

**KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ISOFLAVON
DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI
EKSTRAK ETANOL TEMPE BERBAHAN BAKU
KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis*)**

TESIS

Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna memperoleh gelar Magister Sains
Program Studi Biosains



Oleh :
Yurina Istiani
Nim. S900208034

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2010**

**KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ISOFLAVON DAN
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK ETANOL
TEMPE BERBAHAN BAKU KORO PEDANG
(*Canavalia ensiformis*)**

TESIS

Oleh
Yurina Istiani
Nim. S900208034

Telah disetujui oleh tim pembimbing

Komisi Pembimbing	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Pembimbing I	Prof.Ir. Sri Handajani, MS,Ph.D NIP. 19470729 197612 2 001	 2010
Pembimbing II	Dr. Artini Pangastuti, M.Si. NIP. 19750531 200003 2 001	 2010

Mengetahui
Ketua Program Studi Biosains
Program Pasca Sarjana

Dr. Sugiyarto, M.Si
NIP. 19670430 199203 1002

**KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ISOFLAVON DAN
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK ETANOL
TEMPE BERBAHAN BAKU KORO PEDANG
(*Canavalia ensiformis*)**

TESIS

**Oleh
Yurina Istiani
Nim. S900208034**

Telah dipertahankan di depan penguji
Dinyatakan telah memenuhi syarat
pada tanggal,

Jabatan	Nama	Tanda tangan	Tanggal
Ketua :	Prof. Drs. Sutarno, M.Sc.,Ph.D NIP. 19600809 198612 1 001
Sekretaris :	Dr. Edwi Mahajoeno, M.Si NIP. 19601025 199702 1 001
Anggota Penguji :	Prof.Ir.Sri Handajani,MS.,Ph.D NIP. 19470729 197612 2 001
	Dr. Artini Pangastuti, M.Si NIP. 19750531 200003 2 001

Mengetahui

Direktur Program Pascasarjana UNS

Ketua Program Studi Biosains

Prof.Drs Suranto,MSc.,Ph.D
NIP. 19570820 198503 1 004

Dr. Sugiyarto, M.Si
NIP. 19670430 1992003 1 002

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS DAN PUBLIKASI TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa

1. Tesis yang berjudul : “ **Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*)**“ ini adalah karya penelitian saya dan merupakan bagian dari penelitian Prof. Ir. Sri Handayani, MS, Ph.D dan Sri Retno Dwi Ariani, S.Si, M.Si. Karya ilmiah ini tidak pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur- unsur jiplakan, maka saya bersedia Tesis beserta gelar MAGISTER saya dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).
2. Publikasi sebagian atau keseluruhan isi tesis pada jurnal atau forum ilmiah lain harus seijin Ketua Prodi Biosains PPs-UNS dan minimal satu kali publikasi menyertakan tim pembimbing sebagai *author*. Apabila dalam waktu sekurang-kurangnya satu semester (6 bulan sejak pengesahan Tesis) saya tidak melakukan publikasi dari sebagian atau keseluruhan tesis ini, maka Prodi Biosains PPs-UNS berhak mempublikasikannya pada jurnal ilmiah yang diterbitkan oleh Prodi Biosains PPs-UNS dan atau media ilmiah yang ditunjuk. Apabila saya melakukan pelanggaran dari ketentuan publikasi ini, maka saya bersedia mendapatkan sanksi akademik yang berlaku.

Surakarta, 21 Januari 2010

Mahasiswa

Yurina Istiani
S900208034

KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ISOFLAVON DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK ETANOL TEMPE BERBAHAN BAKU KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis*)

Yurina Istiani, Sri Handajani, Artini Pangastuti

Program Studi Biosains PPs UNS

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa isoflavon daidzein, genestein, glisitein dan faktor-2, dan mengetahui aktivitas antioksidan pada koro pedang dan produk tempunya.

Bahan yang digunakan adalah koro pedang dengan perlakuan ukuran biji utuh dan rajang dengan variasi lama waktu fermentasi (0,1,2,3,4 hari) bila dibandingkan dengan ekstrak etanol dari kedelai dan produk tempunya dan beberapa antioksidan alami (α -tokoferol, β -karoten, dan vitamin C) maupun antioksidan sintetis (BHT). Metode yang digunakan untuk ekstraksi isoflavon adalah metode maserasi dan untuk identifikasi isoflavon menggunakan metode HPLC. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Analisis data untuk uji aktivitas antioksidan menggunakan metode *General Linear Model – Univariate*. dan *Compare Means – One Way Anova*.

Kandungan total isoflavon tertinggi untuk tempe koro pedang utuh dan rajang terjadi pada fermentasi 1 hari yaitu masing-masing 0.786% dan 0.590%, sedangkan pada tempe kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari yaitu 1.812%. Aktivitas antioksidan tertinggi pada tempe koro pedang utuh dan rajang dan tempe kedelai terjadi pada fermentasi 3 hari yaitu masing-masing 77.32%, 68.63%, dan 81.43%. Aktivitas antioksidan pada tempe kedelai relatif sama dengan BHT yaitu pada kisaran 81%, dan tempe koro pedang utuh relatif sama dengan vitamin C dan α -tokoferol yaitu antara 75%-77%. Untuk aktivitas antioksidan tempe koro pedang rajang lebih kecil berbeda nyata yaitu 69%, dan terendah β -karoten yaitu 43%.

Kata kunci : koro pedang, tempe, antioksidan, isoflavon

**THE CHARACTERISTICS OF THE BIOACTIVE COMPOUNDS OF
ISOFLAVONE AND STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
THE ETHANOL EXTRACT OF TEMPEH
MADE OF JACK BEAN (*Canavalia ensiformis*)**

Yurina Istiani, Sri Handajani, Artini Pangastuti

**Graduate Program in Bioscience, Postgraduate Program,
Sebelas Maret University**

ABSTRACT

The objectives of the research were to find out: (1) the contents of the isoflavone compounds of daidzein, genistein, glisitein, and factor-2, and (2) the antioxidant activity of jack bean and its tempeh product.

The material used for the research was jack bean with the treatment of the whole and chopped seed size and length of fermentation (0,1,2, 3, 4 days) compared with the ethanol extract of the soy bean and its tempeh product and several natural antioxidants (α -tocoferol, β carotene, and Vitamin C) and BHT synthetic antioxidant. The method used to extract the isoflavone compounds was maceration, and the method used to identify the isoflavone compounds was that of HPLC. The test of antioxidant activity used the method of DPPH. The analysis of the data of the test of antioxidant activity used the method of General Linear Model – Univariate and Compare Means – One-Way Anova.

The largest total content of the isoflavone compounds of the tempeh made of the whole and chopped jack bean took place in the 1-day fermentation, that is, 0.786% and 0.590% while the largest total content of the isoflavone compounds of the tempeh made of the soy bean took place in the 2-day fermentation, that is, 1.812%. The highest antioxidant activity of the tempeh made of the whole and chopped jack bean and soy bean took place in the 3-day fermentation, that is, 77.32%, 68.63%, and 81.43% respectively. The antioxidant activity of the tempeh made of the soy bean was relatively similar to that of BHT, that is, at the range of 81%, and the antioxidant activity of the tempeh made of the whole jack bean was relatively similar to those of vitamin C and α -tocoferol, that is, ranging from 75% to 77%. The oxidant activity of the tempeh made of the chopped jack bean was lower compared to those of soy bean, natural antioxidant (Vitamin C and α -tocoferol and BHT) significantly different that is 69%, and β carotene (45%) had the lowest antioxidant activity.

Keywords: Jack bean, tempeh, antioxidant, isoflavone



Karya ilmiah ini saya persembahkan untuk
My Be, *love of my life*
Ayah Ibuku tercinta
Adik-adikku tercinta
Sahabat-sahabatku yang tersayang

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul “ **Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*)**” Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi ekstraksi isoflavon biji *legume* dan produk tempunya, identifikasi isoflavon dengan HPLC dan uji aktivitas antioksidan.

Nilai penting penelitian ini adalah mengetahui kandungan isoflavon dan aktivitas antioksidan koro pedang utuh dan rajang dengan variasi lama waktu fermentasi. Dari hasil penelitian ditemukan bahwa kandungan isoflavon tertinggi koro pedang rajang dan utuh terjadi pada fermentasi 1 hari dan aktivitas antioksidan tertinggi terjadi pada fermentasi 3 hari. Penelitian ini adalah ke arah pengembangan produk tempe generasi ketiga berbahan baku *legume* lokal yang memiliki khasiat yang tidak kalah dengan kedelai. Adapun kendala-kendala yang ada diantaranya ketidakstabilan senyawa isoflavon sendiri yang mudah bereaksi dengan senyawa lain.

Penulis menyadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi dirasakan banyak kekurang tepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Surakarta,

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah hirobil 'alamin atas segala rahmat dan inayah Allah SWT yang telah senantiasa tercurah pada penulis sehingga dapat menyelesaikan Tesis dengan judul "**Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*)**". Dalam penyusunan tesis ini penulis telah memperoleh bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Sebelas Maret selaku pimpinan dari lembaga pendidikan ini.
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret yang telah memberikan kesempatan yang seluas-luasnya mengikuti pendidikan pascasarjana ini.
3. Ketua Program Studi Biosains yang telah membimbing dan memotivasi dalam menyelesaikan program pembelajaran.
4. Prof. Dr. Ir. Sri Handajani, MS., selaku pembimbing pertama dan Dr. Artini Pangastuti, Msi., selaku pembimbing kedua yang telah berkenan membimbing dengan penuh kesabaran dan ketelitian sehingga tesis ini dapat penulis selesaikan.
5. Ibu Sri Retno Dwi Ariani, Msi., Dosen jurusan pendidikan kimia FKIP UNS yang telah membantu dan membimbing di laboratorium sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

6. Ketua Lab Mipa Pusat UNS, khususnya ketua sub Lab Biologi atas ijinnya menggunakan fasilitas lab.
7. Ketua Lab FKIP Kimia atas ijinnya menggunakan fasilitas lab.
8. Bapak Supoyo, laboran jurusan kimia UGM yang dengan sabar membantu proses HPLC.
9. Adik-adik S1 (Wiji, Yuli dan Yani) jurusan pendidikan kimia FKIP UNS yang telah menemani di laboratorium hingga sampai diperoleh data penelitian.
10. Teman-temanku Bu Heni, Bu Yuni dan Bu Rini atas semangat dan dorongannya.
11. Bupati Sukoharjo yang telah memberikan ijin belajar untuk melanjutkan pendidikan di program pascasarjana.
12. Kepala Dinas Pendidikan Kabupaten Sukoharjo yang telah memotivasi untuk meningkatkan kualifikasi akademik dengan melanjutkan pendidikan di program pascasarjana.
13. Kepala Sekolah SMP Negeri 2 Grogol yang telah memberikan ijin belajar untuk melanjutkan pendidikan di program pascasarjana.
14. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini.

Semoga amal baik beliau-beliau senantiasa mendapatkan balasan pahala, rahmat dan hidayah dari Allah, SWT.

Surakarta, Januari 2010

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan Pembimbing Tesis.....	ii
Halaman Pengesahan Penguji Tesis.....	iii
Halaman Pernyataan Orisinalitas.....	iv
Halaman Abstrak	v
Halaman Abstract.....	vi
Halaman Persembahan.....	vii
Kata Pengantar.....	viii
Halaman Ucapan Terima Kasih.....	ix
Daftar Isi.....	xi
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Gambar.....	xv
Daftar Lampiran.....	xvi
Daftar Singkatan.....	xviii
I. Pendahuluan.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	6
II. Tinjauan Pustaka.....	7
A. Legume.....	7
B. Koro Pedang atau Jack Beans (<i>Canavalia ensiformis</i>).....	7
1. Daerah Asal dan Penyebarannya.....	7

2. Morfologi Koro Pedang.....	7
3. Kandungan Kimia Koro Pedang.....	9
C. Tempe.....	10
1. Tempe Kedelai.....	11
2. Tempe Non Kedelai.....	12
3. Fermentasi Tempe.....	13
4. <i>Rhizopus sp.</i>	16
D. Metabolit Sekunder.....	18
E. Isoflavon.....	20
1. Isoflavon Pada Kedelai	20
2. Isoflavon pada Tempe Kedelai.....	22
3. Metabolisme Isoflavon pada Proses Pengolahan Kedelai Menjadi Tempe.....	24
4. Manfaat Senyawa Isoflavon pada Tempe Kedelai.....	27
F. Antioksidan.....	30
1. Pengertian Tentang Antioksidan.....	31
2. Antioksidan Alami.....	33
3. Antioksidan Sintetik.....	34
4. Antioksidan Pada Kedelai.....	35
5. Antioksidan Pada Tempe kedelai.....	36
G. Uji Aktifitas Antioksidan.....	37
H. Kerangka Berpikir.....	39
I. Hipotesis.....	40
III. Metodologi Penelitian	41
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	41

B. Bahan dan Alat.....	41
1. Bahan.....	41
2. Alat.....	42
C. Prosedur Kerja.....	42
1. Metode Pembuatan Tempe.....	42
2. Ekstraksi Isoflavon dengan Metode Maserasi.....	44
3. Metode Identifikasi Isoflavon.....	45
4. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	46
5. Teknik Analisa Data.....	47
IV. Hasil Penelitian dan Pembahasan.....	48
1. Ekstraksi Isoflavon Bij Legume dan Produk Tempenya.....	43
2. Identifikasi Isoflavon dengan HPLC.....	51
3. Uji Aktivitas Antioksidan.....	58
V. Kesimpulan dan Saran.....	65
A. Kesimpulan.....	65
B. Saran.....	66
Daftar Pustaka.....	67
Lampiran.....	84

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kandungan Gizi Biji Koro Pedang.....	9
Tabel 2.2. Perbedaan Sifat-Sifat Pokok <i>Rhizopus sp.</i> Pada Tempe.....	16
Tabel 2.3. Struktur Daidzin, Genistin dan Glisitin.....	21
Tabel 2.4. Struktur dan Sifat Kimia Daidzein, Genistein, Glisitein dan Faktor-2.....	23
Tabel 2.5. Potensi Pemanfaatan Senyawa Isoflavonoida untuk Kesehatan.....	28
Tabel 2.6. Kadar Vitamin (mg/g bahan kering) dalam biji kedelai dan tempe...36	
Tabel 4.1. Ekstraksi Senyawa Isoflavon Kedelai dan Koro Pedang (per 100 gram).....	49
Tabel 4.2. Hasil Identifikasi Isoflavon dari Kedelai dan Koro Pedang dan Utuh dan Rajang (per 100 gram).....	52
Tabel 4.3. Aktivitas Antioksidan (%) Pada Koro Pedang dan Kedelai dengan Lama Waktu Fermentasi.....	58
Tabel 4.4. Perbandingan Aktivitas Antioksidan (%) Tempe Koro Pedang Utuh Utuh dan Rajang Serta Sumber Lain.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Tanaman Koro Pedang.....	8
Gambar 2.2.	Biji Koro Pedang.....	8
Gambar 2.3.	<i>Rhizopus oligosporus</i>	17
Gambar 2.4.	Hubungan Antara Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder.....	19
Gambar 2.5.	Reaksi Hidrolisis Glukosida Isoflavon Menjadi Aglukon Isoflavon.....	25
Gambar 2.6.	Reaksi Biokonversi Aglukon Isoflavon Menjadi Faktor-2.....	26
Gambar 4.1.	Grafik Kandungan Isoflavon Tempe Koro Pedang Utuh.....	56
Gambar 4.2.	Grafik Kandungan Isoflavon Tempe Koro Pedang Rajang.....	56
Gambar 4.3.	Grafik Kandungan Isoflavon Tempe Kedelai.....	56
Gambar 4.4.	Grafik Aktivitas Antioksidan (%) Beberapa Jenis Tempe.....	58
Gambar 4.5.	Perbandingan Aktivitas Antioksidan (%) Antara Tempe Koro Pedang dengan Senyawa Antioksidan Lain.....	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Bagan Mekanisme Kerja Pembuatan Tempe Kedelai Kuning Madura.....	75
Lampiran 2.	Bagan Mekanisme Kerja Pembuatan Tempe Koro Pedang Utuh dan Rajang.....	76
Lampiran 3.	Bagan Mekanisme Ekstraksi Isoflavon dengan Metode Maserasi.....	77
Lampiran 4.	Bagan Mekanisme Identifikasi Isoflavon dengan Metode HPLC	78
Lampiran 5.	Bagan Mekanisme Pembuatan Larutan DPPH.....	79
Lampiran 6.	Bagan Mekanisme Pembuatan Larutan Sampel dan Uji Aktivitas Antioksidannya.....	80
Lampiran 7.	Tabel Karakteristik Kedelai Madura dan Produk Tempunya	81
Lampiran 8.	Tabel Karakteristik Biji Koro Pedang dan Produk Tempe Koro Pedang Utuh.....	82
Lampiran 9.	Tabel Karakteristik Biji Koro Pedang dan Produk Tempe Koro Pedang Rajang.....	83
Lampiran 10.	Tabel Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kedelai Kuning	84
Lampiran 11.	Tabel Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Koro Pedang Utuh.....	85
Lampiran 12.	Tabel Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Koro Pedang Rajang.....	86

Lampiran 13. Analisa Data Statistik Menggunakan *General Linear Model – Univariate*.....87

Lampiran 14. Analisa Data Statistik Menggunakan *Compare Means – One Way Annova*.....89



DAFTAR SINGKATAN

AAPH	: Azobis Amidino Propane di-Hydrochloride
ABTS	: Azinobis ethyl-Benzo Thiazoline Sulfonic acid
BHA	: Butylated Hydroxy Anisole
BHT	: Butylated Hydroxy Toluene
DPPH	: Difenil Pikril Hidrazil hidrat
EDTA	: Etylene Diamine Tetra Acetic acid
HDL	: High Density Lipoprotein
LDL	: Low Density Lipoprotein
ORAC	: Oxygen Radical Absorbance Capacity
PG	: Propyl Gallat
TBARS	: Thio Barbituric Acid Reactive Substances
TBHQ	: Tert-Butil Hidoksi Quinon
VLDL	: Very Low Density Llipoprotein

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis tanaman. Namun tidak seperti metabolit sekunder lainnya, senyawa ini tidak disintesis oleh mikroorganisme. Oleh karena itu, tanaman merupakan sumber senyawa isoflavon di alam (Anderson, 1997 dalam Pawiroharsono, 2001). Isoflavon yang terdapat dalam biji kedelai dorman adalah dalam bentuk isoflavon glikosida yaitu daidzin, genistin dan glisitin. Isoflavon glikosida tersebut mempunyai aktivitas fisiologis yang rendah. Pawiroharsono (1993) dalam Restuhadi (2001), menyatakan bahwa 99% isoflavon glikosida yang terdapat pada biji kedelai, selama proses perendaman (dalam pembuatan tempe) dapat terhidrolisis menjadi aglukan isoflavon dan glukosa. Aglukan isoflavon yang mempunyai aktivitas fisiologis tinggi tersebut adalah genistein (*5,7,4'-trihidroksi isoflavon*), daidzein (*7,4'-trihidroksi isoflavon*), dan glisitein (*6-metoksi-7,4'-trihidroksi isoflavon*), selanjutnya pada proses fermentasi kedelai rendam dengan kapang *Rhizopus oligosporus*, daidzein dapat mengalami proses hidroksilasi sehingga menjadi senyawa faktor-2 (*6,7,4'-trihidroksi isoflavon*) (Gyorgy *et al.*,1964). Faktor-2 mempunyai aktivitas antioksidan dan antihemolisis yang lebih baik dari daidzein dan genistein. Dengan demikian di dalam tempe kedelai dapat kita jumpai 4 jenis isoflavon yaitu daidzein, genestein, glisitein dan faktor-2.

Salah satu aktivitas fisiologis yang menonjol dari isoflavon daidzein, genestein, glisitein dan faktor-2 adalah aktivitas antioksidan. Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid. Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan pada isoflavon sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dini, mencegah penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, jantung koroner, *diabetes militus*, dan kanker.

Pada umumnya selama ini antioksidan yang digunakan sebagai pengawet pada bahan makanan adalah antioksidan sintetik seperti *Butylated Hydroxyanisole* (BHA), *Butylated Hydroxytoluene* (BHT), *Propyl Gallat* (PG) dan *Etylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA). Pemanfaatan zat antioksidan sintetik dapat menimbulkan gangguan kesehatan bagi konsumen antara lain gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan (Suryo dan Tohari, 1995). Untuk itu perlu dicari alternatif lain untuk mengatasi permasalahan tersebut. Salah satu cara adalah dengan mengganti pemanfaatan antioksidan sintetik dengan antioksidan alami. Mengingat adanya kandungan isoflavon dalam kedelai yang dapat berfungsi sebagai antioksidan, maka tempe kedelai dapat direferensikan sebagai bahan baku sumber antioksidan alami. Disamping sebagai antioksidan, isoflavon daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2 juga mempunyai khasiat lain diantaranya sebagai estrogenik, anti inflamasi, anti tumor atau anti kanker, anti hemolisis, anti penyempitan pembuluh darah, anti kolesterol, menurunkan kadar trigliserida VLDL (*very low density lipoprotein*) dan LDL (*low density lipoprotein*) serta meningkatkan HDL (*high density lipoprotein*) (Pawiroharsono, 2001).

Dengan demikian isoflavon dari tempe kedelai selain berkhasiat sebagai antioksidan juga mempunyai khasiat ganda seperti yang tertera diatas.

Tempe kedelai merupakan salah satu makanan tradisional asli Indonesia yang sangat digemari oleh penduduk Indonesia dan sering dijumpai sebagai makanan dalam menu sehari-hari, baik sebagai lauk pauk maupun sebagai makanan sambilan (Ariani, 1997). Masyarakat Indonesia yang secara tradisi telah lama mengkonsumsi tempe, banyak diuntungkan dari berbagai faktor karena produk tersebut mengandung nilai gizi tinggi, khususnya sebagai sumber protein dan mengandung senyawa aktif isoflavon (Pawiroharsono, 2001).

Pada saat ini tengah terjadi dilema dalam memproduksi bahan pangan berbahan baku kedelai (termasuk tempe), karena harganya yang melambung yaitu, dari Rp 2.500,00 menjadi Rp 8.000,00 / kg. Penurunan harga kedelai sudah tidak memungkinkan lagi karena saat ini kedelai diperebutkan sebagai bahan pangan (*food*), pakan (*feed*) dan bahan bakar (*fuel*) (Suharyanto, 2008). Untuk itu perlu dicari alternatif lain, yaitu dengan menggali potensi bahan pangan lokal yang murah dan melimpah di Indonesia sebagai alternatif pengganti kedelai sebagai sumber antioksidan alami khususnya isoflavon.

Handajani *et al.* (1996) menyatakan bahwa Indonesia mempunyai banyak jenis *legume* yang beberapa diantaranya belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu jenis *legume* yang cocok dibudidayakan di Indonesia dan dapat berfungsi sebagai bahan pangan tetapi produk olahannya masih jarang dikonsumsi yaitu koro pedang (*Canavalia ensiformis*). Dalam rangka pengembangan senyawa antioksidan alami khususnya isoflavon maka perlu dilakukan penelitian tentang optimasi produksi senyawa antioksidan dari koro pedang dan produk tempunya serta karakterisasi kandungan isoflavonnya.

Dipilihnya koro pedang sebagai alternatif obyek penelitian sumber isoflavon karena koro pedang merupakan salah satu spesies dari familia *leguminosae* sehingga dimungkinkan juga mengandung isoflavon seperti yang dijumpai pada kedelai.

Selama ini tempe kedelai yang dikonsumsi oleh masyarakat adalah tempe hasil fermentasi kedelai selama 36 – 48 jam. Lama waktu fermentasi tersebut merupakan lama waktu fermentasi kedelai untuk menghasilkan tempe yang paling optimum dari sisi cita rasa untuk dikonsumsi, tetapi lama waktu fermentasi yang optimum untuk menghasilkan ekstrak antioksidan khususnya isoflavon yang optimum belum diketahui. Koro pedang mempunyai ukuran biji yang relatif lebih besar (8 kali) dari ukuran biji kedelai, untuk itu perlu diteliti pula ukuran biji yang optimum disamping lama waktu fermentasi untuk menghasilkan ekstrak antioksidan khususnya isoflavon yang optimum. Sehingga dalam penelitian ini akan difokuskan pada optimasi produksi senyawa antioksidan khususnya isoflavon dengan variasi lama waktu fermentasi dan ukuran partikel baik pada biji kedelai dan produk tempunya maupun pada biji koro pedang dan produk tempunya.

Untuk memperoleh zat antioksidan alami, dapat dilakukan dengan cara ekstraksi tanaman menggunakan pelarut organik seperti, heksana, benzena, etil eter, kloroform, etanol atau metanol. Metanol 90 % merupakan pelarut optimum untuk mengekstrak isoflavon dari kedelai, namun penggunaannya untuk skala komersial masih perlu dikaji lebih lanjut karena bersifat toksik. Penelitian dengan menggunakan pelarut etanol untuk ekstraksi diharapkan dapat mengganti metanol untuk menghasilkan ekstrak antioksidan alami secara komersial, karena kepolaran etanol mendekati metanol dan relatif tidak beracun. (Susanto *et al.*,

1998 dalam Ariani dan Hastuti, 2009). Untuk selanjutnya pada penelitian ini juga akan difokuskan pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol.

B. Perumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas permasalahan dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Isoflavon jenis apa sajakah yang terkandung dalam biji koro pedang dan produk tempunya bentuk utuh maupun rajang?
2. Berapa lama waktu fermentasi optimum untuk menghasilkan aktivitas antioksidan yang optimum pada perlakuan fermentasi dengan biji bentuk utuh dan rajang ?
3. Bagaimana aktivitas antioksidan koro pedang bila dibandingkan dengan antioksidan alami (*α-tokoferol*, *β-karoten*, dan vitamin C) maupun antioksidan sintetis (BHT) ?

C. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah :

1. Mengetahui isoflavon jenis apa saja yang terkandung dalam biji koro pedang dan produk tempunya bentuk utuh maupun rajang.
2. Mengetahui lama waktu fermentasi optimum untuk menghasilkan aktivitas antioksidan yang optimum pada perlakuan fermentasi dengan biji bentuk utuh dan rajang.
3. Mengetahui aktivitas antioksidan koro pedang dibandingkan dengan antioksidan alami (*α-tokoferol*, *β-karoten*, dan vitamin C) maupun antioksidan sintetis (BHT).

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah dengan diketahui senyawa berkhasiat pada koro pedang dan produk tempenya sebagai sumber antioksidan alami khususnya isoflavon diharapkan dapat menjadi solusi alternatif pengganti kedelai dan pengembangan produk tempe dari biji kacang-kacangan atau *leguminoceae*.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Legume

Legume adalah tanaman dikotil setahun dan tahunan, sebagian besar legume sayuran dan legume bijian yang dibudidayakan adalah tanaman setahun. Legum bijian, sering dikenal sebagai tanaman kacang bijian, adalah tanaman sereal/bijian terpenting kedua sebagai sumber pangan utama dunia (Rubatski dan Yamaguchi, 1997).

B. Koro Pedang atau Jack Beans (*Canavalia ensiformis*)

1. Daerah Asal dan Penyebarannya

Canavalia ensiformis berasal dari Amerika Selatan dan dapat ditemui di beberapa daerah di India, Srilangka, Myanmar dan di Negara Asia Timur lainnya. Di Indonesia banyak ditemukan didaerah Jawa Tengah dan Jawa Barat. Di Jawa Tengah terkenal dengan nama : koro bedog, koro bendo, koro loke, koro gogok, koro wedhung dan koro kaji. Sedang di Jawa Barat dikenal dengan nama koro bakol (Handajani dan Atmaka, 1993).

2. Morfologi Koro Pedang

Bentuk tanaman koro pedang menyerupai perdu batangnya bercabang pendek dan lebat dengan jarak percabangan pendek dan perakaran termasuk akar tanggung. Bentuk daun trifoliat dengan panjang tangkai daun 7-10 cm, lebar daun sekitar 10 cm, tinggi tanaman dapat mencapai 1 meter. Bunga berwarna kuning, tumbuh pada ketiak/buku cabang. Bunga termasuk bunga majemuk dan berbunga mulai umur 2 bulan hingga umur 3 bulan. Polong dalam

satu tangkai berkisar 1 - 3 polong, tetapi umumnya 1 polong/tangkai. Panjang polong 30 cm dan lebar 3,5 cm, polong muda berwarna hijau dan polong tua berwarna kuning jerami. Biji berwarna putih dan tanaman koro dapat dipanen pada 9-12 bulan, namun terdapat varietas berumur genjah umur 4-6 bulan (Rubatzky dan Yamaguchi, 1997).



Gambar 2.1. Tanaman Koro Pedang (http://en.wikipedia.org/wiki/Canavalia_ensiformis)

Taksonomi dari tanaman koro pedang adalah sebagai berikut (Heyne, 1987) :

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Fabales

Family : Fabaceae

Genus : *Canavalia*

Species : ***Canavalia ensiformis***



Gambar 2.2. Biji Koro Pedang (http://en.wikipedia.org/wiki/Canavalia_ensiformis)

3. Kandungan Kimia Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*)

Koro merupakan salah satu jenis kacang-kacangan lokal yang memiliki beragam varietas dan biasa digunakan sebagai bahan baku pengganti kedelai dalam pembuatan tempe. Kandungan gizi koro pedang dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kandungan Gizi Biji Koro Pedang

Zat Gizi	Kandungan (%) Koro Pedang
Kadar air	11 – 15.5
Protein	23 – 27.6
Lemak	2.3 – 3.9
Karbohidrat	45.2 – 56.9
Serat kasar	4.9 – 8.0
Mineral	2.27 – 4.2

Sumber : Kay (1979) dan Salunkhe & Kadam (1989) dalam Pramita 2008

Koro pedang juga memiliki kandungan mineral yang tinggi. Delatorre (2008), melaporkan selain mengandung α -aminobutyric acid (Abu), kacang koro pedang juga mengandung lectin, yaitu karbohidrat sederhana yang berikatan dengan protein. Akan tetapi koro juga mengandung beberapa senyawa merugikan yaitu glukosianida yang bersifat toksik dan asam fitat yang merupakan senyawa antigi. Dalam Kanetro dan Hastuti (2006), senyawa antinutrisi yang sering terdapat pada kacang-kacangan antara lain enzim lipoksinase, tripsin inhibitor, asam fitat, oligosakarida, senyawa glikosida dan sianida. Namun sebaliknya ternyata selain bersifat sebagai senyawa antinutrisi, fitat memiliki peranan dalam kesehatan yang dianggap positif yaitu sebagai antioksidan yang dapat menangkal adanya radikal bebas maupun senyawa non radikal yang dapat menimbulkan oksidasi pada biomolekul seperti protein, karbohidrat, lipida, dan lain-lain.

Ekanayake (2006), menuliskan kacang koro pedang memiliki kandungan canavanine yang sangat tinggi (88 – 91 %). Menurut Campbell (2004),

Canavanine merupakan suatu senyawa asam amino yang mirip Arginin. Apabila dikonsumsi senyawa ini akan bergabung ke dalam protein yang biasa ditempati oleh arginin. Canavanine sangat berbeda dengan arginin, sehingga dapat mengganggu fungsi protein tersebut. Namun kandungan Canavanine ini dapat dihilangkan dengan cara direndam, dan dihancurkan / digiling (Ekanayake, 2006).

C. Tempe

Tempe tergolong sebagai makanan hasil fermentasi oleh jamur *Rhizopus s.p.* Tempe adalah produk fermentasi yang amat dikenal oleh masyarakat Indonesia. Tempe dapat dibuat dari berbagai bahan. Tetapi yang biasanya dikenal sebagai tempe oleh masyarakat pada umumnya ialah tempe yang dibuat dari kedelai (Astuti, 1995).

Tempe merupakan makanan bergizi tinggi sehingga makanan ini mempunyai arti strategis dan sangat penting untuk pemenuhan gizi. Lebih dari itu, tempe mempunyai keunggulan-keunggulan lain, yaitu mempunyai kandungan senyawa aktif, teknologi pembuatannya sederhana, harganya murah, mempunyai citarasa yang enak; dan mudah dimasak.

Tempe mempunyai ciri-ciri berwarna putih, tekstur kompak dan flavour spesifik. Warna putih disebabkan adanya miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji-bijian. Tekstur yang kompak juga disebabkan oleh miselia-miselium jamur yang menghubungkan antara biji-biji. Sedangkan flavour yang spesifik disebabkan oleh terjadinya degradasi komponen-komponen dalam kedelai selama fermentasi (Kasmidjo, 1990).

1. Tempe Kedelai

Tempe merupakan makanan tradisional Indonesia yang dihasilkan melalui proses fermentasi biji kedelai, oleh berbagai mikroorganisme khususnya oleh kapang *Rhizopus oligosporus*. Adanya aktivitas mikroorganisme sekaligus juga menyebabkan proses biotransformasi dan biosintesa senyawa aktif diantaranya adalah senyawa antioksidan. Senyawa aktif dalam tempe dihasilkan melalui proses biotransformasi dan biosintesa oleh mikroba, khususnya pada proses perendaman dan pemeraman (Susanto *et al.*, 1998).

Menurut Pawiroharsono (1995) produk tempe yang umum dikonsumsi oleh masyarakat adalah tempe generasi pertama berupa tempe segar. Hasil olahan tempe generasi pertama (tempe generasi kedua) juga banyak dikonsumsi dalam bentuk produk yang sifat fisik dan organoleptiknya masih sama dengan tempe yaitu berupa tempe keripik, tepung tempe, bubur tempe dan sebagainya. Pawiroharsono (2001) mendefinisikan bahwa industri tempe generasi ketiga adalah industri yang memanfaatkan produk akhir tempe segar sebagai sumber senyawa aktif yaitu antioksidan, antikolesterol dan antikanker.

Tempe berpotensi untuk digunakan melawan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dan mencegah terjadinya penyakit degeneratif (aterosklerosis, jantung koroner, diabetes melitus, kanker, dan lain-lain). Selain itu tempe juga mengandung zat antibakteri penyebab diare, penurunan kolesterol darah, pencegah penyakit jantung, hipertensi, dan lain-lain.

Komposisi gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah dibandingkan dengan kedelai. Namun, karena adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe, maka protein, lemak, dan karbohidrat pada tempe menjadi lebih mudah dicerna di dalam tubuh

dibandingkan yang terdapat dalam kedelai. Oleh karena itu, tempe sangat baik untuk diberikan kepada segala kelompok umur (dari bayi hingga lansia), sehingga bisa disebut sebagai makanan semua umur. Dibandingkan dengan kedelai, terjadi beberapa hal yang menguntungkan pada tempe.

2. Tempe Non Kedelai

Selain tempe berbahan dasar kacang kedelai, terdapat pula berbagai jenis makanan berbahan bukan kedelai yang juga disebut tempe. Terdapat 2 golongan besar tempe menurut bahan dasarnya, yaitu tempe berbahan dasar *Legume* dan tempe berbahan dasar *non-legume* (Astawan, 2003).

Tempe bukan kedelai yang berbahan dasar *legume* adalah salah satunya koro. Koro merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang dapat tumbuh di tanah yang kurang subur dan kering. Selain untuk dimanfaatkan bijinya, tujuan penanaman koro adalah sebagai tanaman pelindung dan pupuk hijau (Kanetro dan Hastuti, 2006). Tempe koro mencakup tempe koro benguk (*Mucuna pruriens, L.*) berasal dari sekitar Waduk Kedungombo (Handajani *et al.*, 1996), tempe gude (*Cajanus cajan*), tempe gembus dari ampas tahu/ampas gude (populer di daerah Lombok dan Bali), tempe kacang hijau (terkenal di daerah Yogyakarta), tempe kacang kecipir (*Psopocarpus tetragonolobus*), tempe koro pedang (*Canavalia ensiformis*), tempe lupin (*Lupinus Angustifolius*), tempe kacang merah (*Phaseolus vulgaris*), tempe kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), tempe koro wedhus (*Lablab purpureus*), tempe koro kratok (*Phaseolus lunatus*) banyak ditemukan di Amerika utara, dan tempe menjes (dari kacang tanah dan kelapa terkenal di sekitar Malang (Astawan, 2003).

Pengolahan koro pada umumnya diawali dengan perendaman untuk menghilangkan sianida karena kadar sianida pada koro relatif tinggi.

Perendaman terbaik bila dilakukan pada air yang mengalir, bila hal tersebut tidak dapat dilakukan (air tetap), maka air perlu sering diganti agar terhindar dari aroma kurang sedap. Setelah perendaman biasanya diikuti dengan pemasakan. Karena kandungan karbohidrat yang tinggi menyebabkan koro memiliki tekstur yang keras sehingga pemasakan dilakukan agar teksturnya menjadi lunak.

3. Fermentasi Tempe

Fermentasi adalah proses kimiawi yang kompleks sebagai akibat pertumbuhan maupun metabolisme mikroba yang merubah bahan-bahan mentah yang murah bahkan tidak berharga menjadi produk-produk yang bernilai ekonomi tinggi. Proses kimiawi yang terjadi disebabkan oleh enzim dan enzim yang berperan dihasilkan oleh mikroorganisme atau telah ada dalam bahan pangan. Fermentasi bahan makanan menyebabkan perubahan fisik dan kimia yang menguntungkan seperti flavour, aroma, tekstur, daya cerna, dan daya simpan (Astuti, 1995).

Fermentasi merupakan suatu proses oksidasi karbohidrat anaerob atau anaerob sebagian (Samson *et al.*, 1987) dan merupakan hasil kegiatan beberapa jenis organisme diantara beribu-ribu jenis bakteri, khamir dan kapang yang telah dikenal. Jadi mikroba yang digunakan dalam proses fermentasi merupakan unsur penentu terhadap berhasil atau tidaknya proses fermentasi bersangkutan.

Hasil fermentasi merupakan bagian penting dalam menu makanan dunia. Fermentasi mengakibatkan hilangnya karbohidrat dari bahan pangan, tetapi kerugian ini dapat tertutup oleh keuntungan yang diperoleh. Protein, lemak, dan polisakarida dapat dihidrolisis sehingga bahan pangan hasil fermentasi lebih mudah dicerna. Fermentasi menyebabkan perubahan flavour yang dipertimbangkan lebih disukai daripada bahan bakunya (Sutardi dan Buckle,

,1985).

Sifat-sifat bahan pangan hasil fermentasi ditentukan oleh mutu dan sifat-sifat asal bahan pangan, perubahan yang terjadi sebagai hasil fermentasi mikroorganisme dan interaksi yang terjadi diantara kegiatan-kegiatan tersebut dan zat-zat yang merupakan pembentuk bahan pangan tersebut (Sutardi dan Buckle, 1985).

Proses pengolahan tempe pada umumnya meliputi tahap pencucian, perendaman bahan mentah, perebusan, pengulitan, pengukusan, penirisan dan pendinginan, inokulasi, pemanasan, kemudian fermentasi 2-3 hari. Perendaman mengakibatkan ukuran biji menjadi lebih besar dan stuktur kulit mengalami perubahan sehingga lebih mudah dikupas. Perebusan dan pengukusan selain menaikkan biji dimaksud untuk membunuh bakteri kontaminan dan mengurangi zat antigizi. Penirisan dan pendinginan bertujuan mengurangi kadar air dalam biji dan menurunkan suhu biji sampai sesuai dengan kondisi pertumbuhan jamur (Samson *et al.*, 1987).

Fujimaki (1968) melaporkan selama fermentasi terjadi perubahan enzimatik yaitu bau dan rasa karena adanya aktivitas enzim protease. Selama fermentasi miselia jamur yang berwarna putih akan menyelubungi permukaan tempe. Jamur akan mengeluarkan enzim-enzim yang dapat memecah komponen dalam bahan yaitu lemak, protein dan karbohidrat menjadi bahan yang lebih sederhana (Fujimaki, 1968).

Aktivitas mikroorganisme di dalam proses pembuatan tempe secara tradisional terutama terdapat 2 tahapan proses yaitu pada :

1) Proses Fermentasi Awal (Fermentasi I)

Proses perendaman dilakukan terhadap kedelai yang telah direbus dan atau dikuliti selama 24 jam, pada temperatur kamar (25-30⁰C), dengan menggunakan air tanah atau air kran. Pada proses ini terjadi proses fermentasi awal oleh bakteri pembentuk asam-asam organik. Tujuan utama proses ini adalah untuk pengasaman kedelai. Untuk maksud pengasaman ini, maka pada proses perendaman dilakukan inokulasi bakteri pembentuk asam yaitu dengan menambahkan air ke dalam rendaman dari proses perendaman sebelumnya, sehingga tahapan ini disebut merupakan proses fermentasi I. Dengan kondisi demikian (24 jam perendaman) terjadi proses pembentukan asam-asam organik oleh bakteri pembentuk asam. Pada koro proses perendamannya 3 x 24 jam untuk menghilangkan senyawa glikosida (HCN) (Pawiroharsono, 1996).

2) Proses Fermentasi Utama (Fermentasi II)

Mikroorganisme yang berperan utama didalam pembuatan tempe adalah kapang *Rhizopus oligosporus*. Aktivitas fisiologis kapang pada proses fermentasi tempe dimulai sejak diinokulasinya inokulum (ragi tempe) pada kedelai yang telah siap difermentasikan yaitu kedelai dan berbagai jenis koro masak yang telah dikuliti dan ditiriskan. Spora kapang tersebut mulai tumbuh berkecambah dengan membentuk benang-benang hifa yang makin tumbuh memanjang membalut dan menembus biji kotiledon kedelai. Apabila benang-benang tersebut telah sedemikian padat, maka terbentuklah tempe yang kompak, putih, dan dengan aroma khas tempe. Secara keseluruhan tahapan ini disebut sebagai proses fermentasi II (Pawiroharsono, 1996).

4. *Rhizopus sp.*

Kapang yang tergolong dalam genus *Rhizopus* ditandai dalam sel vegetatif yang berupa benang yang disebut hifa/misellium yang membentuk stolon-stolon (semacam ruas/buku) yang dilengkapi dengan rhizoid (mirip akar) yang tumbuh bercabang-cabang masuk ke dalam substrat. Pada tempat tumbuhnya rhizoid terdapat sporangiofora yang tumbuh mengarah ke udara (berlawanan arah dengan rhizoid) dan dari tempat inilah terbentuk spora didalam suatu sporangium. Kapang jenis *Rhizopus* mempunyai sifat tumbuh cepat dan membentuk koloni yang terdiri dari benang-benang misellia (Pawiroharsono, 1996).

Tabel 2.2 Perbedaan sifat-sifat pokok *Rhizopus sp.* pada tempe

	<i>R. oligosporus</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. stolonifer</i>
Sporangiofora	< 1 mm	< 1 mm (0,15-2 mm)	> 1 mm (1,5-3 mm)
Spora	non-striated	non-striated	striated
Khlamidospora	Banyak, membentuk rantai	Ada, jarang ditemui	Tidak ada kecuali pada kultur submerge
Temperatur pertumbuhan	Optimal 32-35 ⁰ C minimal 12 ⁰ C Maksimal 42 ⁰ C	Optimal 35 ⁰ C minimal 5-7 ⁰ C maksimal 44 ⁰ C	Optimal 25-26 ⁰ C minimal 10 ⁰ C maksimal 35-37 ⁰ C
Thalus dan zygospora	Homothalik dan tidak terdapat zygospora	Homothalik, tidak ada zygospora	Heterothalik, tidak terbentuk zygospora

Sumber : Pawiroharsono, 1996

Berdasarkan Tabel 2.2 dapat disimpulkan bahwa perbedaan pokok sifat-sifat dari ketiga jenis species kapang *Rhizopus sp.* terutama terdapat pada sporangiofora, spora (termasuk khlamidospora dan zygospora) dan kisaran temperatur untuk pertumbuhannya.

Mikroorganisme yang berperan utama didalam pembuatan tempe adalah kapang *Rhizopus oligosporus*. Berdasarkan klasifikasinya dapat digolongkan sebagai berikut (Hesseltine, 1985) :

Kingdom : Fungi

Division : Zygomycota

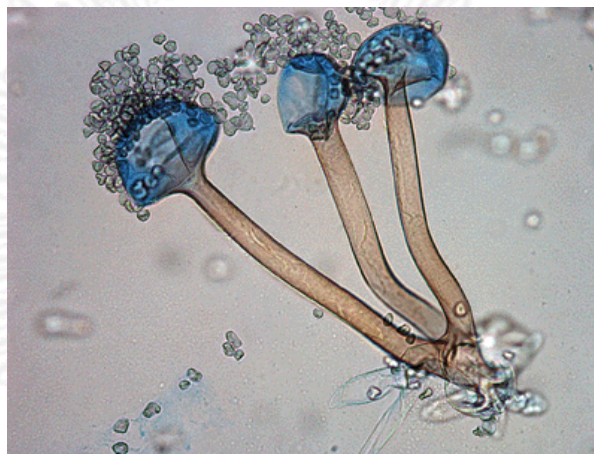
Class : Zygomycetes

Order : Mucorales

Family : Mucoraceae

Genus : *Rhizopus*

Species : ***Rhizopus oligosporus***



Gambar 2.3. *Rhizopus oligosporus* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au>)

Hesseltin (1966 dalam Pawiroharsono, 1995) menambahkan bahwa aktivitas fisiologis kapang pada proses fermentasi tempe dimulai sejak diinokulasikannya inokulum (ragi tempe) pada kedelai yang telah siap difermentasikan yaitu kedelai masak yang telah dikuliti dan ditiriskan. Spora kapang tersebut mulai tumbuh berkecambah dengan membentuk benang-benang hifa yang makin tumbuh memanjang membalut dan menembus biji kotiledone kedelai.

Dilaporkan bahwa *Rhizopus oligosporus* adalah species yang paling banyak dijumpai sebagai jamur tempe dan di masyarakat Jawa Barat paling

terkenal untuk produksi tempe secara komersil maupun untuk keperluan penelitian (Kasmidjo,1990). Jenis kapang ini telah terbukti dapat memfermentasikan kedelai dan membentuk tempe secara sempurna. Waktu yang dibutuhkan sampai terbentuk tempe secara sempurna 24-36 jam (Pawiroharsono, 1996).

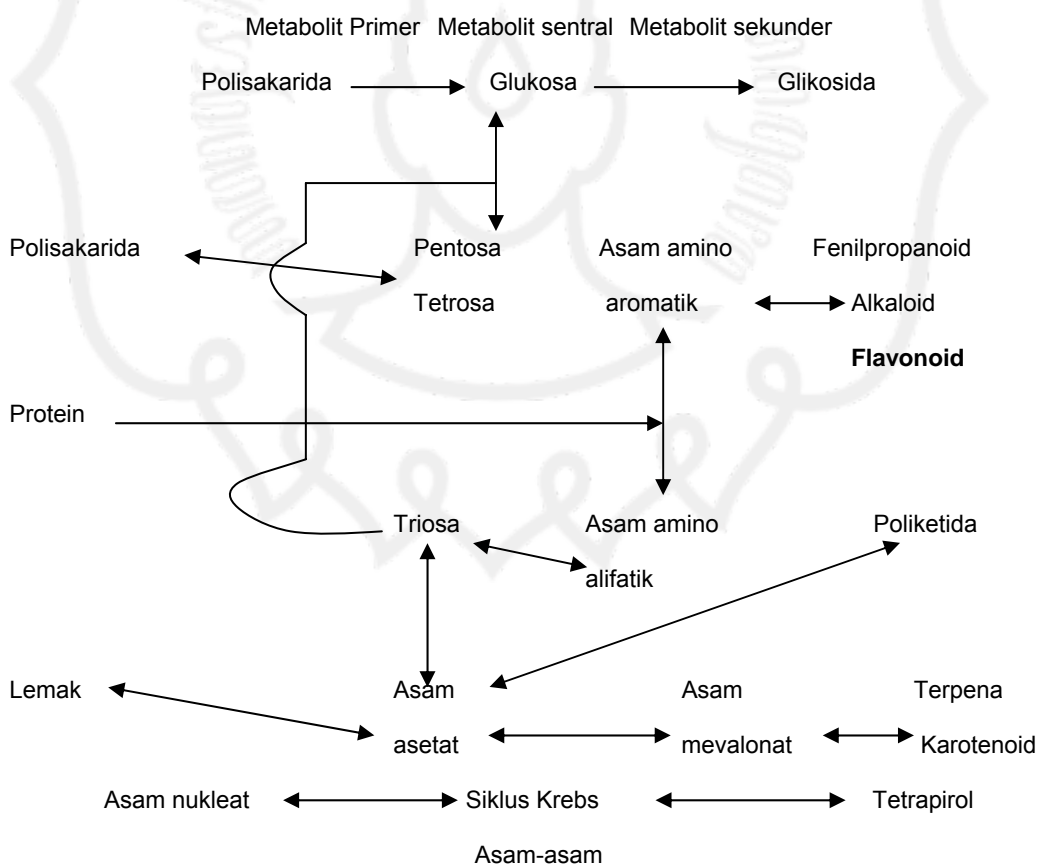
Selama proses fermentasi berlangsung, kedelai berubah menjadi tempe dan perubahan tersebut pada dasarnya dapat dibedakan sebagai perubahan secara fisik dan secara kimia. Perubahan sifat fisik tempe dibandingkan dengan kedelai antara lain : bertekstur kompak, warna putih dengan aroma khas tempe. Perubahan secara kimia ditandai dengan terjadinya hidrolisis senyawa-senyawa kompleks (protein, karbohidrat, lemak, ikatan glikosida) menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mudah dicerna. Selain itu, masih terdapat berbagai senyawa baru yang disintesis selama fermentasi yang bermanfaat untuk kesehatan seperti asam lemak tidak jenuh dan isoflavon faktor II.

D. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa-senyawa yang terdapat pada spesies tertentu dan sangat khas untuk setiap spesies. Metabolit sekunder berperan untuk kelangsungan hidup suatu spesies dalam perjuangan untuk menghadapi spesies-spesies lain. Penyebarannya lebih terbatas, terutama pada tumbuhan dan mikroorganisme serta memiliki spesifikasi untuk setiap spesiesnya (Manitto,1981). Senyawa metabolit sekunder terbentuk pada saat tidak ada pertumbuhan sel yang dikarenakan keterbatasan nutrien zat gizi dalam medium sehingga merangsang dihasilkannya enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Sebagian besar metabolit sekunder

dapat berubah dengan laju tertentu dan dapat mengalami metabolisme sempurna menjadi karbondioksida sehingga kadar metabolit sekunder dalam organ makhluk hidup belum diketahui apakah akan bertambah, tetap, berkurang ataukah acak seiring dengan perkembangan hidupnya (Manitto, 1981).

Polisakarida, protein, lemak dan asam nukleat merupakan penyusun utama dari makhluk hidup karena itu disebut metabolit primer. Adapun proses metabolisme primer merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan zat-zat ini yang dilakukan oleh organisme, untuk kelangsungan hidupnya. Metabolit primer dari semua organisme sama meskipun sangat berbeda genetiknya. Adapun hubungan antara metabolit primer dan metabolit sekunder yaitu :



Gambar 2.4. Hubungan antara metabolit primer dan metabolit sekunder (Ariani dan Hastuti, 2009)

Dari bagan di atas, dapat diketahui bahwa senyawa-senyawa yang termasuk golongan metabolit sekunder diantaranya adalah senyawa glikosida, fenilpropanoid, alkaloid, flavonoid, poliketida, terpena, karotenoid dan tetrapirrol.

E. Isoflavon

Flavonoid adalah senyawa fenol yang terdapat pada seluruh tumbuhan, di bagian daun, akar, kayu, kulit, bunga, buah dan biji. Flavonoid berupa senyawa yang terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang terdapat dalam suatu tumbuhan sebagai campuran. Flavonoid merupakan senyawa polar seperti etanol, butanol, methanol, aseton, air dan lain-lain. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air (Padmawinata, 1988).

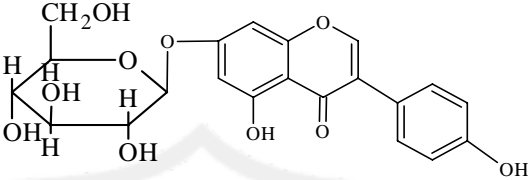
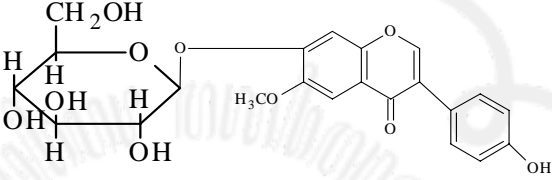
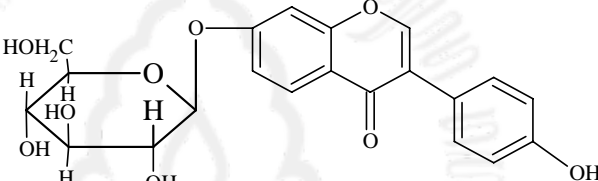
Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman. Namun, tidak seperti senyawa metabolit sekunder lain, senyawa ini tidak disintesis oleh mikroorganisme (Anderson, 1997 dalam Pawiroharono, 2001). Dengan demikian, mikroorganisme tidak mempunyai kandungan senyawa ini. Oleh karena itu, tanaman merupakan sumber utama senyawa isoflavon di alam. Dari beberapa jenis tanaman, kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada tanaman *Leguminoceae*, khususnya pada tanaman kedelai.

1. Isoflavon Pada Kedelai

Pada tanaman kedelai, kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada biji kedelai, khususnya pada bagian hipokotil (germ) yang akan tumbuh menjadi tanaman. Sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama dari tanaman. Senyawa isoflavon ini pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa gula melalui ikatan

glukosida. Jenis senyawa isoflavon ini terutama adalah genistin, daidzin, dan glisitin (Pradana, 2008).

Tabel 2.3. Struktur Daidzin, Genistin dan Glisitin

Nama Senyawa	Struktur
Genistin	
Glisitin	
Daidzin	

Sumber : Ariani dan Hastuti, 2009

Tabel 2.3 merupakan struktur daidzin, genistin dan glisitin. Naim (1973) melaporkan bahwa kedelai dorman mengandung glikosida isoflavon yang terdiri dari : 65% genistin, 23% daidzin dan 15% glisitin.

Isoflavon yang dominan pada kedelai terdapat dalam bentuk glikosida, sedangkan yang dominan pada produk kedelai yang mengalami fermentasi adalah aglikon (Coward *et al.*, 1993). Bentuk glikosida dipertahankan oleh tanaman sebagai bentuk in-aktif sehingga dibutuhkan sebagai antioksidan. Bentuk aktif glikosida adalah aglikon, yang dihasilkan dari pelepasan glukosa dan glikosida (Anderson *et al.*, 1998).

Isoflavon kedelai dapat menurunkan resiko penyakit jantung dengan membantu menurunkan kadar kolesterol darah, menghambat perkembangan sel-sel kanker dan angiogenesis, membantu menurunkan osteoporosis dan

dapat membantu pengobatan simtom menopause (Koswara, 2006).

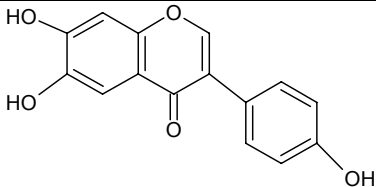

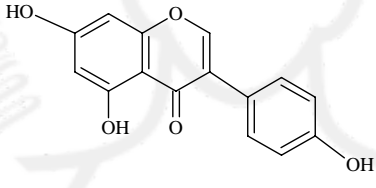
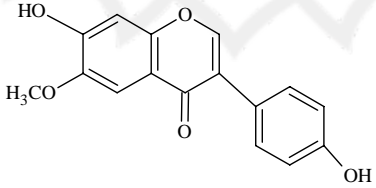
2. Isoflavon Pada Tempe Kedelai

Kedelai mengalami berbagai perubahan pada proses pembuatan tempe baik oleh proses fisik maupun proses enzimatik oleh adanya aktivitas mikroorganisme. Keterlibatan mikroorganismen pada proses pembuatan tempe terutama terjadi pada proses perendaman oleh bakteri-bakteri pembentuk asam dan proses fermentasi oleh kapang khususnya *Rhizopus oligosporus*.

Sebagai akibat perubahan-perubahan tersebut tempe menjadi lebih enak, lebih bergizi, dan lebih mudah dicerna. Salah satu faktor penting dalam perubahan tersebut adalah terbebasnya senyawa-senyawa isoflavon dalam bentuk bebas (aglikon), dan teristimewa hadirnya Faktor-II, yang terdapat pada tempe tetapi tidak terdapat pada kedelai, ternyata berpotensi tinggi (dibanding dengan jenis isoflavon yang lainnya) sebagai antioksidan (Gyorgy *et al.*, 1964), antihemolitik (Murata, 1985), penurun tekanan darah, anti kanker (Zilleken, 1986), dan sebagainya.

Selama proses pengolahan, baik melalui fermentasi maupun proses non-fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami biokonversi, terutama melalui proses hidrolisis sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglukan yang lebih tinggi aktivitasnya. Senyawa aglukan tersebut adalah genistein, daidzein dan glisitein (Pawiroharsono, 2001). Struktur dan sifat kimia daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2 ditampilkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Struktur dan sifat kimia daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2

No	Nama Senyawa	Struktur
1.	Faktor-2	 <p data-bbox="555 633 1174 663">Nama Kimia : Faktor-2 , 6,7,4'-trihidroksi isoflavon</p> <p data-bbox="555 680 868 710">Rumus Molekul: $C_{15}H_{10}O_5$</p> <p data-bbox="555 728 804 757">Berat Molekul: 270,2</p> <p data-bbox="555 775 938 804">Kelarutan : Tidak larut dalam air</p>
2.	Daidzein	 <p data-bbox="555 987 1126 1016">Nama Kimia : Daidzein, 7,4'-dihidroksi isoflavon</p> <p data-bbox="555 1034 868 1064">Rumus Molekul: $C_{15}H_{10}O_4$</p> <p data-bbox="555 1081 820 1111">Berat Molekul : 254,2</p> <p data-bbox="555 1128 954 1158">Kelarutan : Tidak larut dalam air</p>
3.	Genistein	 <p data-bbox="555 1364 1152 1393">Nama Kimia : Genistein, 5,7,4'-trihidroksi isoflavon</p> <p data-bbox="555 1411 868 1440">Rumus Molekul: $C_{15}H_{10}O_5$</p> <p data-bbox="555 1458 820 1487">Berat Molekul : 270,2</p> <p data-bbox="555 1505 1324 1534">Kelarutan : Larut dalam metanol dan etanol sukar larut dalam air</p>
4.	Glisitein	 <p data-bbox="555 1753 1251 1783">Nama Kimia : Glisitein, 6-metoksi-7,4'-trihidroksi isoflavon</p> <p data-bbox="555 1800 868 1830">Rumus Molekul: $C_{16}H_{12}O_5$</p> <p data-bbox="555 1848 820 1877">Berat Molekul : 284,3</p> <p data-bbox="555 1895 938 1924">Kelarutan : Tidak larut dalam air</p>

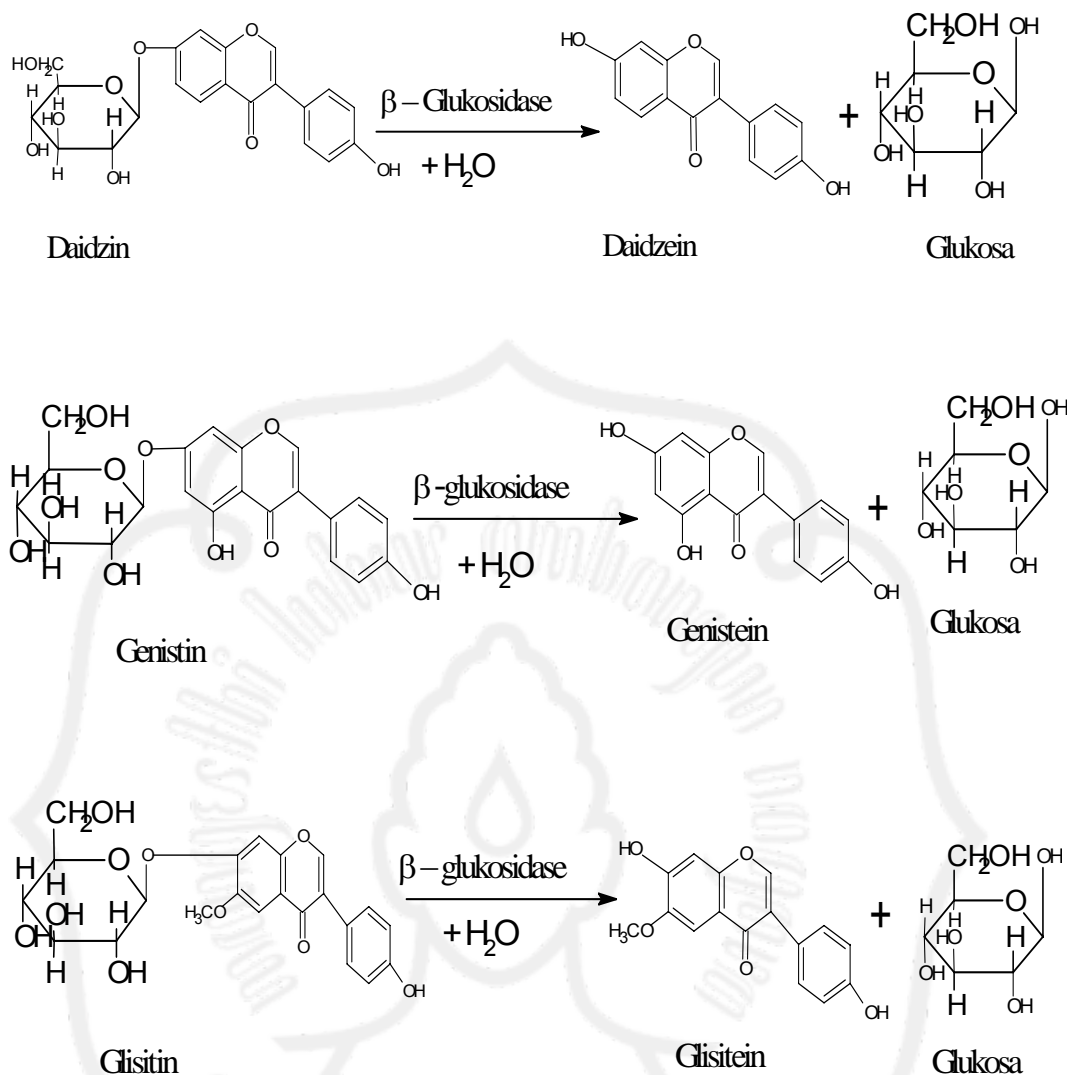
Sumber : Ariani dan Hastuti, 2009

Struktur dan sifat kimia jenis-jenis isoflavon yang ditemukan dalam tempe kedelai ditampilkan pada Tabel 2.3 diatas antara lain faktor-2 (*6,7,4'-trihidroksi isoflavon*), daidzein (*7,4'-trihidroksi isoflavon*), glisitein (*6-metoksi-7,4'-trihidroksi isoflavon*) dan genistein (*5,7,4'-trihidroksi isoflavon*). Genistein dan daidzein dijumpai pada kedelai bahan baku tempe tersebut, tetapi senyawa faktor-2 hanya dijumpai pada tempe kedelai hasil fermentasi (Gyorgy *et al*, 1964).

3. Metabolisme Isoflavon pada Proses Pengolahan Kedelai menjadi Tempe

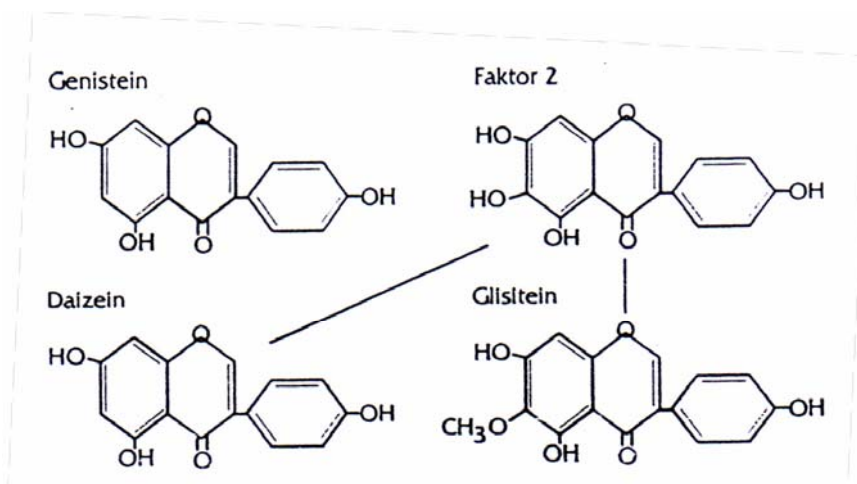
Senyawa isoflavon merupakan salah satu komponen yang juga mengalami metabolisme. Senyawa isoflavon ini pada kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan -O- glikosidik. Selama proses fermentasi, ikatan -O- glikosidik terhidrolisis, sehingga dibebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon yang bebas. Senyawa isoflavon aglikon ini dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa transforman baru. Hasil transformasi lebih lanjut dari senyawa aglikon ini justru menghasilkan senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas biologi lebih tinggi (Pawiroharsono, 2001).

Pratt dan Hudson (1985), melaporkan bahwa daidzin, genistin, dan glisitein yang terdapat pada biji kedelai dapat dihidrolisis oleh β -glukosidase selama proses perendaman menjadi aglikon isoflavon dan glukosanya yaitu genestein (*5,7,4'-trihidroksi isoflavon*) dan glukosa, daidzein (*7,4'-trihidroksi isoflavon*) dan glukosa, serta glisitein (*6-metoksi-7,4'-dihidroksi isoflavon*) dan glukosa. Reaksi hidrolisis glukosida isoflavon menjadi aglukan isoflavon ditampilkan pada gambar 2.5.



Gambar 2.5. Reaksi Hidrolisis Glukosida Isoflavon menjadi Aglukan Isoflavon (Ariani, 2003).

Senyawa aglukan isoflavon daidzein dan genistein dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa baru, yaitu faktor-2 (Pawiroharsono, 2001). Senyawa faktor-2 ini tidak dijumpai pada kedelai yang tidak difermentasi (Ariani, 2001). Reaksi biokonversi daidzein dan genistein menjadi faktor-2 ditampilkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Reaksi Biokonversi Aglukon Isoflavon menjadi Faktor-2 (Pawiroharsono, 1996)

Pada Gambar 2.6 diatas, terbentuknya faktor-2 dapat dimulai dengan dua cara yaitu hidroksilasi gugus C₆ dari senyawa daidzein atau demetilasi gugus C₆ dari senyawa glisitein (Ariani, 2003). Menurut penelitian Barz *et al.* (1993) biosintesis Faktor-II dihasilkan melalui demetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui reaksi hidroksilasi daidzein.

Faktor-II merupakan senyawa yang sangat menarik perhatian, karena senyawa ini tidak terdapat pada kedelai dan hanya terdapat pada tempe. Senyawa ini terbentuk selama proses fermentasi oleh aktivitas mikroorganisme. Setelah fermentasi, Faktor-II akan dibebaskan walaupun jumlahnya sangat kecil. Faktor-II dipandang sebagai senyawa yang sangat prospektif sebagai senyawa antioksidan (10 kali aktivitas dari vitamin A dan sekitar 3 kali dari senyawa isoflavon aglikon lainnya pada tempe) serta memiliki aktivitas antihemolitik (Jha, 1985).

4. Manfaat Senyawa Isoflavon Pada Tempe Kedelai

Isoflavon pada tempe dapat mencegah aktivitas sel menjadi sel kanker, tetapi juga dapat memperbaiki metabolisme hormon steroid, menurunkan kolesterol dan trigleserida, serta melindungi sel-sel hati dari paparan senyawa beracun. Selain itu Isoflavon juga dapat berfungsi untuk memperlancar sirkulasi darah. Isoflavon mempunyai beberapa efek positif dari isoflavon adalah antiadrenalin, yang membuat jantung bekerja lebih santai, di samping anti-peradangan serta mencegah ketidak teraturan denyut jantung.

Khususnya isoflavon pada tempe yang aktif sebagai antioksidan, yaitu Faktor-2, terbukti berpotensi sebagai anti-konstriksi pembuluh darah dan juga berpotensi menghambat pembentukan LDL (*low density lipoprotein*). Dengan demikian, isoflavon dapat mengurangi terjadinya arteriosclerosis pada pembuluh darah.

Zat yang terkandung dalam hasil olahan kedelai ini dapat berfungsi pula untuk mencegah terjadinya kerusakan permukaan dinding pembuluh darah jantung (koroner), tetapi sekaligus memperbaikinya. Termasuk pula mengikis endapan kolesterol pada dinding pembuluh darah koroner. Berikut adalah tabel potensi pemanfaatan senyawa isoflavon bagi kesehatan :

Tabel 2.5. Potensi Pemanfaatan Senyawa Isoflavonoida untuk Kesehatan

No.	Isoflavon	Bioaktivitas	Referensi
1	Daidzein, Genistein, Glisitein dan Faktor-II	Antioksidan Antikanker	Gyorgy dkk. (1964) Kramer, dkk. (1984)
2	Isoflavon (khususnya 6,7,4' tri-OH isoflavon)	Antioksidan, Antiinflamasi Hipokhiesterik, Antikontriksi, Antikanker (<i>radical scavenger</i>)	Zilliken (1987)
3	Faktor-II	Antihaemolitic Antiedematik	Murata (1985) Jha (1985)
4	6,7 di-OH -metoksi	Antiedematik isoflavon Antialergi	Jha (1985)
5	Daidzein, Genistein	Estrogenik	Oilis (1962) Snyder dan Kwon (1987)

Sumber : Pawiroharsono, 2001

Bioaktivitas masing-masing isoflavon dapat dilihat pada Tabel 2.5 diatas yang berpotensi untuk keperluan kesehatan, antara lain :

1) Antitumor / Antikanker

Senyawa flavonoid dan isoflavonoid banyak disebut-sebut berpotensi sebagai anti-tumor / anti-kanker. senyawa flavonoida tersebut terbukti menghambat aktivitas senyawa promotor terbentuknya tumor, sehingga senyawa-senyawa di atas disebut sebagai antitumor. Dari sejumlah senyawa flavonoida dan isoflavonoida tersebut, yang berpotensi sebagai antitumor/antikanker adalah genestein yang merupakan isoflavon aglikon (bebas). Potensi tersebut antara lain menghambat perkembangan sel kanker payudara dan sel kanker hati. Penghambatan sel kanker oleh senyawa flavon/isoflavon ini terjadi khususnya pada fase promosi. Senyawa isoflavon yang berpotensi sebagai anti tumor ini adalah daidzein dan glisitein yang telah diuji kemampuannya mencegah kanker dengan memperkirakan aktivitas sitotoksik dan pengaruhnya pada pembentukan kelompok faktor beta dari sitokin.

2) Antivirus

Sifat anti-virus senyawa isoflavon terutama ditunjukkan oleh senyawa aglikon. Sebaliknya, isoflavon dalam bentuk glukosida tidak mempunyai efek

anti-virus. Mekanisme penghambatan senyawa flavonoida pada virus diduga terjadi melalui penghambatan sintesa asam nukleat (DNA atau RNA) dan pada translasi virion atau pembelahan dari poliprotein. Percobaan secara klinis menunjukkan bahwa senyawa flavonoida tersebut berpotensi untuk penyembuhan pada penyakit demam yang disebabkan oleh rhinovirus, yaitu dengan cara pemberian intravena dan juga terhadap penyakit hepatitis-B.

3) Anti-kolesterol

Efek isoflavon terhadap penurunan kolesterol telah terbukti tidak saja pada binatang percobaan seperti tikus dan kelinci, tetapi juga pada manusia. Faktor-2 (*6,7,4' tri-hidroksi isoflavon*) merupakan senyawa isoflavon yang paling besar pengaruhnya. Mekanisme lain penurunan kolesterol oleh isoflavon diterangkan melalui pengaruh terhadap peningkatan katabolisme sel lemak untuk pembentukan energi, yang berakibat pada penurunan kandungan kolesterol.

4) Anti Alergi

Penghambatan pembebasan histamin dari sel-sel "mast", yaitu sel yang mengandung granula histamin, serotonin, dan heparin. Penghambatan pada enzim oxidative nukleosid-3', 5' siklik monofosfat fosfodiesterase, fosfatase alkalin, dan penyerapan Ca. Berinteraksi dengan pembentukan fosfoprotein. Senyawa-senyawa flavonoid yang digunakan sebagai anti-allergi antara lain adalah terbukronil, proksikromil, dan senyawa kromon.

5) Pengaruh pada Sistem Sirkulasi dan Mencegah Jantung Koroner

Isoflavon dan poli-metoksiflavone yang diekstrak dari tanaman *Leguminosa Milletha ritalata* dan *Baishinia champiomi* yang terikat pada protein, mempunyai sifat menghambat agregasi platelet (keping-keping sel darah), dilatan koroner, dan menghambat introphy otot jantung (*cardio trophyc*)

sehingga dapat memperlancar sistem sirkulasi darah. Efek antihemolisis (pecahnya sel-sel darah merah) dari ekstrak tempe naik berbanding lurus dengan waktu inkubasi. Hasil ekstraksi tersebut, setelah dikristalisasi dan diidentifikasi, ternyata mempunyai struktur 6, 7, 4'-trihidroksi isoflavon (Faktor-2) dengan daya antihemolisis setaraf dengan vitamin E dalam percobaannya pada darah yang tanpa atau telah diinduksi lebih dulu dengan asam dialurat.

6) Membantu Produksi Hormon Estrogen dan Mencegah Osteoporosis.

Senyawa isoflavon terbukti juga mempunyai efek hormonal, khususnya efek estrogenik. Efek estrogenik ini terkait dengan struktur isoflavon yang dapat ditransformasikan menjadi equol, dimana equol ini mempunyai struktur fenolik yang mirip dengan hormon estrogen. Mengingat hormon estrogen berpengaruh pula terhadap metabolisme tulang, terutama proses klasifikasi, maka adanya isoflavon yang bersifat estrogenik dapat berpengaruh terhadap berlangsungnya proses klasifikasi. Dengan kata lain, isoflavon dapat melindungi proses osteoporosis pada tulang sehingga tulang tetap padat dan masif.

F. Antioksidan

Antioksidan dapat berasal dari dalam tubuh dan luar tubuh. Didalam tubuh kita memiliki sistem enzim antioksidan yang bekerja secara simultan memetabolisme radikal bebas sehingga tidak meninggalkan kerusakan pada jaringan (Hodgson dan Levi, 2000). Sementara itu jenis antioksidan yang lainnya berasal dari luar tubuh, yaitu yang berasal dari makanan, atau komponen bahan makanan (fitokimia) seperti fenol (Yang, *et al.*, 2000 dalam Ariani dan Hastuti, 2009) karotenoid (Nara *et al.*, 2001), atau alkaloid (Schultz *et al.*, 1984).

1. Pengertian Tentang Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, mencegah proses oksidasi lipid, lipoprotein, protein dan DNA. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan (Winarsi, 2007).

Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) (Pratt, 1992 dalam Ardiansyah, 2007).

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting dalam kesehatan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan mengurangi resiko terhadap penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung koroner (Amrun *et al.*, 2007). Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein dan jaringan lemak. Radikal bebas terbentuk di dalam tubuh akibat produk sampingan proses metabolisme ataupun karena tubuh terpapar radikal bebas melalui pernapasan. Di dalam tubuh terdapat mekanisme antioksidan atau antiradikal bebas secara endogenik. Tetapi bila jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih maka dibutuhkan antioksidan yang berasal dari sumber alami atau sintetik dari luar tubuh. Senyawa antioksidan ini akan

menyerahkan satu atau lebih elektronnya kepada radikal bebas sehingga dapat menghentikan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Menurut Kochhar dan Rossell (1990) definisi antioksidan secara umum adalah suatu senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah proses oksidasi.

Reaksi oksidasi lemak yang terjadi pada makanan atau bahan makanan berlemak dapat dihambat dengan pemberian zat antioksidan. Pada umumnya zat antioksidan yang digunakan adalah zat antioksidan sintetik seperti *Butylated Hydroxyanisole* (BHA), *Butylated Hydroxytoluene* (BHT), *Propyl Gallat* (PG) dan *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA). Sementara itu penggunaan zat antioksidan sintetik tertentu misalnya BHT dapat menimbulkan akibat buruk terhadap kesehatan konsumen seperti gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan. Salah satu usaha untuk mengatasi masalah tersebut adalah mengganti zat antioksidan sintetik dengan zat antioksidan alami. Zat antioksidan alami dapat diperoleh dari ekstrak bagian-bagian tanaman tertentu terutama yang banyak mengandung senyawa-senyawa flavonoid yang tersusun dari gugus-gugus fenol (Suryo dan Tohari, 1995).

Penggunaan antioksidan tidak boleh berlebihan karena aktivitas antioksidan akan hilang pada konsentrasi yang tinggi dan mungkin akan menjadi prooksidan. Penggunaan antioksidan berlebihan akan menyebabkan senyawa lebih bersifat sebagai akselerator daripada inhibitor dalam oksidasi lemak. Dalam keadaan berlebih, antioksidan akan meningkatkan dekomposisi oksidasi lemak dan pembentukan produk radikal.

2. Antioksidan alami

Antioksidan alami yang diperoleh dari tanaman atau hewan yaitu tokoferol, vitamin C, betakaroten, flavonoid dan senyawa fenolik, di dalam makanan dapat berasal dari (a) senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, (b) senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, (c) senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992).

Menurut Pratt dan Hudson (1990) kebanyakan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami adalah berasal dari tumbuhan. Isolasi antioksidan alami telah dilakukan dari tumbuhan yang dapat dimakan, tetapi tidak selalu dari bagian yang dapat dimakan. Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman, seperti pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji, dan serbuk sari (Pratt, 1992).

Menurut Pratt dan Hudson (1990) serta Shahidi dan Naczki (1995), senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, dan kalkon. Sementara turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat, dan lain-lain. Senyawa antioksidan alami polifenolik ini adalah multifungsional dan dapat beraksi sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam, (d) peredam terbentuknya singlet oksigen.

Kira-kira 2 % dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya,

sehingga flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar (Markham, 1988). Sebenarnya flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau, sehingga pastilah ditemukan pula pada setiap telaah ekstrak tumbuhan. Golongan flavonoid dan senyawa yang berkaitan erat dengannya memiliki sifat-sifat antioksidan baik di dalam lipida cair maupun dalam makanan berlipida (Pratt dan Hudson, 1990).

Ada banyak bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, seperti rempah-rempah, dedaunan, teh, kakao, biji-bijian, sereal, buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan/alga laut. Bahan pangan ini mengandung jenis senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, seperti asam-asam amino, asam askorbat, tokoferol, karotenoid, tannin, peptida, melanoidin, produk-produk reduksi, dan asam-asam organik lain (Pratt, 1992).

3. Antioksidan sintetik

Antioksidan sintetik efektif dalam mencegah ketengikan pada minyak dan bahan pangan berlemak (Purwoko, 2001 dalam Meyri, 2003). Diantara beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan untuk makanan, ada lima antioksidan yang penggunaannya meluas dan menyebar diseluruh dunia, yaitu *Butil Hidroksi Anisol* (BHA), *Butil Hidroksi Toluena* (BHT), *propil galat*, *Tert-Butil Hidroksi Quinon* (TBHQ) dan *tokoferol*. Antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Buck, 1991).

BHA memiliki kemampuan antioksidan (*carry through*, kemampuan antioksidan baik dilihat dari ketahanannya terhadap tahap-tahap pengelolaan maupun stabilitasnya pada produk akhir) yang baik pada lemak hewan dalam sistem makanan panggang, namun relatif tidak efektif pada minyak tanaman. BHA bersifat larut lemak dan tidak larut air, berbentuk padat putih dan dijual

dalam bentuk tablet atau serpih, bersifat volatil sehingga berguna untuk penambahan ke materi pengemas (Buck, 1991 dan Coppen, 1983).

Menurut Sherwin (1990 dalam Trilaksani, 2003), antioksidan sintetik BHT memiliki sifat serupa BHA, akan memberi efek sinergis bila dimanfaatkan bersama BHA, berbentuk kristal padat putih dan digunakan secara luas karena relatif murah. Namun menurut Chang *et al.* (1977), penggunaan BHT pada tikus percobaan dapat menyebabkan kerusakan organ tubuh seperti paru-paru dan organ pencernaan. Oleh karena itu penggunaan *food additive* (bahan tambahan makanan) lebih baik dibatasi.

4. Antioksidan Pada Kedelai

Salah satu komponen flavonoid yang sering digunakan suplementasi makanan adalah senyawa fitoestrogen. Senyawa ini tersusun dari tiga komponen, yaitu isoflavon, lignan dan kumestran (Ruggiero *et al.*, 2002). Secara *in vitro*, senyawa flavonoid telah terbukti mempunyai efek biologis yang sangat kuat. Sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas, flavonoid dapat menghambat penggumpalan keping-keping darah, memperlancar pembuluh darah, dan menghambat pertumbuhan sel kanker (Robak dan Gryglewski, 1988).

Di dalam kedelai ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas (Pawiroharsono, 1996). Dari berbagai jenis tanaman dari golongan *Leguminoceae*, isoflavon paling banyak terdapat pada kedelai dan produk olahannya. Dalam kedelai terdapat tiga jenis isoflavon, yaitu daidzein, glisitein, dan genistein. Jumlah isoflavon dalam kedelai bervariasi, bergantung pada jenis kedelai, daerah geografis budidaya, dan cara pengolahannya (Winarsi, 2007).

5. Antioksidan Pada Tempe Kedelai

Pada tempe, di samping ketiga jenis isoflavon yaitu daidzein, glisitein, dan genistein juga terdapat antioksidan faktor II yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coreyne bacterium* (Pawiroharsono, 1996). Tempe merupakan sumber antioksidan yang baik, konsumsinya dalam jumlah cukup secara teratur dapat mencegah terjadinya proses penuaan dini (Pawiroharsono, 1996).

Tabel 2.6. kadar vitamin (mg/g bahan kering) dalam biji kedelai dan tempe

Vitamin	Kedelai	Tempe
Riboflavin	0,06	0,49
Asam nikotinat	0,90	4,39
Asam pantothenat	0,50	1,00
Piridoksin	0,08	0,35

(Sumaatmojo, 1985)

Murata (1985) menemukan bahwa kadar ribovlavin, asam nikotinat, asam pantotenat dan piridoksin dalam tempe jauh lebih tinggi daripada dalam kedelai yang tidak difermentasikan seperti terlihat dalam tabel 2.6 (Sumaatmojo, 1985). Fermentasi ternyata dapat menurunkan kadar asam phitat dalam biji kedelai (54%) asam phitat adalah senyawa fosfor yang dapat mengikat mineral (kalsium, besi, fosfor, magnesium, seng) sehingga tidak dapat diserap tubuh. Dengan berurainya asam phitat karena perebusan dan oleh enzin fitase yang dihasilkan cendawan *rizophus oligosporus*, fosfornya dapat dimanfaatkan tubuh dan penyerapan mineral lainpun tidak terganggu (Sumaatmojo, 1985).

G. Uji Aktifitas Antioksidan

Berbagai metode uji aktivitas antioksidan telah digunakan untuk mengetahui dan membandingkan aktivitas antioksidan pada makanan. Beberapa tahun terakhir, pengujian kapasitas absorbansi radikal oksigen telah digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada makanan, serum dan cairan biologis. Metode ini memerlukan peralatan khusus dan keahlian teknis untuk analisisnya. Beberapa metode untuk uji aktivitas antioksidan antara lain *Thiobarbituric acid-reactive-substances* (TBARS), *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH), *2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid* (ABTS), *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), *2,2'-azobis-amidinopropane-dihydrochloride* (AAPH) serta reagen *Folin-Ciocalteu*. Berbagai metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan pada bahan makanan dapat memberikan hasil yang berbeda-beda tergantung pada jenis radikal bebas yang digunakan sebagai reagen (Prakash, 2001).

Metode yang cepat, mudah dan tidak mahal untuk mengukur aktivitas antioksidan pada makanan dan bahan makanan menggunakan senyawa radikal bebas DPPH. DPPH secara luas digunakan untuk menguji kemampuan senyawa-senyawa penyerang radikal bebas atau donor hidrogen dan untuk menilai besarnya aktivitas antioksidan pada makanan. Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel padat ataupun cair dan tidak spesifik untuk senyawa antioksidan tertentu tetapi pada keseluruhan senyawa antioksidan yang ada dalam sampel. Uji aktivitas antioksidan secara keseluruhan membantu dalam memahami fungsi zat-zat yang terkandung dalam makanan (Prakash, 2001).

Uji antioksidan dengan metode DPPH telah dikembangkan dalam memaparkan aktivitas antioksidan menggunakan radikal bebas stabil DPPH.

Elektron bebas dalam radikal bebas DPPH memberikan panjang gelombang maksimum 517 nm dan berwarna ungu. Peredaman warna ungu menjadi kuning sebagai absorpsivitas molar radikal bebas DPPH berkurang dari 9660 menjadi 1640 ketika elektron bebas radikal bebas menjadi berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan yang menyerang radikal bebas membentuk DPPH-H tereduksi. Sehingga peredaman warna DPPH sebanding dengan banyaknya elektron yang tertangkap (Prakash, 2001).

DPPH (*difenil pikril hidrazil hidrat*) menghasilkan radikal bebas aktif bila dilarutkan dalam alkohol. Radikal bebas tersebut stabil dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 517 nm dan dapat direduksi oleh senyawa antioksidan (Prakash, 2001). Dalam metode ini larutan sampel ditambah larutan 0,2 mM DPPH (sebagai kontrol) dalam metanol, dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar dalam keadaan gelap dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antiradikal dapat diperlihatkan pada sistem yang warnanya berubah dari ungu menjadi kekuningan.

Perubahan warna larutan menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dan dapat diukur dengan perbedaan absorbansi yang dihasilkan pada sampel dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas antiradikal dinyatakan dalam bentuk persen penangkapan radikal DPPH dan dihitung dengan persamaan (Yen dan Chen, 1995 dalam Ariani dan Hastuti, 2009).

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas atau antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu

dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.

H. Kerangka Berpikir

Senyawa isoflavon adalah salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan, khususnya golongan *Leguminoceae*. Kedelai dan hasil olahannya mengandung senyawa isoflavon dalam bentuk glukosida isoflavon (daidzin, genistin dan glisitin) dan dalam bentuk aglukan isoflavon (daizein, genistein, glisitein dan faktor-2). Selama proses pengolahan dan fermentasi kedelai menjadi tempe terjadi biokonversi isoflavon dari glukosida isoflavon menjadi aglukan isoflavon.

Koro pedang merupakan alternatif pengganti kedelai sebagai sumber antioksidan alami khususnya isoflavon. Koro pedang mempunyai ukuran biji yang relatif lebih besar, untuk itu perlu diteliti perlakuan ukuran biji (utuh dan rajang) untuk menghasilkan isoflavon yang optimum serta isoflavon jenis apa saja yang terkandung dalam koro pedang berdasarkan variasi lama waktu fermentasi (0, 1, 2, 3,dan 4 hari).

Untuk mengetahui potensi isoflavon koro pedang dan produk tempenya sebagai sumber antioksidan, maka aktivitas antioksidannya dibandingkan dengan kedelai dan aktivitas sumber antioksidan yang sudah ada, diantaranya α - *tokoferol*, β -*karoten*, dan vitamin C sebagai antioksidan alami lainnya maupun BHT sebagai antioksidan sintetis.

I. Hipotesis

Berdasarkan kajian teori dan kerangka pemikiran di atas, maka dapat dikemukakan hipotesis sebagai berikut :

1. Adanya beberapa jenis isoflavon yang terkandung dalam biji koro pedang dan produk tempunya bentuk utuh maupun rajang.
2. Terdapat perbedaan lama waktu fermentasi optimum untuk aktivitas antioksidan yang optimum pada perlakuan fermentasi dengan biji bentuk utuh dan rajang.
3. Adanya perbedaan aktivitas antioksidan koro pedang bila dibandingkan dengan antioksidan alami (α -tokoferol, β -karoten, dan vitamin C) maupun antioksidan sintetis (BHT).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada pertengahan bulan Maret sampai Juli 2009, dan penelitian ini dilakukan di:

- a. Laboratorium Kimia FKIP UNS.
- b. Sub Laboratorium Biologi Pusat MIPA UNS.
- c. Laboratorium Kimia Organik F.MIPA UGM.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah :

- a) Kedelai Kuning Madura dan koro pedang.
- b) Inokulum *Rhizopus oligosporus* ("RAPRIMA", produk dari LIPI).
- c) Etanol 70 % (Merck)
- d) Metanol p.a (Merck)
- e) Standar Genistein (Sigma Chemical Co.)
- f) Standart Daidzein (Sigma Chemical Co.)
- g) Standar Glisitein (Sigma Chemical Co.)
- h) Standar Faktor-2 (Sigma Chemical Co.)
- i) DPPH (Sigma Chemical Co.)
- j) BHT (Butyl Hidroksi Toluena) (Sigma Chemical Co.)
- k) β -karoten (Sigma Chemical Co.)
- l) α -tokoferol (Sigma Chemical Co.)

- m) Metanol gradient grade for liquid chromatography (*Merck*)
- n) Aluminium foil
- o) Akuades
- p) Kertas saring

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a) Alat *rotary vacum evaporator* (*Buchi*)
- b) Neraca analitik (*Sartorius*)
- c) Alat HPLC (*Perkin Elmer LC 295*)
- d) Blender (*Philip*)
- e) Pipet mikro
- f) Alat *Spektrofotometer UV - VIS* (*Shimadzu*)
- g) Alat-alat gelas merek *Pyrex*

C. Prosedur Kerja

1. Metode Pembuatan Tempe

a. Pembuatan tempe kedelai berbahan baku kedelai kuning Madura sebagai berikut :

1. Persiapan bahan disortasi

Penyiapan bahan baku berupa kedelai kuning Madura 500 gr dipilih biji-biji yang bernas, licin dan mengkilat kulitnya.

2. Perendaman

Perendaman dilakukan dengan merendam 500 gr kedelai kuning Madura dalam 1000 ml air bersih selama 24 jam, dengan penggantian air rendaman setiap 8 jam.

3. Pengupasan kulit

Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi.

4. Perebusan

Biji direbus dalam air sebanyak 1000 ml selama 45 menit, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan sampai biji kedelai dalam keadaan lembab (tidak terlalu basah).

5. Penambahan inokulum

Setelah sampel dalam keadaan tidak terlalu basah, ditaburi ragi/inokulum sebanyak 0,5 gr untuk 500 gr sampel. Inokulum yang digunakan adalah *Rhizopus oligosporus*, produk dari LIPI dengan merek RAPRIMA.

6. Pemeraman

Sampel yang sudah diberi inokulum dicampur dengan rata kemudian dibungkus dengan menggunakan daun pisang dan diperam selama 24, 48, 72, 96 jam dalam suhu kamar (27°C) dan terbentuklah tempe kedelai.

- b. Pembuatan Tempe Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*) Utuh dan rajang sebagai berikut :

1. Persiapan bahan dan Sortasi

Tahap pertama dimulai dengan penyiapan bahan baku yaitu koro ro pedang (*Canavalia ensiformis*). Dengan menggunakan 2 perlakuan biji yaitu utuh dan dirajang.

2. Perendaman

Perendaman dilakukan dengan merendam 1000 gram biji koro pedang dalam 2000 ml air bersih selama tiga hari untuk menghilangkan senyawa glukosianida (HCN). Selama 24 jam sekali dilakukan penggantian air

sebanyak tiga kali, agar air yang digunakan untuk merendam koro tidak jenuh.

3. Pengupasan kulit

Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi.

4. Perlakuan Ukuran Biji

Biji koro pedang yang telah dikuliti, selanjutnya dilakukan perlakuan ukuran biji yaitu utuh dan dirajang masing-masing 500 gram.

5. Teknik Pemanasan/Perebusan

Biji koro pedang utuh dan rajang direbus dalam air masing-masing sebanyak 1000 ml selama 45 menit.

6. Penirisan dan Pemberian Inokulum

Koro pedang yang telah direbus, ditiriskan atau didinginkan selama 30 menit setelah itu diberi inokulum. Inokulum yang digunakan adalah produk dari LIPI dengan merk RAPRIMA.

7. Pengemasan

Koro pedang yang telah diberi inokulum dengan dua perlakuan ukuran biji, yaitu utuh dan rajang di bungkus dengan daun pisang. Kemudian ditutup rapat dan diikat dan diperam selama 24, 48, 52, 96 jam dalam suhu kamar (27°C) dan terbentuklah tempe koro pedang dengan perlakuan biji utuh dan rajang.

2. Ekstraksi Isoflavon dengan Metode Maserasi

Sebanyak 100gr sampel diblender hingga terbentuk bubur, kemudian dimaserasi dalam 250 ml etanol 70 % selama 24 jam, kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Residu ditambah dengan 100 ml etanol 70 %, kemudian

dimaserasi selama 24 jam, kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Residu kedua ditambah dengan 100 ml etanol 70 %. Filtrat hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental di oven selama 30 menit dengan suhu 50°C sehingga diperoleh isolat. Isolat yang dihasilkan kemudian diidentifikasi isoflavonnya dengan metode HPLC.

3. Metode Identifikasi Isoflavon

Identifikasi isoflavon dengan menggunakan metode HPLC dilakukan dengan pengkondisian instrumen HPLC dan pembuatan larutan sampel. Larutan sampel dibuat dengan mengambil 1 mg isolat isoflavon hasil ekstraksi lalu masing-masing dilarutkan dalam etanol 10 mL. Larutan kemudian disentrifuge lalu diambil 20 µL dengan alat injeksi. Selanjutnya sampel diinjeksikan ke dalam HPLC setelah pengkondisian HPLC selesai. Menganalisa kromatogram HPLC dengan menggunakan pembandingan kromatogram isoflavon standar yang terdiri dari daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2. Adapun kondisi HPLC adalah sebagai berikut:

Panjang Kolom	: 10 cm
Jenis Kolom	: Lichrosper (R) 100 RP-18 (non polar)
Fase Gerak	: metanol:asam asetat 0,02 (57,5% ; 42,5%)
Volume Injeksi	: 20 µL
Detektor	: sinar UV pada panjang gelombang 265 nm
Suhu Oven	: suhu kamar

4. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

Pembuatan larutan DPPH dengan menimbang kristal sebanyak 7,88 mg DPPH dan dilarutkan dalam metanol 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 0,2 mM sebagai larutan kontrol. Pengukuran absorbansi larutan DPPH dilakukan dengan memipet 600 μ L pelarut (metanol) ke dalam kuvet dan ditambahkan larutan DPPH sampai volume 3 mL kemudian ditutup dan dikocok sampai homogen warnanya. Selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbannya pada puncak panjang gelombang 517nm sebagai absorban kontrol.

b. Pembuatan Larutan Sampel

Pembuatan larutan uji dengan menimbang ekstrak sebanyak 2 mg dan melarutkan ke dalam etanol 4 mL untuk membuat larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian pengukuran antioksidan bahan uji digunakan metode yang sama, dimana 600 μ L pelarut diganti dengan 600 μ L larutan uji (sampel). Selanjutnya diukur absorbansi tampak pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbannya pada puncak panjang gelombang mendekati 517nm sebagai absorban sampel.

c. Pengukuran Kadar Antioksidan

Aktivitas antiradikal dihitung dengan metode DPPH dimana sampel direaksikan dengan larutan DPPH. Aktivitas antiradikal diperlihatkan pada sistem yang warnanya berubah dari ungu menjadi kekuningan.

Perubahan warna larutan menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dan dapat diukur dengan perbedaan absorbansi yang dihasilkan pada sampel dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas antiradikal dinyatakan dalam

bentuk persen penangkapan radikal DPPH dan dihitung dengan persamaan (Yen dan Chen, 1995 dalam Ariani dan Hastuti, 2009).

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \%$$

Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas atau antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.

5. Teknik Analisa Data

Teknik analisa data statistik menggunakan program SPSS *version* 15 yaitu :

- *General Linear Model – Univariate* untuk analisa data hasil uji aktivitas antioksidan pada koro pedang dan kedelai dengan lama waktu fermentasi menggunakan dua faktor yaitu jenis bahan dasar pembuat tempe dan lama fermentasi.
- *Compare Means – One Way Anova* untuk analisa data statisitik perbandingan aktivitas antioksidan (%) tempe koro pedang utuh dan rajang serta sumber lain menggunakan satu faktor yaitu jenis bahan dasar.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Ekstraksi Isoflavon Biji Legume dan Produk Tempenya

Ekstraksi isoflavon dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol 70% diketahui mampu mengekstrak isoflavon secara optimal (Kudou *et al.*, 1991). Etanol merupakan salah satu pelarut yang sesuai untuk mengisolasi senyawa-senyawa organik polar dan memiliki kepolaran mendekati metanol. Metanol merupakan pelarut optimum untuk mengekstrak isoflavon dari kedelai, namun penggunaannya untuk skala komersial masih perlu dikaji lebih lanjut karena bersifat toksik (Susanto *et al.*, 1998). Penelitian ini dilakukan menggunakan pelarut etanol karena selain kepolarannya mendekati metanol, etanol juga relatif tidak beracun.

Maserasi merupakan cara ekstraksi senyawa organik yang mudah dan sederhana. Bahan mentah yang akan diekstrak direndam dalam pelarut yang sesuai selama waktu tertentu. Selanjutnya filtrat dipisahkan dari residu untuk diproses lebih lanjut menjadi ekstrak yang murni. Dari proses maserasi dengan pelarut etanol 70% diperoleh hasil berupa filtrat berwarna kuning untuk tempe fermentasi 0 hari, lalu meningkat intensitasnya, warna semakin pekat dengan semakin lama waktu fermentasinya. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50⁰ C sampai didapatkan ekstrak yang pekat atau hampir semua etanol teruapkan. Ekstrak ini selanjutnya disimpan dalam oven suhu 40⁰C untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa, kemudian

ditimbang sehingga diperoleh massa hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Ekstrak Senyawa Isoflavon Kedelai dan Koro Pedang (per 100 gram)

Sampel	Kedelai kuning		Koro pedang utuh		Koro pedang rajang		
	Hasil ekstraksi (gram)	Warna	Hasil ekstraksi (gram)	Warna	Hasil ekstraksi (gram)	Warna	
Biji mentah	3.422	Coklat tua	2.581	Coklat kehitaman	2.581	Coklat kehitaman	
Tempe hasil fermentasi	0 hari	0.677	Kuning muda	0.693	Kuning muda	0.693	Kuning muda
	1 hari	2.933	Kuning kecokelatan	1.635	Kuning kecokelatan	1.778	Kuning kecokelatan
	2 hari	4.982	Kuning kecokelatan	2.179	Kuning kecokelatan	3.532	Kuning kecokelatan
	3 hari	3.421	coklat	2.183	coklat	3.371	coklat
	4 hari	5.192	Coklat tua	3.044	Coklat tua	3.610	Coklat tua

Tabel 4.1 dapat diketahui massa hasil ekstraksi etanol tempe koro pedang utuh dan rajang terbanyak terjadi pada fermentasi hari keempat yaitu sebanyak 3.044 gram dan 3.610 gram per 100 gram sampel tempe koro pedang. Sementara itu, untuk biji mentah didapat 2.581 gram ekstrak per 100 gram sampel biji koro pedang mentah. Pada kedelai massa hasil ekstraksi terbanyak juga terjadi pada hari keempat yaitu 5.192 gram, sedangkan pada biji mentahnya didapatkan 3.442 gram ekstrak per 100 gram sampel.

Tabel 4.1 juga dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu fermentasinya semakin banyak massa ekstrak etanol yang dihasilkan, kecuali untuk kedelai dan koro pedang rajang hasil fermentasi 2 hari dan 3 hari tidak meningkat bahkan menurun. Namun hal ini tidak berlaku bagi biji mentah, karena pada biji mentah masih mengandung senyawa sianida sehingga massa hasil ekstraksi biji mentah relatif banyak. Ini terlihat dari warna hasil ekstraksi yang

dihasilkan. Pada koro pedang mentah massa hasil ekstraksi berwarna coklat kehitaman karena masih banyak mengandung senyawa sianida, sedangkan pada kedelai mentah berwarna coklat tua kemungkinan kandungan sianidanya relatif sedikit dibanding dengan koro pedang. Hal ini ditandai dengan lamanya waktu perendaman, untuk kedelai perendaman 24 jam, sedangkan koro pedang 3 x 24 jam. Hasil ekstaksi isoflavon dari biji yang sudah difermentasi berwarna kuning muda hingga coklat tua, karena senyawa sianidanya sudah hilang di saat perendaman sehingga aman untuk dikonsumsi.

Dari Tabel 4.1 juga dapat disimpulkan bahwa massa hasil ekstraksi isoflavon dari kedelai dan koro pedang utuh serta rajang ternyata bervariasi. Hal ini diduga karena kekerasan atau kelunakan dan kepadatan komponen zat yang ada didalam biji setiap *legume* berbeda. Berdasarkan penelitian Handajani dan Atmaka (1993) bahwa faktor varietas, faktor daerah tempat tumbuh dan musim panen ternyata memberikan pengaruh yang cukup bervariasi terhadap sifat fisis dan khemis dari biji kacang-kacangan.

2. Identifikasi Isoflavon dengan HPLC

Analisis dengan HPLC bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dalam sampel tempe koro pedang dan tempe kedelai pada berbagai waktu fermentasi. Seperti metode kromatografi yang lain, analisis HPLC dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari senyawa isoflavon standar dengan waktu retensi dari masing-masing sampel. Adanya puncak-puncak yang memiliki waktu retensi relatif sama dengan senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 standar menunjukkan bahwa dalam sampel tersebut terdapat kandungan isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2.

Penentuan waktu retensi senyawa daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 standar dilakukan pada hari yang sama dengan penentuan waktu retensi dari masing-masing sampel untuk meminimalkan perbedaan kondisi. Analisis kuantitatif senyawa isoflavon dilakukan dengan cara menghitung luas kromatogram. Konsentrasi senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dapat diketahui dengan mengalikan persen luas masing-masing senyawa isoflavon dalam kromatogram dengan massa ekstrak yang dihasilkan. Berikut adalah tabel hasil identifikasi isoflavon dari kedelai dan koro pedang baik utuh maupun rajang.

Tabel 4.2 Hasil Identifikasi Isoflavon dari Kedelai dan Koro Pedang Biji Utuh dan Rajang (per 100 gram)

Jenis Sampel	Lama Waktu fermentasi (hari)	Kandungan Isoflavon (gram)				Isoflavon Total (gram)
		Faktor-2	Daidzein	Glisitein	Genistein	
Koro Pedang Utuh 100 gram	mentah	-	0.075	0.006	-	0.081
	0	0.003	0.016	0.020	0.035	0.074
	1	0.009	0.228	0.079	0.469	0.785
	2	-	0.091	0.009	0.461	0.561
	3	0.011	0.102	0.035	0.248	0.396
	4	-	0.101	0.029	0.153	0.283
Koro Pedang Rajang 100 gram	mentah	-	0.075	0.006	-	0.081
	0	0.003	0.016	0.020	0.035	0.074
	1	-	0.226	0.077	0.287	0.590
	2	0.005	0.036	0.006	0.071	0.118
	3	-	0.045	0.007	-	0.052
	4	0.003	0.023	0.004	-	0.030
Kedelai 100 gram	mentah	-	0.034	0.009	0.136	0.179
	0	0.001	0.075	0.013	0.106	0.195
	1	0.083	0.442	0.085	0.677	1.287
	2	0.064	0.586	0.306	0.856	1.812
	3	0.025	0.499	0.091	0.568	1.183
	4	0.058	0.632	0.232	0.755	1.677

Dari Tabel 4.2 dapat diketahui kandungan jenis-jenis isoflavon dari masing-masing sampel. Untuk koro pedang mentah hanya terdapat kandungan isoflavon daidzein dan glisitein, sedangkan untuk kedelai mentah terdapat kandungan daidzein, glisitein dan genistein, walaupun demikian kandungan daidzein koro pedang mentah 0.075 gram, lebih tinggi jika dibandingkan dengan kedelai yang hanya 0.034 gram. Adanya kandungan isoflavon tersebut diduga telah terjadi proses hidrolisis menjadi aglukan isoflavon dan glukosanya pada waktu penyimpanan, biji kedelai dan koro pedang masih mengandung air walaupun tidak mengalami proses pengolahan.

Di kedua jenis sampel tersebut yaitu koro pedang dan kedelai mentah kandungan isoflavon faktor-2 tidak terbentuk. Menurut Barz dan Papendorf (1991), faktor-2 dapat terbentuk karena selama proses perendaman β -glukosidase akan aktif dan mengubah glisitin, genistin dan daidzin menjadi

daidzein, genistein dan glisitein yang selanjutnya selama proses fermentasi dengan *Rhizopus oligosporus* terjadi biokonversi lebih lanjut daidzein dan glisitein menjadi faktor-2. Juga menurut penelitian Barz *et al.* (1993), biosintesa faktor-2 dihasilkan melalui demetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui reaksi hidrosilasi daidzein. Sehingga pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa faktor-2 hanya dijumpai pada tempe selama proses fermentasi dan hal ini mendukung penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

Pada Tabel 4.2 ditampilkan juga masing-masing kandungan isoflavon untuk fermentasi 0 hari sampai 4 hari dari masing-masing sampel. Untuk kandungan isoflavon faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein untuk masing-masing sampel berbeda-beda. Pada koro pedang utuh dan rajang kandungan total isoflavon tertinggi terjadi pada fermentasi 1 hari, sedangkan pada kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari. Dari 100 gram sampel tempe koro pedang utuh diperoleh kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.786 gram yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.009 gram, daidzein 0.228 gram, glisitein 0.079 gram, dan genistein 0.469 gram, sedangkan pada tempe koro pedang rajang kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.590 gram yang terdiri dari kandungan isoflavon daidzein 0.226 gram, glisitein 0.077 gram, dan genistein 0.287 gram.

Untuk kandungan total isoflavon tertinggi pada tempe kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari yaitu 1.812 gram yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.064 gram, daidzein 0.586 gram, glisitein 0.306 gram dan genistein 0.856 gram. Walaupun rata-rata kandungan isoflavon kedelai lebih tinggi dari koro pedang baik utuh maupun rajang, namun kandungan isoflavon faktor-2 pada fermentasi 0

hari untuk koro pedang 0.003 gram, lebih tinggi bila dibanding dengan kedelai yang hanya sebanyak 0.001 gram. Hal ini menjadi nilai tambah bagi koro pedang sebagai alternatif pengganti kedelai.

Perbedaan kandungan jumlah senyawa isoflavon yang naik turun bahkan ada yang tidak muncul seperti yang terlihat pada Tabel 4.2, diduga disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, karakteristik dari senyawa isoflavon sendiri yang sangat reaktif dan mudah teroksidasi sehingga dimungkinkan sudah berikatan dengan senyawa lain menjadi senyawa baru.

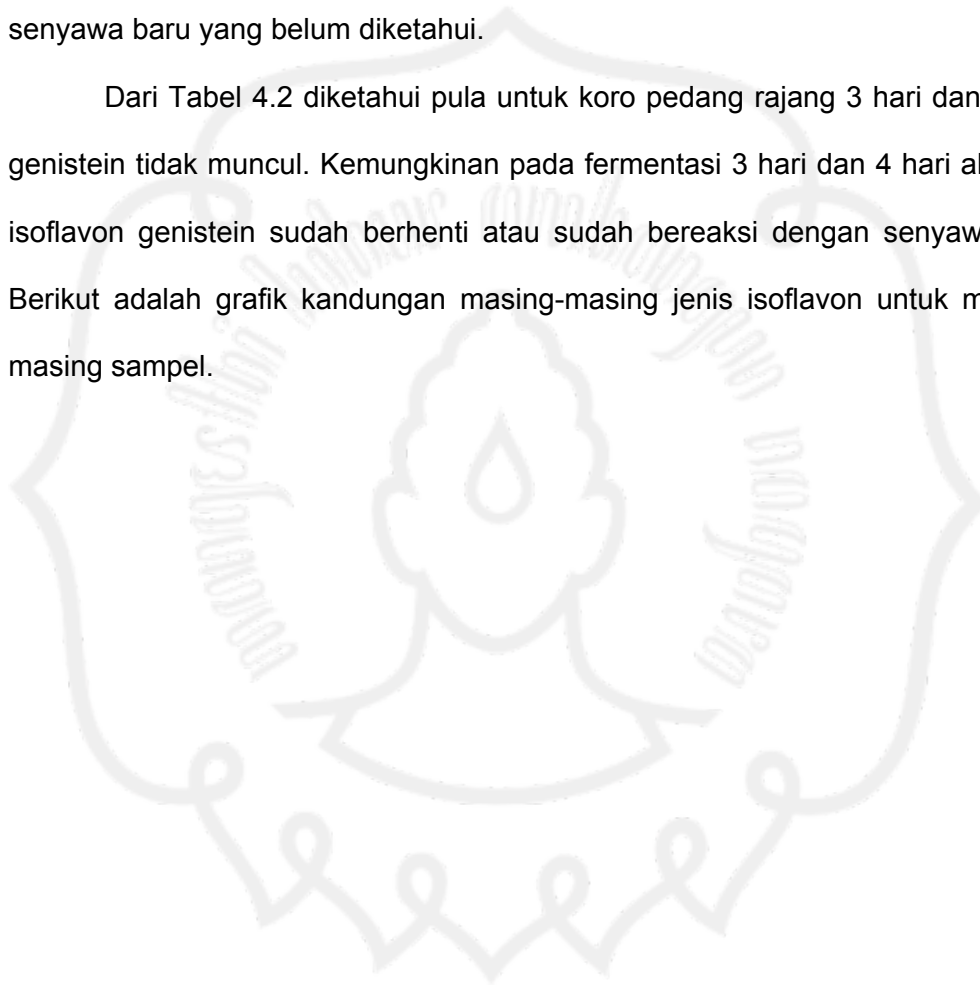
Kedua, beberapa penelitian melaporkan bahwa kandungan isoflavon pada kacang-kacangan dipengaruhi oleh varietas, waktu panen dan lokasi penanaman (Mazur *et al.*, 1998), waktu tanam (Aussenac *et al.*, 1998) dan kondisi iklim (Tsukomoto *et al.*, 1995). Sehingga kondisi pertumbuhan, varietas, lokasi, dan waktu tanam membedakan jumlah senyawa isoflavon (Harbone, 1996).

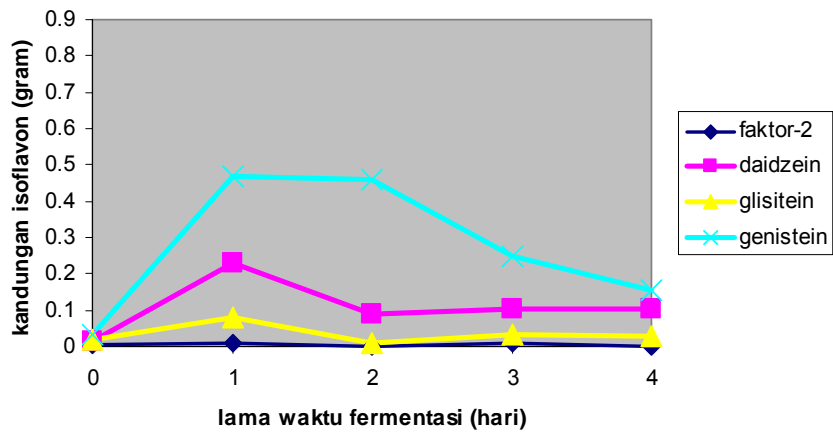
Untuk koro pedang dengan dua perlakuan biji utuh dan dirajang berdasarkan Tabel 4.2 diketahui koro pedang utuh memiliki kandungan jenis-jenis isoflavon rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan koro pedang rajang. Hal ini kemungkinan dipengaruhi oleh pertumbuhan kapang serta massa terlarut pada saat pengolahan tempe, dari proses perendaman hingga fermentasi. Dengan perlakuan perajangan maka dimungkinkan senyawa-senyawa yang terlarut saat perendaman lebih banyak bila dibanding dengan biji utuh, sehingga dijumpai kandungan isoflavon biji rajang lebih rendah dibandingkan dengan biji utuh.

Berdasarkan Tabel 4.2 ada beberapa jenis isoflavon yang tidak muncul. Pada koro pedang utuh fermentasi 2 hari dan 4 hari, faktor-2 tidak muncul.

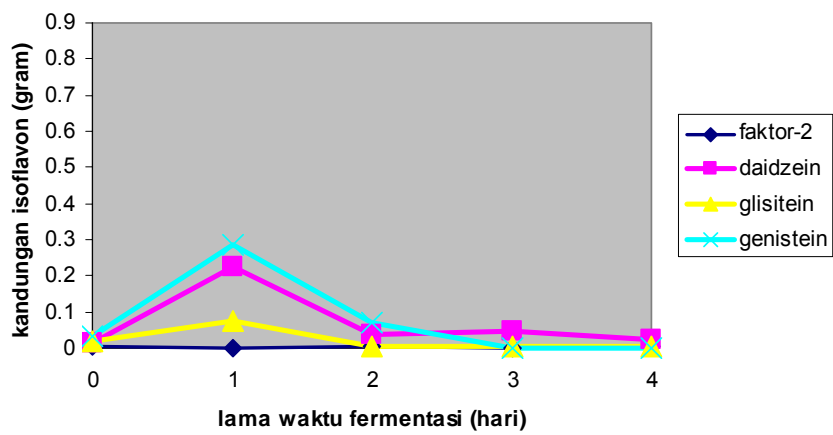
Sedangkan pada koro pedang rajang, faktor-2 tidak muncul pada fermentasi 1 hari dan 3 hari. Hal ini dikarenakan isoflavon sebagai antioksidan memiliki sifat mudah teroksidasi sehingga mudah bereaksi dengan radikal bebas, sehingga pada beberapa tempe koro pedang ada beberapa jenis isoflavon yang tidak muncul dimungkinkan karena sudah bereaksi dengan senyawa lain dan menjadi senyawa baru yang belum diketahui.

Dari Tabel 4.2 diketahui pula untuk koro pedang rajang 3 hari dan 4 hari genistein tidak muncul. Kemungkinan pada fermentasi 3 hari dan 4 hari aktivitas isoflavon genistein sudah berhenti atau sudah bereaksi dengan senyawa lain. Berikut adalah grafik kandungan masing-masing jenis isoflavon untuk masing-masing sampel.

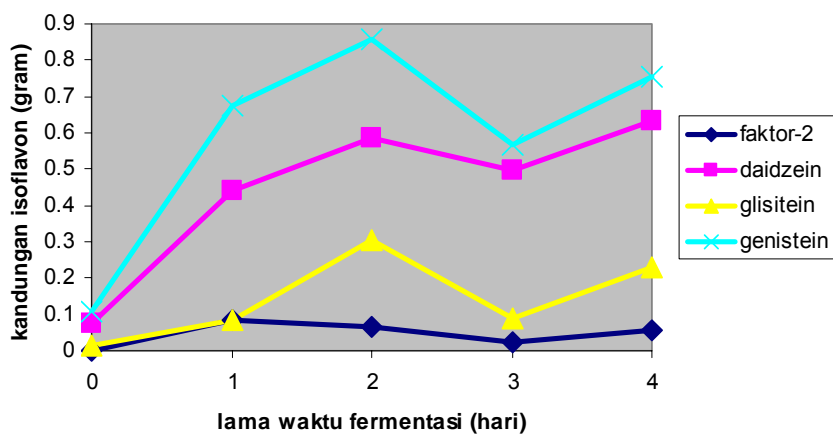




Gambar 4.1. Grafik Kandungan Isoflavon Tempe Koro Pedang Utuh



Gambar 4.2. Grafik Kandungan Isoflavon Tempe Koro Pedang Rajang

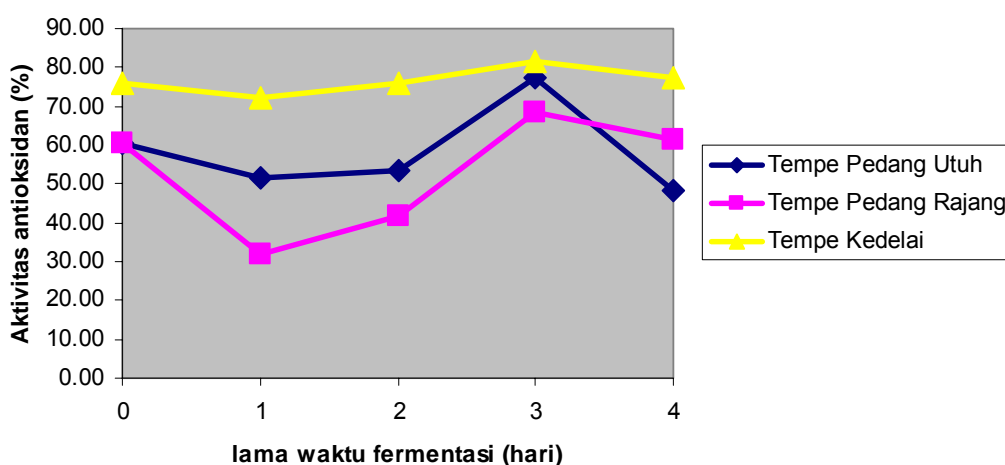


Gambar 4.3. Grafik Kandungan Isoflavon Tempe Kedelai

Dari grafik Gambar 4.1 sampai 4.3 diketahui rata-rata kandungan jenis-jenis isoflavon pada tempe kedelai fermentasi 0 hari sampai 4 hari jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan tempe koro pedang utuh dan rajang, sedangkan untuk tempe koro pedang utuh memiliki kandungan jenis-jenis isoflavon rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan tempe koro pedang rajang. Dari grafik Gambar 4.1 sampai 4.3 juga dapat dilihat penurunan kandungan isoflavon pada koro pedang utuh dan rajang setelah fermentasi 1 hari, sedangkan pada kedelai penurunan kandungan isoflavon setelah fermentasi 2 hari, namun meningkat pada fermentasi 4 hari. Hal ini diduga karena selama fermentasi terjadi aktivitas mikroba yang bervariasi dan pembentukan aglukan sudah berhenti. Tempe yang terbaik dengan tekstur kompak diselimuti miselia putih tebal terjadi pada fermentasi 3 hari. Namun setelah itu pada fermentasi 4 hari sudah terjadi pembusukan, diduga karena *Rhizopus* mengalami fase pembusukan atau fermentasi lanjut (50-90 jam fermentasi) terjadi kenaikan jumlah bakteri dan jumlah asam lemak bebas, pertumbuhan jamur menurun dan pada kadar air tertentu pertumbuhan jamur terhenti, terjadi perubahan flavor karena degradasi protein lanjut sehingga terbentuk amoniak dan mikroba pembusuk mulai tumbuh.

3. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH melalui pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil uji aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai, tempe koro pedang utuh, dan tempe koro pedang rajang hasil fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari disajikan dalam grafik pada Gambar 4.4 dan terangkum dalam tabel 4.3 berikut :



Gambar 4.4. Grafik Aktivitas Antioksidan(%) Beberapa Jenis Tempe

Tabel 4.3 Aktivitas antioksidan (%) pada koro pedang dan kedelai dengan lama waktu fermentasi

Lama waktu fermentasi	Aktivitas Antioksidan (%)		
	Kedelai	Koro Pedang Utuh	Koro Pedang Rajang
Mentah	67.45 ^f	47.13 ^c	47.13 ^c
0 hari	76.06 ^{hi}	60.40 ^e	60.40 ^e
1 hari	72.08 ^{gh}	51.57 ^{cd}	31.90 ^a
2 hari	76.06 ^{hi}	53.61 ^d	41.72 ^b
3 hari	81.43 ^j	77.32 ^{ij}	68.63 ^{fg}
4 hari	77.14 ^{ij}	48.26 ^c	61.61 ^e

*) superscrib yang berbeda menunjukkan terdapat adanya perbedaan yang signifikan.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2 difenil 1 picril hidrazil). Metode yang dipilih adalah metode DPPH karena sederhana, mudah, cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Metode aktivitas antiradikal bebas DPPH merupakan metode terpilih untuk

menapis aktivitas antioksidan bahan alam (Molyneux, 2004; Luo *et al.*, 2002; Leong dan Shui, 2002; Okawa *et al.*, 2001; Santosa *et al.*, 1998 dalam Amrun dan Umayah, 2007). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.

Hasil uji aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai, tempe koro pedang utuh, dan tempe koro pedang rajang hasil fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari terangkum dalam Tabel 4.3. Dari tiga kali perulangan percobaan, hasil uji aktivitas antioksidan diperoleh rata-rata aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai kuning, tempe koro pedang utuh dan rajang hasil fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari. Pada Gambar 4.4 terlihat bahwa rata-rata aktivitas antioksidan dari tertinggi ke terendah berturut-turut adalah tempe kedelai, tempe pedang utuh, kemudian tempe pedang rajang. Pada Tabel 4.3 huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=5\%$. Pada aktivitas antioksidan koro pedang mentah dengan koro pedang utuh fermentasi 4 hari tidak berbeda nyata yaitu antara 47%-48%, sedangkan pada koro pedang utuh dan rajang fermentasi 0 hari tidak berbeda nyata dengan koro pedang rajang fermentasi 4 hari yaitu antara 60%-61%. Pada kedelai fermentasi 0 hari dan 2 hari juga tidak berbeda nyata yaitu 76%, demikian juga dengan kedelai fermentasi 4 hari tidak berbeda nyata dengan koro pedang utuh fermentasi 3 hari yaitu sebesar 77%.

Dari Tabel 4.3 juga dapat diketahui bahwa koro pedang rajang fermentasi 1 hari sangat berbeda nyata dengan kedelai fermentasi 3 hari, yaitu masing-masing 31.90% dan 81.43%. Sehingga dengan demikian dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan terendah terjadi pada koro pedang rajang fermentasi

1 hari sedangkan aktivitas antioksidan tertinggi terjadi pada kedelai fermentasi 3 hari.

Namun aktivitas antioksidan tertinggi rata-rata terjadi pada fermentasi 3 hari dan aktivitas antioksidan terendah terjadi saat kondisi mentah, kecuali pada koro pedang rajang aktivitas antioksidan terendah terjadi pada fermentasi 1 hari. Hal ini terlihat dalam Tabel 4.3 bahwa sampel tempe hasil fermentasi 3 hari memiliki aktivitas antioksidan tertinggi. Untuk tempe kedelai aktivitas antioksidan maksimum 81,43%, tempe koro pedang utuh aktivitas antioksidan maksimum 77,32% dan tempe koro pedang rajang aktivitas antioksidan maksimum 68,63%. Sedangkan untuk aktivitas antioksidan kedelai mentah dan koro pedang mentah adalah 67,45% dan 47,13%.

Hal ini kemungkinan disebabkan karena terhidrolisisnya senyawa isoflavon glukosida menjadi senyawa isoflavon bebas yang disebut aglukon oleh enzim *β -glukosidase*. Enzim ini selain terdapat di dalam biji kedelai dan koro pedang juga dihasilkan oleh mikroorganisme selama proses fermentasi. Aktivitas antioksidan menurun pada sampel tempe kedelai hasil fermentasi 4 hari kemungkinan disebabkan oleh reaksi lebih lanjut senyawa isoflavon menjadi senyawa lain yang aktivitasnya belum diketahui dan perlu dikaji lebih mendalam.

Lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan senyawa isoflavon, karena fermentasi adalah proses yang memanfaatkan mikroba untuk menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder dalam suatu lingkungan yang dikendalikan. Hal ini dapat dilihat dari hasil uji aktivitas antioksidan yang dilakukan. Terjadi kenaikan aktivitas antioksidan seiring bertambahnya waktu fermentasi, hingga mencapai maksimum pada hari ketiga.

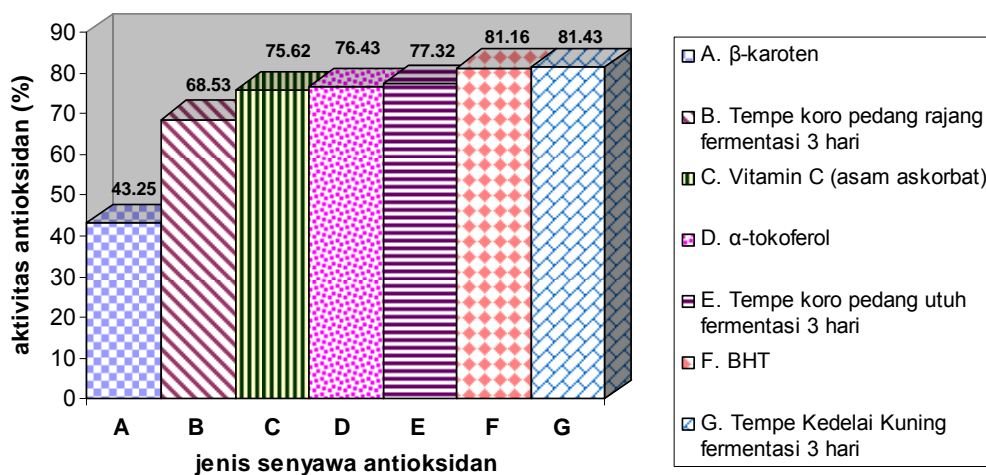
Dari pembahasan diatas dapat diketahui hubungan kandungan isoflavon dengan aktivitas antioksidan dari masing-masing sampel dengan variasi lama waktu fermentasi. Kandungan total isoflavon pada kedelai mentah adalah yang paling rendah jika dibanding dengan kedelai yang difermentasi demikian pula untuk aktivitas antioksidannya. Hal ini berbeda dengan koro pedang, pada koro pedang utuh kandungan total isoflavon paling rendah terjadi pada fermentasi 0 hari. Begitu pula dengan koro pedang rajang, kandungan total isoflavon terendah terjadi pada fermentasi 4 hari, namun aktivitas aktioksidan keduanya cenderung tinggi dibandingkan dengan yang lain kecuali pada fermentasi 3 hari. Untuk kandungan total isoflavon tertinggi pada koro pedang utuh dan rajang terjadi pada fermentasi 1 hari, sedangkan pada kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari. Dimana hal tersebut tidak diikuti dengan aktivitas antioksidannya. Karena baik kedelai maupun koro pedang utuh dan rajang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi pada fermentasi 3 hari, dan aktivitas antioksidan terendah rata-rata terjadi pada kondisi masih mentah atau belum terjadi pengolahan, kecuali pada koro pedang rajang, dimana pada fermentasi 1 hari justru aktivitas antioksidannya paling rendah.

Dari uraian diatas dapat disimpulkan kandungan jenis-jenis isoflavon yang optimum rata-rata pada fermentasi 1 hari sedangkan untuk aktivitas antioksidan yang optimum adalah pada fermentasi 3 hari. Namun ada beberapa jenis kandungan isoflavon yang rendah bahkan tidak muncul, padahal aktivitas antioksidannya relatif tinggi. Hal ini dikarenakan walaupun senyawa isoflavon mempunyai aktivitas sebagai antioksidan namun dimungkinkan ada senyawa fenolik lain yang bukan dalam golongan flavanoid yang terdapat pada ekstrak etanol yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Menurut Pratt dan

Hudson (1990) serta Shahidi dan Naczk (1995), senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, komarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional.

Sebaliknya ada beberapa jenis kandungan isoflavon yang relatif tinggi namun aktivitas antioksidannya rendah. Hal ini dimungkinkan karena aktivitas antioksidan pada isoflavon memang rendah. Rendahnya kemampuan isoflavon sebagai antioksidan ini dimungkinkan pada waktu ekstraksi telah terjadi oksidasi, karena isoflavon merupakan senyawa yang sangat reaktif.

Kedudukan isolat tempe koro pedang sebagai antioksidan dibandingkan beberapa antioksidan yang sudah ada yaitu α -tokoferol, β -karoten dan vitamin C sebagai antioksidan alami maupun BHT yang merupakan antioksidan sintetis ditampilkan dalam gambar 4.5.



Gambar 4.5. Perbandingan Aktivitas Antioksidan (%) Antara Tempe Koro Pedang dengan Senyawa Antioksidan Lain.

Dari Gambar 4.5, dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tempe koro pedang utuh tidak berbeda nyata dengan α -tokoferol, β -karoten dan vitamin C tetapi lebih rendah dari BHT. Pada koro pedang rajang juga memiliki aktivitas

antioksidan yang lebih tinggi daripada β -karoten tetapi lebih kecil dibanding dengan yang lainnya. Dari Gambar 4.5 juga diketahui bahwa aktivitas antioksidan koro pedang utuh dan rajang lebih rendah dari BHT akan tetapi mengingat efek samping BHT tempe koro pedang memiliki potensi untuk digunakan sebagai antioksidan alami. Menurut Chang *et al.* (1977) dan Barbut *et al.* (1985) dalam Suryo dan Tohari (1995), penggunaan zat antioksidan sintetik tertentu misalnya BHT dapat menimbulkan akibat buruk terhadap kesehatan konsumen seperti gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan. Dari hasil tersebut, maka ekstrak tempe koro pedang sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami. Berikut adalah tabel perbandingan aktivitas antioksidan (%) dengan berbagai sampel :

Tabel 4.4. Perbandingan aktivitas antioksidan (%) tempe koro pedang utuh dan rajang serta sumber lain

Sampel	Aktivitas Antioksidan (%)
Tempe Kedelai Kuning fermentasi 3 hari	81.43 ^d
Tempe Koro Pedang Rajang fermentasi 3 hari	68.63 ^b
Tempe Koro Pedang Utuh fermentasi 3 hari	77.32 ^c
α -tokoferol	76.41 ^c
β -karoten	43.25 ^a
BHT	81.16 ^d
Vitamin C	75.62 ^c

*) *superscrib yang berbeda menunjukkan terdapat adanya perbedaan yang signifikan.*

Dari Tabel 4.4 dapat diketahui aktivitas antioksidan tempe koro pedang utuh dan rajang bila dibandingkan dengan sumber lain dimana yang ditandai dengan huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=5\%$. Berdasarkan Tabel 4.4 diketahui aktivitas antioksidan pada tempe kedelai tidak berbeda nyata dengan BHT yaitu pada kisaran 81%, dan tempe koro pedang utuh tidak berbeda nyata dengan vitamin C dan α -tokoferol yaitu

antara 75%-77%. Untuk aktivitas antioksidan tempe koro pedang rajang lebih kecil berbeda nyata yaitu 69%, dan terendah β -karoten yaitu 43%. Berdasarkan Tabel 4.4 dapat disimpulkan bahwa koro pedang dan produk tempenya berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami dibandingkan dengan kedelai dan beberapa produk antioksidan alami lainnya seperti α -tokoferol, β -karoten, dan vitamin C dan BHT.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Kandungan total isoflavon tertinggi untuk tempe koro pedang utuh dan rajang adalah pada fermentasi 1 hari, sedang pada tempe kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari. Pada tempe koro pedang utuh kandungan isoflavon total tertinggi adalah 0.786% yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.009%, daidzein 0.228%, glisitein 0.079%, dan genistein 0.469%. Pada tempe koro pedang rajang kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.590% yang terdiri dari kandungan isoflavon daidzein 0.226%, glisitein 0.077%, genistein 0.287%. Kandungan total isoflavon tertinggi pada tempe kedelai adalah 1.812% yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.064%, daidzein 0.586%, glisitein 0.306% dan genistein 0.856%.
2. Aktivitas antioksidan yang tertinggi untuk koro pedang utuh, koro pedang rajang dan kedelai adalah pada fermentasi 3 hari yaitu masing-masing 77.32% , 68.63%, dan 81.43%.
3. Koro pedang serta produk tempenya berpotensi dalam upaya pemanfaatan sebagai antioksidan alami walaupun kandungan isoflavonnya lebih kecil bila dibandingkan dengan kedelai dan produk tempenya, namun aktivitas antioksidannya lebih tinggi bila dibandingkan dengan β -karoten dan tidak berbeda nyata dengan vitamin C dan α -tokoferol.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, penulis memberikan saran bahwa:

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengurangi senyawa HCN dalam biji koro pedang selain dengan perlakuan secara fisik.
2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang aktivitas fisiologis senyawa isoflavon pada tempe koro pedang.



DAFTAR PUSTAKA

- Amrun, H. M, Umiyah, dan E. U. Umayah 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Ekstrak Metanol Beberapa Varian Buah Kenitu (*Chrysopylum cainito* L.) dari Daerah Jember . *Berkala Penelitian Hayati* 13. Jurusan Biologi Universitas Jember.
- Anderson J.W., V.A. Diwadkar, and S.R. Bridges. 1998. Selective Effect Of Different Antioxidants on Oxidation of Lipoprotein from rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218: 376 – 381.
- Ardiansyah. 2007. *Antioksidan dan Peranannya Bagi Kesehatan*.
www.chapterislamicospace.wordpress.com [24 Mei 2009].
- Ariani, S.R.D. 1997. *Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung Faktor-2 sebagai Alternatif Pengembangan Hasil Olahan Pangan dari Tahu*. Tesis Magister Kimia ITB. Bandung.
- Ariani, S.R.D 2001. *Identifikasi Senyawa Faktor-2 (Suatu Senyawa Isoflavon) dari Tempe Selama Proses Fermentasi Hari ke-0,1,2,3,4, dan 5*, Paedagogia, Jilid 4 No.1, 2001.
- Ariani, S.R.D. 2003. Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung Senyawa Faktor-2 Hasil Biokonversi Isoflavon Pada Tahu Oleh *Rhizopus oligosporus* (L.41), *BioSMART* 5(1) : 8 – 12.
- Ariani, S.R.D. dan Hastuti, W. 2009. Analisis Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Tempe dengan Variasi Lama Waktu Fermentasi dan Metode Ekstraksi. *Prosiding Kimia Organik, Bahan Alam, dan Biokimia*. FKIP UNS Surakarta.

- Astuti, Mary. 1995. *Tempe dan Antioksidan Prospek Pencegahan Penyakit Degenaratif*. Yayasan Tempe Indonesia.
- Astawan, M. 2003. *Menguak Manfaat Tempe*. IPB. Bogor.
- Aussenac, T. Lacombe, S. and Dayde, J. 1988. Quantification of Isoflavones by Capillary Zone Electrophoresis in Soybean Seeds : Effect of Variety and Environment. *Am. J. Clin. Nurt.* 68 (suppl) : 1480s – 1485s.
- Barz, W. Ang G.B. Papendorf. 1991. *Metabolism of isoflavones and formation of factor-2 by tempeh producing microorganism*. Tempeh Workshop, Cologne. 20 May 1991.
- Barz, W., Heskamp, Klus, K., Rehms, H. and Steinkamp, R. 1993. *Recent Aspect of Protein, Phytate and Isoflavone Metabolism by Microorganisms Isolated from Tempe-Fermentation*. Tempo Workshop, Jakarta, 15 February.
- Buck, D.F. 1991. *Antioxidants*. Didalam: J. Smith, editor. Food Additive User's Campbell, 2004. *Biologi*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Chang, S.S., Bostric-Matijasevic, O.A.L.Hsieh, dan C.L.Huang. 1977. Natural Antioxidants from Rosemary and Sage. *J. Food.Sci.* 42:574.
- Coppen, P.P 1983. *The use of antioxidant*. Di dalam: J.C. Allen dan R.J Hamilton, editor. Rancidity in Foods. Applied Science Publishers, London.
- Coward, L., Barnes, N., Setchell, K.D.R., Barnes, S. 1993. Genestein and Deidzein and their β Gliciside Conjugates anti-Tumor Isoflavones in Soybeans Foods from American and asian Diets. *J. Agric. Food. Chem.* 41: 1961-1967.

- Delatorre.P. 2008. *Structure of a lectin from Canavalia gladiata seeds: new structural insights for old molecules.* ¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brazil.
- Ekanayake, S. 2006. *Canavanine Content in SwordBeans (Canavalia gladiata): Analysis and Effect of Processing.* Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Nugegoda, Sri Lanka.
- Fujimaki. 1968. *Fundamental Investigation of Proteolytic Enzim Application to Soybean Protein inrelation Flavour.* Tokyo University. Tokyo. Hal 343.
- Gyorgy, P., K. Murata, and H. Ikehata. 1964. *Antioksidants isolated from fermented soybeans tempeh.* *Nature.* 203: 872-875.
- Handajani,S dan Atmaka, W. 1993. *Analisa sifat Phisis-Khemis Beberapa Biji Kacang-Kacangan, kekerasan, Kualitas Tanak, Protein, dan Kandungan Mineralnya.* Lembaga Penelitian Universitas Sebelas maret Surakarta.
- Handajani S., Supriyono, Triharyanto E. Marwanti. S, Astuti D. W, dan Pujiasmanto B. 1996. *Pengembangan Budidaya dan Pengolahan Hasil Kacang-Kacangan Sebagai Usaha Produktif Wanita di Lahan Kering Daerah Tangkapan Hujan Waduk Kedung Ombo.* Lembaga Penelitian Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Harbone, J.B. 1996. *The Flavonoid : Advances in Research Since 1986.* Chapman & Hall, Inc. London.
- Hesseltine, C.W. 1985. *Genus Rhizopus and Tempeh Microorganism.* Asian Symposium Non-Salted Soybean Fermentation. Tsukuba. Japan.
- Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid 3. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Departemen Kehutanan, penerjemah;*

Jakarta: Yayasan sarana Wana Jaya. Terjemahan dari: De Nuttige Planten Van Indonesia.

http://en.wikipedia.org/wiki/Canavalia_ensiformis. [25 Mei 2009]

Hugson, E and P.E. Levi.2000. *A Textbook of Modern Toxicology*. Elsevier. New York.

Imam Suryo dan Imam Tohari. 1995. Aktivitas Antioksidan Buah Jambu Mete dan Penerapannya pada Abon. *Biosains*. 1(7) : 50-61.

Jha, H.C. 1985. *Novel Isoflavonoids and It's Derivates, New Antioxydant Derived from Fermented Soybean (Tempeh)*. Asian Symposium Non-salted Soybean Fermentation. Tsukaba, Japan, July 14-16, 1985.

Kanetro, B. dan Hastuti S. 2006. *Ragam Produk Olahan Kacang-Kacangan*. Universitas Wagsa Manggala Press. Yogyakarta.

Kasmidjo, R.B. 1990. *Tempe: Mikrobiologi dan Biokimia, Pengolahan Serta Pemanfaatannya*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. UGM Yogyakarta.

Kochar, S.P. and Rossell. 1990. *Detection Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food System*. Di dalam : B.J.F. Hudson, editor. Food Antioxidants. Elvisier Applied Science. London

Koswara, S. 2006. *Isoflavon Senyawa Multi-Manfaat Dalam Kedelai*. Ebookpangan.com, Bogor

Kudou, S., Y. Fleury, D.Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura and K. Okubo. 1991. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seed (*Glycine max Merrill*). *Agric. Biol. Chem.* 55: 2227 – 2233.

Manitto, P. 1981. *Biosintesis Produk Alami*. Terjemahan P.G. Sammes. New York : Erris Horwood Limited.

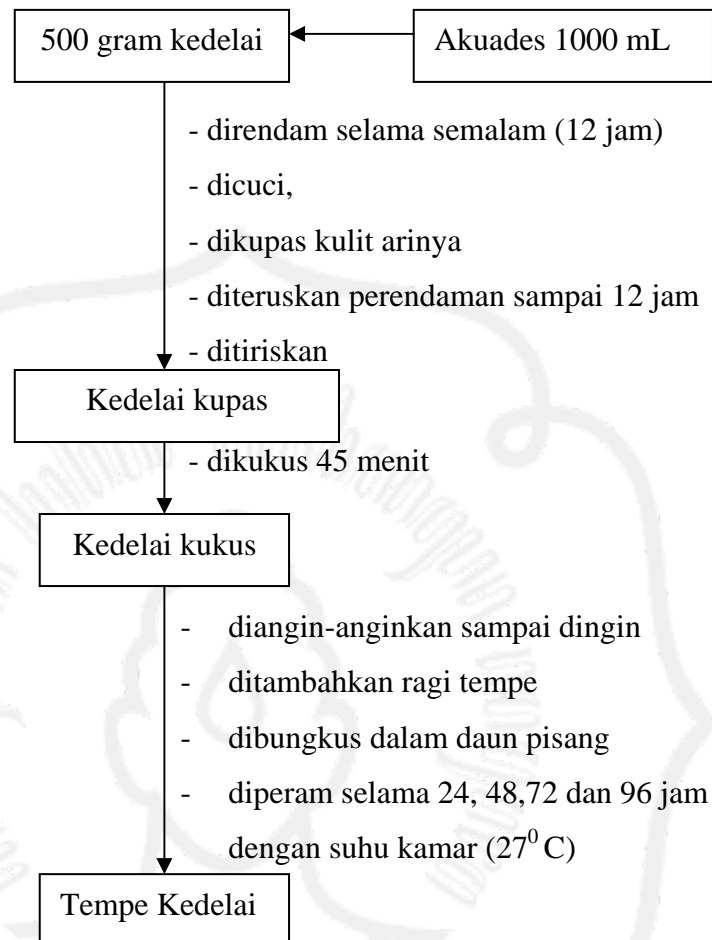
- Markham. 1988. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- Mazur, W.M., J.A. Duke, K. Wahata, S. Rasku, and H. Adlercreutz. 1998. Isoflavonoids and Lignans in Legume : Nutritional and Health Aspects in Humans. *J Nutr Biochem* 9. 193-200.
- Meyri Sulasmi. 2003. *Aktivitas Antioksidatif Ekstrak Tempe Hasil Fermentasi Rhizopus oryzae. Terhadap Oksidasi Minyak Kedelai*. Skripsi FMIPA UNS Surakarta.
- Murata, K., 1985. *Formation of antioxidant and nutrient in tempe*. Asian Symposium on Non-salted Soybean Fermentation, Tsukuba, Japan, July 14-16, 1985.
- Nara, E.X., M. Kushiro, H. Zhang, T. Sugawara, N. Miyashita, and A. Nagao. 2001. Carotenoids Effect Proliferation of Human Prostate Cancer Cells Research Communications. *J.Nuts* 131 : 3303-3306.
- Naim, M. 1973. A new isoflavone from soybeans. *Phytochemistry* 12: 169-171.
- Padmawinata, K, 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavanoid*, ITB Press. Bandung.
- Pawiroharsono, S. 1995. Metabolisma Isoflavon dan Faktor-II Pada Proses Pembuatan Tempe. *Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe Dalam Industri Pangan Modern*. UGM Yogyakarta.
- Pawiroharsono, S. 1996. *Aspek Mikrobiologi Tempe*. Bunga Rampai Tempe Indonesia. Jakarta : Yayasan Tempe Indonesia.
- Pawiroharsono, S. 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.

- Pradana, S. 2008. *Prospek dan Manfaat Isoflavon sebagai Fitoestrogen Bagi Kesehatan*. <http://one.indoskripsi.com/judul-skripsi-tugas-makalah/biologi-umum/prospek-dan-manfaat-isoflavon-sebagai-fitoestrogen-bagi-kesehatan>. [20 April 2009]
- Prakash A. 2001. *Antioxidant Activity*. Medallion Laboratories Analytical Progress. 19(2).
- Pratt, D.E and B.J. Hudson. 1985. Natural antioxidants not exploited commercially. *Antioxidants* : 1971-1989.
- Pratt, D.E. and B.J.F. Hudson. 1990. *Natural Antioxidants not Exploited Commercially*. Di dalam : B.J.F. Hudson, editor. Food Antioxidants. Elvisier Applied Science. London
- Pramita D.S, 2008. *Pengaruh Teknik Pemanasan Terhadap Kadar Asam Fitat dan Aktivitas Antioksidan Koro Benguk (Mucuna pruriens), Koro Glinding (Phaseolus lunatus) dan Koro Pedang (Canavalia ensiformis)*. Skripsi. Surakarta : Jurusan Teknologi Hasil Pertanian FP UNS.
- Pratt, D.E. 1992. *Natural Antioxidants From Plant Material*. Di dalam : M.T. Huang, C.T. Ho, dan C.Y. Lee, editor. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health H. American Society, Washington DC.
- Restuhadi, F. 2001. *Studi Pendahuluan Biokonversi Isoflavon pada Proses Fermentasi Kedelai Menggunakan Rhizopus spp. L.4l*. Tesis Magister Kimia ITB. Bandung.
- Robak, J. and R.J. Gryglewski.1988. Flavonoids are Scavengers of Super Oxide Anions. *Biochemistry and Pharmacology*. 37 : 837-841.
- Rubatzky V.E. and M. Yamaguchi. 1997. *Sayuran Dunia : Prinsip, Produksi dan Gizi Jilid II*. Penerbit ITB Bandung.

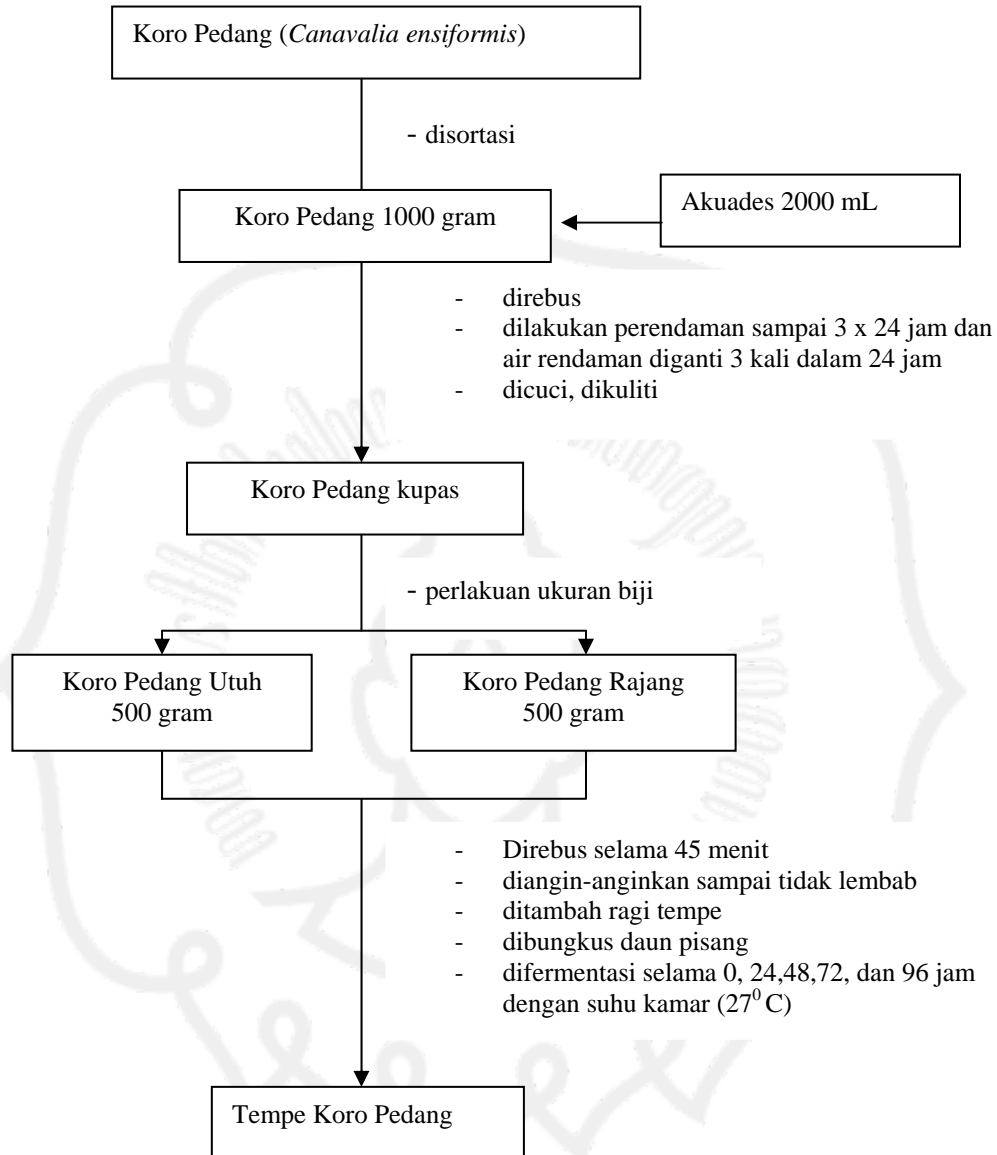
- Ruggiero, R.J., D. Pharm, and E.L. Frances. 2002. Estrogen : Physiology, Pharmacology, and Formulations for Replacement Therapy. *Journal of Midwifery and Women's Health*. 47 (3) : 130-138.
- Samson, R.A., J.A. Van Kooij, and E.S. De Boer. 1987. Microbiological Quality of Commercial Tempeh in Netherlands. *J.Food Protection*. 50(2). 92-94.
- Schultze, J.E., R. Hansel and V.E. Tayler. 1984. *Rational Phitotherapy A Physician's Guide to Herbal Medicine*. 3rd ed. Springer Verlag. Heidelberg.
- Shahidi, F and M. Naczk. 1995. *Food Phenolics*. Technomic Pub. Co. Inc. Lavester-Basel.
- Somaatmojo, S. Ismunadji, M. Sumarno. Syam, Mahyuddin. Manurung, dan S.O. Yuswadi. 1985. *Kedelai*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor. 1985.
- Suharyanto. 2008. Ketahanan Pakan untuk Ketahanan Pangan. <http://unib.ac.id/blog/suharyanto/2008/03/13/ketahanan-pakan-untuk-ketahanan-pangan/>. [20 Mei 2009]
- Susanto T, E. Zubaidah , dan S. B. Wijanarko. 1998. Studi tentang aktivitas antioksidan pada tempe terhadap lama fermentasi jenis pelarut dan ketahanan terhadap proses pemanasan. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi*. Yogyakarta 15 Desember 1998.
- Sutardi and Buckle, K.A. 1985. Phytic Acid Changes in Soybeans Fermented by Traditional Inoculum and Six Strain of *Rhizopus oligosporus*. *J.Applied Bacterial* 53 (6). 539-543.

- Trilaksani W. 2008. *Antioksidan : Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan*. <http://www.rudyct.com/PPS702-ipb/06223/wini-trilaksani.htm> [12 Maret 2009]
- Tsukamoto C, Shimada S Igita K, Kudou S, Kokubun M, Okubo K, and Kitamura K. 1995. *Factors Effecting Isoflavones Content in Soybean Seeds : Changes in Isoflavones, Saponins, and Compositon of Fatty Acids at Different Temperatures During Seed Development*. 43 : 1184 – 1192.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/oligosporus.html [1 Februari 2010]
- Zilleken, F., 1986. *First draft meeting on biotechnology*. BPP Teknologi, 11 Maret 1986, Jakarta.

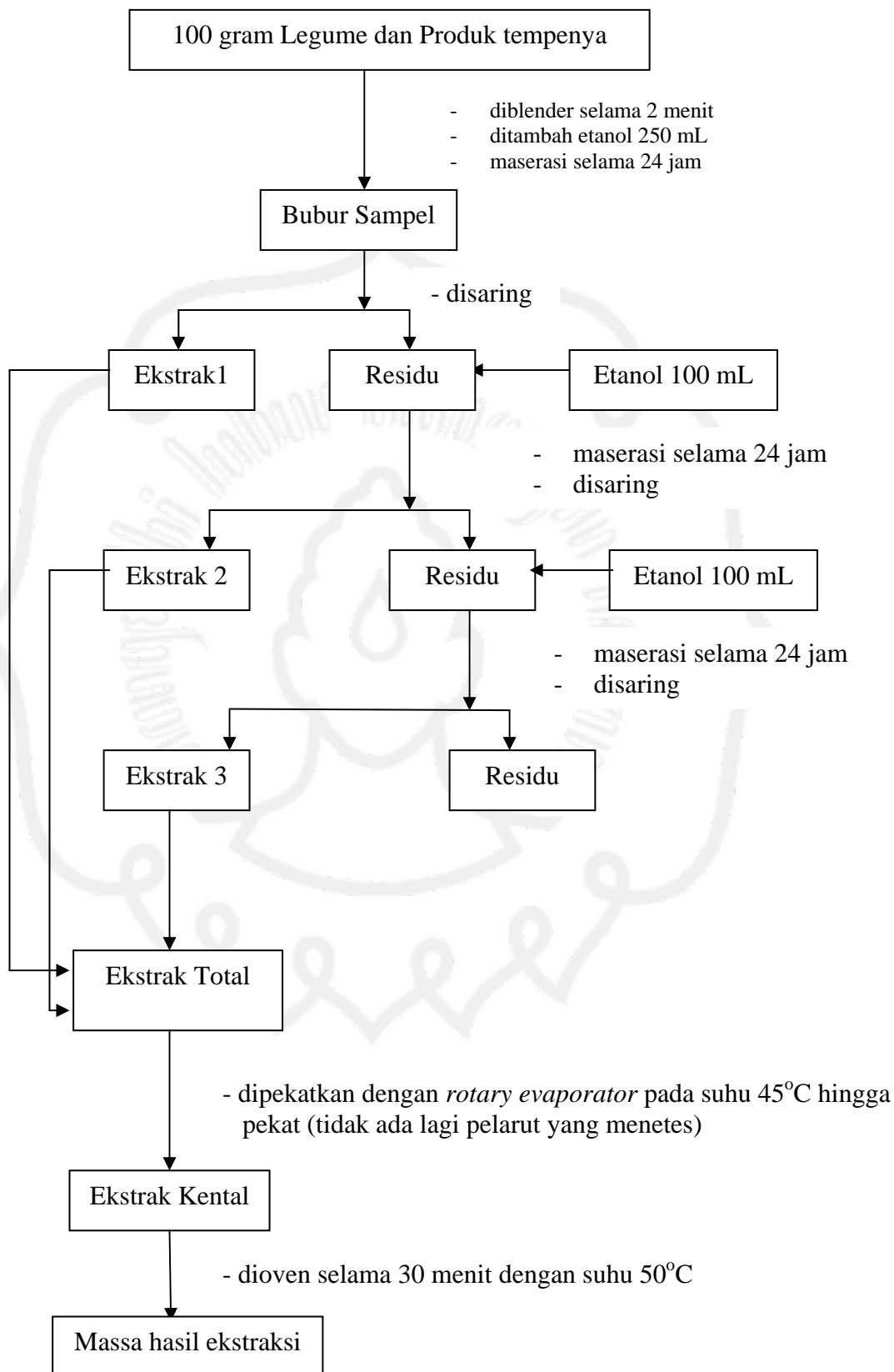
Lampiran1. Bagan Mekanisme Kerja Pembuatan Tempe Kedelai Kuning Madura



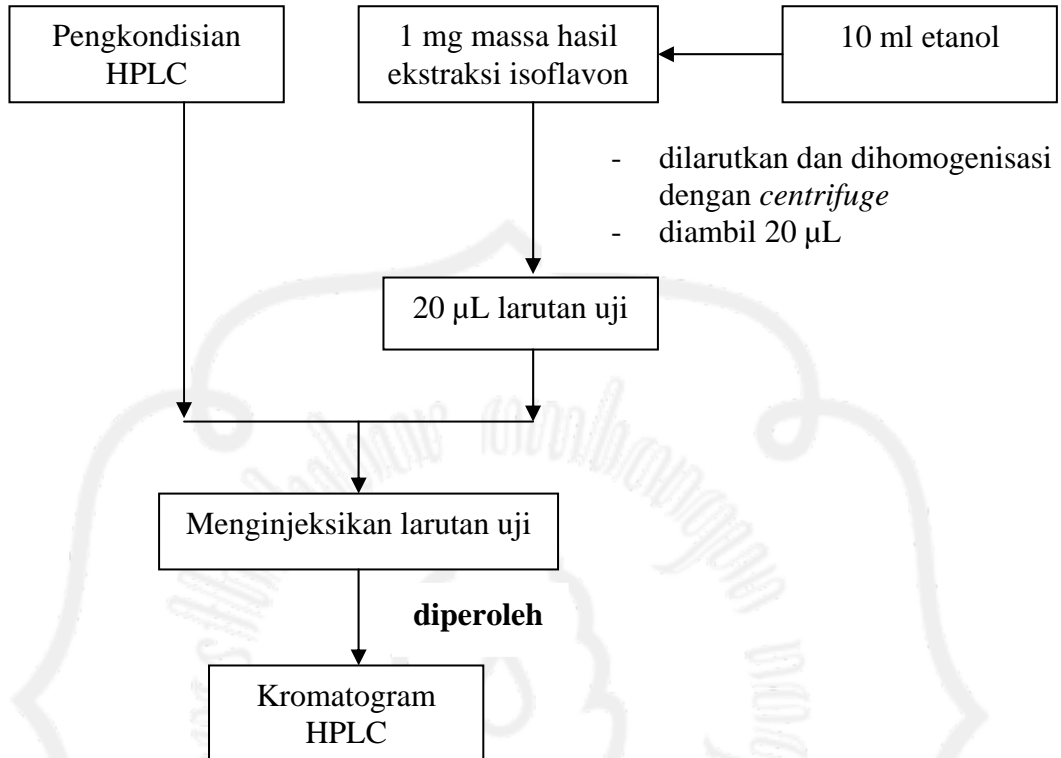
Lampiran 2. Bagan Mekanisme Kerja Pembuatan Tempe Koro Pedang Utuh dan Rajang



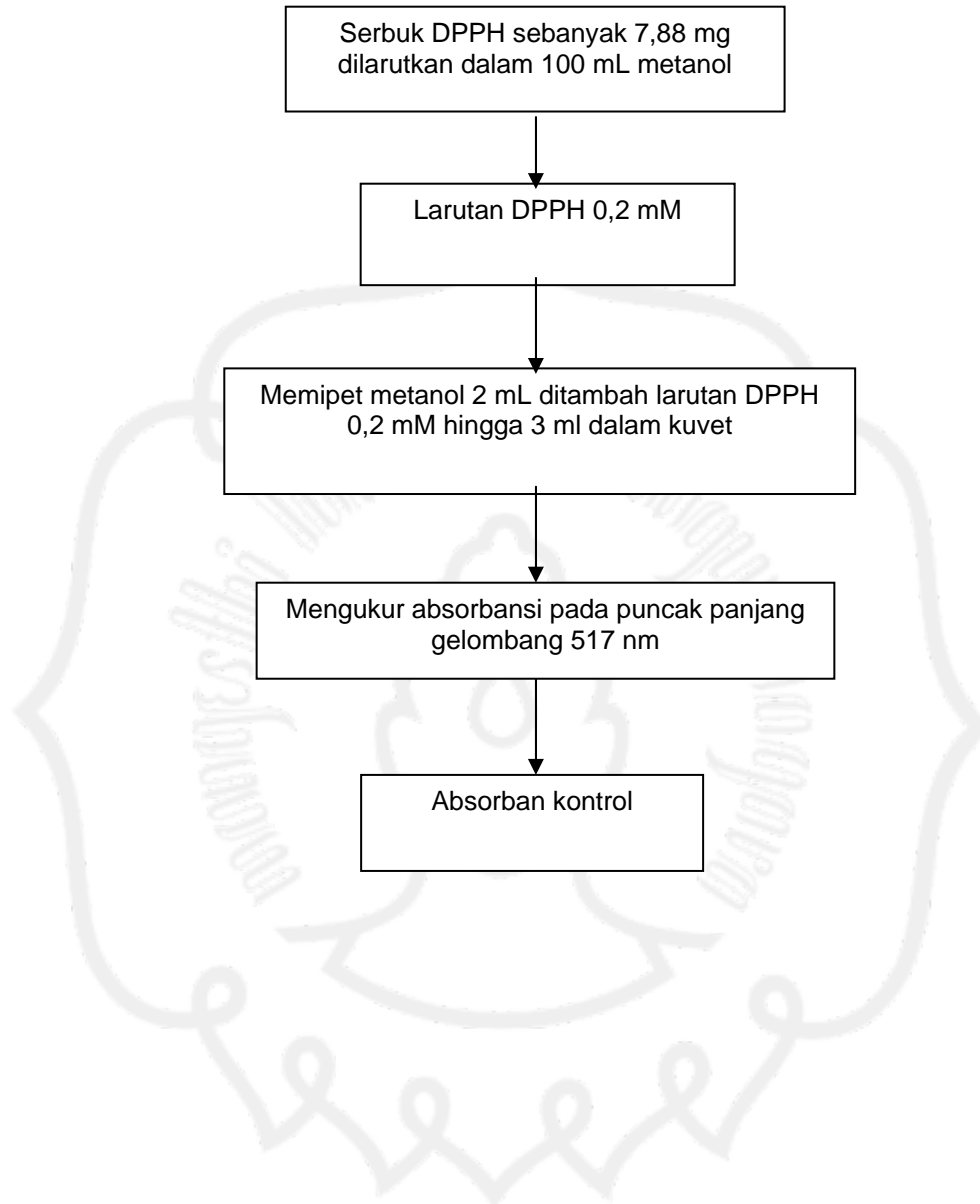
Lampiran 3. Bagan Mekanisme Ekstraksi Isoflavon dengan Metode Maserasi



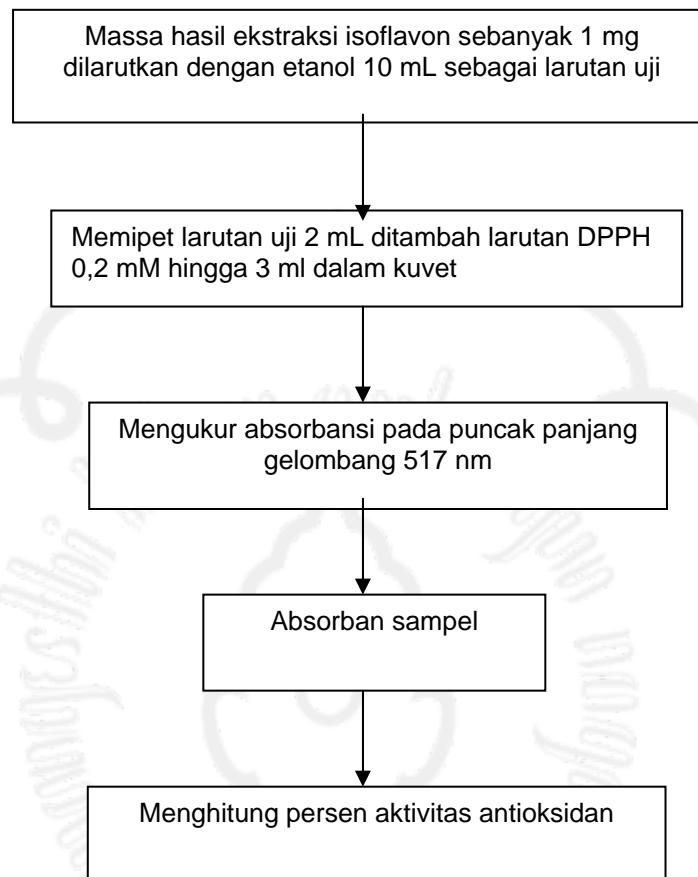
Lampiran 4. Bagan Mekanisme Identifikasi Isoflavon dengan Metode HPLC



Lampiran 5. Bagan Mekanisme Pembuatan Larutan DPPH



Lampiran 6. Bagan Mekanisme Pembuatan Larutan Sampel dan Uji Aktivitas Antioksidannya



- Sebagai pembanding menggunakan :
- BHT (Butyl Hidroksil Toluena)
 - betakaroten
 - alfatokoferol
 - vitamin C

Lampiran 7. Tabel Karakteristik Kedelai Madura dan Produk Tempenya

Sampel	Foto	Warna	Aroma	Kenampakan	Tahapan Kerja
Biji kedelai mentah		Kuning muda	Khas kedelai	Berbentuk biji, keras	Disortir dipilih biji yang baik dan tidak rusak
Tempe kedelai hasil fermentasi hari ke-0		Kuning muda	Khas kedelai	Berbentuk biji kedelai, lunak, dengan serbuk inokulum di permukaannya	Merupakan biji kedelai yang telah mengalami proses perendaman sampai pengukusan dan penambahan inokulum, namun tidak difermentasikan lebih lanjut.
Tempe kedelai hasil fermentasi hari ke-1		Kuning muda	Khas tempe kedelai	Miselium jamur mulai tumbuh, namun belum merata di permukaan.	Tempe diiris tidak pecah
Tempe kedelai hasil fermentasi hari ke-2		Putih	Khas tempe kedelai	Miselium jamur berwarna putih, tumbuh merata dan kompak.	Tempe diiris tidak pecah
Tempe kedelai hasil fermentasi hari ke-3		Putih	Khas tempe kedelai	Miselium jamur berwarna putih nsmun beberapa bagian mulai menguning, tumbuh merata dan kompak.	Tempe diiris tidak pecah
Tempe kedelai hasil fermentasi hari ke-4		Putih kekuningan	Sedikit berbau amoniak	Miselium jamur menguning, tumbuh merata, mulai menyusut.	Tempe diiris tidak pecah

Lampiran 8. Tabel Karakteristik Biji Koro Pedang dan Produk Tempe Koro Pedang Utuh

Waktu Fermentasi (Hari)	Foto	Warna	Aroma	Penampilan	Keterangan
Biji koro pedang mentah		Putih	Khas koro Pedang	Berbentuk biji, keras	Disortasi biji baik dan utuh yang dipilih
Tempe Koro pedang hasil fermentasi hari ke-0		Putih	Khas koro Pedang	Berbentuk biji koro pedang utuh, lunak, dengan serbuk inokulum di permukaannya	Merupakan biji koro pedang utuh yang telah mengalami proses perendaman sampai pengukusan dan penambahan inokulum, namun tidak difermentasikan lebih lanjut.
Tempe koro pedang utuh hasil fermentasi hari ke-1		Putih	Khas tempe koro Pedang	Miselium jamur mulai tumbuh, namun belum merata di permukaan.	Tempe diiris pecah
Tempe koro pedang utuh hasil fermentasi hari ke-2		Putih	Khas tempe koro Pedang utuh	Miselium jamur berwarna putih, tumbuh merata dan kompak.	Tempe diiris tidak pecah
Tempe koro pedang utuh hasil fermentasi hari ke-3		Putih	Khas tempe koro Pedang utuh	Miselium jamur berwarna putih namun beberapa bagian mulai menguning, tumbuh merata dan kompak.	Tempe diiris tidak pecah
Tempe koro pedang utuh hasil fermentasi hari ke-4		Putih kekuningan	Sedikit berbau amoniak	Miselium jamur menguning, tumbuh merata, mulai menyusut.	Tempe diiris tidak pecah

Lampiran 9. Tabel Karakteristik Biji Koro Pedang dan Produk Tempe Koro Pedang Rajang

Waktu Fermentasi (Hari)	Foto	Warna	Aroma	Penampilan	Keterangan
Biji koro Pedang mentah		Putih	Khas koro Pedang	Berbentuk biji, keras	Disortasi biji baik dan utuh yang dipilih
Tempe Koro Pedang hasil fermentasi hari ke-0		Putih	Khas koro Pedang	Berbentuk biji koro Pedang rajang, lunak, dengan serbuk inokulum di permukaannya	Merupakan biji koro Pedang rajang yang telah mengalami proses perendaman sampai pengukusan dan penambahan inokulum, namun tidak difermentasikan lebih lanjut.
Tempe koro Pedang rajang hasil fermentasi hari ke-1		Putih	Khas tempe koro Pedang	Miselium jamur mulai tumbuh, namun belum merata di permukaan.	Tempe diiris pecah
Tempe koro Pedang rajang hasil fermentasi hari ke-2		Putih	Khas tempe koro Pedang utuh	Miselium jamur berwarna putih, tumbuh merata dan kompak.	Tempe diiris tidak pecah
Tempe koro Pedang rajang hasil fermentasi hari ke-3		Putih	Khas tempe koro Pedang utuh	Miselium jamur berwarna putih namun beberapa bagian mulai menguning, tumbuh merata dan kompak.	Tempe diiris tidak pecah
Tempe koro Pedang rajang hasil fermentasi hari ke-4		Putih kekuningan	Sedikit berbau amoniak	Miselium jamur menguning, tumbuh merata, mulai menyusut.	Tempe diiris tidak pecah

Lampiran 10. Tabel Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kedelai Kuning

Sampel	Keterangan	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Rata-rata
Kedelai Kuning Mentah	Larutan Kontrol	0.339	0.339	0.339	0.339
	Larutan sampel	0.107	0.108	0.116	0.110
	Aktivitas Antioksidan (%)	68.43	68.14	65.78	67.45
Kedelai Kuning Fermentasi 0 Hari	Larutan Kontrol	0.270	0.270	0.270	0.270
	Larutan sampel	0.065	0.066	0.063	0.065
	Aktivitas Antioksidan (%)	75.93	75.56	76.67	76.05
Kedelai Kuning Fermentasi 1 Hari	Larutan Kontrol	0.325	0.325	0.325	0.325
	Larutan sampel	0.078	0.076	0.077	0.077
	Aktivitas Antioksidan (%)	76.00	76.62	76.31	76.31
Kedelai Kuning Fermentasi 2 Hari	Larutan Kontrol	0.252	0.252	0.252	0.252
	Larutan sampel	0.061	0.060	0.060	0.060
	Aktivitas Antioksidan (%)	75.79	76.19	76.19	76.06
Kedelai Kuning Fermentasi 3 Hari	Larutan Kontrol	0.298	0.298	0.298	0.298
	Larutan sampel	0.056	0.055	0.055	0.055
	Aktivitas Antioksidan (%)	81.21	81.54	81.54	81.32
Kedelai Kuning Fermentasi 4 Hari	Larutan Kontrol	0.245	0.245	0.245	0.245
	Larutan sampel	0.056	0.056	0.056	0.056
	Aktivitas Antioksidan (%)	77.14	77.14	77.14	77.14

Lampiran 11. Tabel Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Koro Pedang Utuh

Sampel	Keterangan	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Rata-rata
Koro Pedang Mentah	Larutan Kontrol	0.534	0.534	0.534	0.534
	Larutan sampel	0.290	0.298	0.259	0.282
	Aktivitas Antioksidan (%)	45.69	44.19	51.50	47.13
Koro Pedang Utuh Fermentasi 0 Hari	Larutan Kontrol	1.077	1.077	1.077	1.077
	Larutan sampel	0.428	0.429	0.428	0.428
	Aktivitas Antioksidan (%)	60.26	60.69	60.26	60.37
Koro Pedang Utuh Fermentasi 1 Hari	Larutan Kontrol	0.521	0.521	0.521	0.521
	Larutan sampel	0.254	0.252	0.251	0.252
	Aktivitas Antioksidan (%)	51.25	51.63	51.82	51.57
Koro Pedang Utuh Fermentasi 2 Hari	Larutan Kontrol	0.513	0.513	0.513	0.513
	Larutan sampel	0.237	0.239	0.238	0.238
	Aktivitas Antioksidan (%)	53.80	53.41	53.61	53.61
Koro Pedang Utuh Fermentasi 3 Hari	Larutan Kontrol	0.535	0.535	0.535	0.535
	Larutan sampel	0.121	0.121	0.122	0.121
	Aktivitas Antioksidan (%)	77.38	77.38	77.20	77.32
Koro Pedang Utuh Fermentasi 4 Hari	Larutan Kontrol	0.567	0.567	0.567	0.567
	Larutan sampel	0.257	0.292	0.331	0.293
	Aktivitas Antioksidan (%)	54.67	48.50	41.62	48.26

Lampiran 12. Tabel Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Koro Pedang Rajang

Sampel	Keterangan	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Rata-rata
Koro Pedang Mentah	Larutan Kontrol	0.534	0.534	0.534	0.534
	Larutan sampel	0.290	0.298	0.259	0.282
	Aktivitas Antioksidan (%)	45.69	44.19	51.50	47.13
Koro Pedang Rajang Fermentasi 0 Hari	Larutan Kontrol	1.077	1.077	1.077	1.077
	Larutan sampel	0.428	0.429	0.428	0.428
	Aktivitas Antioksidan (%)	60.26	60.69	60.26	60.37
Koro Pedang Rajang Fermentasi 1 Hari	Larutan Kontrol	0.225	0.225	0.225	0.225
	Larutan sampel	0.173	0.174	0.174	0.174
	Aktivitas Antioksidan (%)	32.16	31.77	31.77	31.90
Koro Pedang Rajang Fermentasi 2 Hari	Larutan Kontrol	0.306	0.306	0.306	0.306
	Larutan sampel	0.175	0.176	0.184	0.178
	Aktivitas Antioksidan (%)	42.81	42.48	39.87	41.72
Koro Pedang Rajang Fermentasi 3 Hari	Larutan Kontrol	0.323	0.323	0.323	0.323
	Larutan sampel	0.097	0.095	0.112	0.101
	Aktivitas Antioksidan (%)	69.96	70.59	65.33	68.63
Koro Pedang Rajang Fermentasi 4 Hari	Larutan Kontrol	0.367	0.367	0.367	0.367
	Larutan sampel	0.133	0.123	0.130	0.129
	Aktivitas Antioksidan (%)	63.76	66.49	64.58	64.94

Lampiran 13. Analisa Data Statistik Menggunakan *General Linear Model – Univariate*.

Univariate Analysis of Variance
Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Sampel	1	3
	2	3
	3	3
	4	3
	5	3
	6	3
	7	3
	8	3
	9	3
	10	3
	11	3
	12	3
	13	3
	14	3
	15	3
	16	3
	17	3
	18	3

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: akt.Antioksidan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10591.699(a)	17	623.041	89.652	.000
Intercept	201627.557	1	201627.557	29013.053	.000
Sampel	10591.699	17	623.041	89.652	.000
Error	250.184	36	6.950		
Total	212469.441	54			
Corrected Total	10841.883	53			

a. R Squared = .977 (Adjusted R Squared = .966)

Post Hoc Tests Sampel Homogeneous Subsets

akt.Antioksidan

Duncan ^{a,b}

Sampel	N	Subset												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
KPR 1 hari	3	31.9000												
KPR 2 hari	3		41.7200											
KPR mentah	3			47.1267										
KPU mentah	3			47.1267										
KPU 4 hari	3			48.2633										
KPU 1 hari	3			51.5667	51.5667									
KPU 2 hari	3				53.6067									
KPR 0 hari	3					60.4033								
KPU 0 hari	3					60.4033								
KPR 4 hari	3					61.6100								
KKM mentah	3						67.4500							
KPR 3 hari	3						68.6267	68.6267						
KKM 1 hari	3							72.0833	72.0833					
KKM 2 hari	3								76.0567	76.0567				
KKM 0 hari	3								76.0600	76.0600				
KKM 4 hari	3										77.1400	77.1400		
KPU 3 hari	3										77.3200	77.3200		
KKM 3 hari	3												81.4300	
Sig.		1.000	1.000	.066	.350	.602	.588	.117	.088	.599	.066			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 6.950.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

Keterangan :

- KKM : Kedelai Kuning Madura
- KPR : Koro Pedang Rajang
- KPU : Koro Pedang Utuh

Lampiran 14. Analisa Data Statistik Menggunakan *Compare Means – One Way Anova*.

Oneway

Descriptives

BBS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kedelai kuning madura	3	81.4300	.19053	.11000	80.9567	81.9033	81.21	81.54
koro pedang rajang	3	68.6267	2.87232	1.65834	61.4914	75.7619	65.33	70.59
koro rajang utuh	3	77.3200	.10392	.06000	77.0618	77.5782	77.20	77.38
alfatokoferol	3	76.4100	.15588	.09000	76.0228	76.7972	76.23	76.50
betakaroten	3	43.2533	.27502	.15878	42.5702	43.9365	42.98	43.53
BHT	3	81.1567	.15011	.08667	80.7838	81.5296	81.07	81.33
vitamin C	3	75.6200	.32909	.19000	74.8025	76.4375	75.43	76.00
Total	21	71.9738	12.71056	2.77367	66.1880	77.7596	42.98	81.54

Test of Homogeneity of Variances

BBS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
12.021	6	14	.000

ANOVA

BBS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3214.109	6	535.685	439.699	.000
Within Groups	17.056	14	1.218		
Total	3231.165	20			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

BBS

Duncan

Sampel	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
betakaroten	3	43.2533			
koro pedang rajang	3		68.6267		
vitamin C	3			75.6200	
alfatokoferol	3			76.4100	
koro rajang utuh	3			77.3200	
BHT	3				81.1567
kedelai kuning madura	3				81.4300
Sig.		1.000	1.000	.094	.766

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Biodata Mahasiswa

- a. Nama : Yurina Istiani
b. Tempat, tanggal lahir : Surakarta, 12-05-1981
c. Jenis kelamin : Perempuan
d. Agama : Islam
e. Status pernikahan : Menikah
f. Alamat rumah : Perum Ngasem Indah Blok K No. 25 Colomadu
g. Telp : 081329356104
h. Alamat email : soon_yurie@yahoo.co.id
i. Riwayat pendidikan :

Tingkat Pendidikan	Nama	Tahun Mulai	Tahun Selesai
SD	SD Muhammadiyah I Ska	1988	1994
SLTP	SMP MTA Gemolong Sragen	1994	1997
SLTA	SMA MTA Ska	1997	2000
PT	UPN "Veteran" Yogyakarta	2000	2005

- j. Daftar Karya ilmiah :

Judul	Penerbit	Tahun
Perangkat Lunak Program Aplikasi Ilustrasi dan Kinerja Algoritma Sorting Sebagai Alat Bantu Pembelajaran	Skripsi	2005

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini, ketua Tim Peneliti dari Proyek Penelitian berjudul : **"Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Aneka Legume Famili *Fabaceae*"**, yang didanai melalui program penelitian pra kerjasama dengan PT.Nutrindo sebesar Rp.100.000.000.

Nama : Prof. Ir. Sri Handajani, MS., Ph.D.
NIP : 19470729 197612 2 001
Unit kerja : Fakultas Pertanian UNS
Alamat : Jl. Ir Sutami 36 A Surakarta

Dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya bahwa tesis yang berjudul: **" Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*)"** yang disusun oleh :

Nama : Yurina Istiani
NIM : S 900208034
Prodi : Biosains, Pascasarjana UNS
Pembimbing : 1. Prof.Ir. Sri Handajani, MS., Ph.D.
2. Dr. Artini Pangastuti, MS

adalah bagian dari penelitian yang tersebut diatas.

Berkenaan dengan hal itu, maka hak publikasi adalah pada tim peneliti. Demikian pernyataan ini dibuat untuk dijadikan perhatian bagi pihak-pihak yang berkepentingan.

Surakarta, Januari 2010
Ketua Tim Peneliti

(Prof.Ir. Sri Handajani, MS., Ph.D)

Menyetujui/Mengetahui

Ketua Prodi Biosains

Mahasiswa

Dr. Sugiyarto, MSi
NIP: 19670430 1992003 1 002

Yurina Istiani