



**VALIDASI METODE KLT DENSITOMETRI DAN  
PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* TERHADAP  
KADAR DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max* L.)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Sutatik  
NIM 142210101037**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**VALIDASI METODE KLT DENSITOMETRI DAN  
PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* TERHADAP  
KADAR DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max* L.)**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Sutatik  
NIM 142210101037**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah Subhanahu wa ta'ala yang Maha segala-galanya dan Nabi Muhammad Shallallahu alaihi wasallam;
2. Orang tua tercinta, Ibu Sumarmi dan Bpk Kadi, yang tiada henti-hentinya mendo'akan, menasehati dan memberikan motivasi dalam setiap perjalanan hidup saya agar senantiasa menjadi seseorang yang lebih baik;
3. Para pengajarku di SDN Genengan Jasem 1, SMPN 1 Kabuh, SMAN Ploso Jombang, dan Fakultas Farmasi Universitas Jember, atas kesabarannya dalam membimbing dan menyalurkan ilmunya, hingga menjadikan saya sosok yang berpendidikan;
4. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

## MOTTO

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.

(QS. Al-Insyirah,6-8)

Dibalik orang-orang besar selalu ada ibadah yang mempesona.

(dr. Gamal Albinsaid)

Kita melihat kebahagiaan itu seperti pelangi, tidak pernah berada di atas kepala kita sendiri, tetapi selalu berada di atas kepala orang lain.

(Thomas Hardy)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Sutatik

NIM : 142210101037

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Validasi Metode KLT Densitometri dan Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine Max L.*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam instansi 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 ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Juli 2018

Yang Menyatakan.

(Sutatik)

NIM 142210101037

**SKRIPSI**

**VALIDASI METODE KLT DENSITOMETRI DAN  
PENGARUH FERMENTASI *Aspergillus oryzae* TERHADAP  
KADAR DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max* L.)**

Oleh

Sutatik

NIM 142210101037

Pembimbing:

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Validasi Metode KLT Densitometri dan Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine Max L.*)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Kamis, 19 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

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

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

Anggota II,

Anggota III,



Indah Yulia N., S.Farm.,M.Farm.,Apt  
NIP 19807122008122002

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

Mengesahkan

Dekan,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.  
NIP 197604142002122001



## RINGKASAN

**Validasi Metode KLT Densitometri dan Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine Max L.*);** Sutatik, 142210101037; 2018; 69 Halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Angka harapan hidup di Indonesia dari tahun ke tahun selalu mengalami peningkatan. Hal tersebut berdampak pada semakin banyaknya jumlah wanita lanjut usia di Indonesia. Salah satu permasalahan kesehatan yang dialami oleh wanita lanjut usia adalah menopause. Tahun 2020 diperkirakan jumlah wanita menopause di Indonesia berjumlah 30,3 juta (Depkes RI, 2005).

Menurut Prawirohardjo (2008), menopause terjadi karena penurunan hormon estrogen yang dihasilkan ovarium. Penurunan kadar hormon tersebut menyebabkan terjadinya perubahan pada tubuh. Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi perubahan yang terjadi pada masa menopause. Salah satunya yaitu dengan pemberian terapi sulih hormon (TSH), terutama pemberian hormon estrogen untuk mengatasi keluhan atau perubahan yang dialami wanita menopause. Namun terapi hormon memiliki banyak efek samping, sehingga perlu di fikirkan cara lain, salah satunya dengan fitoestrogen. Terapi fitoestrogen menggunakan suatu bahan yang memiliki khasiat mirip estrogen dan berasal dari tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang memiliki senyawa fitoestrogen adalah edamame (Cederroth dan Nef, 2009).

Edamame merupakan kedelai sayur yang memiliki kandungan penting berupa senyawa isoflavon sebagai fitoestrogen utama. Senyawa isoflavon pada edamame memiliki dua bentuk yaitu aglikon dan glikosida. Salah satu upaya untuk mendapatkan kandungan senyawa isoflavon aglikon yang tinggi adalah dengan melakukan fermentasi. Penelitian ini dilakukan untuk melihat validitas metode analisis dan pengaruh fermentasi edamame menggunakan *Aspergillus oryzae*.

Tahap awal yang dilakukan adalah preparasi sampel yang terdiri dari edamame non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3, dan 4. Kemudian dilakukan optimasi kondisi analisis, kemudian validasi metode terhadap metode



yang akan digunakan dan dilanjutkan dengan penetapan kadar daidzein pada ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi.

Hasil optimasi kondisi analisis menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan adalah metanol p.a; fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F254; fase gerak yang digunakan adalah kombinasi *n*-heksana : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15); panjang gelombang optimum 273 nm; dan konsentrasi uji yang digunakan adalah 80 mg/mL.

Metode analisis penetapan kadar daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan terfermentasi *A.oryzae* dengan metode analisis KLT- densitometri memberikan hasil analisis yang kurang valid, yaitu tidak memenuhi parameter selektivitas  $R_s < 1,5$ , yaitu sehingga kurang selektif dalam pemisahan daidzein. Untuk parameter linieritas terpenuhi yaitu nilai  $r$  sebesar 0,999, nilai  $V_{x0}$  sebesar 3,068%, dan nilai  $X_p$  sebesar 55.676. Kepekaan terhadap BD sebesar 23,694 ng dan nilai BK sebesar 71,089 ng, memiliki spesifisitas yang baik karena nilai korelasi pada uji purity dan identity lebih dari 0,99, presisi dengan nilai RSD kurang dari 5,3%, akurasi dengan nilai recovery antara 90-107% dan nilai RSD kurang dari 5,3%.

Kadar daidzein yang didapatkan pada penetapan kadar daidzein ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi *A. oryzae* berturut-turut dari hari ke-1 hingga hari ke-4 adalah  $0,0433 \pm 0,00221$ ;  $0,0336 \pm 0,00698$ ;  $0,0276 \pm 0,00039$ ;  $0,0219 \pm 0,00041$ ;  $0,1002 \pm 0,00924$  % (b/b). Terdapat penurunan pada H0, H1, H2 dan H3, namun meningkat pada H4

Hasil analisis statistik uji ANOVA dan LSD menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara edamame non-fermentasi dengan edamame terfermentasi hari ke-4 dengan nilai  $P < 0,01$ . Hal ini dapat menunjukkan bahwa kadar daidzein pada ekstrak edamame yang difermentasi menggunakan *A. oryzae* pada hari ke-4 lebih tinggi dibandingkan dengan edamame non-fermentasi.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode KLT Densitometri dan Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine Max L.*)” Sholawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi agung Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Skripsi ini merupakan salah satu syarat yang harus ditempuh untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Jember. Penulis menyadari bahwa terselesaikannya skripsi ini tidak luput dari dukungan, arahan, bimbingan, upaya dan do'a dari keluarga, dosen pembimbing serta pihak-pihak lainnya. Sehingga, dalam kesempatan ini, dengan setulus hati penulis mengucapkan terimakasih yang tak terbatas dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada terhormat:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari S.Si., Apt.,M.Farm atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm.,M.Sc.,Apt dan Ibu Indah Yulia N, S.Farm.,M.Farm.,Apt selaku dosen pembimbing yang telah berkenan membimbing dengan ikhlas hingga akhir penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm.,M.Farm.,Apt dan Bpk Bawon Triatmoko, S.Farm.,M.Sc.,Apt selaku dosen penguji yang telah berkenan memberikan kritik dan saran dengan tulus;
4. Terimakasih kepada negara yang sudah memberikan beasiswa BIDIKMISI sehingga saya bisa merasakan dunia perkuliahan hingga menjadi seorang Sarjana;
5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah mengajar dan memberikan wawasan ilmu pengetahuan selama masa perkuliahan;

6. Staf dan karyawan yang sudah banyak membantu selama penulis mejadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
7. Orang tua tercinta Ibu Sumarmi, Bapak Kadi, dan Adik tercinta M.Ilham Febrianto yang selalu memberikan do'a, kasih sayang, dukungan, nasehat, dan motivasi yang tak terbatas hingga saat ini;
8. Keluarga besar Pak de Sudarmo dan Bu de Rukemah yang sudah memberikan do'a dan bantuan terbaiknya selama ini;
9. Tim pejuang skripsi dan proyek Edamame Squad, Fanitika, Adinda, Mace, Vita, Yogi dan Finda yang sudah menjadi teman suka, duka, tangis dan tawa selama pengerjaan skripsi;
10. Teman seperjuangan di lab biologi Alfiatur, Hilda, Illa, Linda, Leni dll yang sudah menjadi penguat untuk tetap berjuang;
11. sahabat "*Istiqomah*" Yuvi, Feni, Uul, dan Nadia Rosi yang selalu memberikan nasehat untuk selalu dalam ketaatan;
12. Teman seperjuang di Fakultas Farmasi Universitas Jember Angkatan 2014 (PHARMAGEN) yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu;
13. Teknisi laboratorium biologi dan kimia, Bu Widi, MbK Parka, Bu Wayan dan mbk Hani yang sudah banyak membantu;
14. Teman-teman dari paguyuban IKMJ yang sudah berkenan menjadi keluarga diperantauan;
15. Teman-teman dari "*Kontrakan Hits*" (MbK Rossi, MbK Ika, Ari, Pradini, Sri dan Yuyun) yang sudah berkenan menjadi keluarga selama 2 tahun diperantauan;
16. Penghuni kosan "*MINI Squad*" ( Intan, Ana, Elok dan Titin) yang selalu baik;
17. Sahabat SMA (Jijah,Weni, mbk Lulut, mbk Ida, mbk Tari, Heru, Wilda dll) yang sudah menjadi teman berbagi;
18. Teman-teman KKN 06, Novilyah, Nita, MbK Hanifah, Lukman, Awan, Guna, Angga, Mas Munir, dan Mas Diego yang sudah menjadi keluarga selama 45 hari .

19. Serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas bantuan dan perhatiannya baik langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini.

Hanya Doa yang dapat penulis haturkan semoga segala kebaikan yang diberikan mendapat balasan dari Allah SWT. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 19 Juli 2018

Penulis



**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xviii</b>
<b>DAFTAR PERSAMAAN.....</b>	<b>xix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xx</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Tinjauan tentang Edamame .....</b>	<b>5</b>
2.1.2 Klasifikasi .....	6
2.1.2 Morfologi.....	6
2.1.3 Kandungan Kimia Edamame.....	7

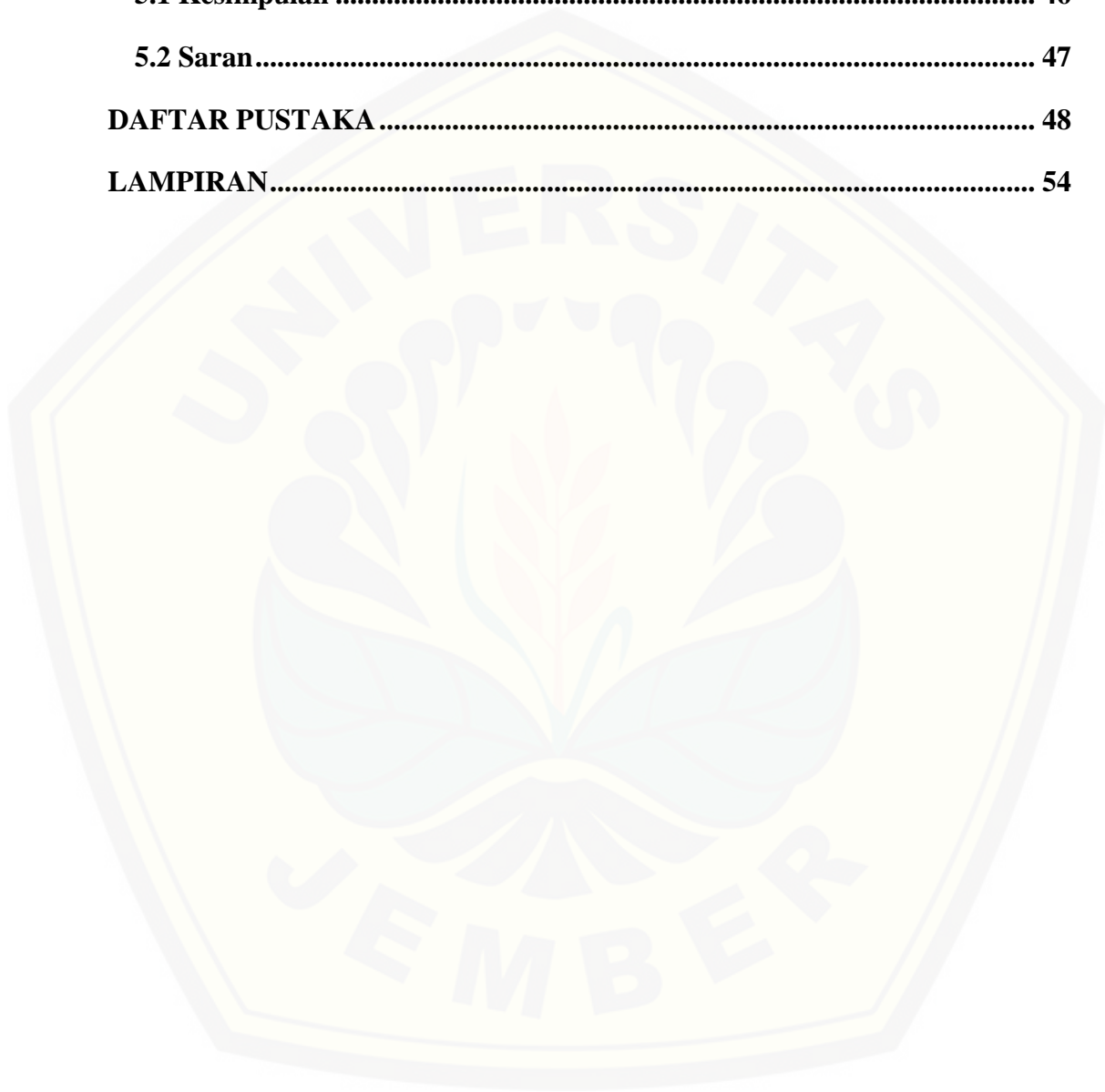
2.1.4 Aktivitas Farmakologi yang Sudah Diteliti .....	7
<b>2.2 Isoflavon .....</b>	<b>8</b>
3.2.1 Daidzein .....	9
<b>2.3 Tinjauan tentang Fermentasi .....</b>	<b>10</b>
3.3.1 Tinjauan tentang <i>A. oryzae</i> .....	10
3.3.2 Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon .....	12
<b>2.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5 Densitometri .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6 Optimasi Kondisi Analisis .....</b>	<b>16</b>
<b>2.7 Tinjauan tentang Validasi Metode Analisis .....</b>	<b>18</b>
<b>BAB 3.METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Tempat dan waktu penelitian .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Variabel Penelitian .....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Variabel bebas .....	20
3.3.2 Variabel Terikat .....	20
3.3.3 Variabel Terkendali .....	20
<b>3.4 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>20</b>
3.4.1 Rancangan Operasional .....	21
3.4.2 Definisi Operasional .....	21
<b>3.5 Alat dan Bahan .....</b>	<b>22</b>
3.5.1 Alat .....	22
3.5.2 Bahan .....	22
<b>3.6 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>22</b>
3.6.1 Preparasi Edamame Non-fermentasi .....	22
3.6.2 Peremajaan <i>A. oryzae</i> .....	22
3.6.3 Pembuatan Suspensi Spora <i>A.oryzae</i> .....	23
3.6.4 Perhitungan Kerapatan Spora .....	23



3.6.5 Preparasi Kedelai Fermentasi <i>A. Oryzae</i> .....	25
3.6.6 Proses Penghilangan Lemak ( <i>defatting</i> ) .....	25
3.6.7 Pembuatan Ekstrak Kedelai Fermentasi dan Non-fermentasi .....	26
<b>3.7 Optimasi Kondisi Analisis .....</b>	<b>26</b>
3.7.1 Optimasi Eluen .....	26
3.7.2 Optimasi Panjang Gelombang .....	27
3.7.3 Optimasi Konsentrasi Uji .....	27
<b>3.8 Validasi Metode Analisis.....</b>	<b>27</b>
<b>3.9 Penetapan Kadar Daidzein.....</b>	<b>29</b>
<b>3.10 Analisis Data .....</b>	<b>30</b>
<b>3.10 Skema Pelaksanaan Penelitian.....</b>	<b>31</b>
3.7.1 Skema Pembuatan Ekstrak Edamame Non-fermentasi dan Fermentasi.....	31
3.7.2 Skema Optimasi, Validasi dan Penetapan Kadar .....	32
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Evaluasi Karakterisai Edamame Terfermentasi dengan <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Hasil Rendemen Ekstrak .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Optimasi Kondisi Analisis .....</b>	<b>34</b>
4.3.1 Optimasi Eluen .....	34
4.3.2 Optimasi Panjang Gelombang .....	35
4.3.3 Optimasi Konsentrasi Uji .....	36
<b>4.4 Validasi Metode Analisis.....</b>	<b>37</b>
4.4.1 Linieritas .....	37
4.4.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitas (BK).....	37
4.4.3 Selektivitas/spesifisitas .....	38
4.4.4 Presisi.....	40
4.4.5 Akurasi.....	41



<b>4.4 Penetapan Kadar Daidzein dalam Ekstrak Edamame Terfermentasi</b>	
<i>Aspergillus oryzae</i> .....	42
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	46
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	46
<b>5.2 Saran</b> .....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	48
<b>LAMPIRAN</b> .....	54



DAFTAR GAMBAR

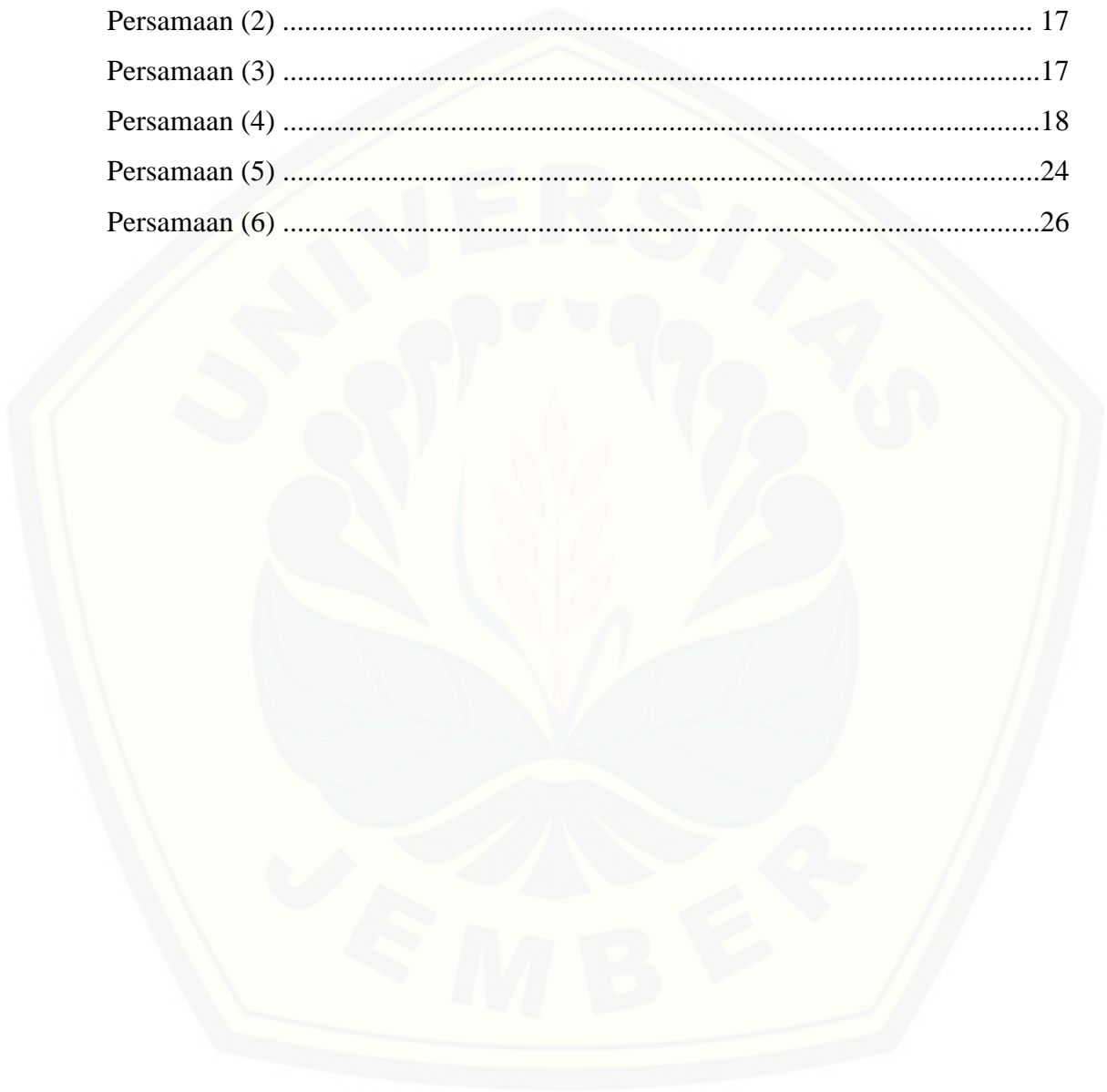
	Halaman
2.1 Biji edamame.....	5
2.2 Struktur isoflavon, beberapa senyawa isoflavon dan derivatnya dari kedelai .....	9
2.3 Struktur molekul isoflavon daidzein .....	10
2.4 <i>A. oryzae</i> .....	12
2.5 Ilustrasi migrasi analit dan eluen pada lempeng KLT .....	15
3.1 Rancangan penelitian.....	22
3.1 Kamar hitung hemositometer <i>Improved Neubauer</i> .....	25
3.2 Cara menghitung spora dengan menggunakan alat hemositometer.....	25
3.3 Skema pembuatan ekstrak edamame.....	32
3.4 Skema optimasi, validasi dan penetapan kadar.....	31
4.1 Karakteristik edamame non fermentasi dan terfermentasi <i>A.oryzae</i> .....	33
4.2 Spektra daidzein pada panjang gelombang 200-400 nm .....	36
4.3 Kromatogram pemisahan daidzein, glisitein, dan genistein .....	38
4.4 Spektra uji purity dan identity daidzein.....	39
4.5 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame H1, H2, H3, dan H4 diamati pada sinar UV 254 nm .....	42
5.6 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame H0 diamati pada sinar UV 254 nm .....	43
4.7 Penetapan kadar daidzein. Data yang disajikan berupa nilai rata-rata kadar daidzein $\pm$ SD (% b/b). Perbedaan notasi huruf menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan uji LSD, ( $P < 0,01$ ).....	44

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1	Kriteria rentang recovery yang dapat diterima .....19
2.2	Kriteria Penerimaan % RSD dan ketentuan Horwitz dan ketentuan AOAC Peer Verifed Methods (PVM) berdasarkan kadar analit .....19
4.1	Karakteristik edamame non fermentasi dan terfermentasi dengan <i>A.oryzae</i> .....22
4.2	Hasil rendemen ekstrak edamame.....33
4.3	Perbandingan parameter efisiensi kromatogram.....35
4.4	Perbandingan nilai parameter efisiensi kromatogram pada Konsentrasi yang berbeda.....36
4.5	Kondisi optimasi analisis daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan terfermentasi <i>A.oryzae</i> .....37
4.6	Korelasi uji purity daidzein.....39
4.7	Korelasi uji identity daidzein.....39
4.8	Hasil uji presisi repeatabilitas daidzein.....40
4.9	Hasil uji presisi antara dadzein.....40
4.10	Hasil uji akurasi.....41

**DAFTAR PERSAMAAN**

	Halaman
Persamaan (1) .....	15
Persamaan (2) .....	17
Persamaan (3) .....	17
Persamaan (4) .....	18
Persamaan (5) .....	24
Persamaan (6) .....	26



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
4.1 Perhitungan.....	54
4.2 Data Optimasi Eluen.....	55
4.3 Data Optimasi Konsentrasi Uji.....	58
4.4 Preparasi Larutan Standar Daidzein.....	58
4.5 Perhitungan Resolusi Puncak Daidzein.....	59
4.6 Perhitungan Data Presisi.....	60
4.7 Perhitungan Akurasi.....	63
4.8 Perhitungan Penetapan Kadar.....	65
4.9 Data ANOVA.....	67

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Di Indonesia angka harapan hidup dari tahun ke tahun selalu mengalami peningkatan. Berdasarkan survei Badan Pusat Statistik, pada tahun 2010 angka harapan hidup perempuan di Indonesia 71,83 tahun dan pada tahun 2016 angka harapan hidup perempuan di Indonesia mencapai 72,8 tahun. Hal tersebut berdampak pada semakin banyaknya jumlah wanita lanjut usia di Indonesia. Salah satu permasalahan kesehatan yang dialami oleh wanita lanjut usia adalah menopause. Tahun 2020 diperkirakan jumlah wanita menopause di Indonesia berjumlah 30,3 juta (Depkes RI, 2005). Setiap orang mengalami masa menopause pada umur yang berbeda-beda, namun pada umumnya sekitar usia 50 tahun (Prawirohardjo, 2008).

Menopause merupakan salah satu perubahan dari siklus panjang yang dialami oleh wanita usia produktif dan dapat dideteksi dengan melihat pola perdarahan saat menstruasi (Gracia, 2005). Menurut Prawirohardjo (2008), menopause terjadi karena penurunan hormon estrogen yang dihasilkan ovarium. Penurunan kadar hormon tersebut menyebabkan terjadinya perubahan pada tubuh. Beberapa perubahan yang terjadi pada wanita menopause yaitu terjadi *hot flashes*, gangguan tidur, gangguan emosi, masalah pernapasan, kerontokan rambut, dan peningkatan insiden hipotiroidisme (Kriebs dan Carolyn, 2010). Sebagian orang memiliki persepsi bahwa menopause merupakan masa yang sangat menakutkan karena adanya kecemasan akibat menurunnya fungsi organ dan berhentinya menstruasi (Hamdana, 2011).

Beberapa upaya dapat dilakukan untuk mengatasi perubahan yang terjadi pada masa menopause. Salah satunya yaitu dengan pemberian terapi sulih hormon (TSH), terutama pemberian hormon estrogen untuk mengatasi keluhan atau perubahan yang dialami wanita menopause baik yang bersifat dalam jangka pendek ataupun jangka panjang. Namun terapi hormon memiliki banyak efek samping, diantaranya meningkatkan risiko kanker payudara, stroke, dan masalah jantung. Selain itu, banyak pula wanita yang mempunyai kontraindikasi untuk



melakukan terapi hormon (Baziad, 2003). Karenanya, saat ini mulai dipertimbangkan alternatif lain yaitu menggunakan fitoestrogen. Terapi fitoestrogen ini menggunakan suatu bahan yang memiliki khasiat mirip estrogen dan berasal dari tumbuhan. Beberapa penelitian membuktikan bahwa fitoestrogen mampu mengurangi gejala menopause (Ariyanti dan Apriliana, 2016). Salah satu tumbuhan yang memiliki senyawa fitoestrogen adalah edamame (Cederroth dan Nef, 2009).

Edamame merupakan tanaman yang cukup populer di Indonesia dan banyak dijumpai khususnya di daerah Jember, Jawa Timur. Edamame memiliki kandungan penting berupa senyawa isoflavon sebagai fitoestrogen utama yang berasal dari sumber daya alam. Isoflavon memiliki kemiripan dengan estrogen endogen  $17 \beta$ -estrodial (Cederroth dan Nef, 2009). Oleh karena itu, isoflavon banyak dimanfaatkan dalam permasalahan kesehatan yang berkaitan dengan penyakit usia dan hormon, gejala menopause, penyakit kardiovaskular, dan osteoporosis (Messina, 2000). Selain itu, fitoestrogen juga dapat digunakan untuk mengatasi kanker (Adlercreutz, 2003). Penelitian Cheng dkk. (2007) membuktikan bahwa mengkonsumsi isoflavon 60 mg selama 12 minggu dapat menurunkan *hot flashes* sekitar 57% dan tidak ada efek buruk pada endometrium dan payudara.

Senyawa isoflavon pada edamame memiliki dua bentuk yaitu aglikon dan glikosida. Isoflavon yang termasuk dalam bentuk aglikon yaitu genistein, glisitein, dan daidzein (Huang dkk., 2010). Pada penelitian Guha dkk. (2009) disebutkan bahwa pemberian asupan daidzein yang lebih tinggi dapat menurunkan kekambuhan kanker payudara sebesar 60% dibandingkan dengan pemberian asupan daidzein rendah pada wanita pascamenopause. Kandungan daidzein pada edamame varietas Ryokoh diketahui lebih tinggi daripada genistein dan glisitein (Mebrahtu dkk., 2004).

Salah satu upaya untuk mendapatkan kandungan senyawa isoflavon aglikon yang tinggi adalah dengan melakukan fermentasi. Proses fermentasi dapat menyebabkan perubahan senyawa fitokimia dan menyebabkan perubahan bentuk isoflavon (Zhu dkk., 2005). Fermentasi terjadi akibat adanya aksi enzim yang



dihasilkan oleh suatu mikroorganisme tertentu. Salah satu enzim yang dapat meningkatkan isoflavon aglikon adalah enzim  $\beta$ -glikosidase. Enzim ini dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon di bawah kondisi asam atau basa (Wei dkk., 2004). Berdasarkan penelitian dari Yunindarwati (2016) dibuktikan bahwa proses fermentasi kedelai menggunakan *Aspergillus oryzae* dapat meningkatkan kadar isoflavon genistein hingga hari ke-3 fermentasi dan menurun pada fermentasi hari ke-4.

Berdasarkan latar belakang di atas, edamame yang difermentasi menggunakan *Aspergillus oryzae* dimungkinkan juga mengandung isoflavon aglikon, sama halnya dengan kedelai yang difermentasi dengan *Aspergillus oryzae*. Pada penelitian ini akan dilakukan fermentasi edamame menggunakan isolat murni *Aspergillus oryzae* dan dilakukan penetapan kadar daidzein menggunakan metode KLT densitometri. Kelebihan metode tersebut yaitu memiliki spesifisitas tinggi, pengerjaannya relatif cepat dan mudah, biaya pengoperasiannya relatif murah, kepolaritasan pelarut dapat diubah-ubah dan tidak membutuhkan pelarut yang banyak (Wulandari, 2011).

Menurut Rohman (2009), suatu metode analisis yang baru harus dilakukan validasi terlebih dahulu untuk membuktikan bahwa parameter-parameter kinerjanya mampu untuk mengatasi masalah analisis tertentu. Validasi metode juga dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan mampu menganalisis analit tertentu pada kisaran konsentrasi tertentu. Parameter validasi yang diuji pada penelitian ini meliputi linieritas, selektivitas/spesifisitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, akurasi, dan presisi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan dari latar belakang di atas, maka rumusan masalah yang diperoleh adalah:

- a. Bagaimanakah kondisi optimum penetapan kadar daidzein dalam ekstrak etanol edamame dengan metode KLT densitometri?
- b. Bagaimanakah validitas metode penetapan kadar daidzein dalam ekstrak etanol edamame dengan metode KLT densitometri yang meliputi parameter

linieritas, selektivitas/spesifisitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan akurasi?

- c. Bagaimanakah pengaruh fermentasi kedelai dengan *Aspergillus oryzae* terhadap kadar daidzein?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui kondisi optimum penetapan kadar daidzein dalam ekstrak etanol edamame dengan metode KLT densitometri.
- b. Mengetahui validitas metode penetapan kadar daidzein dalam ekstrak etanol edamame dengan metode KLT densitometri yang meliputi parameter linieritas, selektivitas/spesifisitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan akurasi.
- c. Mengetahui pengaruh fermentasi kedelai dengan *Aspergillus oryzae* terhadap kadar daidzein.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

- a. Bagi institusi, sebagai salah satu bahan acuan atau tinjauan pustaka untuk penelitian selanjutnya.
- b. Bagi ilmu pengetahuan, memberikan sumbangan informasi terutama dalam pengaruh fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap kadar daidzein edamame.
- c. Bagi peneliti, memperluas wawasan mengenai validasi metode KLT densitometri dan penetapan kadar daidzein pada edamame terfermentasi *Aspergillus oryzae*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan tentang Edamame

Edamame merupakan kedelai yang berasal negara dari Jepang dan cukup populer di Asia (Rukmanah dan Yuniarsih, 2012). Tanaman Edamame dapat tumbuh di daerah yang memiliki iklim tropis, seperti Amerika yaitu di Negara Brazil dan Chile, serta Asia yaitu di Negara China, Thailand, Vietnam, Taiwan, termasuk di Indonesia (Pambudi, 2013). Kedelai edamame di Indonesia dikembangkan PT. Mitra Tani 27 Jember sejak tahun 1991 untuk orientasi ekspor (Wahyu, 2013). Menurut Asadi (2009) sentra produksi edamame di Indonesia terdapat di daerah Jember (Jawa Timur), Wonogiri (Jawa Tengah) dan Ciawi-Bogor (Jawa Barat).

Edamame disebut juga kedelai sayur karena dipanen saat polongnya masih muda dan hijau seperti terlihat pada Gambar 2.1, yakni pada stadia tumbuh R-6 atau R-7 atau ketika pengisian biji edamame sudah mulai penuh (80 - 90% pengisian) saat ukuran polongnya besar (Konovsky dkk., 1994).

Edamame yang digunakan pada penelitian ini yaitu edamame jenis SPM1(Ship Protection Mitra Tani), Merupakan varietas edamame yang mulai dikembangkan di jember setelah varietas Ryokoh



Gambar 2.1 Biji edamame (Dokumentasi pribadi)

### 2.1.2 Klasifikasi

Klasifikasi tanaman edamame yaitu:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embriophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Rosanae
Orde	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i> Wild.
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.) Merr. (USDA, 2010).

### 2.1.2 Morfologi

Edamame merupakan salah satu tanaman semusim dan berupa semak yang rendah, berdaun lebat, tubuh tegak, dan memiliki morfologi yang beragam. Tingginya kurang lebih sekitar 30-50 cm, banyaknya percabangan tergantung varietas lingkungan hidupnya. Pada tanaman edamame daun pertama berupa daun tunggal berbentuk sederhana yang keluar dari buku sebelah atas kotiledon dan letaknya berseberangan (unifoliolat). Kemudian daun-daun yang terbentuk selanjutnya adalah daun-daun trifoliolat (daun bertiga) dan seterusnya (Samsu, 2001).

Tanaman edamame memiliki batang berbentuk bulat berwarna hijau kekuningan dan memiliki biji dengan ukuran yang jauh lebih besar daripada kedelai biasa, jumlah biji per polong lebih dari 2, memiliki warna bulu abu, tekstur polong dan biji lembut, rasa sedikit manis dan memiliki aroma yang bagus (Shanmugasundaram dkk., 1991).

Edamame juga didefinisikan sebagai kedelai dengan ukuran biji sangat besar (>30g/100 biji) yang dipanen ketika muda dalam bentuk polong segar dan

dipasarkan dalam bentuk segar (*fresh* edamame) atau dalam keadaan beku (*frozen* edamame). Biji kedelai edamame berukuran besar dengan berat 30 -56 gram/100 biji, berwarna kuning hingga hijau, berbentuk bulat hingga bulat telur, dilapisi oleh lapisan berwarna hijau terang (Samsu, 2001)

### 2.1.3 Kandungan Kimia Edamame

Edamame memiliki keunggulan kandungan protein yang tinggi dan lengkap, di mana kandungan protein edamame mencapai 36%, lebih tinggi dibanding kedelai lain, edamame memiliki kandungan gizi yang kompleks yaitu asam folat 482 mcg/100g (121% AKG), zat besi 3,5 mg/100g, protein 16.9 g/100g (34-45% AKG), karbohidrat 12-30% dan lemak 18-32% (Grieshop dkk., 2003)

Kedelai edamame mengandung komponen fitokimia berupa isoflavon (0,1-3%), saponin (0,12-6,16%) dan sterol (0,23-0,46%) (Samruan dkk., 2012). Edamame mengandung beberapa macam isoflavon diantaranya genistin, daidzin, genistein, daidzein, dan malonil isoflavon (Preedy, 2013). Menurut hasil penelitian Mebrahtu dkk. (2004), edamame varietas Ryokoh memiliki kandungan genistein rata-rata 19,79 µg/g, daidzein 46,98 µg/g, glisitein 27,04 µg/g, dan total isoflavon 92,81 µg/g.

### 2.1.4 Aktivitas Farmakologi yang Sudah Diteliti

Edamame merupakan salah satu jenis kedelai dengan kandungan utama isoflavon. Widati dan Iteu (2012) membuktikan bahwa kandungan isoflavon dalam edamame memiliki banyak manfaat di antaranya dapat memperkuat sistem imun dan dapat mencegah timbunan kolesterol pada dinding pembuluh darah dan memberikan efek yang baik bagi tekanan darah. Pada penelitian Ponnusha dkk. (2011) juga menunjukkan adanya potensi antioksidan dan antibakteri pada edamame.

Ekstrak etanol kedelai fermentasi dan non-fermentasi memiliki aktivitas antioksidan dan *skin whitening* (pemutih kulit) (Chae dan Ha, 2011). Selain itu juga sudah terbukti bahwa senyawa genistein, daidzein, dan glisitein merupakan komponen yang dapat digunakan sebagai perlindungan kulit terhadap radiasi UVb



(Huang dkk., 2008). Pengujian aktivitas hambatan tirosinase pada ekstrak edamame menggunakan pelarut etanol 70% memiliki nilai IC<sub>50</sub> lebih tinggi daripada menggunakan pelarut etil asetat yaitu  $90,241 \pm 1,266$  dan  $76,585 \pm 1,799$   $\mu\text{g/mL}$  (Kartini, 2005). Ekstrak etanol edamame dengan metode sonikasi memiliki aktivitas hambatan tirosin dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar  $92,795 \pm 1,994$   $\text{ng}/\mu\text{L}$  (Dewi, 2015).

Menurut Koswara (2006), bahwa isoflavon pada kedelai berpotensi menurunkan resiko penyakit jantung dengan menghambat perkembangan sel-sel kanker, membantu menurunkan kadar kolesterol dalam darah, menghambat angiogenesis, membantu menurunkan osteoporosis dan dapat membantu pengobatan gejala menopause. Berdasarkan bukti uji aktivitas dari edamame tersebut, maka penting untuk dilakukan penelitian lebih lanjut tentang cara meningkatkan kandungan isoflavon pada edamame.

## 2.2 Isoflavon

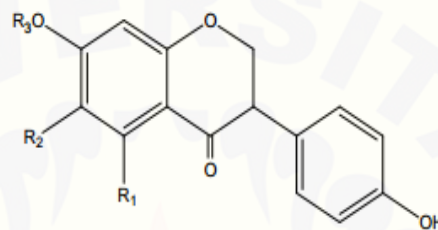
Isoflavon merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tumbuh-tumbuhan. Namun, tidak seperti senyawa metabolit sekunder lainnya, senyawa isoflavon tidak disintesis oleh mikroorganisme (Hernawati, 2008). Karenanya tanaman merupakan sumber utama senyawa isoflavon di alam. Dari beberapa jenis tanaman, kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada tanaman Leguminoceae, utamanya yaitu tanaman kedelai (Andreson dan Garner, 1997).

Isoflavon termasuk dalam golongan flavonoid yang merupakan senyawa polifenolik. Struktur kimia dasar dari isoflavon hampir sama seperti flavon, yaitu terdiri dari 2 cincin benzen (A dan B) dan terikat pada cincin C heterosiklik, tetapi orientasi cincin B nya berbeda. Pada flavon, cincin B diikat oleh karbon nomor 2 cincin tengah C, sedangkan isoflavon diikat oleh karbon nomor 3 (Schmidl dan Labuza, 2000). Pada umumnya, senyawa isoflavon sering ditemukan pada tanaman kacang- kacangan atau Leguminosa (Zubik dan Meydani, 2003).

Isoflavon kedelai dapat dikelompokkan secara kimia berdasarkan gugus fungsi. Terdapat empat kelompok yaitu aglikon (genistein, daidzein, dan

glisitein), glikosida (genistin, daidzin dan glisitin), malonil glikosida (malonil genistin, malonil daidzin dan malonil glisitin), dan asetil glikosida (asetil genistin, asetil daidzin dan asetil glisitin) (Dhaubhadel dkk., 2011). Struktur isoflavon dan beberapa senyawa isoflavon beserta derivatnya dari kedelai dapat dilihat pada Gambar 2.2

Isoflavon utama pada kedelai terdiri dari genistein dan daidzein serta turunan  $\beta$ -glikosida, gensitin dan daidzin. Ditemukan juga sejumlah kecil senyawa isoflavon lainnya seperti glycitein dan glikosidanya (Wang dan Murphy, 1994).



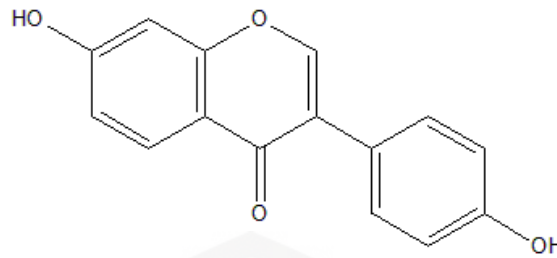
Senyawa	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Daedzein (DAE)	H	H	H
Glisetin (GLE)	H	OCH <sub>2</sub>	H
Genestein (GEE)	OH	H	H
Daedsin (DAI)	H	H	7-O- $\beta$ -D-glukosida
Glisetin (GLI)	H	OCH <sub>3</sub>	7-O- $\beta$ -D-glukosida
Genestin (GEI)	OH	H	7-O- $\beta$ -D-glukosida
Ac-DAI	H	H	6''-O-Acetil-7-O- $\beta$ -D-glukosida
Ac-GLI	H	OCH <sub>3</sub>	6''-O-Acetil-7-O- $\beta$ -D-glukosida
Ac-GEI	OH	H	6''-O-Acetil-7-O- $\beta$ -D-glukosida
Mal-DAI	H	H	6''-O-malonil-7-O- $\beta$ -D-glukosida
Mal-GLI	H	OCH <sub>3</sub>	6''-O-malonil-7-O- $\beta$ -D-glukosida
Mal-GEI	OH	H	6''-O-malonil-7-O- $\beta$ -D-glukosida

Gambar 2.2 Struktur isoflavon, beberapa senyawa isoflavon dan derivatnya dari kedelai (Yuan dkk., 2008)

### 3.2.1 Daidzein

Daidzein merupakan salah satu isoflavon dalam kedelai yang utama dan merupakan salah satu flavonoid alami yang paling aktif (Yang dkk., 2012). Daidzein merupakan difenol heterosiklik dengan tiga gugus hidroksil dengan nama kimianya 7,4'-dihidroksi isoflavon. Daidzein memiliki rumus molekul C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> seperti terlihat pada Gambar 2.3. dengan berat molekul sebesar 254,2 g/mol dan tidak larut dalam air (Gyorgy dkk., 1964).





Gambar 2.3. Struktur molekul isoflavon daidzein (ChemDraw versi 8.0)

### 2.3 Tinjauan tentang Fermentasi

Menurut Suprihatin (2010), fermentasi dapat diartikan sebagai suatu proses perubahan kimia pada suatu senyawa organik akibat aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Selain itu, fermentasi dapat diartikan juga sebagai suatu proses oksidasi karbohidrat secara anaerob atau anaerob sebagian (Samson dkk., 1987).

Proses fermentasi akan mengakibatkan terjadinya perombakan senyawa-senyawa organik oleh mikroba untuk menghasilkan suatu energi serta terjadi perubahan substrat menjadi produk baru (Bourgaize dkk., 1999). Proses fermentasi memanfaatkan aktivitas dari suatu mikroba atau campuran beberapa spesies mikroba. Mikroba yang sering digunakan dalam proses fermentasi antara lain kapang, khamir, dan bakteri (Pelczar dkk., 1986)

Fermentasi tempe mampu mengubah isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon (Purwoko dkk., 2001). Perubahan isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon disebabkan oleh aktivitas enzim glukosidase yang terdapat disekitar biji kedelai (Coward dkk., 1993).

#### 3.3.1 Tinjauan tentang *A. oryzae*

*A. oryzae* adalah salah satu spesies yang penting dalam proses fermentasi beberapa makanan tradisional dan juga dapat digunakan untuk memproduksi enzim. *A. oryzae* digunakan untuk fermentasi tahap pertama pada proses pembuatan kecap (Fardiaz, 1992).

*A. oryzae* merupakan anggota dari kelompok *A. flavus*. Selain itu, *A. sojae*, *A. nomius* dan *A. parasiticus* juga termasuk dalam kelompok *A. flavus* (Elbashiti *et al.*, 2010).

Jamur *A. oryzae* hidup sebagai parasit atau saprofit, multiseluler, memiliki bentuk benang atau filamen, tidak berklorofil dan bercabang-cabang. Masing-masing benang disebut hifa, dan kumpulan dari hifa disebut miselium. Miselium *A. oryzae* strukturnya bersekat-sekat. Koloni yang sudah menghasilkan spora memiliki warna coklat kekuning-kuningan, kehijau-hijauan, atau kehitam-hitaman, miselium yang semula berwarna putih menjadi tidak tampak lagi (Suriawiria, 1986).

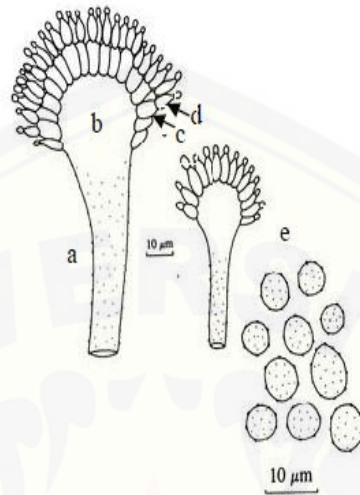
*A. oryzae* memiliki kepala konidia berbentuk bulat, berwarna hijau-kekuningan, dan apabila tua menjadi coklat redup. Konidiofor berbentuk hialin dengan panjang 4-5 mm, dan biasanya berdinding kasar. Vesikel berdiameter 40-80  $\mu\text{m}$  dan berbentuk semibulat. Fialid berukuran (10-15) x (3-5)  $\mu\text{m}$  dan terbentuk langsung pada vesikula atau pada metula. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 2.4 (Gandjar dkk., 1999).

Perkembangbiakan secara vegetatif dilakukan dengan menggunakan konidia, sedangkan pembiakan secara generatif menggunakan spora yang terbentuk dalam askus. Pada umumnya askus itu suatu ujung hifa yang memiliki 4 atau 8 buah spora. Kegunaan dari jamur *A. oryzae* yaitu berguna dalam pembuatan kecap, minuman, dan etanol (Dwidjoseputro, 1990). Pertumbuhan *A. oryzae* memerlukan kondisi aerobik, dengan suhu optimal pertumbuhan sebesar 32 – 36  $^{\circ}\text{C}$  (Barbesgaard dkk., 1992).

Menurut Uniprot (2018), taksonomi *A. oryzae* adalah sebagai berikut:

Domain : Eukariot  
Kingdom : Fungi  
Subkingdom : Dikarya  
Filum : Ascomycota  
Subfilum : Pezizomycotina  
Kelas : Eurotiomycetes  
Subkelas : Eurotiomycetidae

Ordo : Eurotiales  
Famili : Aspergillaceae  
Genus : Aspergillus



Gambar 2.4 *A.oryzae* a. Konidiofor b. Vesikel c. Metula d. Fialid e. Konidia (Gandjar dkk., 1999)

### 3.3.2 Pengaruh Fermentasi terhadap Profil Isoflavon

Isoflavon merupakan zat aktif dari edamame yang memiliki berbagai aktivitas biologi yang berguna, sehingga perlu suatu teknik untuk meningkatkan kandungan isoflavon pada edamame tersebut. Teknik fermentasi merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kandungan isoflavon. Proses fermentasi terjadi akibat adanya aksi enzim dari mikroorganisme. Salah satu enzim yang berperan dalam proses fermentasi adalah enzim  $\beta$ -glukosidase (Punjaisee, 2011).

Enzim  $\beta$ -glukosidase memiliki peranan penting dalam proses biotransformasi, seperti degradasi selulosa (Khan dan Akhtar, 2010) dan perubahan flavonoid glikosida (Marotti dkk., 2009). Enzim ini berperan dalam biotransformasi isoflavon glikosida (daidzin dan genistin) menjadi isoflavon aglikon (daidzein dan genistein) selama proses fermentasi tempe (Nugrahani, 2014). Biotransformasi daidzin menjadi daidzein lebih besar dibandingkan

genistin menjadi genistein, pada tempe yang difermentasi *R.oryzae* UICC 524 (Purwoko dkk., 2001).

Menurut Setyaningsih dkk. (2006), aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase tertinggi diperoleh pada saat fermentasi berlangsung selama 72 jam. Kerja optimum enzim  $\beta$ -glukosidase yaitu pada suhu 45°C pada pH 7,5 (Bartz dkk, 1990).

#### 2.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah metode pemisahan komponen-komponen yang terdistribusi antara dua fase. Pemisahan dengan kromatografi didasarkan pada perbedaan kesetimbangan komponen-komponen campuran diantara fase diam dan fase gerak. Fasa diam adalah fase yang menahan cuplikan secara selektif, dan fase gerak berupa zat alir yang mengalir lambat membawa cuplikan menembus fase diam. Fase diam dapat berupa zat padat atau cairan, dan fase geraknya dapat berupa cairan atau gas. Bila fase diam yang dipakai bersifat polar, maka zat-zat yang bersifat nonpolar akan terpisah terlebih dahulu karena zat bersifat polar terikat kuat pada fase diamnya. Jika fase diamnya bersifat polar maka fase gerak yang digunakan bersifat nonpolar, demikian pula sebaliknya (Day dkk., 1989).

Jenis-jenis kromatografi berdasarkan mekanisme pemisahannya yaitu: 1) Kromatografi adsorpsi; 2) kromatografi partisi; 3) kromatografi pasangan ion; 4) Kromatografi penukar ion; 5) Kromatografi eksklusi ukuran; dan 6) Kromatografi afinitas. Berdasarkan alat yang digunakan kromatografi terbagi menjadi beberapa jenis yaitu : 1) Kromatografi kertas; 2) Kromatografi lapis tipis; 3) Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT); dan 4) Kromatografi gas (KG) (Gandjar dan Rohman, 2013). KLT termasuk kedalam kelompok kromatografi planar, merupakan suatu metode kromatografi yang paling sederhana yang dapat digunakan untuk analisis secara kualitatif dan kuantitatif (Sherma dan Fried, 1994).

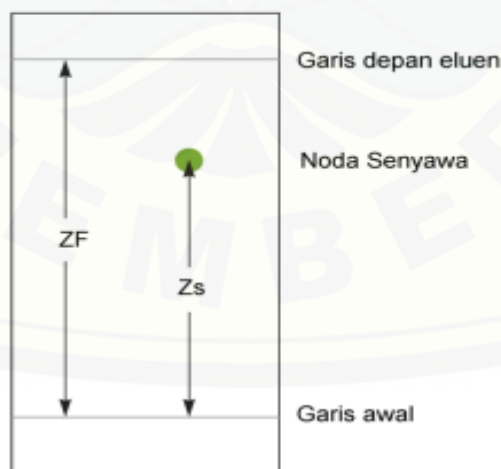
Fase diam pada KLT dapat berupa senyawa organik dan anorganik. Senyawa organik misalnya pati dan selulosa. Sedangkan senyawa anorganik berupa aluminium oksida, silikon oksida, magnesium karbonat, kalsium karbonat, dan lain-lain. Pemilihan fase diam pada KLT didasarkan pada sifat fisika kimia komponen sampel yang akan dipisahkan meliputi polaritas, kelarutan,

kemampuan mengion, berat molekul, bentuk dan ukuran analit. Sifat fisika kimia tersebut berperan penting dalam menentukan mekanisme pemisahan dalam KLT (Wulandari, 2011).

Fase gerak atau eluen merupakan cairan yang digunakan untuk pengembangan (elusi), atau sering disebut pelarut pengembang (Sherma dan Fried, 2003). Pemilihan fase gerak merupakan faktor yang paling berpengaruh pada sistem KLT. Fase gerak dapat terdiri dari satu pelarut atau campuran dua sampai enam pelarut. Campuran pelarut harus saling tercampur dan tidak terdapat tanda-tanda kekeruhan (Wulandari, 2011).

a. Analisis Kualitatif

Metode Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk analisis secara kualitatif suatu analit dengan cara membandingkan noda kromatogram analit dengan noda standar (*reference standart*) yang dikenal sebagai *reterdation factor* (Rf). Parameter analisis kualitatif pada KLT adalah harga Rf noda sampel. Dalam penentuan secara kualitatif, sampel yang mengandung analit dielusi bersama analit standar, kemudian harga Rf keduanya dibandingkan (Sherma dan fried, 2003). Penentuan harga Rf analit, yaitu membandingkan jarak migrasi noda analit dengan jarak migrasi fase gerak/eluen seperti terlihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Ilustrasi migrasi analit dan eluen pada lempeng KLT (Wulandari, 2011)



Retardasi faktor dapat dihitung sebagai rasio seperti pada persamaan (1). Nilai Rf berkisar antara 0 dan 1 dan nilai Rf terbaik memiliki nilai antara 0,2- 0,8 untuk deteksi UV dan berkisar antara 0,2-0,9 untuk deteksi visibel (Wulandari, 2011)

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi analit}}{\text{Jarak migrasi eluen}} \dots\dots\dots(1)$$

#### b. Analisis Kuantitatif

Analisis kuantitatif KLT yang umum dilakukan yaitu dengan cara ekstraksi noda dan densitometri. Cara ekstraksi noda meliputi tahapan pengeringan lempeng, penandaan noda analit, memotong bagian lempeng yang mengandung analit, mengumpulkan sorben, ekstraksi analit dari sorben, dan pengukuran dengan dibandingkan standar secara mikroanalitikal, seperti absorpsi larutan atau spektrofotometri fluoresensi (Wulandari, 2011).

Metode kuantifikasi ekstraksi noda biasanya memakan waktu lama, dan sering tidak akurat. Hal ini disebabkan karena kesalahan ekstraksi dan pemindahan noda. Pada cara densitometri tidak terjadi kesalahan yang disebabkan oleh pemindahan noda atau kesalahan ekstraksi (Gandjar dan Rohman, 2013).

### 2.5 Densitometri

Densitometri adalah suatu metode analisis instrumental yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT Densitometri. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, refleksi, fluoresensi dan radiasi semula (Mulja dan Suharman, 1995).

Densitometri dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif setelah terlebih dahulu dipisahkan dengan teknik KLT. Penentuan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai Rf analit dan standart. Noda analit yang memiliki Rf sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan

standar. Sedangkan penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standart (Wulandari, 2011). Parameter kuantitatif yang digunakan adalah tinggi puncak kurva densitometri dan area dibawah puncak kurva densitometri (Satiadarma dkk., 2004).

Ada 2 metode densitometri yaitu model reflektan dan transmitan. Model reflektan dapat digunakan pada rentang spektral UV/Vis, fluoresensi, dan peredaman fluoresensi. Spektral visual (400-800 nm) menggunakan lampu halogen dan tungsten, sedangkan pada spektral UV (190-400 nm) menggunakan lampu deuterium dan xenon (Sherma dan Fried, 2003).

## 2.6 Optimasi Kondisi Analisis

Optimasi kondisi analisis penting dilakukan 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 ( $R_s$ ), nilai *theoretical plate* ( $N$ ), dan *nilai height equivalent of theoretical plate* ( $H$ ) (Wulandari, 2011).

### a. Resolusi ( $R_s$ )

Resolusi merupakan kemampuan kondisi analisis untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Secara matematik dapat dirumuskan sesuai dengan persamaan (2) yaitu:

$$R_s = \frac{2[(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

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

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

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

$W_A$  = lebar dasar puncak zat A,

$W_B$  = lebar dasar puncak zat B.



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

b. Nilai *theoretical plate*/Lempeng teori (N)

Nilai N merupakan nilai atau angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan sesuai dengan persamaan (3):

$$N = 16 \left[ \frac{Z_s}{W} \right]^2 \dots\dots\dots(3)$$

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 sesuai dengan persamaan (4) yaitu:

$$H = \left[ \frac{Z_f}{N} \right] \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan :

H = jarak tempuh/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).

### 3.7 Tinjauan tentang Validasi Metode Analisis

Validasi metode berdasarkan United States Pharmacopeia (USP) merupakan suatu usaha yang dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, dan reproduksibel pada kisaran analit yang akan dianalisis. Singkatnya validasi merupakan langkah konfirmasi bahwa metode analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diharapkan (Rohman, 2009). Berikut beberapa parameter yang biasa dilakukan dalam validasi metode analisis diantaranya yaitu:

#### a. Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan yang dimiliki oleh suatu metode analisis untuk memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit yang terdapat di dalam sampel (Harmita, 2014).

#### b. Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan antara hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Kriteria penerimaan *recovery* dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Kriteria rentang *recovery* yang dapat diterima (Gonzales dan Herador, 2007)

Konsentrasi analit (%)	Fraksi Analit	Unit	Akurasi (%)
100	1	100%	98-102
$\geq 10$	$10^{-1}$	10%	98-102
$\geq 1$	$10^{-2}$	1%	97-103
$\geq 0,1$	$10^{-3}$	0,1%	95-105
0,01	$10^{-4}$	100 ppm	90-107
0,001	$10^{-5}$	10 ppm	80-110
0,0001	$10^{-6}$	1 ppm	80-110
0,00001	$10^{-7}$	100 ppb	80-110
0,000001	$10^{-8}$	10 ppb	60-115
0,0000001	$10^{-9}$	1ppb	40-120

#### c. Presisi

Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari

campuran yang homogen (Harmita, 2004). Kriteria penerimaan RSD dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Kriteria Penerimaan %RSD dari ketentuan Horwitz dan ketentuan AOAC Peer Verified Methods (PVM) berdasarkan kadar analit (Gonzales dan Herador,2007)

Kadar Analit %	Unit	Horwitz %RSD	AOAC PVM %RSD
100	100%	2	1,3
10	10%	2,8	1,8
1	1%	4	2,7
0,1	0,1%	5,7	3,7
0,01	100 ppm	8	5,3
0,001	10 ppm	11,3	7,3
0,0001	1 ppm	16	11
0,00001	100 ppb	22,6	15
0,000001	10 ppb	32	21
0,00000001	1ppb	45,3	30

d. Selektivitas/Spesifitas

Selektivitas atau spesifisitas merupakan kemampuan yang hanya mampu mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin terdapat di dalam matriks sampel. Selektivitas pada metode kromatografi ditentukan melalui perhitungan daya resolusi ( $R_s$ ). Nilai  $R_s$  sebaiknya  $> 1,5$  (Harmita, 2004). Nilai  $R_s = 1,5$  disebut *baseline resolution*, yaitu pemisahan sempurna dari dua puncak dengan ukuran yang sama (Pecsok dkk.,1976).

e. Limit of Detection (LOD ) & Limit of Quantification (LOQ)

LOD disebut juga batas deteksi yang diartikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit berada diatas atau dibawah nilai tertentu (Swartz dan Krull,1997)

LOQ disebut juga batas kuantifikasi yang diartikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang bisa ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi metode yang digunakan. Kadang-kadang rasio *signal to noise* 10:1 digunakan untuk menentukan LOQ (Rohman, 2009)

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah penelitian *experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengidentifikasi perbedaan waktu fermentasi *A. oryzae* terhadap kadar isoflavon daidzein pada edamame.

### 3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Jember mulai bulan Januari sampai Juli 2018.

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan waktu fermentasi *A. oryzae* pada edamame.

#### 3.3.2 Variabel Terikat

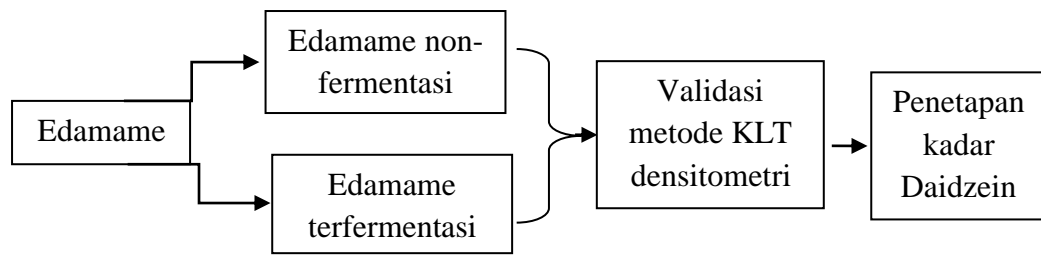
Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar isoflavon daidzein pada edamame

#### 3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah suhu inkubasi fermentasi kedelai, inokulum fermentasi yang digunakan yakni suspensi spora *A. oryzae* yang mengandung  $10^6$  spora/mL.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Sistematika rancangan penelitian secara umum tersaji dalam Gambar 3.1 berikut ini:



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

#### 3.4.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut:

- Preparasi sampel edamame non fermentasi.
- Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* yang mengandung  $10^6$  spora/mL.
- Fermentasi edamame dilakukan selama hari ke-1, 2, 3, dan 4.
- Preparasi sampel edamame yang difermentasi dengan *A. oryzae*.
- Optimasi kondisi optimum penetapan kadar
- Validasi metode analisis pada KLT densitometri
- Penentuan kadar daidzein dari masing-masing ekstrak.

#### 3.4.2 Definisi Operasional

- Edamame yang digunakan merupakan jenis kedelai varietas SPM1 (Ship Protection Mitra Tani) yang diperoleh dari PT. Mitra Tani Dua Tujuh, ditanam di daerah Jember dan dipanen pada umur 63-68 hari setelah tanam (hst).
- Ekstraksi dilakukan dengan metode sonikasi selama 1 jam pada suhu ruang.
- Fermentasi edamame dilakukan pada hari ke-1, 2, 3, dan 4.
- Parameter validasi yang digunakan adalah akurasi, presisi, linieritas, selektivitas, LOD dan LOQ.
- Penetapan kadar isoflavon dalam ekstrak dengan standar daidzein yang dinyatakan dalam % b/b menggunakan metode KLT densitometri.



### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

Autoklaf (ALP), *laminar air flow* (Airtech), mikroskop (Olympus BX53), *shaker incubator* (MaxQ 6000 Stackable), timbangan analitik digital, timbangan mikro (Sartorius ME36S), *ultrasonicator* (Elmasonic), *sentrifuge* (Hermle), *rotavapour* (Strike 2000), chamber KLT (Camag), *Densitometer* (CAMAG TLC 3), oven, seperangkat alat soxhlet, seperangkat alat gelas, mikro pipet (Serana), mikro tip warna kuning dan warna biru.

#### 3.5.2 Bahan

Biji edamame (kedelai varietas SPM 1), isolat *A. oryzae* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember), standart daidzein (Sigma), *potato dextrose agar* (BD Difco), tween 80, lempeng KLT Silika Gel 60 F254 (Merck), toluen (Smart Lab Indonesia), etil asetat (Smart Lab Indonesia), aseton (Smart Lab Indonesia), *n*-heksana (Smart Lab Indonesia), etanol 70%, metanol p.a. (Smart Lab Indonesia), dan akuades.

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Preparasi Edamame Non-fermentasi

Simplisia edamame dibuat dengan cara merendam 500 gram edamame dalam air panas selama 5 menit kemudian dikupas dan dihilangkan kulit arinya. Edamame kupas ditimbang 500 gram dan di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Duenas dkk., 2012). Setelah dingin edamame dirajang dan di keringkan menggunakan oven suhu 60°C. Simplisia edamame kemudian dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan mesh 80 agar diperoleh serbuk dengan ukuran yang seragam. Serbuk edamame non-fermentasi yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Cheng dkk., 2013)

#### 3.6.2 Peremajaan *A. oryzae*

Isolat murni *A. oryzae* diambil satu ose dimasukkan kedalam media agar miring PDA (*potato dextro agar*) dilakukan secara berulang sampai dua kali, kemudian diinkubasi selama 1 hari pada suhu 30°C (Jayanti dkk., 2013)



### 3.6.3 Pembuatan Suspensi Spora *A.oryzae*

Suspensi spora *A. oryzae* dibuat sebanyak 10 mL dengan cara berulang ulang menambahkan 10  $\mu$ L Tween 80 dan 1 mL aquades steril pada *A. oryzae* yang sudah diremajahkan pada media agar miring PDA. Spora *A. oryzae* diambil secara perlahan menggunakan ose kemudian diresuspensi menggunakan mikropipet. Spora yang sudah diresuspensi dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Suspensi spora tersebut kemudian divorteks supaya homogen dan dapat digunakan untuk proses selanjutnya. Proses pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dilakukan secara steril dan dalam kondisi yang aseptis yaitu dilakukan dibawah *laminar air flow* (LAF) (Lee dkk., 2008).

### 3.6.4 Perhitungan Kerapatan Spora

Untuk membantu memudahkan perhitungan kerapatan spora *A. oryzae* digunakan metode *haemocytometer*. Suspensi spora *A. oryzae* 1 mL diambil dengan pipet tetes steril lalu ditetaskan pada bagian kotak perhitungan haemocytometer dan ditutup dengan *cover glass*. Selanjutnya menghitung spora *A. oryzae* di bawah mikroskop dilakukan dengan perbesaran 400x. Cara perhitungan tersaji pada Gambar 3.1 dan 3.2. Suspensi spora *A. oryzae* dilakukan perhitungan hingga diperoleh kerapatan spora sebesar  $10^6$ /mL kemudian diinokulumkan pada edamame (Lee dkk., 2008). Perhitungan kerapatan menggunakan rumus (Hadioetomo, 1993) sesuai dengan persamaan (5) yaitu:

$$S = \frac{X}{t(\text{mm}) \times d \times L(\text{mm}^2)} \times 10^3 \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan:

S = Jumlah spora/mL

X = Jumlah spora yang dihitung (1 + 2 + 3 + 4 + 5)

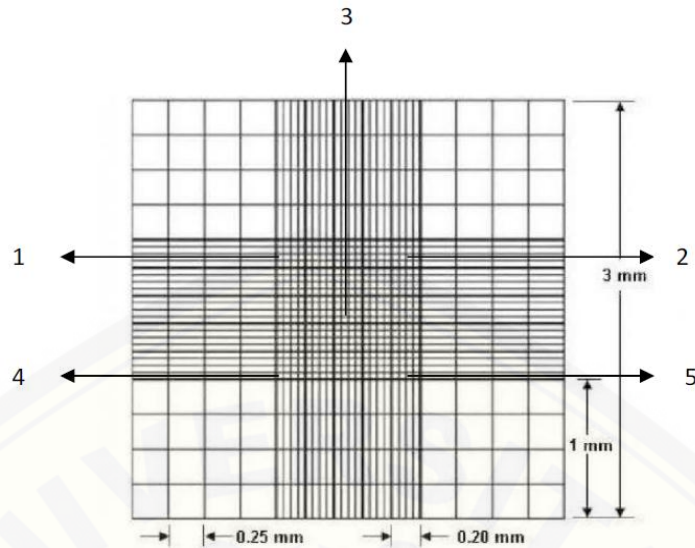
L = Luas kotak hitung (0,04 x 5 = 0,2 mm<sup>2</sup>)

t = Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

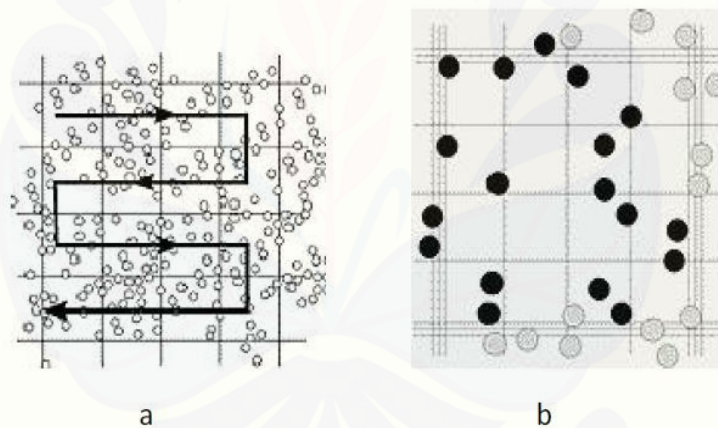
d = Faktor pengenceran

$10^3$  = Volum suspensi yang diambil (1 mL = 10<sup>3</sup> mm<sup>3</sup>)

(Modifikasi dari Tim QC APH Golongan Jamur, 2009).



Gambar 3.1. Kamar hitung hemositometer *Improved Neubauer* (Perhitungan spora hanya dilakukan pada daerah yang ditunjuk anak panah) (Hansen, 2000).



Gambar 3.2 Cara menghitung spora dengan menggunakan alat hemasitometer  
Keterangan:

- Alur perhitungan spora yaitu dari kiri kekanan dan di bawahnya dimulai dari kanan ke kiri
- Cara perhitungan spora pada kamar hitung dimana ● : spora yang dihitung, ○ : spora tidak dihitung (Tim QC APH Golongan Jamur, 2009)

Apabila suspensi spora yang didapatkan memiliki kerapan lebih dari  $10^6$  spora/mL, maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan persamaan (6) yaitu:

$$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2 \dots \dots \dots (6)$$

Keterangan :

V1 : volume larutan stok (mL)

N1 : konsentrasi larutan stok (spora/mL)

V2 : volum larutan yang diharapkan (mL)

N2 : konsentrasi larutan yang diharapkan (spora/mL)

### 3.6.5 Preparasi Kedelai Fermentasi *A. Oryzae*

Simplisia edamame terfermentasi dibuat dengan cara merendam 1/2 kg edamame segar dalam air panas selama 5 menit kemudian dikupas dan dihilangkan kulit arinya. Edamame kupas ditimbang 50 gram dan distrerilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C lalu didinginkan. Fermentasi dilakukan dengan menambahkan 10 mL suspensi spora yang mengandung  $10^6$  spora/mL di inokulumkan pada edamame steril. Selanjutnya diinkubasi selama 1, 2, 3 dan 4 hari pada suhu 30°C RH 95 % dan didapatkan kedelai fermentasi bentuk padat (*solid-state fermentation*). Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan cara di oven selama 30 jam pada suhu 60°C. Simplisia edamame kemudian dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan mesh 80 agar diperoleh serbuk dengan ukuran yang seragam. Serbuk edamame terfermentasi yang diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya (Cheng dkk., 2013)

### 3.6.6 Proses Penghilangan Lemak (*defatting*)

Proses penghilangan lemak (*defatting*) dilakukan dengan cara soxletasi. Serbuk edamame fermentasi dan non-fermentasi masing-masing ditimbang 40 g dibungkus menggunakan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam timbel soxhlet dan ditambahkan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1 : 5 (Hui dkk., 2005). kemudian dilakukan proses *defatting* selama 3 jam, serbuk edamame diambil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama satu malam dan ditimbang untuk proses selanjutnya.

### 3.6.7 Pembuatan Ekstrak Kedelai Fermentasi dan Non-fermentasi

Serbuk edamame bebas lemak diekstraksi menggunakan metode ultrasonik dengan pelarut etanol 70%. Serbuk edamame ditimbang kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer 500 mL dan ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 : 6 (Hui dkk., 2005). Setelah proses ekstraksi berlangsung selama 1 jam, kemudian diendapkan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Residu yang tersisa diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etanol 70% yang baru. Proses tersebut berlangsung 3 kali. Filtrat hasil *sentrifuge* dikumpulkan dalam *beaker glass*, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan digunakan untuk proses selanjutnya (Luthria dkk., 2007 dengan modifikasi). Skema pembuatan ekstrak edamame dapat dilihat pada Gambar 3.3.

### 3.7 Optimasi Kondisi Analisis

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

#### 3.7.1 Optimasi Eluen

Pada penelitian ini eluen yang dioptimasi adalah:

---

Komposisi eluen

---

*n*-heksan : etil asetat : asam formiat (v/v/v) = 2 : 5 : 0,05

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

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

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

---

Standar daidzein dengan konsentrasi tertentu ditotolkan sebanyak 6  $\mu$ L dan sampel ditotolkan sebanyak 6  $\mu$ L pada lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan masing-masing eluen dan *discanning* pada panjang gelombang 266 nm. Penilaian eluen yang paling optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N (*Theoretical Plate Number*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent*



a *Theoretical Plate*) terkecil, nilai Resolusi  $\geq 1,5$  dan nilai *retardation factor* (Rf) 0,2-0,8 (Rohman, 2009)

### 3.7.2 Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dapat dilakukan dengan melakukan *scanning* noda analit pada CAMAG TLC *Scanner* 3 (Densitometer) dan *software* program winCATS. Penilaian panjang gelombang dilakukan pada area panjang gelombang 200-400 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dengan melihat spektrum analit yang terbaca pada panjang gelombang maksimum.

### 3.7.3 Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji dengan menggunakan tiga konsentrasi uji. Pemilihan konsentrasi uji didasarkan pada hasil optimasi eluen terpilih yang menunjukkan perkiraan kandungan daidzein dalam ekstrak edamame. Pembuatan sampel uji dilakukan dengan cara menimbang sejumlah tertentu ekstrak edamame (*Glycine max*) dan dilakukan preparasi sampel dengan melarutkan pada 5 mL metanol.

Ditotolkan sebanyak larutan sampel 6  $\mu$ l pada lempeng KLT dan larutan standart 6  $\mu$ l, kemudian dieluasi dengan eluen *n*-heksan : etil asetat : asam asetat (2 : 5 : 0,15) dan *discanning* pada panjang gelombang 273 nm. Penilaian konsentrasi analit yang paling optimum berdasarkan parameter efisiensi kromatogram yaitu nilai N (*Theoretical Plate Number*) yang paling besar, nilai H (*Height Equivalent a Theoretical Plate*) terkecil.

## 3.8 Validasi Metode Analisis

Validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil analisis yang baik (Adamovics,1997). Parameter validasi metode analisis yang dilakukaan diantaranya yaitu :

### a. Selektifitas/spesifisitas

Ditotolkan larutan standar daidzein, larutan sampel sesuai dengan konsentrasi terpilih masing-masing 6  $\mu$ l, pada lempeng KLT silika gel GF254. Eluasi lempeng

KLT dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15), kemudian dianalisis dengan KLT densitometer. Pengujian selektivitas ditentukan melalui perhitungan nilai  $R_s$  dan nilai  $R_s$  yang diharapkan  $> 1,5$ . Parameter spesifisitas 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).

b. Akurasi

Akurasi dihitung berdasarkan persentase perolehan kembali terhadap tiga konsentrasi baku 30, 45, dan 60% yang ditambahkan pada larutan sampel. Dibuat larutan baku daidzein 400  $\mu\text{g/mL}$  dari larutan baku induk. Diadiskan 0,3 mL; 0,45 mL; dan 0,6 mL larutan baku daidzein ke dalam 5,0 mL suspensi sampel. Selanjutnya, ditotolkan ke pada lempeng KLT sebanyak 6  $\mu\text{L}$ . Dieluasi menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15). Diamati area daidzein pada panjang gelombang 273 nm menggunakan densitometer. Dihitung perolehan kembali berdasarkan kurva baku (Hilmi dkk., 2013). Nilai *recovery* dan RSD yang dipersyaratkan sesuai dengan tabel penerimaan yang ditetapkan oleh AOAC (1998).

c. Presisi

Presisi repeatabilitas dan presisi antara dilakukan terhadap konsentrasi baku hasil uji linieritas yaitu 10, 20, 50, 70, 90 dan 100  $\mu\text{g/mL}$  yang diamati simpangan baku relatifnya pada satu hari dan presisi antara diamati selama tiga hari berturut-turut.

Masing-masing konsentrasi baku dan sampel ditotolkan 6  $\mu\text{L}$  pada lempeng KLT silika gel GF254. Selanjutnya dieluasi dengan eluen *n*-heksan : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15). Diamati area daidzein pada panjang gelombang 273 menggunakan densitometer. Kemudian dihitung nilai RSD, penerimaan nilai RSD berdasarkan tabel penerimaan yang ditetapkan oleh AOAC (1998) pada Tabel 2.1

d. Linieritas

Linieritas dihitung dengan menggunakan 6 konsentrasi bertingkat dari bercak masing-masing baku pembanding terhadap luas areanya, sehingga



didapatkan persamaan linieritas  $y = a + bx$  dengan koefisien korelasinya mendekati 1.

Konsentrasi standar 20-200  $\mu\text{g/mL}$  ditotolkan sebanyak 6  $\mu\text{l}$  pada lempeng KLT silika gel GF254, kemudian dieluasi menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15). Diamati area daidzein pada panjang gelombang 273 menggunakan densitometer, kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi dengan area.

Berdasarkan area terukur ( $y$ ) pada berbagai kadar baku kerja daidzein ( $x$ ), maka dapat dihitung harga koefisien korelasi ( $r$ ). Bila ada hubungan linier antara  $y$  dengan  $x$ , maka dihitung persamaan garis regresi ( $y = bx+a$ ) dan koefisien variasi fungsi ( $V_{x_0}$ ) (Hilmi dkk., 2013). Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai parameter linieritas menggunakan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan untuk linieritas adalah nilai  $r \geq 0,99$ ,  $V_{x_0} < 5\%$ , dan  $X_p$  lebih kecil dari konsentrasi terkecil yang digunakan (Indrayanto and Yuwono, 2003).

e. Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitas (BK)

BD dan BK dihitung menggunakan 5 konsentrasi terkecil dibawah konsentrasi linieritas, kemudian dieluasi menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15) Diamati area daidzein pada panjang gelombang 273 menggunakan densitometer, Selanjutnya dilakukan perhitungan BD dan BK menggunakan program *Validation Method of Analysis* (Indrayanto and Yuwono, 2003).

### 3.9 Penetapan Kadar Daidzein

Penetapan kadar daidzein dalam ekstrak edamame dilakukan dengan menggunakan metode KLT densitometri.

a. Membuat Standar Uji

Dibuat larutan baku induk dari 10 mg serbuk standar daidzein kemudian dilarutkan dalam metanol p.a, sehingga diperoleh konsentrasi 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan baku induk diencerkan hingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 400  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan induk diencerkan sehingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi 10, 20, 50, 70, 90 dan 100  $\mu\text{g/mL}$

b. Membuat Sampel Uji

Ekstrak kental edamame ditimbang sebanyak 400 mg kemudian dilarutkan dalam 5 mL metanol p.a.

c. Kondisi Analisis

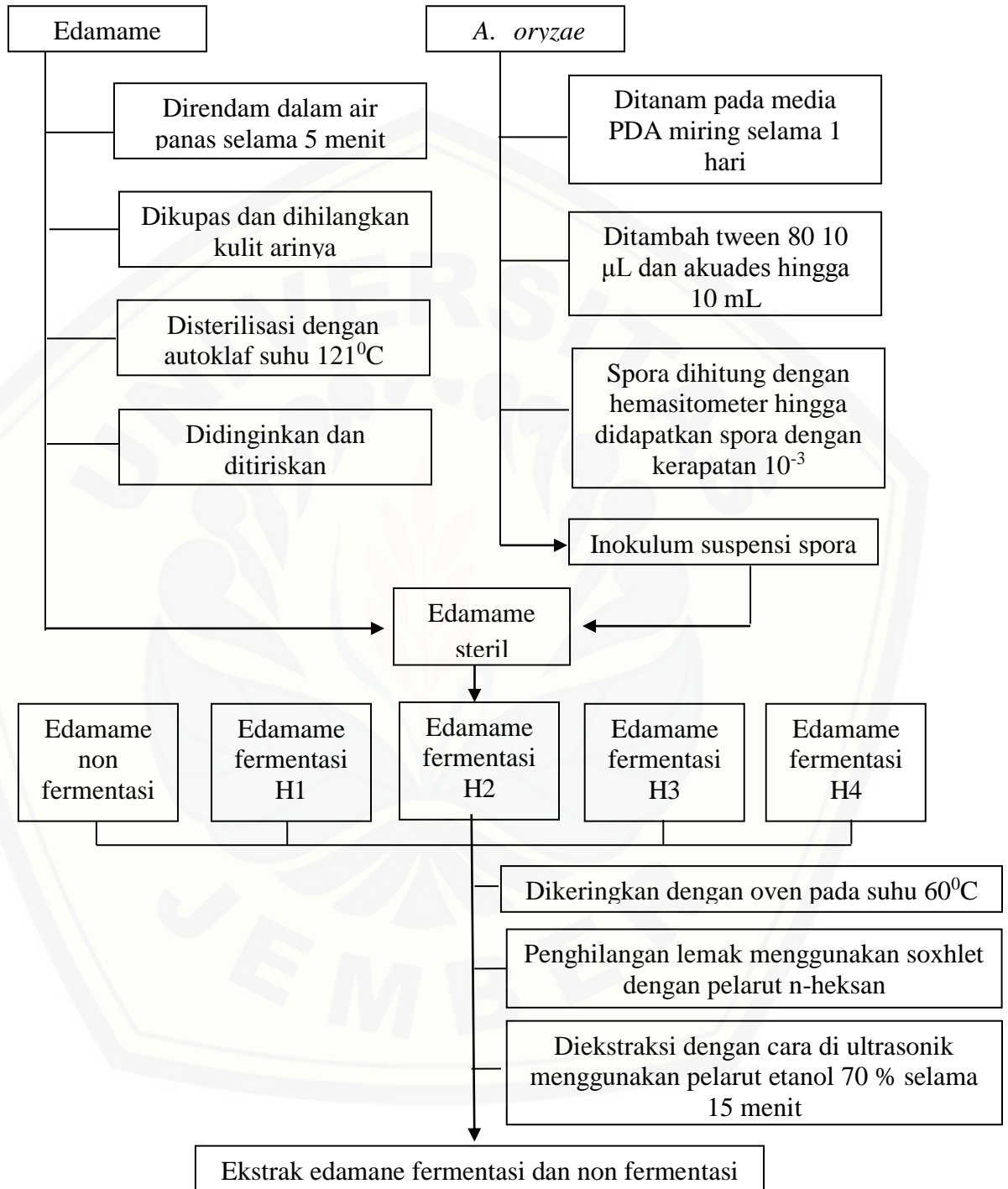
Kondisi analisis dalam pengujian daidzein dengan metode KLT, yaitu dengan menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF254 dan sebagai fase gerak terpelih. Volume sampel dan standar yang ditotolkan sebanyak 6  $\mu$ L. Noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm. Kemudian dilakukan uji densitometri pada panjang gelombang maksimum 273 nm.

### 3.10 Analisis Data

Setelah diperoleh data kadar daidzein, kemudian data dianalisis menggunakan *one-way* ANOVA. Data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen. Analisis varian satu arah ANOVA dilakukan untuk melihat perbedaan kadar daidzein dengan waktu fermentasi dari dua atau lebih kelompok. Uji ANOVA menunjukkan data yang berbeda signifikan, maka dapat dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Hasil uji ANOVA dan LSD signifikan bila didapat harga  $p < 0,01$  dengan tingkat kepercayaan 99% ( $\alpha = 0,01$ ).

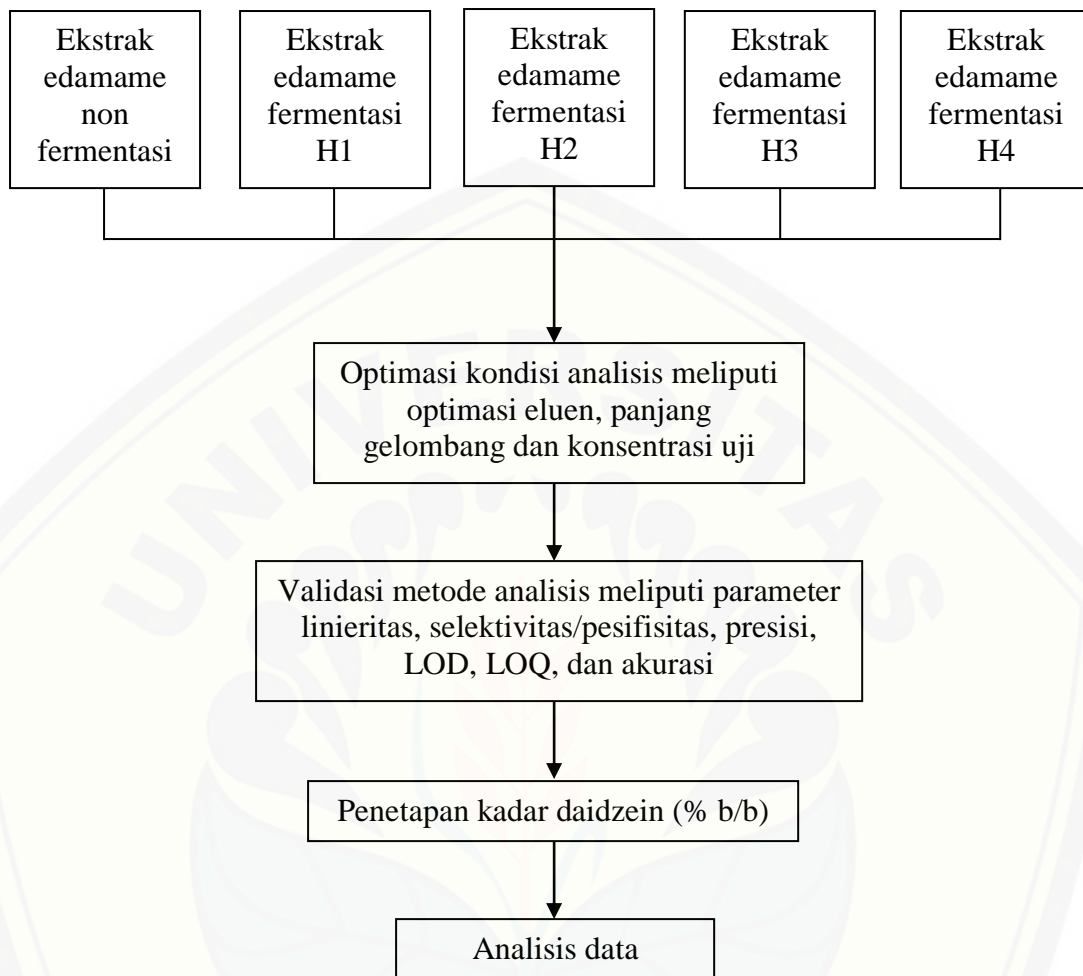
### 3.10 Skema Pelaksanaan Penelitian

#### 3.7.1 Skema Pembuatan Ekstrak Edamame Non-fermentasi dan Fermentasi



Gambar 3. 3 Skema pembuatan ekstrak edamame

## 3.7.2 Skema Optimasi, Validasi dan Penetapan Kadar



Gambar 3.4 Skema optimasi, validasi dan penetapan kadar

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

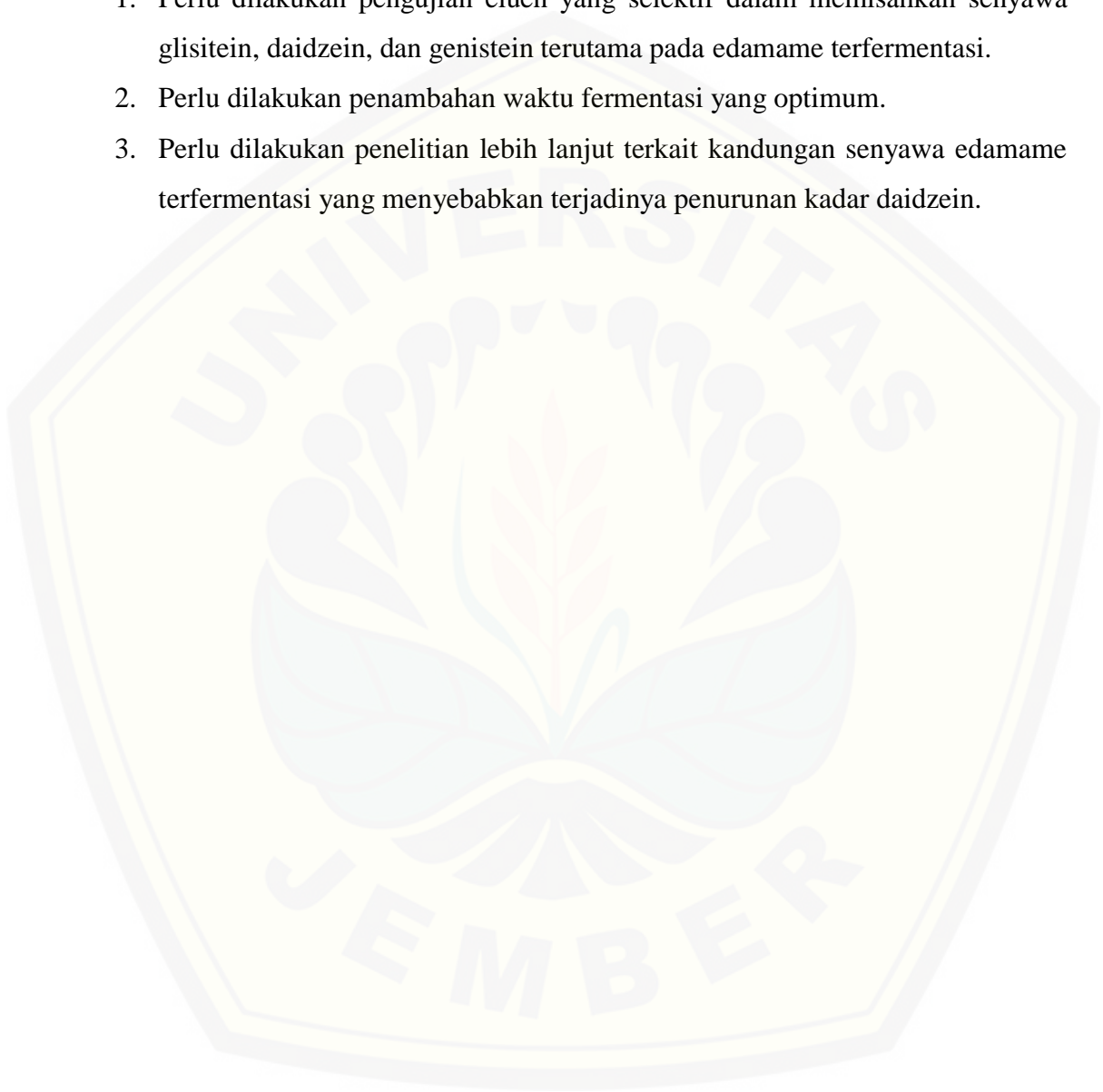
Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Kondisi optimum penetapan kadar daidzen dalam ekstrak edamame non fermentasi dan terfermentasi *A.oryzae* dengan metode analisis KLT-densitometri yaitu digunakan pelarut metanol p.a; fase diam Silica Gel 60 F254; Eluen yang digunakan : n-heksan : etil asetat : asam asetat (v:v:v) = 2:5:0,15; Panjang gelombang 273 nm; konsentrasi uji 80 mg/mL; dan metode pengembangan menaik.
2. Metode analisis penetapan kadar daidzein dalam ekstrak edamame non fermentasi dan terfermentasi *A.oryzae* dengan metode analisis KLT-densitometri memberikan hasil analisis yang kurang valid, yaitu tidak memenuhi parameter selektivitas  $R_s < 1,5$  sehingga kurang selektif dalam pemisahan daidzein. Untuk parameter linieritas terpenuhi yaitu nilai r sebesar 0,999, nilai  $V_{x0}$  sebesar 3,068%, dan nilai  $X_p$  sebesar 55.676. Kepekaan terhadap BD sebesar 23,694 ng dan nilai BK sebesar 71,089 ng, memiliki spesifisitas yang baik karena nilai korelasi pada uji purity dan identity lebih dari 0,99, presisi dengan nilai RSD kurang dari 5,3%, akurasi dengan nilai recovery antara 90-107% dan nilai RSD kurang dari 5,3%.
3. Fermentasi edamame menggunakan *A.oryzae* dapat meningkatkan kadar daidzein pada fermentasi hari ke- 4. Kadar daidzein  $\pm$  SD pada edamame non-fermentasi dan terfermentasi *A.oryzae* pada hari ke-1, 2, 3, dan 4 berturut-turut yaitu,  $0,0433 \pm 0,00221$ ;  $0,0336 \pm 0,00698$ ;  $0,0276 \pm 0,00039$ ;  $0,0219 \pm 0,00041$ ;  $0,1002 \pm 0,00924$  % (b/b).

## 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, saran yang bisa peneliti berikan yaitu:

1. Perlu dilakukan pengujian eluen yang selektif dalam memisahkan senyawa glisitein, daidzein, dan genistein terutama pada edamame terfermentasi.
2. Perlu dilakukan penambahan waktu fermentasi yang optimum.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait kandungan senyawa edamame terfermentasi yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar daidzein.





**DAFTAR PUSTAKA**

- Adlercreutz, H. 2003. Phytoestrogens and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 83:113–118.
- Ali, A., 2005. *Mikrobiologi Dasar Jilid I*. Makassar : State University of Makassar Press.
- Anderson J. W., V.A. Diwadkar, dan S.R. Bridges. 1998. Selective effect of different antioxidants on oxidation of lipoprotein from rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218:376-381.
- Ariyanti, H. dan E. Apriliana. 2016. Pengaruh fitoestrogen terhadap gejala menopause the influence of phytoestrogen on menopause symptom. 5:1–5.
- Armin, Fithriani, Bitu Revir, dan A. Z. Adnan. 2015. *Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri Untuk Analisis Pewarna Merah Sintetik Pada Beberapa Merek Saus Sambal Sachet*. Padang: Universitas Andalas.
- Asadi. 2009. Karakterisasi Plasma Nutfah untuk Perbaikan Varietas Kedelai Sayur (Edamame). *Buletin Plasma Nutfah*. 15(2):59-69.
- Barbesgaard, P., H. Hheldt-Hansen, dan B. Diderichsen. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae* : a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36:569–572.
- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Jakarta: YBPSP.
- Bourgaize, D., T. T. Jewell, dan R. G. Buiser. 1999. *Biotechnology Demystifying The Concepts*. (Terjemahan : Hari Purnomo dan Andiono), Jakarta: UI Press.
- Cederroth, C. R. dan S. Nef. 2009. Molecular and cellular endocrinology soy , phytoestrogens and metabolism : a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304:30–42.
- Chang, T. S., H.Y. Ding., S. S. K. Tai., dan C. Y. Wu. 2007. Mushroom tyrosinaseinhibitor effects of isoflavone isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chemistry*. 105: 1430–1438.
- Cheng, Brigitte, Margaret, Jan, dan Britth. 2007. Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause: The Journal of the North American Menopause Society*; 14(3):1-6.

- Coolong, T. 2009. *Edamame. College of Agriculture*. Kentucky: University of Kentucky.
- Coward, L., N. C. Barnes, K. D. R. Setchell, dan S. Barnes. 1993. Genistein, daidzein and other  $\beta$ -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 41:1961-1967.
- Dewi, Elisa Nur Afrida. 2015. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Edamame (*Glycine max*) In Vitro. *Skripsi*. Universitas Jember
- Duenas, Montserrat., Teresa., dkk. 2012. Bioactive Phenolic Compounds of Soybean (*Glycine max* cv. Merit): Modifications by Different Microbiological Fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 62(4):241-250S
- Dwidjoseputro. 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Solo: Djambatan.
- Elbashiti, T., F. Amal, dan E. Abboud. 2010. Isolation and identification of *Aspergillus oryzae* and the production of soy sauce with new aroma. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9(12): 1171-1175.
- Fardiaz, Srikandi. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama
- Franke, A.A., L.J Custer., C.M. Cerna, dan K. K Narala. 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal. Agric. Food Chem*. 42:1905-1913.
- Gandjar, I. G. dan A. Rohman. 2013. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gandjar, I., A. S. Robert., V. D Karin., O. Ariyanti, dan S. Iman. 1999. *Pengenalan Kapang Topik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gonzales, A. G. dan M. A. Herrador. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*. 26(3):227-238
- Gracia, C., M. Sammel., E. Freeman., H. Lin, Dan Nelson. 2005. Defining menopause status: creation of a new definition to identify the early changes of the menopausal transition. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*.
- Grieshop, C. M., C. T. Kadzere., G. M. Clapper., E. A. Flickinger., L. L. Bauer., L. Frazier, dan J. G. C. Fahey. 2003. Chemical and nutritional

characteristics of United States soybeans and soybean meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(26):7684-769.

Gritter, R. J., J. M. Bobbit., dan A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi. Terjemahan dari Introduction to Chromatography*. Oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.

Guha, N., M. L. Kwan., C. P. Quesenberry Jr., E. K. Weltzien., A. L. Castillo, dan B. J. Caan. 2009. Soy isoflavones and risk of cancer recurrence in a cohort of breast cancer survivors: the life after cancer epidemiology study. *Breast Cancer Research and Treatment*. 118:395-405.

Gyorgy, P., K. Murata, dan H. Ikehata. 1964. Antioxidants isolated from fermented soybeans tempeh. *Nature*. 203: 872-875.

Ha, E.Y.W., C.V. Morr, dan A. Seo, 1992, Isoflavone aglucones and volatile organic compounds in soybean; effect of soaking treatment. *Jornal of Food Science*. 57: 414-417.

Halmi, Auliya, Sudjarwo dan Asri Darmawati. 2013. *Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri Untuk Penetapan Kadar Kolkisin Dalam Infus Daun Kembang Sungsang (Gloriosa superba Linn.)*. Surabaya: Universitas Airlanga.

Hamdana, H.M. 2011. Kecemasan Menghadapi Perubahan saat Menopause. *Jurnal Tarbiyatuna Pendidikan Agama Islam*. 1(1):95-105.

Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3):117-135.

Huang, C., B. Hsu., N. Wu., W. Tsui, dan T. Lin. 2010. Anti-photoaging effects of soy isoflavone extract (aglycone and acetylglucoside form) from soybean cake. *International Journal of Molecular Sciences*. 1:4782-4795.

Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories, 2nd Edition*. New York: Informa Healthcare USA, Inc.

Hutabarat, L. S., H. Greenfield, dan M. Mulholland. 2000. Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. *J. Chrom. A*. 886:55-63.

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*. Universitas Jember.

- Kartini, Fitria Dwi. 2015. Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Kriebs, Jan M dan Carolyn. 2010. *Varney's Pocket Midwife*, 2nd Ed. Jakarta: EGC.
- Lee, I.H. dan C.C. Chou, 2006, Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:1309-1314.
- Messina, M. 2000. Soyfoods and soybean phytoestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (hrt). *European Journal of Cancer*. 36:71–72.
- Mulja, M . dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Naufalia, A. N. 2018. Validasi Metode Dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Glycine Max*) Terfermentasi Oleh *Rhizopus Oligosporus* Dengan KLT-Densitometri. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Pambudi, Singgih. 2013. *Budidaya dan Khasiat Kedelai Edamame Camilan Sehat dan Lezat Multi Manfaat*. Yogyakarta: Penerbit Pustaka Baru.
- Pawiroharsono, S. 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Jakarta: Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Pelczar, Michel J.Jr dan E.C.S.Chan. 1986. *Dasar-dasar mikrobiologi cetakan ke satu*. Penerjemah: Ratna Sri H, dkk. Jakarta:UI Press.
- Peters, D. dan Whitehouse, J. 2000. *The Role of Herbs in Modern Medicine: Some Current and Future Issues*. Malaysian Agricultural Research and Development Institute. Proceedings of 87 International Conference and Exhibition, 35-39.
- Ponnusha, B.S., S. Subramaniam., P. Paupathi., B. Subramaniam, dan R. Virumandy. 2011. Antioxidant and Antimicrobial properties of Glycine max L. *International Journal of Current Biological and Medical Science*. 1 (2):49 – 62.
- Prawirohardjo, Sarwono. 2008. *Ilmu Kebidanan*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka.
- Pubchem. 2018. National Center for Biotechnology Information. CID=5281708. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycitein> [Diakses 15 Juli 2017]



- Pubchem. 2018. National Center for Biotechnology Information. CID=5281708. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/daidzein>  
[Diakses 15 Juli 2017]
- Pubchem. 2018. National Center for Biotechnology Information. CID=5280961 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/genistein>  
[Diakses 15 Juli 2017]
- Punjaisee, C., W. Visessanguan., S. Punjaisee, dan C. Chaiyasut. 2011. Screening of potential *Aspergillus* spp. for production of fermented soybean with high antioxidative activity. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 10(2):197-212.
- Purwoko, T., S. Pawiroharsono, dan I. Gandjar, 2001. Biotransferensi isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524. *Biosmart*. 3(2): 7-12.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. 1st ed. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rukmana, R. dan Y. Yuniarsih. 2012. *Kedelai, Budidaya dan Pasca Panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Samruan, W., R. Oonsivilai, dan A. Oonsivilai. 2012. *Soybean and Fermented Soybean Extract Antioxidant Activity*. Thailand: World Academy of Science, Engineering and Technology, Suranaree University of Technology.
- Santjaka, A. 2011. *Statistik untuk Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta: Nuha Medika Yogyakarta.
- Schild, M.K. dan T.P. Labuza. 2001. *Essentials of Functional Foods*. Maryland: Aspen Publisher, Inc.
- Setyaningsih, D., K. Tresnawati., M. T. Soehartono., dan A. Apriyantono. 2006. Pengaruh aktivitas  $\beta$ -glukosidase eksternal dari kapang terhadap kadar vanilin buah vanili. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 16(1):28-35.
- Sherma, J. dan B. Fried. 1994. *Handbook of Thin Layer Chromatography Third Edition*. Pennsylvania, U.S.A: Lafayette College Easton.
- Suriawiria, U. 1986. *Pengantar untuk Mengenal dan Menanam Jamur*. Bandung : Angkasa.
- Suryaningsih, Wahyu. 2013. Karakterisasi Sosis Ayam Dengan Penambahan Edamame Sebagai Bahan Substitusi. *Skripsi*. Politeknik Negeri Jember.

- Teekachunhatean, S., N. Hanprasertpong, dan T. Teekachunhatean. 2013. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds grown in thailand. *International Journal of Agronomy*.
- Uniprot. 2018. URL: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). [Diakses 20 Januari 2018].
- Waluyo, L., 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press..
- Wang, H. dan P. A. Murphy. 1994. Isoflavone content in commercial soybeans foods. *J.Agric. Food Chem.* 42:1666-1673.
- Wei, Q. K., W. J. Wang, dan T. J. Fang. 2004. Study on isoflavones isomers contents in Taiwan's soybean. *Journal of Food and Drug Analysis*. 12:75–82.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Yunindarwati, Estika. 2015. Pengaruh Fermentasi *Aspergillus Oryzae* terhadap Kadar Genistein dan Aktivitas Penghambatan Tirosinase Kedelai (Glycine Max) In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Zamora A.F dan M. L. Fields. 1979. Nutritive quality of fermented cowpeas (*Vigna sinensis*) and chickpeas (*Cicer arietinum*). *J. Food Sci.* 44:234–236.
- Zubik, L. dan M. Meydani. 2003. Bioavailability of soybean isoflavon from aglycone and glucoside form in american women. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1459-1465.
- Zhu, D., N. S. Hettiarachchy., R. Horax, dan P. Chen. 2005. Isoflavone contents in germinated soybean seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 147–148.



## LAMPIRAN

## 1. Perhitungan

a. Perhitungan kepadatan suspensi spora *A.oryzae*

Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 47 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 57 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 52 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 57 spora

Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 47 spora

Rata-rata jumlah spora = 52 spora

Perhitungan kepadatan spora/mL (S)

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

$$S = 4,16 \cdot 10^6/\text{mL}$$

## b. Pengenceran suspensi spora

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

$$4,16 \cdot 10^6 \cdot 10 \text{ mL} = 10^6 \cdot V2$$

$$V2 = 41,6 \text{ mL, maka akuades yang ditambahkan sebesar } 31,6 \text{ mL.}$$

- Data Jumlah spora yang digunakan

$$\frac{41,6 \text{ ml suspensi jamur}}{31,6 \text{ ml akuades}} = \frac{1 \text{ ml suspensi jamur}}{x}$$

$$x = 0, 0,759 \text{ mL aquades, maka suspensi jamur yang harus dipipet sebesar } 0, 702 \text{ mL suspensi jamur}$$

### c. Perhitungan Rendemen Ekstrak

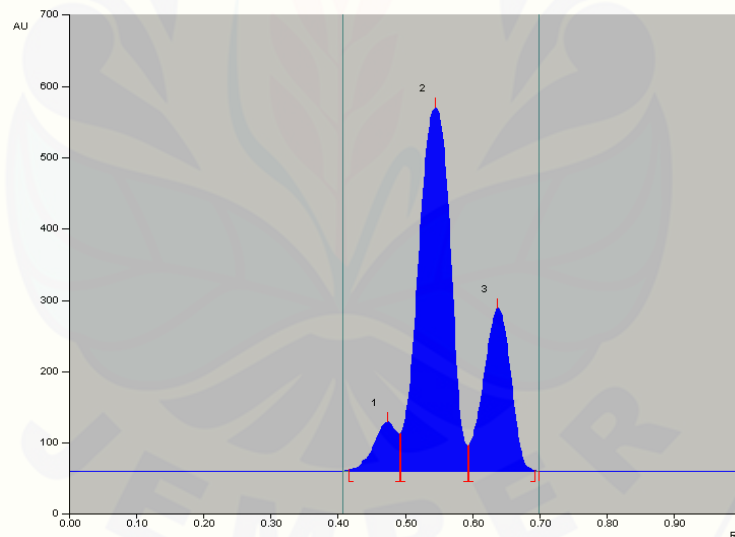
Waktu fermentasi	Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%b/b)
0	700	67,83	9,69
1	64	10,998	17,185
2	62	14,725	23,7495
3	56,4	7,0845	12,5701
4	51,4	10,5528	20,5307

- Contoh perhitungan:

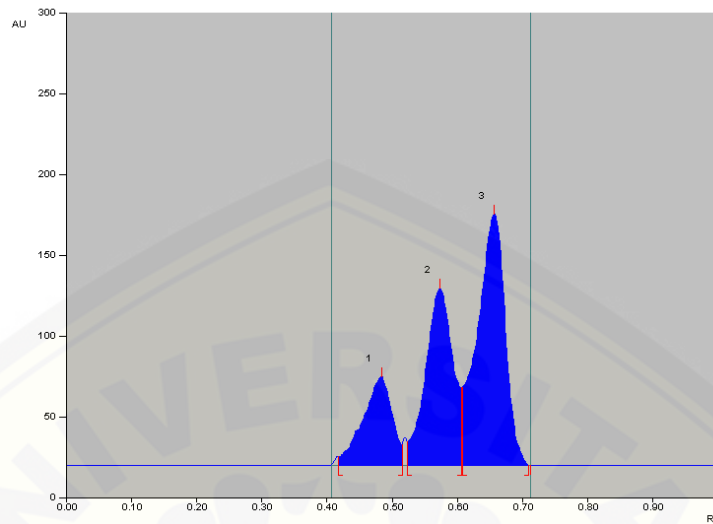
$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{bobot serbuk}} = \frac{67,83}{700} = 9,69 \text{ \% b/b}$$

## 2. Data Optimasi Eluen

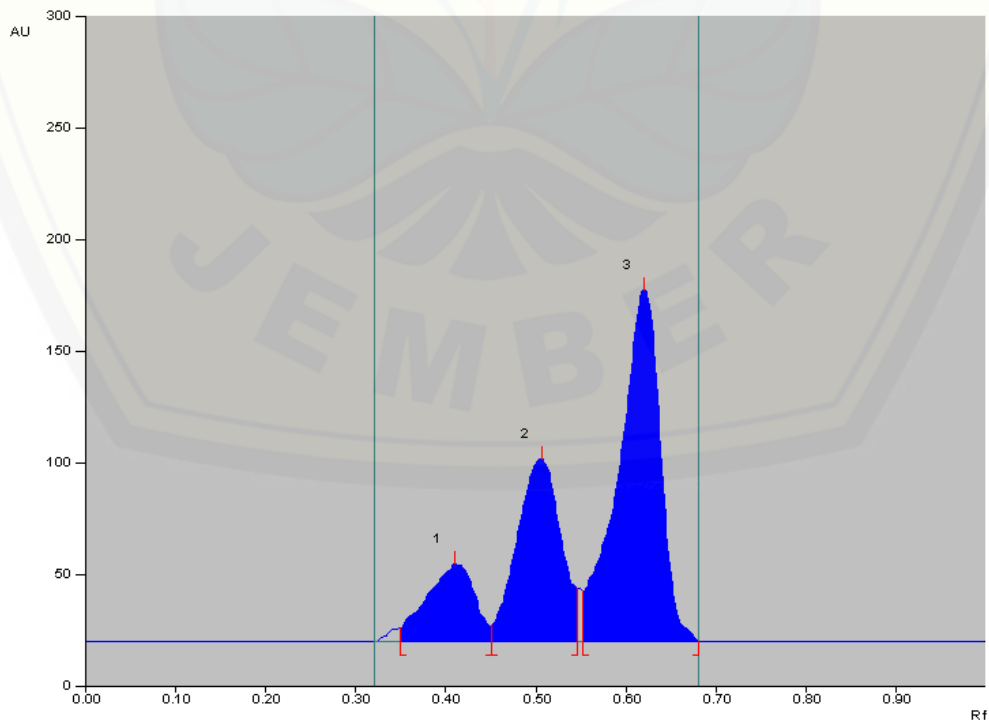
a. *n*-heksan : etil asetat : asam format (v/v/v) = 2 : 5 : 0,05



Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,42 Rf	0,47 Rf	0,49 Rf	Glisitein
2	0,49 Rf	0,55 Rf	0,59 Rf	Daidzein
3	0,59 Rf	0,64 Rf	0,69 Rf	Genistein

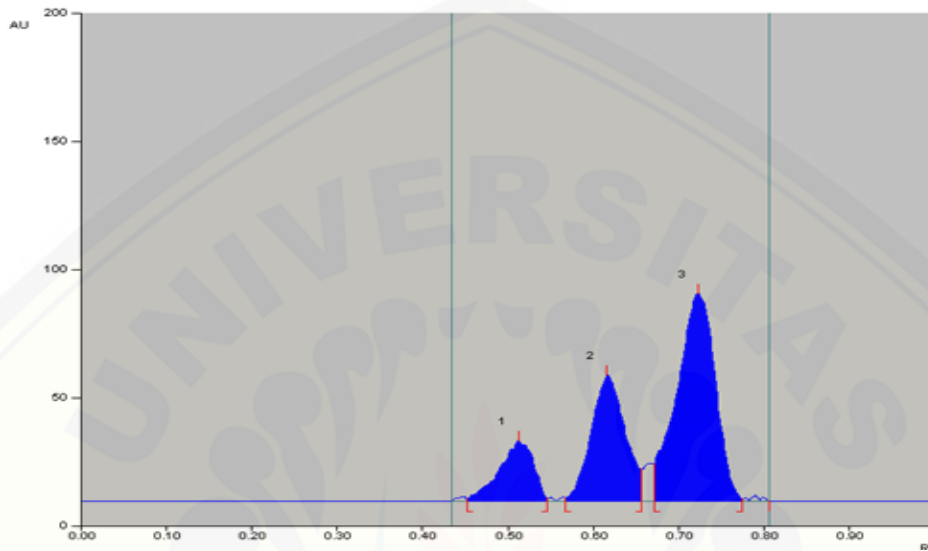
**b. *n*-heksan : etil asetat : air (v/v/v) = 2 : 5 : 0,15**

Peak	Start Position	Max Position	End Position	Assigned Substance
1	0,42 Rf	0,48 Rf	0,52 Rf	Glisitein
2	0,52 Rf	0,57 Rf	0,61 Rf	Daidzein
3	0,61 Rf	0,66 Rf	0,71 Rf	Genistein

**c. *n*-heksan : etil asetat (v/v/v) = 3 : 5**

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

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



Peak	Start Position	Max Position	Max Height	End Position	Area	Assigned Substance
1	0,45 Rf	0,51 Rf	23,6 AU	0,55 Rf	874 AU	Glisitein
2	0,57Rf	0,62 Rf	49,2 AU	0,66 Rf	1892 AU	Daidzein
3	0,67	0,72Rf	61 AU	0,78 Rf	3379 AU	Genistein

### Contoh Perhitungan

$$N = 16 \left( \frac{z_s}{w} \right)^2 = 16 \left( \frac{0,62}{0,57-0,66} \right)^2 = 759,309$$

$$H = \frac{zf}{N} = \frac{90}{759,309} = 0,1185$$

- Rasolusi puncak daidzein terhadap puncak glisitein ( $Rs_{1,2}$ )

$$Rs_{1,2} = \frac{2[(z)a - (z)b]}{w_a + w_b} = \frac{2(0,62 - 0,51)}{(0,66 + 0,57) - (0,55 + 0,45)} = 1,16$$

- Rasolusi puncak daidzein terhadap puncak genistein ( $Rs_{2,3}$ )

$$Rs_{2,3} = \frac{2[(z)a - (z)b]}{w_a + w_b} = \frac{2(0,71 - 0,61)}{(0,78 - 0,67) - (0,66 + 0,57)} = 1$$

### 3. Data Optimasi Konsentrasi Uji

Berdasarkan pada hasil *scanning* eluen terpilih, ekstrak terfermentasi 0,5 g dilarutkan dalam 5 mL metanol p.a Dilakukan penyetaraan massa sediaan untuk mendapatkan konsentrasi uji yang diharapkan.

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

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

- Data perbandingan nilai efisiensi kromatogram pada konsentrasi analit yang berbeda

Konsentrasi (mg/mL)	Start Position	Max Position	End Position	N	H
80	0,59	0,61	0,67	930,25	0,102
100	0,59	0,62	0,69	615,04	0,154
120	0,59	0,62	0,68	759,30	0,125

Contoh perhitungan

$$N = 16 \left( \frac{z_s}{w} \right)^2 = 16 \left( \frac{0,61}{0,67-0,59} \right)^2 = 930,25$$

$$H = \frac{z_f}{N} = \frac{90}{930,25} = 0,967$$

### 4. Preparasi Larutan Standar Daidzein

Massa daidzein = 10 mg

Volume = 5 mL

Konsentrasi larutan induk standar =  $\frac{10 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 2000 \mu\text{g/mL}$

- Pengenceran
  - $\frac{1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 2000 \mu\text{g/mL} = 400 \mu\text{g/mL}$
  - $\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2000 \mu\text{g/mL} = 200 \mu\text{g/mL}$



**a. Pengenceran larutan standar**

- Larutan standar 10 µg/mL

$$\frac{0,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 200 \text{ µg/mL} = 10 \text{ µg/mL}$$

- Larutan standar 20 µg/mL

$$\frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 200 \text{ µg/mL} = 20 \text{ µg/mL}$$

$$\frac{0,625 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ µg/mL} = 50 \text{ µg/mL}$$

- Larutan standar 70 µg/mL

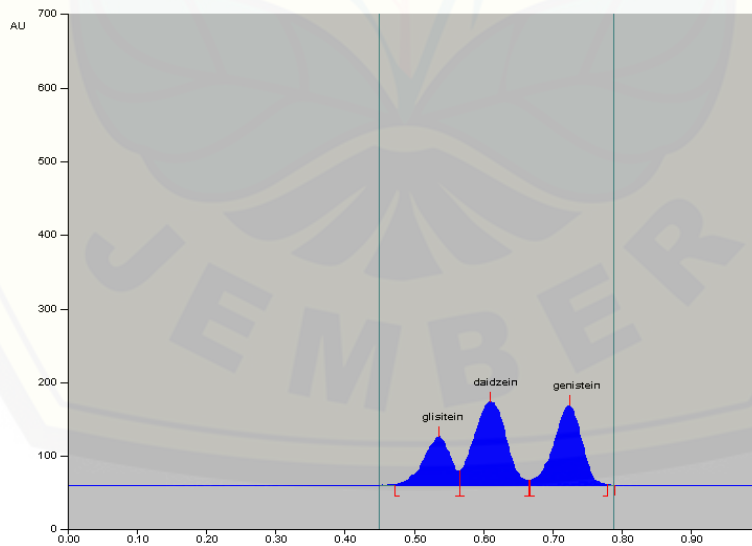
$$\frac{0,875 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ µg/mL} = 70 \text{ µg/mL}$$

- Larutan standar 90 µg/mL

$$\frac{1,125 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ µg/mL} = 90 \text{ µg/mL}$$

- Larutan standar 100 µg/mL

$$\frac{1,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ µg/mL} = 100 \text{ µg/mL}$$

**5. Perhitungan Resolusi Puncak Daidzein**

Peak	Start Position	Max Position	Max Height	End Position	Area	Assigned Substance
1	0,47 Rf	0,54 Rf	68,6 AU	0,56 Rf	2371 AU	Glisitein
2	0,57 Rf	0,61 Rf	113,4 AU	0,67 Rf	4834 AU	Daidzein
3	0,67 Rf	0,72 Rf	109 AU	0,78 Rf	4029 AU	Genistein

- **Resolusi puncak daidzein terhadap puncak glisitein (Rs<sub>1,2</sub>)**

$$Rs_{1,2} = \frac{2[(Z)a-(Z)b]}{W_a+W_b} = \frac{2(0,61-0,54)}{(0,67+0,57)-(0,56+0,47)} = 0,128$$

- **Resolusi puncak daidzein terhadap puncak genistein (Rs<sub>2,3</sub>)**

$$Rs_{2,3} = \frac{2[(Z)a-(Z)b]}{W_a+W_b} = \frac{2(0,72-0,61)}{(0,78+0,67)-(0,67+0,57)} = 0,198$$

## 6. Perhitungan Data Presisi

### a. Presisi hari ke-1

Kurva baku uji presisi hari ke-1 merujuk kepada Naufalia (2018), karena penelitian dilakukan pada satu lempeng dengan dua sampe berbeda. Diperoleh hasil kurva baku yaitu :

$$Y = 51.8749 + 22.0612X ;$$

$$R = 0.9995;$$

$$V_{x0} = 2.3355\%;$$

$$X_p = 42.9622.$$

- **Hasil uji presisi reapeatabilitas hari ke 1**

Penimbangan (mg)	Area	Massa (ng)	Massa percobaan (mg)	Kadar daidzein (% b/b)
408,7	4712	211,2362	0,1760	0,0430
406	4885,41	219,0966	0,1825	0,0449
405,1	4758,32	213,3358	0,1777	0,0438
403,4	4281,01	191,7001	0,1597	0,0396
403,5	4779,7	214,3049	0,1785	0,0442
405	4799,7	215,2115	0,1793	0,0442
		Rata-rata =		0,0433
		SD =		0,0019
		RSD =		4,4667

### b. Presisi hari ke-2

- **Kurva baku uji presisi hari ke-2**

Hasil kurva baku uji presisi hari ke-2 yaitu:

$$Y = -185.8462 + 20.3612X$$

$$r = 0.999171$$

$$V_{x0} = 2.970781\%$$

$$X_p = 54.38507$$

- **Hasil uji presisi reapeatabilitas hari ke-2**

Penimbangan (mg)	Area	Massa (ng)	Massa Percobaan (mg)	%b/b
408,7	3407,36	176,4729	0,1470	0,0359
406	3169,04	164,7683	0,1373	0,0338
405,1	3280,38	170,2365	0,1418	0,0350
403,4	3436,49	177,9035	0,1482	0,0367
403,5	3615,49	186,6948	0,1555	0,0385
405	3525,6	182,28004	0,1519	0,0375
	Rata-rata =			0,0362
	SD =			0,0017
	RSD =			4,7179

c. **Presisi hari ke-3**

- **Kurva baku uji presisi hari ke-3**

Hasil kurva baku uji presisi hari ke-2 yaitu

$$Y = -230.2862 + 22.71664X;$$

$$r = 0.99917;$$

$$V_{x0} = 2.96486\%;$$

$$X_p = 54.2791$$

- **Hasil uji presisi reapeatabilitas hari ke-3**

Penimbangan (mg)	Area	Massa ( ng)	Massa Percobaan (mg)	%b/b
408,7	3279,8	134,2414	0,1118	0,0273
406	3347,05	137,2017	0,1143	0,0281
405,1	3312,56	135,6835	0,1130	0,0279
403,4	3301	135,1746	0,1126	0,0279
403,5	3170,17	129,4154	0,1078	0,0267
405	3090,41	125,9043	0,1049	0,0259
	Rata-rata			0,0273
	SD			0,000869
	CV			3,178295

- **Contoh perhitungan**

$$\text{Kurva baku } Y = -230.2862 + 22.7166X$$

$$\text{Massa penimbangan} = 408,7 \text{ mg}$$

$$\text{Area} = 3279,8$$

$$\text{Massa percobaan (ng)}$$

$$Y = -230.2862 + 22.7166x$$

$$3279,8 = -230.2862 + 22.7166x$$

$$x = 134,2414 \text{ ng}$$

$$\text{Massa percobaan (mg)}$$

$$\frac{134,2414}{6 \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,1119 \text{ mg}$$

$$\text{Kadar ( \% b/b)} = \frac{0,1119}{408,7} \times 100\% = 0,0274 \%$$

## 7. Perhitungan Akurasi

### a. Pembuatan sampel akurasi

a. Sampel adisi 30%

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

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

$$X = 0,3 \text{ mL}$$

- **Cara pembuatan :**

a. Ditimbang sampel ekstrak sebanyak 0,5 g lalu dilarutkan dalam 3 L metanol.

b. Dimasukkan ekstrak ke dalam labu ukur 5 mL lalu ditambahkan standar sebanyak 0,3 mL dari standar induk 400  $\mu\text{g/mL}$ .

c. Ditambahkan metanol sampai tanda batas.

b. Sampel adisi 45 %

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

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

$$X = 0,45 \text{ mL}$$

- Cara membuat:
  - a. Ditimbang sampel ekstrak sebanyak 0,5 g lalu dilarutkan dalam 3 mL metanol.
  - b. Dimasukkan ekstrak ke dalam labu ukur 5 mL lalu ditambahkan standar sebanyak 0,45 mL dari standar induk 400  $\mu\text{g/mL}$ .
  - c. Ditambahkan metanol sampai tanda batas.
- c. Sampel adisi 60 %

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

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

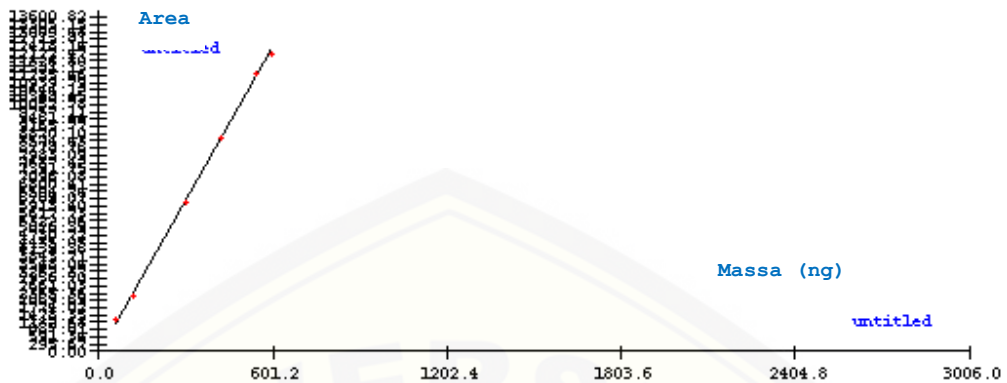
$$X = 0,6 \text{ mL}$$

- Cara membuat:
  - b. Ditimbang sampel ekstrak sebanyak 0,5 g lalu dilarutkan dalam 3 mL metanol.
  - b. Dimasukkan ekstrak ke dalam labu ukur 5 mL lalu ditambahkan standar sebanyak 0,6 mL dari standar induk 400  $\mu\text{g/mL}$ .
  - c. Ditambahkan metanol sampai tanda batas.

#### b. Kurva baku uji akurasi

Massa (ng)	Area
60	1426,65
120	1738,87
300	6029,01
420	9123,47
540	12278,82
600	12505,29





Line equation :  $Y = -57.01881000 + 20.60991000X$   
 Corelation coefficient : 0.99921410  
 Vx0 value : 2.87215800%

Method : Linearity  
 Probability : 95%  
 Number of data : 6  
 Line equation :  $Y = -57.01881000 + 20.60991000X$   
 Corelation coefficient : 0.99921410  
 sy value : 201.26270000  
 vx0 value : 2.87215800%  
 xp value : 52.20104000

The correlation coefficient is fullfilled the requirement ( > 0.99 )  
 The vx0 value is fullfilled the requirement ( 0% to 5% )  
 The xp value is OK ( < 60.00000000 )

**c. Data hasil uji akurasi**

Adisi (%)	Penimbangan	Area	Massa percobaan (mg)	Massa teoritis (mg)	Recovery (% b/b)	RSD (%)
30	401,8	5858,59	0,2339	0,2630	88,9344	5,8255
	401,8	6470,55	0,2568	0,2630	97,6166	
	401,8	6586,74	0,2611	0,2630	99,2651	
45	401	8026,48	0,3148	0,3228	97,5465	2,8720
	401	8492,65	0,3322	0,3228	102,9367	
	401	8114,86	0,3181	0,3228	98,5684	
60	400,1	9977,21	0,3876	0,3824	101,3600	0,9758
	400,1	10010,05	0,3889	0,3824	101,6804	
	400,1	10168,15	0,3948	0,3824	103,2232	
Rata-rata					99,0146	3,2244

- **Contoh perhitungan**

Massa standar:

Adisi 30%

$$\frac{2000 \text{ ppm}}{10 \text{ mg}} = \frac{24 \text{ ppm}}{x}$$

$$X = 0,12 \text{ mg}$$

Massa teoritis (% b/b dari presisi) = 0,0356 % b/b

$$\frac{0,0356 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 401,8 = 0,143 \text{ mg} + 0,12 \text{ mg} = 0,2630 \text{ mg}$$

Massa percobaan

$$Y = -57,01881 + 20,60991X$$

$$5858,59 = -57,01881 + 20,60991X$$

$$X = 280,7206 \text{ ng}$$

$$\frac{280,7206 \text{ ng}}{6 \text{ } \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ mL}}$$

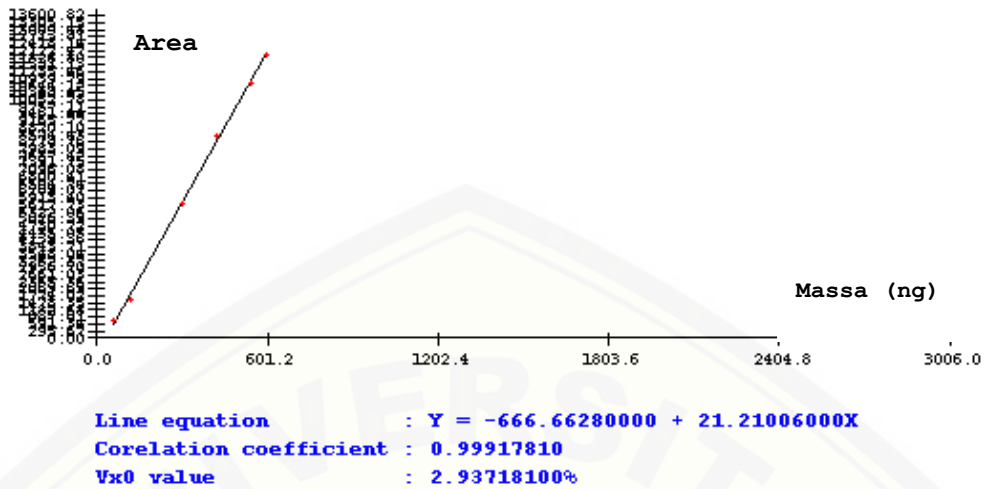
$$X = 0,2339 \text{ mg}$$

$$\text{Recovery} = \frac{0,2339 \text{ mg}}{0,2630 \text{ mg}} \times 100\% = 88,9344 \text{ \% b/b}$$

## 8. Perhitungan penetapan kadar

### a. Kurva penetapan kadar edamame terfermentasi

Massa (ng)	Area
60	768,99
120	1616,82
300	5668,47
420	8508,55
540	10751,59
600	11954,13



```

Method          : Linearity
Probability     : 95%
Number of data  : 6
Line equation   : Y = -666.66280000 + 21.21006000X
Correlation coefficient : 0.99917810
Sy value       : 211.81250000
Vx0 value      : 2.93718100%
Xp value       : 53.35633000
    
```

The correlation coefficient is fullfilled the requirement ( > 0.99 )  
 The vx0 value is fullfilled the requirement ( 0% to 5% )  
 The xp value is OK ( < 60.00000000 )

**b. Hasil uji penetapan kadar daidzein**

Sampel	Penimbangan	Area	Massa (mg)	Kadar (% b/b)	Rata-rata (%)	SD (%)
h0	402,8	4320,23	0,1769	0,0439	0,0433	0,00221
	401,7	4428,25	0,1813	0,0451		
	401,7	4001,67	0,1641	0,0408		
h1	400,6	3301,43	0,1559	0,0389	0,0335	0,00698
	401,5	3025,38	0,1450	0,0361		
	402	1959,97	0,1031	0,0256		
h2	402,9	2123,97	0,1096	0,0272	0,0276	0,000398
	402,7	2201,23	0,1126	0,0279		
	402,2	2177,48	0,1117	0,0277		
h3	402,3	1599,06	0,0890	0,0221	0,02199	0,000411
	400,2	1606,29	0,0893	0,0223		
	402,3	1537,6	0,0866	0,0215		
h4	401,4	8789,5	0,3715	0,0925	0,1002	0,009240
	402,1	9328,28	0,3926	0,0976		
	401,2	10616,0	0,4432	0,1105		

Contoh perhitungan :

Massa percobaan

$$y = -666,6628 + 21,21006X$$

$$3301,43 = -666,6628 + 21,21006X$$

$$X = 187,0854 \text{ ng}$$

$$\frac{187,0854 \text{ ng}}{6 \mu\text{l}} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$X = 0,1559\text{mg}$$

$$\text{Kadar (\% b/b)} = \frac{0,1559 \text{ mg}}{400,6 \text{ mg}} \times 100\% = 0,0389 \text{ \% b/b}$$

## 9. Hasil data ANOVA

### a. Uji normalitas

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
konsentrasi	non fermentasi	.279	3	.	.939	3	.523
	fermentasi H1	.310	3	.	.900	3	.384
	fermentasi H2	.337	3	.	.855	3	.253
	fermentasi H3	.292	3	.	.923	3	.463
	fermentasi H4	.277	3	.	.941	3	.532

a. Lilliefors Significance Correction

### b. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
konsentrasi			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.840	4	10	.011

## c. Uji signifikan ANOVA

ANOVA					
konsentrasi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.012	4	.003	107.133	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.012	14			

## d. Uji LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
non - fermenta si	fermentasi H1	.0097333	.0043278	.048	-.003983	.023449
	fermentasi H2	.0156333*	.0043278	.005	.001917	.029349
	fermentasi H3	.0213000*	.0043278	.001	.007584	.035016
	fermentasi H4	-.0569333*	.0043278	.000	-.070649	-.043217
fermenta si H1	fermentasi	-.0097333	.0043278	.048	-.023449	.003983
	fermentasi H2	.0059000	.0043278	.203	-.007816	.019616
	fermentasi H3	.0115667	.0043278	.023	-.002149	.025283
	fermentasi H4	-.0666667*	.0043278	.000	-.080383	-.052951



fermenta non si H2	fermentasi	-.0156333*	.0043278	.005	-.029349	-.001917
	fermentasi H1	-.0059000	.0043278	.203	-.019616	.007816
	fermentasi H3	.0056667	.0043278	.220	-.008049	.019383
	fermentasi H4	-.0725667*	.0043278	.000	-.086283	-.058851
fermenta non si H3	fermentasi	.0213000*	.0043278	.001	-.035016	-.007584
	fermentasi H1	-.0115667	.0043278	.023	-.025283	.002149
	fermentasi H2	-.0056667	.0043278	.220	-.019383	.008049
	fermentasi H4	-.0782333*	.0043278	.000	-.091949	-.064517
fermenta non si H4	fermentasi	.0569333*	.0043278	.000	.043217	.070649
	fermentasi H1	.0666667*	.0043278	.000	.052951	.080383
	fermentasi H2	.0725667*	.0043278	.000	.058851	.086283
	fermentasi H3	.0782333*	.0043278	.000	.064517	.091949

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