

Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (*Glycine soja*), koro hitam (*Lablab purpureus*), dan koro kratok (*Phaseolus lunatus*)

Characterization of isoflavone bioactive compounds and antioxidant activity test of ethanol extract of tempe made from *Glycine soja*, *Lablab purpureus*, and *Phaseolus lunatus*

HENY RAHMA SULISTIANI, SRI HANDAYANI, ARTINI PANGASTUTI

Prodi Biosains, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 26 Februari 2014. Revisi disetujui: 7 Mei 2014.

Abstract. Sulistiani HR, Handayani S, Pangastuti A. 2012. Characterization of isoflavone bioactive compounds and antioxidant activity test of ethanol extract of tempe made from *Glycine soja*, *Lablab purpureus*, and *Phaseolus lunatus*. *Biofarmasi* 14: 62-72. The aim of this research was: (i) finding out the content of the isoflavone compounds of daidzein, genistein, glisitein, and factor-2, (ii) conducting the test of antioxidant activity of the tempeh made of black soybean, hyacinth bean, and lima bean with the variations of length of fermentation (0,1,2, 3, 4 day(s)), and (iii) comparing the antioxidant activity of the black soybean, hyacinth bean, and lima bean and their tempeh product with both the ethanol extract of the yellow soybean and its tempeh product and several natural antioxidants (α -tocoferol, β carotene, ascorbic acid) and BHT synthetic antioxidant. The materials used for the research were black soybean, hyacinth bean, and lima bean with the variations of seed measure (whole seed and chopped seed) and length of fermentation (0,1,2, 3, 4 day(s)). 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 calculation of the antioxidant activity used the computer program of SPSS, Version 15. General Model – Univariate and One Way – Anova. The results of the research showed that both the whole black soybean and hyacinth bean genistein, while the whole lima bean contained daidzein. The largest total contents of isoflavone were in the 2-day fermentation of the black soybean, in the 1-day fermentation of the hyacinth bean, in the 3-day fermentation of the lima bean, and in the 2-day fermentation of the yellow soybean. The highest antioxidant activity in the 3-day fermentation of the black soybean, hyacinth bean, lima bean, and yellow soybean; the black soybean highest antioxidant activity compared to other compounds such as β -carotene, α -tocopherol, vitamin C, and BHT synthetic antioxidant. Thus, the black soybean and its tempeh product fermented for three days were potential to be used as a natural antioxidant.

Keywords: Antioxidant, ethanol extract, *Glycine soja*, isoflavone, *Lablab purpureus*, *Phaseolus lunatus*, tempe

PENDAHULUAN

Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesa oleh tanaman. Namun, tidak sebagai layaknya senyawa metabolit sekunder karena senyawa ini tidak disintesis oleh mikroorganisme. 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 Leguminosae, khususnya pada tanaman kedelai (Pradana 2008).

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 (1995), menyatakan bahwa 99% isoflavon glikosida yang terdapat pada biji kedelai, selama proses perendaman (dalam pembuatan tempe) dapat terhidrolisis menjadi isoflavon aglukan dan glukosa. Isoflavon aglukan yang mempunyai

aktivitas fisiologis tinggi tersebut adalah genistein, daidzein, dan glisitein, selanjutnya pada proses fermentasi kedelai rendam dengan kapang *Rhizopus oligosporus*, daidzein dapat mengalami proses hidrosilasi sehingga menjadi senyawa faktor-2. Faktor-2 mempunyai aktivitas antioksidan dan antihemolisis yang lebih baik dari daidzein dan genistein (Gyorgy et al. 1964).

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. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas (Kochar dan Rossell 1990).

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 melitus, dan kanker (Horwitz 1980).

Selama ini kita ketahui 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 (zat yang mirip estrogen), anti inflamasi, anti tumor atau anti kanker, anti hemolisis, anti kontriksi (penyempitan) pembuluh darah, anti kolesterol, menurunkan kadar trigliserida VLDL dan LDL serta meningkatkan HDL (pawiroharsono 2001). Dengan demikian isoflavon dari tempe kedelai selain berkhasiat sebagai antioksidan juga mempunyai khasiat ganda seperti yang tertera diatas.

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 (tahun 2004) menjadi Rp 8.000,00 (tahun 2009) / kg. Penurunan harga kedelai sudah tidak memungkinkan lagi karena saat ini kedelai selain diperebutkan sebagai bahan pangan (food), juga untuk pakan (feed). Untuk itu perlu dicari alternatif lain, yaitu dengan menggali potensi bahan lokal yang murah dan melimpah di Indonesia sebagai alternatif pengganti kedelai sebagai sumber antioksidan alami khususnya isoflavon (Ariani 2001)

Handajani et al. (2008) 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 hitam (*Lablab purpureus*), koro kratok (*Phaseolus lunatus*), dan kedelai hitam (*Glycine soja*).

Dalam rangka pengembangan senyawa antioksidan alami khususnya isoflavon maka perlu dilakukan penelitian tentang optimasi produksi senyawa antioksidan dari koro hitam, koro kratok, dan kedelai hitam dan produk tempunya serta karakterisasi kandungan isoflavonnya. Dipilihnya koro hitam, koro kratok dan kedelai hitam sebagai alternatif obyek penelitian sumber isoflavon karena isoflavon merupakan metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman namun tidak disintesis oleh mikroorganisme. Koro hitam, koro kratok, dan kedelai hitam merupakan spesies dari familia leguminoceae sehingga dimungkinkan juga mengandung isoflavon seperti yang dijumpai pada kedelai.

Selama ini tempe kedelai yang dikonsumsi oleh masyarakat adalah tempe hasil fermentasi kedelai selama 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. Kedelai hitam, koro hitam, dan koro kratok mempunyai ukuran biji yang hampir sama dari ukuran biji kedelai, untuk itu perlu diteliti lama waktu fermentasi untuk menghasilkan ekstrak antioksidan khususnya isoflavon yang optimum. Penelitian ini akan difokuskan pada optimasi produksi senyawa antioksidan khususnya isoflavon dengan variasi lama waktu fermentasi baik pada biji kedelai dan produk tempunya maupun pada biji koro hitam, koro kratok serta kedelai hitam 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 (Ariani dan Hastuti 2009). Untuk selanjutnya pada penelitian ini juga akan difokuskan pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol.

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah: Mengetahui lama waktu fermentasi yang optimum untuk menghasilkan ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok dengan aktivitas antioksidan yang optimum pada perlakuan fermentasi (0, 1, 2, 3, 4 hari). Mengetahui Isoflavon jenis apa saja yang terkandung dalam tempe berbahan baku koro hitam, koro kratok serta kedelai hitam dan produk tempunya berdasarkan variasi lama waktu fermentasi (0, 1, 2, 3, dan 4 hari). Mengetahui aktivitas antioksidan tempe berbahan baku koro hitam, koro kratok serta kedelai hitam dan produk tempunya bila dibandingkan dengan ekstrak etanol dari kedelai dan produk tempunya serta beberapa antioksidan alami (α -tokoferol, β -karoten, dan asam askorbat) maupun antioksidan sintesis (BHT).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada pertengahan bulan Maret sampai Juni 2009. Laboratorium Program Kimia P.MIPA FKIP UNS, Surakarta. Sub Laboratorium Biologi Pusat MIPA UNS, Surakarta, dan Laboratorium Kimia Organik F.MIPA UGM, Yogyakarta.

Prosedur kerja

Pembuatan tempe

Pembuatan tempe kedelai berbahan baku kedelai kuning Madura sebagai berikut: Sebelum difermentasi, kedelai mengalami serangkaian perlakuan yang meliputi: Persiapan bahan dan sortasi, Penyiapan bahan baku berupa

kedelai kuning Madura dan kedelai 500 gr dipilih biji-biji yang besar, licin dan mengkilat kulitnya. Perendaman dilakukan dengan merendam 500 gr kedelai kuning Madura dalam 1000 mL air bersih selama 24 jam, dengan penggantian air rendaman setiap 8 jam. Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi. Biji direbus dalam air sebanyak 1000 mL selama 45 menit, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan sampai biji kedelai dalam keadaan lembab (tidak terlalu basah). Setelah sampel dalam keadaan tidak terlalu basah, ditaburi ragi atau Inokulum sebanyak 0,5 gr untuk 500 gr sampel. Inokulum yang digunakan produk dari LIPI dengan merek RAPRIMA. 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.

Pembuatan tempe berbahan baku koro hitam dari Wonogiri, kedelai hitam dan koro kratok dari Solo sebagai berikut: Tahap pertama dimulai dengan penyiapan bahan baku yaitu biji koro hitam (*Lablab purpureus*), koro kratok (*Phaseolus lunatus*), kedelai hitam (*Glycine soja*) masing-masing 500 g. Perendaman dilakukan dengan merendam 500 g biji koro hitam, koro kratok dan kedelai hitam dalam 1000 mL air bersih selama 3 x 24 jam, dengan penggantian air rendaman sebanyak tiga kali dalam 24 jam, untuk menghilangkan senyawa asam sianida (HCN). Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi. Pemasakan dilakukan dengan cara mengukus biji koro hitam, koro kratok dan kedelai hitam selama satu jam, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan. Setelah sampel dalam keadaan tidak terlalu basah, ditaburi ragi/inokulum. Bahan inokulum yang digunakan dari produk LIPI dengan merk RAPRIMA. Sampel yang sudah diberi inokulum dicampur dengan rata, kemudian dibungkus dengan menggunakan daun pisang dan diperam selama 24, 48, 52, 96 jam dalam suhu kamar (27oC) dan terbentuklah tempe koro hitam, tempe koro kratok dan tempe kedelai hitam.

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 %, lalu di saring lagi. Filtrat hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental di oven selama 30 menit dengan suhu 50oC sehingga diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak etanol yang dihasilkan kemudian diidentifikasi isoflavonnya dengan metode HPLC.

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 ekstrak etanol 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. Menganalisis kromatogram HPLC dengan menggunakan pembanding 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

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

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 µL pelarut (metanol) ke dalam kuvet dan ditambahkan larutan DPPH sampai volume 3 mL kemudian ditutup dan dikocok sampai homogen warnanya. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbansinya pada puncak panjang gelombang 517 nm sebagai absorbansi kontrol.

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 µL pelarut diganti dengan 600 µL larutan uji (sampel). Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbansinya pada puncak panjang gelombang mendekati 517nm sebagai absorbansi sampel.

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).

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

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.

Analisis data

Analisis data dengan dua faktor yaitu jenis bahan dasar pembuat tempe dan lama fermentasi, menggunakan program SPSS *version* 15. Analisis data pada Program SPSS tersebut adalah analisis data berupa *General Linear Model– Univariate*. Analisis data dengan satu faktor yaitu jenis bahan dasar, menggunakan program SPSS *version* 15. Analisis data pada Program SPSS tersebut adalah analisis data berupa *Compare Means – One Way Anova*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil fermentasi aneka legume dan produk tempenya

Biji kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok setelah mengalami serangkaian perlakuan sebelum terjadi proses fermentasi, antara lain: persiapan bahan dan sortasi, perendaman, pengupasan kulit, pemasakan biji koro, penambahan inokulum dan yang terakhir pemeraman, dari proses diatas didapatkan hasil (Tabel 1):

Biji kedelai hitam dan produk tempenya

Fermentasi hari ke-0: Kedelai hitam berupa biji-biji yang sudah lunak, ada yang terbelah menjadi dua dan ada yang utuh serta ada penambahan inokulum tetapi tidak difermentasikan lebih lanjut, sehingga bentuknya seperti kedelai kukus.

Fermentasi hari ke-1: Pada biji kedelai hitam sudah tumbuh sedikit miselium meski belum merata pada permukaan, dan belum dapat diiris (akan terlepas satu persatu), sehingga diperkirakan kandungan isoflavon belum optimum.

Fermentasi hari ke-2: Miselium jamur yang berwarna putih sudah tumbuh merata dan kompak sehingga sudah terbentuk tempe seperti halnya tempe kedelai kuning dan diiris tidak pecah, sehingga diperkirakan kandungan isoflavon sudah ada.

Fermentasi hari ke-3: Miselium semakin berwarna putih merata menutupi biji-biji kedelai hitam dan kompak, diiris tidak pecah dan belum terlihat warna kuning pada tepinya seperti halnya tempe kedelai, sehingga diperkirakan kandungan isoflavon sudah optimum.

Fermentasi hari ke-4: Miselium mengalami perubahan warna menjadi kuning pada bagian tepi tempe dan menyusut kekompakannya, diiris tidak pecah, sehingga diperkirakan kandungan isoflavonnya pun berkurang.

Biji koro hitam dan produk tempenya

Fermentasi hari ke-0: Pada biji koro hitam sama dengan biji kedelai hitam yaitu biji-biji yang lunak, ada yang terbelah ada yang utuh, ada penambahan inokulum dan tidak difermentasikan lebih lanjut dan bentuknya seperti kedelai kukus.

Fermentasi hari ke-1: pada biji koro hitam sudah tumbuh sedikit miselium dan belum merata pada permukaan biji, sehingga tidak dapat diiris (terlepas satu-persatu), diperkirakan kandungan isoflavon belum optimum.

Fermentasi hari ke-2: Miselium berwarna putih dan tumbuh merata, serta kompak sehingga sudah berbentuk

tempe, diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah ada.

Fermentasi hari ke-3: Miselium makin berwarna putih merata menutupi biji-biji koro hitam dan kompak, diiris tidak pecah dan belum terlihat warna kuning pada tepi tempe, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah optimum.

Fermentasi hari ke-4: Miselium mengalami penyusutan dan perubahan warna menjadi kuning pada bagian tepi tempe, diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavonnya juga mulai berkurang.

Biji koro katrok dan produk tempenya

Fermentasi hari ke-0: sama seperti kedelai hitam dan koro hitam, biji koro katrok berupa biji-biji yang lunak, ada yang terbelah dan utuh serta ada penambahan inokulum dan tidak difermentasikan lebih lanjut.

Fermentasi hari ke-1: sudah tumbuh miselium pada permukaan biji koro meskipun belum merata dan kompak, diiris akan pecah (terlepas satu persatu), dan diperkirakan kandungan isoflavon belum optimum.

Fermentasi hari ke-2: Miselium yang berwarna putih tumbuh merata dan kompak sehingga sudah berbentuk tempe dan diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah ada.

Fermentasi hari ke-3: Miselium semakin berwarna putih, merata menutupi biji koro dan kompak, diiris tidak pecah dan belum terlihat warna kuning pada tepi tempe, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah optimum.

Fermentasi hari ke-4: Miselium mengalami penyusutan dan perubahan warna menjadi kuning pada bagian tepi tempe, diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavonnya juga mulai berkurang.

Dari ketiga jenis legume dan produk tempenya, hasil fermentasi yang optimum untuk menjadi tempe adalah pada fermentasi hari ke-3, karena pada hari tersebut sudah nampak adanya miselium yang berwarna putih yang tumbuh merata dan kompak sehingga biji-biji tertutupi dan pada saat tempe diiris tidak pecah yang disebabkan adanya miselium yang mengikat dan menembus biji-biji legume yang lunak, selain itu pada fermentasi hari ke-3 pada bagian tepi tempe belum terlihat adanya warna kuning yang menunjukkan adanya penyusutan miselium dan dimungkinkan kandungan isoflavonnya paling optimum (Faktor-2) karena hasil fermentasinya juga optimum.

Hasil fermentasi tempe dari jenis legume yang paling optimum adalah hari ke-3 dimana hasil tersebut sama dengan hasil fermentasi tempe pada kedelai kuning Madura.

Hasil ekstraksi aneka legume dan produk tempenya

Tempe hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol 70% diketahui mampu mengekstrak isoflavon secara optimal (Kudou et al. 1991), sedangkan maserasi merupakan cara ekstraksi senyawa organik yang mudah dan sederhana. Bahan yang akan diekstrak dipotong dengan ukuran tipis, kemudian diblender hingga berbentuk bubuk tempe dan dimaserasi dalam pelarut etanol selama 24 jam, dan diperoleh hasil berupa filtrat yang berwarna kuning

dari senyawa protein termasuk senyawa isoflavon yang masih kompleks, selanjutnya filtrat dipisahkan dari residu untuk diproses lebih lanjut menjadi ekstrak yang murni. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50° C sampai didapatkan ekstrak yang pekat atau hampir semua etanol teruapkan. Ekstrak ini selanjutnya disimpan dalam oven suhu 40°C (untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa) dan ditimbang sehingga diperoleh massa hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi seperti yang tercantum dalam Tabel 2.

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi semakin banyak massa ekstrak etanol yang dihasilkan. Massa ekstrak etanol terbanyak pada tempe kedelai hitam, koro kratok, koro hitam dan kedelai kuning terjadi fermentasi hari ke-4, yaitu 9,658 g/100g tempe; 3,172 g/100g tempe; 2,513 g/100g tempe; dan 5,192 g/100g tempe yang menunjukkan massa ekstrak pada kedelai hitam lebih banyak daripada koro kratok, koro hitam dan kedelai kuning. Demikian juga pada massa hasil ekstraksi dari biji kedelai hitam mentah lebih banyak dibanding biji koro hitam, biji koro kratok dan kedelai kuning mentah yaitu 4,541 g; 3,93 g; 4,215 g; dan 3,422 g. Hal ini disebabkan spesies tanaman yang diekstraksi memiliki kandungan materi yang tidak sama meski dalam 1 jenis legume, ini terlihat pada warna hasil ekstraksi yang dihasilkan biji mentah. Pada kedelai, koro kratok, dan koro hitam hasil ekstraksi berwarna hitam karena masih mengandung senyawa sianida sedangkan hasil ekstraksi kedelai kuning mentah berwarna coklat tua, karena kemungkinan kandungan sianidanya relative lebih sedikit dan hilang pada saat perendaman selama 24 jam dan pengukusan. Hasil ekstraksi biji yang sudah difermentasikan berwarna kuning muda sampai coklat tua karena senyawa sianidanya sudah hilang pada saat perendaman selama 3 x 24 jam sehingga aman untuk dikonsumsi.

Berdasarkan Tabel 2 dapat disimpulkan bahwa massa hasil ekstraksi dari beberapa legume ternyata bervariasi, yang dapat disebabkan karena perbedaan sifat kekerasan atau kelunakan biji, kepadatan komponen zat, serta kandungan zat yang ada dalam biji. Menurut Handajani dan Atmaka (1993), bahwa faktor varietas, faktor daerah tempat tumbuh, musim tanam dan musim panen ternyata memberikan pengaruh yang cukup bervariasi terhadap sifat fisis dan khemis dari biji kacang-kacangan.

Hasil identifikasi isoflavon dengan metode HPLC

Analisis dengan HPLC bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dalam sampel tempe kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok 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 area di bawah puncak luas. Konsentrasi senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dapat diketahui dengan mengalikan persentase luas masing-masing senyawa isoflavon dalam kromatogram dengan massa ekstrak etanol yang dihasilkan. Hasil identifikasi senyawa isoflavon berdasarkan kromatogram pada kedelai hitam, koro hitam, koro kratok dan kedelai kuning dapat dilihat pada Tabel 3.



















Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa: (i) Tempe kedelai hitam mentah memiliki kandungan isoflavon genistein saja. Hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2 memiliki kandungan isoflavon Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-3 mengandung isoflavon daidzein, glisitein dan genistein sementara hasil fermentasi hari ke-4 tidak mengandung isoflavon Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein. (ii) Tempe koro hitam mentah memiliki kandungan isoflavon genistein saja. Hasil fermentasi hari ke-0, 1, 4 mempunyai kandungan isoflavon Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-2 hanya mengandung isoflavon Daidzein saja dan hasil fermentasi hari ke-4 kandungan isoflavonnya adalah Faktor-2, daidzein, dan glisitein

Tempe koro kratok mentah memiliki kandungan isoflavon daidzein saja. Hasil fermentasi hari ke-0 mempunyai kandungan isoflavon Daidzein, Glisitein, dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-1 mengandung isoflavon daidzein dan glisitein. Hasil fermentasi hari ke-3 mengandung isoflavon Faktor-2 dan genistein. Sementara itu, hasil fermentasi hari ke-4 mengandung isoflavon glisitein dan genistein.

Tempe kedelai kuning mentah memiliki kandungan isoflavon daidzein, glisitein, dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-0 sampai dengan hasil fermentasi hari ke-4 kandungan isoflavonnya optimum yaitu terdiri dari Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein.

Dari data hasil identifikasi isoflavon total pada Tabel 3. dapat dijelaskan bahwa pada kedelai hitam dan koro hitam mentah hanya memiliki kandungan genistein, pada koro kratok mentah hanya memiliki kandungan daidzein dan pada kedelai kuning mentah memiliki kandungan daidzein, glisitein dan genistein. Dari keempat sampel legume (kedelai kuning, kedelai hitam, koro kratok dan koro hitam) mentah tidak ditemukan faktor-2, hal tersebut dimungkinkan karena pada biji mentah tidak terjadi proses fermentasi sehingga faktor-2 belum terbentuk. Menurut Barz dan Papendorf (1991) faktor-2 dapat terbentuk selama proses fermentasi dengan *Rhizopus oligosporus* terjadi biokonversi lebih lanjut dari daidzein dan glisitein menjadi faktor-2. Biosintesa faktor-2 juga dapat terjadi melalui demetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus*, dan melalui reaksi hidroksilasi daidzein oleh bakteri *microbacterium arbosrescens* (Barz et al. 1993), dan berdasarkan Tabel 3 dapat dijelaskan pula bahwa:

Tabel 1. Hasil pengamatan biji kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok serta produk tempenya

Perlakuan	Kedelai hitam			Koro hitam			Koro kratok		
	Foto	Warna	Aroma	Foto	Warna	Aroma	Foto	Warna	Aroma
Biji mentah		Hitam	Khas kedelai		Hitam	Tidak beraroma		Hitam	Tidak beraroma
Kukus (fermentasi hari ke-0)		Putih	Khas kedelai		Putih	Khas kedelai rebus		Putih	Khas kedelai rebus
Fermentasi hari ke-1		Putih agak kuning dan ada warna hitam	Khas tempe kedelai		Putih agak hitam	Khas tempe kedelai		Putih agak hitam	Khas tempe kedelai
Fermentasi hari ke-2		Putih kuning kehitaman	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai
Fermentasi hari ke-3		Putih	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai
Fermentasi hari ke-4		Putih	Sedikit berbau amoniak		Putih	Sedikit berbau amoniak		putih	Sedikit berbau amoniak

Kedelai hitam, meskipun mempunyai massa ekstrak etanol yang optimum pada fermentasi hari ke-4, tetapi jumlah kandungan isoflavon yang optimum terdapat pada fermentasi 0, 1, 2, 3 hari sedangkan pada fermentasi hari ke-4 kandungan isoflavon (Faktor-2, daidzein, genistein dan glisitein) menghilang atau tidak muncul, hal tersebut kemungkinan dapat terjadi karena pada fermentasi hari ke-4 pertumbuhan kapang sudah mengalami penurunan dan sudah terjadi pembusukkan pada tempe sehingga kandungan isoflavonnyapun menurun atau menghilang karena isoflavon sebagai antioksidan memiliki sifat mudah teroksidasi dan mudah bereaksi dengan radikal bebas sehingga kandungan isoflavon tidak dapat muncul karena sudah terurai menjadi senyawa lain yang belum diketahui.

Koro hitam, seperti halnya kedelai hitam massa ekstrak etanol koro hitam yang tertinggi pada fermentasi hari ke-4, tetapi jumlah kandungan isoflavon yang optimum terdapat pada hasil fermentasi hari ke-0, 1, 3, 4, hari. Kandungan isoflavon Faktor-2, glisitein dan genistein tidak ditemukan pada hasil fermentasi hari ke-2, hal tersebut dapat terjadi karena pada Faktor-2 fermentasi hari ke-1 kadarnya sudah menurun dibanding hari ke-0, sampai pada fermentasi hari ke-3 dan 4, dan pada fermentasi hari ke-2 kemungkinan tidak muncul dapat disebabkan karena dalam proses pengolahannya menjadi tempe yaitu senyawa isoflavon glukosidanya sudah larut pada saat proses perendaman karena perendaman biji koro hitam untuk dibuat tempe harus direndam 3 x 24 jam (selama 3 hari) dengan pergantian air 3 kali dalam 1 hari sampai air menjadi jernih sedangkan pada kedelai hitam (sama seperti kedelai kuning) hanya direndam 1 x 24 jam (selama 1 hari), sehingga dengan perendaman yang lama menyebabkan isoflavon glukosidanya banyak yang hilang, demikian juga pada genistein tidak muncul pada fermentasi hari ke-2 dan 3, pada fermentasi hari ke-4 dapat ditemukan atau muncul kembali dengan kadar mengalami penurunan, hal tersebut dapat juga disebabkan karena faktor perendaman yang lama seperti diatas atau faktor lain yaitu ekstrak etanolnya sudah teroksidasi atau terurai menjadi senyawa lain.

Koro kratok mempunyai massa ekstrak etanol yang terbanyak pada hasil fermentasi hari ke-4, tetapi jumlah kandungan isoflavon yang optimum (daidzein, glisitein, genistein) terdapat pada hasil fermentasi hari ke-0 yang mempunyai kadar konsentrasi faktor-2 yang kecil sehingga tidak muncul sampai pada fermentasi hari ke-1, kemudian dengan bertambahnya jumlah kapang pada fermentasi hari ke-2, faktor-2 dapat terlihat atau muncul dengan kadar konsentrasi yang kecil pula dan mengalami penurunan pada fermentasi hari ke-3 dan hari ke-4. Demikian pula pada kandungan isoflavon glisitein dan genistein, pada fermentasi hari ke-0, 1, 2 nampak terlihat dengan kadar yang kecil kemudian pada fermentasi hari ke-3 dan hari ke-4 mengalami penurunan sehingga tidak nampak atau menghilang, hal tersebut dapat disebabkan karena kadarnya kecil atau sedikit pada awal fermentasi yang disebabkan karena faktor perendaman yang lama sehingga isoflavon glukosidanya banyak yang hilang dan pada saat dibuat menjadi tempe meskipun dipengaruhi pertumbuhan kapang akan menghasilkan isoflavon aglukon yaitu daidzein, glisitein, genistein dan terutama faktor-2 tidak dapat muncul.

Pada kedelai kuning sebagai kontrol/pembanding dalam penelitian ini, mempunyai massa ekstrak etanol optimum pada hasil fermentasi hari ke-4, dan memiliki kandungan isoflavon optimum (faktor-2, daidzein, glisitein, genistein) pada fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 karena pada biji kedelai kuning dan produk tempenya memang sudah diketahui adanya kandungan senyawa isoflavon yang berkhasiat sebagai antioksidan.

Berdasarkan data hasil identifikasi senyawa isoflavon total pada Tabel 3. dapat dijelaskan bahwa kedelai hitam memiliki kandungan jenis-jenis isoflavon rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan dengan koro hitam dan koro kratok serta kedelai kuning sebagai kontrolnya. Kandungan isoflavon total pada kedelai hitam fermentasi hari ke-2 (4,6202mg/100 g sampel) lebih tinggi dibanding kedelai kuning hasil fermentasi hari ke-2 yaitu 1,8104 mg/100 g sampel, sedangkan koro kratok paling tinggi pada fermentasi hari ke-3 yaitu 1,7252 mg/100 g sampel dan koro hitam yang paling tinggi pada fermentasi hari ke-1 yaitu 0,6099 mg/100 g sampel. Dari data tersebut dapat diartikan bahwa kedelai hitam dan kedelai kuning sama dalam menghasilkan jenis isoflavon dan sama terjadi dalam fermentasi hari ke-2 tetapi berbeda kadar isoflavon totalnya, dimana kedelai kuning dan produk tempenya sudah diketahui banyak mengandung jenis isoflavon dibandingkan kedelai hitam. Kandungan isoflavon pada jenis legume/kacang-kacangan dipengaruhi varietas, waktu tanam dan lokasi penanaman (Mazur et al. 1995). Kondisi pertumbuhan, varietas, lokasi dan waktu tanam membedakan jumlah jenis senyawa isoflavon (Harbone 1996). Dari berbagai tanaman, kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada kelompok Leguminosae dan tidak terdapat pada organisme seperti bakteri, alga, jamur, lumut (Markham 1988).

Banyaknya kandungan jenis isoflavon pada masing-masing sampel yaitu kedelai hitam, kedelai kuning, koro hitam dan koro kratok ditampilkan pada Gambar 2.

Hasil identifikasi senyawa isoflavon dengan metode HPLC berdasarkan dari ketiga macam legume diatas, jumlah kandungan isoflavon yang muncul berbeda pada tiap hasil fermentasi (perlakuan) dan pada tiap jenis legume (sampel), hal ini dapat disebabkan karena beberapa faktor diantaranya kadar isoflavon yang kecil atau sedikit pada awal fermentasi sehingga tidak nampak pada fermentasi berikutnya, dan seiring dengan bertambahnya misellium pada fermentasi berikutnya dapat terlihat meski dengan kadar yang kecil atau sedikit; atau dapat juga disebabkan karena proses perendaman yang lama pada pembuatan tempe pada koro; faktor lain dari ketidak nampakkan isoflavon pada akhir fermentasi dapat juga terjadi karena sudah terurai menjadi zat lain, atau disebabkan karena pada spesies tanaman tersebut tidak memiliki kandungan isoflavon seperti yang dijumpai pada kedelai kuning, sehingga perlu penelitian lebih lanjut mengenai hal tersebut.

Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH hasil uji

Pada 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 (Amrun et al. 2007). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan melakukan 3 kali pengulangan, kemudian dari 3 kali pengulangan tersebut diambil rata-rata aktivitas antioksidan sampel. Hasil uji aktivitas antioksidan dapat dilihat dalam Lampiran, dan dari hasil pengukuran rata-rata diperoleh data yang disajikan dalam Tabel 4.

Dari Tabel 4 dapat dijelaskan, bahwa: Dari 3 kali pengulangan, hasil uji aktivitas antioksidan diperoleh rata-rata aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai hitam, tempe koro hitam, tempe koro kratok dan tempe kedelai kuning hasil fermentasi 0, 1, 2, 3, 4 hari.

Pada kedelai hitam, dari 3 kali pengulangan diperoleh hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 berturut-turut adalah 48,10%; 68,29%; 77,33%; 82,49%; 74,81% yang berarti menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang optimum terjadi pada fermentasi hari ke-3 setelah mengalami penurunan pada fermentasi hari ke-4.

Pada koro hitam, dari 3 kali pengulangan diperoleh hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 berturut-turut adalah 81,44%; 69,30%; 67,19%; 77,90%; 69,34% yang berarti juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang optimum terjadi pada fermentasi hari ke-3 yang kemudian mengalami penurunan juga pada fermentasi hari ke-4.

Pada koro kratok, dari 3 kali pengulangan diperoleh hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 berturut-turut adalah 62,04%; 56,25%; 56,44%; 65,12%; 59,09% yang berarti juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang optimum terjadi pada fermentasi pada hari ke-3 dan mengalami penurunan pada fermentasi pada hari ke-4.

Dari Tabel 4 diketahui bahwa aktivitas antioksidan biji mentah pada koro kratok lebih tinggi dibanding kedelai kuning yaitu 76,49%; sedangkan aktivitas antioksidan kedelai hitam lebih rendah dibanding kedelai kuning yaitu 30,0%, hal ini kemungkinan disebabkan terhidrolisisnya senyawa isoflavon glukosida menjadi isoflavon bebas yang disebut aglucion oleh enzim α -glukosidase yang terdapat pada jenis legume yang dihasilkan oleh mikroorganisme selama fermentasi. Dari Tabel 4 juga menunjukkan bahwa rata-rata tempe hasil fermentasi 3 hari memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi, yaitu 81,43% pada tempe kedelai kuning, 82,49% pada tempe kedelai hitam, 77,90% pada tempe koro hitam dan 65,12% pada tempe koro kratok kemudian menurun pada fermentasi hari ke-4, hal ini dapat disebabkan karena adanya hidrolisis pada saat fermentasi atau kemungkinan disebabkan oleh reaksi lebih lanjut senyawa isoflavon menjadi senyawa lain yang aktivitasnya belum diketahui dan perlu dikaji lebih mendalam.

Dari Tabel 4 dapat juga diuraikan bahwa tingkat aktivitas antioksidan rata-rata kedelai hitam mentah menunjukkan hasil yang paling rendah dibandingkan dengan kedelai kuning, koro kratok dan koro hitam mentah, tetapi pada hasil fermentasi hari ke-3 kedelai hitam mempunyai tingkat aktivitas antioksidan yang paling tinggi

dibandingkan kedelai kuning, koro hitam dan koro kratok, hal ini disebabkan kemungkinan karena reaksi enzimatik yang mengubah senyawa isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglucion terjadi secara optimum pada lama fermentasi hari ke-3 tersebut. Seperti telah diketahui, senyawa aglucion isoflavon memiliki aktivitas fisiologis yang lebih tinggi dibanding isoflavon glukosida.

Lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan senyawa isoflavon. 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.

Hasil uji aktivitas antioksidan optimum pada tempe kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok berdasarkan lama waktu fermentasi dapat dianalisis dengan statistik program SPSS *version* 15, untuk mencari perbedaan yang nyata dari pengaruh lama waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan yang dapat dilihat pada lampiran.

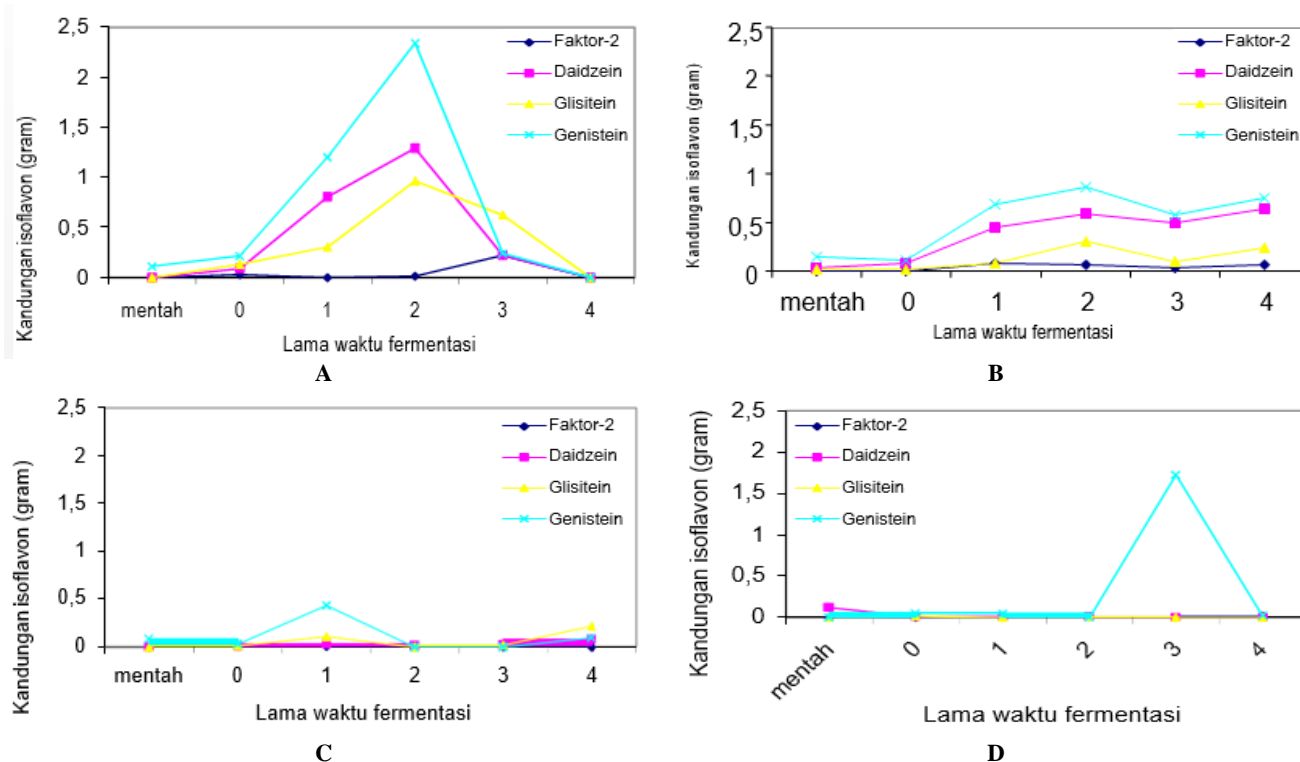
Tabel 4 menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan kedelai kuning, kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok dipengaruhi lama waktu fermentasi. Berdasarkan perbedaan antar perlakuan, biji mentah koro kratok menunjukkan aktivitas antioksidan yang tertinggi diantara biji kedelai kuning mentah, biji kedelai hitam mentah dan biji koro hitam mentah. Pada hasil fermentasi hari ke-0 dan hasil fermentasi hari ke-2 aktivitas antioksidan kedelai kuning tidak menunjukkan beda nyata dibanding hasil fermentasi hari ke-1, 3 dan ke-4. Untuk koro hitam hasil fermentasi hari ke-1 dan fermentasi hari ke-4 aktivitas antioksidannya tidak menunjukkan beda nyata bila dibandingkan dengan hasil fermentasi biji mentah, fermentasi hari ke-0, 2, dan ke-3. Untuk kedelai hitam dan koro kratok pada biji mentah hingga fermentasi hari ke-4 memiliki aktivitas antioksidan yang menunjukkan perbedaan secara signifikan.

Berdasarkan perbedaan antar perlakuan, fermentasi hari ke-3 merupakan fermentasi yang optimum untuk menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi diantara fermentasi hari ke-0, 1, 2, 4. Pada fermentasi hari ke-3 tersebut tempe kedelai hitam memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi diikuti tempe kedelai kuning, tempe koro hitam dan tempe koro kratok, tetapi hasil aktivitas antioksidan antara tempe kedelai hitam dan tempe kedelai kuning menunjukkan beda nyata. Berdasarkan Tabel 4, juga dapat diketahui bahwa pada fermentasi hari ke-0 kedelai kuning, kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok aktivitas antioksidannya mengalami kenaikan dibanding pada saat belum difermentasikan (mentah) kemudian menurun pada fermentasi hari ke-1 sampai fermentasi hari ke-2, setelah itu mengalami kenaikan pada fermentasi hari ke-3, kemudian menurun lagi pada fermentasi hari ke-4, kecuali pada kedelai hitam hasil uji aktivitas antioksidannya pada biji mentah sampai fermentasi hari ke-3 terus mengalami kenaikan kemudian menurun pada fermentasi hari ke-4 yang dimungkinkan sudah mulai terjadi pembusukkan yang ditandai dengan munculnya warna hitam misellium pada bagian tepi dan aroma busuk yang menyengat.

Hubungan antara aktivitas antioksidan yang tinggi pada beberapa jenis legume diatas tidak dipengaruhi oleh kadar

kandungan senyawa isoflavon yang optimum. Pada kedelai hitam, koro hitam, koro kratok serta kedelai kuning sebagai kontrol memiliki rata-rata aktivitas antioksidan yang tinggi pada fermentasi hari ke-3 tetapi kandungan isoflavon optimumnya tidak terjadi pada fermentasi hari ke-3. Pada kedelai hitam dan kedelai kuning kadar kandungan isoflavon optimum terjadi pada fermentasi hari ke-2, pada koro hitam kadar kandungan isoflavon optimum terjadi pada fermentasi hari ke-1, dan pada koro kratok kadar kandungan isoflavon optimum terjadi pada fermentasi hari ke-3. Ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang tinggi tidak selalu mempunyai kandungan isoflavon yang optimum pula, hal ini kemungkinan dapat disebabkan adanya senyawa-senyawa lain misalnya fenolik lain yang

bukan dalam golongan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol yang memiliki aktivitas seperti antioksidan atau dapat juga disebabkan adanya senyawa yang bukan isoflavon tetapi memiliki kemampuan seperti antioksidan atau kemungkinan karena faktor lain yaitu terjadi pada saat berlangsungnya proses fermentasi dimana enzim α -glukosidase cepat memecah glukosida menjadi agluron sehingga juga dapat menambah jumlah senyawa isoflavon. Sebaliknya, ada beberapa jenis kandungan isoflavon yang tinggi tetapi memiliki aktivitas antioksidan yang rendah, hal ini dapat dimungkinkan pada waktu proses ekstraksi, pengemasan hasil ekstraksi dan penyimpanan hasil ekstraksi sudah teroksidasi atau bereaksi dengan senyawa lain yang bersifat radikal bebas.



Gambar 1. Kandungan isoflavon. A. Tempe kedelai hitam, B. Tempe kedelai kuning, C. Tempe koro hitam, D. Tempe koro kratok

Tabel 2. Hasil ekstraksi biji legume dan produk tempenya

Sampel	Kedelai madura		Kedelai hitam		Kedelai kratok		Koro hitam	
	Massa (g)	Warna	Massa (g)	Warna	Massa (g)	Warna	Massa (g)	Warna
Biji mentah	3,422	Kuning muda	4,541	Hitam	3,293	Hitam	4,215	Hitam
Hasil fermentasi hari ke								
0	0,677	Kuning muda	1,113	Kuning	0,584	Coklat	0,354	Coklat
1	2,933	Kuning	4,386	Coklat	1,340	Coklat	1,650	Coklat
2	4,982	Kuning coklat	8,492	Coklat	0,768	Coklat tua	1,904	Coklat Tua
3	3,421	Coklat tua	8,43	Coklat tua	2,423	Coklat hitam	2,666	Coklat Hitam
4	5,192	Coklat tua	9,658	Coklat hitam	2,513	Coklat hitam	3,172	Coklat Hitam

Tabel 3. Hasil identifikasi Isoflavon total beberapa legume (100 g sampel)

Jenis sample	Lama waktu fermentasi (hari)	Kandungan isoflavon (g)				Isoflavon total (g)
		Faktor-2	Daidzein	Glisitein	Genistein	
Kedelai hitam	Mentah	-	-	-	0,1130	0,1130
	0	0,0321	0,0915	0,1325	0,2159	0,4722
	1	0,0097	0,8069	0,3051	1,2042	2,3259
	2	0,0161	1,2947	0,9670	2,3424	4,6202
	3	0,2250	0,2234	0,6562	0,2415	1,3461
	4	-	-	-	-	-
Koro hitam	Mentah	-	-	-	0,0937	0,0937
	0	0,0239	0,0105	0,0165	0,0344	0,0853
	1	0,0149	0,0401	0,1145	0,4404	0,6099
	2	-	0,0177	-	-	0,0177
	3	0,0085	0,0235	0,0251	-	0,0571
	4	0,0038	0,0884	0,2254	0,1043	0,4219
Koro kratok	Mentah	-	0,1237	-	-	0,1237
	0	-	0,0140	0,0202	0,0597	0,0939
	1	-	0,0151	-	0,0532	0,0683
	2	0,0089	0,0122	0,0090	-	0,0301
	3	0,0036	-	-	1,7252	1,7288
	4	0,0178	-	-	0,0241	0,0419
Kedelai kuning	Mentah	-	0,034	0,0092	0,1398	0,183
	0	0,0009	0,0752	0,0128	0,1057	0,1937
	1	0,083	0,4414	0,0838	0,6769	1,2021
	2	0,0637	0,5853	0,3058	0,8556	1,8104
	3	0,0246	0,4994	0,0909	0,5682	1,1585
	4	0,0575	0,6318	0,232	0,7549	1,6187

Tabel 4. Aktivitas antioksidan aneka legume dan produk tempunya dengan variasi lama waktu fermentasi

Sampel	Perlakuan (fermentasi hari)					
	Mentah	0 hari	1 hari	2 hari	3 hari	4 hari
Kedelai kuning	67,4500hi	76,0600kl	72,0833j	76,0567kl	81,4300m	77,1400l
Koro hitam	60,8000e	81,4400m	69,3000i	67,1900h	77,9033l	69,3400i
Kedelai hitam	30,0000a	48,1033c	68,2867hi	77,3267l	82,4867m	74,8133k
Koro kratok	76,4900kl	62,0367f	43,4067b	56,4400d	65,1200g	59,0900e

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada blok yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji Duncan 5% (berlaku pada kolom yang sama)

Tabel 5. Perbandingan aktivitas antioksidan tempe beberapa legume dan sumber lainnya (%)

Sampel	Aktivitas antioksidan (%)
a-karoten	43,2533a
Tempe koro kratok (3hari)	65,1200b
Vitamin C	75,6200c
a-tokoferol	76,4100d
Tempe koro hitam (3 hari)	77,9033e
BHT	81,1567f
Tempe kedelai kuning (3 hari)	81,4300f
Tempe kedelai hitam (3hari)	82,4867g

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada blok yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji Duncan 5% (berlaku pada kolom yang sama)

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan pembandingan antioksidan alami dan antioksidan sintetik

Aktivitas antioksidan tempe kedelai hitam, tempe koro hitam, dan tempe koro kratok dapat kita uji dan dibandingkan dengan aktivitas antioksidan lain yang sudah ada yaitu α -tokoferol, β -karoten dan vitamin C sebagai antioksidan alami maupun BHT yang merupakan antioksidan sintesis, yang dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan Tabel 5 dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tempe beberapa legume dan sumber lainnya menunjukkan tempe kedelai hitam 3 hari memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (82,49%) dan menunjukkan beda nyata dibanding tempe koro hitam (77,90%), tempe koro kratok (65,12%) dan tempe kedelai kuning (81,43%) sebagai kontrol serta antioksidan sumber lainnya.

Dan dari Tabel 5 juga dapat diketahui bahwa antara tempe kedelai kuning dengan BHT (81,16%) sebagai antioksidan sintetis menunjukkan beda tidak nyata, dengan aktivitas antioksidannya cenderung sedikit lebih rendah dibanding tempe kedelai hitam. Pada tempe koro hitam memiliki aktivitas antioksidan yang sedikit lebih tinggi dan menunjukkan beda nyata dengan a-tokoferol (76,41%) dan vitamin C (75,62%) sebagai antioksidan alami, sedangkan tempe koro kratok (65,12%) memiliki aktivitas antioksidan yang sedikit lebih tinggi dan menunjukkan beda nyata dengan b-karoten (43,25%) sebagai antioksidan sintetis.

Dari Tabel 5 dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan beberapa senyawa dari yang terendah ke yang tertinggi berturut-turut adalah b- caroten, tempe koro kratok (3hari), Vitamin C, a-tokoferol, tempe koro hitam (3 hari), BHT, Tempe Kedelai kuning (3 hari), dan tempe kedelai hitam (3 hari). Dari hasil perbandingan aktivitas antioksidan tersebut dapat juga disimpulkan bahwa kedelai hitam dengan fermentasi 3 hari didapatkan hasil aktivitas antioksidan yang optimum yang dapat digunakan sebagai sumber isoflavon yang berkhasiat antioksidan.

Dari perbandingan 4 jenis legume diatas dapat disimpulkan bahwa Tempe kedelai hitam memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas senyawa antioksidan tempe kedelai kuning sebagai kontrolnya. Aktivitas antioksidan tempe kedelai hitam lebih baik bila dibandingkan BHT yang merupakan antioksidan sintetis. Sedangkan tempe koro hitam memiliki aktivitas antioksidan yang sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan a-tokoferol, dan vitamin C, meskipun dibandingkan dengan tempe kedelai kuning hasil uji aktivitas antioksidan koro hitam cenderung tidak terpaat jauh.

Menurut Suryo dan Tohari (1995), penggunaan zat antioksidan sintetis tertentu misalnya BHT dapat menimbulkan akibat buruk terhadap kesehatan konsumen seperti gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan. Dan dari hasil tersebut diatas, maka tempe kedelai hitam hasil fermentasi hari ke-3 potensial untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami pengganti BHT (sebagai antioksidan sintetis) yang dapat digunakan sebagai sumber isoflavon yang berkhasiat antioksidan, sehingga dapat memberikan manfaat yang baik bagi kesehatan tubuh apabila dikonsumsi, dan mengkonsumsi tempe yang paling baik bagi kesehatan adalah tempe hasil fermentasi hari ke-3 karena memiliki aktivitas antioksidan yang optimum dan disarankan mengkonsumsi tempe koro dengan fermentasi lebih dari 2 hari dengan cara dipanaskan terlebih dahulu untuk menghindari keracunan tempe.

KESIMPULAN

Jenis-jenis senyawa isoflavon berkhasiat antioksidan selama fermentasi optimum adalah: Tempe kedelai hitam dengan lama fermentasi 2 hari mengandung faktor-2 (0,0161 g), daidzein (1,2947g), glisitein (0,9670 g), genistein (2,3424 g) dengan isoflavon total 4,6202 g. Tempe koro hitam dengan lama fermentasi 1 hari mengandung faktor-2 (0,0149 g), daidzein (0,0401 g), glisitein (0,1145 g), genistein (0,4404 g) dengan isoflavon

total 0,0699 g. Tempe koro kratok dengan lam fermentasi 3 hari mengandung faktor-2 (0,0036 g), genistein (1,7252 g) dengan isoflavon total 1,7288 g. Lama fermentasi optimum menghasilkan senyawa antioksidan tinggi adalah fermentasi 3 hari, untuk kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok masing- masing adalah 82,49%; 77,90%; 65,12%. Bahwa kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok serta produk tempunya berpotensi ddalam upaya pemanfaatn sebagai antioksidan alami khususnya isoflavon bila dibandingkan dengan ekstrak etanol dari kedelai kuning dan produk tempunya serta beberapa antioksidan alami (α -tokoferol, β -karoten, dan asam askorbat) maupun antoksidan sintetis (BHT).

DAFTAR PUSTAKA

- Amrun HM, Umiyah, Umayah EU. 2007. Uji aktivitas antioksidan ekstrak air dan ekstrak metanol beberapa varian buah kenitu (*Chrysopylum cainito* L.) dari daerah Jember. Berkala Penelitian Hayati 13: 45-50.
- Ariani SRD, Hastuti W. 2009. Analisis Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Tempe Kedelai (*Glycine max* L. Merrill) dengan Variasi Lama Waktu Fermentasi Dan Metode Ekstraksi, Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia dengan Tema: Teknologi Informasi dalam Mendukung Perkembangan Riset dan Pembelajaran Kimia, Surakarta 18 Maret 2009.
- Ariani SRD. 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.
- Barz W, Heskamp K, Rehms H, Steinkamp R. 1993. Recent aspect of protein, phytate and isoflavone metabolism by microorganisms isolated from tempe-fermentation. Tempo Workshop, Jakarta, 15 February 1993.
- Barz W, Papendorf GB. 1991. Metabolism of isoflavones and formation of factor-2 by tempeh producing microorganism Tempeh Workshop, Cologne. 20 May 1991.
- Gyorgy P, Murata K, Ikehata H. 1964. Antioksidants isolated from fermented soybeans tempeh. Nature 203: 872-875.
- Handajani S, Atmaka W. 1993. Analisis Sifat Fisis Khemis Beberapa Biji Kacang-Kacangan, Kekerasan, Kualitas Tanak, Protein, dan Mineralnya. Lembaga Penelitian Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Handajani S, Rachmawati D, Pramita DS. 2008. Studi Pendahuluan Karakteristik Kimia (HCN, Antioksidan, dan Asam Fitat) Beberapa Jenis Koro Lokal dengan Berbagai Perlakuan Pendahuluan. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi. Jakarta. Agustus 2008.
- Horwitz W. 1980. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 13th ed. AOAC, Gaithersburg, USA.
- Kochar SP, Rossell B. 1990. Detection estimation and evaluation of antioxidants in food system. In: Hudson BJB (ed.). Food Antioxidants. Elsevier, London.
- Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K. 1991. Malowd isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merr). Agric Biol Chem 55: 2227-2233.
- Markham KR. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoida. Penerj.: Padmawinata K. ITB, Bandung
- Mazur WM, Duke JA, Wähälä K, Rasku S, Adlercreutz H. 1998. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. J Nutr Biochem 9 (4): 193-200.
- Pawiroharsono S. 1995. Metabolisma Isoflavon dan Faktor-II Pada Proses Pembuatan Tempe. Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe Dalam Industri Pangan Modern, April 1995. UGM. Yogyakarta.
- Pawiroharsono S. 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. Direktorat. Teknologi Bioindustri. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong.
- Pradana S. 2008. Prospek dan Manfaat Isoflavon sebagai Fitoestrogen Bagi Kesehatan. Balai Penerbit FKUI, Jakarta
- Suryo I, Tohari I. 1995. Aktivitas Antioksidan Buah jambu Mete dan Penerapannya pada Abon. Biosains 1 (7): 50-61.
- Yen GC, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem 43: 27-32.