktivitas antioksidan dan *whitening agent* (pemutih kulit). Uji aktivitas hambatan *tirokinase* dari isoflavon aglikon genistein (*whitening agent*) yang dilakukan oleh Praharini (2015) menunjukkan bahwa kadar genistein dalam ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* sebanding dengan peningkatan dan penurunan aktivitas hambatan. Hal tersebut ditunjukkan melalui nilai  $IC_{50} \pm SD$  edamame non fermentasi dan edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* pada hari kedua, ketiga, dan keempat berturut-turut sebesar  $288,718 \pm 4,333$ ;  $223,400 \pm 1,004$ ;  $183,946 \pm 2,110$ ; dan  $196,490 \pm 4,868 \mu\text{g/mL}$ .

Senyawa turunan isoflavon yaitu 8,4'-trihidroksiisoflavon dan 7,3',4'-trihidroksiisoflavon memiliki hambatan tirokinase dengan  $IC_{50}$  sebesar  $11,21 \pm 0,8 \mu\text{M}$  dan  $5,23 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Senyawa turunan 6,7,4'-trihidroksiisoflavon yang merupakan metabolit dari glisitein dan daidzein merupakan komponen utama antioksidan dalam tempe. Senyawa tersebut memiliki aktivitas hambatan *tirokinase* dengan nilai  $IC_{50}$  0,009 mM (Chang dkk., 2005).

Selain itu, isoflavon memiliki fungsi sebagai fitoestrogen yang dapat mengurangi efek menopause (Amato dkk., 2012), mencegah osteoporosis

(Gallagher, 2007), penyakit kardiovaskular (Utari dkk., 2010), memperkuat sistem imun tubuh dan mengurangi risiko kanker (Kartini, 2015).

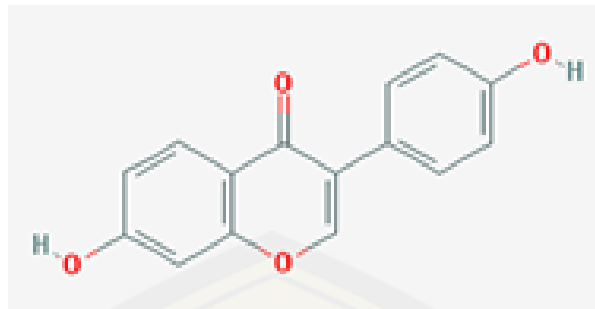
#### 2.1.6 Isoflavon Aglikon Daidzein

Isoflavon merupakan senyawa yang tergolong fitoestrogen, berasal dari bahan alam yang memiliki struktur yang sama dengan 17- $\beta$ -estradiol dan dapat berikatan dengan estrogen receptor (ESR). Isoflavon dapat disebut juga molekul seperti estrogen atau estrogen non-steroid (Yunindarwati, 2015).

Isoflavon terdiri atas struktur dasar C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, secara alami disintesis oleh tumbuh-tumbuhan dan senyawa asam amino aromatik fenilalanin atau tirosin. Isoflavon yang disintesis dari jalur fenilpropanoid yang menghasilkan semua senyawa flavonoid pada tumbuhan tingkat tinggi. Isoflavon banyak terdapat pada biji kedelai. Isoflavon kedelai merupakan flavonoid yang umumnya dapat diperoleh dari biji kedelai atau banyak pada famili Fabaceae (Dewi, 2015).

Isoflavon secara kimia dapat dikelompokkan berdasarkan gugus fungsinya, yaitu malonil glukosida (malonil genistin, malonil daidzin dan malonil glisitin); asetil glukosida (asetil genistin, asetil daidzin dan asetil glisitin); aglikon (genistein, daidzein dan glisitein) dan glukosida (genistin, daidzin dan glisitin) (Dhaubhadel dkk., 2011). Senyawa isoflavon biasanya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa gula membentuk isoflavon glukosida (Andersen dan Markham, 2006). Isoflavon dalam bentuk glukokonjugat ini memiliki aktivitas lebih rendah dibandingkan dengan bentuk aglikonnya (Chang, 2009). Isoflavon aglikon merupakan bentuk isoflavon paling aktif dalam tubuh manusia (Yunindarwati, 2015).

Daidzein adalah suatu biokimia difenolik yang memiliki struktur C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> dengan berat molekul 254.241 g/mol (Gambar 2.3). Daidzein memiliki produk aktif metabolit utama yang diproduksi melalui mikroflora spesifik dalam usus disebut equol. Equol dapat meningkatkan aktivitas isoflavon kedelai karena afinitasnya yang lebih besar untuk reseptor estrogen, memiliki sifat antiandrogenik yang unik dan superior serta aktivitas antioksidan yang besar (Pubchem, 2004a).



Gambar 2.3 Struktur daidzein (Pubchem, 2004a)

## 2.2 Tinjauan tentang Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon

Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. (Suprihatin, 2010). Fermentasi adalah salah satu cara untuk dapat meningkatkan jumlah isoflavon aglikon. Proses fermentasi pada edamame memiliki peranan penting dalam meningkatkan kadar isoflavon aglikon. Isoflavon dalam edamame mayoritas berbentuk glukosida. Isoflavon bentuk aglikon merupakan bentuk yang aktif dan memiliki efek fisiologis pada tubuh (Pandit dan Patravale, 2011). Proses peningkatan konsentrasi aglikon karena aktivitas mikroba dapat meningkatkan bioavailabilitas isoflavon aglikon dalam tubuh manusia (Haron dkk., 2009). Bentuk aglikon yang terdapat dalam edamame yaitu genistein, daidzein dan glisitein yang memiliki aktivitas mencegah menopause dini (Amato dkk., 2012).

Peningkatan jumlah isoflavon aglikon selama proses fermentasi terjadi akibat aktivitas enzim dari mikroorganisme yang disebut  $\beta$ -glukosidase (Punjaisee dkk., 2011).  $\beta$ -glukosidase merupakan enzim utama dalam metabolisme karbohidrat yang berlangsung di bakteri. Enzim ini memiliki peranan penting dalam proses biotransformasi, seperti degradasi selulosa, sianogenik glukosida dan perubahan flavonoid glukosida (Yunindarwati, 2015).  $\beta$ -glukosidase bekerja dengan dengan cara deglikosilasi isoflavon. Deglikosilasi merupakan proses penghilangan gugus glikosil akibat aktivitas glikosil hidrolase, seperti  $\beta$ -glukosidase. Isoflavon glukosida daidzin dengan adanya enzim  $\beta$ -glukosidase menghasilkan isoflavon aglikon daidzein dan glukosa. Enzim  $\beta$ -glukosidase dihasilkan *Rhizopus sp.* Enzim  $\beta$ -glukosidase bekerja optimum pada suhu 45°C

dan pH 7,5. Aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase *R. oligosporus* lebih besar dibanding *R. oryzae* dan *R. stolonifer* (Praharini, 2015).

Tempe yang dibuat dari kapang *R. oligosporus* memiliki aglikon (genistein dan daidzein) yang lebih tinggi dibanding dengan tempe dari kapang *A. oryzae*. Tempe hasil fermentasi *A. oryzae* menghasilkan isoflavon aglikon sekitar 300  $\mu\text{g/g}$ , sedangkan tempe hasil fermentasi *R. oligosporus* lebih tinggi sekitar 2 kali, dibanding *A. oryzae* (Purwoko, 2004).

## 2.3 Tinjauan tentang Validasi Metode Analisis

### 2.3.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri

Metode kromatografi merupakan metode analisis dengan prinsip fase gerak melewati sebuah fase diam sedemikian rupa sehingga campuran zat dipisahkan menjadi komponen-komponen. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan sebuah metode analisis campuran dengan cara pemisahan senyawa dalam suatu campuran berdasarkan pada perbedaan sifat fisika-kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang menyebabkan adanya perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen sehingga menyebabkan perbedaan kecepatan migrasi (Deinstrop, 2007).

Densitometri merupakan metode analisis instrumental dalam penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dan analit yang merupakan noda pada KLT. Interaksi REM dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi), dan fluoresensi dari radiasi semula. Penentuan kualitatif analit KLT Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai  $R_f$  analit dan  $R_f$  standar. Noda analit yang memiliki  $R_f$  yang sama dengan  $R_f$  standar diidentifikasi memiliki kemurnian yang tinggi yang dapat dibandingkan spektrum densitometri analit dan spektrum densitometri standarnya. Sedangkan penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit atau membandingkannya dengan densitas noda standar (Wulandari, 2011).

### 2.3.2 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisi analisis merupakan bagian dari studi prevalidasi dalam prosedur validasi analisis. Studi prevalidasi dilakukan untuk mendapatkan kondisi analisis yang selektif dengan mengevaluasi kestabilan larutan standar dan larutan sampel dalam pelarut terpilih. Tujuan dari optimasi kondisi analisis ini, yaitu untuk menghemat biaya, waktu dan tenaga; menghasilkan efisiensi pemisahan paling bagus dari sampel; memilih fase gerak dan fase diam; serta mendapatkan kecepatan eluasi optimum (Wulandari, 2011).

Efisiensi kromatogram dapat dilihat dari nilai Resolusi (Rs), *Theoretical Plate Number* (N) dan *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP atau H) (Kowalska dan Prus, 2003).

#### a. Resolusi (Rs)

Resolusi merupakan kemampuan proses kromatografi untuk memisahkan dua senyawa yang mirip. Keberadaan dua puncak dalam kromatogram menunjukkan tingkat resolusi. Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya lebih dari 1,5, karena semakin besar nilai resolusi semakin baik pemisahan yang terjadi antara analit dengan sampel. Sebaliknya, jika resolusi kromatografi lebih kecil dari 1,5, maka perlu dilakukan evaluasi kondisi analisis yang digunakan. Nilai resolusi dapat diukur dengan persamaan berikut (Wulandari, 2011):

$$R_s = \frac{2 \{ (Z)a - (Z)b \}}{W_a + W_b} \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.1}$$

Keterangan :

Rs = Pemisahan antara dua puncak kromatogram (zat a dan zat b)

(Z)a = Jarak migrasi zat a

(Z)b = Jarak migrasi zat b

W<sub>a</sub> = Lebar dasar puncak zat a

W<sub>b</sub> = Lebar dasar puncak zat b

#### b. *Theoretical Plate Number* (N)

*Theoretical Plate Number* (N) merupakan nilai pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam.

Semakin besar nilai N, maka semakin efisien kromatogramnya. *Theoretical Plate Number* (N) dapat diukur dengan persamaan sebagai berikut (Wulandari, 2011):

$$N = 16 \left[ \frac{Z_s}{W} \right]^2 \quad \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.2}$$

Keterangan :

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

Z<sub>s</sub> = Jarak migrasi analit

W = Lebar dasar puncak

c. *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP atau H)

*Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP atau H) merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. HETP atau H ini dapat diukur dengan persamaan sebagai berikut (Wulandari, 2011):

$$H = \frac{Z_f}{N} \quad \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.3}$$

Keterangan :

H = Jarak tempuh analit untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase diam dan fase gerak

Z<sub>f</sub> = Jarak migrasi fase gerak

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

### 2.3.3 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu proses penilaian terhadap parameter yang dilakukan melalui proses pengujian laboratorium untuk menunjukkan kinerja metode memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode analisis perlu dilakukan untuk mendapatkan suatu metode analisis yang dapat dipercaya dan hasil analisisnya mendekati kebenaran. Oleh karena itu, validasi merupakan langkah penting yang harus dilakukan untuk menentukan reabilitas dan reproduibilitas dari suatu metode karena dapat

mengetahui apakah suatu metode dapat dilakukan pada suatu sistem tertentu (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

a. Linieritas

Linieritas merupakan suatu kemampuan metode analisis untuk memberikan hasil pengukuran yang proposional terhadap konsentrasi analit dalam sampel, baik secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik (Harmita, 2004). Linieritas dinyatakan dengan kurva *ordinary least square* (OLS) atau kurva regresi linier sederhana dari respon alat sebagai fungsi dari peningkatan konsentrasi analit (Wulandari, 2011).

Untuk pengujian linieritas, direkomendasikan menggunakan 5-10 konsentrasi standar dengan kisaran setara dengan 80-120, 25-200 atau 50-150% dari konsentrasi uji. Untuk evaluasi linieritas, beberapa parameter dapat digunakan, seperti nilai standar deviasi (SD) dan koefisien korelasi (CV), nilai rata-rata, serta analisis varians (ANOVA) (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

Perhitungan CV secara matematik dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (n - ni) * 2}{N - 2}} \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.4}$$

$$RSD = \frac{SD}{b} \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.5}$$

$$CV = \frac{RSD}{\text{rata - rata konsentrasi uji}} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Persamaan 2.6}$$

b. LOD dan LOQ

LOD (*Low of Detection*) merupakan konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan. LOQ (*Low of Quantitation*) merupakan konsentrasi terkecil dari analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara cermat dan seksama (Harmita, 2004). Penentuan LOD dan LOQ dapat dilakukan dengan menggunakan 5-10 tingkat konsentrasi analit yang relatif rendah (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

Menurut ICH (*International Conference on Harmonization*) penentuan LOD dan LOQ dapat menggunakan empat cara yaitu:

- 1) Metode *Signal to Noise*, batas deteksi adalah konsentrasi yang menghasilkan puncak dengan ketinggian minimal 2-3 kali lebih tinggi dari noise.
  - 2) Metode Inspeksi Visual, batas deteksi ditentukan oleh analisis sampel yang berisi konsentrasi analit dan batas deteksi merupakan konsentrasi minimum dimana analit masih dapat dideteksi.
  - 3) Standar deviasi dari respon berdasarkan standar deviasi blanko, pengukuran besarnya respon latar belakang analisis dilakukan dengan menganalisis blanko serta menghitung standar deviasi dari respon blanko.
  - 4) Standar deviasi dari respon berdasarkan kemiripan kurva kalibrasi, sebuah kurva kalibrasi tertentu dievaluasi dengan menggunakan larutan yang mengandung analit dalam kisaran batas deteksi.
- c. Selektivitas/Spesifisitas

Suatu metode dikatakan spesifik jika metode tersebut hanya memberikan respon untuk suatu analit dan metode dikatakan selektif jika metode tersebut memberikan respon untuk beberapa senyawa kimia yang dapat dengan jelas dibedakan satu sama lain. Tujuan dilakukannya pengujian ini adalah untuk menunjukkan bahwa suatu metode tidak memberikan respon positif terhadap senyawa atau analit lain (Harmita, 2004).

Dalam teknik kromatografi, selektivitas dibuktikan dengan adanya pemisahan yang baik antara analit dengan senyawa-senyawa lain seperti matriks, pengotor, hasil degradasi dan metabolit. Selektivitas ditentukan melalui perhitungan nilai resolusi ( $R_s$ ). Nilai  $R_s$  antara analit dengan senyawa lain lebih baik jika lebih dari 1,5 ( $>1,5$ ). Bila  $R_s$  yang didapatkan kurang dari 1,5 ( $<1,5$ ) perlu dilakukan optimasi kembali dari kondisi analisis atau kondisi kromatografi yang dilakukan (Harmita, 2004). Parameter untuk mengetahui spesifisitas metode dapat ditentukan berdasarkan pengamatan identitas (*identity*) dan kemurnian (*purity*) analit dalam sampel. Uji kemurnian spektra diambil dari lereng puncak pertama berkorelasi dengan puncak maksimum spektra dan puncak maksimum



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

d. Presisi

Presisi atau keseksamaan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran homogen (Harmita, 2004). Penentuan presisi dapat dibagi menjadi tiga kategori, yaitu:

1) *Repeatability (intraassay within-day precision)*

*Repeatability (intraassay within-day precision)* ditentukan pada saat analisis dilakukan di satu laboratorium, oleh satu analis menggunakan satu peralatan dan dikerjakan dalam satu hari.

2) *Intermediate precision*

*Intermediate precision* didapatkan saat analisis dilakukan dalam satu laboratorium oleh analis yang berbeda selama beberapa hari atau minggu, menggunakan peralatan, reagen dan kolom yang berbeda.

3) *Reproducibility*

*Reproducibility* menunjukkan presisi dilakukan di laboratorium yang berbeda dengan tujuan untuk verifikasi bahwa metode tersebut memberikan hasil yang sama dengan menggunakan fasilitas yang berbeda.

e. Akurasi

Akurasi atau kecermatan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). *Recovery* diperoleh melalui pengukuran sejumlah analit yang diketahui kadarnya ditambahkan dalam sampel. Kecermatan dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

1) Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*)

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

Tabel 2.1 Konsentrasi analit berbanding RSD (Yuwono *et al*, 2005)

Analit (%)	Unit	RSD (%)
<b>100</b>	100%	1,3
<b>10</b>	10%	1,9
<b>1</b>	1%	2,7
<b>0,01</b>	0,10%	3,7
<b>0,001</b>	100 ppm	5,3
<b>0,0001</b>	10 ppm	7,3
<b>0,00001</b>	1 ppm	11
<b>0,000001</b>	100 ppb	15
<b>0,0000001</b>	10 ppb	21
<b>0,00000001</b>	1 ppb	30

2) Metode penambahan standar atau pembandingan (*standard addition method*)

Metode penambahan standar atau pembandingan yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Penambahan analit ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30-60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

Perhitungan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan rumus matematik pada Persamaan 2.7 :

$$\% Recovery = \frac{\text{Konsentrasi hasil percobaan}}{\text{Konsentrasi teoritis}} \times 100\%$$

..... Persamaan 2.7

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul sebagai akibat adanya perlakuan tertentu. Jenis penelitian eksperimental pada penelitian ini merupakan *true experimental laboratories* yaitu untuk mengetahui perbedaan kadar daidzein pada edamame non fermentasi dan fermentasi oleh *R. oligosporus*.

#### 3.1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Juli 2018 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

### 3.2 Variabel Penelitian

#### 3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu perlakuan pemberian inokulum dan waktu fermentasi pada edamame.

#### 3.2.2 Variabel Terikat

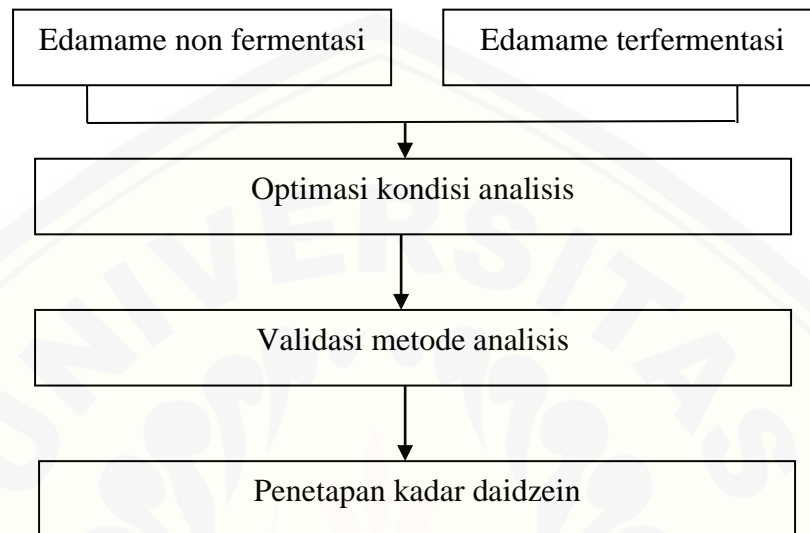
Variabel terikat pada penelitian ini yaitu kadar daidzein.

#### 3.2.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu suhu inkubasi fermentasi edamame, inokulum fermentasi yang digunakan seperti suspensi spora *R. oligosporus* yang mengandung  $10^6$  spora/mL.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Berikut merupakan skema rancangan penelitian validasi dan pengaruh fermentasi *R. oligosporus* terhadap kadar daidzein pada edamame dengan metode klt-densitometri:



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut :

- a. Preparasi sampel edamame non fermentasi.
- b. Pembuatan suspensi spora *R. oligosporus* yang mengandung  $10^6$  spora/mL.
- c. Preparasi sampel edamame fermentasi dengan *R. oligosporus*.
- d. Ekstraksi simplisia kedelai dengan pelarut etanol 70%.
- e. Preparasi optimasi kondisi analisis kadar daidzein dalam sampel edamame.
- f. Preparasi validasi metode analisis kadar daidzein dalam sampel edamame.
- g. Penentuan kadar daidzein dari ekstrak edamame non fermentasi dan fermentasi oleh *R. oligosporus*.

### 3.3.2 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut :

- a. Edamame yang digunakan adalah jenis kedelai varietas SPM 1 yang diperoleh dari PT. Mitratani Dua Tujuh, ditanam di daerah Jember dan dipanen pada umur 63-68 hari setelah tanam (hst).
- b. Isolat *R. oligosporus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- c. H-0 merupakan simbol dari ekstrak kental edamame non fermentasi yang digunakan sebagai kontrol.
- d. H-1, H-2, H-3 dan H-4 merupakan simbol dari sampel ekstrak kental edamame yang telah terfermentasi oleh *R. oligosporus* berturut-turut selama 1, 2, 3, dan 4 hari.

## 3.4 Alat dan Bahan

### 3.4.1 Bahan Penelitian

Edamame (kedelai varietas SPM 1), isolat *R. oligosporus*, tween 80, *n*-heksana teknis, etanol teknis 70%, standar daidzein (Sigma Aldrich), metanol p.a (Fluka), etil asetat (Fluka), toluen (Smartlab), aseton (Fluka), asam format (Merck), DMSO (Fluka), silika gel 60 F254, blue tip, white tip, akuades.

### 3.4.2 Alat Penelitian

Alat gelas, timbangan analitik digital, *laminar air flow* (Airtech), autoklaf (ALP), mikroskop (Olympus BX53), haemositometer (*Neubaner Improved*), mikropipet (Serana), oven (Menmert), blender, soxhlet, ultrasonikator (Elmasonic), *sentrifuge* (Hermle), *rotary evaporator* (Heildoph), chamber KLT, kromatografi lapis tipis (KLT) densitometer (TLC-Scanner 3 Camag).

## 3.5 Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Preparasi Edamame Non Fermentasi

Sebanyak 1 kg edamame segar dicuci kemudian direndam dengan air panas hingga dingin. Kemudian, kulit luar dan kulit ari edamame dikupas. Lalu edamame disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan. Setelah itu, edamame dikeringkan menggunakan oven suhu 60°C

selama 24 jam. Edamame kering diserbuk menggunakan blender dan ditimbang untuk proses selanjutnya (Lee dkk., 2008).

### 3.5.2 Peremajaan Isolat *R. oligosporus*

Isolat *R. oligosporus* diremajakan dengan memindahkannya sebanyak dua ose dari tabung ke dalam *potato dextrose agar* (PDA) miring. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ) selama 3 hari (Lee dkk., 2008).

### 3.5.3 Pembuatan Suspensi Spora *R. oligosporus*

Proses pembuatan suspensi spora *R. oligosporus* dilakukan dibawah *laminar air flow* (LAF). Suspensi spora *R. oligosporus* dibuat dengan memipet campuran 10% Tween 80 dalam 10 mL akuades dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terdapat *R. oligosporus* pada media PDA miring. Spora *R. oligosporus* diambil dengan mengeruk menggunakan ose steril secara perlahan (jangan sampai media ikut terangkat). Spora yang telah diambil diresuspensi menggunakan mikropipet dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril. Prosedur tersebut diulang beberapa kali hingga didapatkan suspensi sebanyak 10 mL. Suspensi spora tersebut kemudian divorteks agar homogen untuk proses selanjutnya (Lee dkk., 2008).

### 3.5.4 Perhitungan Kepadatan Spora

Perhitungan kepadatan spora diperlukan untuk mengontrol jumlah spora yang akan diinokulasikan, guna menghasilkan fermentasi yang optimal. Kepadatan spora hasil pengenceran *R. oligosporus* dihitung dengan menggunakan alat hemositometer. Suspensi yang akan digunakan sebagai inokulum kedelai yaitu suspensi yang mengandung kepadatan sebesar  $10^6$  spora/mL (Cheng dkk., 2013).

Untuk menghitung spora dengan hemositometer dilakukan dengan menggunakan kamar hitung eritrosit *Neubaner Improved*. Langkah-langkah perhitungan menggunakan hemositometer adalah sebagai berikut:

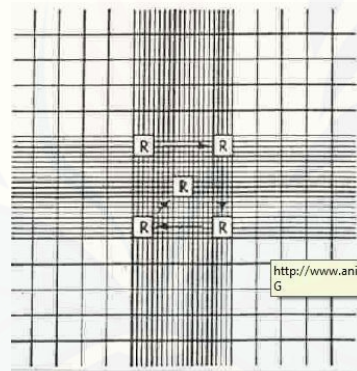
- a. Suspensi spora yang telah divortex ditetaskan sebanyak satu tetes pada bidang hitung hemositometer yang sudah ditutup dengan cover glass melalui tepi kamar hitung.

- b. Perhitungan spora dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400X. Spora yang dihitung terletak pada kotak hitung (1+2+3+4+5). Perhitungan spora hanya dilakukan pada daerah yang ditentukan pada Gambar 3.2.
- c. Perhitungan spora dilakukan dengan cara seperti Gambar 3.2 yaitu dari kiri kekanan dan dibawahnya dimulai dari kanan ke kiri.
- d. Jumlah spora yang diperoleh dihitung dengan menggunakan rumus :

$$N = [x / \{t \text{ (mm)} \times d \times l \text{ (mm}^2)\}] \times 10^3 \dots\dots\dots \text{Persamaan 3.1}$$

Keterangan :

- N : Jumlah spora/mL
  - X : Jumlah spora yang dihitung (1+2+3+selanjutnya)
  - t : Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)
  - d : Faktor pengenceran
  - l : Luas kotak hitung (0,04 X 5 = 0,2 mm<sup>2</sup>)
  - 10<sup>3</sup> : Volume suspensi yang diambil (1mL = 10<sup>3</sup> mm<sup>3</sup>)
- (Tim QC APH Golongan Jamur, 2009)



Gambar 3.2 Kamar hitung hemositometer *Naubauer Improved* (Hansen, 2000)

Bila suspensi spora yang didapatkan memiliki kepadatan lebih dari 1 X 10<sup>6</sup> spora/mL, maka dapat dilakukan pengenceran dengan rumus :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2 \dots\dots\dots \text{Persamaan 3.2}$$

Keterangan :

- N1 : Konsentrasi larutan stock (spora/mL)
- N2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan (spora/mL)
- V1 : Volume larutan stock (mL)
- V2 : Volume larutan yang diinginkan (mL)

3.5.5 Preparasi Edamame Fermentasi *R. oligosporus*

Sebanyak 1 kg edamame dicuci kemudian direndam dengan air panas hingga dingin. Kemudian, kulit luar dan kulit ari edamame dikupas. Lalu

edamame disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan. Fermentasi dilakukan dengan menambah 10 mL suspensi spora yang mengandung  $10^6$  spora/mL kedalam 50 gram edamame matang. Setelah dicampur, edamame dibungkus dengan kertas saring. Selanjutnya diinkubasi selama 1, 2, 3, dan 4 hari pada suhu 30°C RH 95% dan didapatkan edamame fermentasi padat (*Solid-state fermentation*). Setelah diinkubasi, edamame diiris tipis dan dikeringkan menggunakan oven suhu 60°C. Edamame kering diserbuk menggunakan blender dan ditimbang untuk proses selanjutnya (Lee dkk., 2008).

#### 3.5.6 Proses Penghilangan Lemak (*Defatting*)

Dilakukan proses penghilangan lemak pada serbuk edamame menggunakan soxhlet dengan pelarut *n*-heksana perbandingan 1:5. Sebanyak 40 gram dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam timbel soxhlet. Kemudian dilakukan proses penghilangan lemak selama 3 jam. Lalu, serbuk edamame diambil kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama satu malam dan ditimbang untuk proses selanjutnya (Hui dkk., 2005).

#### 3.5.7 Pembuatan Ekstrak Edamame Non Fermentasi dan Fermentasi

Serbuk edamame bebas lemak diekstraksi dengan ultrasonik menggunakan pelarut etanol 70% selama 1 jam dengan perbandingan 1:6 (Hui dkk., 2005). Kemudian ditutup dengan aluminium foil. Setelah 1 jam ekstraksi berlangsung ekstrak diendapkan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Supernatan diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etanol 70% baru dan diulang 3 kali. Supernatan hasil *sentrifuge* dikumpulkan pada suatu wadah tertutup, dipisahkan dengan *rotary evaporator* dan digunakan proses selanjutnya (Luthria dkk., 2007)

#### 3.5.8 Preparasi Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisis analisis diawali dengan preparasi larutan standar dan daidzein. Preparasi larutan standar dilakukan dengan membuat larutan induk dengan melarutkan 10 mg daidzein dalam 5 mL metanol p.a hingga didapat konsentrasi sebesar 2000 µg/mL. Preparasi sampel dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,5 gram ekstrak kental edamame dan dilarutkan dalam 5 mL metanol



p.a. Kemudian diultrasonik hingga larut. Larutan yang mengandung daidzein dianalisis dengan eluen terpilih (Kusumawati, 2015).

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi optimasi fase gerak/eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji analit.

a. Optimasi Eluen

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, eluen yang digunakan untuk optimasi eluen dengan komposisi sebagai berikut:

*n*-heksana : etil asetat = 0,5 : 5

*n*-heksana : etil asetat = 1 : 5

*n*-heksana : etil asetat = 2 : 5

*n*-heksana : etil asetat : asam asetat = 2 : 5 : 0,15

*n*-heksana : etil asetat = 0,5 : 5

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<sub>f</sub>* (*Retardation factor*) antara 0,2-0,8 dan menghasilkan kromatogram dengan satu puncak yang simetris (Wulandari, 2011).

b. Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan scanning noda analit pada Camag *TLC scanner* (Densitometri) dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 200-700 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi.

c. Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji dilakukan pemilihan konsentrasi uji 80, 100, dan 120 µg/mL. Pemilihan ini didasarkan pada hasil optimasi yang menunjukkan perkiraan kandungan daidzein pada ekstrak edamame yang terbilang kecil. Dengan demikian untuk mempermudah preparasi sampel, konsentrasi uji yang digunakan untuk optimasi adalah tingkat konsentrasi yang rendah.

Prosedur optimasi :

Larutan standar daidzein dibuat dengan melarutkan daidzein dalam metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi yang akan dioptimasi. Sedangkan untuk larutan sampel dibuat dengan cara menimbang sejumlah tertentu sampel kemudian dilarutkan dalam metanol p.a sehingga larutan mengandung daidzein dengan konsentrasi sesuai dengan yang akan dioptimasi. Kemudian masing-masing larutan dimasukkan ke dalam vial. Setelah itu larutan standar dan sampel ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel 60 F<sub>254</sub> masing-masing 2 µL dengan pipa kapiler. Setelah penotolan selesai, lempeng diangin-anginkan untuk menguapkan pelarut.

Eluen dipreparasi dengan komposisi sesuai dengan hasil optimasi kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi kertas saring lalu *chamber* ditutup dan dibiarkan hingga jenuh (kertas saring terbasahi semua). Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Kemudian lempeng diangin-anginkan sampai kering lalu noda yang terbentuk *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Penilaian konsentrasi analit yang paling optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N yang paling besar, nilai H terkecil serta kemudahan dalam preparasi sampel.

### 3.5.9 Preparasi Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis penentuan kadar daidzein dalam ekstrak edamame dengan KLT Densitometri meliputi berbagai parameter yaitu linieritas, LOD dan LOQ, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

#### a. Linieritas

Membuat larutan standar daidzein dalam metanol p.a dengan 6 tingkat konsentrasi dalam rentang 25-200% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Larutan standar dibuat dengan menimbang sejumlah tertentu standar daidzein dan dilarutkan dengan metanol p.a di dalam labu ukur, lalu diencerkan sejumlah tertentu sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan. Larutan standar yang telah dibuat dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT Silika Gel 60 F<sub>254</sub> masing-masing 6 µL dengan pipa kapiler. Setelah penotolan selesai, lempeng diangin-anginkan untuk menguapkan pelarut.

Eluen dipreparasi dengan komposisi sesuai dengan hasil optimasi, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi kertas saring lalu *chamber* ditutup dan dibiarkan hingga jenuh (kertas saring terbasahi semua). Lempeng KLT yang telah ditotol dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dan ditunggu hingga eluasi mencapai tanda batas. Kemudian lempeng diangin-anginkan sampai kering lalu noda yang terbentuk *discanning* pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter linieritas dari data hasil *scanning* dengan program *validation method of analysis*. Kriteria penerimaan (*Acceptance Criteria*) suatu metode dikatakan linier jika koefisien korelasi ( $r \geq 0,99$ ; Koefisien variasi fungsi ( $V_{xo}$ )  $< 5\%$  serta nilai  $X_p$  lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

b. LOD dan LOQ

Penentuan LOD dan LOQ dilakukan dengan membuat larutan standar daidzein dalam metanol p.a dengan 5 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 subbab linieritas. 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

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi yang didapatkan dari hasil optimasi konsentrasi uji. Kemudian membuat larutan sampel dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi konsentrasi uji. Preparasi dan penotolan larutan standar, preparasi eluen, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada subbab linieritas. Selanjutnya kromatogram daidzein yang terbentuk diamati dan dicek spektra *purity* dan *identity* puncak standar dan sampelnya. Pada kromatogram sampel, dihitung Resolusi puncak daidzein terhadap puncak yang lain (*unknown*). Syaratnya yaitu nilai  $R_s > 1,5$  (Harmita, 2004).

d. Presisi

Parameter presisi yang dilakukan meliputi *repeatability* dan *intermediet precision*. Uji presisi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kurva baku pada 6 tingkat konsentrasi antara 80-180% dari konsentrasi uji hasil optimasi. Kemudian dilakukan preparasi 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 subbab linieritas. Prosedur di atas dilakukan sebanyak tiga kali pada tiga hari yang berbeda untuk menentukan *intermediet precision* (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 studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan (Kusumawati, 2015).

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 analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi dan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas. Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a (tidak sampai tanda batas). Selanjutnya dilakukan adisi dengan larutan standar dengan konsentrasi 30, 45, dan 60% dari konsentrasi analit yang terkandung dalam sejumlah sampel yang ditimbang. 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, penjenuhan *chamber*, eluasi, pengeringan dan *scanning* lempeng dilakukan seperti yang telah dijelaskan pada subbab linieritas. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter akurasi dari data hasil *scanning* dengan program *validation method of*

*analysis*. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD dan berada pada rentang yang sesuai dengan konsentrasi yang digunakan (Wulandari, 2011).

#### 3.5.10 Penetapan Kadar Daidzein

Kadar isoflavon aglikon daidzein yang terdapat pada masing-masing ekstrak edamame dapat ditentukan menggunakan metode KLT-densitometri (Sari, 2015).

##### a. Pembuatan Standar Uji

Larutan standar induk daidzein dibuat dengan cara melarutkan 10 mg serbuk standar daidzein dengan 5 mL pelarut metanol p.a, sehingga diperoleh konsentrasi 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan standar induk daidzein diencerkan dengan memipet 1 ml larutan standar induk 2000  $\mu\text{g/mL}$  dan ditambah dengan pelarut metanol p.a ad 5 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 400  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan standar induk daidzein diencerkan dengan memipet 1 ml larutan standar induk 2000  $\mu\text{g/mL}$  dan ditambah dengan pelarut metanol p.a ad 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$ . Kemudian, larutan standar 400 dan 200  $\mu\text{g/mL}$  diencerkan kembali, sehingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi 10, 20, 50, 70, 90 dan 100  $\mu\text{g/mL}$ . Perhitungan pembuatan standar uji dapat dilihat pada lampiran.

##### b. Pembuatan Sampel Uji

Ditimbang masing-masing ekstrak kental  $\pm 400$  mg dan dilarutkan dalam 5 ml pelarut metanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$ .

##### c. Kondisi Analisis

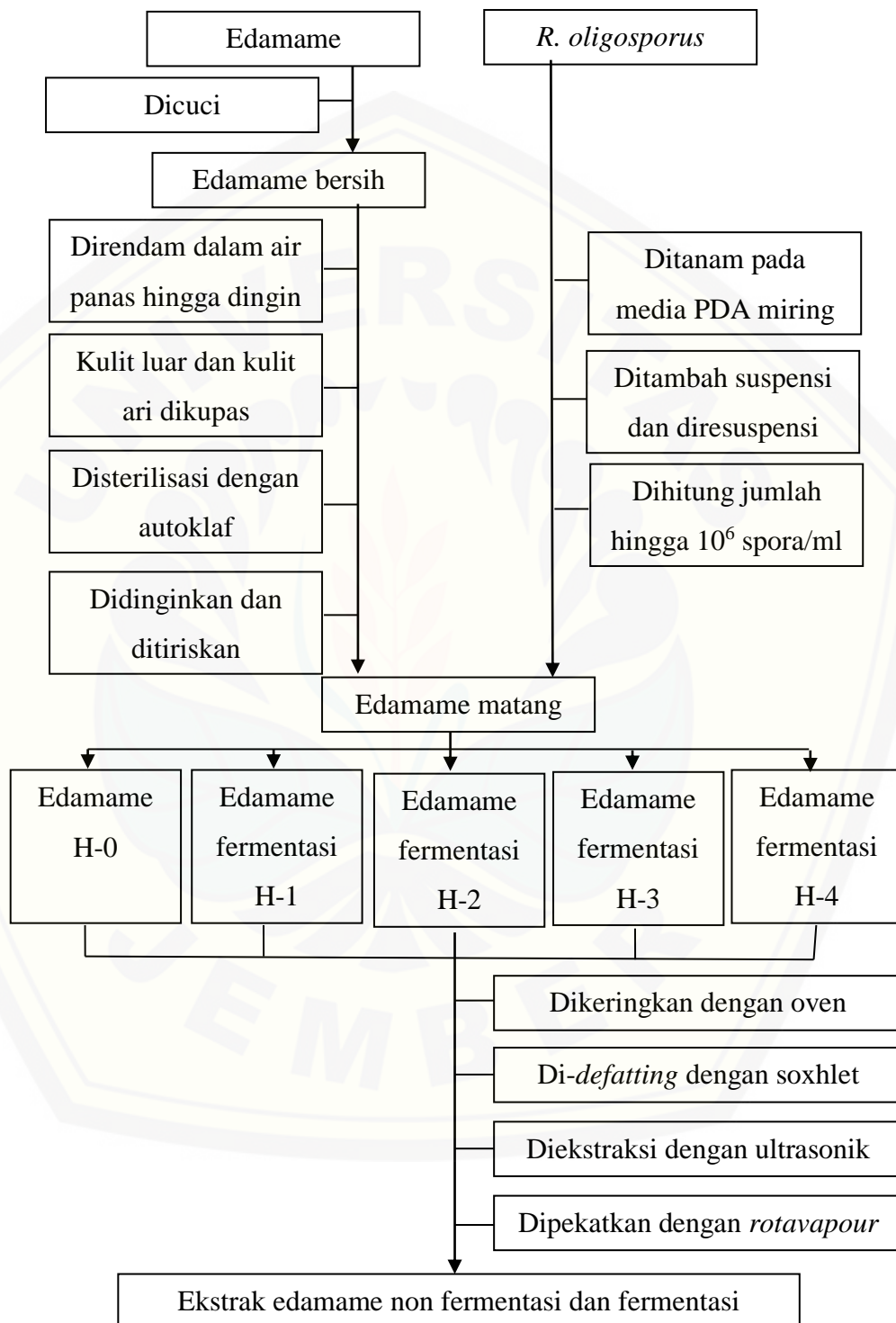
Fase diam yang digunakan yaitu lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) silika gel GF<sub>254</sub> dan sebagai fase gerak digunakan toluen-etil asetat-aseton-asam formiat (20:4:2:1). Perhitungan komposisi fase gerak dapat dilihat pada lampiran. Penotolan dilakukan dengan menggunakan pipa kapiler dengan volume masing-masing standar dan sampel sebanyak 2  $\mu\text{L}$ . Noda yang terbentuk diamati dibawah lampu UV 254 nm dan untuk selanjutnya di-*scanning* dengan menggunakan densitometer.

### 3.6 Analisis Data

Data kadar daidzein yang telah diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *one way ANOVA*. Analisis *one way ANOVA* dilakukan untuk melihat perbedaan kadar daidzein dari 2 atau lebih kelompok. Beberapa asumsi yang harus terpenuhi pada uji ANOVA, yaitu sampel berasal dari kelompok yang independen, varian antar kelompok harus homogen dan data dari masing-masing kelompok terdistribusi normal. Jika pada uji ANOVA nilai varian dari masing-masing kelompok masih berbeda harus dilakukan uji homogenitas varian yang hasilnya memperlihatkan bahwa *p-value* (sig.) lebih besar dari nilai  $\alpha = 0,05$  dengan arti varian antar kelompok sama. Jika varian tidak sama, maka uji ANOVA tidak valid. Jika uji *one way ANOVA* menunjukkan hasil yang berbeda signifikan, maka dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc least significant difference* (LSD). Hasil uji *one way ANOVA* dan LSD dikatakan signifikan, jika diperoleh nilai  $p < 0,01$ . Jika sebaran data tidak normal, maka dilakukan transformasi data sehingga diperoleh hasil transformasi dengan sebaran yang normal. Jika asumsi tersebut tidak terpenuhi, maka dapat dilakukan transformasi data. Apabila proses transformasi tidak juga dapat memenuhi asumsi, maka uji ANOVA tidak valid untuk dilakukan, sehingga harus menggunakan uji non-parametrik seperti Kruskal Wallis (Besral, 2010).

### 3.7 Skema Pelaksanaan Penelitian

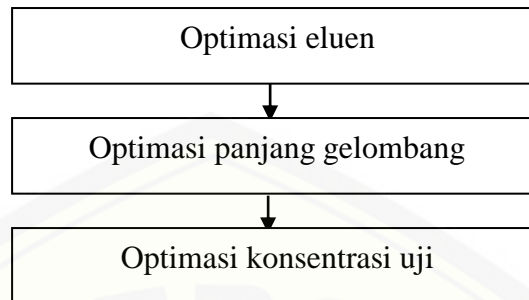
#### 3.7.1 Skema Pembuatan Ekstrak Edamame



Gambar 3.3 Skema pembuatan ekstrak edamame

### 3.7.2 Skema Optimasi Kondisi Analisis

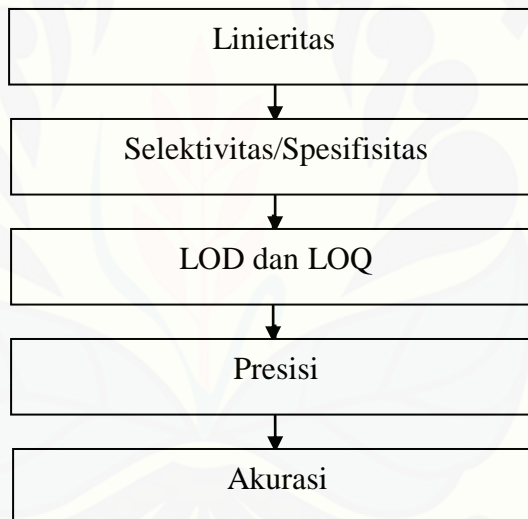
Berikut merupakan skema optimasi kondisi analisis :



Gambar 3.4 Skema optimasi kondisi analisis

### 3.7.3 Skema Validasi Metode Uji

Berikut merupakan skema validasi metode uji :

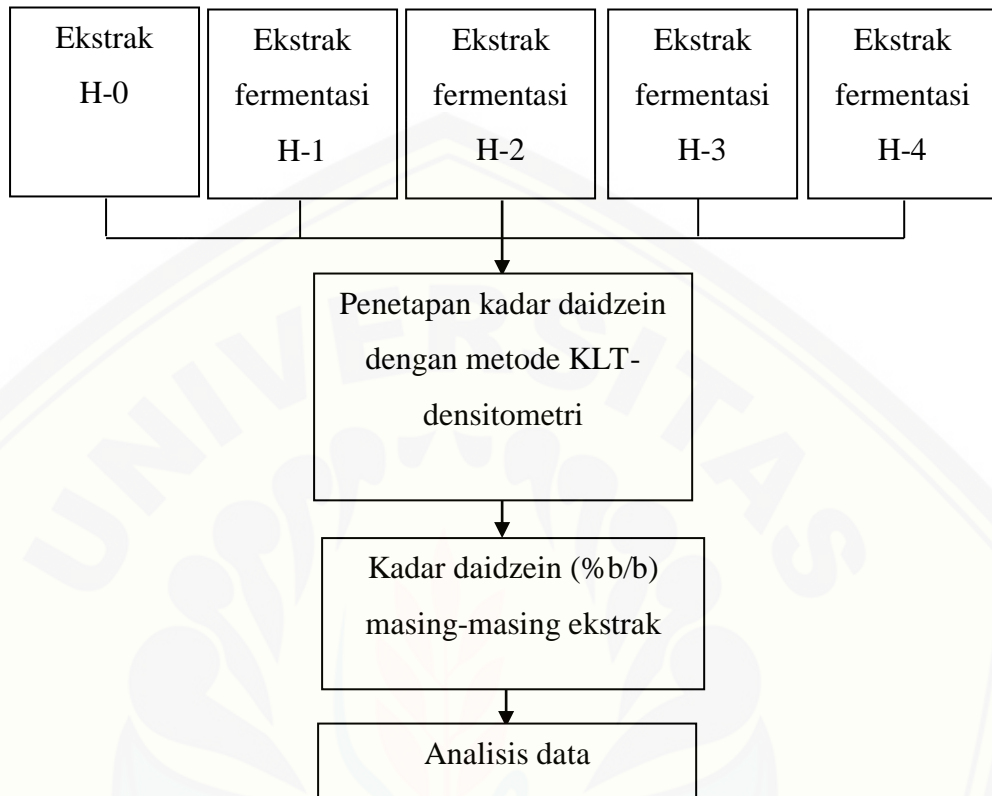


Gambar 3.5 Skema validasi metode analisis



### 3.7.4 Skema Penetapan Kadar Daidzein

Berikut merupakan skema penetapan kadar daidzein :



Gambar 3.6 Skema penetapan kadar daidzein

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berikut merupakan hal yang dapat disimpulkan dari penelitian ini:

- a. Kondisi optimum analisis daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan ekstrak edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* yaitu pelarut metanol p.a, fase diam berupa silika gel 60 F<sub>254</sub>, eluen berupa *n*-heksana: etil asetat: asam asetat (2:5:0,15), panjang gelombang 273 nm dan konsentrasi uji 80 µg/mL.
- b. Berdasarkan hasil pengujian parameter validasi yang telah dilakukan, yaitu linieritas, LOD dan LOQ, selektivitas/ spesifisitas, presisi dan akurasi, dapat disimpulkan bahwa metode analisis daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* valid, tetapi nilai resolusi pada parameter selektivitas kurang dari 1,5 sehingga perlu diperbaiki untuk penelitian selanjutnya.
- c. Kadar daidzein menurun signifikan dengan adanya fermentasi pada hari pertama tetapi kadarnya meningkat pada hari kedua, ketiga dan secara signifikan pada hari keempat fermentasi. Besar nilai kadar daidzein dalam sampel ekstrak edamame H-0, H-1, H-2, H-3, dan H-4 secara berurutan yaitu  $0,0720 \pm 7,4 \times 10^{-3}$ ;  $0,0179 \pm 2,4 \times 10^{-3}$ ;  $0,0291 \pm 4,1 \times 10^{-3}$ ;  $0,0381 \pm 2,5 \times 10^{-3}$ ; dan  $0,0613 \pm 4 \times 10^{-4}$ %.

### 5.2 Saran

Saran yang perlu disampaikan pada penelitian ini adalah:

- a. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai eluen yang digunakan untuk memisahkan isoflavon aglikon yang lebih baik pada ekstrak edamame non fermentasi dan edamame terfermentasi oleh *R. oligosporus* agar didapatkan nilai resolusi pada parameter selektivitas yang memenuhi persyaratan yaitu lebih dari 1,5.

- b. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak edamame terfermentasi hari kelima, keenam dan selanjutnya untuk mengetahui peningkatan kadar daidzein.
- c. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme penurunan kadar daidzein dalam ekstrak edamame terfermentasi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Amato, M. P., R. L. Young, F. M. Steinberg, M. J. Murray, R. D. Lewis, M. A. Cramer, S. Barnes, K. J. Ellis, R. J. Shypailo, J. K. Fralae, K. L. Konzelman, J. G. Fischer, C. LaSalle, E. O. Smith, dan W. W. Wong. 2012. Effect of soy isoflavone supplementation on menopausal quality of life. *Menopause : The Journal of The North American Menopause Society*. 20(4):443-447.
- Andersen, M., dan K. R. Markham. 2006. *Flavonoids*. New York: Taylor & Francis Group.
- Aprilia. 2007. Faktor yang mempengaruhi tingkat kecemasan pada wanita perimenopause. *The Indonesian Journal of Public Health*. 4(1):35-42.
- Besral. 2010. *Pengolahan dan Analisis Data-I Menggunakan SPSS*. Depok: Universitas Indonesia.
- Bhagwat S., D. B. Haytowitz, dan J. M. Holden. 2008. USDA Database for The Isoflavone Content of Selected Foods, Release 2.0 U.S. *Departement of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory*. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/isoflav> [Diakses pada 19 Februari 2018].
- Chae, G. Y. dan Ha, B. J. 2011. The comparative evaluation of fermented and non-fermented soybean extract on antioxidation and whitening. *Toxicology Research*. 27(40):205-209.
- Chang, T. S. 2009. An update review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(2009):2440-2475.
- Chang, T. S., H. Y. Ding, dan H. C. Lin. 2005. Identifying 6,7,4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase Inhibitor. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*. 69(10):1999-2001.
- Cheng, K. C., J. Y. Wu, dan J. T. Lin. 2013. Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solide-state fermentation with *Rhizopus* spp. *Euro Food Res. Technol*. 236(2013):1107-1113.
- Deinstrop, E. H. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography : Best Practice and Avoidance of Mistakes*. 2nd ed. Germany: Wiley-VCH.

- Dewi, E. N. A. 2015. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirokinase Edamame. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Dhaubhadel, S. 2011. Regulation of isoflavonoid biosynthesis in soybean seeds in ng, t.-b. (ed) – soybean. *Biochemistry, Chemistry and Physiology, InTech, Open Access Publisher*. 15(2011):243-258.
- Gallagher, J. C. 200. Effect of early menopause on bone mineral density and fracture. *Menopause : The Journal of The North American Menopausal Society*. 14(3):567-571.
- Ghani, L., M. D. Susilawati, dan H. Novriani. 2016. Faktor risiko doinan penyakit jantung koroner di indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 44(3):153-164.
- 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):117-235.
- Haron, H., A. Ismail, A. Azlan, S. Shahar, dan L. S. Peng. 2009. Daidzein and genistein content in tempe and selected soy product. *Food Chem*. 115(2009):1350-1356.
- Huang, C. C., B. Y. Hsu dan C. F. Hung. 2010. Anti-photoaging effect of soy isoflavone extract (aglycone and acetylglucoside form) from soybean cake. *Int. J. Mol. Sci*. 11(12):4782-4795.
- Hui, M., Q. Tiansheng, dan Z. Hai. 2005. Methodes for Extracting, Separating, Identifying and Quantifying Daidzein and Genistein. *Chinese Journal of Applies and Environmental Biology*. 03. [http://en.enki.com/en/Article\\_en/CJFDTOTAL-YYHS200503007.htm](http://en.enki.com/en/Article_en/CJFDTOTAL-YYHS200503007.htm) [Diakses pada 27 Februari 2018].
- Imansari, F. 2018. Validasi Metode dan Pengaruh Fermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max L.*) Menggunakan KLT-Densitometri. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Indrayanto, G. dan M. Yuwono. 2003. *Validation of TLC Analysis in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kartini, F. D. 2015. Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirokinase Edamame (*Glycine max*) In Vitro. *Skripsi*. Universitas Jember.

- Kowalska, T. dan W. Prus. 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*. Universitas Jember.
- Lee, I. H., Y. H. Hung, dan C. C. Chou. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and antocyanin contents of black bean. *International Journal of Microbiology*. 121(2008):150-156.
- Luthria, D. L., R. Biswas, dan S. Natarajan. 2007. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*. 105(2007):325-333.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Novitasari, D. 2018. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Kadar Genistein Ekstrak Edamame (*Glycine max L. Merrill*) Terfermentasi *Rhizopus oligosporus* Dengan Metode KLT-Densitometri. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Pandit, N. T., dan V. B. Patravale. 2011. Design and optimization of a novel method for extraction of genistein. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3(2):184-192.
- Praharini, S. R. 2015. Pengaruh Fermentasi *Rhizopus oligosporus* terhadap Kadar Isoflavon Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirokinase Kedelai (*Glycine max.*) In Vitro. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Pubchem. 2004a. DAIDZEIN.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/daidzein#section=Top>  
[Diakses pada 21 Maret 2018].
- Pubchem. 2004b. GENISTEIN.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/genistein#section=Top>  
[Diakses pada 21 Maret 2018].
- Pubchem. 2005. GLISITEIN.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glisitein#section=Top>  
[Diakses pada 21 Maret 2018].
- Punjaissee, C., W. Visessanguan, S. Punjaissee, dan C. Chaiyasut. 2011. Screening of potential *Aspergillus* sp. for production of fermented soybean with high antioxidative activity. *Chiang mai University Journal of Natural Sciences*. 10(2):197-212.

- Purwoko, T. 2004. Kandungan isoflavon aglikon pada tempe hasil fermentasi *Rhizopus microsporus* var. oligosporus : pengaruh perendaman. *BioSMART*. 3(2):85-87.
- Purwoko, T., S. Pawiroarsono, dan I. Gandjar. 2001. Biotransformasi isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524. *BioSMART*. 3(2):7-12.
- Sari, L. P. 2015. Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Tempe Kedelai (*Glycine max* L.) Sebagai Agen Pemutih Kulit Alami. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. Surabaya: Penerbit UNESA.
- Susilo, C. 2015. Identifikasi faktor usia, jenis kelamin, dengan luas infark miokard pada penyakit jantung koroner (PJK) di ruang ICCU RSD dr. Soebandi Jember. *The Indonesian Journal of Health Science*. 6(1):1-7.
- Sutatik. 2018. Validasi Metode Menggunakan KLT-Densitometri dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max*) Terfermentasi Oleh *Aspergillus oryzae*. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Teekachunhatean, S., N. Hanprasertpong, and T. Teekachunhatean. 2013. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds grown in thailand. *International Journal of Agronomy*. 2013
- Tim QC APH Golongan Jamur. 2009. *Modul Quality Control (QC) APH Golongan Jamur*. Surabaya: Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BPPTP).
- USDA. 2017. Full Report (All Nutrients): 45314665, EDAMAME, UPC: 046567015545. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/246397?manu=&fgcd=&ds=> [Diakses pada 15 Maret 2018].
- USDA. tanpa tahun. Plants Profile for *Glycine max* (Soybean). <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GLMA4> [Diakses pada 15 Maret 2018].
- Utari, D. M., Rimbawan, H. Riyadi, Muhilal dan Purwastyastuti. 2010. Pengaruh pengolahan kedelai menjadi tempe dan pemasakan tempe terhadap kadar isoflavon. *PGM*. 33(2):148-153.
- Widati, F. dan M. H. Iteu. 2012. Kedelai sayur (*Gycine max* L. Merrill) sebagai tanaman pekarangan. *Iptek holtikultura*. 8(2012):25-28.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi lapis Tipis*. Jember: PT Taman Kampus Presindo.

- Yuan, D., Y. Chen, X. Bai, Y. Pan, dan Y. Kano. 2006. TLC and HPLC analysis of soy isoflavones in semen sojae praeparatum. *Asia Journal of Tradisional Medicines*. 1(2006):3-4.
- Yunindarwati, E. 2015. Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Penghambatan Tirokinase Kedelai (*Glycine max*) In Vitro. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Yuwono, M., and G. Indrayanto. 2005. *Validation of Methods Analysis. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology Vol. 32*. New York: Elsevier.





LAMPIRAN

Lampiran A. Perhitungan

1. Data Perhitungan Kepadatan Suspensi Spora *R. oligosporus*

Jumlah spora pada kotak hitung 1	= 18
Jumlah spora pada kotak hitung 2	= 22
Jumlah spora pada kotak hitung 3	= 19
Jumlah spora pada kotak hitung 4	= 18
Jumlah spora pada kotak hitung 5	= 12
Rata-rata jumlah spora	= 17,8

Perhitungan kepadatan spora/mL (S)

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

$$= 1,424 \times 10^6$$

2. Data Pengenceran Spora

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$(1,424 \times 10^6) \times 10 = 10^6 \times V_2$$

$$V_2 = 14,24 \text{ mL}$$

14,24 mL – 10 mL = 4,24 mL akuades yang ditambahkan.

3. Data Jumlah Spora yang Digunakan

$$\frac{14,24 \text{ ml akuades}}{4,24 \text{ ml akuades}} = \frac{1 \text{ ml suspensi jamur}}{x}$$

$$X = 0,298 \text{ mL aquades}$$

$$0,702 \text{ mL jamur}$$

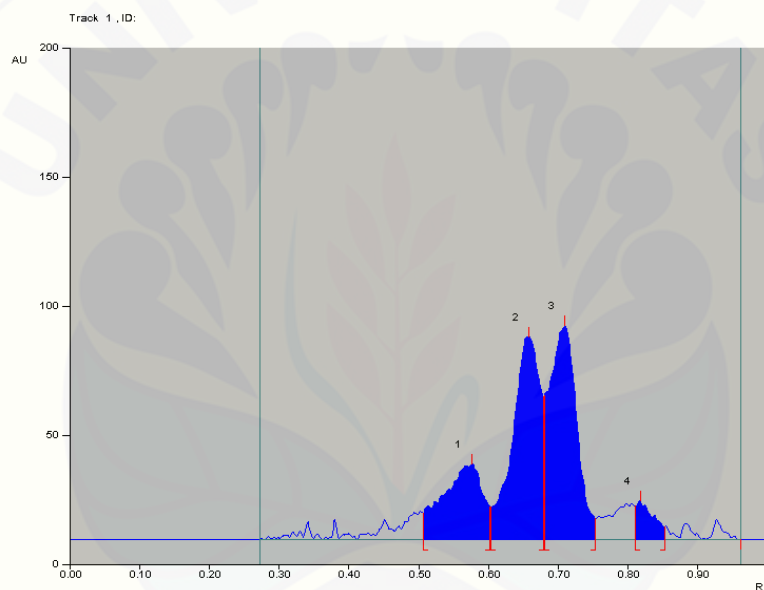
## 4. Data Perhitungan Rendemen Ekstrak

Sampel	Massa serbuk kering (gram)	Massa ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
H-0	700	67,83	9,69
H-1	62,9	8,73	13,87917329
H-2	57,09	14,89	26,0816255
H-3	57,27	16,69	29,14265759
H-4	36,27	17,23	47,50482492

## 5. Data Optimasi Eluen

Optimasi eluen 1

*n*-heksana : etil asetat = 0,5:5



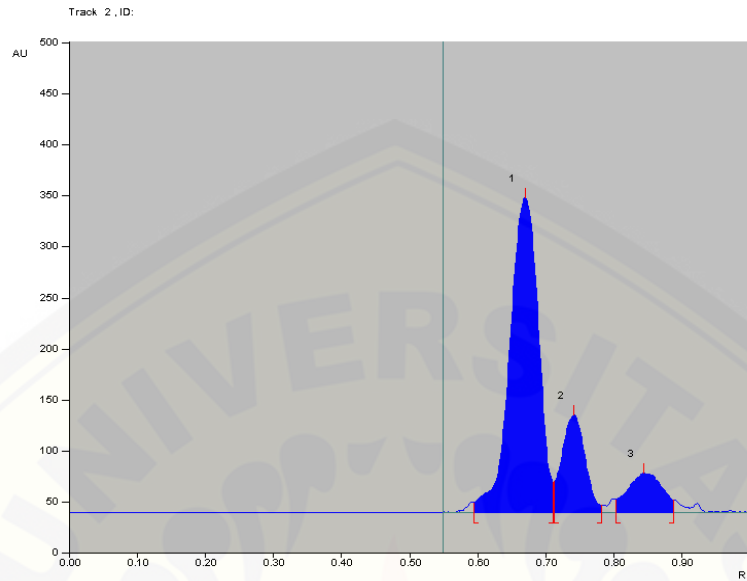
Peak	Start position (Rf)	Max position (Rf)	End position (Rf)	Area (AU)	Assigned substance
1	0,51	0,58	0,60	1540,0	glisitein
2	0,60	0,66	0,68	2861,7	daidzein
3	0,68	0,71	0,75	3027,1	genistein

$$R_s 1,2 = 0,4706$$

$$R_s 2,3 = 0,33$$

$$N \text{ daidzein} = 1089$$

$$H \text{ daidzein} = 0,0826$$

Optimasi eluen 2*n*-heksana : etil asetat = 1:5

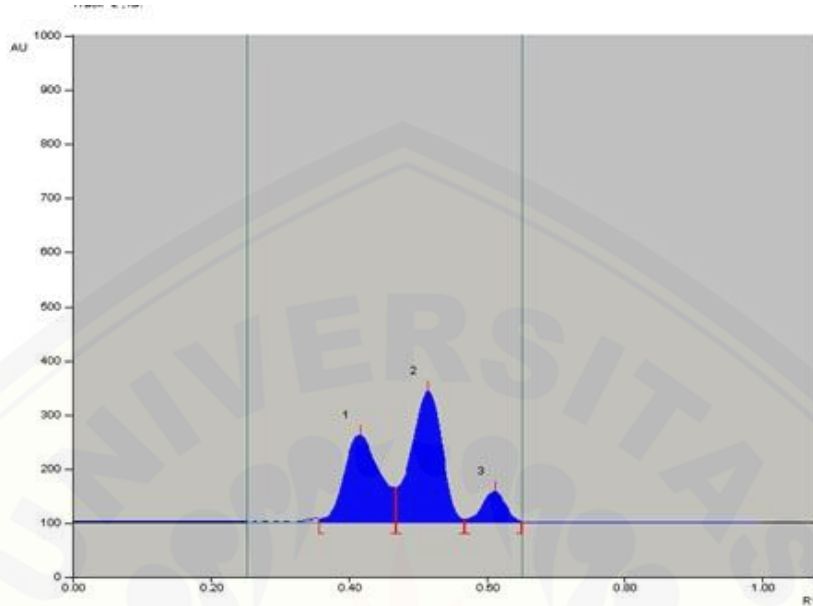
<i>Peak</i>	<i>Start position (Rf)</i>	<i>Max position (Rf)</i>	<i>End position (Rf)</i>	<i>Area (AU)</i>	<i>Assigned substance</i>
1	0,59	0,67	0,71	11984,7	glisitein
2	0,71	0,74	0,78	3008,1	daidzein
3	0,80	0,84	0,89	1818,2	genistein

$$R_s 1,2 = 0,3684$$

$$R_s 2,3 = 0,625$$

$$N \text{ daidzein} = 1788,082$$

$$H \text{ daidzein} = 0,0503$$

Optimasi eluen 3*n*-heksana : etil asetat = 2 : 5

Peak	Start position (Rf)	Max position (Rf)	End position (Rf)	Area (AU)	Assigned substance
1	0,37	0,42	0,47	5806,2	glisitein
2	0,47	0,52	0,57	7822,6	daidzein
3	0,57	0,61	0,64	1386,6	genistein

$$Rs_{1,2} = 1$$

$$Rs_{2,3} = 1,0588$$

$$N_{\text{daidzein}} = 432,64$$

$$H_{\text{daidzein}} = 0,2080$$

Contoh Perhitungan:

$$Rs_{1,2} = \frac{2(\text{jarak migrasi A} - \text{jarak migrasi B})}{(\text{lebar dasar puncak A} + \text{lebar dasar puncak B})}$$

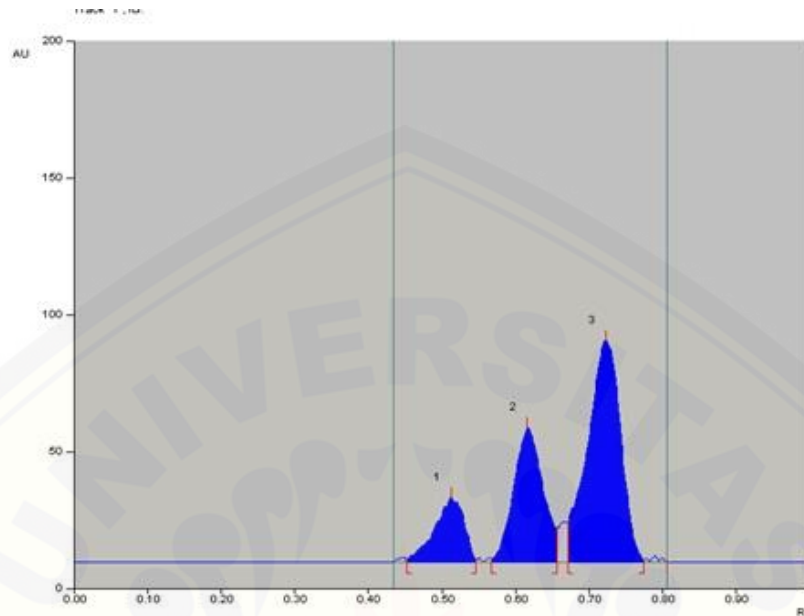
$$Rs_{1,2} = \frac{2(0,52 - 0,42)}{(0,57 - 0,47) + (0,47 - 0,37)} = 1$$

$$N = \left[ \frac{\text{Max Position}}{\text{End} - \text{Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[ \frac{0,52}{0,57 - 0,47} \right]^2 \times 16 = 432,64$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{432,64} = 0,208025148$$

Optimasi eluen 4

*n*-heksana : etil asetat : asam asetat = 2:5:0,15



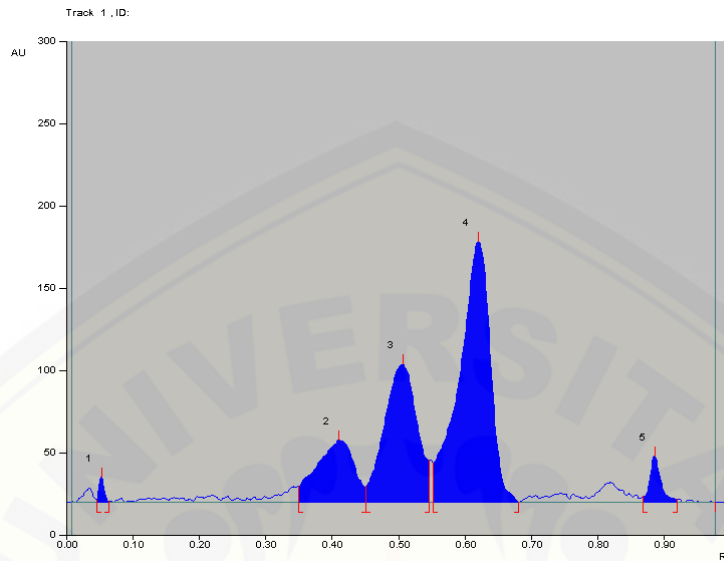
<i>Peak</i>	<i>Start position (Rf)</i>	<i>Max position (Rf)</i>	<i>End position (Rf)</i>	<i>Area (AU)</i>	<i>Assigned substance</i>
1	0,45	0,51	0,56	874,8	glisitein
2	0,57	0,62	0,66	1802,9	daidzein
3	0,67	0,72	0,76	3379,8	genistein

$$R_s 1,2 = 1,1$$

$$R_s 2,3 = 1,1111$$

$$N \text{ daidzein} = 759,3086$$

$$H \text{ daidzein} = 0,1185$$

Optimasi eluen 5*n*-heksana : etil asetat = 3 : 5

Peak	Start position (Rf)	Max position (Rf)	End position (Rf)	Area (AU)	Assigned substance
2	0,35	0,41	0,45	1958,0	glisitein
3	0,45	0,51	0,55	3818,6	daidzein
4	0,55	0,62	0,68	6817,1	genistein

$$R_s 2,3 = 1,1$$

$$R_s 3,4 = 0,9461$$

$$N \text{ daidzein} = 416,16$$

$$H \text{ daidzein} = 0,2163$$

## 6. Data Pembuatan Fase Gerak

*n*-heksana : etil asetat : asam asetat = 2 : 5 : 0,15

$$\frac{2}{7,15} \times 40 \text{ ml} = 11,188 \text{ ml}$$

$$\frac{5}{7,15} \times 40 \text{ ml} = 27,972 \text{ ml}$$

$$\frac{0,15}{7,15} \times 40 \text{ ml} = 0,839 \text{ ml}$$

### 7. Data Optimasi Konsentrasi Uji

Berdasarkan hasil *scanning* menggunakan eluen terpilih, sebanyak 0,5 gram ekstrak edamame terfermentasi hari ketiga (H-3) yang dilarutkan dalam 5 mL metanol p.a (100 µg/mL) mengandung 0,036 µg/mL, sehingga dilakukan penyetaraan massa sediaan untuk mendapatkan konsentrasi uji yang diharapkan.

$$\frac{80}{100} \times 0,5 \text{ gram} = 0,4 \text{ gram} \rightarrow \frac{0,4 \text{ gram}}{5 \text{ ml}} \times 1000 = 80 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{120}{100} \times 0,5 \text{ gram} = 0,6 \text{ gram} \rightarrow \frac{0,6 \text{ gram}}{5 \text{ ml}} \times 1000 = 120 \text{ mg/ml}$$

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

Sampel	Konsentrasi (mg/mL)	Start Position (Rf)	Max Position (Rf)	End Position (Rf)	N	H
H-0	80	0,6	0,65	0,7	676	0,133136
	100	0,6	0,65	0,7	676	0,133136
	120	0,61	0,66	0,71	696,96	0,129132
H-1	80	0,6	0,66	0,7	696,96	0,129132
	100	0,59	0,65	0,7	558,6777	0,161095
	120	0,58	0,64	0,69	541,6198	0,166168
H-2	80	0,59	0,64	0,68	809,0864	0,111237
	100	0,59	0,64	0,69	655,36	0,137329
	120	0,59	0,64	0,69	655,36	0,137329
H-3	80	0,59	0,63	0,69	635,04	0,141723
	100	0,59	0,63	0,69	635,04	0,141723
	120	0,59	0,63	0,69	635,04	0,141723
H-4	80	0,6	0,63	0,69	784	0,114796
	100	0,6	0,63	0,7	635,04	0,141723
	120	0,6	0,63	0,7	635,04	0,141723

Contoh perhitungan:

$$N = \left[ \frac{\text{Max Position}}{\text{End} - \text{Start Position}} \right]^2 \times 16 = \left[ \frac{0,65}{0,7 - 0,6} \right]^2 \times 16 = 676$$

$$H = \frac{\text{Jarak Migrasi}}{N} = \frac{90}{676} = 0,133136$$

## 8. Data Pembuatan Larutan Standar

### a. Larutan standar induk

- i. Melarutkan 10 mg daidzein dalam 5 mL metanol p.a.

$$[10 \text{ mg} / 5 \text{ mL}] \times 1000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 2000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar induk sebesar 2000  $\mu\text{g/mL}$ .

- ii. Mengencerkan 1 mL standar 2000  $\mu\text{g/mL}$  dalam metanol p.a ad 5 mL.

$$[1 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 2000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar induk sebesar 400  $\mu\text{g/mL}$ .

- iii. Mengencerkan 1 mL standar 2000  $\mu\text{g/mL}$  dalam metanol p.a ad 10 mL.

$$[1 \text{ mL} / 10 \text{ mL}] \times 2000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 200 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar induk sebesar 200  $\mu\text{g/mL}$ .

### b. Larutan standar

- i. Larutan standar 10  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,25 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 200 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 10  $\mu\text{g/mL}$

- ii. Larutan standar 20  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,5 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 200 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 20  $\mu\text{g/mL}$

- iii. Larutan standar 50  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,625 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 50  $\mu\text{g/mL}$

- iv. Larutan standar 70  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,875 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 70 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 70  $\mu\text{g/mL}$

- v. Larutan standar 90  $\mu\text{g/mL}$

$$[1,125 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 90 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 90  $\mu\text{g/mL}$

- vi. Larutan standar 100  $\mu\text{g/mL}$

$$[1,25 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$$



Jadi diperoleh larutan standar sebesar 100 µg/mL

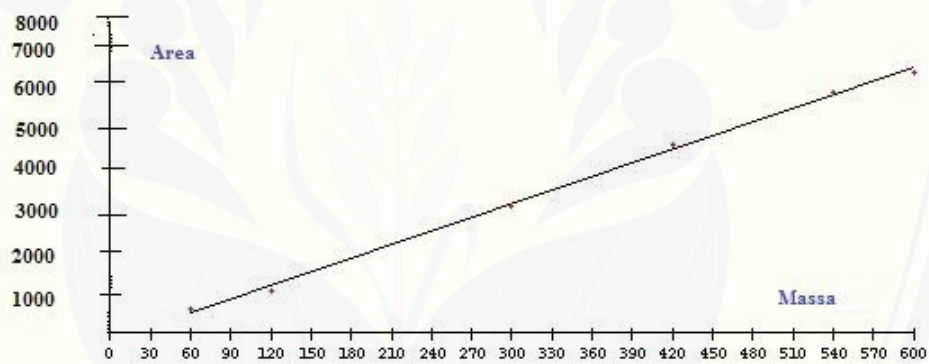
#### 9. Data Pembuatan Larutan Sampel

Pembuatan larutan sampel dengan menimbang 0,4 gram ekstrak edamamedan dilarutkan dalam 5 mL pelarut metanol p.a.

$$\frac{0,4 \text{ gram}}{5 \text{ ml}} \times 1000 = 80 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

#### 10. Data Linieritas

Konsentrasi (µg/mL)	Massa (ng)	Area
10	60	793
20	120	1425,98
50	300	4239,2
70	420	6313,99
90	540	8032,21
100	600	8733,84



Line equation :  $Y = -234.52220000 + 15.16929000X$   
 Correlation coefficient : 0.99910350  
 Vx0 value : 3.06790700%

Method : Linearity

Probability : 95%

Number of data : 6

Line equation :  $Y = -234.52220000 + 15.16929000X$

Correlation coefficient : 0.99910350

Sy value : 158.22910000

Vx0 value : 3.06790700%

Xp value : 55.67552000

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement ( $> 0.99$ )

The  $V_{x0}$  value is fulfilled the requirement ( 0% to 5% )

The  $X_p$  value is OK ( < 60.00000000 )

#### 11. Data LOD dan LOQ

Perhitungan 5 titik konsentrasi LOD dan LOQ di bawah konsentrasi linieritas

i. Larutan standar 4  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,1 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 200 \mu\text{g/mL} = 4 \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 4  $\mu\text{g/mL}$

ii. Larutan standar 5  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,0625 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \mu\text{g/mL} = 5 \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 5  $\mu\text{g/mL}$

iii. Larutan standar 6  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,075 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \mu\text{g/mL} = 6 \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 6  $\mu\text{g/mL}$

iv. Larutan standar 7  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,0875 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \mu\text{g/mL} = 7 \mu\text{g/mL}$$

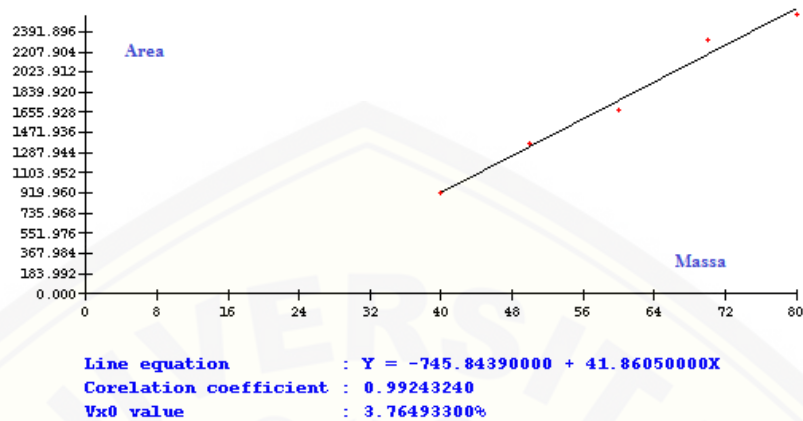
Jadi diperoleh larutan standar sebesar 7  $\mu\text{g/mL}$

v. Larutan standar 8  $\mu\text{g/mL}$

$$[0,1 \text{ mL} / 5 \text{ mL}] \times 400 \mu\text{g/mL} = 8 \mu\text{g/mL}$$

Jadi diperoleh larutan standar sebesar 8  $\mu\text{g/mL}$

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Massa (ng)	Massa (ng)
4	40	919,96
5	50	1471,2
6	60	1683,92
7	70	2310,53
8	80	2543,32



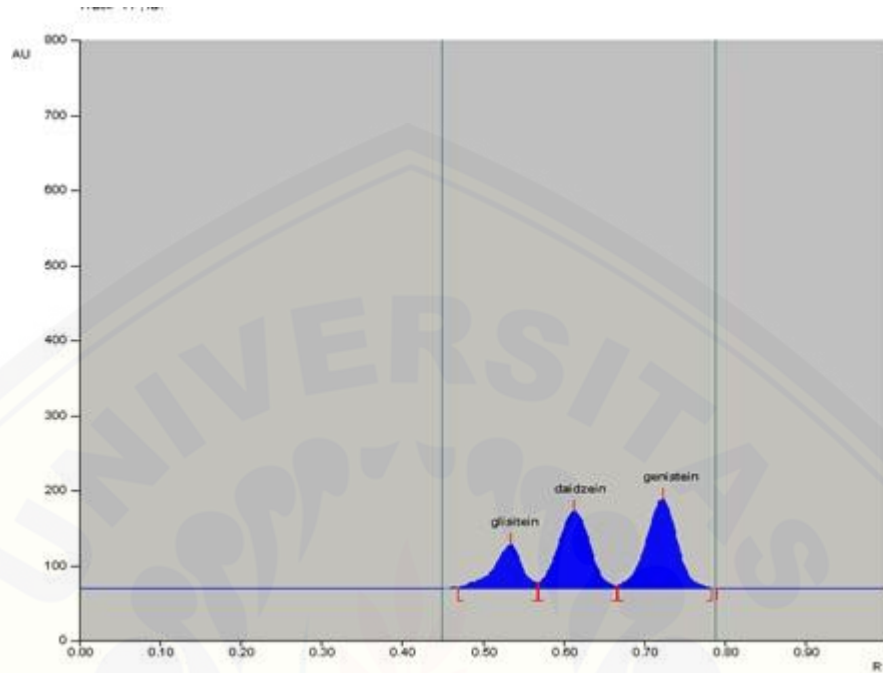
Method : Linearity  
 Probability : 95%  
 Number of data : 5  
 Line equation :  $Y = -745.84390000 + 41.86050000X$   
 Corelation coefficient : 0.99243240  
 Sy value : 94.56118000  
 Vx0 value : 3.76493300%  
 Xp value : 19.99632000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement ( > 0.99 )  
 The Vx0 value is fullfilled the requirement ( 0% to 5% )  
 The Xp value is OK ( < 40.00000000 )

Method : DL – QL  
 Number of data : 5  
 DL value : 20,26226000  
 QL value : 60,78677000

## 12. Data Selektivitas/Spesifitas

## Selektivitas



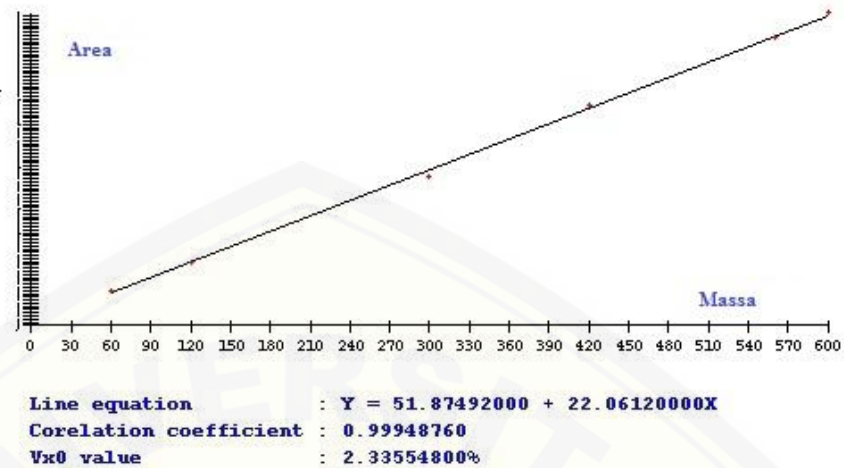
Peak	Start position (Rf)	Max position (Rf)	End position (Rf)	Area (AU)	Assigned substance
1	0,47	0,53	0,57	1896,6	glisitein
2	0,57	0,61	0,67	3736,5	daidzein
3	0,67	0,72	0,78	4196,3	genistein

$$R_s 1,2 = 0,8$$

$$R_s 2,3 = 1,0476$$

## 13. Data Presisi

Konsentrasi (µg/mL)	Massa (ng)	Area (Replikasi 1)	Area (Replikasi 2)	Area (Replikasi 3)
10	60	1514,28	1216,98	1369,37
20	120	2622,03	1989,25	2323,68
50	300	6388,84	5892,53	6349,79
70	420	9428,66	8577,34	9403,42
90	540	12350,15	11263,26	12705,17
100	600	13393,37	11889,7	13263,13

Replikasi 1

Method : Linearity  
 Probability : 95%  
 Number of data : 6  
 Line equation :  $Y = 51.87492000 + 22.06120000X$   
 Corelation coefficient : 0.99948760  
 Sy value : 176.90250000  
 Vx0 value : 2.33554800%  
 Xp value : 42.96220000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement ( > 0.99 )

The Vx0 value is fullfilled the requirement ( 0% to 5% )

The Xp value is OK ( < 60.00000000 )

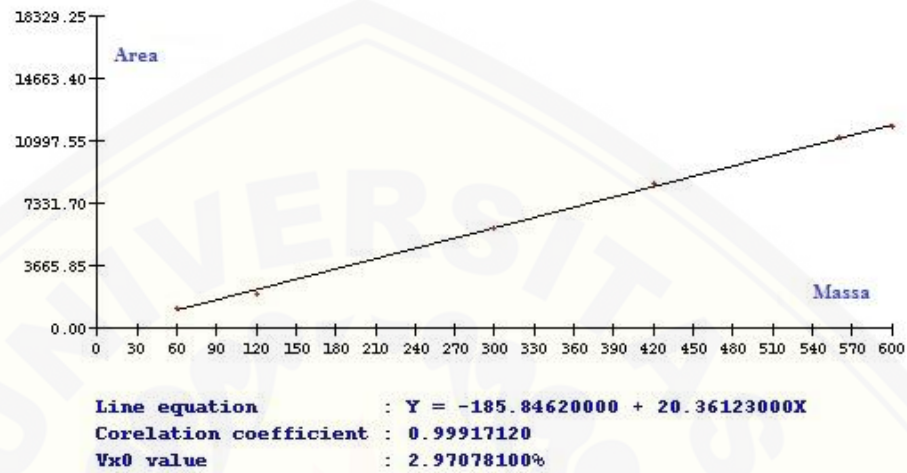
Penimbangan (mg)	Area (AU)	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Kadar daidzein (% b/b)
405,6	3521,6	157,2773	0,1310	0,0323
401,5	3877,7	173,4187	0,1445	0,0359
403,7	3933,57	175,9512	0,1466	0,0363
408,1	3925,29	175,5759	0,1463	0,0358
403,4	3966,11	177,4262	0,1478	0,0366
405	3831,1	171,3064	0,1427	0,0352

Rata-rata kadar daidzein = 0,0353 % b/b

SD = 0,0015

CV = 4,4706 %

Replikasi 2



Method : Linearity

Probability : 95%

Number of data : 6

Line equation :  $Y = -185.84620000 + 20.36123000X$

Corelation coefficient : 0.99917120

Sy value : 207.67810000

Vx0 value : 2.97078100%

Xp value : 54.38507000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement ( > 0.99 )

The Vx0 value is fullfilled the requirement ( 0% to 5% )

The Xp value is OK ( < 60.00000000 )

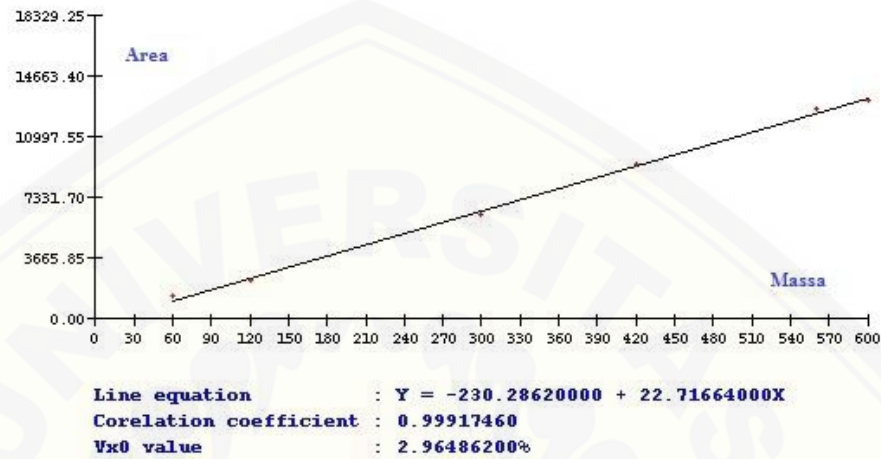
Penimbangan (mg)	Area (AU)	Massa (ng)	Massa Percobaan (mg)	Kadar daidzein (% b/b)
405,6	3551,87	183,5703	0,1529	0,0377
401,5	3260,31	169,2509	0,1410	0,0351
403,7	3306,04	171,4968	0,1429	0,0354
408,1	3348,29	173,5718	0,1446	0,0354
403,4	3412,41	176,721	0,1472	0,0365
405	3187,33	165,6666	0,1380	0,0340

Rata-rata kadar daidzein = 0,0357 % b/b

SD = 0,0012

CV = 3,4958 %

Replikasi 3



Method : Linearity

Probability : 95%

Number of data : 6

Line equation :  $Y = -230.28620000 + 22.71664000X$

Corelation coefficient : 0.99917460

Sy value : 231.24090000

Vx0 value : 2.96486200%

Xp value : 54.27914000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement ( > 0.99 )

The Vx0 value is fullfilled the requirement ( 0% to 5% )

The Xp value is OK ( < 60.00000000 )

Penimbangan (mg)	Area (AU)	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Kadar daidzein (% b/b)
405,6	2637,9	126,2593	0,1052	0,0259
401,5	2799,2	133,3598	0,1111	0,0276
403,7	2703,31	129,1386	0,1076	0,0266
408,1	2627,41	125,7975	0,1048	0,0256
403,4	2961,04	140,4841	0,1170	0,0290
405	2618,7	125,4141	0,1045	0,0258

Rata-rata kadar daidzein = 0,0267 % b/b

SD = 0,0013

CV = 4,9196 %

Contoh perhitungan:

Replikasi 1

$$y = 22,06120000x + 51,87492000$$

$$3521,6 = 22,06120000x + 51,87492000$$

X = 157,2773 ng → massa daidzein dalam 6 μL

$$\frac{157,2773}{6 \mu l} = \frac{x}{5 ml}$$

X = 0,131064 mg → massa daidzein dalam 5 mL

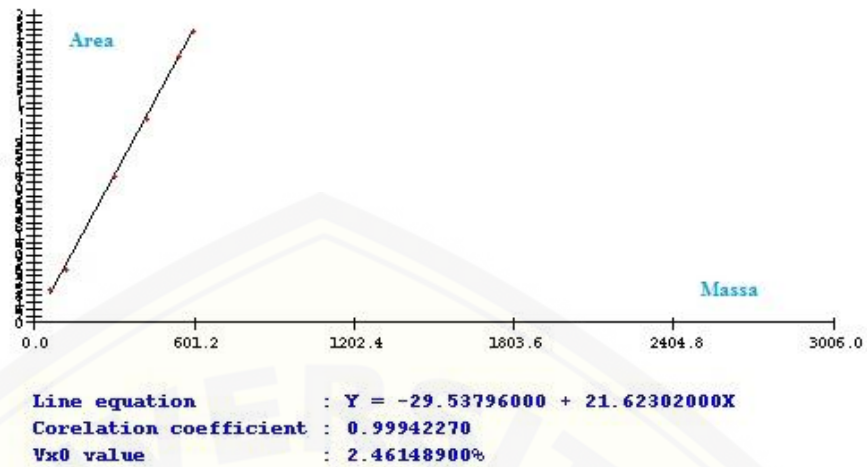
$$\text{Kadar Daidzein} = \frac{0,131064}{405,6} \times 100\% = 0,032314\% \frac{b}{b}$$

→ persentase kandungan daidzein dalam 0,4 gram ekstrak edamame terfermentasi hari ketiga

#### 14. Data Akurasi

Konsentrasi (μg/mL)	Massa (ng)	Area (AU)
10	60	1491,99
20	120	2319,94
50	300	6443,92
70	420	9013,98
90	540	11773,55
100	600	12890,35





Method : Linearity  
 Probability : 95%  
 Number of data : 6  
 Line equation :  $Y = -29.53796000 + 21.62302000X$   
 Correlation coefficient : 0.99942270  
 Sy value : 180.96440000  
 Vx0 value : 2.46148900%  
 Xp value : 44.87825000

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement ( $> 0.99$ )

The Vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK ( $< 60.00000000$ )

	Penimbangan (mg)	Area	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Massa teoritis	Recovery (%)
30	401,8	6421,08	298,3218	0,248601	0,251131	101,0177
	401,8	6324,74	293,8663	0,244889	0,251131	102,5492
	401,8	7003,81	325,2713	0,271059	0,251131	92,64812
40	401,4	7899,44	366,6915	0,305576	0,311001	101,7752
	401,4	7833,96	363,6633	0,303053	0,311001	102,6227
	401,4	7618,83	353,7141	0,294762	0,311001	105,5092
60	401,2	10092,89	468,132	0,39011	0,370936	95,08488
	401,2	10683,96	495,4672	0,412889	0,370936	89,83899
	401,2	10968,06	508,606	0,423838	0,370936	87,51819
					Rata-rata	97,61825

Recovery = 134,3507 %

Contoh perhitungan:

Rata-rata kadar daid = 0,0326 % b/b

Adisi 30% = 24 µg/mL

$$\frac{2000 \mu\text{g/ml}}{10 \text{ mg}} = \frac{24 \mu\text{g/ml}}{x}$$

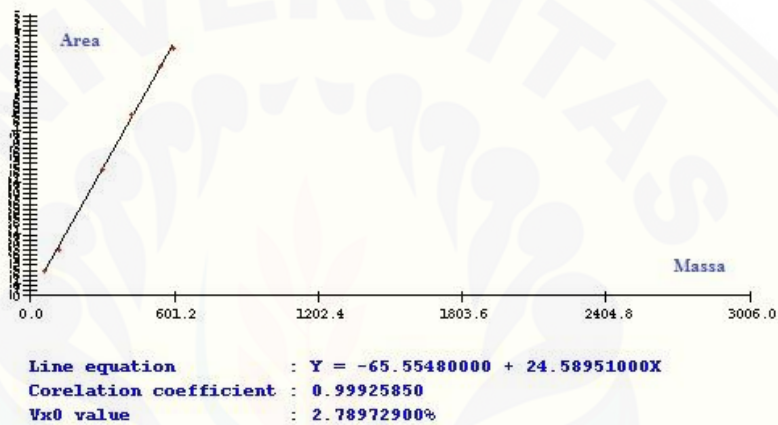
$$\rightarrow x = 0,12 \text{ mg}$$

$$\text{Massa teoritis} = \frac{0,032636}{100} \times 401,8 \text{ mg} = 0,131 \text{ mg} + 0,12 \text{ mg} = 0,251 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Recovery} &= \frac{\text{Massa percobaan}}{\text{Massa teoritis}} \times 100\% = \frac{0,349875 \text{ mg}}{0,251131 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 134,3507157\% \end{aligned}$$

## 15. Data Penetapan Kadar

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Massa (ng)	Area (AU)
10	60	1474,89
20	120	2671,38
50	300	7365,46
70	420	10468,05
90	540	13365,13
100	600	14395,08



Method : Linearity  
 Probability : 95%  
 Number of data : 6  
 Line equation :  $Y = -65.55480000 + 24.58951000X$   
 Correlation coefficient : 0.99925850  
 Sy value : 233.23340000  
 Vx0 value : 2.78972900%  
 Xp value : 50.73488000

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement ( $> 0.99$ )

The Vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK ( $< 60.00000000$ )

<b>Sampel</b>	<b>Penimbangan (mg)</b>	<b>Area (au)</b>	<b>Massa (ng)</b>	<b>Massa percobaan (mg)</b>	<b>Kadar (% b/b)</b>	<b>SD</b>
<b>H-1</b>	401,6	2385,87	99,6939	0,0830	0,0206	
	402	1924,85	80,9452	0,0674	0,0167	
	401,5	1868,67	78,6605	0,0655	0,0163	0,0023
<b>H-2</b>	401,3	3085,46	128,1446	0,1067	0,0266	
	400,4	3098,45	128,6729	0,1072	0,0267	
	401,3	3942,6	163,0026	0,1358	0,0338	0,0041
<b>H-3</b>	400,8	4435,77	183,0587	0,1525	0,0380	
	401,7	4750,55	195,8601	0,1632	0,0406	
	401,3	4153,57	171,5823	0,1429	0,0356	0,0025
<b>H-4</b>	400,3	7097,75	291,3154	0,2427	0,0606	
	401,1	7191,37	295,1227	0,2459	0,0613	
	401,1	7183,71	294,8112	0,2456	0,0612	0,0003
<b>H-0</b>	402,8	7710,49	357,9531	0,2982	0,0740	
	401,7	8117,02	376,7539	0,3139	0,0781	
	401,7	6625,47	307,7742	0,2564	0,0638	0,0073

**Lampiran B. Hasil analisis statistik**

```

NPAR TESTS
  /K-S(NORMAL)=Massa Kadar
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /MISSING ANALYSIS

  /METHOD=MC CIN(99) SAMPLES(10000).
    
```

**NPar Tests**

Notes	
Output Created	15-Jul-2018 07:41:15
Comments	
Input	Active Dataset DataSet0 Filter <none> Weight <none> Split File <none> N of Rows in Working Data File 15
Missing Value Handling	Definition of Missing User-defined missing values are treated as missing. Cases Used Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax	NPAR TESTS /K-S(NORMAL)=Massa Kadar /STATISTICS DESCRIPTIVES /MISSING ANALYSIS /METHOD=MC CIN(99) SAMPLES(10000).
Resources	Processor Time 00:00:00.203 Elapsed Time 00:00:00.131 Number of Cases Allowed <sup>a</sup> 157286 Time for Exact Statistics 00:00:00.120

a. Based on availability of workspace memory.

[DataSet0]

**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Massa	15	3.0000	1.46385	1.00	5.00
Kadar	15	.039553	.0232249	.0000	.0782

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Massa	Kadar	
N		15	15	
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.0000	.039553	
	Std. Deviation	1.46385	.0232249	
Most Extreme Differences	Absolute	.153	.151	
	Positive	.153	.149	
	Negative	-.153	-.151	
Kolmogorov-Smirnov Z		.592	.585	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.875	.884	
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	.821 <sup>c</sup>	.831 <sup>c</sup>	
	99% Confidence Interval	Lower Bound	.811	.821
		Upper Bound	.831	.840
a. Test distribution is Normal.				

c. Based on 10000 sampled tables with starting seed 303130861.

ONEWAY Kadar BY Massa  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY  
 /MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=LSD ALPHA(0.01).

## Oneway

Notes		
Output Created		15-Jul-2018 07:41:41
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY Kadar BY Massa /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=LSD ALPHA(0.01).
Resources	Processor Time	00:00:00.047
	Elapsed Time	00:00:00.029

[DataSet0]

**Descriptives**

Kadar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
H0	3	.072033	.0074191	.0042834	.053603	.090463	.0638	.0782
H1	3	.017933	.0024090	.0013908	.011949	.023918	.0163	.0207
h2	3	.029067	.0041004	.0023674	.018881	.039253	.0266	.0338
h3	3	.038100	.0025000	.0014434	.031890	.044310	.0356	.0406
h4	3	.061067	.0004041	.0002333	.060063	.062071	.0606	.0613
Total	15	.043640	.0210602	.0054377	.031977	.055303	.0163	.0782

**Test of Homogeneity of Variances**

Kadar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.943	4	10	.036

**ANOVA**

Kadar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.006	4	.002	89.822	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.006	14			



## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Kadar

LSD

(I) Massa	(J) Massa	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H0	H1	.0541000*	.0033481	.000	.043489	.064711
	h2	.0429667*	.0033481	.000	.032356	.053578
	h3	.0339333*	.0033481	.000	.023322	.044544
	h4	.0109667*	.0033481	.008	.000356	.021578
H1	H0	-.0541000*	.0033481	.000	-.064711	-.043489
	h2	-.0111333*	.0033481	.008	-.021744	-.000522
	h3	-.0201667*	.0033481	.000	-.030778	-.009556
	h4	-.0431333*	.0033481	.000	-.053744	-.032522
h2	H0	-.0429667*	.0033481	.000	-.053578	-.032356
	H1	.0111333*	.0033481	.008	.000522	.021744
	h3	-.0090333	.0033481	.022	-.019644	.001578
	h4	-.0320000*	.0033481	.000	-.042611	-.021389
h3	H0	-.0339333*	.0033481	.000	-.044544	-.023322
	H1	.0201667*	.0033481	.000	.009556	.030778
	h2	.0090333	.0033481	.022	-.001578	.019644
	h4	-.0229667*	.0033481	.000	-.033578	-.012356
h4	H0	-.0109667*	.0033481	.008	-.021578	-.000356
	H1	.0431333*	.0033481	.000	.032522	.053744
	h2	.0320000*	.0033481	.000	.021389	.042611
	h3	.0229667*	.0033481	.000	.012356	.033578

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