

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Deskripsi Metode Pendekatan Meta Analisis

Meta analisis merupakan suatu metode pendekatan penelitian dengan memadukan beberapa penelitian sejenis secara kuantitatif untuk pengambilan kesimpulan. Metode penelitian ini dilakukan dengan cara merekapitulasi data tanpa melakukan manipulasi eksperimental atau yang disebut dengan studi observasional retrospektif. Data yang digunakan dalam penelitian ini diambil melalui database Google Scholar. Kriteria inklusi dalam pencarian artikel yaitu artikel harus dipublikasikan pada tahun 2011-2021 dan harus terindeks SINTA dan SCIMAGO. Sedangkan kriteria eksklusi dipublikasikan kurang dari tahun 2011, tidak terindeks SINTA maupun SCIMAGO dan merupakan sebuah review artikel.

B. Informasi Jumlah dan Jenis Artikel

Jumlah artikel yang digunakan dalam menjawab rumusan masalah adalah sebanyak 5 (lima) artikel yang terdiri dari 3 (tiga) jurnal internasional dan 2 (dua) jurnal nasional. Kelima jurnal tersebut telah melewati skrining jurnal sehingga memenuhi syarat dengan tema perlakuan biji kedelai terhadap kandungan senyawa metabolit sebagai antioksidan. Penjelasan tentang artikel yang digunakan dalam penelitian ini disajikan dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Informasi Jumlah dan Jenis Artikel

No	Judul Artikel	Tahun	H-index	Impact Factor	Quartil	SJR	ISSN	Sinta Score	Sitasi
1.	<i>The Impact of High-Power Ultrasound and Microwave on the Phenolic Acid Profile and Antioxidant Activity of the extract from Yellow Soybean Seeds</i>	2018	129	4,92	Q1	1,07	0926-6690	-	1508
2.	<i>Antioxidant and Elastase Inhibitor from Black Soybean (<i>Glycine max L.</i>) and Its Compound (Daidzein)</i>	2020	3	-	-	-	2503-2178	S2	53
3.	<i>Bioprocessing of soybeans (<i>Glycine max L</i>) by solid-state fermentation with <i>Eurotium cristatum YL-1</i> improves total phenolic content, isoflavone aglycones, and antioxidant activity</i>	2020	148	0,9	Q1	0,75	2046-2069	S2	5609 0
4	Evaluasi Komposisi Gizi dan Sifat Antioksidatif Kedelai Hitam Malika (<i>Glycine mas</i>) Akibat Penyangraian	2018	3	-	-	-	2598-9480	S5	19
5	<i>Antioxidant Activities of Black Soybean Extract (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) and Daidzein as Hydroxyl and Nitric Oxide Scavengers</i>	2020	16	15	-	-	2338-6223	S2	1364

C. Isi Artikel

1. Artikel Pertama

Judul Artikel	: <i>The Impact of High-Power Ultrasound and Microwave on the Phenolic Acid Profile and Antioxidant Activity of the extract from Yellow Soybean Seeds</i>
Nama Jurnal	: Industrial Crops and Product
Penerbit	: Elsevier B.V
Volume & Halaman	: vol 122 & hal.223-231
Tahun Terbit	: 2018
Penulis Artikel	: Sanja Durovic, Bogdan Nolic, Nevena Lukovic, Jelena Jovanovic, Andrea Stefanovic, Natasha Sekuljica, Dusan Mijin

Isi Artikel 1

Tujuan Penelitian :

Untuk mengevaluasi dan membandingkan ekstraksi dan efisiensi ekstraksi asam fenolat menggunakan berbagai perlakuan pada biji kedelai kuning varietas Laura melalui gelombang ultrasonik getaran berkekuatan tinggi dan ekstraksi menggunakan microwave menggunakan panas listrik.

Metode Penelitian

1. Desain Penelitian :
Desain penelitian yang digunakan eksperimental laboratorium
2. Populasi dan sampel :
 - a. Populasi yang digunakan biji kedelai kuning genotipe "Laura".
 - b. Sampel yang digunakan biji kedelai kuning yang digiling dengan menggunakan ayakan berdiameter 500 mikrometer. Sampel dihilangkan lemaknya dengan petrol eter menggunakan ekstraktor soxhlet selama 4 jam. Sampel disimpan dalam freezer sebelum ekstraksi.
3. Instrumen :
Microwave Synthesis Reactor, Gelombang Ultrasonik daya tinggi, *Soxhlet extractor*, *Freezer*, Alat untuk uji aktivitas dan penentuan kadar fenol, flavonoid, yaitu seperangkat alat gelas (labu takar, tabung reaksi dan kuvet UV-Vis), Spektrofotometer UV-VIS, Oven, *incubator*, alat timbang (neraca analitik), Mikropipet dan propipet, Ekstraktor soxhlet
4. Metode Analisis :
 - a. Ekstraksi menggunakan ultrasonik dengan cara 0,5 gram sampel tepung kedelai yang dihilangkan lemaknya ditambah 10 ml pelarut ultrasonik selama 2, 5, 10, 15 menit dengan sonikator tipe probe. Untuk ekstraksi dengan bantuan microwave menggunakan 0,5 gram tepung kedelai yang dihilangkan lemaknya kemudian ditambahkan

10 ml pelarut, diekstraksi menggunakan microwave selama 2, 5, 10 menit pada suhu 55, 65, 75 dan 85°C.

- b. Cara melakukan aktivitas antioksidan dengan DPPH. Aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri. 200 liter sampel diencerkan dengan larutan reagen Trolox (20, 50, 100, 150, 500, 750, dan 1000 M) ditambahkan 3,58 DPPH sehingga larutan (Konsentrasi akhir dalam metanol 0,1 mM) dalam tabung reaksi. Campuran tersebut disimpan ada suhu kamar di ruang gelap selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm dengan pelarut metanol. Semua pengukuran dinyatakan sebagai mean \pm SD dengan standar pembanding kurva reagen trolox ($\mu\text{mol TE/g d.m}$).
- c. Potensi aktivitas antioksidan pada biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merril) didapat dengan cara mencampurkan pelarut yang mengandung metanol, etanol, dan aseton murni atau dikombinasi dengan asam klorida untuk diuji efisiensi ekstraksi senyawa folat total dari tepung kedelai bebas lemak. Kandungan total fenol dibandingkan pada ekstraksi dengan berbagai pelarut metanol, etanol, dan aseton di ekstraksi dengan pelarut campuran yang mengandung aseton murni, metanol dan etanol didapat bahwa ada korelasi linier negatif antara TPC dan Log P sistem pelarut ($R^2 = 0,93$), menunjukkan bahwa TPC menurun dengan kolaritas pelarut.

Keberadaan sifat asam dalam pelarut tidak berpengaruh nyata terhadap ekstraksi antosianin dalam aseton.

- d. Senyawa metabolit yang terkandung dalam biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) yang berpotensi sebagai antioksidan. Penentuan kandungan fenol pada sampel dengan cara spektrofotometri menggunakan 2 jenis reagen yaitu *Folin-Denis* dan *Folin-Ciocalteu*. *Folin-Denis* adalah campuran natrium tungsten dan asam fosfomolibdat dalam asam fosfat (reagen ini terjadi endapan putih yang mengganggu penentuan kolorimetri fenol). Reagen *Folin-Ciocalteu* adalah campuran fosfomolibdat dan fonotungstat (penambahan litium sulfat dan bromin, yang mencegah pembentukan endapan dan mencapai sensitivitas serta reproduktifitas yang lebih besar). Proses dilakukan dengan mencampurkan 50 μL ekstrak biji kedelai, 3 mL air, 0,25 mL reagen Folin dan 750 μL 20% Na_2CO_3 selama 8 menit pada suhu kamar, kemudian ditambah 950 μL kedalam tabung reaksi dan di inkubasi pada suhu kamar yang gelap selama 2 jam. Absorbansi diukur pada 765 nm. Asam galat disiapkan dalam metanol pada konsentrasi 1,0 mg/mL. Konsentrasi total fenol dinyatakan sebagai mg GAE/g d.m. Kedua reagen Folin diencerkan dengan air dengan perbandingan 1:1 dengan mengencerkan larutan stok dengan metanol sampai konsentrasi 25, 50, 75, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$.

- e. Analisis statistik asam fenolat masing-masing perlakuan rangkap 3 disajikan sebagai nilai rata-rata \pm standar deviasi (SD). Analisis varians (ANOVA) dengan membandingkan efek pra-perlakuan ultrasonik dan gelombang mikro untuk menentukan perbedaan dari kelompok hasil secara signifikan $P < 0,05$.

5. Hasil

Hasil terkait aktivitas antioksidan dapat terlihat pada tabel 3.2 berikut.

Tabel 3.2 Hasil Aktivitas Antioksidan.

Nilai aktivitas antioksidan	Aktivitas antioksidan (mol TE/g d.m.)	TPC (mg GAE/g d.m.)
MAE (microwave)	345,21	18,77
USP (Ultrasonik)	289,12	15,23

Keterangan :

MAE (mol TROLOX eq/g d.m.) = ekstraksi gelombang mikro

TPC (mg Galat Acit Ekvivalen/g d.m.) = ekstraksi analisis total isi fenol

USP = ekstraksi bantuan probe ultrasonik

TE = *Trolox Ekvivalen*

GAE = *Gallic Acid Ekvivalen*

g = gram

d = dry

m = massa

Tabel 3.3 Perbandingan kandungan total fenol pada 2 reagen
(mg GAE/g d.m)

Ekstraksi	Reagent <i>Folin Denis</i>	Reagen <i>Folin Ciocalteu</i>
Metanol + 10 % HCL (85:15 %v/v)	2,72±0,02	3,65±0,03
acetone + 10 % HCL (85:15 %v/v)	2,66±0,03	3,31±0,03
etanol + 10 % HCL (85:15 %v/v)	2,48±0,02	3,07±0,04
70% Metanol + 70% aseton (1:1)	2,14±0,03	3,62±0,04
80 %Metanol	1,88±0,02	2,27±0,02
80 % aseton	2,54±0,04	3.05±0,05
50 % aseton	2,65 ±0,03	2,92±0,04
80 % etanol	2,36±0,05	2,78±0,03

Pada tabel 3.2., ekstraksi menggunakan MAE memiliki aktivitas antioksidan lebih besar dibandingkan dengan ultrasonik tetapi tidak berbeda signifikan ($p < 0,05$). Hal ini dipengaruhi kandungan total fenol pada MAE lebih besar dibandingkan dengan USP tetapi terdapat perbedaan signifikan pada kandungan fenol ($p > 0,05$). Perbandingan kandungan fenol dengan 2 jenis reagen yang berbeda menghasilkan hasil total fenol dengan reagen *Folin Ciocalteu*, kandungan total fenolnya lebih tinggi dibandingkan dengan *Folin Denis*.

Kesimpulan

Ekstraksi biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) dengan campuran metanol (kandungan asam fenolat) MAE sebesar 345,21 mg TE/g d.m. sebagai

antioksidan bernilai tinggi dan sebanding dengan TPC (*Total Phenolic Content*) sebesar 18,77 mg GAE/g d.m. sebagai total isi fenol. Senyawa metabolit sangat tinggi pada aktivitas antioksidan karena kandungan senyawa isoflavon.

2. Artikel Kedua

Judul Artikel : Antioxidant and Elastase Inhibitor from Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and Its Compound (*Daidzein*)

Nama Jurnal : Journal of Biomedicine and Translational Research

Penerbit : Faculty of Medicine Diponegoro University and Indonesian Medical Association

Volume & Halaman : vol 6, no. 1 & 11-14

Tahun Terbit : 2020

Penulis Artikel : Cendy Juliana, I Nyoman Ehrich, Erni Girsang, Ali Napiyah Nasution, Wahyu Widowati

Isi Artikel 2

Tujuan Penelitian :
Mengevaluasi aktivitas antioksidan dan antipenuaan dari ekstrak biji kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merrill) serta komponen senyawa metabolit daidzein.

Metode Penelitian

1. Desain Penelitian :

Desain penelitian yang digunakan eksperimental laboratorium

2. Populasi dan sampel :

- a. Populasi yang dipakai biji kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merrill)
- b. Sampel yang dipakai biji kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merrill) dikeringkan menggunakan lampu pijar untuk mempercepat pengeringan. Kemudian digiling dan diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan etanol 70% selama 3 hari pada suhu ruang. Filtrat yang dihasilkan dengan diuapkan bersama pelarut dengan rotary evaporator pada suhu 50°C, sehingga diperoleh hasil ekstrak kental.

3. Instrumen :

Macerator, Evaporator, pH meter, Tabung Erlenmeyer, Multiskan Go Reader, Mikropipet (1-10 µl, 50- 200 µl, 100-1000 µl), Tips (1-10 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl), Tabung Falcon (15 ml, 50 ml), Tube Effendorf (1,5 ml), 96 well plate, *Analytical Balance*, Vortex.

4. Metode Analisis :

- a. Sampel larutan ekstrak kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) sebanyak 2 µl dan daidzein dengan konsentrasi (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml), kemudian ditambah 198 µl ABTS. Larutan baku 200 µL ABTS dan 200 µL DMSO dimasukkan microplate di tutup serta di inkubasi

37°C selama 6 menit. Hasil pengukuran dari absorbansi dan dibaca microplate pada panjang gelombang 745 nm.

b. Aktivitas antioksidan diukur dengan IC₅₀ dengan menggunakan

$$\% \text{ scavenging activity} = [(\text{control-sampel}) / \text{control}] \times 100\%$$

5. Hasil

Hasil terkait aktivitas antioksidan terlihat pada tabel 3.4 berikut.

Tabel 3.4 Hasil Aktivitas Antioksidan Kedelai Hitam

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL) Rata-rata
Kedelai Hitam	77,39 + 4,05
Daidzein Murni	83,34 ± 3,89

Hasil Penelitian

Kedelai hitam merupakan tanaman tropis yang dapat tumbuh di Indonesia. Biji kedelai mengandung senyawa aglikon isoflavon salah satunya adalah daidzein, senyawa ini juga mengandung genistein. pada penelitian ini, pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan ABTS, metode ABTS mengukur kemampuan relatif antioksidan berdasarkan hilangnya warna biru akibat antioksidan yang menyumbangkan spektrum hidrogen sebesar 745 nm. tabel 3.4 menunjukkan reduksi Abts pada deidzein lebih besar dibandingkan dengan biji kedelai hitam karena deidzein

merupakan senyawa murni yang sangat aktif. kedelai hitam memiliki kemampuan untuk menghambat hidolisiselastin atau fibrilin.

Kesimpulan

Ekstrak kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merrill) memiliki potensi aktivitas antioksidan melalui oksidasi ABTS menggunakan perhitungan IC_{50} dengan nilai rata-rata $77,39 \pm 4,05 \mu\text{g/mL}$. Sedangkan kandungan senyawa metabolit yang terdapat dalam biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) yang berpotensi sebagai antioksidan dengan pengurangan ABTS adalah daidzein murni yang bernilai IC_{50} sebesar $83,34 \pm 3,89 \mu\text{g/mL}$ hal ini karena kandungan senyawa daidzein aglikon isoflavon yang tinggi yang terdapat pada biji kedelai.

3. Artikel Ketiga

Judul Artikel	: Bioprocessing of soybeans (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) by solid-state fermentation with <i>Eurotium cristatum</i> YL-1 improves total phenolic content, isoflavone aglycones, and antioxidant activity
Nama Jurnal	: Royal Society of Chemistry
Penerbit	: Creative Commons Attribution-Non Commercial 3.0 Unported Licence
Volume & Halaman	: vol 10, Hal 16928-16941

Tahun Terbit : 2020
Penulis Artikel : Yulian Chen, Yuanling Wang, Jiayu Chen,
Hao Tang, Chuanhua Wang, Zongjun Li, Yu
Xiao

Isi Artikel 3

Tujuan Penelitian :

Mengkaji aktivitas antioksidan dari kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) selama difermentasi dengan beberapa periode.

Metode Penelitian

1. Desain Penelitian :
Penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium.
2. Populasi dan sampel :
 - a. Populasi yang digunakan adalah biji kedelai alkali (*Glycine max* (L.) Merrill)
 - b. Sampel yang digunakan adalah Ekstraksi biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill)
 - c. Cara ekstraksi adalah kedelai di de-ionisasi direndam selama 60 menit pada suhu kamar. Kedelai alkali yang dihasilkan disterilisasi dalam autoklaf selama 25 menit pada suhu 121⁰C. Kedelai alkali yang dihasilkan diinokulasi pada suhu 25⁰C dengan suspensi *E.Cristatumspora* (5 ml/100 g). Diinokulasi 15 hari pada suhu 28⁰C untuk bioproses.

Sampel diambil secara aseptik pada 0, 2, 4, 6, 8, 10 dan 15 hari untuk dianalisis. Sampel dikering-bekukan dan dihancurkan menggunakan penggiling listrik. Kemudian disaring dengan saringan 60 mesh. Dan disimpan pada suhu 4⁰C pada ruangan gelap.

3. Instrumen :

M40Y, *hemocytometer*, electric grinder, Evaporator vakum RE-52, (3–18R berpendingin centrifuge, A ZORBAX SBC18 reverse-phase column (Eclipse Plus, Agilent Technologies, USA), (Waters 2998 PDA Detector; Waters Co., Milford, MA), vortex mixer

4. Metode Analisis :

Penentuan Kandungan Senyawa Metabolit

a. Penentuan Kandungan Fenol Total

Metode *Folin-Ciocalteu* diterapkan untuk menentukan kandungan fenolat dari sampel yang diteliti. Caranya adalah 2,3 ml air deionisasi ditambahkan dalam 0,2 mL ekstrak sampel, Kemudian dicampur 0,5 ml reagen *Folin-Ciocalteu* tadi. Setelah 1 menit inkubasi 2 ml natrium karbonat (75 g/L) ditambahkan untuk memulai reaksi dan dipertahankan selama 2 jam pada suhu sekitar 27⁰C ditempat gelap. Hasil absorbansi dicatat pada panjang gelombang 760 nm setelah inkubasi. Larutan asam galat dengan konsentrasi 10-200 mg/mL⁻¹ disiapkan untuk menetapkan kurva standar. Sampel dilakukan rangkap 3 independen. TPC disajikan sebagai mg setara asam galat (GAE) dalam kedelai 2716 m g GAE/ g d.w.

b. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Sampel 2 ml larutan 0,4 m/mol dicampur dengan 2 ml larutan sampel uji kemudian dikocok kuat dengan vortex mixer selama 30 menit ditempat gelap pada suhu kamar dengan mengukur absorbansi pada 517 nm. Kurva kalibrasi disiapkan untuk menentukan kapasitas antioksidan yang setara dengan vitamin c. Hasilnya vitamin c dalam mg setara dengan 1 g kedelai kering (μg VCE per g d.w.).

c. Penentuan antioksidan dengan metode ABTS (ABTSc+)

ABTSc+ larutan stok didapat dengan mencampur 2,45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ dengan 7 mM ABTS yang diinkubasi pada suhu kamar selama 12 jam di ruang gelap. Untuk mengencerkan ABTSc+ larutan stok digunakan etanol pada absorbansi dari 0,70 dan 0,02 dengan panjang gelombang 734 nm. Kemudian ditambahkan 1 ml ekstrak sampel kedelai ke dalam 4 ml ABTSc+ dan dikocok sehingga mendapatkan absorbansi campuran selama 6 menit dalam gelap. Hasil kalibrasi kurva konsentrasi vitamin C untuk menentukan kapasitas antioksidan yang setara vitamin C, kemudian dibilas ABTSc+ hasil aktivitas sajian dalam μg vitamin C yang setara 1 g kedelai kering (μg VCE per g d.m.).

d. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode FRAP

Reagen FRAP dibuat dengan mencampur 10 ml TPTZ (10 mM dilarutkan 40 Mm HCl) dengan 10 ml besi klorida dalam (20 mM dalam 100 mL buffer asetat pH 3,6 (0,3 M)). 1 ml sampel uji dicampur dengan 5 ml FRAP kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam gelap selama 20

menit dan diabsorbansi pada panjang gelombang 593 nm. Hasil plot kurva kalibrasi menggunakan larutan standar FeSO_4 (100-1600 μM). Hasil FRAP di sajikan dengan hasil 19,7 mmol Fe (II) / g. d.w. berat kedelai. FRAP dengan nilai lebih besar merupakan indikasi aktivitas antioksidan yang lebih kuat.

Hasil Penelitian

Perubahan kadar fenol kedelai disajikan sebagai larutan asam galat yang diperoleh dengan konsentrasi 10-200 mg ml^{-1} diperoleh $y = 0,0021x + 0,002$ ($R_2^{1/4} 0,9996$) (2716 mg GAE/ g d.w.) pada hari ke 0. Pengambilan larutan DPPH menghilangkan warna ungu yang berbeda dari larutan karena bereaksi dengan antioksidan yang mencegah reaksi berantai radikal dengan menyediakan atom hidrogen sebesar 818 (mg GAE/g d.m.). Aktivitas pengambilan ABTSc+ untuk menentukan kapasitas antioksidan setara dengan vitamin C berdasar grafik sebesar 4700 (μg VCE per g d.w.). Larutan standar dievaluasi antioksidannya pada persamaan kurva kalibrasi merupakan indikasi aktivitas antioksidan yang lebih kuat yaitu $y = 0,0013x + 0,0012$ ($R_2^{1/4} 0,9998$) hasil FRAP di sajikan dengan hasil mmol Fe (II) per g berat kedelai. Kedelai diproses dengan mikroorganisme mempromosikan biotransformasi iso kedelai ditambah afone dari glukosida menjadi aglikon yang berkontribusi pada peningkatan aktifitas antioksidan.

Hasil terkait aktivitas antioksidan dapat terlihat pada tabel 3.5 berikut :

Tabel 3.5. Hasil Aktivitas Antioksidan pada hari ke 0

Nilai aktivitas antioksidan	TPC (m g GAE/ g dw)	DPPH (mg GAE/g d.m.)	ABTSc+ (μ g VCE/ g d.w.)	FRAP (mmol FE(II) / g d.w.)
Ekstrak Kedelai	2716	818	4700	19,7

Keterangan

TPC : Kandungan fenolat total

DPPH : α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl

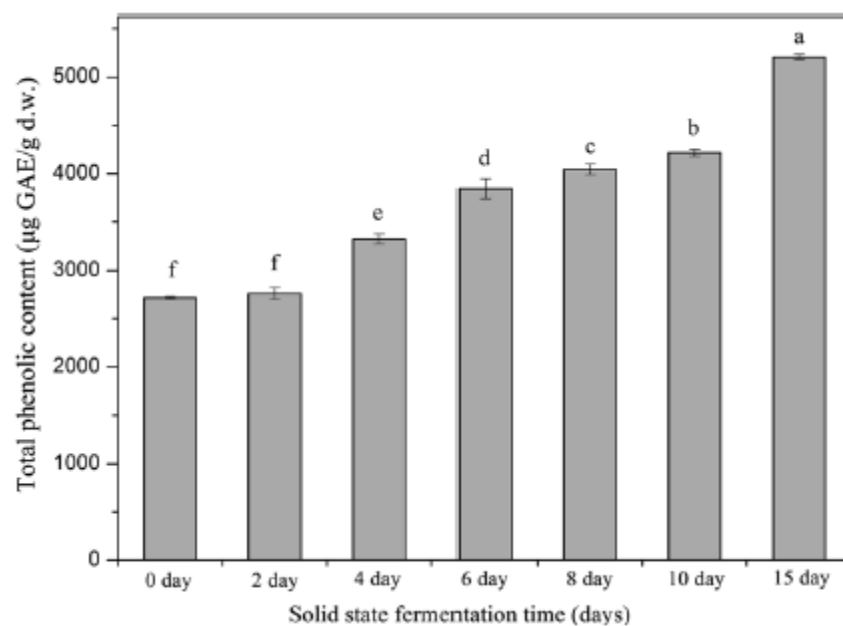
ABTSc+ : 2,2-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic asam) garam diammonium 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil asam askorbat

FRAP : Kekuatan antioksidan pereduksi besi.

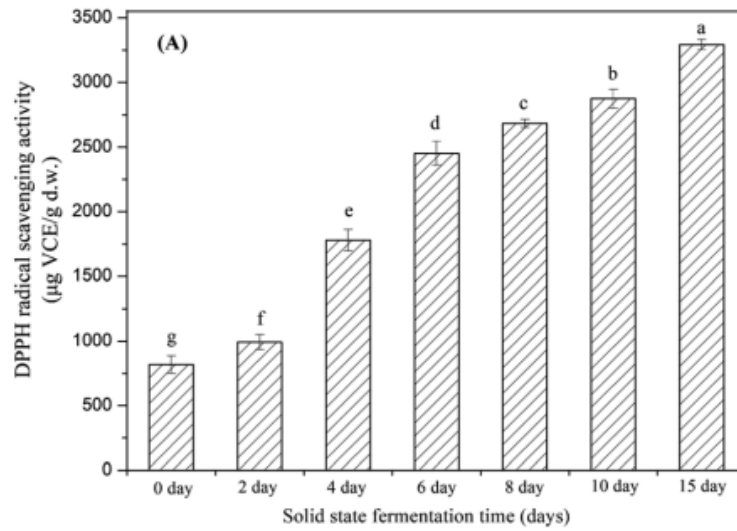
g : Gram

d : Dry

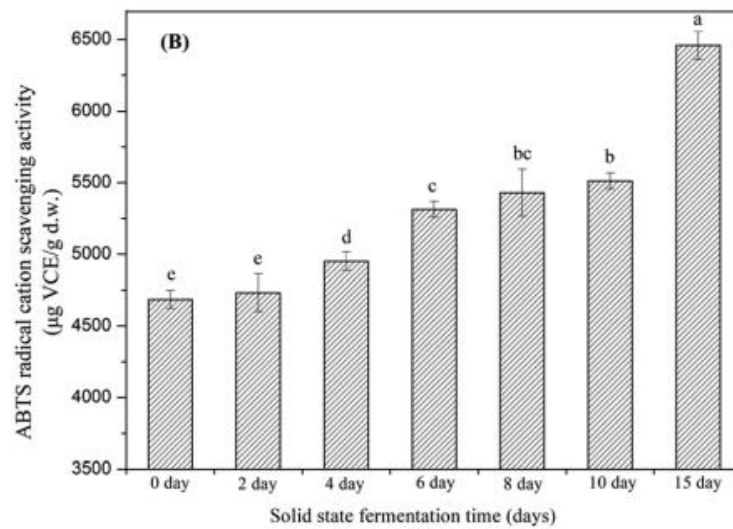
w : Weight



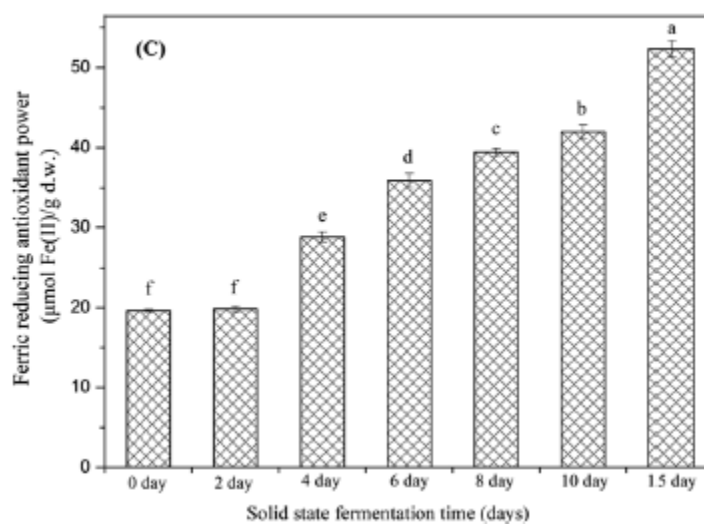
Gambar 3.1. Kandungan total fenol dengan perbedaan waktu fermentasi



Gambar 3.2. Penghambatan radikal DPPH berdasarkan waktu fermentasi



Gambar 3.3. Penghambatan radikal ABTS berdasarkan waktu fermentasi



Gambar 3.4. Hasil Reduksi ion Ferri berdasarkan waktu fermentasi

Tabel 3.6. Kandungan senyawa isoflavon pada biji kedelai berdasarkan waktu fermentasi (hari) 0 hari

Isoflavon	Kadar (µg/gdw)						
	0	2	4	6	8	10	15
Glukosida							
Daidzin	730±19	724±20	644±17	597±14	475±11	384±11	150±18
genistin	954±9	940±10	890±2	873±19	793±19	685±19	361±9
Total	1685±24	1664±25	1534±19	1471±29	1268±29	1069±22	511±26
Glukosida							
Aglikon							
Daidzein	74±6	84±3	149±3	248±5	303±5	497±16	777±12
Genistein	79±3	85±6	128±6	212±5	269±6	359±10	669±11
Total	154±4	170±7	277±9	459±10	572±5	856±24	1446±23
aglikon							

Biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) memiliki kandungan senyawa metabolit isoflavon berupa glukosida yaitu daidzin dan genistin dan aglikon berupa daidzein dan genistein. Kandungan isoflavon pada biji kedelai mengalami perubahan akibat lama waktu fermentasi. Pada isoflavon glukosida, semakin lama waktu fermentasi mengalami penurunan kadar totalnya. Pada hari ke 15 fermentasi, total glukosida yang dihasilkan paling rendah dari perlakuan fermentasi hari sebelumnya. Pada isoflavon aglikon, semakin lama waktu fermentasi mengalami kenaikan kadar dan total aglikon pada hari ke 15, menunjukkan kadar paling tinggi. Hal ini selaras dengan gambar 3.1 sampai 3.4, yang mana semakin lama waktu fermentasi semakin tinggi kadar total fenol, penghambatan radikal DPPH, Abts dan reduksi ion ferri. Berdasarkan data tersebut, kandungan senyawa metabolit yang berperan terhadap aktivitas antioksidan adalah aglikon daidzein dan genistein yang akan bertambah kadarnya sesuai dengan lama waktu fermentasi.

Kesimpulan

Hasil kandungan fenol, DPPH, ABTSc+ dan FRAP menunjukkan bahwa adanya peningkatan fenolat dan aglikon selama proses fermentasi. Hal ini menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam potensi mengkatalisis senyawa pembekalan fenolat dan aglikon bebas kedelai sebagai antioksidan. Kandungan isoflavon aglikon berbanding terbalik dengan isoflavon

glukosida. Keterangan aglikon isoflavon = (daidzin, genestin, TAI) berbanding terbalik dengan isoflavon glukosida (daidzin, genestin, TGI).

4. Artikel Keempat

Judul Artikel : Evaluasi Komposisi Gizi dan Sifat Antioksidatif Kedelai Hitam Malika (*Glycine max* (L.) Merril) Akibat Penyangraian

Nama Jurnal : Agroindustrial Technology Journal

Penerbit : ATJ Journal

Volume & Halaman : vol 2 & hal.82 - 90

Tahun Terbit : 2018

Penulis Artikel : Wahidah Mahanani Rahayu, Endah Sulistiawati

Isi Artikel 4

Tujuan Penelitian :

Mengevaluasi pengaruh penyangraian terhadap kandungan aktivitas senyawa antioksidan pada kedelai (*Glycine max* (L.) Merril) varietas Mallika.

Metode Penelitian

1. Desain Penelitian :
Desain penelitian yang digunakan eksperimental laboratorium.
2. Populasi dan sampel :

- a. Populasi yang digunakan biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merril) hitam varietas Malika
 - b. Sampel yang digunakan biji kedelai hitam disangrai suhu 150⁰C dan 200⁰C selama 15 dan 30 menit dan non sangrai, kemudian digiling dan diayak dengan ayakan 60 mesh diukur pada ekstrak etanolik kedelai hitam dan etanol 96% (rasio 1:8 b/v)
3. Instrumen :
- Coffee Roaster, Evaporator Vacum, Semi mikro kjeldal (analisis protein), Soxhlet (lemak), Termografrimetri (kadar air), Gravimetri (kadar abu), Spektrofotometer (Shimadzu UV-1601), SPSS 19.0 Statistic Software (One-Way ANOVA)
4. Metode Analisis :
- a. Bubuk kedelai direndam dan diaduk dalam heksan (rasio 1:6 b/v) selama 2 jam untuk menghilangkan lemak (*defatting*), disaring kemudian dihamparkan selama 4 jam pada suhu kamar untuk menghilangkan residu heksan. Selanjutnya bubuk kedelai direndam dan diaduk dalam etanol 96% (dalam rasio 1:8 b/v) selama 2 jam kemudian disaring menggunakan evapulator vakum sampai suhu 40⁰C.
 - b. Metode DPPH
Aktivitas antioksidan dilakukan pengambilan larutan 0,1 mL ekstrak 100 ppm pada metanol PA ditambah 0,05 ml dan larutan DPPH 0,5 mM dalam metanol. Selanjutnya 4 ml etanol ditambahkan dan didiamkan selama 60 menit dalam gelap. Larutan baku mengandung 0,5

ml DPPH dan 4 ml metanol diabsorbansi pada panjang gelombang 516 nm menggunakan spektrofotometer. Aktivitas peningkatan DPPH dihitung dari selisih absorbansi baku dan absorbansi sampel, dibagi absorbansi baku dalam persen.

- c. Aktivitas senyawa fenolik sebanyak 0,25 ml ekstrak ditambah 0,75 ml aquadest kemudian diambil 0,02 ml (3x ulangan) ditambah 1 ml reagen Folin-Ciocalteu. Kemudian di gojog dan didiamkan selama 8 menit serta ditambah 0,8 ml larutan Na_2CO_2 2%. Kemudian didiamkan 30 menit diukur absorbansi dengan panjang gelombang 760 nm menggunakan spektrofotometer. Total fenol di ukur dengan kurva standar asam galat dengan konsentrasi 10-100 mg/ml.

- d. Analisis Total Flavonoid

Sebanyak 0,1 ml ekstrak ditambah 4 ml aquadest dan 0,3 ml NaNO_2 5% (b/v). Setelah digojog selama 5 menit ditambah 0,3 ml AlCl_3 10 % (b/v) digojog lagi selama 6 menit kemudian ditambah 2 ml NaOH 1 M dan 2,4 ml Aquadest. Absorbansi pada panjang gelombang 510 nm menggunakan spektrofotometer. Total flavonoid dihitung dengan kurva standar Quercetin pada konsentrasi 1-8 mg/ml.

Sebanyak 0,03 ml ekstrak etanolik kedelai hitam sangrai dimasukkan dalam 2 tabung reaksi, tabung 1 ditambah larutan KCl 0,025 (pH 1) sedang tabung 2 ditambahkan Natrium asetat 0,4 M (pH 4,5). Kedua tabung tersebut sebanyak 11,97 ml. Setelah 15 menit didiamkan absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang

520 nm dan 700 nm. Antosianin (dalam equivalen sianidin 3-glukosida, mg/ 100 g). Dihitung dengan rumus

$$\frac{A \times BM \times FP \times 103}{\epsilon \times l}$$

Keterangan :

A = selisih absorbansi panjang gelombang pada pH 1,0 dan pH 4,5.

BM = berat molekul sianidin-3-glukosida sebanyak 449,2 g/mol.

FP = Faktor pengenceran

ϵ = koefisien ekstingsi molar sianidin-3-glukosida sebesar 26.900

l = *pathlength* dalam cm.

Hasil Penelitian

Hasil aktifitas antioksidan ekstrak etanolik kedelai hitam malika pada kemampuan penangkapan radikal (*% radical scavenging activity*) DPPH dapat meningkatkan aktivitas antioksidan pada suhu 150⁰C selama 30 menit pada kisaran 13,81-82,5 % yang berarti peningkatan 11%. Penyangkraian pada suhu 200⁰C selama 30 menit meningkatkan aktivitas antioksidan tertinggi sampai 82,8% dibanding kedelai non sangrai dimana hal ini diukur dengan metode DPPH.

Tabel 3.7. Hasil Aktivitas Antioksidan

DPPH	Non sangrai	Perlakuan			
		150°C		200°C	
		15 menit	30 menit	15 menit	30 menit
Aktivitas Antioksidan (% radical scavenging activity)	38,002 ± 0,08	29,46 ± 0,16	44,43 ± 0,8	43,25 ± 0,08	69,35 ± 0,41

Tabel 3.8 Hasil kandungan senyawa metabolit penyangraian suhu 200°C 30 menit

Parameter	Kandungan senyawa metabolit
Total fenol	56,96 mg GAE/g berat kering
Total Flavonoid	14,39 mg QE/ g berat kering
Antosianin	0,125 mg CE/ g berat kering

Keterangan :**GAE** : Gallic acid equivalen**QE** : quercetin equivalen**CE** : cyanidin-3-glycoside equivalen

Perlakuan penyangraian biji kedelai mempengaruhi aktivitas antioksidan dan kandungan senyawa metabolit. Biji kedelai yang tidak disangrai memiliki aktivitas antioksdan lebih rendah dibandingkan dengan

biji kedelai yang disangrai. Pada penyangraian suhu 200°C selama 30 menit menghasilkan aktivitas antioksidan paling tinggi disebabkan karena adanya kandungan senyawa metabolit berupa fenol, flavonoid dan antosianin yang dapat menghambat radikal bebas.

Kesimpulan

Penyangraian dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dengan aktifitas tertinggi pada perlakuan 200°C selama 30 menit sebesar 82,5% lebih tinggi dari kedelai non sangrai. hal ini merupakan sifat oksidatif kedelai hitam Malika.

5. Artikel Kelima

Judul Artikel : *Antioxidant Activities of Black Soybean Extract (Glycine max (L.) Merr) and Daidzein as Hydroxyl and Nitric Oxide Scavengers*

Nama Jurnal : Research Article

Penerbit :Majalah Kedokteran Bandung

Volume & Halaman : vol 52 No.2

Tahun Terbit : 2020

Penulis Artikel : Mulia Irwan, Erni Girsang, Ali Napiyah Nasution, I Nyoman Ehrich Lister, Annisa Amalia, Wahyu Widowati

Isi Artikel 5

Tujuan Penelitian :

Mengevaluasi aktivitas antioksidan yang bertindak sebagai pemerangkap radikal bebas serta $\bullet\text{OH}$ dan NO dari ekstrak etanol 70% kedelai hitam (BSE) dan senyawa daidzein.

Metode Penelitian

1. Desain Penelitian :

Desain penelitian yang digunakan eksperimental analisis.

2. Populasi dan sampel :

Populasi yang digunakan biji ekstraksi kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*).

Sampel yang digunakan biji kedelai hitam kering 250 g dihaluskan dan dimaserasi dengan etanol suling dengan 50%. Etanol disaring setiap 24 jam kemudian dikondensisasikan dengan rotary evaporator dengan suhu 50°C menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan hasil dengan konsentrasi (4, 5, 10, 11, 12) disimpan pada suhu -20°C .

3. Instrumen :

Rotary evaporator (Zhengzhou Well-known, RE-201D), MultiskanTM GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific), Spektrofotometer (Shimadzu UV-1601), SPSS 20.0 Statistic Software

4. Metode Analisis :

a. Kandungan total fenol

Sampel sebanyak 15 ml (konsentrasi 1000g g/ml atau asam galat pada konsentrasi 50-1,56 g/ml didalam cawan dan ditambahkan 75% dari 75 liter pereaksi Folin-Ceucalteu 10% dan 60 liter natrium karbonat, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 50⁰C. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 700 nm. Nilai total fenol disajikan sebagai g setara asam galat (GAE) dalam 1 mg ekstrak.

- b. Kandungan flavonoid total BSE (*Black Soybaen Ekstrak*) metode kolorimetri alumunium klorida

Sampel sebanyak 75 µl (konsentrasi 1000 g/ml) dicampur dengan 75 liter 2% larutan alumunium klorida kemudian diinkubasi 10 menit pada suhu kamar. Absorbansi campuran diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 415 nm. Quartil pada konsentrasi (500 µg/ml – 3,9 µg/ml) sebagai standart. Total flavonoid dihitung dalam µg quarcetil equivalen (QE) didalam ekstrak.

- c. Aktifitas penghambatan radikal •OH

Ekstrak kedelai hitam dan daidzein, 30 µL konsentrasi sampel (10 µL FeCl₃ – EDTA, 5 µL /l 20 mM H₂O₂). Asam L-askorbat, 10 µL pada 28 mM deoxiribose dan 70 µL phospate buffer dikocok dan dinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Kemudian 25 µL 5% TCA dan 1% TBA ditambahkan untuk diinkubasi selama 30 menit pada suhu 80⁰C- 90⁰C. Absorbansi diukur panjang gelombang 532 nm menggunakan spektrofotometer.

d. Aktivitas penghambatan radikal NO

Sodium Nitroprusside (SNP) dilarutkan dalam air pada pH 7,2 menghasilkan NO. NO bereaksi dengan oksigen menghasilkan produk stabil (nitrat dan nitrit) kondisi aerobik. Reagen Greiss digunakan pada uji NO dengan larutan SNP 10 mM dalam larutan buffer fosfat, dicampur dengan konsentrasi (66,67-2,08 g/mL) BSE dan daidzein kemudian diinkubasi 2 jam pada suhu kamar 26⁰C. Selanjutnya ditambahkan reagen Greiss yang mengandung 1% sulfanilamid, 2% H₃PO₄ dan 0,1% N-(1-naphyl)etilena diamina dihidroklorida. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 546 nm.

Hasil Penelitian

Kandungan total BSE menggunakan setara asam galat, kandungan total fenol $7,78 \pm 0,20$ Mg GAE/Mg ekstrak. Flavonoid total BSE adalah $0,18 \pm 0,05$ μ g QE /mg ekstrak. Aktivitas antioksidan pada ekstrak biji kedelai (BSE) dan daidzein menggunakan penghambatan radikal \cdot OH dan NO sebagai perwakilan dari ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan RNS (*Reactive Nitrogen Species*). Hal ini dilakukan untuk evaluasi efek antioksidan BSE dan daidzein untuk 2 jenis radikal bebas.

Tabel 3.9. Hasil dari Ekstrak Kedelai Hitam dengan Asam galat sebagai Standard

Sample	Total Phenolic Content (Mg GAE/Mg extract)	Total Flavonoid Content (μg QE/mg extract)
BSE	7.78 ± 0.20	$0,18 \pm 0,05$

Tabel 3.10. Nilai IC₅₀ aktivitas $\cdot\text{OH}$ dan NO scavenging dari BSE dan daidzein

IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	BSE	Daidzein
$\cdot\text{OH}$	71,07	24,57
NO	71,60	35,68

Nilai IC₅₀ untuk daidzein lebih rendah ($24,57 \mu\text{g}/\text{mL}$) jika dibandingkan BSE ($71,07 \mu\text{g}/\text{mL}$) artinya menunjukkan BSE memiliki aktivitas penggolongan $\cdot\text{OH}$ lebih rendah. Daidzein memiliki nilai IC₅₀ terendah ($35,68 \mu\text{g}/\text{mL}$) jika dibandingkan BSE ($71,60 \mu\text{g}/\text{mL}$). Hal ini menunjukkan bahwa BSE memiliki aktivitas pengambilan NO lebih rendah dibanding daidzein.

Kesimpulan

Daidzein memiliki potensi aktivitas antoksidan lebih tinggi melalui pengambilan NO dan $\cdot\text{OH}$. Oleh karena itu daidzein berpotensi lebih untuk antipenuaan radikal bebas. BSE menunjukkan aktivitas yang kuat karena memiliki IC₅₀ pada daidzein. Persamaan reaksi transfer elektron kehilangan proton (SPLET) sekuensial dua langkah yang umum disajikan di bawah ini:



ΔG_b SPLET



Keterangan.

A = antioksidan

$(A-H)^{\cdot-}$ = anion antioksidan terdeprotonasi

R = radikal bebas

$(A-H)$ = radikal bebas setelah kehilangan hidrogen

$R^{\cdot-}$ = anion radikal bebas yang kurang reaktif dibanding radikal bebas yang sesuai

