

Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku koro pedang (*Canavalia ensiformis*)

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

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

Manuskrip diterima: 21 Januari 2015. Revisi disetujui: 6 Juni 2015.

Abstract. Istiani Y, S Handajani, A Pangastuti. 2015. 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*). *Biofarmasi* 13: 50-58. The objectives of the research were to find out: (i) the contents of the isoflavone compounds of daidzein, genistein, glisitein, and factor-2, and (ii) 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 soybean and its tempeh product and several natural antioxidants (α -tocopherol, 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 soybean 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 soybean 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 soybean 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 -tocopherol, 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 soybean, natural antioxidant (Vitamin C and α -tocopherol and BHT) significantly different that is 69%, and β carotene (45%) had the lowest antioxidant activity.

Keywords: Jack bean, tempeh, antioxidant, isoflavone

PENDAHULUAN

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 et al. 1998). 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 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 hidrosilasi 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. Penurunan harga kedelai sulit terjadi karena kedelai diperebutkan sebagai bahan pangan (*food*), pakan (*feed*) dan bahan bakar (*fuel*) (Suharyanto 2008). Untuk itu perlu alternatif lain, yaitu dengan menggali potensi bahan pangan lokal yang murah dan melimpah di Indonesia sebagai pengganti kedelai dan 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*).

Tujuan penelitian ini adalah: mengetahui isoflavon jenis apa saja yang terkandung dalam biji koro pedang dan produk tempennya bentuk utuh maupun Rajang; mengetahui lama waktu fermentasi optimum untuk menghasilkan aktivitas antioksidan yang optimum pada perlakuan fermentasi dengan biji bentuk utuh dan Rajang; mengetahui aktivitas antioksidan koro pedang dibandingkan dengan antioksidan alami (*α-tokoferol*, *β-karoten*, dan vitamin C) maupun antioksidan sintesis (BHT).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada pertengahan bulan Maret sampai Juli 2009, dan penelitian ini dilakukan di: Laboratorium Kimia FKIP UNS Surakarta. Sub Laboratorium Biologi Pusat MIPA UNS. Laboratorium Kimia Organik F.MIPA UGM Yogyakarta.

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah: Kedelai Kuning Madura dan koro pedang. Inokulum *Rhizopus oligosporus* ("RAPRIMA", produk dari LIPI). Etanol 70 % (*Merck*); Metanol p.a (*Merck*); Standar Genistein (*Sigma Chemical Co.*); standart Daidzein (*Sigma Chemical Co.*); Standar Glisitein (*Sigma Chemical Co.*); Standar Faktor-2 (*Sigma Chemical Co.*); DPPH (*Sigma Chemical Co.*); BHT (*Butyl Hidroksi Toluena*) (*Sigma Chemical Co.*); *β*-karoten (*Sigma Chemical Co.*); *α*-tokoferol (*Sigma Chemical Co.*); Metanol gradient grade for liquid chromatography (*Merck*); Aluminium foil; Akuades; Kertas saring.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Alat *rotary vacuum evaporator* (*Buchi*); Neraca analitik (*Sartorius*); Alat HPLC (*Perkin Elmer LC 295*); Blender (*Philip*); Pipet mikro; Alat *Spektrofotometer UV - VIS* (*Shimadzu*); Alat-alat gelas merek *Pyrex*.

Pembuatan tempe

Pembuatan tempe kedelai

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

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.

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

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).

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.

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.

Pembuatan tempe koro pedang utuh dan rajang

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

Perendaman. Perendaman dilakukan dengan merendam 1000 g 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.

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

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

Teknik pemanasan/perebusan. Biji koro pedang utuh dan rajang direbus dalam air masing-masing sebanyak 100 ml selama 45 menit.

Penirisan dan pemberian inoculum. Koro pedang yang telah direbus, ditiriskan atau didinginkan selama 30 menit setelah itu diberi inoculum.

Pengemasan. Koro pedang yang telah diberi inoculum 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.

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 100ml etanol 70 %. Filtrat hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental di oven selama 30 menit dengan suhu 50oC sehingga diperoleh isolat. Isolat 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 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. Menganalisis 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

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 absorbansi pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbannya pada puncak panjang gelombang 517nm 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 absorbansi tampak pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbannya 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 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.

Analisis data

Teknik analisis data statistik menggunakan program SPSS *version 15* yaitu: *General Linear Model -Univariate* untuk analisis 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 analisis data statisitik perbandingan aktivitas antioksidan (%) tempe koro pedang utuh dan rajang serta sumber lain menggunakan satu faktor yaitu jenis bahan dasar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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 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, kemudian ditimbang sehingga diperoleh massa hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 dapat diketahui massa hasil ekstraksi etanol tempe koro pedang utuh dan rajang terbanyak terjadi pada fermentasi hari keempat yaitu sebanyak 3.044 g dan 3.610 g per 100 g sampel tempe koro pedang. Sementara itu, untuk biji mentah didapat 2.581 g ekstrak per 100 g sampel biji koro pedang mentah. Pada kedelai massa hasil ekstraksi terbanyak juga terjadi pada hari keempat yaitu 5.192 g, sedangkan pada biji mentahnya didapatkan 3.442 g ekstrak per 100 g sampel.

Tabel 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 ekstraksi 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 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 Handayani 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.

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.

Dari Tabel 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 hidroksilasi 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 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 g sampel tempe koro pedang utuh diperoleh kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.786 g yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.009 g, daidzein 0.228 g, glisitein 0.079 g, dan genistein 0.469 g, sedangkan pada tempe koro pedang rajang kandungan total isoflavon tertinggi adalah 0.590 g yang terdiri dari kandungan isoflavon daidzein 0.226 g, glisitein 0.077 g, dan genistein 0.287 g.

Untuk kandungan total isoflavon tertinggi pada tempe kedelai terjadi pada fermentasi 2 hari yaitu 1.812 g yang terdiri dari kandungan isoflavon faktor-2 0.064 g, daidzein 0.586 g, glisitein 0.306 g dan genistein 0.856 g. 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 g, lebih tinggi bila dibanding dengan kedelai yang hanya sebanyak 0.001 g. 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 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. 1988) dan kondisi iklim (Tsukamoto 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 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 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 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.

Dari Gambar 1 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 Gambar 1 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 penaikan 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.

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 pada Gambar 2.

Tabel 1. Ekstrak senyawa isoflavon kedelai dan koro pedang (per 100 g)

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

Tabel 2. Hasil identifikasi isoflavon dari kedelai dan koro pedang biji utuh dan rajang (per 100 g)

Jenis sampel	Lama waktu fermentasi (hari)	Kandungan Isoflavon (g)				Isoflavon total (g)
		Faktor-2	Daidzein	Glisitein	Genistein	
Koro pedang utuh 100 g	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
Koro pedang rajang 100 g	4	-	0.101	0.029	0.153	0.283
	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
Kedelai 100 g	3	-	0.045	0.007	-	0.052
	4	0.003	0.023	0.004	-	0.030
	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

Tabel 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	67.45f	47.13c	47.13c
0 hari	76.06hi	60.40e	60.40e
1 hari	72.08gh	51.57cd	31.90a
2 hari	76.06hi	53.61d	41.72b
3 hari	81.43j	77.32ij	68.63fg
4 hari	77.14ij	48.26c	61.61e

Note: *) superscrib yang berbeda menunjukkan terdapat adanya perbedaan yang signifikan

Tabel 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
<i>α</i> -tokoferol	76.41 ^c
<i>β</i> -karoten	43.25 ^a
BHT	81.16 ^d
Vitamin C	75.62 ^C

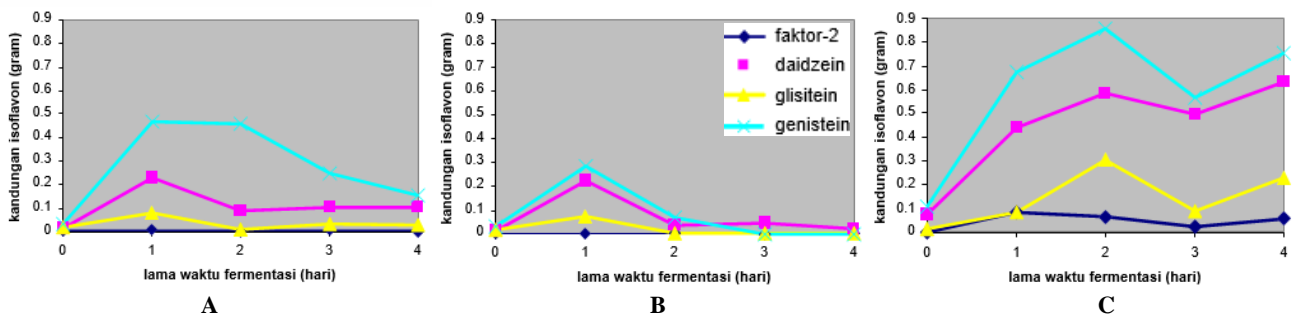
Note: *) superscrib yang berbeda menunjukkan terdapat adanya perbedaan yang signifikan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2 difenil 1 picril hidrazil). Metode yang dipilih adalah metode DPPH karena sederhana, mudah,

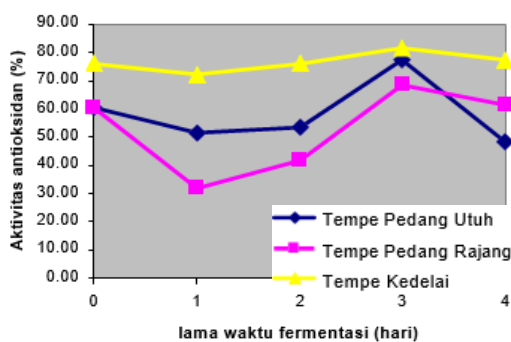
cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Metode aktivitas antiradikal bebas DPPH merupakan metode terpilih untuk menapis aktivitas antioksidan bahan alam (Molyneux 2004). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya 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 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 2 terlihat bahwa rata-rata aktivitas antioksidan dari tertinggi ke terendah berturut-turut adalah tempe kedelai, tempe pedang utuh, kemudian tempe pedang rajang. Pada Tabel 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%.

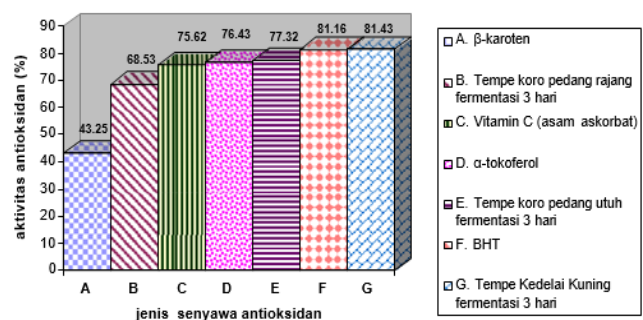
Dari Tabel 3 juga dapat diketahui bahwa koro pedang rajang fermentasi 1 hari sangat berbeda nyata dengan kedelai fermentasi 3 hari, yaitu masing-masing 31.90% dan 81.43%. Sehingga dengan demikian dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan terendah terjadi pada koro pedang rajang fermentasi 1 hari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



Gambar 1. Kandungan isoflavon. A. tempe koro pedang utuh, B. tempe koro pedang rajang, C. tempe kedelai



Gambar 2. Aktivitas antioksidan (%) beberapa jenis tempe



Gambar 3. Perbandingan Aktivitas Antioksidan (%) Antara Tempe Koro Pedang dengan Senyawa Antioksidan Lain

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 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 Naczki (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 3.

Dari Gambar 3, 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 3 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), penggunaan zat antioksidan sintetis 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.

Dari Tabel 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 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 dapat disimpulkan bahwa koro pedang dan produk tempunya 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.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa: 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%. 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%. Koro pedang serta produk tempunya berpotensi dalam upaya pemanfaatan sebagai antioksidan alami walaupun kandungan isoflavonnya lebih kecil bila dibandingkan dengan kedelai dan produk tempunya, namun aktivitas antioksidannya lebih tinggi bila dibandingkan dengan *β-karoten* dan tidak berbeda nyata dengan vitamin C dan *α-tokoferol*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson JW, Diwadkar VA, Bridges SR. 1998. Selective Effect of Different Antioxidants on Oxidation of Lipoprotein from rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 218: 376-381.
- Ariani SRD, 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.
- Ariani SRD. 1997. Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung Faktor-2 sebagai Alternatif Pengembangan Hasil Olahan Pangan dari Tahu. [Tesis]. Magister Kimia ITB. Bandung.
- Aussenac T, Lacombe S, Dayde J. 1988. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effect of variety and environment. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1480s-1485s.
- Barz W, Heskamp Klus 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.
- Barz W, Papendorf GB. 1991. Metabolism of isoflavones and formation of factor-2 by tempeh producing microorganism. *Tempo Workshop*, Cologne. 20 May 1991.
- Chang SS, Bostric-Matijasevic O, Hsieh AL, Huang CL. 1977. Natural Antioxidants from Rosemary and Sage. *J Food Sci* 42:574.
- Gyorgy P, Murata K, Ikehata H. 1964. Antioxidants 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 Kandungan Mineralnya. Lembaga Penelitian Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Handajani S, Supriyono, Triharyanto E, Marwanti S, Astuti DW, 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 JB. 1996. *The Flavonoid: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, Inc., London.
- Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K. 1991. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seed (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* 55: 2227-2233.

- Mazur WM, Duke JA, Wahata K, Rasku S, Adlercreutz H. 1998. Isoflavonoids and Lignans in Legume: Nutritional and Health Aspects in Humans. *J Nutr Biochem* 9: 193-200.
- Nara EX, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita N, Nagao A. 2001. Carotenoids effect proliferation of human prostate cancer cells research communications. *J Nuts* 131: 3303-3306.
- 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. 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong.
- Prakash A. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress* 19 (2): 1-4.
- Pratt DE, Hudson B.J.F. 1990. Natural Antioxidants not Exploited Commercially. In: Hudson B.J.F (ed.). *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London
- Shahidi F, Naczki M. 1995. *Food Phenolics*. Technomic Pub. Co. Inc. Lavester-Basel.
- Suharyanto. 2008. Ketahanan Pakan untuk Ketahanan Pangan. <http://unib.ac.id/blog/suharyanto/2008/03/13/ketahanan-pakan-untuk-ketahanan-pangan/>. [20 Mei 2009]
- Suryo I, Tohari I. 1995. Aktivitas Antioksidan Buah Jambu Mete dan Penerapannya pada Abon. *Biosains*. 1(7): 50-61.
- Susanto T, Zubaidah E, Wijanarko S B. 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.
- Tsukamoto C, Shimada S, Igita K, Kudou S, Kokubun M, Okubo K, Kitamura K. 1995. Factors effecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agric Food Chem* 43: 1184 -1192.