



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

SKRIPSI

oleh

Ayu Maulida Fitriah

NIM 142210101116

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



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

SKRIPSI

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

oleh

Ayu Maulida Fitriah

NIM 142210101116

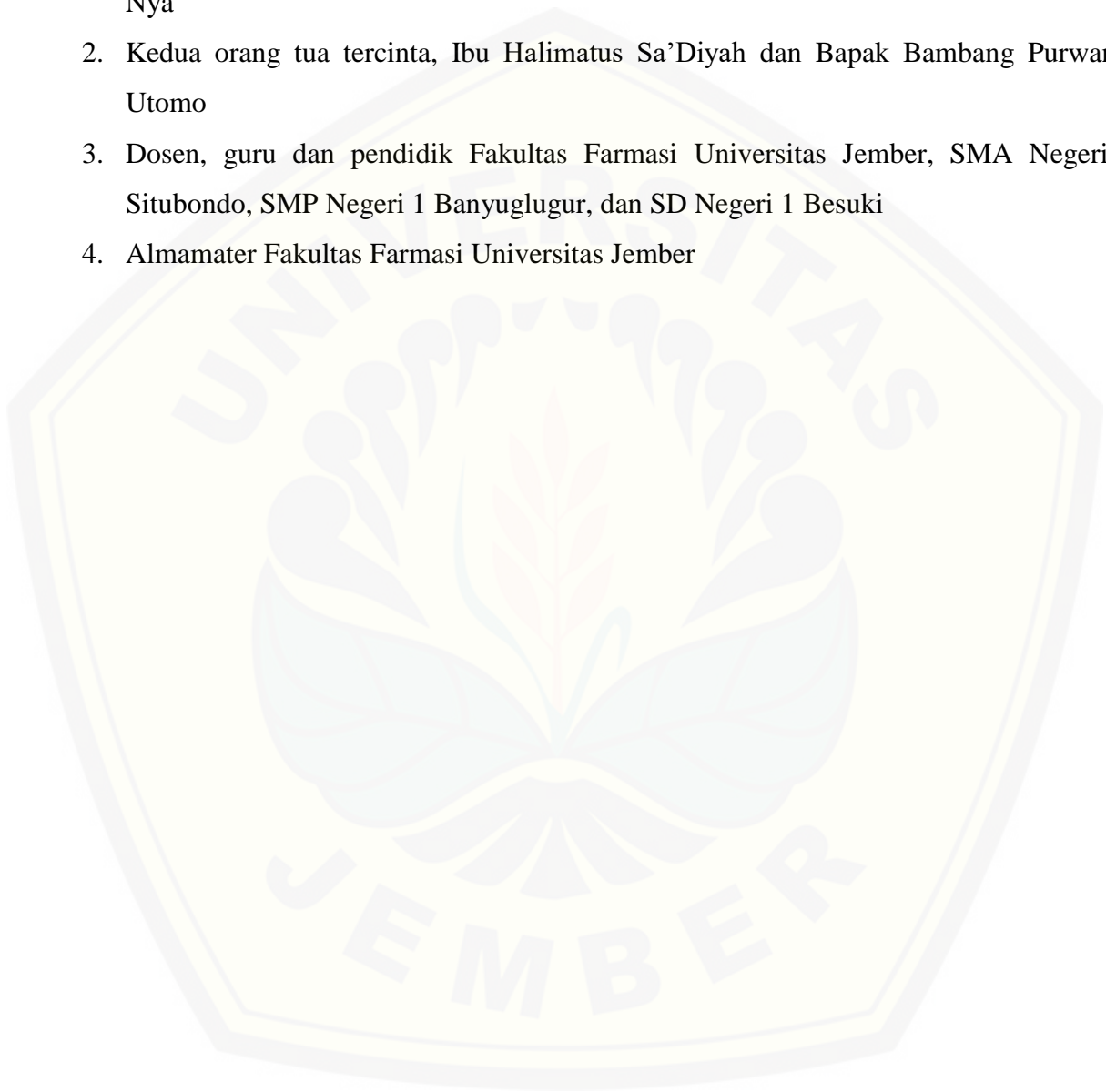
**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah Subhanahu wa Ta'ala, dengan segala rahmat, hidayah, karunia serta petunjuk-Nya
2. Kedua orang tua tercinta, Ibu Halimatus Sa'Diyah dan Bapak Bambang Purwanto Utomo
3. Dosen, guru dan pendidik Fakultas Farmasi Universitas Jember, SMA Negeri 1 Situbondo, SMP Negeri 1 Banyuglugur, dan SD Negeri 1 Besuki
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember



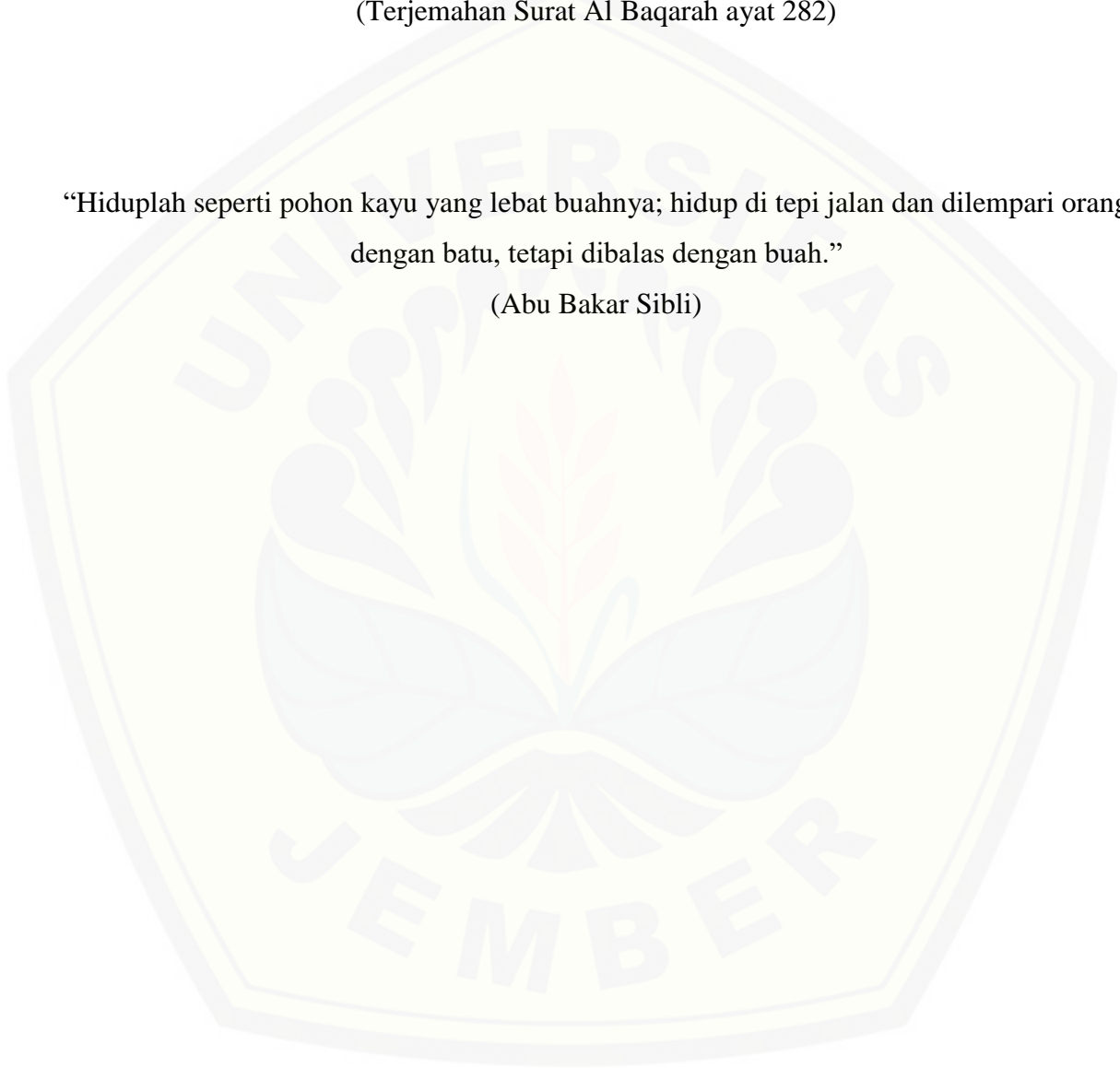
MOTTO

“Bertaqwalah kepada Allah, maka Dia akan membimbingmu. Sesungguhnya Allah mengetahui segala sesuatu.”

(Terjemahan Surat Al Baqarah ayat 282)

“Hiduplah seperti pohon kayu yang lebat buahnya; hidup di tepi jalan dan dilempari orang dengan batu, tetapi dibalas dengan buah.”

(Abu Bakar Sibli)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama: Ayu Maulida Fitriah

NIM: 1422101011116

Menyatakan dengan sungguh-sungguh bahwa karya ilmiah yang berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame (*Glycine max L. Maeril*) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* dengan metode KLT Densitometri” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan-kutipan yang sudah disebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Juli 2018

Yang Menyatakan,

(Ayu Maulida Fitriah)

NIM. 1422101011116

SKRIPSI

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

Oleh:

Ayu Maulida Fitriah

142210101116

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame (*Glycine max L. Maeril*) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* dengan KLT Densitometri” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Jumat, 20 Juli 2018

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Anggota I,

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

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

NIP 198107232006042002

NIP 198407122008122002

Anggota II,

Anggota III,

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

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

NIP 198712082014042002

NIP 198201292009121003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

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

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Validasi Metode dan Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame (*Glycine max L. Maeril*) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* dengan metode KLT Densitometri: Ayu Maulida Fitriah, 142210101116: 2018: 87 halaman; Fakultas Farmasi; Universitas Jember.

Kanker adalah penyebab utama kematian dan morbiditas di seluruh dunia, termasuk di Indonesia. Salah satu senyawa alami yang mempunyai aktivitas antikanker adalah genistein, karena kemampuannya dalam menghambat tirosin protein kinase, menginduksi apoptosis pada kanker, dan bersifat antimutagenik. Genistein merupakan bentuk bebas dari senyawa isoflavon, yaitu senyawa fitokimia yang ada pada tumbuhan. Senyawa isoflavon tersebut banyak terdapat pada tanaman kacang-kacangan seperti kedelai dalam jumlah signifikan. Salah satu varietas kedelai yang produksinya di Jember melimpah dan merupakan salah satu komoditas ekspor Indonesia adalah edamame. Kandungan isoflavon dalam kedelai mayoritas masih dalam bentuk glikosida, yang aktivitas biologisnya lebih rendah dibandingkan dalam bentuk aglikonnya. Oleh karena itu, untuk merubah bentuk glikosida ke dalam bentuk aglikon diperlukan suatu proses, salah satunya dengan fermentasi.

Proses fermentasi pada penelitian kali ini menggunakan kombinasi kapang *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*. Keduanya memiliki enzim β -glukosidase yang dapat mendeglikosilasi isoflavon glikosida menjadi aglikon. Kemudian salah satu senyawa isoflavon aglikon tersebut, yaitu genistein, akan ditetapkan kadarnya menggunakan metode KLT-densitometri. KLT-densitometri memiliki beberapa keuntungan yaitu menggunakan fase gerak yang sedikit, waktu yang relatif singkat dan dapat dilakukan penetapan kadar beberapa sampel secara simultan dengan preparasi yang mudah. Metode KLT-densitometri tersebut sebelumnya akan divalidasi terlebih dahulu dengan beberapa parameter yaitu linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan akurasi. Optimasi kondisi analisis juga dilakukan untuk mendapatkan kondisi analisis yang optimal.

Kondisi optimal untuk analisis genistein dalam sampel ekstrak edamame yaitu eluen menggunakan n-heksan : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15), panjang gelombang pada 266 nm, dan konsentrasi uji yang digunakan pada konsentrasi 5,6; 6; 15,6; 17,8; dan 42 $\mu\text{g/ml}$ dengan 6 μl penotolan. Metode analisis penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi menggunakan metode KLT-densitometri memberikan

analisis yang linier dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9989; V_{x0} = 3,51%; dan X_p = 26,745 ng; peka dalam nilai batas deteksi 24,932 ng dan batas kuantitasi 74,798 ng; kurang selektif karena R_s salah satu puncak genistein dengan puncak *unknown* < 1,5 yaitu sebesar 1,33, namun spesifik karena menghasilkan nilai korelasi spektra pada uji *purity* dan uji *identity* lebih dari 0,99; uji presisi menunjukkan hasil yang memenuhi syarat RSD (< 5,3%) dengan RSD presisi repeatabilitas = 1,93% dan RSD presisi antara = 2,36%; dan akurat dengan *mean recovery* = 101,661 ± 0,23 %. Metode yang telah tervalidasi digunakan untuk menentukan kadar genistein dalam sampel ekstrak edamame H_0 , H_1 , H_2 , H_3 , dan H_4 secara berurutan adalah sebesar $0,0213 \pm 1,49 \times 10^{-3}$; $0,0047 \pm 1,42 \times 10^{-4}$; $0,0062 \pm 2,19 \times 10^{-4}$; $0,0106 \pm 2,38 \times 10^{-4}$; dan $0,0183 \pm 2,08 \times 10^{-4}$ %b/b. Hasil menunjukkan adanya perbedaan kadar yang bermakna antar sampel, kecuali pada H_1 dan H_2 . Dapat disimpulkan bahwa kadar genistein pada edamame non-fermentasi lebih tinggi daripada edamame terfermentasi, namun belum dapat dipastikan jika waktu fermentasi dilanjutkan, kadar genistein dapat meningkat melebihi sampel non-fermentasi atau malah menurun.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala atas rahmat dan hidahnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode dan Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame (*Glycine max L. Maeril*) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* dengan KLT Densitometri”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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

1. Ibu Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis untuk menyelesaikan penelitian ini;
3. Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M. Farm.,Apt selaku Dosen Penguji I dan Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc.,Apt selaku Dosen Penguji II yang dengan sabar memberikan saran terhadap penelitian ini;
4. Bapak Dwi Nurahmanto, S.Farm.,M.Sc., Apt dan Bapak Dian Agung P, S.Farm., M. Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing saya selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
5. Seluruh dosen maupun tenaga pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmunya, berbagi pengalaman selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Mbak Parka dan Ibu Widi selaku teknisi Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember yang selalu memberikan bantuan kepada penulis selama penelitian;
7. Orang tua tercinta, Ibu Halimatus Sa'Diyah dan Bapak Bambang Purwanto Utomo yang selalu mendukung, memotivasi, mendoakan dan memberikan segalanya kepada penulis dalam mengerjakan skripsi dan penelitian;
8. Mbak Diah Muslimatul Jannah tersayang yang selalu memberikan motivasi dan semangat penulis selama kuliah maupun skripsi;

9. Yanuar Widy Pratama yang selalu memberikan bantuan dan semangat selama ini supaya penulis cepat lulus kuliah dan skripsi;
10. Ibu Yuni Azalwa dan Bapak Widiyanto yang selalu memberikan dukungan dan semangat terhadap penulis;
11. Teman seperjuangan penelitian proyek edamame yaitu Fanitika, Vita, Nadia, Sutatik, dan Yogi yang selalu memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis dalam penelitian;
12. Semua rekan penelitian di di Laboratorium Biologi Farmasi (Alfiatur, Hilda, Illa, Alfia, Hanum, Huda) yang telah banyak membantu;
13. Teman-teman angkatan 2014 Fakultas Farmasi Universitas Jember yang tidak bisa disebutkan satu persatu;
14. Grup Cimiw-cimiw Yudya Residence (Sheila, Laily, Tata, Yulintan, Alfita, Ratih, dan Lisa) yang tiap hari bersama dan saling mendukung;
15. Rekan Strawbell (Dina, Ambar, Dika, Lita, Ipi, Vidya, dan Tita) yang telah memotivasi penulis;
16. Keluarga besar kos Yudya Residence yang tidak dapat disebutkan satu-persatu;
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga mendapat rahmat, lindungan Allah SWT. Penulis juga menerima kritikan dan saran pada penelitian ini. Penulis berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi semua pihak.

Jember, 20 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR PERSAMAAN	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Kedelai Edamame	5
2.1.1 Klasifikasi Kedelai Edamame (<i>Glycine max</i> L. Merrill)	5
2.1.2 Uraian tentang Edamame	5

2.1.3 Kandungan Kimia Edamame	6
2.1.4 Penelitian Terkait yang Pernah Diteliti	8
2.1.5 Pengaruh Fermentasi terhadap Kandungan Isoflavon.....	9
2.1.6 Pengaruh Kapang terhadap Biotransformasi Genistein	9
2.2 Validasi Metode Analisis	11
2.2.1 Optimasi Kondisi Analisis	12
2.2.2 Parameter Validasi	14
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	20
3.1.1 Jenis Penelitian.....	20
3.1.2 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.2 Variabel Penelitian.....	20
3.2.1 Variabel bebas	20
3.2.2 Variabel terikat.....	20
3.2.3 Variabel terkontrol	20
3.3 Rancangan Penelitian	21
3.3.1 Rancangan Operasional.....	21
3.3.2 Definisi Operasional.....	22
3.4 Alat dan Bahan.....	22
3.4.1 Alat Penelitian.....	22
3.4.2 Bahan Penelitian.....	22
3.5 Prosedur Penelitian.....	23
3.5.1 Preparasi Kedelai Non-fermentasi (Ho)	23
3.5.2 Peremajaan Isolat <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i>	23

3.5.3 Pembuatan Suspensi Spora Kombinasi <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i>	23
3.5.4 Perhitungan Kepadatan Spora	23
3.5.5 Preparasi Kedelai Fermentasi.....	26
3.5.7 Pembuatan Ekstrak Edamame.....	26
3.5.8 Optimasi Kondisi Analisis	27
3.5.9 Validasi Metode Analisis	28
3.5.10 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein.....	30
3. 6 Analisis Data.....	31
3. 7 Skema Penelitian.....	32
3.7.1 Preparasi Ekstrak Kedelai Non-fermentasi dan Fermentasi..	32
3.7.2 Penetapan Kadar Genistein dan Validasi Metode KLT-densitometri.....	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Karakterisasi Kedelai Terfermentasi dengan Kombinasi <i>A.oryzae</i> dan <i>R.oligosporus</i>	34
4.2 Hasil Rendemen Ekstrak.....	35
4.3 Optimasi Kondisi Analisis.....	36
4.3.1 Optimasi eluen	36
4.3.2 Optimasi panjang gelombang.....	37
4.3.3 Optimasi konsentrasi uji.....	37
4.4 Validasi Metode Analisis	38
4.4.1 Linieritas	39
4.4.2 Batas deteksi dan batas kuantitasi	40
4.4.3 Selektivitas/spesifisitas	41

4.4.4 Presisi	44
4.4.5 Akurasi	45
4.5 Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame Non-fermentasi dan Terfermentasi	46
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Pedoman memberikan interpretasi koefisien korelasi.....	14
2.2 Konsentrasi analit berbanding RSD.....	18
2.3 Persen perolehan kembali (<i>recovery</i>) analit pada konsentrasi yang berbeda.....	18
4.1 Karakteristik kedelai fermentasi dengan kombinasi <i>A.oryzae</i> dan <i>R.oligosporus</i>	35
4.2 Hasil rendemen ekstrak.....	35
4.3 Perbandingan parameter efisiensi kromatogram pada komposisi yang berbeda.....	36
4.4 Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada konsentrasi yang berbeda.....	38
4.5 Kondisi optimum analisis genistein dalam ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi dengan metode KLT densitometri.....	38
4.6 Hasil uji linieritas genistein.....	39
4.7 Hasil uji BD dan BK standar genistein.....	40
4.8 Tabel korelasi uji <i>purity</i> genistein.....	42
4.9 Tabel korelasi uji <i>identity</i> genistein.....	43
4.10 Hasil uji presisi repeatabilitas.....	44
4.11 Hasil uji presisi antara genistein.....	44
4.12 Hasil uji akurasi genistein.....	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Biji kedelai edamame (<i>Glycine max</i> L. Merrill).....	6
2.2 Struktur kimia isoflavon aglikon.....	7
2.3 Proses biotransformasi genistin menjadi genistein oleh enzim β -glukosidase.....	11
3.1 Rancangan penelitian.....	21
3.2 Daerah hitung hemasitometer <i>Improved Neubauer</i>	25
3.3 Cara perhitungan spora.....	25
3.4 Skema alur pembuatan ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi.....	32
3.5 Skema penetapan kadar ekstrak edamame dan validasi metode KLT-densitometri.....	33
4.1 Karakteristik edamame non-fermentasi dan terfermentasi kombinasi <i>A.oryzae</i> dan <i>R.oligosporus</i>	34
4.2 Spektra genistein pada panjang gelombang 200-400 nm.....	37
4.3 Kurva linieritas genistein massa vs area.....	40
4.4 Kurva BD dan BK genistein massa vs area.....	41
4.5 Kromatogram pemisahan genistein.....	42
4.6 Spektra uji <i>purity</i> dan <i>identity</i> genistein.....	43
4.7 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame non-fermentasi dilihat dengan sinar UV 254 nm.....	46
4.8 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame terfermentasi dilihat dengan sinar UV 254 nm.....	47
4.9 Data kadar genistein dalam masing-masing sampel.....	48

DAFTAR PERSAMAAN

	Halaman
2.1 Resolusi.....	13
2.2 Nilai <i>Theoretical Plate</i>	13
2.3 Nilai <i>Haight Equivalent of Theoretical Plate</i>	13
2.4 Batas deteksi.....	16
2.5 Batas kuantitasi.....	16
2.6 Perolehan kembali (<i>recovery</i>).....	18
2.7 Perhitungan jumlah spora.....	24
2.8 Persamaan pengenceran.....	25

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan.....	60
B. Data optimasi eluen.....	62
C. Data optimasi konsentrasi uji	66
D. Preparasi larutan standar genistein.....	68
E. Data linieritas.....	70
F. Data batas deteksi dan batas kuantitasi.....	71
G. Perhitungan resolusi puncak genistein.....	72
H. Data presisi.....	73
I. Perhitungan data akurasi.....	79
J. Perhitungan penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame....	82
K. Analisis data penetapan kadar.....	86
L. Dokumentasi penelitian.....	88

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah penyebab utama kematian dan morbiditas di seluruh dunia, termasuk negara-negara di Asia bagian Timur Laut dan Tenggara, tidak terkecuali Indonesia (Moore, 2014). Di Indonesia penyakit kanker merupakan urutan keenam dari pola penyakit nasional, dan setiap tahunnya 100 kasus baru terjadi di antara 100.000 penduduk (Departemen Kesehatan, 2002). Tingginya kasus baru kanker, dan sekitar 40% dari kematian akibat kanker berkaitan erat dengan faktor risiko kanker yang seharusnya dapat dicegah. Faktor risiko tersebut terdiri dari faktor risiko perilaku dan pola makan (Bott, 2015). Saat ini, diet dan suplemen diet khusus dipandang sebagai bahan pembantu potensial untuk mencegah atau untuk memperbaiki terapi farmakologis kanker (Russo dkk., 2016). Oleh karena itu, penelitian tentang diet dan suplemen diet yang berpotensi sebagai antikanker sangat gencar di kalangan masyarakat, terutama yang berasal dari bahan alam (Ali dkk., 2015; Rady dkk., 2017; Sik dkk., 2017).

Salah satu senyawa alami yang mempunyai aktivitas antikanker adalah genistein (Liu dkk., 2016). Di negara maju genistein telah digunakan sebagai salah satu terapi bagi penderita kanker prostat, payudara dan paru-paru (Coral, 2008) karena kemampuannya dalam menghambat tirosin protein kinase (Duan dkk., 2003), menginduksi apoptosis pada kanker, dan bersifat antimutagenik (Polivkova dkk., 2006). Genistein juga mampu menurunkan trigliserida, LDL, kolesterol, dan total kolesterol (Caderroth and Serge, 2009). Genistein merupakan bentuk bebas dari senyawa isoflavon, yaitu senyawa fitokimia pada tumbuhan yang memiliki efek biologis mirip estrogen dan bersifat antioksidan (Otieno dkk., 2006).

Senyawa isoflavon banyak terdapat pada tanaman kacang-kacangan seperti kedelai (Chang T.S, 2009). Senyawa tersebut ditemukan pada kedelai dalam jumlah signifikan (Zhang dkk., 2007). Kedelai memiliki kandungan total isoflavon sebesar 1,2-4,2 mg/g sampel kering (Rostagno dkk., 2004). Pada penelitian kali ini, digunakan kedelai sayur atau edamame (*Glycine max* L.

Merrill), yang berbeda dari penelitian sebelumnya yaitu kedelai varietas Baluran (Praharini, 2015; Yunindarwati dkk., 2016). Edamame dipilih karena produksinya di Jember melimpah dan merupakan salah satu komoditi ekspor terbesar di Indonesia (Wibisono dan Warsito, 2009).

Kandungan isoflavon dalam kedelai mayoritas dalam bentuk glikosida seperti genistin dan daidzin (Teekachunhatean dkk., 2013). Padahal senyawa isoflavon glikosida memiliki aktivitas biologis lebih rendah daripada bentuk aglikon bebasnya seperti genistein, dan daidzein (Fengshan dkk., 2004). Oleh karena itu, isoflavon glikosida harus diubah menjadi bentuk aglikon, salah satunya melalui proses fermentasi (Lee dan Chou, 2006). Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Suprihatin, 2010). Salah satu enzim yang berperan dalam fermentasi adalah β -glukosidase (Huynh dkk., 2014).

Enzim β -glukosidase dapat dihasilkan oleh bakteri di saluran pencernaan (Setchel dkk., 2002). Selain dihasilkan oleh bakteri di saluran pencernaan, enzim β -glukosidase tersebut juga dapat dihasilkan oleh khamir dan kapang (Setyaningsih dkk., 2006). Beberapa penelitian telah membuktikan fermentasi kedelai menggunakan kapang dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon. Kedelai yang difermentasi menggunakan *Aspergillus oryzae* dapat meningkatkan kadar genistein sebesar $0,1256 \pm 0,00362$ % (b/b) pada hari ke-3 (Yunindarwati dkk., 2016). Sedangkan pada penelitian Praharini (2015), digunakan *Rhizopus oligosporus* dan dapat meningkatkan kadar genistein sebesar $0,12147 \pm 0,0014$ % (b/b) pada hari ke-3. Oleh karena itu, penelitian ini akan digunakan kombinasi dari kedua kapang tersebut untuk melihat apakah bisa lebih meningkatkan kadar genistein daripada penggunaan tunggal seperti yang sudah digunakan sebelumnya.

Pada penelitian kali ini akan dilakukan pengukuran kadar senyawa salah satu isoflavon aglikon yaitu genistein. Genistein dipilih karena genistein merupakan senyawa isoflavon aglikon dengan kadar paling tinggi dibandingkan dengan daidzein dan glisitein (6:3:1) yang terkandung dalam kedelai (Rostagno dkk., 2004). Genistein tersebut akan diukur kadarnya menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan densitometri. KLT-densitometri memiliki

beberapa keuntungan yaitu menggunakan fase gerak yang sedikit, waktu yang relatif singkat dan dapat dilakukan penetapan kadar beberapa sampel secara simultan dengan preparasi yang mudah (Sugihartini dkk., 2012).

Metode analisis dalam penelitian kali ini mengalami perkembangan dengan adanya perbedaan sampel dan modifikasi dari metode yang ada sebelumnya, sehingga perlu divalidasi dengan menggunakan beberapa parameter, meliputi linearitas, selektivitas/spesifisitas, penetapan batas deteksi, batas kuantitasi, presisi, dan akurasi (Sugihartini dkk., 2012). Metode analisis harus divalidasi agar hasil yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, permasalahan yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah:

- a. Bagaimanakah kondisi optimum penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame terfermentasi dengan metode KLT-densitometri?
- b. Bagaimanakah validitas metode penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame terfermentasi dengan metode KLT-densitometri yang meliputi parameter linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantitasi, dan selektivitas/spesifisitas?
- c. Bagaimanakah pengaruh fermentasi edamame dengan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar senyawa genistein?

1.3 Tujuan Penelitian

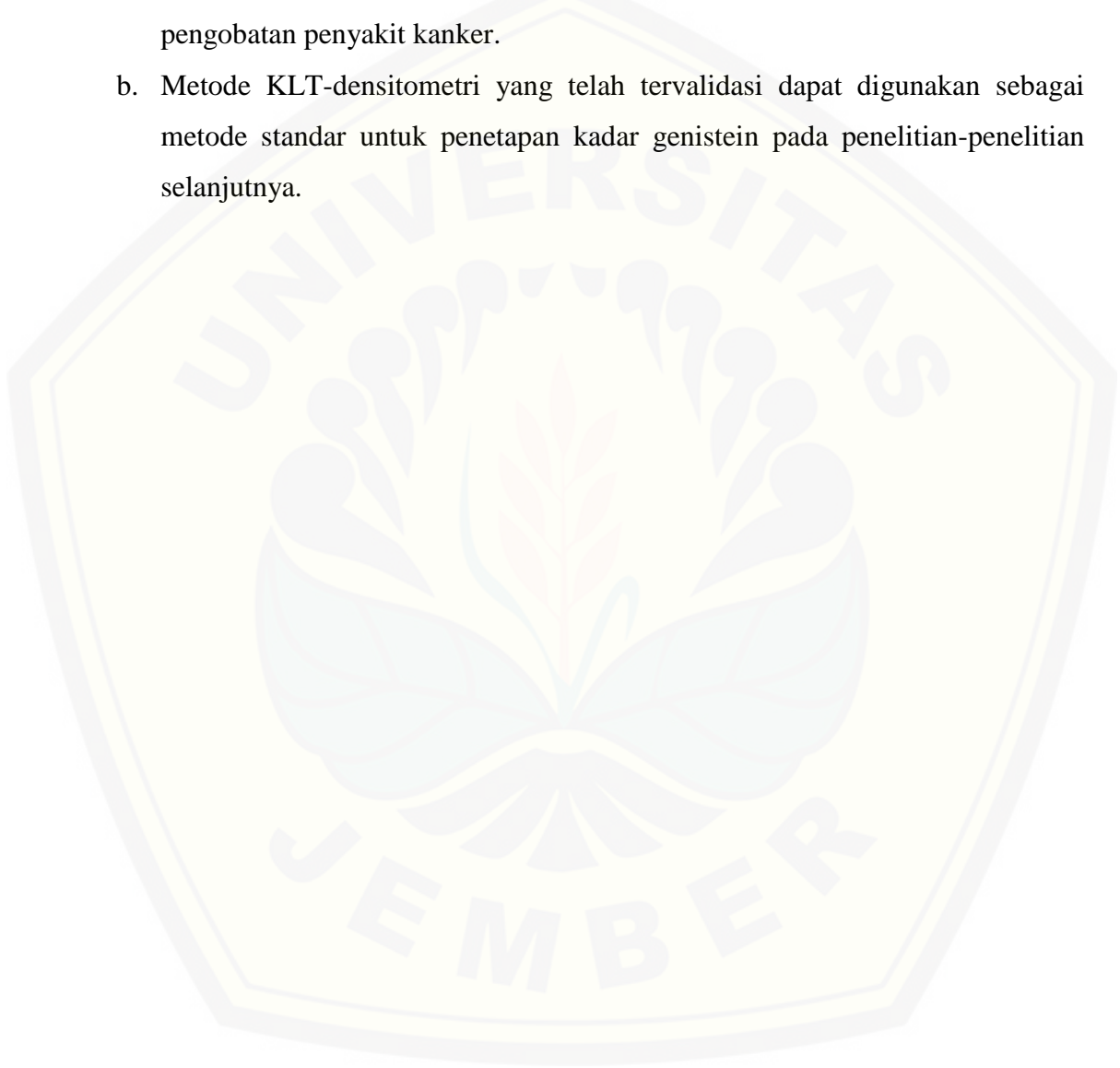
Tujuan dari penelitian ini untuk:

- a. Mengetahui kondisi optimum penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame terfermentasi dengan metode KLT-densitometri.
- b. Mengetahui validitas metode KLT-densitometri pada penentuan kadar genistein dalam edamame terfermentasi meliputi pemenuhan parameter linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantitasi, dan selektivitas/spesifisitas.
- c. Mengetahui pengaruh fermentasi edamame dengan kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* terhadap kadar senyawa genistein.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan dari penelitian ini, masyarakat mendapatkan informasi pengetahuan sebagai berikut:

- a. Pemanfaatan kedelai edamame yang terfermentasi oleh kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* untuk penelitian selanjutnya tentang pencegahan dan pengobatan penyakit kanker.
- b. Metode KLT-densitometri yang telah tervalidasi dapat digunakan sebagai metode standar untuk penetapan kadar genistein pada penelitian-penelitian selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Kedelai Edamame

2.1.1 Klasifikasi Kedelai Edamame (*Glycine max* L. Merrill)

Menurut *United States Department of Agricultural* (USDA) (2010)

klasifikasi edamame dalam taksonomi tumbuhan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i>
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.) Merrill

2.1.2 Uraian tentang Edamame

Edamame atau kedelai sayur (*vegetable soybean*) merupakan sejenis kedelai yang berasal dari Jepang dan memiliki nilai jual yang lebih tinggi dibandingkan dengan kedelai biasa. Edamame dipanen sebagai sayuran disaat benih belum sepenuhnya matang (stadium R-6 atau R-7) dan benih telah mengisi 80% sampai 90% lebar polong, sedangkan kedelai (*grain soybean*) umumnya dipanen pada stadium R-8. Benih kedelai edamame ini kaya akan protein dan memiliki khasiat tinggi. Namun, walaupun edamame sangat mirip dengan kacang kedelai, edamame berbeda dari kedelai biasa karena memiliki hilum yang jelas, ukuran benihnya yang relatif lebih besar, dan karakteristik indrawi yang unik (Gambar 2.1). Meskipun edamame pertama kali diperkenalkan di China ada tahun 200 sebelum Masehi, namun penggunaan edamame yang tercatat pertama kali di Jepang tepatnya di Englishiki pada tahun 927 setelah Masehi. Saat ini Jepang

merupakan produsen komersial terbesar yang dapat menghasilkan sekitar 105.000 ton (Konovsky dkk., 1994).



Gambar 2. 1 Biji kedelai edamame (*Glycine max* (L.) Merrill) (dokumentasi pribadi)

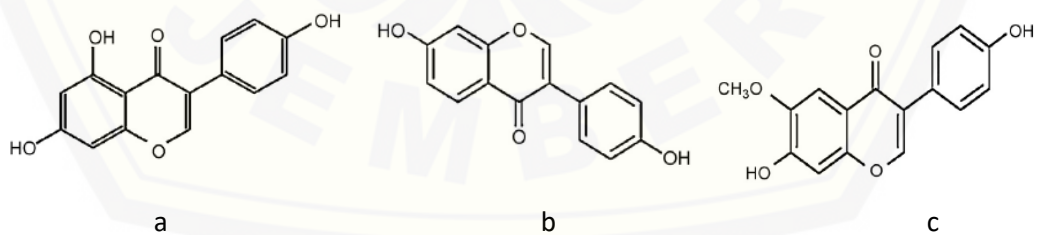
Tanaman edamame biasanya setinggi 60 sampai 90 cm, namun bisa tumbuh setinggi 2 m, bergantung pada varietas dan lingkungan hidupnya. Daunnya majemuk, berbulu lebat, dengan jumlah tiga helai (trifoliat). Bunga berwarna putih dan ungu yang tidak mencolok yang jumlahnya satu tiap *axils* (sudut atas antara tangkai daun atau cabang dengan batang) (Bailey dkk., 1976). Berbagai varietas edamame yang pernah dikembangkan di Indonesia antara lain Ocnami, Tsuronoko, Tsurumidori, Taiso dan Ryokkoh. Warna bunga varietas Ryokkoh adalah putih, sedangkan varietas yang lainnya ungu. Saat ini varietas yang dikembangkan untuk produk edamame beku adalah Ryokkoh asal Jepang dan R 75 asal Taiwan (Samsu, 2001). Buahnya berupa polong berbulu halus secara merata dengan panjang sekitar 10 cm. Setiap tanaman biasanya menghasilkan 100 sampai 150 polong (Faostat, 2012).

2.1.3 Kandungan Kimia Edamame

Edamame memiliki banyak manfaat bagi tubuh. Selain rasanya yang nikmat, edamame merupakan sumber protein yang baik. Daya cernanya lebih baik karena kandungan tripsin-inhibitor tergolong rendah. Dalam satu mangkuk kecil edamame, terdapat sekitar 17 gram protein. Kandungan lain edamame adalah asam amino esensial. Satu porsi edamame berkontribusi sekitar 10% asupan harian zat besi dan vitamin C, asupan harian vitamin A, 8.1 gram serat, dan

mengandung 189 kilo kalori. Tidak hanya itu, kandungan isoflavon yang dimiliki edamame bersifat antioksidan sehingga dapat mendukung sistem imun, terutama dalam menangkal radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker, penuaan dini, dan berbagai macam penyakit lainnya (Barru dkk., 2013).

Isoflavon merupakan salah satu senyawa fitokimia yang ditemukan dalam kedelai dalam jumlah besar. Kandungan isoflavon saat biji kedelai muda lebih tinggi daripada pada kedelai biji tua (Mebrahtu dkk., 2004). Isoflavon banyak terdapat di kotiledon, sekitar 80-90% (Tsukamoto dkk., 1995). Isoflavon merupakan senyawa heterosiklik golongan flavonoid yang mengandung rangka 3-fenilkroman yang terhidroksilasi pada posisi 4' dan 7 (Luthria dkk., 2007; Rahayu, 2012). Senyawa isoflavon dalam kedelai ditemukan dalam bentuk glikosida (genistin, daidzin, glisitin), dan aglikon (genistein, daidzein, glisitein) (Yoshiara dkk., 2012). Adanya enzim malonil-transferase (MT) mengubah genistin, daidzin, dan genistin menjadi malonil glikosida (malonilgenistin, malonildaizidin, malonilglisitin), serta dengan adanya enzim asetil-transferase dapat dihasilkan asetilgenistein, asetil daidzein, asetilglisitin (Dhaubhadel, 2011). Menurut Bhagwat dkk. (2008), 100 gram edamame mengandung genistein 22,57 mg, daidzein 20,43 mg, glisitein 7,57 mg, dan total isoflavon sebanyak 48,95 mg. Struktur kimia senyawa isoflavon aglikon edamame dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2. 2 Struktur kimia isoflavon aglikon a. Genistein b. Daidzein c. Glisitein (He and Chen, 2013)

Dua belas isomer isoflavon terdiri dari tiga aglikon dan sembilan glukosida. Kedelai mengandung dua aglikon isoflavon mayor yaitu genistein dan daidzein, serta glycitein aglikon minor. Sedangkan sembilan isoflavon glukosida

adalah daidzin, genistin, glisitin; 6"-O-asetildaidzin, -genistin, atau -glisitin; dan 6"-O-malonildaidzin, -genistin, atau -glisitin (Wang dan Murphy, 1994). Dalam tanaman, isoflavon umumnya terdapat dalam bentuk glikosida (Yamaguchi dan Gao-Balch, 2013).

2.1.4 Penelitian Terkait yang Pernah Diteliti

Senyawa isoflavon mempunyai banyak manfaat yang sudah pernah diteliti. Isoflavon terkenal bermanfaat sebagai antioksidan, yaitu mampu menangkap radikal bebas dan menetralkannya (Muaris, 2013). Pada penelitian Barru dkk., (2013), ekstrak etanol biji edamame terbukti bermanfaat sebagai antioksidan dengan hasil IC_{50} sebesar 177,2 ppm menggunakan metode DPPH, namun masih termasuk dalam antioksidan lemah berdasarkan klasifikasi tabel blois. Sedangkan menurut Kusumawati dkk., (2015), IC_{50} pada ekstrak edamame 92,8 ppm dan nilai IC_{50} dibawah 100 tersebut sudah baik untuk agen pemutih kulit alami. Namun nilai tersebut masih dibawah tanaman *Smillax china*, *Eugenia dysenterica*, dan *Pouteria torta* yang biasa dibuat agen pemutih kulit di Indonesia (Batubara dkk., 2010). Hal tersebut mungkin karena edamame yang digunakan dalam bentuk segar, sehingga kandungan isoflavon aglikon yang mempunyai aktivitas biologis tinggi masih berjumlah sedikit.

Penelitian yang dilakukan oleh Yunindarwati dkk. (2016), kadar salah satu isoflavon aglikon (genistein) pada kedelai varietas Baluran terfermentasi oleh kapang *A.oryzae* ditetapkan kadar dan diuji aktivitas hambatan tirosinasenya. Hasilnya genistein semakin meningkat pada fermentasi hari ke 1,2, dan 3, sedangkan hari ke-4 menurun, sehingga aktivitas hambatan tirosinasenya juga meningkat pada hari ke 1,2, dan 3, hari ke-4 menurun, sebanding dengan kadar genisteinnya. Begitu pula menurut Praharini, (2015), yang juga menguji aktivitas hambatan tirosinase pada ekstrak kedelai terfermentasi namun menggunakan kapang *R. oligosporus* dan hasilnya sama seperti sebelumnya yaitu meningkatnya aktivitas hambatan tirosinase sebanding dengan kadar genistein yang meningkat akibat fermentasi. Hasil yang sama juga terbukti pada penelitian pada kedelai varietas Detam 1 dan Wilis, kedelai dijadikan tempe dengan fermentasi ragi

menghasilkan kadar genistein lebih tinggi yaitu 576 $\mu\text{g/g}$ daripada non-fermentasi yaitu 150 $\mu\text{g/g}$ (Hidayat dkk., 2010).

2.1.5 Pengaruh Fermentasi terhadap Kandungan Isoflavon

Pengertian fermentasi adalah suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Suprihatin, 2010). Fermentasi ini merupakan salah satu cara untuk dapat meningkatkan jumlah isoflavon aglikon. Izumi dkk. (2000) menyebutkan bahwa bentuk isoflavon aglikon lebih mudah diserap oleh tubuh manusia dibandingkan bentuk glukosidanya baik dalam dosis rendah maupun tinggi, sehingga produk yang kaya akan isoflavon aglikon lebih efektif dalam mencegah penyakit kronis seperti jantung koroner. Bentuk isoflavon kedelai dari produk yang difermentasi seperti tempe, natto dan kecap juga diketahui lebih mudah diserap dibandingkan produk yang tidak difermentasi (Hutchins dkk., 1995).

Bentuk isoflavon glukosida memiliki tingkat penyerapan yang rendah di dalam usus karena berat molekul yang besar sehingga perlu diubah menjadi bentuk aglikonnya dengan peran enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh bakteri di saluran pencernaan (Setchell dkk., 2002). Selain melalui peran bakteri di saluran pencernaan, enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh kapang, khamir atau bakteri asam laktat selama proses fermentasi kedelai juga dapat membantu proses konversi tersebut. Oleh karena itu, mikroba dengan aktivitas enzim β -glukosidase yang tinggi berpotensi penting dalam produksi komponen isoflavon yang lebih tinggi dengan bioavailabilitas yang lebih baik (Hur dkk., 2000).

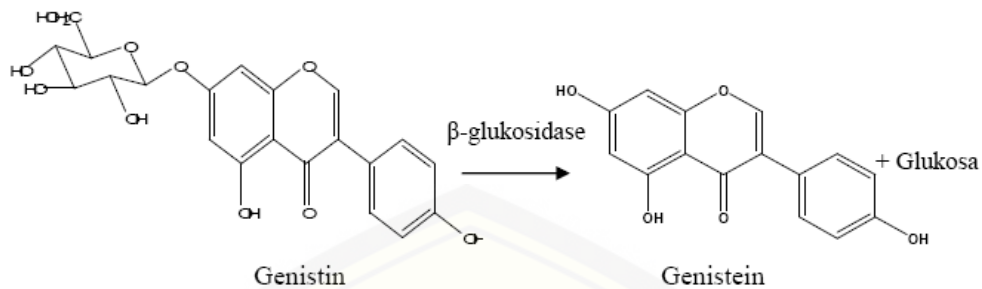
2.1.6 Pengaruh Kapang terhadap Biotransformasi Genistein

Enzim β -glukosidase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan glikosidik untuk melepaskan residu terminal glukosil non pereduksi dari glikosida dan oligosakarida. Enzim ini dapat dihasilkan secara ekstraseluler maupun intraseluler tergantung dari jenis mikroba yang menghasilkannya (Ketudat Cairns dan Esen, 2010). β -glukosidase pada kapang bekerja dengan cara deglikosilasi isoflavon.

Deglikosilasi merupakan proses penghilangan gugus glikosil akibat aktivitas glikosil hidrolase. Glukosa yang berikatan pada flavonoid posisi C3 dan C7 akan diserang oleh enzim β -glukosidase, sehingga ikatan β -1,4-glikosidat pada aril dan alkil β -D-glukosida dapat terhidrolisis (Huynh dkk., 2014). Kapang yang biasanya digunakan dalam fermentasi makanan adalah *R. oligosporus* atau *R. oryzae* untuk pembuatan tempe dan oncom, *A. oryzae* untuk pembuatan kecap dan koji (Fardiaz, 1992). Penggunaan kapang dikarenakan kapang tidak bersifat toksik sehingga kemungkinan produk yang dihasilkan akan bersifat toksik sangat kecil atau bahkan tidak ada (Enari, 1983).

Jenis kapang yang digunakan dalam fermentasi kedelai berpengaruh juga terhadap kadar isoflavon yang dihasilkan. Kedelai yang difermentasi dari kapang *R. oligosporus* memiliki kadar aglikon (genistein dan daidzein) lebih tinggi dibandingkan dengan hasil dari *R. oryzae*. Kedelai fermentasi hasil *R. oligosporus* memiliki isoflavon aglikon lebih tinggi, sekitar 2 kali dibandingkan *R. oryzae* yang hanya menghasilkan isoflavon aglikon sekitar 300 $\mu\text{g/g}$ (Purwoko dkk., 2001). Kemudian ada juga salah satu golongan kapang yang mampu menghasilkan β -glukosidase lebih besar daripada spesies lainnya yaitu *Aspergillus* (Machida dkk., 2008). β -glukosidase yang dihasilkan oleh *A. oryzae* BCC 3088 pada kedelai yang difermentasi suhu 30⁰C selama 4 hari menunjukkan adanya penurunan 2,4 kali jumlah total senyawa glikosida, dan peningkatan 2 kali total senyawa aglikon (Punjaisee, 2011).

Untuk penelitian ini, jenis kapang yang digunakan adalah kombinasi dari keduanya yaitu *A. oryzae* dan *R. oligosporus*, dengan harapan dapat meningkatkan proses deglikosilasi isoflavon sehingga menyebabkan transformasi isoflavon glikosida (genistin) menjadi aglikon (genistein) (Huynh dkk., 2014; Pandit dkk., 2011). Proses biotransformasi genistin menjadi genistein dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2. 3 Proses biotransformasi genistin menjadi genistein oleh enzim β -glukosidase (Pandit *et al.*, 2011)

2.2 Validasi Metode Analisis

Validasi adalah suatu pembuktian terhadap suatu parameter berdasarkan hasil laboratorium bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Gandjar dan Rohman, 2007). Tujuan dilakukan validasi adalah sebagai verifikasi bahwa parameter-parameter kinerja metode analisis cukup mampu untuk mengatasi problem analisis. Validasi harus dilakukan terhadap metode non-standar dan metode yang dikembangkan laboratorium (Riyanto, 2014).

Beberapa alasan metode analisis harus selalu divalidasi yaitu:

- Metode baru dikembangkan untuk mengatasi masalah analisis tertentu.
- Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena terjadi suatu masalah yang mengarahkan agar metode tersebut harus direvisi.
- Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah.
- Metode baku yang dilakukan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analisis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
- Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode seperti metode baru dan metode baku (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pada penelitian ini, penetapan kadar genistein pada ekstrak edamame menggunakan metode analisis KLT-densitometri. Metode analisis KLT-densitometri ini dapat digunakan untuk analisis preparatif, kualitatif dan

kuantitatif. Secara preparatif metode ini akan memisahkan senyawa campuran, sedangkan analisis kualitatif suatu analit dalam KLT dilakukan dengan cara membandingkan noda kromatogram analit tersebut dengan noda zat standar (*reference standard*) yang dikenal sebagai *retardation factor* (Rf). Selain itu, secara kuantitatif metode ini dilakukan penentuan langsung noda kromatogram dengan cara membandingkan area noda sampel dengan area noda standar pada pelat KLT dengan menggunakan alat densitometri (Sherma dan Fried, 2003).

Metode analisis KLT-densitometri yang digunakan harus divalidasi terlebih dahulu, karena suatu metode analisis akan dapat memberikan data yang valid dan dipercaya apabila telah dilakukan validasi sebelumnya, serta membuktikan bahwa parameter-parameter kinerjanya mampu mengatasi masalah analisis tertentu serta untuk menjamin bahwa metode analisis tersebut akurat, spesifik, reproduibel, dan mampu menganalisis analit tertentu pada kisaran konsentrasi tertentu (Rohman, 2009). Sebelum dilakukan validasi dengan beberapa parameter tersebut, diperlukan optimasi kondisi analisis terlebih dahulu agar kualitas pemisahan meningkat, karena prinsip dari kromatografi sendiri adalah pemisahan analit dari campuran (Kowalska dan Prus, 2003).

2.2.1 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi yang perlu dilakukan adalah optimasi kondisi analisis karena untuk mendapatkan pemisahan yang baik harus digunakan kondisi analisis yang optimum. Pemilihan kondisi analisis yang akan digunakan didasarkan pada penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi. Parameter yang menentukan efisiensi kromatogram antara lain nilai resolusi (Rs), nilai *theoretical plate* (N), dan nilai *height equivalent of theoretical plate* (H). Kriteria parameter efisiensi kromatogram yang dipilih meliputi nilai N yang paling besar, nilai H yang terkecil, nilai Rf antara 0,2-0,8, dan menghasilkan kromatogram dengan puncak genistein yang simetris dengan nilai Rs >1,5 (Wulandari, 2011).

a. Resolusi (Rs)

Resolusi meruakan kemampuan untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Resolusi yang baik yaitu > 1,5, karena semakin besar nilai resolusi maka

pemisahan yang akan terjadi semakin baik. Apabila resolusi kromatografi kecil yaitu kurang dari 1,5 maka metode tersebut perlu dilakukan evaluasi kondisi analisis yang digunakan. Secara matematik nilai Rs dapat dirumuskan menggunakan Persamaan 2.1.

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

Keterangan:

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

(Z)a = jarak migrasi zat a

(Z)b = jarak migrasi zat b

Wa = lebar dasar puncak zat a

(Wulandari, 2011)

b. Nilai *theoretical plate* (N)

Nilai ini merupakan nilai atau angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik nilai N dapat dirumuskan dengan Persamaan 2.2.

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

Keterangan:

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

W = lebar dasar puncak

Zs = jarak migrasi analit

(Wulandari, 2011)

c. Nilai *height equivalent of theoretical plate* (H)

Nilai H merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan dengan Persamaan 2.3.

$$H = \frac{Z_f}{N} \dots\dots\dots (2.3)$$

Keterangan :

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

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

Zf = jarak migrasi fase gerak

(Wulandari, 2011)

2.2.2 Parameter Validasi

a. Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode analisis yang memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel, baik secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik (Harmita, 2004). Metode analisis dikatakan linier ketika hubungan antara respon metode berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam rentang konsentrasi (Riyanto, 2014).

Setelah didapatkan persamaan regresi linier $Y = bx + a$, sebuah koefisien korelasi (R) yang tinggi yaitu mendekati 1 atau -1 (bergantung pada arah garis) akan didapat dan sering digunakan sebagai kriteria linieritas. Batas diterimanya nilai R adalah $> 0,3$, jika $< 0,3$ maka dikatakan tidak valid, dibuang atau direvisi (Sugiyono, 2009). Kriteria interpretasi nilai R dalam dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Pedoman memberikan intrepretasi koefisien korelasi (R)

Interval koefisien	Tingkat hubungan
0,80 – 1,000	Sangat kuat
0,60 – 0,799	Kuat
0,40 – 0,599	Cukup kuat
0,20 – 0,399	Rendah
0,00 – 0,199	Sangat rendah

Sumber: Sugiyono, 2005

Namun, nilai R tidak cukup untuk membuktikan bahwa hubungan linear tersebut ada, karena metode dengan koefisien korelasi kurang dari 0.99 mungkin masih cocok untuk tujuan penggunaan (Riyanto, 2014). Oleh karena itu, untuk mengindikasikan linieritas, tidak hanya menggunakan nilai R saja tetapi harus

ditambah dengan parameter lain seperti nilai standar deviasi (V_{x0}) dan X_p . Pada pengujian parameter ini, disarankan untuk menggunakan 5-10 tingkat konsentrasi standar dengan rentang 80-200%, 25-200%, atau 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto dan Suwono, 2003).

b. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi dan diidentifikasi, serta memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter yang dapat dipengaruhi oleh perubahan kecil dalam sistem analitis (misalnya suhu, kemurnian reagen, efek matriks, kondisi analisis) (Riyanto, 2014). Sedangkan batas kuantitasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). Pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dilakukan dengan menggunakan 5-10 tingkat konsentrasi analit yang relatif rendah (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

Ada beberapa metode untuk menentukan batas deteksi dan kuantitasi, yang semuanya tergantung pada analisis spesimen dan pemeriksaan sinyal untuk rasio kebisingan blanko. Menurut *International Conference on Harmonization (ICH)*, (1994), penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dapat menggunakan 4 cara yaitu:

1) Metode *signal to noise*

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

2) Inspeksi visual

Batas deteksi ditentukan oleh analisis sampel yang berisi konsentrasi analit dan batas deteksi merupakan konsentrasi minimum dimana analit masih terdeteksi.

3) Standar deviasi dari respon berdasarkan standar deviasi blanko

Pengukuran besarnya respon latar belakang analisis dilakukan dengan menganalisis blanko dan menghitung standar deviasi dari respon blanko. Selain itu, batas deteksi dan batas kuantitasi juga dapat ditentukan dari rasio standar deviasi respon blanko menggunakan standar deviasi residual dari

garis kalibrasi atau standar deviasi *intercept* (s) dan *slope* (S) melalui Persamaan 2.4 dan 2.5.

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

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

4) Standar deviasi dari respon berdasarkan kemiringan kurva kalibrasi

Sebuah kurva kalibrasi tertentu dievaluasi dengan menggunakan larutan yang mengandung analit dalam kisaran batas deteksi. Residual standar deviasi dari garis regresi atau standar deviasi dari intersep dari y dapat digunakan sebagai standar deviasi. Pada pendekatan ini, nilai parameter linieritas seperti r , V_{x0} dan X_p harus terpenuhi terlebih dahulu.

c. Selektivitas/spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Tujuan dilakukan pengujian ini adalah untuk menunjukkan bahwa suatu metode tidak memberikan respon yang positif terhadap senyawa atau analit lain (Harmita, 2004).

Pada uji selektivitas parameternya ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) dimana nilai R_s sebaiknya lebih dari 1,5 (Harmita, 2004). Sedangkan 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 berkolerasi dengan puncak maksimum spektra. Kolerasi ini diidentifikasi sebagai $r(s,m)$ pada winCATS, dengan s menunjukkan mulai puncak dan m menunjukkan puncak maksimum. Korelasi dari spektra diambil pada puncak maksimum dengan salah satu lereng bawah atau akhir puncak, di winCATS bernama $r(m,e)$, dengan m menunjukkan puncak maksimum dan e merupakan akhir puncak (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

d. Presisi

Presisi adalah ukuran kedekatan hasil analisis yang diperoleh dari serangkaian pengukuran ulangan dari ukuran yang sama. Hal ini mencerminkan

kesalahan acak yang terjadi dalam sebuah metode (Riyanto, 2014). Pada penentuan presisi, menurut *International Conference on Harmonization* (ICH) (1994) dapat dilakukan pada 3 kategori yaitu:

1) Repeatabilitas

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

2) Presisi antara

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

3) Reprodusibilitas

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

Dari ketiga kategori di atas, yang wajib dilakukan adalah repeatabilitas dan presisi antara (Indrayanto dan Yuwono, 2003). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita, 2004). Kriteria penerimaan uji presisi ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2. 2 Konsentrasi analit berbanding RSD

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

Sumber: AOAC, 1998

e. Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya, biasanya dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Rentang nilai *mean recovery* yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2. 3 Persen perolehan kembali (*recovery*) analit pada konsentrasi yang berbeda

Analit (%)	Unit	RSD (%)	Mean Recovery
100	100%	1,3	98-102
10	10%	1,9	98-102
1	1%	2,7	97-103
0,01	0,1%	3,7	95-105
0,001	100 ppm	5,3	90-107
0,0001	10 ppm	7,3	80-110
0,00001	1 ppm	11,0	80-110
0,000001	100 ppb	15,0	80-110
0,0000001	10 ppb	21,0	60-115
0,00000001	1 ppb	30,0	40-120

Sumber: AOAC, 1998

Perolehan kembali (*recovery*) dapat dihitung dengan Persamaan 2.6 sebagai berikut:

$$Recovery = \frac{C_F - C_A}{C^*_A} \times 100 \dots\dots\dots (2.6)$$

Keterangan:

C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C^*_A = konsentrasi analit yang ditambahkan

(Harmita, 2004).

Parameter akurasi dapat ditentukan dengan dua metode (Indrayanto dan Yuwono, 2003), yaitu:

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

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

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

Metode ini dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Penambahan analit ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30%-60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yaitu jenis penelitian *true experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh fermentasi kombinasi kapang *A. oryzae* dan *R. oligosporus* pada kedelai edamame terhadap kandungan isoflavon genistein pada hari ke 1, 2, 3, dan 4. Metode analisisnya kemudian divalidasi dengan parameter validasi linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantitasi, dan selektivitas/spesifisitas.

3.1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi & Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember pada bulan Januari 2018 – Juli 2018.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan dalam penelitian yaitu:

3.2.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan fermentasi yaitu waktu fermentasi pada edamame selama 1, 2, 3, dan 4 hari.

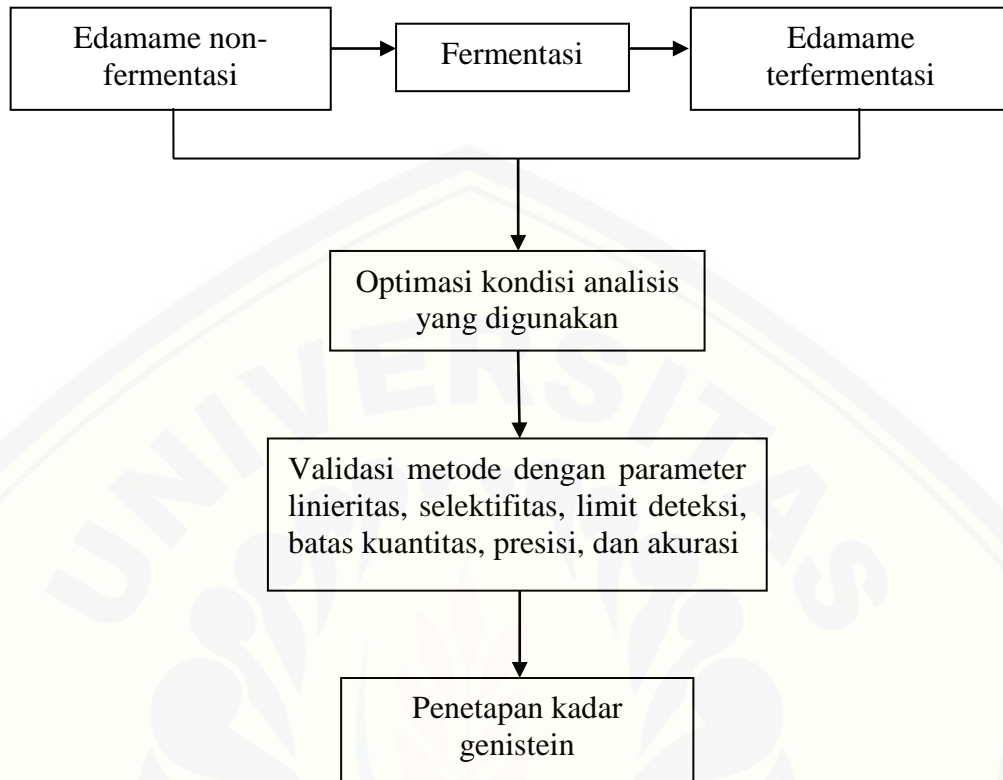
3.2.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar genistein dan parameter validasi linieritas, presisi, akurasi, limit deteksi, batas kuantitas, dan selektivitas.

3.2.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian kali ini adalah media pertumbuhan kapang, suhu inkubasi fermentasi edamame, suhu pengeringan sampel, inokulum fermentasi yang digunakan yakni suspensi spora kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang mengandung 10^6 spora/ml.

3.3 Rancangan Penelitian



Gambar 3. 1 Rancangan penelitian

3.3.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut:

- Preparasi sampel edamame non-fermentasi dan fermentasi.
- Preparasi sampel edamame non-fermentasi dan fermentasi dengan kombinasi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus*.
- Penghilangan lemak (*defatting*) dengan metode *soxhlet* menggunakan pelarut n-heksana.
- Ekstraksi simplisia edamame dengan pelarut etanol 70%.
- Optimasi kondisi analisis yang digunakan untuk analisis.
- Validasi metode KLT-Densitometri menggunakan beberapa parameter.
- Penetapan kadar genistein dari masing-masing ekstrak etanol edamame non-fermentasi maupun terfermentasi.

3.3.2 Definisi Operasional

Definisi operasional yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

- a. Kedelai edamame yang digunakan adalah kedelai varietas SPM 1 yang diperoleh dari PT.Mitratani Dua Tujuh Jember pada bulan Januari 2018 (waktu panen \pm 3 bulan).
- b. Preparasi suspensi kombinasi spora *A. oryzae* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi & Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Jember) dan *R. oligosporus* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember) sehingga mengandung 10^6 spora/ml.
- c. Optimasi kondisi analisis meliputi optimasi eluen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji yang digunakan untuk analisis.
- d. Validitas metode KLT-densitometri yang digunakan diukur dari terpenuhinya syarat parameter linieritas, presisi, akurasi, limit deteksi, batas kuantitas, dan selektivitas/spesifisitas.
- e. Penetapan kadar isoflavon aglikon dalam ekstrak menggunakan standar genistein menggunakan metode KLT-densitometri.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat Penelitian

Autoklaf (ALP), *laminar air flow* (Aairtech), mikropipet (Soccorex), hemasitometer (Neubauer Improved), mikroskop (Olympus BX53), inkubator (Imperial III), oven (memmert), *blender*, timbangan analitik digital (OHAUS), seperangkat alat *soxhlet*, alat-alat gelas, ultrasonikator (Elmasonic), *sentrifuge* (Hermle), *rotary evaporator* (Heildoph), seperangkat alat KLT (chamber, silika gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA), pipa kapiler), densitometer (TLC Scanner 3 Camag).

3.4.2 Bahan Penelitian

Kedelai edamame varietas SPM 1 yang diperoleh dari PT.Mitratani Dua Tujuh Jember, isolat *A. oryzae*, isolat *R. oligosporus*, *Potato Dextrose Agar* (BD difco), akuabides steril, tween 80, n-heksana teknis, etanol teknis 70%, metanol p.a (Fluka), etil asetat (Fluka), toluen (Smartlab), aseton (Fluka), standar genistein (Sigma Aldrich), asam format (Merck), akuades, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Kedelai Non-fermentasi (H_0)

Sebanyak 500 gram biji edamame dikeluarkan dari polongnya kemudian direndam dalam air hangat selama ± 30 menit untuk memudahkan melepas kulit arinya. Kemudian, kedelai disterilisasi dan dimatangkan menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan. Setelah dingin, edamame steril dipotong tipis lalu dikeringkan menggunakan oven suhu 60°C selama 30 jam. Simplisia dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Cheng dkk., 2013).

3.5.2 Peremajaan Isolat *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

Isolat *A. oryzae* diremajakan terlebih dahulu dengan cara memindahkan *A. oryzae* sebanyak dua ose ke dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 1 hari (Jayanti dkk., 2013). Begitu pula untuk isolat *R. oligosporus*, jamur diremajakan terlebih dahulu dengan cara memindahkan *R. oligosporus* sebanyak dua ose ke dalam media PDA miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari (Lee dkk., 2008)

3.5.3 Pembuatan Suspensi Spora Kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

Proses pembuatan suspensi spora kombinasi *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dilakukan di bawah *Laminar Air Flow* (LAF). Suspensi spora kombinasi dibuat dengan 10 ml aquadest yang mengandung 0,1% Tween 80 steril (1 ml akuades mengandung 10 μl Tween 80). Kemudian proses pemanenan masing-masing kapang dilakukan dengan mengeruk menggunakan ose steril secara perlahan (dipastikan media tidak terikut) lalu diresuspensi dengan mikropipet (Cheng dkk., 2013). Masing-masing suspensi spora yang diperoleh (10 ml tiap kapang) kemudian dihitung kepadatan sporanya hingga 10^6 spora/ml, lalu dicampur menjadi suspensi campuran 10 ml dengan kepadatan spora tetap 10^6 spora/ml.

3.5.4 Perhitungan Kepadatan Spora

Kepadatan spora hasil masing-masing kapang yaitu *A. oryzae* dan *R. oligosporus*, dihitung dengan menggunakan alat hemasitometer. Suspensi yang akan digunakan sebagai inokulum sampel edamame yaitu suspensi kombinasi

antara *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang mengandung kepadatan spora sebesar 10^6 spora/ml (Cheng dkk., 2013). Langkah-langkah perhitungan kepadatan spora kombinasi menggunakan kamar hitung *Improved Neubauer* dalam hemasitometer sebagai berikut:

- a. Suspensi spora yang telah homogen diteteskan sebanyak 10 μ l pada tiap bidang hitung hemasitometer, lalu ditutup dengan gelas penutup.
- b. Kemudian spora *A. oryzae* maupun *R. oligosporus* dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x, hingga didapatkan bidang hitung pada hemasitometer.
- c. Spora yang dihitung hanya yang terletak pada kotak hitung (1 + 2 + 3 + 4 + 5), seperti yang tersaji pada (Gambar 3.2).
- d. Cara perhitungan spora mengikuti aturan seperti yang dijelaskan dalam (Gambar 3.3), dimana spora yang terletak pada garis batas kotak hitung yang dihitung hanya pada sisi kiri dan atas.
- e. Setelah didapatkan jumlah spora pada kotak hitung 1, 2, 3, 4, dan 5, lalu dihitung jumlah spora/ml pada bidang hitung dengan Persamaan 3.1 sebagai berikut:

$$N = \frac{x}{t(mm) \times d \times l(mm^2)} \times 10^3 \dots\dots\dots(3.1)$$

Keterangan:

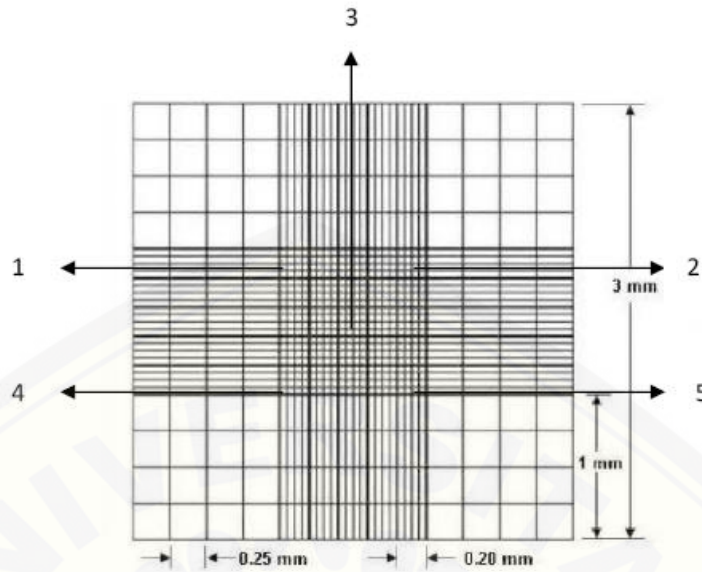
N : Jumlah spora/ml

x : Jumlah spora yang dihitung (1+2+3+4+5)

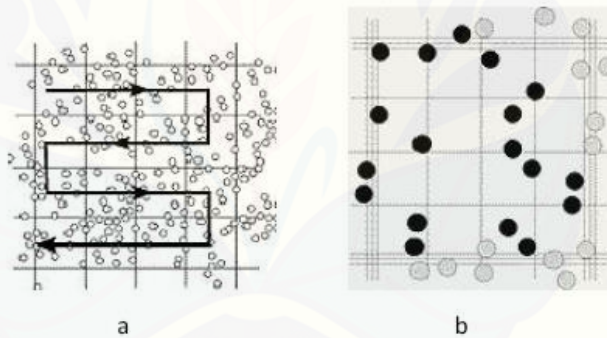
l : Luas kotak hitung ($0,04 \times 5 = 0,2 \text{ mm}^2$)

t : Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

10^3 : Volume suspensi yang diambil (1 ml = 10^3 mm^3) (Modifikasi dari Tim QC APH Golongan Jamur, 2009)



Gambar 3. 2 Daerah hitung hemasitometer *Improved Neubauer* (Hansen, 2000)



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

Jika setelah dihitung pada kamar hitung, spora yang didapat memiliki kepadatan lebih dari 1×10^6 spora/ml, maka dilakukan pengenceran dengan Persamaan 3.2.

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

Keterangan:

N1: Konsentrasi larutan stok (spora/ml)

V1: Volume larutan stok (ml)

N2: Konsentrasi larutan yang diinginkan (spora/ml)

V2: Volume larutan yang diinginkan (ml)

3.5.5 Preparasi Kedelai Fermentasi

Sebanyak 500 gram edamame dicuci kemudian direndam dalam air hangat selama \pm 30 menit untuk memudahkan membuang kulit ari. Kemudian, biji edamame disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit dan didinginkan. Fermentasi dilakukan dengan menambahkan 1 ml suspensi spora campuran yang mengandung 10^6 spora/ml (inokulum) pada tiap 50 gram biji edamame. Setelah dicampur, biji edamame dibungkus dengan kertas saring. Selanjutnya diinkubasi selama 1, 2, 3 dan 4 hari pada suhu 30° C dan didapatkan edamame terfermentasi bentuk padat (*solid-state fermentation*) dan tumbuh miselia berwarna putih. Kemudian edamame terfermentasi tersebut diiris tipis dan dikeringkan menggunakan oven suhu 60°C selama 30 jam. Setelah kering, simplisia kedelai fermentasi dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak menggunakan ayakan mesh 80 agar mencapai keseragaman bentuk dan bobot. Serbuk yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Lee dkk., 2008).

3.5.6 Proses Penghilangan Lemak

Proses penghilangan lemak pada serbuk edamame fermentasi dan non-fermentasi yang didapat menggunakan *soxhlet*. Sebanyak 40 g dari masing-masing serbuk dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam tabung ekstraktor/timbel dari *soxhlet* yang telah dirangkai. Kemudian ditambahkan pelarut n-heksana 200 ml (perbandingan 1 : 5). Selanjutnya dilakukan proses *defatting* selama 3 jam, lalu serbuk edamame yang telah dihilangkan lemaknya tersebut diambil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama satu malam dalam lemari asam. Serbuk lalu ditimbang untuk proses selanjutnya (Hui dkk., 2005).

3.5.7 Pembuatan Ekstrak Edamame

Serbuk bebas lemak yang didapat sebelumnya diekstraksi dengan cara ultrasonikasi menggunakan pelarut etanol 70 % selama 1 jam. Serbuk tersebut ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan pelarut etanol 70 % dengan perbandingan (1 : 6), lalu ditutup dengan alumunium foil. (Hui dkk., 2005). Setelah 1 jam ekstraksi berlangsung, larutan diendapkan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Residu

yang tersisa diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etanol 70 % yang baru. Proses tersebut dilakukan sebanyak 3 kali. Filtrat hasil *sentrifuge* dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental dan digunakan untuk proses selanjutnya (Luthria dkk., 2007).

3.5.8 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisi analisis diawali dengan preparasi larutan standar dan sampel ekstrak edamame. Preparasi larutan standar dilakukan dengan melarutkan genistein sebanyak 5 mg dalam 5 ml metanol p.a hingga didapat konsentrasi larutan induk 1000 ppm. Preparasi sampel ekstrak edamame dengan menimbang sebanyak 0,5 g dan dilarutkan dengan metanol p.a ad 5 ml, kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang mengandung genistein dipisahkan dari endapan dan dianalisis dengan eluen terpilih (Yuan dkk., 2006).

Kondisi analisis yang dioptimasi pada metode ini antara lain:

a. Optimasi panjang gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan memindai noda analit pada Densitometer dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang dilakukan pada area panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum paling tinggi yang digunakan untuk penelitian (Kusumawati, 2015).

b. Optimasi eluen

Berdasarkan hasil konsultasi dengan berbagai ahli dan percobaan dengan berbagai macam komponen, pada penelitian kali ini melakukan optimasi eluen dengan memodifikasi perbandingan komposisi eluen sebagai berikut:

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

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

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

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

Pengujian dilakukan dengan menotolkan 2 standar genistein dengan konsentrasi berbeda sebanyak 6 µl dan sampel ditotolkan sebanyak 6 µl pada lempeng KLT. Kemudian dieluasi dengan masing-masing eluen dan dipindai

pada panjang gelombang optimum hasil optimasi panjang gelombang. Pemilihan eluen optimum didasarkan pada parameter efisiensi kromatogram yang meliputi nilai N (*theoretical plate number*) yang paling besar, nilai H (*height equivalent of theoretical plate*) yang terkecil, nilai R_f antara 0,2-0,8, dan menghasilkan kromatogram dengan puncak genistein yang simetris dengan nilai $R_s > 1,5$ (Wulandari, 2011).

c. Optimasi konsentrasi uji

Optimasi konsentrasi uji menggunakan tiga konsentrasi uji setiap sampel. Penentuan konsentrasi uji didasarkan pada hasil optimasi eluen terpilih yang menunjukkan perkiraan kandungan genistein dalam sampel ekstrak edamame. Pembuatan sampel uji dilakukan dengan cara menimbang sejumlah tertentu ekstrak edamame dan dipreparasi seperti yang telah dijelaskan sebelumnya sehingga didapatkan larutan sampel yang mengandung genistein dengan konsentrasi yang sesuai dengan yang akan dioptimasi. Larutan sampel kemudian ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 6 μ l dan larutan standar sebanyak 6 μ l. Lempeng kemudian dieluasi menggunakan eluen terpilih dan dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi (Kusumawati, 2015). Pemilihan konsentrasi uji optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N yang paling besar, nilai H yang paling kecil, dan kemudahan preparasi sampel.

3.5.9 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis penentuan genistein dalam ekstrak edamame dengan metode KLT-densitometri meliputi parameter linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, selektivitas/spesifisitas, presisi, dan akurasi.

a. Linieritas

Larutan induk genistein diencerkan menggunakan metanol p.a dan dibuat seri konsentrasi standar dengan 6 tingkat konsentrasi dalam rentang konsentrasi uji hasil optimasi. Larutan standar kemudian ditotolkan pada lempeng KLT silika Gel 60 F254 masing-masing 6 μ l. Lempeng KLT kemudian dieluasi dengan eluen terpilih dan dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter linieritas menggunakan program *validation*

method of analysis. Kriteria penerimaan untuk linieritas adalah nilai $r \geq 0,99$, $VX0 < 5\%$ dan Xp lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto dan Yuwono, 2003)

b. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan mengeluasi 6 tingkat konsentrasi larutan standar di bawah konsentrasi linieritas dengan eluen terpilih dan dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dilakukan perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi menggunakan program *validation method of analysis* (Indrayanto dan Yuwono, 2003).

c. Selektivitas/spesifisitas

Sebanyak 2 konsentrasi standar genistein dengan konsentrasi berbeda ditotolkan sebanyak 6 μ l dan sampel dengan konsentrasi terpilih ditotolkan sebanyak 6 μ l pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan eluen terpilih dan dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Pengujian selektivitas ditentukan melalui perhitungan R_s dengan nilai yang diharapkan $> 1,5$. Parameter spesifitas ditentukan berdasarkan nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ pengujian *purity* dan nilai $r(s,s)$ dan $r(s,a)$ pengujian *identity* spektra genistein sampel dan standar. Nilai korelasi yang diharapkan $> 0,99$ (Harmita, 2004).

d. Presisi

Pengujian presisi yang dilakukan meliputi kategori repeatabilitas dan presisi antara. Dibuat seri konsentrasi standar dengan 6 tingkat konsentrasi ditotolkan sebanyak 6 μ l dan larutan sampel dengan salah satu konsentrasi terpilih (replikasi 6x) ditotolkan sebanyak 6 μ l. Lempeng KLT kemudian dieluasi dengan eluen terpilih dan dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Data RSD % b/b genistein dalam sampel digunakan sebagai data repeatabilitas. Prosedur pengujian repeatabilitas dilakukan sebanyak 3 kali pada hari yang berbeda untuk pengujian presisi antara. Kriteria penerimaan nilai RSD berdasarkan tabel penerimaan seperti tertera pada Tabel 2.1 (AOAC, 1998).

e. Akurasi

Pengujian parameter akurasi menggunakan metode penambahan standar (*standart addition method*). Pengujian akurasi dilakukan dengan dua tahap, yaitu

pembuatan sampel akurasi dengan penambahan dalam standar sebanyak 30%, 45%, dan 60% dari konsentrasi analit sampel sesuai dengan hasil uji presisi (repeatibilitas) dan pembuatan kurva baku (Harmita, 2004).

Pembuatan sampel akurasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, dan dilarutkan dengan sedikit metanol p.a. Selanjutnya ditambahkan sejumlah tertentu larutan standar yang mengandung genistein sebanyak 30%, 45%, dan 60% dari jumlah analit yang diperkirakan dalam sampel. Penotolan standar, penotolan sampel, eluasi, dan pemindaian dilakukan seperti pada pengujian presisi (Poin d). Nilai *recovery* dan RSD yang dipersyaratkan sesuai dengan tabel penerimaan yang tertera pada Tabel 2.2 (AOAC, 1998).

3.5.10 Penetapan Kadar Isoflavon Genistein

Salah satu isoflavon aglikon yang terdapat dalam kedelai edamame yaitu genistein dapat dilakukan penentuan kadar dengan menggunakan metode KLT-densitometri (Christin dkk., 2014).

a. Pembuatan larutan standar uji

Larutan induk standar genistein dibuat dengan cara menimbang 5 mg standar genistein kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. hingga didapat konsentrasi 500 µg/ml. Selanjutnya larutan induk tersebut diencerkan hingga didapatkan konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60, 80 µg/ml.

b. Pembuatan larutan sampel uji

Menimbang sampel ekstrak edamame non fermentasi dan terfermentasi hari 1, 2, 3, dan 4 masing-masing sebanyak 500 mg kemudian dilarutkan dalam 5 ml metanol p.a (dilakukan sebanyak 3 kali).

c. Penetapan kadar genistein dengan KLT-densitometri

Seri konsentrasi standar dengan 6 tingkat konsentrasi ditotolkan sebanyak 2 µl setiap totolan dan larutan uji (3x replikasi) ditotolkan sebanyak 6 µl setiap totolan pada lempeng KLT. Lempeng KLT kemudian dieluasi menggunakan eluen terpilih dan dipindai pada panjang gelombang hasil optimasi. Selanjutnya dihitung kadar genistein yang diperoleh dalam %b/b, lalu dihitung perolehan

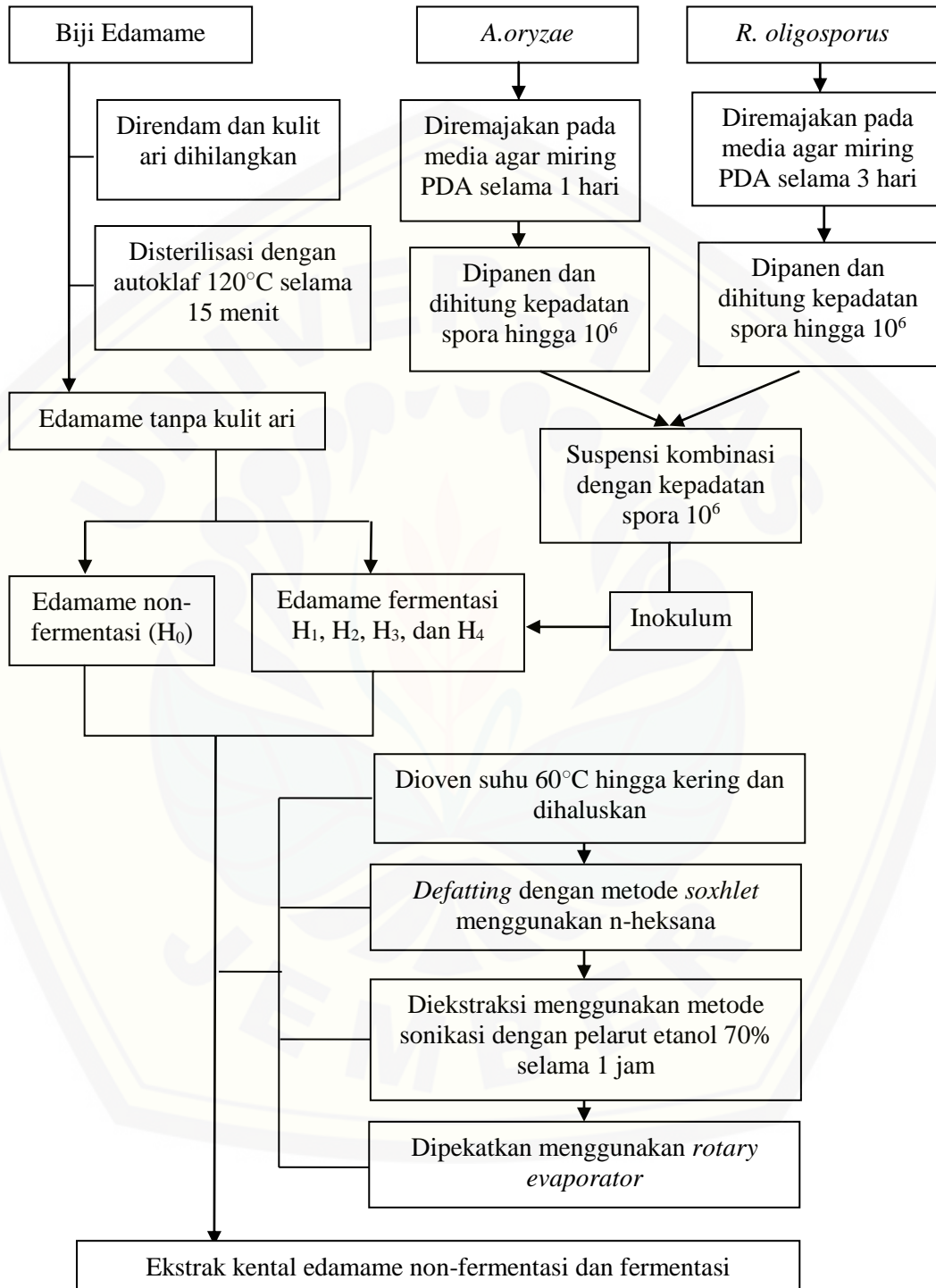
kembali (*recovery*) genistein dalam sampel. Kriteria penerimaan mean recovery sesuai dengan tabel penerimaan yang ditetapkan oleh AOAC (1998) pada Tabel 2.2.

3.6 Analisis Data

Data perolehan kadar genistein dalam sampel ekstrak edamame diolah untuk mengetahui perbedaan rata-rata kadar genistein yang diperoleh dari dua atau lebih kelompok melalui uji one way ANOVA. Beberapa asumsi yang harus dipenuhi pada uji ini adalah sampel berasal dari kelompok yang independen, varian antar kelompok harus homogen (uji homogenitas), dan data masing-masing kelompok berdistribusi normal (uji normalitas). Setelah semua asumsi terpenuhi, maka uji Anova dapat dilakukan dengan tujuan untuk melihat apakah data antar kelompok memiliki perbedaan yang bermakna atau tidak, dan melihat kelompok mana yang berbeda dengan uji Post Hoc LSD (*Least Significant Different*) pada kotak dialog anova (Besral, 2010).

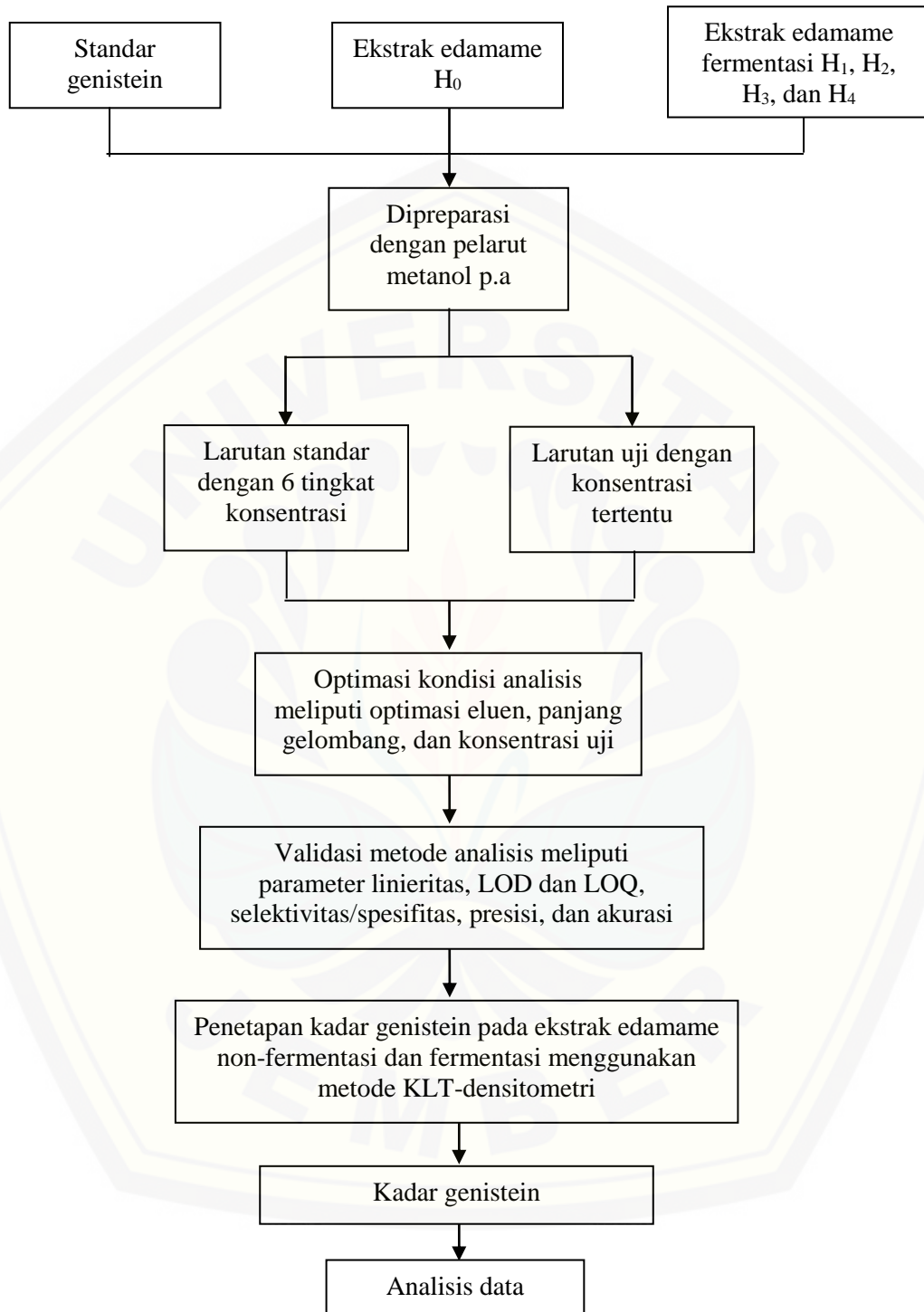
3.7 Skema Penelitian

3.7.1 Preparasi Ekstrak Kedelai Non-fermentasi dan Fermentasi



Gambar 3. 4 Skema alur pembuatan ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi

3.7.2 Penetapan Kadar Genistein dan Validasi Metode KLT-densitometri



Gambar 3. 5 Skema penetapan kadar ekstrak edamame dan validasi metode KLT-densitometri

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat berdasarkan hasil penelitian adalah:

- a. Kondisi optimal untuk analisis genistein dalam sampel ekstrak edamame yaitu eluen menggunakan n-heksan : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15), panjang gelombang pada 266 nm, dan konsentrasi uji yang digunakan pada konsentrasi 5,6; 6; 15,6; 17,8; dan 42 $\mu\text{g/ml}$.
- b. Metode analisis penetapan kadar genistein dalam ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi menggunakan KLT-densitometri memberikan analisis yang linier dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9989; V_{x0} = 3,51%; dan X_p = 26,745 ng; peka dalam nilai batas deteksi 24,932 ng dan batas kuantitasi 74,798 ng; kurang selektif karena R_s salah satu puncak genistein dengan puncak *unknown* < 1,5 yaitu sebesar 1,33, namun spesifik karena menghasilkan nilai korelasi spektra pada uji *purity* dan uji *identity* lebih dari 0,99; uji presisi menunjukkan hasil yang memenuhi syarat (< 5,3%) dengan RSD presisi repeatabilitas = 1,93% dan RSD presisi antara = 2,36%; dan akurat dengan *mean recovery* = $101,661 \pm 0,23$ %.
- c. Proses fermentasi edamame menggunakan kombinasi *R.oligosporus* dan *A.oryzae* dapat meningkatkan kadar genistein dalam sampel edamame terfermentasi dari hari ke-1 sampai hari ke-4. Akan tetapi kadar tersebut masih dibawah kadar genistein sampel non-fermentasi. Kadar genistein \pm SD dalam sampel H_0 , H_1 , H_2 , H_3 , dan H_4 secara berurutan adalah sebesar $0,0213 \pm 1,49 \times 10^{-3}$; $0,0047 \pm 1,42 \times 10^{-4}$; $0,0062 \pm 2,19 \times 10^{-4}$; $0,0106 \pm 2,38 \times 10^{-4}$; dan $0,0183 \pm 2,08 \times 10^{-4}$ %b/b.

5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan pada penelitian kali ini adalah:

- a. Analisis optimasi kondisi lanjutan diperlukan untuk mengetahui kondisi analisis yang dapat memisahkan senyawa isoflavon lebih baik, terutama dengan nilai log P yang berdekatan.

- b. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui penyebab dan mekanisme terjadinya fluktuasi kadar genistein dalam ekstrak edamame terfermentasi.
- c. Penelitian lanjutan tentang optimasi waktu fermentasi edamame juga diperlukan untuk melihat jika waktu fermentasi dilanjutkan, kadar genistein akan menurun atau meningkat pada hari-hari selanjutnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Ali, D. A., N. K. B. El-din, dan R. F. Abou-el-magd. 2015. Antioxidant and hepatoprotective activities of grape seeds and skin against ehrlich solid tumor induced oxidative stress in mice. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2(2):98–109.
- Anindya H.R., Sukandar U dan Harimawan A. 2014. *Deaminasi Tempe*. Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri ITB.
- AOAC. 1998. *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA : Arlington, Virginia.
- Bailey, L. H., Bailey, E. Z. 1976. *Hortus third: A Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada*. New York: Macmillan. 1290 pp.
- Barru, H., H. Fajar, E. F. Prabawati, dan A. F. 2013. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji edamame (*Glycin max* (L) Merrill) dengan metode DPPH. *Jurnal Ilmiah Kesehatan*. 1(1):27–31.
- Batubara, I., L. K. Darusman, T. Mitsunaga, M. Rahminiwati, dan E. Djauhari. 2010. Potency of Indonesian medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *Journal of Biological Sciences*. 10(2):132-144.
- Besral. 2010. *Pengolahan dan Analisis Data-1 Menggunakan SPSS*. Depok: Universitas Indonesia.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., dan Holden, J. M. 2008. USDA Database for the isoflavone content of selected foods, release 2.0. U.S. *Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory*. Available at: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/isoflav> [Diakses pada 12 Februari 2018]
- Bott, R. 2015. Data and Health Information of Cancer Situation. Jakarta: Buletin Jendela. Semester I, Juni. Halaman 4.
- Caderroth, C. dan N. Serge. 2009. Soy, Phytoestrogens and metabolism: a reviews. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304:30–42.
- Chang T.S. 2009. An update review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10:2440–2475.

- Cheng, K. C., J. Y. Wu, J. T. Lin, dan W. H. Liu. 2013. Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus spp.* *European Food Research and Technology*. 236(6):1107–1113.
- Christin, D., A. Putri, R. E. K. A. Putra, dan D. Chandra. 2014. Analisis kuantitatif isoflavon tempe secara cepat dan sederhana menggunakan metode kromatografi lapis tipis-densitometri. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. 11(1):13–17.
- Coral, A. 2008. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *American Journal Clinic Nutritions*. 71(suppl):1705S – 1707S.
- Departemen Kesehatan. 2002. *Survei Kesehatan Nasional, Laporan Studi Mortalitas 2001*. Jakarta: Depkes RI.
- Dhaubhadel, S. 2011. *Regulation of Isoflavonoid Biosynthesis in Soybean Seeds*. Kanada : Southern Crop Protection and Food Research Center. 243-258.
- Duan, W., I. C. Kuo, S. Selvarajan, K. Y. Chua, B. H. Bay, dan W. S. F. Wong. 2003. Antiinflammatory effects of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on a guinea pig model of asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 167(2):185–192.
- Enari, T. M. (1983). *Microbial Cellulase: w.m. Fogarty (ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology*. New York: Applied Science Pub. 183 halaman.
- Faostat. 2012. *Statistic Database of Agricultural Production*. Available at: <http://faostat.fao.org> [Diakses pada 10 Februari 2018]
- Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama
- Fengshan, M., E. Cholewa, T. Mohamed, C. Peterson, dan M. Guzen. 2004. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability in water. *Annals of Botany*. 94:213–228.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Hansen, P. J. 2000. *Use of a hemacytometer*. University of Florida: PJ Hansen Laboratory.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 117 – 135.

- He, F. dan J. Chen. 2013. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: differences between chinese women and women in western countries and possible mechanisms. *Food Science and Human Wellness*. 2(3-4):146–161.
- Hidayat, M., D. Kurnia, M. Sujatno, N. Sutadipura, Setiawan. 2010. Perbandingan kandungan makronutrisi dan isoflavon dari kedelai detam 1 dan wilis serta potensinya dalam menurunkan berat badan. *Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*. 12(1):5–13.
- Hui, M., Tiansheng, Q., dan Hai, Z. 2005. Methods for extracting, separating, identifying and quantifying daidzein and genistein. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 03. Abstract from: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YHS200503007.htm [15 Januari 2015].
- Hur H, Lay J, Beger RD, Freeman J, dan Rafii F. (2000). Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavones glycosides daidzin and genistin. *Archives of Microbiology*. 174:422–428.
- Hutchins AM, Slavin JL dan Lempe JW. (1995). Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *Journal of The American Dietetic Association*. 95: 545–551.
- Huynh, N., J. Camp, G. Smagghe, dan K. Raes. 2014. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 15:19369–19388.
- Imansari, Fanitika. 2018. Validasi metode dan pengaruh fermentasi kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* terhadap kadar daidzein edamame (*Glycine max* L.) menggunakan KLT densitometri. *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia.
- International Conference on Harmonisation (ICH). 1994. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. European Union, Japan, USA: ICH Expert Working Group.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glycosides in humans. *Journal of Nutrition*. 130: 1695–1699.

- Jayanti, D., Wuryanti, dan Taslimah. 2013. Isolasi, karakterisasi, dan amobilisasi α -amilase dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. *Journal of Chemistry Information*. 1(1): 76-84.
- Kamphaus, G. D., P. C. Colorado, D. J. Panka, H. Hopfer, R. Ramchandran, A. Torre, Y. Maeshima, J. W. Mier, V. P. Sukhatme, dan R. Kalluri. 2000. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(2):1209–1215.
- Ketudat Cairns, J. R. dan A. Esen. 2010. B-glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(20):3389–3405.
- Konovsky, J., Lumpkin, T.A. dan McClary, D., 1994. Edamame: The Vegetable Soybean. Pages 173-81 in A.D. O'Rourke (ed), *Understanding the Japanese Food and Agrimarket: A Multifaceted Opportunity*. Binghamton: Haworth Press.
- Kowalska, T. & Prus, W. 2003. *Optimization of Thin-Layer Chromatography in Encyclopedia of Chromatography*. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Kusumawati, L. A. I. 2015. Formulasi dan Evaluasi Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine max*) Sebagai Sediaan Krim Pemutih Kulit. *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi universitas Jember.
- Kusumawati, L. A. I., E. N. A. Dewi, O. C. Xenograf, K. Rifrianasari, dan M. A. Hidayat. 2015. Tyrosinase inhibition assay and skin whitening cream formulation of edamame extract (*Glycine max*). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 7(6):1167–1171.
- Lee, I. dan C. C. Chou. 2006. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *Journal of Agriculture Chemistry*. 54(4):1309–1314.
- Lee, I. H., Hung, Y. H., dan Chou, C. C. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and antocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*. 121 (2008): 150–156.
- Li, Y., J. Li, Y. M. Woo, Z. Shen, H. Yao, Y. Cai, M. C. mi Lin, dan W. S. Poon. 2017. Enhanced expression of vastatin inhibits angiogenesis and prolongs survival in murine orthotopic glioblastoma model. *BMC Cancer*. 17(1):1–10.
- Liu, X., X. Xue, H. Wang, dan X. Xu. 2016. Genistein modulates mmp-26 and estrogen receptor expression in endometrial cancer cells. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. 3(4):242–247.

- Luthria, D. L., Biswas, R., dan Natarajan, S. 2007. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isolavones from soybean. *Food Chemistry*. 105 (2007): 325-333.
- Machida, M., Yamada, O., dan Gomi, K. 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae* : learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research*. 15 (4): 173-183.
- Mebrahtu, T., Mohamed, A., Wang, C.Y., and Andebrhan, T. 2004. Analysis of isoflavone contents in vegetable soybeans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59: 55-61.
- Moore, M. A. 2014. Cancer control programs in east asia: evidence from the international literature. *Journal of Preventive Medicine and Public Health Yebang Ūihakhoe Chi*. 47(4):183-200.
- Muaris H.K. 2013. *Khasiat Edamame untuk Kestabilan Tubuh dan Gizi Edamame*, Edisi kedua. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Naufalia, A. N. 2018. Validasi metode dan penetapan kadar daidzein edamame (*Glycine max*) terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* dengan KLT-densitometri. *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Novitasari, Dewi. 2018. Validasi metode penetapan kadar genistein edamame (*Glycine max* L. Merrill) terfermentasi *Rhizopus oligosporus* dengan metode KLT densitometri. *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Otieno, D. O., J. F. Ashton, dan N. P. Shah. 2006. Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Food Research International*. 39(4):394-407.
- Pandit, N. T., dan Patravale, V. B. 2011. Design and optimization of a novel method for extraction of genistein. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73 (2): 184-192.
- Polivkova, Z., M. Langova, P. Šmerák, J. Bártová, dan I. Barta. 2006. Antimutagenic effect of genistein. *Czech Journal of Food Sciences*. 24:119-126.
- Praharini, S. R. 2015. Pengaruh Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Isoflavon Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*). *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.

- Punjaissee, C., Visessanguan, W., Punjaissee, S., dan Chaiyasut, C. 2011. Screening of potential *Aspergillus spp.* for production of fermented soybean with high antioxidative activity. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 10 (2): 197-212.
- Purwoko T., Pawiroharsono S. dan Gandjar I. 2001. Biotransformasi isoflavon oleh *Rhizopus oryza*. UICC 524. *BioSMART*. 3(2) : 7-12.
- Rady, I., H. Mohamed, M. Rady, I. A. Siddiqui, dan H. Mukhtar. 2017. Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314808X1730533X> [Diakses pada tanggal 26 Februari 2018]
- Rahayu, T. (2012). *Deteksi Senyawa Isoflavon Daidzein Dan Genistein Pada Kultur In Vitro (Glycine max)*. Berkala Penelitian Hayati, 18,p.75-78.
- Riyanto. 2014. *Validasi & Verifikasi Metode Uji*. Edisi 1. Yogyakarta: Deepublish.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Edisi Pertama. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rostagno, M. A., M. Palma, dan C. G. Barroso. 2004. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*. 522(2):169–177.
- Rudietna, A. 1991. *Studi Pendahuluan Biokonversi Isoflavon pada Proses Fermentasi Tempe dengan Teknik Perendaman (Submerge)*. Tesis. Bandung: Fakultas Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung.
- Russo, M., G. L. Russo, M. Daglia, P. D. Kasi, S. Ravi, S. F. Nabavi, dan S. M. Nabavi. 2016. Understanding genistein in cancer: the “good” and the “bad” effects: a review. *Food Chemistry*. 196:589–600.
- Samsu, H. S. 2001. *Membangun Agroindustri Bernuansa Ekspor: Edamame (vegetable soybean)*. Jember: Graha Ilmu dan Florentina.
- Setchell K, Brown N, Zimmer Neehemias L, Brashear W, Wolfe B, Kirschour A. dan Heubi J. 2002. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 76, 447–453.
- Setyaningsih, D., Tresnawati, K., Soehartono, M. T., dan Apriyantono, A. 2006. Pengaruh aktivitas β -glukosidase eksternal dari kapang terhadap kadar vanilin buah vanilia. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 16(1):28-35.

- Sherma, J & Fried, B. 2003. *Handbook of Thin Layer Chromatography 3rd Edition, Revised and Expanded*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sik, J., H. Roh, S. Lee, K. Jung, K. Baek, dan K. Hyun. 2017. Antiproliferative effect of *Momordica cochinchinensis* seeds on human lung cancer cells and isolation of the major constituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 27(3):329–333.
- Sugihartini, N., A. Fudholi, S. Pramono, dan Sisindari. 2012. Validation method of quantitative analysis of epigallocatechin gallat by thin layer chromatography. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 02:81–87.
- Sugiyono. 2009. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung : CV Alfabeta.
- Sugiyono. 2005. *Memahami Penelitian Kualitatif*. Bandung: CV Alfabeta.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. Surabaya: Penerbit UNESA.
- Sutatik. 2018. Validasi metode KLT densitometri dan pengaruh fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap kadar daidzein edamame (*Glycine max* L.). *Skripsi*. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Syafitri, N., E. Bintang, Maria. Falah, Syamsul. 2014. Kandungan fitokimia, total fenol, dan total flavonoid ekstrak buah herendong (*Melastoma affine* D. Don). *Current Biochemistry*. 1 (3): 105-115.
- Teekachunhatean, S., N. Hanprasertpong, dan T. Teekachunhatean. 2013. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds grown in Thailand. *International Journal of Agronomy*. 2013(163573):1–11.
- Tim QC APH Golongan Jamur. 2009. *Modul Quality Control (QC) APH golongan jamur*. Surabaya: Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BPPTP).
- Tsukamoto, C., S. Shimada, K. Igita, S. Kudou, M. Kokubun, K. Okubo, dan K. Kitamura. 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(5):1184–1192.
- USDA. 2010. [Online]. Available at: www.plants.usda.gov [Diakses pada 20 Januari 2018]
- Wang, H. dan P. A. Murphy. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(8):1666–1673.

- Wibisono Y dan Warsito H, 2009. Optimalisasi, ekstraksi dan produksi genistein secara komersial dari kedelai edamame afkiran (waste product) untuk mengatasi penyakit degeneratif dan terapi kanker di Indonesia. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus*: 7A (149–155).
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Xu, R., Z.-Y. Yao, L. Xin, Q. Zhang, T.-P. Li, dan R.-B. Gan. 2001. NC1 domain of human type viii collagen ($\alpha 1$) inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289(1):264–268.
- Yamaguchi, M. and Gao-Balch, y. H. 2013. Role of dietary soybean genistein in osteoporosis prevention. *International Journal of Food Science, Nutrition, and Dietetics*. 2(2):1-11.
- Yoshiara, L. Y. Madeira, T. B., Delarozza, F., da Silva, J. B., and Ida, E. I. 2012. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(8), p.978-986.
- Yuan, D., Y. Chen, X. Ba, Y. Pan, dan Y. Kano. 2006. TLC and HPLC analysis of soy isoflavones in semen sojae praeparatum. *Asian Journal of Traditional Medicines*. 1:3–9.
- Yunindarwati, E., E. V. I. U. Ulfa, E. Puspitasari, dan M. A. Hidayat. 2016. Penentuan kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai (*Glycine max*) terfermentasi *Aspergillus oryzae*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 14(1):1–7.
- Zhang, E.J., Ng, K.M. and Luo, K.Q. 2007. Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6940–6950.

LAMPIRAN

A. Perhitungan

1. Perhitungan kepadatan suspensi spora *R. oligosporus*

- a. Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 12 spora
- b. Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 21 spora
- c. Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 12 spora
- d. Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 38 spora
- e. Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 30 spora
- f. Rata-rata jumlah spora = 22,6 spora
- g. Perhitungan kepadatan spora/ml (S)

$$S = \frac{22,6}{0,0125 \times 0,1 \times 0,1} \times 10$$

$$= 1,808 \times 10^6$$

2. Perhitungan kepadatan suspensi spora *A. oryzae*

- a. Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 47 spora
- b. Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 57 spora
- c. Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 52 spora
- d. Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 57 spora
- e. Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 47 spora
- f. Rata-rata jumlah spora = 52 spora
- g. Perhitungan kepadatan spora/ml (S)

$$S = \frac{52}{0,0125 \times 0,1 \times 0,1} \times 10$$

$$= 4,16 \times 10^6$$

3. Pengenceran suspensi spora

- a. Suspensi spora *R. oligosporus*

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

$$(1,808 \times 10^6) \times 10 \text{ ml} = 10^6 \times V_2$$

$$V_2 = 18,08 \text{ ml}$$

18,08 ml – 10 ml = 8,08 ml akuades yang ditambahkan.

b. Suspensi spora *A.oryzae*

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ (4,16 \times 10^6) \times 10 \text{ ml} &= 10^6 \times V_2 \\ V_2 &= 41,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

41,6 ml – 10 ml = 31,6 ml akuades yang ditambahkan.

4. Perhitungan pengenceran suspensi untuk inokulum

a. Suspensi *R. oligosporus*

$$\frac{18,08 \text{ ml akuades}}{8,08 \text{ ml akuades}} = \frac{0,5 \text{ ml suspensi jamur}}{x}$$

$$X = 0,22 \text{ ml akuades}$$

0,5 ml untuk inokulum = 0,22 ml akuades + 0,28 ml suspensi spora

b. Suspensi *A.oryzae*

$$\frac{41,6 \text{ ml akuades}}{31,6 \text{ ml akuades}} = \frac{0,5 \text{ ml suspensi jamur}}{x}$$

$$X = 0,37 \text{ ml akuades}$$

0,5 ml untuk inokulum = 0,37 ml akuades + 0,13 ml suspensi spora

5. Perhitungan rendemen ekstrak

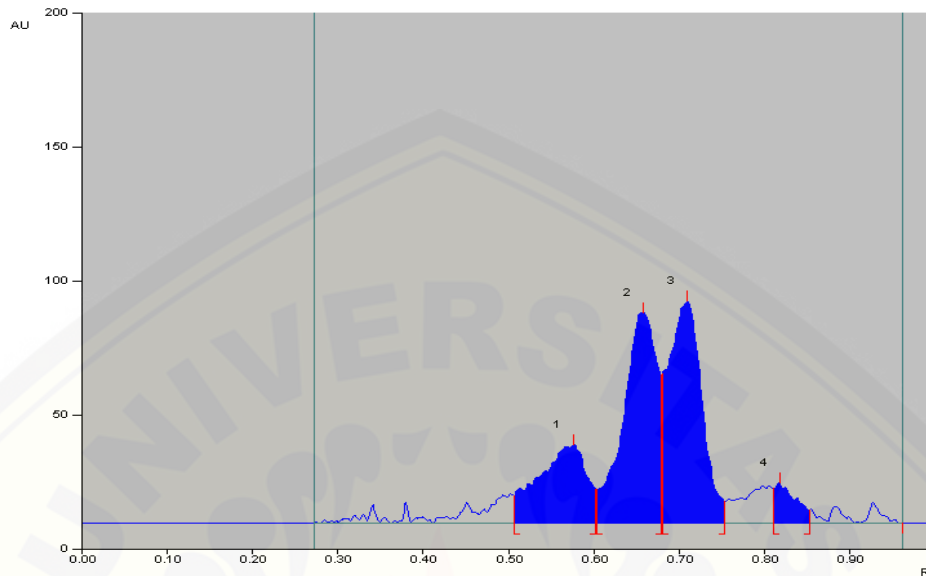
Sampel	Massa Serbuk Kering (g)	Massa Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)
H ₀	700	67,83	9,69
H ₁	37,16	14,36	38,64
H ₂	37,19	24,86	66,85
H ₃	30,83	16,18	54,52
H ₄	23,27	10,70	45,98

Contoh perhitungan:

$$H_0 \rightarrow \frac{\text{massa ekstrak kental}}{\text{massa serbuk kering}} \times 100\% = 9,69\%$$

B. Data Optimasi Eluen

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



Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
0,6	0,1	0,66	41	45,03	0,68	1,5	1440	48,64	Daidzein (2)
0,6	4,7	0,71	34	37,63	0,75	0,4	1186	40,09	Genistein (3)
0,81	1,3	0,82	15,4	17,08	0,85	3	333,9	11,28	Unknown (4)

a. Untuk genistein:

$$N = 16 \left[\frac{Zs}{w} \right]^2 = 16 \left(\frac{0,71}{0,75-0,6} \right)^2 = 358,47$$

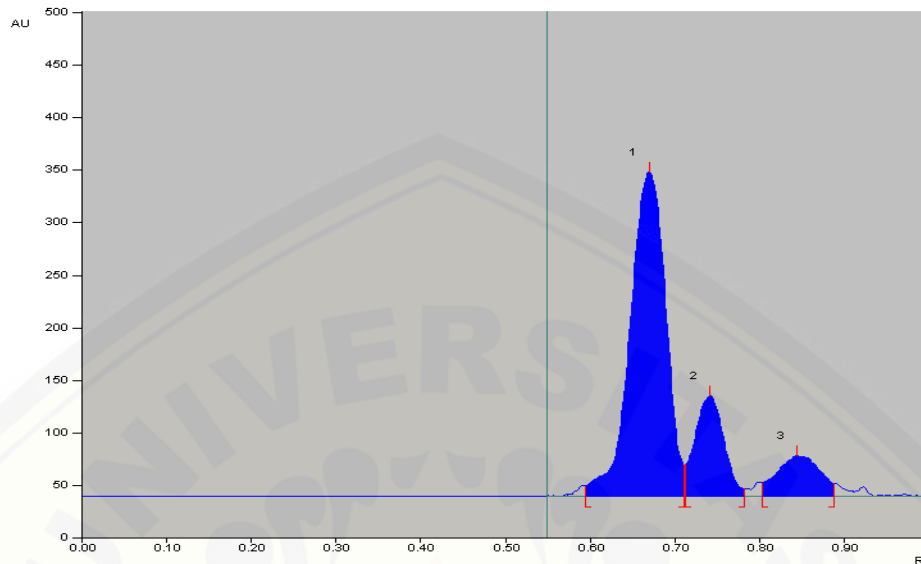
$$H = \frac{Zf}{N} = \frac{90}{358,47} = 0,251$$

b. Perhitungan Rs:

$$\text{Puncak 3 terhadap 2} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,71 - 0,66]}{(0,75 - 0,6) + (0,68 - 0,6)} = 0,43$$

$$\text{Puncak 3 terhadap 4} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,82 - 0,71]}{(0,75 - 0,6) + (0,85 - 0,81)} = 1,16$$

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



Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
0,59	0,1	0,67	41	45,03	0,71	1,5	1440	48,64	daidzein (1)
0,71	4,7	0,74	34	37,63	0,78	0,4	1186	40,09	Genistein (2)
0,8	1,3	0,84	15,4	17,08	0,89	3	333,9	11,28	Unknown (3)

a. Untuk genistein:

$$N = 16 \left[\frac{Zs}{w} \right]^2 = 16 \left(\frac{0,74}{0,78-0,71} \right)^2 = 1788,08$$

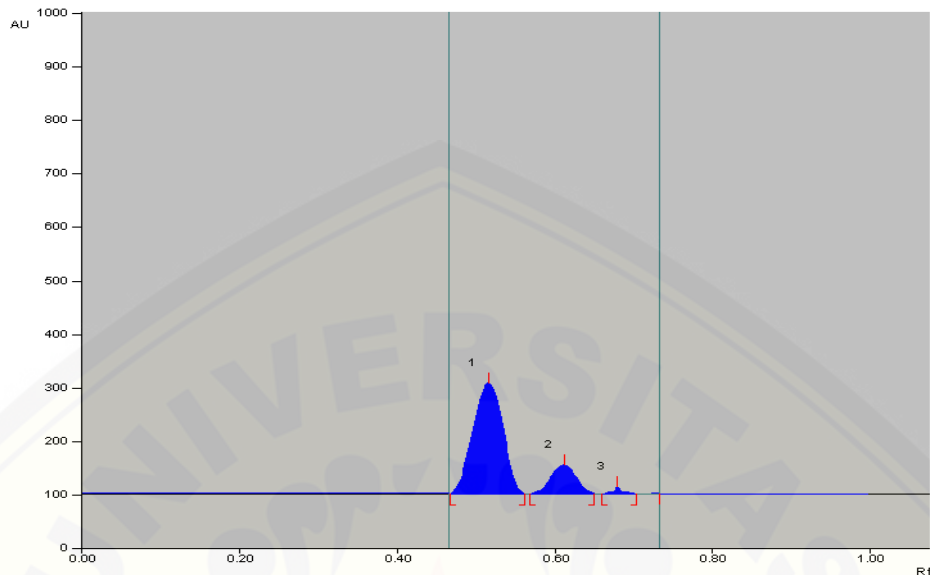
$$H = \frac{Zf}{N} = \frac{90}{1788,08} = 0,050$$

b. Perhitungan Rs:

$$\text{Puncak 2 terhadap 1} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,74 - 0,67]}{(0,78 - 0,71) + (0,71 - 0,59)} = 0,73$$

$$\text{Puncak 2 terhadap 3} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,84 - 0,74]}{(0,78 - 0,71) + (0,89 - 0,8)} = 1,25$$

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



Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
0,46	0,1	0,52	41	45,03	0,52	1,5	1440	48,64	Daidzein (1)
0,57	4,7	0,61	34	37,63	0,64	0,4	1186	40,09	Genistein (2)
0,66	1,3	0,68	15,4	17,08	0,70	3	333,9	11,28	Unknown (3)

a. Untuk genistein:

$$N = 16 \left[\frac{Zs}{w} \right]^2 = 16 \left(\frac{0,61}{0,64-0,57} \right)^2 = 1215,02$$

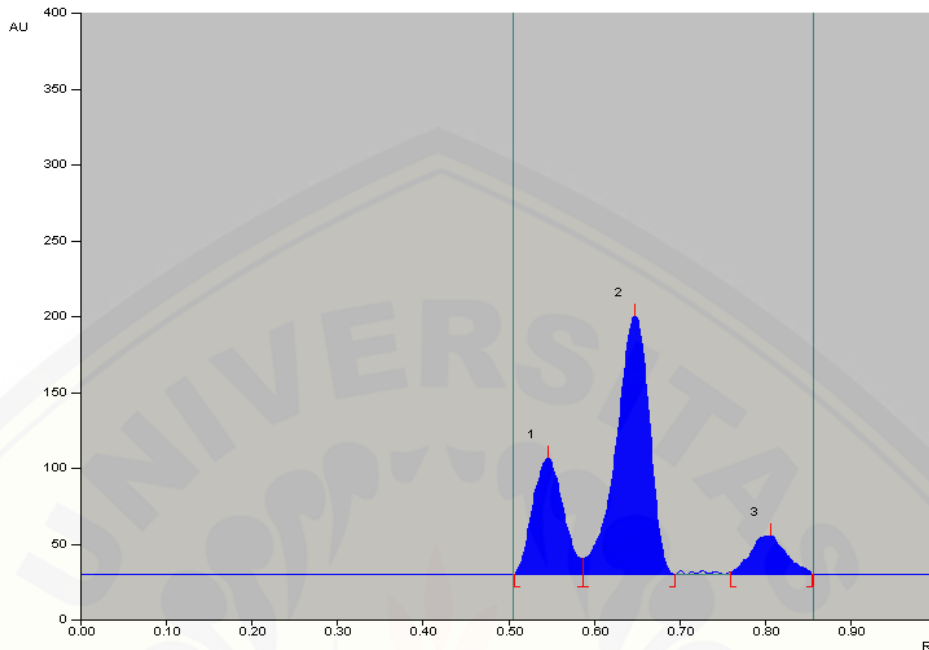
$$H = \frac{Zf}{N} = \frac{90}{930,25} = 0,074$$

b. Perhitungan Rs:

$$\text{Puncak 2 terhadap 1} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,61 - 0,52]}{(0,64 - 0,57) + (0,52 - 0,46)} = 1,28$$

$$\text{Puncak 2 terhadap 3} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,68 - 0,61]}{(0,64 - 0,57) + (0,70 - 0,66)} = 1,17$$

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



Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
0,57	0,1	0,62	41	45,03	0,63	1,5	1440	48,64	Daidzein (1)
0,67	4,7	0,72	34	37,63	0,78	0,4	1186	40,09	Genistein (2)
0,86	1,3	0,90	15,4	17,08	0,96	3	333,9	11,28	Unknown (3)

a. Untuk genistein:

$$N = 16 \left[\frac{Zs}{w} \right]^2 = 16 \left(\frac{0,72}{0,78-0,67} \right)^2 = 685,48$$

$$H = \frac{Zf}{N} = \frac{90}{676} = 0,13$$

a. Perhitungan Rs:

$$\text{Puncak 2 terhadap 1} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,72 - 0,62]}{(0,78 - 0,67) + (0,63 - 0,57)} = 1,17$$

$$\text{Puncak 2 terhadap 3} \rightarrow R_s = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{W_a + W_b} = \frac{2 [0,90 - 0,72]}{(0,78 - 0,67) + (0,96 - 0,86)} = 1,71$$

C. Data Optimasi Konsentrasi Uji

Diketahui sebanyak 0,5 gram ekstrak edamame secara berurutan masing-masing mengandung 35; 4,6; 5; 13; dan 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

1. Perhitungan konsentrasi uji yang digunakan

a. $H_0 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$

$$\frac{80\%}{100\%} \times 35 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 28 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{28 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{35 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120\%}{100\%} \times 35 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 42 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{42 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{35 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

b. $H_1 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 4,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$

$$\frac{80\%}{100\%} \times 4,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 3,7 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{3,7 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{4,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120\%}{100\%} \times 4,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 5,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{5,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{4,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

c. $H_2 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

$$\frac{80\%}{100\%} \times 5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 4 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{4 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120\%}{100\%} \times 5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

d. $H_3 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$

$$\frac{80\%}{100\%} \times 13 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 10,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{10,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{13 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120\%}{100\%} \times 13 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 15,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{15,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{13 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

e. $H_4 \rightarrow 0,5$ gram mengandung 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$

$$\frac{80\%}{100\%} \times 15 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 11,8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{11,8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{15 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

$$\frac{120\%}{100\%} \times 15 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 17,8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \rightarrow \frac{17,8 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{15 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \times 0,5 \text{ g} = 0,6 \text{ g}$$

2. Hasil optimasi konsentrasi uji

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

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Start Position	Max Position	End Position	N	H
H ₀	28	0,71	0,77	0,82	784,00	0,115
	35	0,71	0,78	0,83	676,00	0,133
	42	0,73	0,79	0,84	825,25	0,109
H ₁	3,7	0,71	0,78	0,83	676,00	0,133
	4,6	0,73	0,77	0,81	1482,25	0,061
	5,6	0,72	0,77	0,83	784,00	0,115
H ₂	4	0,73	0,77	0,82	1171,16	0,077
	5	0,71	0,76	0,78	1886,04	0,048
	6	0,73	0,76	0,81	1444,00	0,062
H ₃	10,4	0,71	0,76	0,81	924,16	0,097
	13	0,71	0,76	0,81	924,16	0,097
	15,6	0,71	0,76	0,81	924,16	0,097
H ₄	11,8	0,71	0,75	0,8	1111,11	0,081
	15	0,72	0,75	0,82	900,00	0,100
	17,8	0,71	0,76	0,8	1140,94	0,079

Contoh perhitungan:

H₀:

$$N = \left[\frac{\text{max position}}{\text{end} - \text{start position}} \right]^2 \times 16 = \left[\frac{0,77}{0,82 - 0,71} \right]^2 \times 16 = 784$$

$$H = \frac{\text{jarak migrasi eluen}}{N} = \frac{90}{784} = 0,1133136$$

D. Preparasi Larutan Satandar Genistein

$$\text{Massa genistein} = 5 \text{ mg}$$

$$\text{Volume metanol} = 5 \text{ ml}$$

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

1. Pembuatan larutan standar induk

- a. Mengencerkan 1,25 ml standar 1000 $\mu\text{g/ml}$ dalam metanol p.a ad 5 ml.

$$\frac{2,5 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 500 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

➔ Jadi diperoleh larutan standar induk 1 sebesar 500 $\mu\text{g/ml}$.

- b. Mengencerkan 1 ml standar 1000 $\mu\text{g/ml}$ dalam metanol p.a ad 5 ml.

$$\frac{2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 400 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

➔ Jadi diperoleh larutan standar induk 2 sebesar 400 $\mu\text{g/ml}$.

a. Pembuatan larutan standar untuk uji linieritas

- i. Larutan standar 5 $\mu\text{g/ml}$

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

$\times = 0,05 \text{ ml}$ ➔ dipipet 0,05 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

- ii. Larutan standar 15 $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{\times}{5 \text{ ml}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 15 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$\times = 0,15 \text{ ml}$ ➔ dipipet 0,15 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

- iii. Larutan standar 20 $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{\times}{5 \text{ ml}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ ppm } \mu\text{g/ml}$$

$\times = 0,25 \text{ ml}$ ➔ dipipet 0,25 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

- iv. Larutan standar 25 $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{\times}{5 \text{ ml}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 25 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$\times = 0,25 \text{ ml}$ ➔ dipipet 0,25 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

v. Larutan standar 35 µg/ml

$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 500 \text{ µg/ml} = 35 \text{ µg/ml}$$

$x = 0,35 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,35 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

vi. Larutan standar 50 µg/ml

$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 500 \text{ µg/ml} = 50 \text{ µg/ml}$$

$x = 0,5 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,5 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

b. Pembuatan larutan standar untuk uji BD dan BK

i. Larutan standar 4 µg/ml

$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 400 \text{ µg/ml} = 4 \text{ µg/ml}$$

$x = 0,05 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,05 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

ii. Larutan standar 4,5 µg/ml

$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 500 \text{ µg/ml} = 45 \text{ µg/ml}$$

$x = 0,45 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,45 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

iii. Larutan standar 5,5 µg/ml

$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 500 \text{ µg/ml} = 5,5 \text{ ppm µg/ml}$$

$x = 0,055 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,055 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

iv. Larutan standar 7 µg/ml

$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 500 \text{ µg/ml} = 7 \text{ µg/ml}$$

$x = 0,07 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,07 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

v. Larutan standar 8 µg/ml

$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 400 \text{ µg/ml} = 8 \text{ µg/ml}$$

$x = 0,1 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,1 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

vi. Larutan standar 9 µg/ml

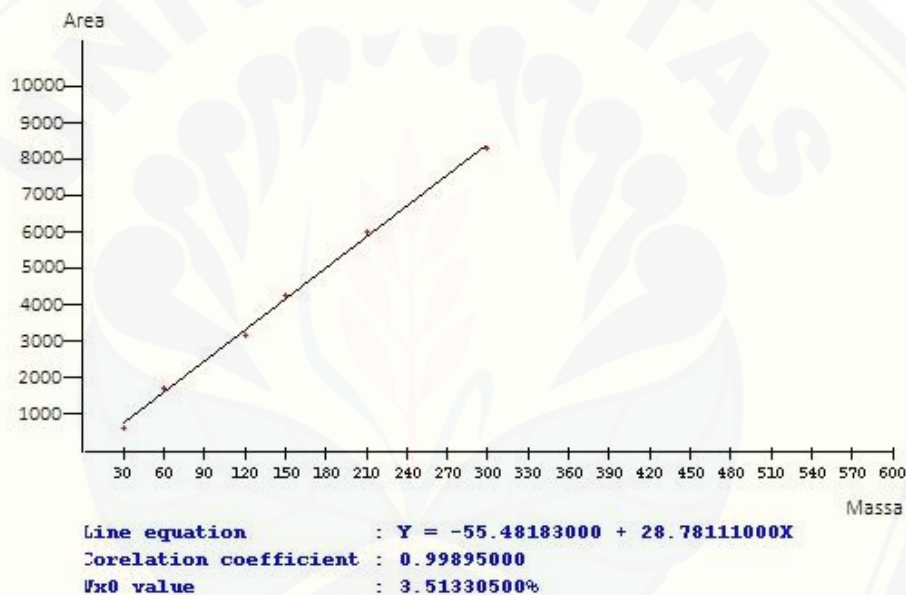
$$\frac{x}{5 \text{ ml}} \times 400 \text{ µg/ml} = 8 \text{ µg/ml}$$

$x = 0,09 \text{ ml} \rightarrow$ dipipet 0,09 ml lalu ad 5 ml metanol p.a

E. Data Linieritas

Hasil pengujian linieritas 6 konsentrasi menggunakan program *Validation Method of Analysis*.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Massa (ng)	Area
5	30	683,37
15	90	1787,01
20	120	3273,95
25	150	4369,17
35	210	6123,43
50	300	8469,75



Method	: Linearity
Probability	: 95%
Number of data	: 6
Line equation	: $Y = -55.48183000 + 28.78111000X$
Correlation coefficient	: 0.99895000
Sy value	: 146.61940000
Vx0 value	: 3.51330500%
Xp value	: 26.74519000

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement (> 0.99)

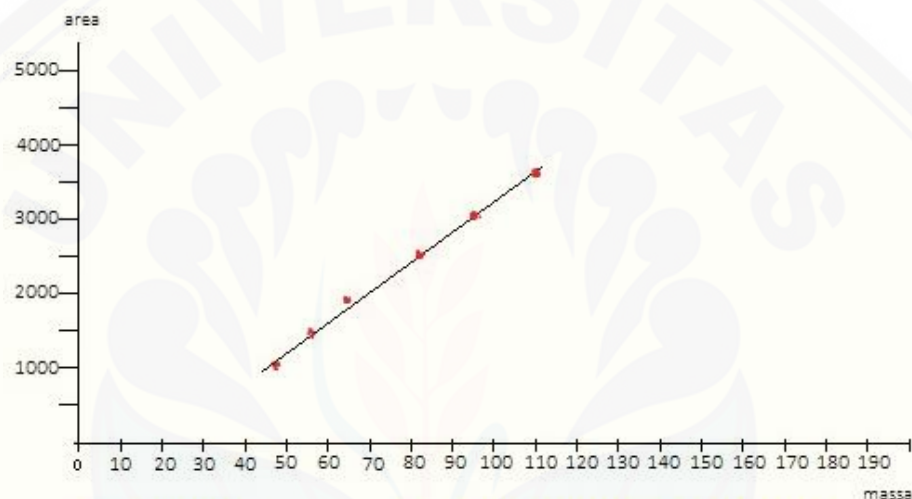
The Vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)

The Xp value is OK (< 30.00000000)

F. Data BD dan BK

Hasil pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi 6 konsentrasi menggunakan program *Validation Method of Analysis*.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Massa (ng)	Area
4	48	1020,58
4,5	54	1392,89
5,5	66	2110,92
7	84	2484,23
8	96	3055,39
9	108	3532,15



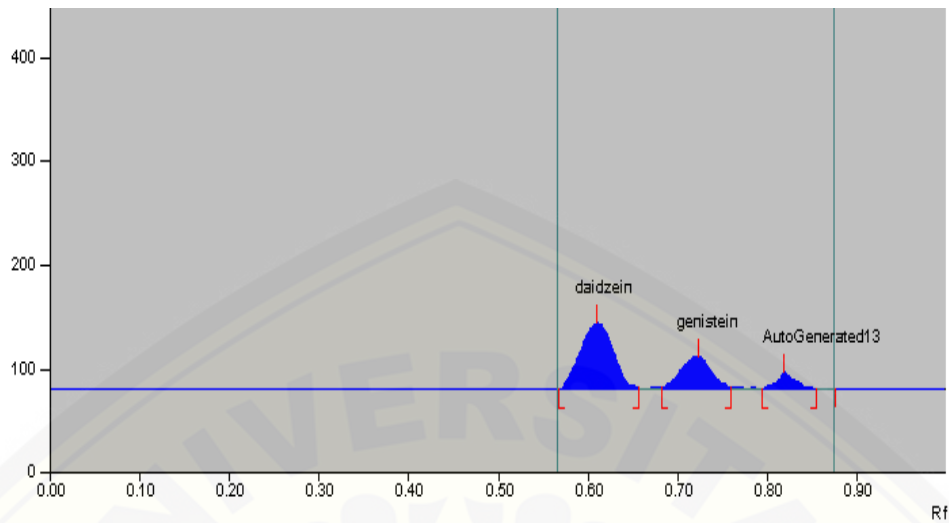
Line equation : $Y = -759.63830000 + 39.81011000X$
 Corelation coefficient : 0.99058310
 Vx0 value : 4.85948400%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = -759.63830000 + 39.81011000X$
 Corelation coefficient : 0.99058310
 Sy value : 147.02700000
 Vx0 value : 4.85948400%
 Xp value : 24.94901000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)
 The Vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)
 The Xp value is OK (< 48.00000000)

Method : DL - QL
 Number of data : 6
 DL value : 24.93286000 ng
 QL value : 74.79857000 ng

G. Perhitungan Resolusi Puncak Genistein



Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned Substance
0,57	0,1	0,61	41	45,03	0,66	1,5	1440	48,64	daidzein
0,69	4,7	0,73	34	37,63	0,76	0,4	1186	40,09	genistein
0,79	1,3	0,81	15,4	17,08	0,84	3	333,9	11,28	unknown

Perhitungan resolusi:

- a. Puncak genistein terhadap daidzein

$$RS = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{Wa + Wb} = \frac{2 [0,73 - 0,61]}{(0,76 - 0,69) + (0,66 - 0,57)} = 1,50$$

- b. Puncak genistein terhadap *unknown*

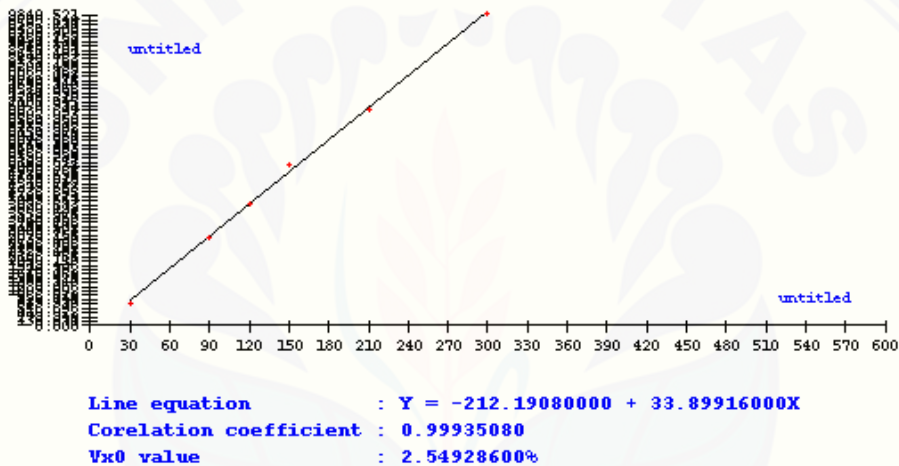
$$RS = \frac{2 [(Z)a - (Z)b]}{Wa + Wb} = \frac{2 [0,81 - 0,73]}{(0,76 - 0,69) + (0,84 - 0,79)} = 1,33$$

H. Data Presisi

1. Presisi hari ke-1

a. Kurva baku presisi hari ke-1

Massa (ng)	Area
30	724,96
90	2789,53
120	3859,12
150	5101,71
210	6872,38
300	9888,40



Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = -212.19080000 + 33.89916000X$
 Corelation coefficient : 0.99935080
 Sy value : 129.62800000
 Vx0 value : 2.54928600%
 Xp value : 20.61798000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

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

The Xp value is OK (< 30.00000000)

b. Hasil uji presisi 6 replikasi hari ke-1

Penimbangan (mg)	Area	Massa genistein (mg)	Kadar genistein (%b/b)	Rata-rata (%b/b)	SD (%)	CV (%)
600,2	1603,80	0,0688	0,0114	0,0119	$2,29 \times 10^{-4}$	1,93
609,3	1704,48	0,0736	0,0121			
601,9	1678,08	0,0723	0,0120			
602,7	1650,75	0,0710	0,0118			
605,0	1680,75	0,0724	0,0119			
608,3	1690,22	0,0729	0,0120			

Contoh perhitungan:

Replikasi 1

$$Y = -212,191 + 33,899X$$

$$1603,80 = -212,191 + 33,899X$$

$$X = 82,55 \text{ ng} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 6 \mu\text{l (penotolan)}$$

$$\frac{82,55}{6 \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

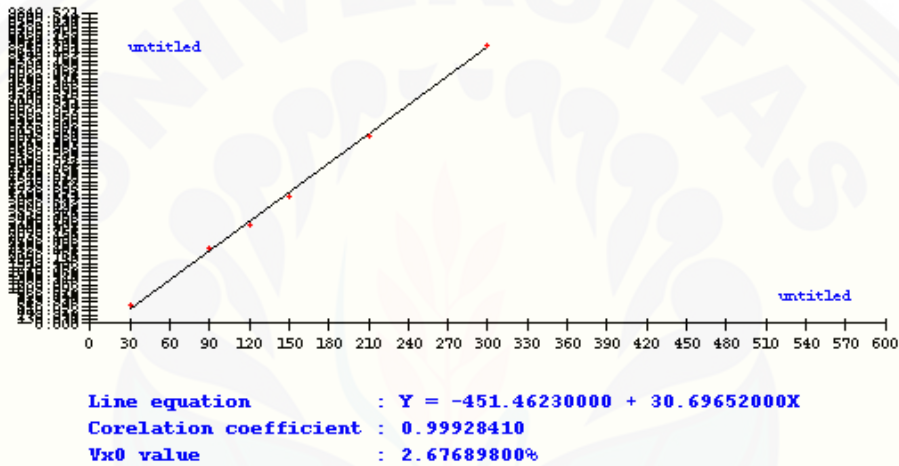
$$x = 0,0688 \text{ mg} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 5 \text{ ml}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,0688}{600,2} \times 100\% = 0,0114\% \rightarrow \text{kadar genistein dalam } 600,2 \text{ mg ekstrak}$$

2. Presisi hari ke-2

a. Kurva baku presisi hari ke-2

Massa (ng)	Area
30	1216,98
90	1989,25
120	5892,53
150	8577,34
210	11263,26
300	11889,7



Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = -451.46230000 + 30.69652000X$
 Corelation coefficient : 0.99928410
 Sy value : 123.25720000
 Vx0 value : 2.67689800%
 Xp value : 21.62799000

The Correlation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

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

The Xp value is OK (< 30.00000000)

b. Hasil uji presisi 6 replikasi hari ke-2

Penimbangan (mg)	Area	Massa genistein (mg)	Kadar genistein (%b/b)	Rata-rata (%b/b)	SD (%)	CV (%)
600,2	1599,12	0,0710	0,0118			
609,3	1709,43	0,0763	0,0125			
601,9	1601,57	0,0711	0,0118	0,0121	3,23 x 10 ⁻⁴	2,68
602,7	1611,60	0,0716	0,0119			
605,0	1623,57	0,0722	0,0119			
608,3	1698,88	0,0758	0,0124			

Contoh perhitungan:

Replikasi 1

$$Y = -451,462 + 30,696X$$

$$1599,12 = -451,462 + 30,696X$$

$$X = 85,22 \text{ ng} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 6 \mu\text{l (penotolan)}$$

$$\frac{85,22}{6 \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

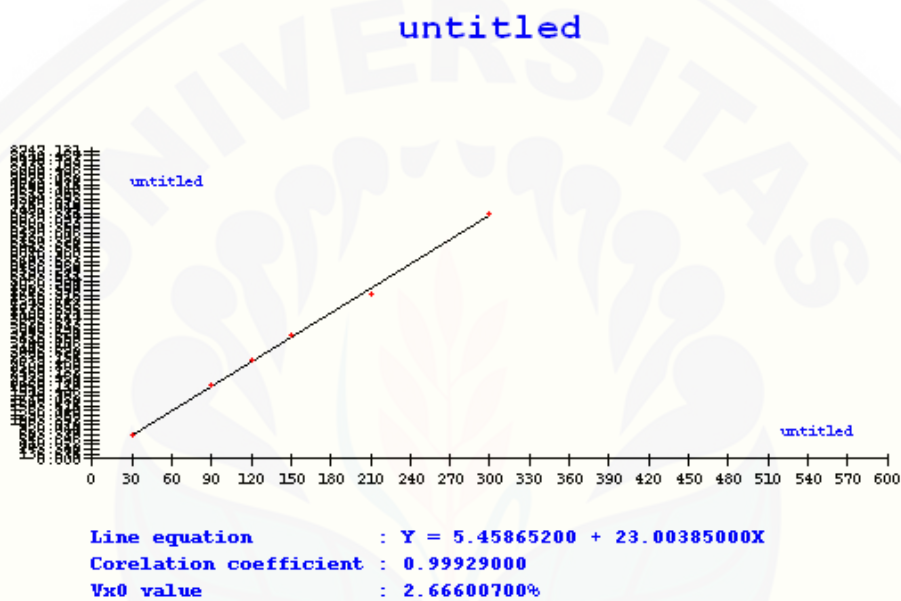
$$x = 0,071 \text{ mg} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 5 \text{ ml}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,71}{600,2} \times 100\% = 0,0118\% \rightarrow \text{kadar genistein dalam } 600,2 \text{ mg ekstrak}$$

3. Presisi hari ke-3

c. Kurva baku presisi hari ke-3

Massa (ng)	Area
30	1369,37
90	2323,68
120	6349,79
150	9403,42
210	12705,17
300	13263,13



Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = 5.45865200 + 23.00385000X$
 Correlation coefficient : 0.99929000
 Sy value : 91.99265000
 Vx0 value : 2.66600700%
 Xp value : 21.54187000

The Correlation coefficient is fulfilled the requirement (> 0.99)

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

The Xp value is OK (< 30.00000000)

d. Hasil uji presisi 6 replikasi hari ke-3

Penimbangan (mg)	Area	Massa genistein (mg)	Kadar genistein (%b/b)	Rata-rata (%b/b)	SD (%)	CV (%)
600,2	1188,86	0,0751	0,0125	0,0131	3,24 x 10 ⁻⁴	2,48
609,3	1283,84	0,0814	0,0134			
601,9	1227,04	0,0776	0,0129			
602,7	1257,41	0,0796	0,0132			
605,0	1250,56	0,0792	0,0131			
608,3	1281,81	0,0813	0,0133			

Contoh perhitungan:

Replikasi 1

$$Y = 5,458 + 23,004X$$

$$1188,86 = 5,458 + 23,004X$$

$X = 90,14 \text{ ng} \rightarrow$ massa genistein dalam 6 μl (penotolan)

$$\frac{90,14}{6 \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$x = 0,075 \text{ mg} \rightarrow$ massa genistein dalam 5 ml

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,75}{600,2} \times 100\% = 0,0125\% \rightarrow \text{kadar genistein dalam 600,2 mg ekstrak}$$

4. Hasil uji presisi antara

Hari ke-	Kadar analit rata-rata (%b/b)	RSD (%)
1	0,0119	1,926
2	0,0121	2,677
3	0,0130	2,477
Rata-rata		2,360

Perhitungan

$$\text{RSD rata-rata} = \frac{1,926 + 2,677 + 2,477}{3} = 2,360 \%$$

I. Perhitungan Data Akurasi

1. Berikut contoh perhitungan pembuatan sampel adisi.

Massa ekstrak yang ditimbang = 0,6 g

Volume larutan = 5 ml

Konsentrasi larutan = $\frac{0,6}{5} \times 1000 = 120 \mu\text{g/ml}$

a. Adisi 30%

$$30 \% \rightarrow \frac{30}{100} \times 120 \mu\text{g/ml} = 36 \text{ ppm}$$

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

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

Cara kerja:

- Sampel 0,6 g ditimbang dan dilarutkan dalam metnol p.a secukupnya
- Dipisahkan supernatannya, dimasukkan dalam labu ukur 5 ml
- Dipipet 0,45 ml larutan standar induk genistein 400 $\mu\text{g/ml}$
- Dimasukkan dalam labu ukur 5 ml yang berisi supernatan larutan sampel, di ad metanol p.a 5 ml
- Dicampur hingga larutan homogen

b. Adisi 45%

$$45 \% \rightarrow \frac{45}{100} \times 120 \mu\text{g/ml} = 54 \text{ ppm}$$

$$54 \text{ ppm} = \frac{x}{5} \times 400 \mu\text{g/ml}$$

$$x = 0,675 \text{ ml}$$

Cara kerja:

- Sampel 0,6 g ditimbang dan dilarutkan dalam metnol p.a secukupnya
- Dipisahkan supernatannya, dimasukkan dalam labu ukur 5 ml
- Dipipet 0,675 ml larutan standar induk genistein 400 $\mu\text{g/ml}$

- Dimasukkan dalam labu ukur 5 ml yang berisi supernatan larutan sampel, di ad metanol p.a 5 ml
- Dicampur hingga larutan homogen

c. Adisi 60%

$$60 \% \rightarrow \frac{60}{100} \times 120 \mu\text{g/ml} = 72 \text{ ppm}$$

$$72 \text{ ppm} = \frac{x}{5} \times 400 \mu\text{g/ml}$$

$$x = 0,9 \text{ ml}$$

Cara kerja:

- Sampel 0,6 g ditimbang dan dilarutkan dalam metnol p.a secukupnya
- Dipisahkan supernatannya, dimasukkan dalam labu ukur 5 ml
- Dipipet 0,9 ml larutan standar induk genistein 400 $\mu\text{g/ml}$
- Dimasukkan dalam labu ukur 5 ml yang berisi supernatan larutan sampel, di ad metanol p.a 5 ml
- Dicampur hingga larutan homogen

2. Hasil uji akurasi

Adisi (%)	Area	Massa hasil percobaan (mg)	Massa teoritis (mg)	Recovery (%)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
30	10922,62	0,2580	0,2542	101,4745	101,6263	0,237	0,233
	10920,12	0,2579	0,2541	101,5048			
	10964,45	0,2590	0,2542	101,8997			
45	14758,96	0,3514	0,3441	102,0896	101,8952	0,201	0,197
	14735,62	0,3508	0,3442	101,9172			
	14700,85	0,3499	0,3442	101,6787			
60	18466,05	0,4416	0,4341	101,7281	101,4607	0,247	0,244
	18420,03	0,4405	0,4341	101,4643			
	18375,18	0,4393	0,4342	101,1898			
Rata-rata					101,6607	0,228	0,225

Contoh perhitungan *recovery* (%):

Misalkan pada adisi 30% replikasi 1

a. Massa genistein teoritis :

Rata-rata kadar hasil presisi = 0,0123 % b/b

Penimbangan = 601,5 mg

$$\frac{0,0123 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 601,5 \text{ mg} = 0,074 \text{ mg} + 0,18 \text{ mg standar} = 0,2542 \text{ mg}$$

b. Massa genistein percobaan = 0,258 mg

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

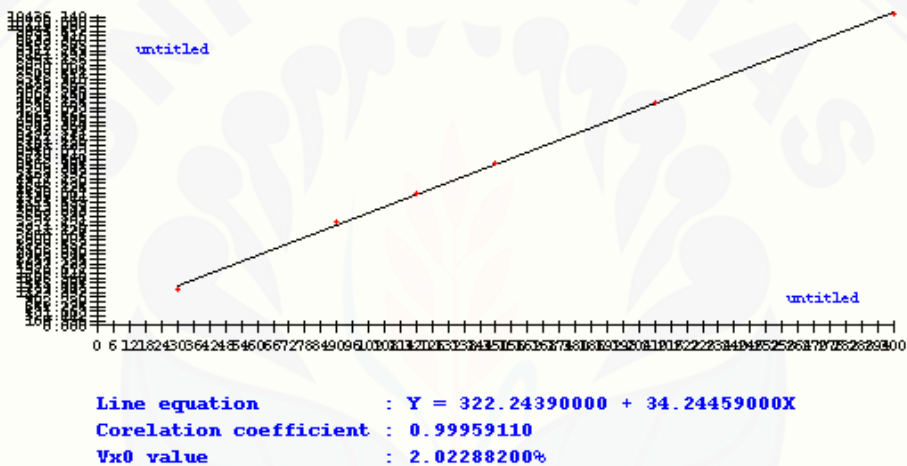
$$\frac{0,2580 \text{ mg}}{0,2542 \text{ mg}} \times 100\% = 101,4745 \%$$

J. Perhitungan Penetapan Kadar Genistein dalam Ekstrak Edamame

1. Kurva baku uji akurasi

a. Kurva baku untuk sampel H₀

Massa (ng)	Area
30	1202,08
90	3495,88
120	4487,45
150	5516,84
210	7534,11
300	10517,24



Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = 322.24390000 + 34.24459000X$
 Corelation coefficient : 0.99959110
 Sy value : 103.90920000
 Vx0 value : 2.02288200%
 Xp value : 16.42987000

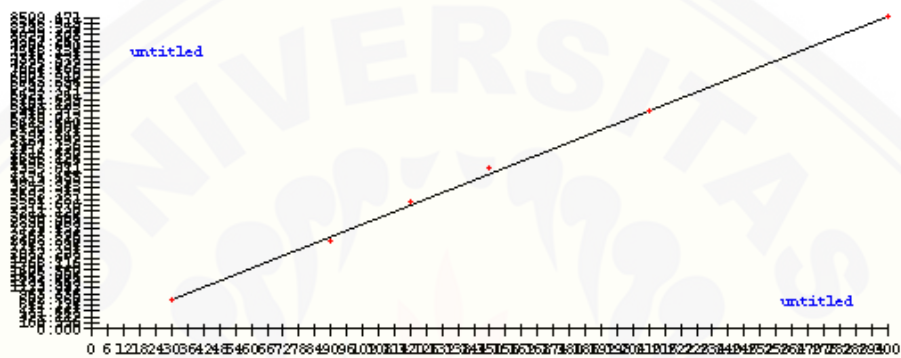
The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

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

The Xp value is OK (< 30.00000000)

b. Kurva baku untuk sampel H₁, H₂, H₃, dan H₄

Massa (ng)	Area
30	802,78
90	2417,29
120	3465,05
150	4374,77
210	5975,57
300	8512,86



Line equation : $Y = -42.41589000 + 28.66979000X$
 Corelation coefficient : 0.99952760
 Vx0 value : 2.17441400%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = -42.41589000 + 28.66979000X$
 Corelation coefficient : 0.99952760
 Sy value : 93.51003000
 Vx0 value : 2.17441400%
 Xp value : 17.63908000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)

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

The Xp value is OK (< 30.00000000)

2. Hasil penetapan kadar genistein pada ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi

Sampel	Penimbangan (mg)	Area	Massa genistein percobaan (mg)	Kadar analit (%b/b)	Rata-rata kadar (%b/b)	RSD (%)
H0	602,8	5175,21	0,1181	0,01959	$0,02130 \pm 1,49 \times 10^{-3}$	7,033
	601,7	5738,66	0,1318	0,02190		
	601,7	5859,32	0,1347	0,02239		
H1	601,4	901,09	0,0303	0,00504	$0,00468 \pm 1,42 \times 10^{-4}$	3,033
	602,7	923,14	0,0309	0,00513		
	604,5	964,14	0,0321	0,00532		
H2	600,28	1291,12	0,0359	0,00597	$0,00621 \pm 2,18 \times 10^{-4}$	3,523
	600,15	1228,09	0,0333	0,00554		
	600,11	1203,00	0,034	0,00566		
H3	604,4	2218,36	0,0633	0,01048	$0,0106 \pm 2,38 \times 10^{-4}$	2,241
	602,6	2119,27	0,0628	0,01042		
	603,1	2137,53	0,0657	0,01089		
H4	602,1	3696,79	0,1086	0,01805	$0,0183 \pm 2,08 \times 10^{-4}$	1,135
	603,6	3762,44	0,1105	0,01832		
	603,4	3789,52	0,1113	0,01845		
Rata-rata				0,01221		2,827

Contoh perhitungan :

a. H_0 replikasi 1

$$Y = 322.244 + 34.2450X$$

$$5175,21 = 322.244 + 34.2450X$$

$$X = 141,74 \text{ ng} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 6 \mu\text{l (penotolan)}$$

$$\frac{141,74}{6 \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,118 \text{ mg} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 5 \text{ ml}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,118}{602,8} \times 100\% = 0,01959\% \rightarrow \text{kadar genistein dalam penimbangan } 602,8 \text{ mg ekstrak}$$

b. H₁ replikasi 1

$$Y = -42.416 + 28.669X$$

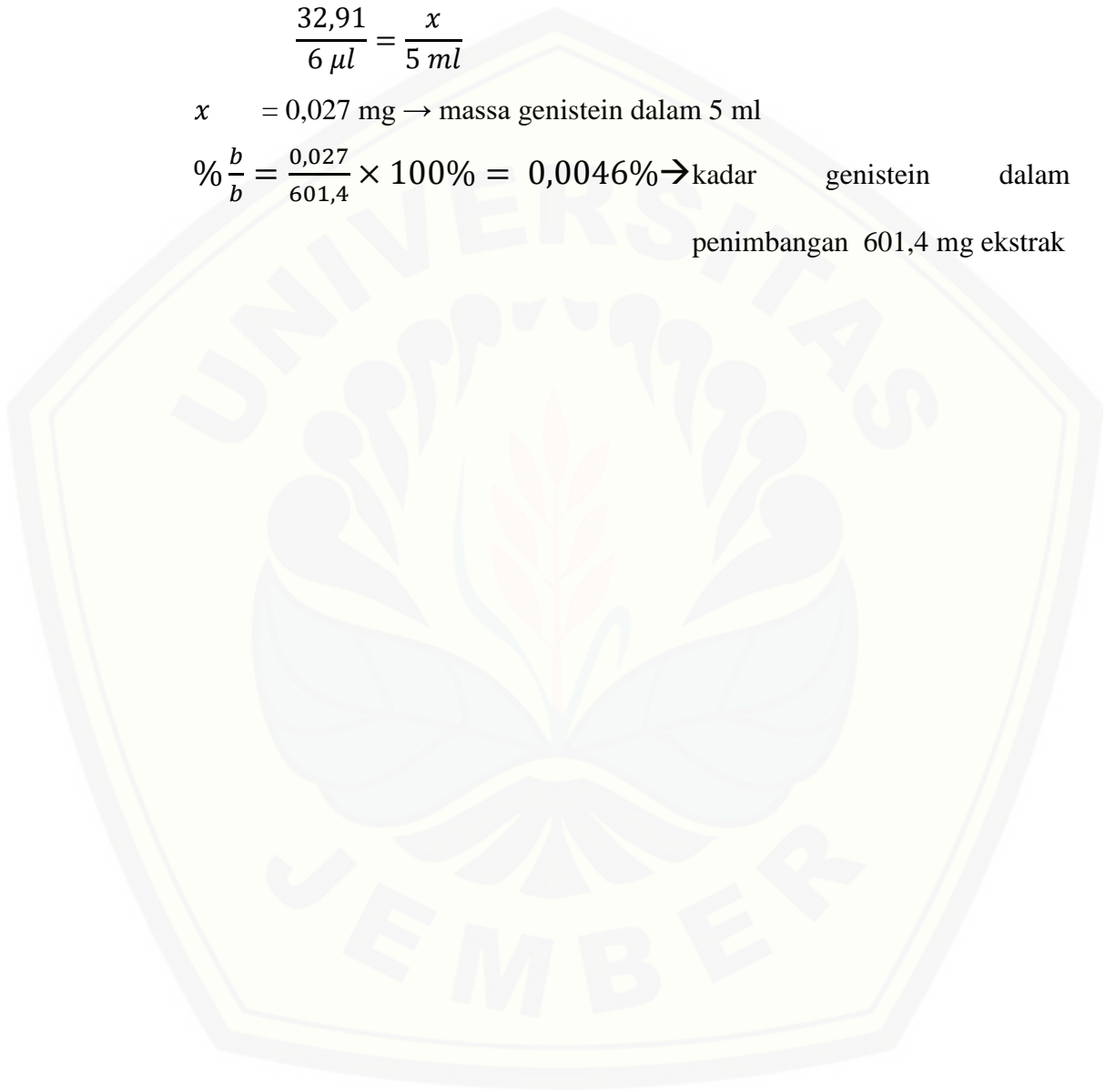
$$901,09 = -42.416 + 28.669X$$

$$X = 32,91 \text{ ng} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 6 \mu\text{l (penotolan)}$$

$$\frac{32,91}{6 \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,027 \text{ mg} \rightarrow \text{massa genistein dalam } 5 \text{ ml}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,027}{601,4} \times 100\% = 0,0046\% \rightarrow \text{kadar genistein dalam penimbangan } 601,4 \text{ mg ekstrak}$$



K. Analisis Data Penetapan Kadar**Tests of Normality**

kelompok_sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
hari 0	.292	3	.	.923	3	.463
hari 1	.175	3	.	1.000	3	1.000
hari 2	.175	3	.	1.000	3	1.000
hari 3	.314	3	.	.893	3	.363
hari 4	.292	3	.	.923	3	.463

a. Lilliefors Significance
Correction

Data memiliki persebaran yang normal ($p > 0,05$)

Test of Homogeneity of Variances

rata_rata

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.873	4	10	.513

Data bersifat homogen ($p > 0,05$), sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA

ANOVA

Kadar genistein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	4.045E3	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.001	14			

Signifikasi ($p < 0,01$), setidaknya ada dua kelompok sampel yang memiliki perbedaan kadar genistein yang signifikan

Post Hoc Tests
Multiple Comparisons

Kadar genistein
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
hari 0	hari 1	.0166333*	.0001660	.000	.016107	.017159
	hari 2	.0161333*	.0001660	.000	.015607	.016659
	hari 3	.0112333*	.0001660	.000	.010707	.011759
	hari 4	.0036000*	.0001660	.000	.003074	.004126
hari 1	hari 0	-.0166333*	.0001660	.000	-.017159	-.016107
	hari 2	-.0005000	.0001660	.013	-.001026	.000026
	hari 3	-.0054000*	.0001660	.000	-.005926	-.004874
	hari 4	-.0130333*	.0001660	.000	-.013559	-.012507
hari 2	hari 0	-.0161333*	.0001660	.000	-.016659	-.015607
	hari 1	.0005000	.0001660	.013	.000026	.001026
	hari 3	-.0049000*	.0001660	.000	-.005426	-.004374
	hari 4	-.0125333*	.0001660	.000	-.013059	-.012007
hari 3	hari 0	-.0112333*	.0001660	.000	-.011759	-.010707
	hari 1	.0054000*	.0001660	.000	.004874	.005926
	hari 2	.0049000*	.0001660	.000	.004374	.005426
	hari 4	-.0076333*	.0001660	.000	-.008159	-.007107
hari 4	hari 0	-.0036000*	.0001660	.000	-.004126	-.003074
	hari 1	.0130333*	.0001660	.000	.012507	.013559
	hari 2	.0125333*	.0001660	.000	.012007	.013059
	hari 3	.0076333*	.0001660	.000	.007107	.008159

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

L. Dokumentasi Penelitian



Edamame setelah di autoklaf



Isolat jamur



Proses pengeringan sampel



Proses sentrifugasi



Proses ultrasonikasi sampel



Proses *defatting*



Proses eluasi



Proses pemindaian KLT densitometri

