

[Dashboard](#)

[Explore SINTA](#)

[Mutation History](#)

[List Verificator PT](#)

[My SINTA](#)

[Covid-19](#)

DETAIL DOCUMENT

## Research

### Detail Research

Verified by [Maria Dwi Budi Jumpowati](#) at 2022-08-13 21:07:27

NIDN Leader  
0520077201

Leader Name  
SRI HARTATI YULIANI



PDDIKTI Code PT (Leader)  
051012

Institution (Leader)  
Universitas Sanata Dharma

Title  
Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe

Skema Abbreviation  
PTUPT

Skema Name  
Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi

The First year of the proposal  
*Tahun Pertama Usulan*  
2016

Proposed Year of Activities  
*Tahun Usulan Kegiatan*  
2016

The Year of The Activity  
*Tahun Pelaksanaan Kegiatan*  
2017

Duration of activity  
*Lama Kegiatan*  
3 Year

Proposal Status  
didanai

Funds are approved  
Rp. 75.095.000,-

SINTA Afiliasi ID  
422

Funds Institution  
Universitas Sanata Dharma ✓ in sync with Sinta Affiliation

Target TKT  
TKT 0

Hibah Program  
Penelitian Desentralisasi

Focus Area  
Kesehatan

Fund Source Category  
Pemerintah

Fund Source

Country Fund Source  
ID

Research Member

#### SRI HARTATI YULIANI

Registered in Sinta using [SRI HARTATI YULIANI](#) ( Sinta ID : 5977336 )  
Status : Leader (Leader) | Universitas Sanata Dharma

#### ENADE PERDANA ISTYASTONO

Registered in Sinta using [ENADE PERDANA ISTYASTONO](#) ( Sinta ID : 31032 )  
Status : Member (Member 1) | Universitas Sanata Dharma

#### FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO

Registered in Sinta using [FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO](#) ( Sinta ID : 31047 )  
Status : Member (Member 2) | Universitas Sanata Dharma



## SURAT TUGAS PENELITIAN

No. 020d/ LPPM USD /IV/2017

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sanata Dharma Yogyakarta dengan ini memberikan tugas kepada:

Nama : Dr. Sri Hartati Yuliani, Apt.  
Pekerjaan : Dosen  
NIP/NIDN/Golongan : P.1828/ 0520077201  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Program Studi : Farmasi  
Fakultas : Farmasi  
Status : Ketua Peneliti

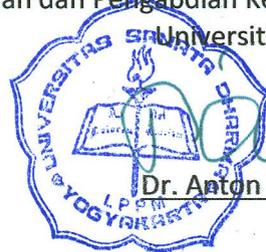
Untuk melaksanakan penelitian Desentralisasi yang didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan dengan:

Judul Penelitian : Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe  
Skim Penelitian : Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi  
Waktu Penelitian : April – Oktober 2017

Penerima tugas penelitian wajib mematuhi ketentuan-ketentuan penelitian sebagaimana diatur oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan.

Demikian surat tugas penelitian ini dibuat, mohon dilaksanakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 19 April 2017

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Sanata Dharma

Dr. Anton Haryono, M.Hum.

Ketua

**Tembusan:**

1. Yth. Rektor
2. Yth. Wakil Rektor I
3. Yth. Dekan/Direktur Pasca Sarjana
4. Yth. Ketua Program Studi
5. Arsip





## SURAT TUGAS PENELITIAN

No. 020d/ LPPM USD /IV/2017

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sanata Dharma Yogyakarta dengan ini memberikan tugas kepada:

Nama : Enade Perdana Istyastono, Ph.D., Apt.  
Pekerjaan : Dosen  
NIP/NIDN/Golongan : P.1969/ 0506087901  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Program Studi : Farmasi  
Fakultas : Farmasi  
Status : Anggota Peneliti

Untuk melaksanakan penelitian Desentralisasi yang didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan dengan:

Judul Penelitian : Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe  
Skim Penelitian : Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi  
Waktu Penelitian : April – Oktober 2017

Penerima tugas penelitian wajib mematuhi ketentuan-ketentuan penelitian sebagaimana diatur oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan.

Demikian surat tugas penelitian ini dibuat, mohon dilaksanakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 19 April 2017

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Sanata Dharma

Dr. Anton Haryono, M.Hum.

Ketua

**Tembusan:**

1. Yth. Rektor
2. Yth. Wakil Rektor I
3. Yth. Dekan/Direktur Pasca Sarjana
4. Yth. Ketua Program Studi
5. Arsip





## SURAT TUGAS PENELITIAN

No. 020d/ LPPM USD /IV/2017

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sanata Dharma Yogyakarta dengan ini memberikan tugas kepada:

Nama : Florentinus Dika Octa Riswanto, M.Sc.  
Pekerjaan : Dosen  
NIP/NIDN/Golongan : P.2389/ -  
Jabatan Fungsional : -  
Program Studi : Farmasi  
Fakultas : Farmasi  
Status : Anggota Peneliti

Untuk melaksanakan penelitian Desentralisasi yang didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan dengan:

Judul Penelitian : Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe  
Skim Penelitian : Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi  
Waktu Penelitian : April – Oktober 2017

Penerima tugas penelitian wajib mematuhi ketentuan-ketentuan penelitian sebagaimana diatur oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan.

Demikian surat tugas penelitian ini dibuat, mohon dilaksanakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 19 April 2017

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Sanata Dharma

Dr. Anton Haryono, M.Hum.

Ketua

**Tembusan:**

1. Yth. Rektor
2. Yth. Wakil Rektor I
3. Yth. Dekan/Direktur Pasca Sarjana
4. Yth. Ketua Program Studi
5. Arsip



**Bidang Unggulan: Farmasi/Penyakit Degeneratif dan Bahan Alam**  
**Kode>Nama Rumpun Ilmu: 405/Farmasetika dan Teknologi Farmasi**

HALAMAN JUDUL

LAPORAN AKHIR

PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**PENGEMBANGAN SEDIAAN PENYEMBUH LUKA BAGI PENDERITA DIABETES  
DENGAN BAHAN AKTIF EKSTRAK TEMPE**

**Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt. (NIDN: 0520077201)**

**ENADE PERDANA ISTYASTONO, Ph.D., Apt. (NIDN: 0506087901)**

**FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO, M.Sc. (NIDN: 0516108801)**

**UNIVERSITAS SANATA DHARMA**

**Oktober 2017**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe

**Peneliti/Pelaksana**  
Nama Lengkap : Dr. SRI HARTATI YULIANI, S.Si., M.Si.  
Perguruan Tinggi : Universitas Sanata Dharma  
NIDN : 0520077201  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Program Studi : Farmasi  
Nomor HP : 081328712851  
Alamat surel (e-mail) : srihartatiyuliani@usd.ac.id

**Anggota (1)**  
Nama Lengkap : ENADE PERDANA ISTYASTONO Apt, M.Sc., PhD  
NIDN : 0506087901  
Perguruan Tinggi : Universitas Sanata Dharma

**Anggota (2)**  
Nama Lengkap : FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO S.Farm,  
M.Sc.  
NIDN : 0516108801  
Perguruan Tinggi : Universitas Sanata Dharma

**Institusi Mitra (jika ada)**  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 75,095,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 457,397,000

Mengetahui,  
Dekan



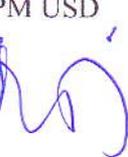
(Aris Widayati, M.Si, Ph.D., Apt)  
NIP/NIK NPP.1936

Kab.Sleman, 20 - 10 - 2017  
Ketua,



(Dr. SRI HARTATI YULIANI, S.Si., M.Si.)  
NIP/NIK

Menyetujui,  
Ketua LPPM USD



(Dr. Anton Haryono, M.Hum)  
NIP/NIK NPP. 1306

## IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe

2. Tim Peneliti

No	Nama	Jabatan	Bidang keahlian	Instansi asal	Alokasi waktu (jam/mg)
1.	Dr. Sri Hartati Yuliani, Apt	Ketua	Teknologi Farmasi	Fak. Farmasi USD	15
2.	Enade Perdana Istyastono, Ph.D., Apt	Anggota	Kimia Medisinal	Fak. Farmasi USD	7,5
3.	Fl. Dika Octa Riswanto, M.Sc.	Anggota	Analisis Farmasi	Fak. Farmasi USD	7,5

3. Objek Penelitian adalah ekstrak tempe, segi penelitian adalah standardisasi ekstrak, penelusuran target molekul ekstrak tempe dalam mempercepat penyembuhan luka diabetikum dan optimasi formula sediaan penyembuh luka diabetikum.

4. Masa Pelaksanaan

- Mulai : bulan Februari 2017
- Berakhir : bulan November 2019

5. Usulan Biaya DRPM Ditjen Penguatan Risbang

- Tahun ke-1 : Rp 75.095.000,-
- Tahun ke-2 : Rp 192.500.000,-
- Tahun ke-3 : Rp 189.802.000,-

6. Lokasi Penelitian: Laboratorium Hayati Imono, Laboratorium Analisis Pusat dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma

7. Instansi lain yang terlibat: -

8. Temuan yang ditargetkan adalah

- Metode optimasi ekstraksi yang akan menghasilkan ekstrak terstandar
- Mekanisme molekuler ekstrak tempe dalam mempercepat penyembuhan luka diabetikum
- Produk sediaan penyembuh luka diabetikum ekstrak tempe

9. Kontribusi mendasar bagi ilmu pengetahuan adalah **bukti ilmiah sampai pada mekanisme molekuler sediaan penyembuh luka diabetikum ekstrak tempe mampu mempercepat penyembuhan luka bagi penderita diabetes.**

10. Jurnal yang menjadi sasaran

- Majalah Obat Tradisional, nasional terakreditasi, ditargetkan pada tahun pertama sampai pada proses review
- Journal of Pharmaceutical Science and Research, internasional bereputasi, ditargetkan pada tahun kedua sampai pada proses review

11. Rencana luaran HKI, buku, dll

- Paten sederhana, tahun ketiga ditargetkan terdaftar
- Buku “Sediaan penyembuh luka berbahan aktif bahan alam”, tahun ketiga ditargetkan draft

## DAFTAR ISI

<b>Halaman Judul</b> .....	<b>i</b>
<b>Halaman pengesahan</b> .....	<b>ii</b>
<b>Identitas dan uraian umum</b> .....	<b>iii</b>
<b>Daftar isi</b> .....	<b>iv</b>
<b>Ringkasan</b> .....	<b>v</b>
<b>Bab 1. Pendahuluan</b> .....	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Permasalahan .....	2
C. Tujuan Penelitian.....	2
D. Urgensi Penelitian .....	2
E. Rencana Target Tahunan .....	3
<b>Bab 2. Tinjauan Pustaka</b> .....	<b>4</b>
A. Posisi Penelitian Ini Dalam Konteks Penelitian Luka Diabetikum.....	4
B. Mekanisme Molekuler Penyembuhan Luka Diabetikum .....	5
C. Genistein, Bahan Aktif Dalam Ekstrak Tempe .....	5
D. Sediaan Penyembuh Luka .....	6
E. Peta Jalan Penelitian .....	6
<b>Bab 3. Metodologi</b> .....	<b>8</b>
A. Alat Dan Bahan Penelitian .....	8
B. Cara Penelitian.....	8
<b>Bab 4. Hasil Sementara</b> .....	<b>11</b>
<b>Bab 5. Kesimpulan Sementara</b> .....	<b>16</b>
<b>Bab 6. Rencana Selanjutnya</b> .....	<b>16</b>
<b>Referensi</b> .....	<b>16</b>
<b>Lampiran</b> .....	<b>22</b>

## RINGKASAN

Indonesia adalah satu dari 10 negara dengan jumlah penderita diabetes terbesar yaitu 4,6% pada usia produktif dan diperkirakan akan semakin tinggi dalam 20 tahun ke depan. Sebanyak 25% penderita diabetes menderita ulcer pada kaki dan 84% diantaranya berakhir pada amputasi. Ulcer kaki pada penderita diabetes seringkali berakhir dengan amputasi karena terjadinya proses penyembuhan luka yang dihambat. Produksi faktor pertumbuhan menurun pada penderita diabetes. Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes menurun produksi VEGF, terhambatnya proses neovasculogenesis, turunnya jumlah eNOS yang berakibat menurunnya EPC yang bermigrasi ke area luka.

Genistein mempunyai aktivitas mempercepat penyembuhan luka dengan mekanisme stress karena oksidasi, memodulasi ekspresi proinflamatori sitokin, meningkatkan angiogenesis pada luka, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS. Melalui mekanisme tersebut genistein berpotensi mempercepat penyembuhan luka diabetikum. Sebagai sumber genistein digunakan tempe. Tempe merupakan kedelai yang telah mengalami fermentasi. Fermentasi terbukti meningkatkan genistein kedelai.

Pada tahun pertama akan dilakukan optimasi proses ekstraksi terhadap genistein dan daidzein. Desain penelitian yang digunakan adalah Desain Faktorial 3 faktor 2 level. Faktor yang digunakan adalah lama ekstraksi, konsentrasi etanol dan rasio penyari-tempe. Penyari yang digunakan adalah etanol karena genistein dan daidzein, isoflavon terbanyak dalam tempe, larut dalam etanol.

Hasil menunjukkan bahwa untuk genistein dan daidzein, waktu ekstraksi mempunyai efek paling signifikan disusul dengan kadar etanol. Ukuran partikel tempe kering mempunyai efek negatif terhadap kadar genistein dan daidzein yang terekstrak dari tempe. Kondisi optimum yang dapat digunakan untuk mengekstrak genistein dan daidzein dalam jumlah maksimal adalah kadar etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit.

Luaran wajib yang telah dihasilkan tahun ini adalah HKI terdaftar yang berjudul “Metode Ekstraksi Isoflavon Aglikon Dari Kedelai Dan Produk Turunan Dari Kedelai Tersebut” dengan no pendaftaran paten PID201706447. Luaran tambahan adalah berupa publikasi ilmiah pada jurnal internasional bereputasi terindeks Scopus 1) Optimization of genistein and daidzein extraction from tempeh-fermented product of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) assisted by a validated RP-HPLC method dalam tahap submitted pada “Journal of Pharmaceutical Sciences and Research”; 2) Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) in Wound Healing of Diabetic Foot Ulcer: Molecular Target and Structure-based Drug Design dalam tahap review pada “Wound Medicine”. Presentasi oral pada seminar internasional telah dilaksanakan pada “Ma Chung International Conference on Chromatography” dengan judul makalah Analytical Method Validation and Determination of Daidzein and Genistein in Ethanolic Extract of Tempeh Using RP-HPLC.

## BAB 1. PENDAHULUAN

### A. Latar belakang

Diabetes adalah penyakit kronis dan apabila terjadi komplikasi dengan penyakit lain akan berakibat serius pada penderitanya. Indonesia adalah salah satu dari 10 negara dengan penderita diabetes terbesar yaitu 4,6% penderita pada usia produktif (Mihardja et al., 2014). Penderita diabetes mempunyai resiko menderita ulcer kaki sebesar 25% (Boulton et al., 2005; Cavanagh et al., 2005). Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan penderita sehat (Hamed et al., 2010). Akibat penyembuhan yang lama ini, 84% penderita ulcer kaki pada pasien diabetes menjalani amputasi (Brem and Tomic-Canic, 2007). **Ketersediaan sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes sangat potensial dikembangkan.**

Pada penderita diabetes produksi beberapa faktor pertumbuhan pada proses penyembuhan luka menurun (Brem and Tomic-Canic, 2007) diantaranya Vascular Epythelial Growth Factor (VEGF) (Hamed et al., 2010), respon angiogenesis (Galiano et al., 2004), makrofag (Maruyama et al., 2007), akumulasi kolagen, jumlah jaringan granulasi, penurunan migrasi dan proliferasi keratinosit dan fibroblas (Brem and Tomic-Canic, 2007) serta keseimbangan antara extracellular matrix (ECM) dan remodellingnya oleh MMPs (Lobmann et al., 2002). Penurunan produksi faktor pertumbuhan tersebut menyebabkan proses penyembuhan luka pada penderita diabetes lebih lambat dibandingkan pada pasien normal (Brem and Tomic-Canic, 2007).

Genistein, isoflavon kedelai, telah terbukti menurunkan stress karena oksidasi, memodulasi ekspresi proinflamatori sitokin (Park et al., 2011), meningkatkan angiogenesis pada luka, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Tie et al., 2013). Mekanisme genistein dalam proses penyembuhan luka tersebut terbukti mempercepat penyembuhan luka diabetikum (Eo et al., 2015). **Genistein dalam ekstrak tempe sangat potensial dikembangkan sebagai sediaan penyembuh luka diabetikum.** Sebagai sumber genistein digunakan tempe. Tempe merupakan kedelai yang telah mengalami fermentasi. Fermentasi terbukti meningkatkan genistein kedelai (Chaiyasut et al., 2010; Hong et al., 2012).

Penelitian mengenai “Sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes dengan bahan aktif ekstrak tempe” ini sesuai, sejalan dan mendukung **Bidang Unggulan Universitas Sanata**

**Dharma yaitu Penyakit degeneratif dan bahan alam.** Penelitian ini mengambil **Topik Unggulan Universitas yaitu Pengembangan sediaan farmasi mengembangkan obat bahan alam untuk penyakit degenerative berbasis bukti ilmiah (database obat bahan alam Indonesia, pendekatan farmasi klinis dan komunitas).**

## B. Permasalahan

Permasalahan yang diangkat dalam penelitian ini adalah penggunaan ekstrak tempe sebagai bahan aktif penyembuh luka diabetikum dan pengembangan sediaan penyembuh luka diabetikum.

## C. Tujuan Penelitian

Penelitian “Pengembangan sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes dengan bahan aktif ekstrak tempe” mempunyai tujuan khusus

Tahun 1.

1. Optimasi ekstraksi genistein sebagai senyawa yang paling banyak diketahui aktivitasnya dalam ekstrak tempe.
2. Standardisasi ekstrak tempe sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum

Tahun 2.

1. Menelusuri target molekuler ekstrak tempe dalam mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum
2. Menentukan kadar ekstrak tempe dalam mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum

Tahun 3.

1. Memformulasi sediaan penyembuh luka diabetikum yang efektif, aman dan nyaman.

## D. Urgensi Penelitian

Indonesia adalah salah satu dari 10 negara dengan penderita diabetes terbesar yaitu 4,6% penderita pada usia produktif (Mihardja et al., 2014). Penderita diabetes mempunyai resiko menderita ulcer kaki sebesar 25% (Boulton et al., 2005; Cavanagh et al., 2005). Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes memerlukan waktu yang lebih lama (Hamed et al., 2010) sebagai akibat 84% penderita ulcer kaki pada pasien diabetes menjalani amputasi (Brem and

Tomic-Canic, 2007). Selama ini belum ada sediaan yang khusus digunakan untuk penyembuhan luka diabetikum. **Pengembangan sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes sangat penting untuk dilakukan.**

Genistein adalah bahan aktif dalam ekstrak tempe yang banyak diketahui mempunyai aktivitas biologis. Genistein telah banyak diteliti berpotensi mempercepat penyembuhan luka (Emmerson et al., 2010). Genistein telah terbukti menurunkan stress karena oksidasi, memodulasi ekspresi proinflamatori sitokin (Park et al., 2011), meningkatkan angiogenesis pada luka, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Tie et al., 2013). Luka pada penderita diabetes mengakibatkan stress oksidasi meningkat, kenaikan aktivitas iNOS dan menurunnya angiogenesis pada luka (Brem and Tomic-Canic, 2007), sehingga **karena aktivitasnya genistein sangat potensial dikembangkan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum.**

**Kebaharuan yang diharapkan dari penelitian ini** adalah penggunaan ekstrak tempe sebagai bahan aktif penyembuh luka diabetikum dan pengembangan sediaan penyembuh luka diabetikum berbahan aktif bahan alam.

#### E. Rencana Target Tahunan

Tabel 1. Rencana Target Tahunan

No	Jenis luaran		Indikator Capaian		
			TS	TS+1	TS+2
1.	Publikasi ilmiah	Internasional bereputasi	-	reviewed	
		Nasional terakreditasi	reviewed		
2.	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan	
		Nasional	-	-	-
3.	HKI	Paten sederhana	-	-	terdaftar
4.	Teknologi tepat guna		-	-	produk
5.	Buku Ajar		-	-	draff

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Posisi Penelitian ini dalam Konteks Penelitian Luka Diabetikum

Pasien diabetes dengan luka (ulcer) di kaki sebagian besar mengarah pada amputasi, hal tersebut terjadi disebabkan karena penderita sebagian besar menderita neuropati (Brem and Tomic-Canic, 2007). Hampir semua proses penyembuhan luka pada penderita diabetes terganggu (Hamed et al., 2014). Terjadi penurunan produksi faktor pertumbuhan diantaranya Vascular Epythelial Growth Factor (VEGF) (Hamed et al., 2010), respon angiogenesis (Galiano et al., 2004), makrofag (Maruyama et al., 2007), akumulasi kolagen, jumlah jaringan granulasi, penurunan migrasi dan proliferasi keratinosit dan fibroblas (Brem and Tomic-Canic, 2007), serta ketidakseimbangan antara extracellular matrix (ECM) dan remodellingnya oleh MMPs (Lobmann et al., 2002). Bahan alam yang dapat meningkatkan produksi faktor pertumbuhan di atas berpotensi digunakan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum.

Penggunaan bahan alam sudah mulai digunakan dalam penyembuhan luka diabetikum (Radhakrishna et al., 2016). Flavonoid dan luteolin yang terkandung pada tanaman *Marynia annua* Lin (Lodhi and Singhai, 2013), sedangkan flavonoid dari tanaman *Tephrosia purpurea* Linn (Lodhi et al., 2013) terbukti mempercepat penyembuhan luka diabetikum dengan mekanisme menangkap radikal bebas (Lodhi and Singhai, 2013), menaikkan level protein dan enzim serta merangsang terjadinya angiogenesis (Lodhi et al., 2013). Notoginsenosida suatu saponin dari tanaman *Panax notoginseng* mempercepat penyembuhan luka diabetikum dengan mekanisme meningkatkan agregasi platelet, proliferasi fibroblast, meningkatkan angiogenesis dan memperingan inflamasi (Zhang et al., 2016). Ekstrak triterpenoid tanaman *Centella asiatica* diketahui meningkatkan epiteliasi, produksi kolagen, menurunkan MMPs dan menghambat produksi nitrit oksida sehingga dapat mempercepat penyembuhan luka diabetikum (Mahmood et al., 2016). Senyawa fenolik dari tanaman *Catharanthus roseus* L mempercepat penyembuhan luka diabetikum dengan mekanisme meningkatkan produksi kolagen dan antioksidan (Singh et al., 2014). **Bahan alam sangat potensial dikembangkan sebagai bahan aktif penyembuh luka diabetikum.**

**Genistein**, suatu isoflavon dari kedelai, telah diteliti kemampuannya sebagai penyembuh luka (Miyazaki et al., 2002). Aktivitas biologis genistein dalam proses penyembuhan luka

diantaranya mempunyai aktivitas anti-inflamasi melalui penghambatan COX-2 (Song et al., 2003), menekan pelepasan interleukin 1- $\beta$  (Sutrisno et al., 2014), memperbaiki enzim anti-oksidan (Valsecchi et al., 2011), merangsang pelepasan asam hialuronat yang merupakan bahan baku penting dalam proses regenerasi kulit (Miyazaki et al., 2002), dan menurunkan stress oksidasi (Park et al., 2011). Genistein mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum karena kemampuannya dalam menurunkan stress oksidasi (Park et al., 2011), meningkatkan angiogenesis, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Tie et al., 2013). **Genistein, kandungan aktif ekstrak tempe, sangat potensial dikembangkan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum.**

**Kebaharuan dalam penelitian ini adalah pembuatan sediaan penyembuh luka diabetikum dengan bahan aktif ekstrak tempe (bahan alam).**

#### B. Mekanisme molekuler penyembuhan luka diabetikum

Proses penyembuhan pada penderita diabetes berbeda dengan pasien normal (Falanga, 2005), termasuk tidak berfungsinya respon inflamasi, penurunan formasi granulasi jaringan dan terganggunya angiogenesis (Cianfarani et al., 2006). Fibroblast yang diisolasi dari luka diabetikum menunjukkan penurunan respon proliferasi terhadap faktor pertumbuhan (Loots et al., 2002) diantaranya TGF $\beta$ 1 (Hasan et al., 1997), platelet-derived growth factor, dan sitokin lain (Stanley et al., 1997). Abnormalitas seluler lain yang muncul pada penderita diabetes diantaranya makrofag pada penderita diabetes memperlihatkan penurunan TNF- $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  dan VEGF (Zykova et al., 2000). Aktivasi berlebihan dari beberapa MMPs diantaranya MMP-9 dapat mengganggu migrasi sel dan menyebabkan pecahnya beberapa matriks protein dan faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam proses penyembuhan luka (Signorelli et al., 2005). Senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan respon inflamasi, menaikkan formasi granulasi jaringan dan meningkatkan angiogenesis pada penderita diabetes akan dapat mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum.

#### C. Genistein, bahan aktif dalam ekstrak tempe

Tempe adalah kedelai yang terfermentasi. Sebagai sumber genistein dipilih tempe karena fermentasi terbukti meningkatkan jumlah genistein pada kedelai (Chaiyasut et al., 2010; Hong et

al., 2012). Genistein merupakan salah satu isoflavon utama kedelai (Rostagno et al., 2007). Kelarutan isoflavon dipengaruhi oleh pH. Pada pH 4 – 6 kelarutan isoflavon lebih rendah dibandingkan kelarutannya pada pH 7 (Barbosa et al., 2006). Kelarutan genistein pada media air adalah  $3 \times 10^{-6}$  M (Stancanelli et al., 2007). Log P, ukuran hidrofobisitas senyawa, genistein mempunyai Log P sebesar 2,09 (Nakada et al., 2009).

Degradasi senyawa isoflavon dipengaruhi oleh pH lingkungan (Chadha et al., 2011) dan panas (Stintzing et al., 2006). Genistein stabil pada kondisi netral, dan tidak stabil baik pada kondisi asam maupun basa (Chadha et al., 2011). Genistein pada suhu 150 °C pH 3 akan terdegradasi sempurna selama 7 setelah pemanasan. Sedangkan pada kondisi netral baik genistein masih stabil selama 7 jam (Stintzing et al., 2006).

#### D. Sediaan Penyembuh Luka

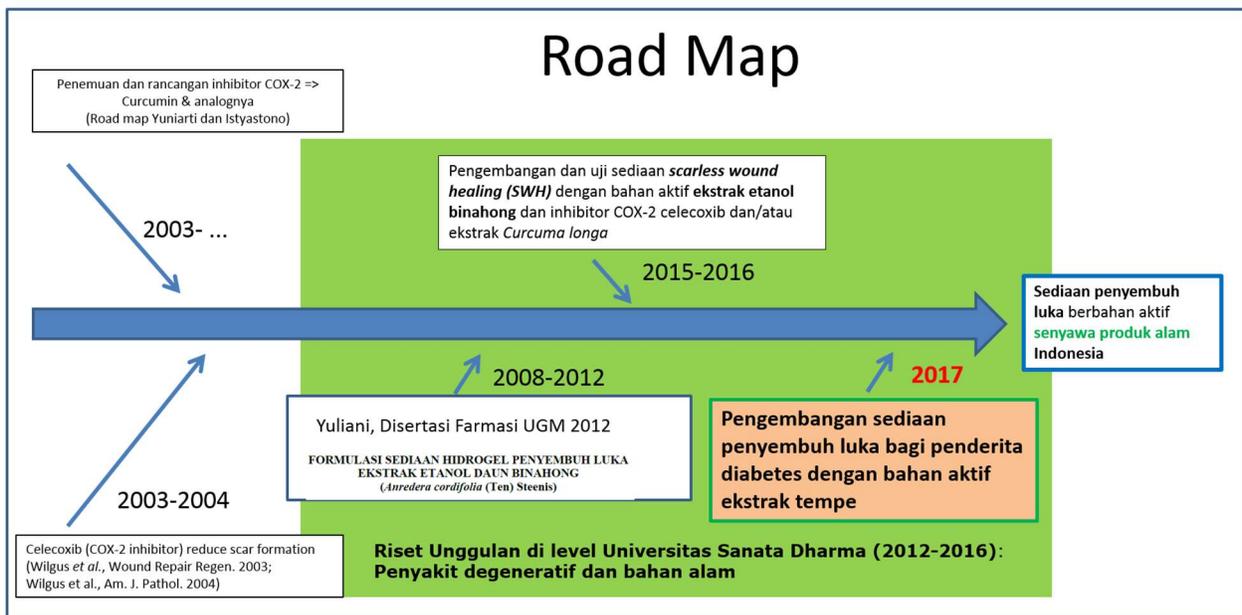
Sediaan penyembuh luka terbuka harus steril (Moynihan and Crean, 2009). Sediaan penyembuh luka hendaknya lembab (Okan et al., 2007), mengabsorpsi dan menghilangkan eksudat, mengisolasi panas, mencegah kontaminasi, menyediakan lingkungan yang kondusif untuk membangun pertahanan alami tubuh (Mallefet and Dweck, 2008). Keuntungan lingkungan yang lembab adalah mencegah dehidrasi dan kematian sel, mempercepat angiogenesis, meningkatkan pecahnya jaringan yang mati dan fibrin (Field and Kerstein, 1994).

Bahan penutup luka yang bersifat oklusif dapat meminimalkan jaringan nekrosis dengan mencegah pengeringan, membantu menghilangkan jaringan mati (*debridement*), dan membentuk barier melawan organisme patogen dari luar sehingga meminimalkan inflamasi yang terjadi (Davis et al., 1990). Penggunaan bahan yang lebih bisa menahan lembab akan meningkatkan lingkungan yang lebih suportif dibandingkan bahan yang tidak mampu menahan lembab (Eaglstein et al., 1988). Bahan yang mampu menahan lembab berhubungan dengan menurunnya infeksi, pasien lebih nyaman dan mengurangi kejadian bekas luka (Campton-Johnston and Wilson, 2001).

#### E. Peta Jalan Penelitian

Penelitian yang diusulkan berdasar pada penelitian terdahulu pengusul yang mengembangkan sediaan hidrogel penyembuh luka dengan bahan aktif ekstrak etanol daun binahong (Yuliani and Istyastono, 2012; Yuliani, 2012; Yuliani et al., 2012). Pengusul juga terlibat

aktif dalam penelitian penemuan senyawa obat untuk anti-inflamasi, baik yang terkait sistem imun via jalur reseptor histamin (Istyastono et al., 2011a, 2011b; Lim et al., 2010, 2009; Sirici et al., 2012; Smits et al., 2010; Wijtmans et al., 2011) maupun non imun via jalur COX (Istyastono, 2012; Radifar et al., 2013; Yuniarti et al., 2012, 2011). Pada saat ini pengusul juga sedang mengerjakan penelitian dengan judul “Sediaan Hidrogel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) sebagai sediaan scarless wound healing dengan adisi inhibitor siklooksigenase-2 celecoxib” menggunakan dana Hibah Bersaing Dikti. Kombinasi pengetahuan dan pengalaman pengusul di bidang formulasi sediaan hidrogel penyembuh luka dan bidang penemuan obat anti-inflamasi akan sangat bermanfaat pada pelaksanaan penelitian yang diusulkan.



Gambar 1. Peta jalan penelitian yang diusulkan. Keterangan: 2015-2016 merupakan penelitian yang sedang dikerjakan saat ini dengan skema Hibah Bersaing dan **penelitian yang diusulkan melalui proposal ini**

## BAB 3. METODOLOGI

### A. Alat dan Bahan Penelitian

**Bahan** yang digunakan dalam penelitian ini berupa: (i) Ekstrak tempe; (ii) Genistein (Sigma-Aldrich); dan (iii) bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian formulasi hidrogel dan optimasi formula hidrogel penyembuh luka berbahan aktif ekstrak etanol daun binahong (Yuliani and Istyastono, 2012; Yuliani, 2012; Yuliani et al., 2012) meliputi: etanol, methanol, carbopol, sodium karboksimetilselulosa (Na-CMC), kalsium alginat (Ca-alginat), gliserol, sodium benzoat, kalium sorbat, formalin dengan kualitas setidaknya *pharmaceutical grade*. Penelitian ini menggunakan hewan uji berupa tikus; (iv) bahan untuk analisis seperti methanol HPLC grade (E-Merck), kolom HPLC (Shimadzu); (v) bahan penelusuran mekanisme molekuler seperti PBS, EDTA, kit MMP9 menurut Cianfarani et al., (2006) dan Galkowska et al., (2006). **Peralatan** yang digunakan dalam penelitian ini adalah: (i) Alat-alat gelas lazim di Laboratorium Kimia Analisis, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Farmakologi-Toksikologi; (ii) *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC; LC-10AD Shimadzu); dan (iii) peralatan ELISA dan peralatan uji imunohistokimia.

### B. Cara Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain faktorial pada tahun pertama dan ketiga sedangkan pada tahun kedua merupakan penelitian eksperimental murni.

#### **Tahun 1**

Pada tahun pertama dilakukan optimasi ekstraksi tempe sehingga didapatkan ekstrak tempe dengan kandungan genistein yang tinggi. Optimasi ekstraksi genistein tempe ini dilakukan menggunakan desain faktorial 3 faktor 2 level. Faktor (variabel bebas) yang diteliti dalam penelitian ini adalah lama ekstraksi (level rendah 2 jam dan level tinggi 4 jam), suhu ekstraksi (level rendah 50°C dan level tinggi 70°C) dan rasio penyari-tempe (level rendah 4:1 dan level tinggi 10:1). Penyari yang digunakan adalah etanol 95%. Respon (variabel tergantung) dalam penelitian ini adalah kadar genistein ekstrak tempe. Setelah didapat kondisi optimal, maka ekstrak yang didapat distandardisasi dengan parameter kadar genistein dalam ekstrak tempe dan berat jenis ekstrak tempe. **Indikator capaian** pada tahun pertama adalah didapatkannya kondisi optimum

ekstraksi genistein ekstrak tempe meliputi lama ekstraksi, suhu ekstraksi dan rasio penyari-tempe. Indikator yang lain adalah kadar genistein dan berat jenis ekstrak tempe. **Luaran** yang diharapkan dalam penelitian tahap ini adalah artikel dalam jurnal nasional terakreditasi “Majalah Obat Tradisional”.

## **Tahun 2**

Pada tahun kedua dilakukan penentuan kadar ekstrak tempe dalam sediaan yang mempercepat penyembuhan luka diabetikum dan penelusuran mekanisme molekuler ekstrak tempe dalam mempercepat penyembuhan luka diabetikum. Penentuan kadar ekstrak tempe dalam sediaan dilakukan dengan metode eksisi. Sebelum digunakan untuk uji penyembuhan luka, tikus diberi injeksi aloksan dengan dosis 250 mg/kgBB, kemudian tikus tersebut dicek kadar gula darahnya. Tikus dengan kadar gula darah puasa  $> 8$  mmol/L digunakan sebagai tikus diabetes. Lima kelompok tikus terinduksi aloksan (diabetes) dengan perlakuan 1) pembawa; 2) 2,5% ekstrak tempe dalam pembawa; 3) 5% ekstrak tempe dalam pembawa; 4) 10% ekstrak tempe dalam pembawa dan 5) tanpa perlakuan ditambah dengan 5 kelompok tikus normal dengan perlakuan yang sama sebagai kelompok kontrol. Parameter yang diukur adalah kecepatan penyembuhan luka dari masing-masing kelompok (Teoh et al., 2009).

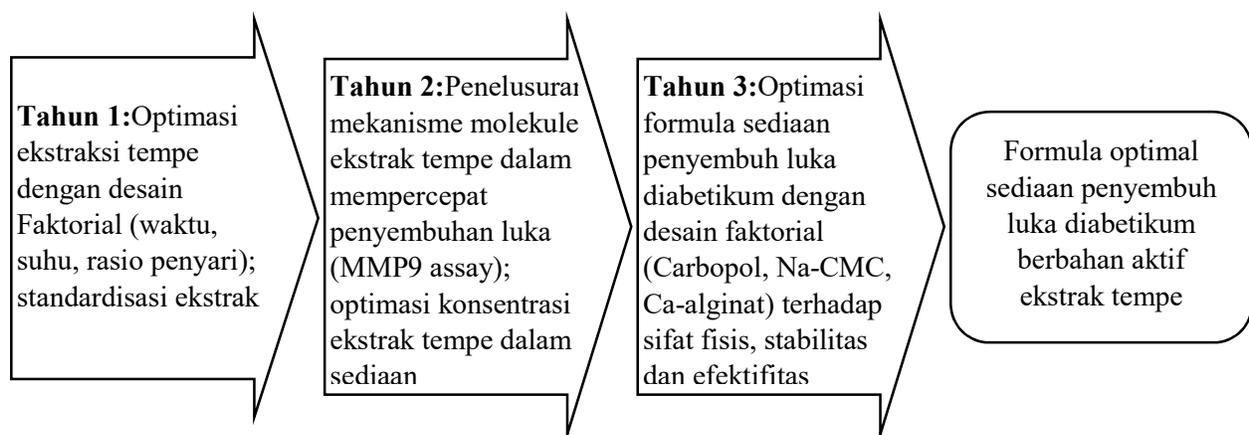
Uji mekanisme molekuler diwakili oleh salah satu target protein yang terlibat dalam perlambatan pembentukan jaringan baru yang berasosiasi dengan penyembuhan luka. Protein ini adalah enzim Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) yang bekerja dengan menghidrolisis ikatan peptida protein pada pembentukan jaringan baru sehingga menghambat penyembuhan luka. Apabila enzim ini dihambat, maka proses pembentukan jaringan baru pasca luka akan berjalan normal. Penelitian sebelumnya telah melaporkan beberapa senyawa flavonoid dan turunannya yang aktif menghambat kinerja MMP9 dengan  $IC_{50} < 100$   $\mu$ M di antaranya luteolin (Ji et al., 2009), xanthohumol (Philips et al., 2010) dan biflavonoid biacacetin (Nanjan et al., 2015). Pada prinsipnya, percobaan dilakukan dengan mereaksikan enzim MMP9 dengan ekstrak tempe yang diuji sebagai inhibitor MMP9 pada konsentrasi yang dianggap tertinggi (contoh 250  $\mu$ g/mL) dalam larutan buffer Tris-HCl pH 7.5. Campuran tersebut direaksikan dalam pelat sumur-96 sambil diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu mengacu pada pustaka (Nicolotti et al., 2012). Selanjutnya, campuran ditambahkan substrat (dalam hal ini peptida yang mengandung fluorofor), diinkubasi kembali pada suhu dan waktu sesuai pustaka. Campuran reaksi kemudian dibaca emisinya menggunakan fluorescence microlate reader dan dibandingkan dengan kontrol negatif

(tanpa ekstrak tempe). Perbedaan antara bacaan kontrol negatif dan perlakuan dibagi bacaan kontrol negatif lalu dikalikan 100% didefinisikan sebagai persen hambatan ekstrak tempe terhadap MMP9. Apabila hambatannya > 50%, perhitungan IC<sub>50</sub> bisa dilakukan dengan membuat satu seri konsentrasi ekstrak tempe dan diuji dengan prosedur yang sama.

**Indikator** dalam penelitian ini adalah 1) ditemukannya kadar ekstrak tempe yang dapat mempercepat penyembuhan luka diabetikum dan 2) ditemukannya mekanisme molekuler ekstrak tempe dalam mempercepat penyembuhan luka diabetikum. **Luaran** yang diharapkan adalah publikasi artikel pada jurnal internasional bereputasi “Journal of Pharmaceutical Science and Research”.

### Tahun 3

Penelitian tahun ke-3 akan dilakukan optimasi formula sediaan penyembuh luka diabetikum. Penelitian menggunakan desain faktorial dengan 3 faktor 2 level. Faktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah carbopol (level rendah 0,5% dan level tinggi 1,25%), Na-CMC (level rendah 0,75% dan level tinggi 1,5%), dan Ca-alginat (level rendah 1% dan level tinggi 2%). Respon yang diharapkan dari penelitian ini adalah daya sebar, daya lekat, viskositas, kecepatan pelepasan obat dari sediaan dan stabilitas sediaan menurut ICH *guideline*. Setelah didapatkan formula optimum maka formula optimum tersebut diuji kembali ke tikus terinduksi aloksan (diabetes) untuk melihat kemampuan dari sediaan menghantarkan bahan aktifnya. **Indikator** yang diharapkan dari penelitian tahun ke-3 adalah formula optimum sediaan penyembuh luka diabetikum yang aman, efektif dan nyaman. Sedangkan **luaran** yang diharapkan pada tahun ke-3 ini adalah **paten sederhana (HKI)** dan **draff buku ajar**.



Gambar 2. Diagram Alir Penelitian, uraian detail terdapat pada Bab 3 Subbab B.

## BAB 4. HASIL SEMENTARA

Tujuan dari penelitian di tahun pertama ini adalah mempelajari dan mengoptimasi factor-faktor yang berpengaruh terhadap ekstraksi genistein dan daidzein dari tempe. Faktor-faktor yang dipelajari adalah konsentrasi etanol, ukuran partikel dan waktu ekstraksi. Etanol dipilih sebagai pelarut karena pertimbangan keamanan, lebih murah dan tidak berbahaya dibandingkan pelarut lain.

Ketiga faktor tersebut dioptimasi menggunakan desain faktorial penuh  $2^3$ . Desain tersebut menghasilkan 8 eksperimen, setiap eksperimen dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dan data konsentrasi genistein dan daidzein digunakan untuk analisis statistika desain factorial. Hasil percobaan tersaji pada tabel 2.

Tabel 2. Rencana desain factorial  $2^3$  dan hasil nilai kadar genistein dan daidzein.

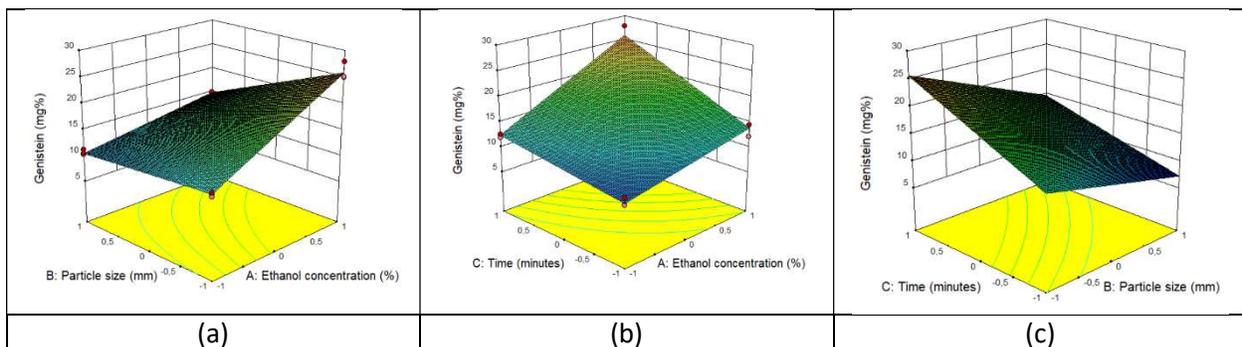
Run	Level factor desain faktorial			Genistein (mg%)	Daidzein (mg%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>		
1	1	1	-1	7,26	4,27
2	1	-1	1	25,12	18,84
3	1	1	-1	7,66	4,46
4	-1	-1	1	11,93	9,25
5	-1	1	-1	11,04	11,17
6	1	-1	1	25,04	18,44
7	1	-1	-1	12,13	10,29
8	-1	1	1	11,15	9,98
9	-1	1	1	10,46	9,98
10	1	-1	-1	14,53	10,52
11	1	-1	1	27,92	21,38
12	1	1	1	14,92	11,29
13	-1	-1	-1	8,66	7,43
14	-1	1	-1	11,34	11,35
15	-1	-1	1	12,36	10,67
16	-1	-1	-1	8,67	7,47
17	-1	-1	-1	9,97	7,94
18	-1	-1	1	12,62	9,2
19	1	1	1	14,91	11,26
20	-1	1	1	10,22	9,75
21	-1	1	-1	10,92	11,1
22	1	-1	-1	14,49	10,4
23	1	1	-1	7,02	4,16
24	1	1	1	14,33	11,84

**Efek konsentrasi etanol, ukuran partikel dan waktu ekstraksi terhadap kadar genistein.**

Model persamaan dibuat dengan mengaplikasikan analisis multiple regresi pada data percobaan kadar genistein. Hasilnya seperti pada persamaan di bawah ini:

$$Y = 13.11 + 2.33X_1 - 2.18X_2 + 2.80X_3 - 2.25 X_1X_2 + 2.13 X_1X_3 - 1.07 X_2X_3 \quad (1)$$

Hasil analisis varian (ANOVA) menunjukkan bahwa model valid. Model mempunyai nilai-F 161,98 dan R-kuadrat 0,9828. Nilai Adj R-kuadrat akan merevisi Nilai R-kuadrat dari ukuran sampel dan jumlah item. Nilai Adj R-kuadrat 0,9767 merupakan nilai yang tinggi dan sangat mendukung signifikansi model. Validasi internal dilakukan dengan validasi leave-one-out. Hasil validasi adalah nilai Pred R-kuadrat 0,9657. Hal ini mempunyai makna tidak terdapat outlier data. Analisis regresi menghasilkan probabilitas signifikan dari nilai F ( $p < 0,0001$ ) dari model untuk memperkirakan konsentrasi genistein yang diekstrak dari tempe. Pada tingkat signifikansi 5%, variabel independen yang signifikan dalam model ekstraksi genistein adalah intercept ( $p < 0,0001$ ),  $X_1$  ( $p < 0,0001$ ),  $X_2$  ( $p < 0,0001$ ),  $X_3$  ( $p < 0,0001$ ),  $X_1X_2$  ( $p < 0,0001$ ),  $X_1X_3$  ( $p < 0,0001$ ), dan  $X_2X_3$  ( $p < 0,0001$ ). Dari ketiga faktor tersebut, waktu ekstraksi ternyata memiliki efek paling tinggi terhadap konsentrasi genistein yang diekstraksi dari tempe yang ditunjukkan dengan nilai koefisien tertinggi (2,80) diikuti oleh konsentrasi etanol (2,33) sedangkan ukuran partikel tempe kering memiliki efek negatif. Interaksi konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi juga menunjukkan efek positif yang signifikan terhadap konsentrasi genistein. Waktu ekstraksi menunjukkan efek positif (2,80) pada ekstraksi genistein. Ini menyiratkan bahwa meningkatnya waktu ekstraksi akan meningkatkan genistein yang diekstraksi dari tempe. Ukuran partikel tempe kering menunjukkan efek negatif (-2,18) pada ekstraksi genistein. Artinya, menurunkan ukuran partikel akan meningkatkan genistein yang diekstraksi dari tempe.



**Gambar 3. Respon permukaan efek factor pada konsentrasi genistein yang diekstraksi dari tempe**

Plot tiga dimensi (plot kontur) yang mewakili pengaruh konsentrasi etanol, ukuran partikel tempe kering dan waktu ekstraksi dihasilkan oleh persamaan (2) dan disajikan pada Gambar 3. Plot dihasilkan oleh masing-masing pasangan factor, dan faktor ketiga dibuat tetap pada nilai yang menghasilkan respon tertinggi. Gambar 3a menunjukkan pengaruh ukuran partikel tempe kering dan konsentrasi etanol. Pada level rendah konsentrasi etanol, penurunan ukuran partikel tidak merubah secara signifikan konsentrasi genistein. Sebaliknya, pada level tinggi konsentrasi etanol, mengurangi ukuran partikel akan meningkatkan konsentrasi genistein. Begitu pula dengan efek ukuran partikel, peningkatan konsentrasi etanol akan meningkatkan konsentrasi genistein pada level ukuran partikel yang rendah. Respon maksimum dicapai pada konsentrasi etanol 100% dan ukuran partikel 0,6 mm. Pengaruh waktu ekstraksi dan konsentrasi etanol ditunjukkan pada Gambar 3b. Pada level tinggi kedua faktor tersebut, peningkatan level faktor akan meningkatkan konsentrasi genistein yang diekstrak dari tempe kering. Konsentrasi genistein maksimum diperoleh pada konsentrasi etanol pada 100% dan waktu ekstraksi 270 menit. Gambar 3c menunjukkan pengaruh waktu ekstraksi dan ukuran partikel tempe kering. Pada tingkat tinggi waktu ekstraksi, mengurangi ukuran partikel akan secara signifikan meningkatkan konsentrasi genistein. Mengurangi ukuran partikel akan meningkatkan area kontak antara partikel padat dan pelarut. Ini akan meningkatkan nilai koefisien difusi genistein. Konsentrasi maksimum genistein adalah 26,03 mg% yang mencapai konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit.

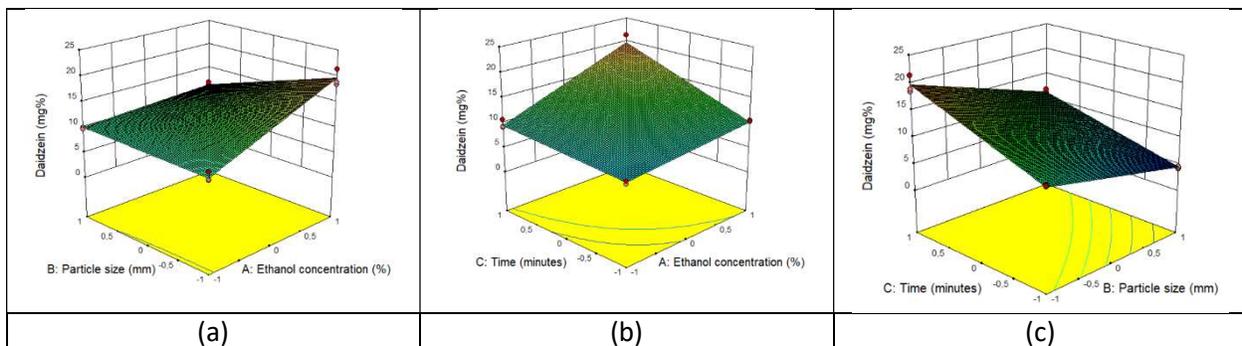
#### **Efek konsentrasi etanol, ukuran partikel dan waktu ekstraksi terhadap kadar daidzein.**

Model persamaan dibuat dengan mengaplikasikan analisis multiple regresi pada data percobaan kadar genistein. Hasilnya seperti pada persamaan di bawah ini:

$$Y = 10,52 + 0,91 X_1 - 1,30 X_2 + 2,14 X_3 - 2,25X_1X_2 + 1,94 X_1X_3 - 0,67 X_2X_3 \quad (2)$$

Hasil ANOVA untuk ekstraksi daidzein dari tempe kering menunjukkan bahwa modelnya valid. Nilai F 143.76 menyiratkan bahwa modelnya signifikan. R-kuadrat dari model adalah 0,9807. Pred R-kuadrat 0,9615 dan Adj R-squared 0,9738 karena selisihnya kurang dari 0,2 maka hal ini menunjukkan bahwa model valid. Validitas internal dilakukan dengan leave-one-out cross validation. Hasilnya tinggi dari Pred R-kuadrat sebesar 0,9615. Ini menunjukkan bahwa tidak ada data outlier dari konsentrasi daidzein pada proses ekstraksi. Analisis regresi yang dihasilkan dari

model ini menunjukkan probabilitas nilai F ( $p < 0,0001$ ) yang signifikan untuk memperkirakan konsentrasi daidzein yang diambil dari tempe. Variabel independen yang signifikan pada tingkat signifikansi 5% adalah intercept ( $p < 0,0001$ ), X1 ( $p < 0,0001$ ), X2 ( $p < 0,0001$ ), X3 ( $p < 0,0001$ ), X1X2 ( $p < 0,0001$ ), X1X3 ( $p < 0,0001$ ), dan X2X3 ( $p < 0,0001$ ). Waktu ekstraksi ternyata memiliki pengaruh paling tinggi terhadap proses ekstraksi daidzein dari tempe yang diikuti dengan konsentrasi etanol. Waktu ekstraksi memiliki nilai positif (2,14), artinya peningkatan waktu ekstraksi akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Di sisi lain, ukuran partikel tempe kering memiliki nilai negatif (-1,30), artinya penurunan ukuran partikel akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Interaksi antara konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi memiliki nilai positif juga.



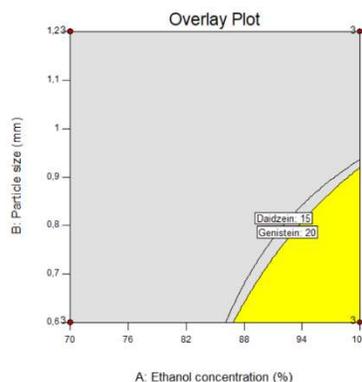
**Gambar 4. Respon permukaan efek factor pada konsentrasi daidzein yang diekstraksi dari tempe**

Gambar 4 menyajikan plot kontur tiga dimensi untuk pengaruh konsentrasi etanol, ukuran partikel tempe kering dan waktu ekstraksi pada konsentrasi daidzein yang diambil dari tempe kering. Plot kontur dikembangkan dengan persamaan (2). Plot diproduksi oleh masing-masing pasangan faktor, dan faktor ketiga diambil dalam respon tertinggi konsentrasi daidzein. Gambar 4a menunjukkan pengaruh konsentrasi etanol dan ukuran partikel tempe kering. Pada konsentrasi etanol level rendah, memperkecil ukuran partikel tidak meningkatkan konsentrasi daidzein yang diekstraksi dari tempe kering, namun pada level tinggi konsentrasi etanol, mengurangi ukuran partikel akan meningkatkan konsentrasi daidzein secara signifikan. Pengaruh konsentrasi etanol memiliki nilai positif 0,91, meningkatkan konsentrasi etanol akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Di sisi lain, pada level ukuran partikel yang rendah, meningkatkan konsentrasi etanol akan meningkatkan konsentrasi daidzein secara signifikan. Efek waktu ekstraksi dan konsentrasi etanol ditunjukkan pada Gambar 4b. Kedua faktor tersebut secara signifikan mempengaruhi konsentrasi daidzein pada level tinggi faktor. Meningkatkan waktu ekstraksi dan konsentrasi

etanol akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Pada level rendah kedua faktor tersebut, konsentrasi daidzein tidak meningkat secara signifikan. Gambar 2c mengilustrasikan efek waktu ekstraksi dan ukuran partikel ekstrak kering pada konsentrasi daidzein. Pada tingkat rendah dan tingkat tinggi ukuran partikel (0,6 dan 1,2 mm masing-masing) meningkatkan waktu ekstraksi secara signifikan akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Konsentrasi maksimum daidzein dicapai pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit yang menghasilkan tempe 19,42 mg% daidzein / tempe kering.

### Kondisi optimal proses ekstraksi genistein dan daidzein tempe

Gambar 3 menunjukkan bahwa konsentrasi genistein maksimum dicapai pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit. Di sisi lain, Gambar 4 menunjukkan bahwa konsentrasi daidzein maksimum dihasilkan pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit. Baik genistein dan daidzein memiliki kondisi yang sama untuk mencapai konsentrasi tertinggi yang diekstrak dari tempe kering. Gambar 5 menunjukkan overlay plot kontur genistein dan ekstraksi daidzein yang dikembangkan dengan persamaan (2) dan (3).



**Gambar 5. Overlay plot dari plot kontur genistein dan daidzein. Waktu ekstraksi dijaga 270 menit**

Gambar 5 menunjukkan bahwa proses ekstraksi akan menghasilkan 20 mg% genistein jika konsentrasi etanolnya lebih dari 87% dan ukuran partikel kurang dari 0,9 mm pada saat waktu ekstraksi 270 menit. Daidzein 15 mg% dapat dicapai dengan proses ekstraksi pada konsentrasi etanol lebih dari 85% dan ukuran partikel kurang dari 0,93 mm pada saat waktu ekstraksi 270 menit. Daerah kuning mewakili kondisi proses ekstraksi yang menghasilkan genistein minimal 20

mg% tempe kering dan minimal 15 mg% daidzein tempe kering. Ini disebut kondisi optimal untuk ekstraksi genistein dan daidzein dari tempe.

## BAB 5. KESIMPULAN SEMENTARA

Model ekstraksi genistein dan daidzein mempunyai probabilitas nilai F ( $p < 0,0001$ ) yang signifikan untuk memprediksi genistein dan daidzein yang diambil dari tempe kering. Validasi internal dilakukan dengan cara leave-one-out dan menghasilkan Pred R-squared yang tinggi untuk genistein dan daidzein masing masing 0,9657 dan 0,9615. Kondisi ekstraksi optimal dicapai pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit. Ini menghasilkan 26,03 mg% genistein dan 19,42 mg% daidzein yang diekstrak dari tempe kering.

## BAB 6. RENCANA SELANJUTNYA

Rencana selanjutnya yang akan dilakukan adalah

1. Melakukan standardisasi proses ekstraksi genistein dan daidzein dari tempeh
2. Menuliskan draft paten proses ekstraksi genistein dan daidzein dari tempe

## REFERENSI

- Barbosa, A.C.L., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2006. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food Chem.* 98, 757–766. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.014
- Boulton, A.J.M., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., Apelqvist, J., 2005. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 366, 1719–24. doi:10.1016/S0140-6736(05)67698-2
- Brem, H., Tomic-Canic, M., 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J. Clin. Invest.* 117, 1219–1222. doi:10.1172/JCI32169.Despite
- Campton-Johnston, S., Wilson, J., 2001. Infected wound management: advanced technologies, moisture-retentive dressings, and die-hard methods. *Crit. Care Nurs. Q.* 24, 64–77. doi:10.1109/10.7291
- Cavanagh, P.R., Lipsky, B. a, Bradbury, A.W., Botek, G., 2005. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 366, 1725–1735. doi:10.1016/S0140-6736(05)67699-4
- Chadha, G., Sathigari, S., Parsons, D.L., Jayachandra Babu, R., 2011. In vitro percutaneous

- absorption of genistein from topical gels through human skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37, 498–505. doi:10.3109/03639045.2010.525238
- Chaiyasut, C., Kumar, T., Tipduangta, P., 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *African J. Biotechnol.* 9, 4120–4126.
- Cianfarani, F., Zambruno, G., Brogelli, L., Sera, F., Lacal, P.M., Pesce, M., Capogrossi, M.C., Failla, C.M., Napolitano, M., Odorisio, T., 2006. Placenta Growth Factor in Diabetic Wound Healing Altered Expression and Therapeutic Potential. *Cell Inj. Repair, Aging Apoptosis* 169, 1167–1182. doi:10.2353/ajpath.2006.051314
- Davis, S.C., Mertz, P.M., Eaglstein, W.H., 1990. Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream. *J. Surg. Res.* 48, 245–248. doi:10.1016/0022-4804(90)90220-V
- Eaglstein, W.H., Davis, S.C., Mehle, A.L., Mertz, P.M., 1988. Optimal use of an occlusive dressing to enhance healing. Effect of delayed application and early removal on wound healing. *Arch Dermatol* 124, 392–395. doi:10.1001/archderm.1988.01670030058022
- Emmerson, E., Campbell, L., Ashcroft, G.S., Hardman, M.J., 2010. The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 321, 184–193. doi:10.1016/j.mce.2010.02.026
- Eo, H., Ann, J., Lim, Y., 2015. Dietary Supplementation of Genistein Attenuates Inflammatory Responses and Oxidative Stress during Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *J. Agric. Sci.* 7, 80–. doi:10.5539/jas.v7n2p80
- Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366, 1736–1743.
- Field, C.K., Kerstein, M.D., 1994. Overview of wound healing in a moist environment. *Am. J. Surg.* 167, 2–6. doi:10.1016/0002-9610(94)90002-7
- Galiano, R.D., Tepper, O.M., Pelo, C.R., Bhatt, K.A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H.G., Gurtner, G.C., 2004. Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *Am. J. Pathol.* 164, 1935–1947. doi:10.1016/S0002-9440(10)63754-6
- Galkowska, H., Wojewodzka, U., Olszewski, W.L., 2006. Chemokines , cytokines , and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 4, 558–565. doi:10.1111/j.1743-6109.2006.00155.x
- Hamed, S., Bennett, C.L., Demiot, C., Ullmann, Y., Teot, L., Desmoulière, A., 2014. Erythropoietin , a novel repurposed drug : An innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus. *Wound Repair Regen.* 22, 23–33. doi:10.1111/wrr.12135
- Hamed, S., Ullmann, Y., Masoud, M., Hellou, E., Khamaysi, Z., Teot, L., 2010. Topical Erythropoietin Promotes Wound Repair in Diabetic Rats. *J. Invest. Dermatol.* 130, 287–294. doi:10.1038/jid.2009.219

- Hasan, A., Murata, H., Falabella, A., Ochoa, S., Zhou, L., 1997. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor- $\beta$  1, 1. *J. Dermatol. Sci.* 16, 59–66.
- Hong, G.-E., Mandal, P.K., Lim, K.-W., Lee, C.-H., 2012. Fermentation Increases Isoflavone Aglycone in Black Soybean Pulp. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 502–511.
- Istyastono, E.P., 2012. Construction and optimization of structure-based virtual screening protocols to identify cyclooxygenase-1 inhibitors using open babel, spores and plants. *Indones. J. Chem.* 12, 141–145.
- Istyastono, E.P., de Graaf, C., de Esch, I.J.P., Leurs, R., 2011a. Molecular determinants of selective agonist and antagonist binding to the histamine H4 receptor. *Cur. Top. Med. Chem.* 11, 661–79.
- Istyastono, E.P., Nijmeijer, S., Lim, H.D., Stolpe, A. Van De, Roumen, L., Kooistra, A.J., Vischer, H.F., Esch, I.J.P. De, Leurs, R., Graaf, C. De, 2011b. Molecular Determinants of Ligand Binding Modes in the Histamine H4 Receptor: Linking Ligand-Based Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship (3D-QSAR) Models to in Silico Guided Receptor Mutagenesis Studies. *J. Med. Chem.* 54, 8136–8147.
- Ji, H.-T., Shi, X.-J., Hong, Y., Wang, Y., Wang, H.-L., Wang, Z.-Y., Fang, X.-X., 2009. Inhibition of matrix metalloproteinases activities by luteolin. *Chem Res Chin Univ*, 25, 895-898. doi: 1005-9040(2009)-06-895-04.
- Lim, H.D., de Graaf, C., Jiang, W., Sadek, P., McGovern, P.M., Istyastono, E.P., Bakker, R. a, de Esch, I.J.P., Thurmond, R.L., Leurs, R., 2010. Molecular determinants of ligand binding to H4R species variants. *Mol. Pharmacol.* 77, 734–43. doi:10.1124/mol.109.063040
- Lim, H.D., Istyastono, E.P., van de Stolpe, A., Romeo, G., Gobbi, S., Schepers, M., Lahaye, R., Menge, W.M.B.P., Zuiderveld, O.P., Jongejan, A., Smits, R. a, Bakker, R. a, Haaksm, E.E.J., Leurs, R., de Esch, I.J.P., 2009. Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H3 and H4 receptors: synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 3987–94. doi:10.1016/j.bmc.2009.04.007
- Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., Lehnert, H., 2002. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 45, 1011–1016. doi:10.1007/s00125-002-0868-8
- Lodhi, S., Jain, A.P., Sharma, V.K., Singhai, A.K., 2013. Wound-Healing Effect of Flavonoid-Rich Fraction from *Tephrosia purpurea* Linn . on Streptozotocin- Induced Diabetic Rats Wound-Healing Effect of Flavonoid-Rich Fraction from *Tephrosia purpurea* Linn . *J. Herbs. Spices Med. Plants* 19, 191–205. doi:10.1080/10496475.2013.779620
- Lodhi, S., Singhai, A.K., 2013. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn . on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac. J.*

Trop. Med. 6, 253–259. doi:10.1016/S1995-7645(13)60053-X

- Loots, M.A.M., Kenter, S.B., Au, F.L., Galen, W.J.M. Van, Middelkoop, E., Bos, J.D., 2002. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 153–160.
- Mahmood, A., Tiwari, A.K., ŞahİN, K., Küçük, Ö., Ali, S., 2016. Triterpenoid saponin-rich fraction of *Centella asiatica* decreases IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B, and augments tissue regeneration and excision wound repair. *Turkish J. Biol.* 40, 399–409. doi:10.3906/biy-1507-63
- Mallefet, P., and Dweck, A.C., 2008, Mechanism of Wound Healing Examined, *Personal Care*, 9 (3), 75 – 83
- Maruyama, K., Asai, J., Ii, M., Thorne, T., Losordo, D.W., Amore, P.A.D., 2007. Decreased Macrophage Number and Activation Lead to Reduced Lymphatic Vessel Formation and Contribute to Impaired Diabetic Wound Healing. *Am. J. Pathol.* 170, 1178–1191. doi:10.2353/ajpath.2007.060018
- Mihardja, L., Soetrisno, U., Soegondo, S., 2014. Prevalence and clinical profile of diabetes mellitus in productive aged urban Indonesians. *J. Diabetes Investig.* 5, 507–512. doi:10.1111/jdi.12177
- Miyazaki, K., Hanamizu, T., Iizuka, R., Chiba, K., 2002. Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15, 175–183. doi:63546
- Moynihan, H., Crean, A., 2009. *Physicochemical Basis of Pharmaceuticals, Physicochemical Basic of Pharmaceuticals.* Oxford University Press.
- Nakada, M., Imai, M., Suzuki, I., 2009. Impact of ethanol addition on the solubility of various soybean isoflavones in supercritical carbon dioxide and the effect of glycoside chain in isoflavones. *J. Food Eng.* 95, 564–571. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.06.020
- Nanjan, P., Nambiar, J., Nair, B.G., Banerji, A., 2015. Synthesis and discovery of (I-3,II-3)-biacacetin as a novel non-zinc binding inhibitor of MMP-2 and MMP-9. *Bioorg Med Chem*, 23, 3781-3787. doi: 10.1016/j.bmc.2015.03.084
- Nicolotti, O., Catto, M., Giangreco, I., Barletta, M., Leonetti, F., Stefanachi, A., Pisani, L., Cellamare, S., Tortorella, P., Loiodice, F., Carotti, A., 2012. Design, synthesis and biological evaluation of 5-hydroxy, 5-substituted-pyrimidine-2,4,6-triones. doi:10.1016/j.ejmech.2012.09.036
- Okan, D., Student, M., Woo, K., Clinic, W.H., Ayello, E.A., Advisor, S., Editor, C.A., Care, W., Sibbald, R.G., Sciences, P.H., Clinic, W.H., Editor, C.A., Care, W., 2007. The Role of Moisture Balance in Wound Healing. *Adv. Ski. Wound Care* 39–53.
- Park, E., Lee, S.M., Jung, I.K., Lim, Y., Kim, J.H., 2011. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 514–519. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.013
- Philips, N., Samuel, M., Arena, R., Chen, Y-J., Conte, J., Natrajan, P., Haas, G., Gonzalez, S., 2010. Direct inhibition of elastase and matrixmetalloproteinases and stimulation of

- biosynthesis of fibrillar collagens, elastin, and fibrillins by xanthohumol. *J Cosmet Sci*, 61, 125. doi: 10.1111/j.1468-2494.2010.00609\_4.x
- Radhakrishna, K., Karri, N.R., Baskaran, M., Kuppusamy, G., 2016. Treatment of Diabetic Foot Ulcers Potential Use of Herbal Medicines in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Med. Sci.* 14, 34–42.
- Radifar, M., Yuniarti, N., Istyastono, E.P., 2013. PyPLIF-assisted redocking indomethacin-(R)-alpha-ethyl-ethanolamide into cyclooxygenase-1. *Indones. J. Chem.* 13, 283–286.
- Rostagno, M. a, Palma, M., Barroso, C.G., 2007. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Anal. Chim. Acta* 597, 265–272. doi:10.1016/j.aca.2007.07.006
- Signorelli, S.S., Malaponte, G., Libra, M., Di, L., Celotta, G., Petrina, M., Nicotra, G.S., Indelicato, M., Navolanic, P.M., 2005. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc. Med.* 10, 1–6.
- Singh, A., Singh, P.K., Singh, R.K., 2014. Antidiabetic and Wound Healing Activity of *Catharanthus roseus* L . in Streptozotocin- Induced Diabetic Mice. *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.* 2, 686–692.
- Sirci, F., Istyastono, E.P., Vischer, H.F., Kooistra, A.J., Nijmeijer, S., Kuijjer, M., Wijtmans, M., Mannhold, R., Leurs, R., De Esch, I.J.P., De Graaf, C., 2012. Virtual Fragment Screening: Discovery of Histamine H3 Receptor Ligands u Using Ligand-based and Protein-Based Molecular Fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 3308–3324. doi:10.1021/ci3004094
- Smits, R. a., Adami, M., Istyastono, E.P., Zuiderveld, O.P., Van Dam, C.M.E., De Kanter, F.J.J., Jongejan, A., Coruzzi, G., Leurs, R., De Esch, I.J.P., 2010. Synthesis and QSAR of Quinazoline Sulfonamides As Highly Potent Human Histamine H4 Receptor Inverse Agonists. *J. Med. Chem.* 53, 2390–2400. doi:10.1021/jm901379s
- Song, H., Koo, T.Y., Park, J.H., Song, K.H., Kim, S.T., Choi, I.S., Choi, W.J., Mok, W.K., Min, H.S., Yoon, D.S., 2003. Inhibition of Cyclooxygenase-2 ( Cox-2 ) Expression by Genistein in Breas Cancer Cell-line. *J. Korean Breast Cancer Soc.* 6, 277–282.
- Stancanelli, R., Mazzaglia, A., Tommasini, S., Calabrò, M.L., Villari, V., Guardo, M., Ficarra, P., Ficarra, R., 2007. The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: a spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 980–984. doi:10.1016/j.jpba.2007.03.025
- Stanley, C.A., Park, H.-Y., Phillips, T.J., Russakovsky, V., Menzoian, J.O., 1997. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *J. Vasc. Surg.* 26, 994–1001.
- Stintzing, F.C., Hoffmann, M., Carle, R., 2006. Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 373–377. doi:10.1002/mnfr.200500187
- Sutrisno, S., Mastryagung, D., Khairiah, R., Tridiyawati, F., Artina, N., Hidayati, D., Noorhamdani, N., Santoso, S., 2014. The effects of genistein on estrogen receptor expression,

- cell proliferation, and apoptosis in endometriosis cell culture. *J. Exp. Integr. Med.* 4, 299–304. doi:10.5455/jeim.200414.or.102
- Teoh, S.L., Latiff, A.A., Das, S., 2009. The effect of topical extract of *Momordica charantia* ( bitter gourd ) on wound healing in nondiabetic rats and in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Clin. Exp. Dermatol.* 34, 815–822. doi:10.1111/j.1365-2230.2008.03117.x
- Tie, L., An, Y., Han, J., Xiao, Y., Xiaokaiti, Y., Fan, S., Liu, S., Chen, A.F., Li, X., 2013. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1 / iNOS pathway in type 1 diabetes ☆. *J. Nutr. Biochem.* 24, 88–96. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.02.011
- Valsecchi, A.E., Franchi, S., Panerai, A.E., Rossi, A., Sacerdote, P., Colleoni, M., 2011. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 694–702. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.060
- Wijtmans, M., de Graaf, C., de Kloe, G., Istyastono, E.P., Smit, J., Lim, H., Boonak, R., Nijmeijer, S., Smits, R. a., Jongejan, A., Zuiderveld, O., de Esch, I.J.P., Leurs, R., 2011. Triazole Ligands Reveal Distinct Molecular Features That Induce Histamine H 4 Receptor Affinity and Subtly Govern H 4 /H 3 Subtype Selectivity. *J. Med. Chem.* 54, 1693–1703. doi:10.1021/jm1013488
- Yuliani, S.H., 2012. Formulasi Sediaan Hidrogel Penyembuh Luka Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). Disertasi Fakultas F.
- Yuliani, S.H., Fudholi, A., Pramono, S., Marchaban, H., 2012. Physical Properties of Wound Healing Gel of Ethanolic Extract of Binahong (*Anredera cordifolia*) During Storage. *Indones. J. Phar.* 23, 203–208.
- Yuliani, S.H., Istyastono, E.P., 2012. Aplikasi Desain Faktorial untuk Mempelajari Proses Ekstraksi pada Ekstraksi Asam Ursolat dari Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). *Medicinus* submitted.
- Yuniarti, N., Ikawati, Z., Istyastono, E.P., 2011. The importance of ARG513 as a hydrogen bond anchor to discover COX-2 inhibitors in a virtual screening campaign. *Bioinformation* 6, 164–6.
- Yuniarti, N., Nugroho, P.A., Asyhar, A., Sardjiman, S., Ikawati, Z., Istyastono, E.P., 2012. In Vitro and In Silico Studies on Curcumin and Its Analogues as Dual Inhibitors for cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). *ITB J. Sci.* 44, 51–66. doi:10.5614/itbj.sci.2012.44.1.5
- Zhang, E., Gao, B., Yang, L., Wu, X., Wang, Z., 2016. Notoginsenoside Ft1 Promotes Fibroblast Proliferation via PI3K / Akt / mTOR Signaling Pathway and Benefits Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 356, 324–332.
- Zykova, S.N., Jenssen, T.G., Berdal, M., Olsen, R., Myklebust, R., Seljelid, R., 2000. Altered Cytokine and Nitric Oxide Secretion In Vitro by Macrophages From Diabetic Type II – Like db / db Mice. *Diabetes* 49, 1451–1458.

## LAMPIRAN

**FORMULIR PERMOHONAN PENDAFTARAN PATEN INDONESIA**  
**APPLICATION FORM OF PATENT REGISTRATION OF INDONESIA**

<b>Data Permohonan (Application)</b>			
Nomor e-Filing <i>Number of e-Filing</i>	: WFP2017015132	Tanggal Permohonan <i>Date of Submission</i>	: 2017-09-22
Nomor Permohonan <i>Number of Application</i>	: PID201706447	Jumlah Klaim <i>Total Claim</i>	: 10
Jenis Permohonan <i>Type of Application</i>	: Paten Non UMKM	Jumlah Halaman <i>Total Page</i>	: 18
Judul <i>Title</i>	: METODE EKSTRAKSI ISOFLAVON AGLIKON DARI KEDELAI DAN PRODUK TURUNAN DARI KEDELAI TERSEBUT		
Abstrak <i>Abstract</i>	: Invensi ini menyediakan suatu metode ekstraksi isoflavon aglikon terstandar genistein dan daidzein. Dimulai dengan proses fermentasi kedelai menggunakan ragi <i>Rhizopus</i> sp. Selanjutnya menghancurkan kedelai atau produk turunan dari kedelai tersebut menjadi kecil yang kemudian didefatisasi dengan menggunakan petroleum eter, dan selanjutnya dikeringkan. Serbuk hasil defatisasi dihaluskan kembali sampai ukuran tertentu kemudian dimaserasi menggunakan etanol dengan kadar tertentu selama waktu tertentu sehingga menghasilkan maserat kental yang kemudian diekstraksi kembali dengan metode ekstraksi liquid-liquid menggunakan etil asetat dan air. Fraksi etil asetat dikeringkan sehingga membentuk ekstrak kering yang kaya akan isoflavon aglikon.		

<b>Permohonan PCT (PCT Application)</b>			
Nomor PCT <i>PCT Number</i>	:	Nomor Publikasi <i>Publication Number</i>	:
Tanggal PCT <i>PCT Date</i>	:	Tanggal Publikasi <i>Publication Date</i>	:

<b>Pemohon (Applicant)</b>		
<b>Nama (Name)</b>	<b>Alamat (Address)</b>	<b>Surel/Telp. (Email/Phone)</b>
Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
ENADE PERDANA ISTYASTONO	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
FLORENTINUS DIKA OCTA	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
MICHAEL RAHARJA GANI	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779

<b>Penemu (Inventor)</b>		
<b>Nama (Name)</b>	<b>Alamat (Address)</b>	<b>Surel/Telp. (Email/Phone)</b>
Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
ENADE PERDANA ISTYASTONO	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo,	adnanhardie@gmail.com 08118097779

	Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	
FLORENTINUS DIKA OCTA	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
MICHAEL RAHARJA GANI	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779

#### Data Prioritas (Priority Data)

Negara (Country)	Nomor (Number)	Tanggal (Date)
------------------	----------------	----------------

#### Kuasa/Konsultan KI (Representative/IP Consultant)

Nama (Name)	Alamat (Address)	Surel/Telp. (Email/Phone)
ADNAN HARDIE, S.H.	JALAN MAYANG IV BLOK AH 3 / 10, RT 004/RW 005, KEL. PONDOK KELAPA, KEC. DUREN SAWIT, JAKARTA TIMUR, 13450, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779

#### Lampiran (Attachments)

Surat Kuasa  
Surat Pernyataan Kepemilikan  
Deskripsi  
Klaim  
Fotokopi KTP

Jakarta, 2017-09-22  
Pemohon / Kuasa  
*Applicant / Representative*

Tanda tangan / Signature  
Nama lengkap / Full Name *ADNAN HARDIE, S.H.*



**POWER OF ATTORNEY  
SURAT KUASA**

**The undersigned** \_\_\_\_\_ :  
Yang bertanda tangan dibawah ini

1. Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt.
2. ENADE PERDANA ISTYASTONO
3. FLORENTINUS DIKA OCTA
4. MICHAEL RAHARJA GANI

**Acting for and on behalf of** \_\_\_\_\_ : -  
Bertindak untuk dan atas nama

**Domiciled at** \_\_\_\_\_ :  
Berkedudukan di

Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma,  
Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282

**Electing legal domicile at the office of proxies mentioned below and having fully authorized to** \_\_\_\_\_ :  
Memilih kedudukan hukum di kantor kuasa di bawah ini dan telah memberikan kuasa kepada

Adnan Hardie, SH (Konsultan HKI No. 262/2010)  
Jalan Mayang IV Blok AH 3/10, RT 005/RW. 007,  
Kel. Pondok Kelapa, Kec. Duren Sawit, Jakarta Timur 13450

**To file a patent application in Indonesia for** \_\_\_\_\_ :  
Untuk mengajukan permohonan paten di Indonesia berjudul

METODE EKSTRAKSI ISOFLAVON AGLIKON DARI KEDELAI  
DAN PRODUK TURUNAN DARI KEDELAI TERSEBUT

to authorize the Patent Office to inquire with the competent Authorities as to the countries and dates of which the patent applications for the same invention have been filed, and also as to the objections of any nature raised against such application;

untuk memberi kuasa kepada Direktorat Paten meminta keterangan-keterangan dari yang berwajib di luar negeri tentang nama negara dan tanggal pada mana untuk penemuan yang sama paten itu telah diajukan permohonannya, dan juga tentang keberatan-keberatan yang bersifat apapun juga yang diajukan terhadap permintaan paten tersebut;

to prepare, to sign and to file the necessary documents, and if necessary, to amend, to separate, complete or to withdraw the application;

untuk menyelesaikan surat yang diperlukan, menandatangani dan mengajukannya, dan jika perlu memperbaiki, memisahkan, menambahi atau mencabutnya;

to make a request for examination of the subject patent application, to appear and to file motion of appeal(s) when necessary, to appeal by filing a notice of appeal if the Directorate of Patent has decided that the entire patent applied for shall not be published or has not been granted at all or has been granted in part or in a modified form;

untuk mengajukan permintaan pemeriksaan pendaftaran paten; untuk menghadap atas panggilan, bila dianggap perlu; untuk mengajukan memori-memori keberatan, apabila telah diputuskan oleh Direktorat Paten bahwa permintaan paten yang bersangkutan itu tidak akan diumumkan seluruhnya atau paten yang diminta ditolak sama sekali, atau dikabulkan sebagian atau dikabulkan hanya dalam keadaan telah diubah;

to reply to petitions, notices of opposition and notices of appeal filed by third parties. To make all payments under the Patent Act or under the Patent rules might be made by the undersigned, and to receive from the Directorate of Patent all relative documents for and on behalf of the undersigned who reserves the right of substitution and on condition of payment.

untuk menjawab surat-surat permintaan, surat-surat keberatan dan surat tuntutan yang diajukan oleh pihak ketiga dan selanjutnya melaksanakan segala pembayaran yang harus dibayar oleh penanda-tangan ini berdasarkan Undang-undang paten atau suatu Peraturan Pemerintah tentang paten dan untuk menerima surat-surat dari Direktorat Paten yang ditujukan kepada penanda-tangan dengan hak substitusi, dan dengan kewajiban penanda-tangan untuk menanggung biaya yang bersangkutan.

Date :  
Tanggal

6 Sept 2017

Signatures :  
Tanda tangan



1.

Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt.

2.   
ENADE PERDANA ISTYASTONO
3.   
FLORENTINUS DIKA OCTA
4.   
MICHAEL RAHARJA GANI

**DECLARATION OF ENTITLEMENT  
PERNYATAAN HAK**

Pursuant to the provisions of the Government Regulation No. 34 of 1991 Articles 2(4) & 3, and in support of the application for a patent of invention entitled:

*Sesuai dengan ketentuan Peraturan Pemerintah No. 34 Tahun 1991 Pasal 2(4) dan Pasal 3, untuk mendukung pengajuan permintaan Patent atas penemuan ini yang berjudul:*

**METODE EKSTRAKSI ISOFLAVON AGLIKON DARI KEDELAI  
DAN PRODUK TURUNAN DARI KEDELAI TERSEBUT**

I/ We\*) : 1. Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt. 3. FLORENTINUS DIKA OCTA  
Saya/ Kami 2. ENADE PERDANA ISTYASTONO 4. MICHAEL RAHARJA GANI

**Do hereby solemnly and sincerely declare as follows :**

*Bersama ini menyatakan dengan sebenarnya bahwa*

- ( x ) ~~I am/~~ we are the rightful inventor(s) of the above invention .  
*Saya/ kami adalah penemu(2) yang sah dari pada penemuan di atas*
- ( ) I am/ we are the title holder (assignee) of the invention as per Assignment form the Inventor(s) attached hereto  
*Saya/ kami adalah pemegang hak atas penemuan tersebut di atas berdasarkan Akta Pemindahan Hak terlampir bersama ini.*
- ( ) I am/ we are authorized by \*\*  
*Saya/ kami diberi kuasa oleh*

The applicant(s) for the patent to make this declaration on its/ their behalf, as per Authorization/ Statement of Consent/ Deed attached hereto

*Pemohon/ para pemohon yang mengajukan Permintaan Paten, untuk membuat pernyataan ini atas namanya/ nama mereka seperti yang diuraikan dalam bukti surat Kuasa/ Pernyataan Persetujuan/ Akta terlampir.*

All statements made herein of my/ our knowledge are true and further these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made by jeopardize the validity of the application or my/ our patent granted therefrom

*Pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya, dan dengan kesadaran apabila keterangan-keterangan tersebut kemudian ternyata merupakan keterangan-keterangan palsu atau sejenisnya yang dibuat dengan sengaja, maka Permintaan atau Paten yang diberikan dari permintaan Saya/ kami ini dapat dicancam batal.*

Date 6 sept 2017  
Tanggal

Signature :  
Tanda tangan

  
1. Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt. 3. FLORENTINUS DIKA OCTA  
2. ENADE PERDANA ISTYASTONO 4. MICHAEL RAHARJA GANI

\*) Details of the applicant/s making the declaration  
\*\*) Where a person being one of the inventors or other than the actual inventor/s is the applicant (To be completed by the applicant, and no legalization is necessary)

## **METODE EKSTRAKSI ISOFLAVON AGLIKON DARI KEDELAI DAN PRODUK TURUNAN DARI KEDELAI TERSEBUT**

### **Bidang Teknik Invensi**

5           Invensi ini berhubungan dengan suatu metode ekstraksi isoflavon aglikon, yaitu genistein, daidzein dan glisitein dari kedelai dan produk turunan dari kedelai tersebut yang telah mengalami fermentasi (misalnya, tempe).

10

### **Latar Belakang Invensi**

          Kedelai adalah bahan makanan yang paling banyak diteliti. Data epidemiologi menyatakan bahwa mengkonsumsi kedelai akan menurunkan angka kejadian  
15 penyakit-penyakit kronis. Makanan dari kedelai banyak dikonsumsi oleh masyarakat dari Asia termasuk diantaranya Cina, Jepang dan juga Indonesia. Angka kejadian penyakit kronis seperti penyakit jantung dan kanker yang cukup rendah dihubungkan dengan kebiasaan  
20 mengkonsumsi makanan yang berasal dari kedelai (Kang et al, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58, 8119 - 8133).

          Kedelai merupakan tanaman yang banyak mengandung isoflavon. Isoflavon mempunyai banyak sekali manfaat  
25 bagi kesehatan. Isoflavon kedelai dapat berikatan dengan reseptor estrogen sehingga dapat digunakan sebagai terapi alternatif dalam terapi yang berhubungan dengan kondisi hormon seperti kanker, gejala menopause, penyakit kardiovaskuler dan osteoporosis. Isoflavon  
30 kedelai mempunyai efek menurunkan kadar kolesterol. Studi epidemiologi menyatakan konsumsi kedelai yang rutin akan menurunkan resiko terkena kanker prostat, kanker payudara dan kanker kolon serta memperbaiki memori otak (Yuliani et al, Oriental Journal of

Chemistry, 2016, 32 (3), 1619-1624). Isoflavon juga berperan dalam penyembuhan luka diabetes dan mempunyai efek anti-inflamasi (Miyazaki et al, Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2002, 15, 175 -183)

5 Isoflavon adalah flavonoid utama yang ditemukan dalam biji kedelai. Isoflavon dibagi dalam 4 golongan besar yaitu aglikon, glukosida, malonilglukosida dan asetilglukosida. Tiga isoflavon aglikon yang banyak terkandung dalam kedelai adalah genistein, daidzein dan  
10 glisitein. Ketiga isoflavon aglikon inilah yang banyak mempunyai aktivitas biologi seperti tersebut di atas. Jumlah isoflavon dalam kedelai dan produk makanan turunan dari kedelai tersebut banyak dipengaruhi oleh genotipe tanaman, budidaya tanaman kedelai, pemanenan,  
15 penanganan pasca panen, penyimpanan, cuaca, pengolahan kedelai dan kondisi proses ekstraksi (Lakshmi et al, Separation Science and Technology, 2013, 46, 166 -174). Proses fermentasi seperti yang dilakukan pada tempe akan meningkatkan kadar isoflavon aglikon dalam bahan (Hong  
20 et al, Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 7 (6), 502 - 511)

Invensi sebelumnya yang pernah ada terkait invensi ini adalah US Paten no 5.702.752 oleh Eric T. Gugger dan Daniel G. Duepen mengenai pemisahan isoflavon dengan  
25 menggunakan pemanasan, proses selanjutnya dilakukan ultrafiltrasi dan kemudian didinginkan sehingga fraksi isoflavon mengkristal. United State Paten No 5.679.806 oleh Bo Lin Zheng dkk mengenai isolasi isoflavon, fraksinasi berdasar jenis isoflavon dan menghidrolisis  
30 isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikonnya. United State Patent No 6.228.993 B1 oleh Konwinski dkk mengenai proses ekstraksi mulai dari defatisasi menggunakan heksan, ekstraksi dengan etanol dan proses pasteurisasi sehingga kandungan isoflavon produk menjadi 8 kali

semula. Paten US 2001/0003781 A1 oleh Thomas A Dobbins mengenai proses ekstraksi mulai dari defatisasi menggunakan heksan, ekstraksi dengan etanol, penyesuaian pH dan temperature sehingga kandungan isoflavon produk  
5 bisa mencapai 40%.

Invensi ini mengusulkan suatu proses ekstraksi isoflavon aglikon (genistein, daidzein dan glisitein) menggunakan teknik maserasi terhadap kedelai dan produk turunan dari kedelai tersebut (tempe) dengan melewati  
10 proses defatisasi menggunakan petroleum eter sehingga menghasilkan ekstrak kedelai terstandar genistein dan daidzein.

#### **Uraian Singkat Invensi**

15 Tujuan dari invensi ini adalah mengekstraksi isoflavon aglikon genistein dengan jumlah maksimum.

Tujuan selanjutnya dari invensi ini adalah mengekstraksi isoflavon aglikon daidzein dengan jumlah maksimum.

20 Tujuan selanjutnya dari invensi ini adalah menghasilkan ekstrak kedelai dan turunan dari kedelai tersebut terstandar genistein dan daidzein.

Tujuan-tujuan tersebut di atas diselesaikan oleh invensi ini yang menyediakan suatu proses ekstraksi  
25 isoflavon aglikon terstandar genistein dan daidzein. Proses didahului dengan fermentasi kedelai menggunakan ragi *Rhizopus* sp. Ekstraksi/isolasi didahului dengan menghancurkan kedelai atau produk turunan dari kedelai tersebut menjadi kecil. Kedelai atau turunan dari  
30 kedelai tersebut yang telah hancur kemudian didefatisasi dengan menggunakan petroleum eter. Serbuk kedelai atau turunan dari kedelai tersebut dipisahkan dari petroleum eter dan dikeringkan. Serbuk hasil defatisasi yang telah kering dihaluskan kembali sampai ukuran tertentu

kemudian dimaserasi menggunakan etanol dengan kadar tertentu selama waktu tertentu. Maserat yang dihasilkan dikentalkan dengan rotary evaporator. Maserat kental kemudian diekstraksi kembali dengan metode ekstraksi liquid-liquid menggunakan etil asetat dan air. Fraksi etil asetat dikeringkan sehingga membentuk ekstrak kering yang kaya akan isoflavon aglikon. Ekstrak yang telah kering kemudian ditetapkan kadar genistein dan daidzein di dalamnya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi.

#### **Uraian Lengkap Invensi**

Seperti telah diuraikan pada latar belakang, telah ada beberapa invensi mengenai isolasi isoflavon dari kedelai. Invensi-invensi tersebut melakukan isolasi dengan menggunakan maserasi yang disertai pemanasan pada suhu tertentu setelah sebelumnya dilakukan defatisasi dengan heksan. Untuk meningkatkan kandungan isoflavon aglikon dilakukan dengan hidrolisis isoflavon glikosida. Dan terakhir dilakukan pendinginan untuk mengkristalkan isoflavon aglikon.

Invensi ini mengajarkan suatu proses ekstraksi/isolasi isoflavon aglikon dari kedelai dan produk turunan dari kedelai tersebut (tempe). Tahap-tahapnya mencakup proses penyiapan dan fermentasi kedelai, proses defatisasi menggunakan petroleum eter dan mengeringkannya kembali, proses maserasi menggunakan etanol, proses pemekatan kandungan isoflavon aglikon yang dilakukan dengan cara fraksinasi menggunakan etil asetat. Standardisasi kandungan produk dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai mencakup beberapa tahap sebagai berikut.

Pertama adalah tahap penyiapan bahan baku dari kedelai.

- 5 Kedelai diolah terlebih dahulu dengan mencucinya menggunakan air. Kedelai kemudian direndam dalam air selama 12 - 18 jam supaya melunak dan dapat dilepaskan kulitnya dengan mudah. Kedelai yang telah dikelupas kulitnya kemudian direbus. Kedelai kemudian ditiriskan
- 10 dan diangin-anginkan sampai dingin. Kedelai yang telah dingin kemudian dicampur dengan ragi. Ragi yang digunakan adalah ragi tempe yang mengandung *Rhizopus* sp.

- Kedelai yang telah dicampur dengan ragi kemudian
- 15 dimasukkan ke dalam plastik. Kedelai yang telah dicampur ragi *Rhizopus* sp didiamkan selama tiga hari hingga jamur *Rhizopus* memenuhi kedelai sehingga terbentuk bahan baku. Fungsi dari penambahan ragi *Rhizopus* ke dalam kedelai adalah untuk meningkatkan kandungan isoflavon aglikon,
- 20 baik genistein, daidzein maupun glisitein.

- Tahap selanjutnya adalah pembentukan bahan baku kering dari bahan baku. Bahan baku berupa kedelai yang telah dipenuhi dengan jamur *Rhizopus* sp dipotong kecil-kecil.
- 25 Bahan baku tersebut dikeringkan pada suhu 50<sup>0</sup> C selama minimal 24 jam dengan menggunakan oven. Bahan baku tersebut selanjutnya dikeluarkan dari oven sehingga menjadi bahan baku kering. Kondisi bahan baku kering yang benar-benar kering ditandai dengan mudah
- 30 dihancurkannya bahan baku kering tersebut apabila diremas dengan menggunakan tangan.

Selanjutnya adalah tahap pembentukan bahan baku partikel dari bahan baku kering dengan cara mengecilkan ukuran

bahan baku kering tersebut menjadi kurang dari sama dengan 0,6 mm. Bahan baku kering berupa tempe yang telah kering kemudian dikecilkan ukuran partikelnya menggunakan blender. Setelah diblender, bahan baku kering tersebut diayak hingga ukuran maksimal 0,6 mm. Langkah ini dilakukan berulang-ulang sampai semua bahan baku yang diblender mencapai ukuran 0,6 mm sehingga menjadi bahan baku partikel. Disukai semakin kecil ukuran bahan baku partikel akan semakin baik karena permukaan bahan baku partikel yang kontak dengan pelarut semakin besar.

Selanjutnya adalah tahap pembentukan bahan baku ter-defatisasi dari bahan baku partikel melalui proses defatisasi bahan baku partikel tersebut menggunakan petroleum eter. Rasio bahan baku partikel berupa serbuk tempe dan petroleum eter yang digunakan adalah 1:2, dimana untuk setiap 100 gram bahan baku partikel dibutuhkan kurang lebih 200 mL petroleum eter. Bahan baku partikel yang telah ditambah dengan petroleum eter diletakkan pada shaker yang diatur dengan kecepatan 155 rpm selama 24 jam.

Duapuluh empat jam kemudian, pisahkan petroleum eter dari bahan baku partikel. Bahan baku partikel kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50<sup>0</sup> C selama minimal 24 jam sampai bahan baku partikel tersebut menjadi kering membentuk bahan baku ter-defatisasi. Bahan baku ter-defatisasi yang dihasilkan sudah tidak mengandung lemak lagi sehingga memudahkan dalam melakukan ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai.

Tahap selanjutnya adalah pembentukan bahan baku ter-maserasi dari bahan baku ter-defatisasi melalui proses

maserasi bahan baku ter-defatisasi tersebut menggunakan petroleum eter.

Bahan baku ter-defatisasi berupa serbuk kering tempe  
5 yang telah mengalami defatisasi tersebut diekstraksi menggunakan metode ekstraksi *solid-liquid* yaitu metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Rasio bahan baku ter-defatisasi dan etanol yang digunakan dalam minimal 1:3, yang berarti untuk 100 g bahan baku terdefatisasi  
10 dibutuhkan minimal 300 mL etanol. Semakin banyak etanol yang dipergunakan akan semakin banyak isoflavon aglikon yang tersari ke dalam pelarut etanol. Maserasi dilakukan selama 4,5 - 6 jam pada shaker yang diatur pada kecepatan putar 155 rpm pada suhu ruangan sehingga  
15 terbentuk bahan baku ter-maserasi.

Lebih lanjut adalah tahap pembentukan larutan kental dari bahan baku ter-maserasi melalui proses pemisahan bahan baku ter-maserasi tersebut dari petroleum eter,  
20 pengeringan bahan baku ter-maserasi tersebut dengan menggunakan oven pada suhu 50<sup>o</sup> C selama 24 jam, pengeksraksian bahan baku ter-maserasi dengan metode maserasi dengan cara mengadukkan selama 4,5 - 6 jam bahan baku ter-maserasi tersebut dengan pelarut etanol dengan perbandingan bahan baku ter-maserasi dan pelarut  
25 etanol sekurang-kurangnya satu banding tiga menggunakan *shaker* pada putaran 155 rpm, dan penguapan pelarut etanol dari bahan baku ter-maserasi tersebut hingga 90% menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 175 mbar,  
30 sehingga terbentuk larutan kental.

Selanjutnya tahap pembentukan ekstrak kental dari larutan kental dengan cara menguapkan larutan kental tersebut dengan oven pada suhu 50<sup>o</sup>C sampai kental.

Lebih lanjut adalah tahap pembentukan fraksi etil asetat dari ekstrak kental dengan cara fraksinasi ekstrak kental tersebut menggunakan metode ekstraksi *liquid-liquid* menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan ekstrak kental dan pelarut etil asetat satu berbanding limabelas.

Ekstrak kental tersebut difraksinasi untuk meningkatkan kadar isoflavon aglikon. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi *liquid-liquid* menggunakan etil asetat dan air. Satu bagian ekstrak kental ditambah dengan masing-masing 15 bagian etil asetat dan air, hal ini berarti untuk setiap 1 gram ekstrak kental ditambah 15 mL etil asetat dan 15 mL air. Setelah ditambah dengan etil asetat dan air, campuran kemudian dikocok-kocok dan bagian etil asetat dikumpulkan sehingga membentuk fraksi etil asetat.

Terakhir adalah tahap pembentukan ekstrak kering dari fraksi etil asetat dengan cara menguapkan fraksi etil asetat tersebut pada oven dengan suhu  $50^{\circ}$  C.

Sementara metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe mencakup beberapa tahap sebagai berikut.

Yang pertama adalah tahap pembentukan bahan baku kering kedua dari tempe. Tempe tersebut dikeringkan pada suhu  $50^{\circ}$  C selama minimal 24 jam dengan menggunakan oven. Tempe tersebut selanjutnya dikeluarkan dari oven sehingga menjadi bahan baku kering kedua. Kondisi bahan baku kering kedua yang benar-benar kering ditandai dengan mudah dihancurkannya bahan baku kering kedua tersebut apabila diremas dengan menggunakan tangan.

Selanjutnya adalah tahap pembentukan bahan baku partikel kedua dari bahan baku kering kedua dengan cara mengecilkan ukuran bahan baku kering kedua tersebut menjadi kurang dari sama dengan 0,6 mm. Bahan baku kering kedua berupa tempe yang telah kering kemudian dikecilkan ukuran partikelnya menggunakan blender. Setelah diblender, bahan baku kering kedua tersebut diayak hingga ukuran maksimal 0,6 mm. Langkah ini dilakukan berulang-ulang sampai semua bahan baku kering kedua yang diblender mencapai ukuran 0,6 mm sehingga menjadi bahan baku partikel kedua. Disukai semakin kecil ukuran bahan baku partikel kedua akan semakin baik karena permukaan bahan baku partikel kedua yang kontak dengan pelarut semakin besar.

Selanjutnya adalah tahap pembentukan bahan baku ter-defatisasi kedua dari bahan baku partikel kedua melalui proses defatisasi bahan baku partikel kedua tersebut menggunakan petroleum eter. Rasio bahan baku partikel kedua berupa serbuk tempe dan petroleum eter yang digunakan adalah 1:2, dimana untuk setiap 100 gram bahan baku partikel kedua dibutuhkan kurang lebih 200 mL petroleum eter. Bahan baku partikel kedua yang telah ditambah dengan petroleum eter diletakkan pada shaker yang diatur dengan kecepatan 155 rpm selama 24 jam.

Duapuluh empat jam kemudian, pisahkan petroleum eter dari bahan baku partikel kedua. Bahan baku partikel kedua kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50<sup>0</sup> C selama minimal 24 jam sampai bahan baku partikel kedua tersebut menjadi kering membentuk bahan baku ter-defatisasi kedua. Bahan baku ter-defatisasi kedua yang dihasilkan sudah tidak mengandung lemak lagi sehingga

memudahkan dalam melakukan ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe.

5 Tahap selanjutnya adalah pembentukan bahan baku ter-maserasi kedua dari bahan baku ter-defatisasi kedua melalui proses maserasi bahan baku ter-defatisasi kedua tersebut menggunakan petroleum eter.

10 Bahan baku ter-defatisasi kedua berupa serbuk kering tempe yang telah mengalami defatisasi tersebut diekstraksi menggunakan metode ekstraksi *solid-liquid* yaitu metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Rasio bahan baku ter-defatisasi kedua dan etanol yang digunakan dalam minimal 1:3, yang berarti untuk 100 g  
15 bahan baku terdefatisasi kedua dibutuhkan minimal 300 mL etanol. Semakin banyak etanol yang dipergunakan akan semakin banyak isoflavon aglikon yang tersari ke dalam pelarut etanol. Maserasi dilakukan selama 4,5 - 6 jam pada shaker yang diatur pada kecepatan putar 155 rpm  
20 pada suhu ruangan sehingga terbentuk bahan baku ter-maserasi kedua.

Lebih lanjut adalah tahap pembentukan larutan kental kedua dari bahan baku ter-maserasi kedua melalui proses  
25 pemisahan bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dari petroleum eter, pengeringan bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dengan menggunakan oven pada suhu 50° C selama 24 jam, pengekstraksian bahan baku ter-maserasi kedua dengan metode maserasi dengan cara mengadukkan  
30 selama 4,5 - 6 jam bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dengan pelarut etanol dengan perbandingan bahan baku ter-maserasi kedua dan pelarut etanol sekurang-kurangnya satu banding tiga menggunakan *shaker* pada putaran 155 rpm, dan penguapan pelarut etanol dari bahan

baku ter-maserasi kedua tersebut hingga 90% menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 175 mbar, sehingga terbentuk larutan kental kedua.

- 5 Selanjutnya tahap pembentukan ekstrak kental kedua dari larutan kental kedua dengan cara menguapkan larutan kental kedua tersebut dengan oven pada suhu 50° C sampai kental.
- 10 Lebih lanjut adalah tahap pembentukan fraksi etil asetat kedua dari ekstrak kental kedua dengan cara fraksinasi ekstrak kental kedua tersebut menggunakan metode ekstraksi *liquid-liquid* menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan ekstrak kental kedua dan pelarut etil asetat satu berbanding limabelas.

- Ekstrak kental kedua tersebut difraksinasi untuk meningkatkan kadar isoflavon aglikon. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi *liquid-liquid* menggunakan etil asetat dan air. Satu bagian ekstrak kental kedua ditambah dengan masing-masing 15 bagian etil asetat dan air, hal ini berarti untuk setiap 1 gam ekstrak kental kedua ditambah 15 mL etil asetat dan 15 mL air. Setelah ditambah dengan etil asetat dan air, campuran kemudian dikocok-kocok dan bagian etil asetat dikumpulkan sehingga membentuk fraksi etil asetat kedua.

- Terakhir adalah tahap pembentukan ekstrak kering kedua dari fraksi etil asetat kedua dengan cara menguapkan fraksi etil asetat kedua tersebut pada oven dengan suhu 50° C.

Standardisasi produk yang dilakukan adalah dengan cara menetapkan kadar genistein dan daidzein dalam ekstrak

kering pertama (kedelai) maupun ekstrak kering kedua (tempe). Penetapan kadar dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Kolom yang digunakan adalah kolom C18, fase gerak metanol:air (70:30) dan kecepatan alir 5 0,6 ml/menit. Detektor yang digunakan adalah UV 261 nm.

Ekstrak kering pertama (kedelai) maupun ekstrak kering kedua (tempe) yang dihasilkan merupakan serbuk kering dengan warna kuning muda, kadar air < 5%, kadar 10 genistein tidak kurang dari 175 mg% dan kadar daidzein tidak kurang dari 125 mg%. Ekstrak kering pertama (kedelai) maupun ekstrak kering kedua (tempe) ini siap diformulasikan lebih lanjut menjadi produk lain dengan kandungan isoflavon aglikon yang terstandar.

15

Penjelasan tersebut diatas dimaksudkan sebagai ilustrasi terhadap perwujudan yang disukai dari invensi ini. Beberapa modifikasi dapat dilakukan tanpa meninggalkan semangat dari invensi ini, dimana 20 perwujudannya tercakup dalam klaim-klaim berikut ini.

25

30

**Klaim**

1. Suatu metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang mencakup:
  - ~ penyiapan bahan baku dari kedelai melalui proses pencucian dan perendaman kedelai tersebut dalam wadah berisi air bersih selama 12 - 18 jam, pemasakan kedelai tersebut, fermentasi kedelai tersebut dengan ragi *Rhizopus sp*, dan mendinginkan kedelai tersebut selama 3 hari;
  - ~ pembentukan bahan baku kering dari bahan baku dengan cara memasukkan bahan baku tersebut ke dalam oven pada suhu 50<sup>0</sup> C selama 24 jam;
  - ~ pembentukan bahan baku partikel dari bahan baku kering dengan mengecilkan ukuran bahan baku kering tersebut menjadi kurang dari sama dengan 0,6 mm dengan cara di-*blender*;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-defatisasi dari bahan baku partikel melalui proses defatisasi bahan baku partikel tersebut menggunakan petroleum eter dengan perbandingan bahan baku partikel dan petroleum eter sebesar satu banding dua;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-maserasi dari bahan baku ter-defatisasi melalui proses maserasi bahan baku ter-defatisasi tersebut menggunakan petroleum eter selama 24 jam dengan meletakkan bahan baku ter-defatisasi tersebut di atas *shaker* yang diatur pada putaran 155 rpm;
  - ~ pembentukan larutan kental dari bahan baku ter-maserasi melalui proses:
    - ~ pemisahan bahan baku ter-maserasi tersebut dari petroleum eter;
    - ~ pengeringan bahan baku ter-maserasi tersebut dengan menggunakan oven pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 24 jam;

- ~ pengekstraksian bahan baku ter-maserasi dengan metode maserasi dengan cara mengadukkan selama 4,5 - 6 jam bahan baku ter-maserasi tersebut dengan pelarut etanol dengan perbandingan bahan baku ter-maserasi dan pelarut etanol sekurang-kurangnya satu banding tiga menggunakan *shaker* pada putaran 155 rpm;
- 5
- ~ penguapan pelarut etanol dari bahan baku ter-maserasi tersebut hingga 90% menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 175 mbar;
- 10
- ~ pembentukan ekstrak kental dari larutan kental dengan cara menguapkan larutan kental tersebut dengan oven pada suhu 50°C sampai kental;
- 15
- ~ pembentukan fraksi etil asetat dari ekstrak kental dengan cara fraksinasi ekstrak kental tersebut menggunakan metode ekstraksi *liquid-liquid* menggunakan pelarut etil asetat dan air dengan perbandingan ekstrak kental terhadap pelarut etil asetat dan air satu berbanding limabelas; dan
- 20
- ~ pembentukan ekstrak kering dari fraksi etil asetat dengan cara menguapkan fraksi etil asetat tersebut pada oven dengan suhu 50°C.
- 25
2. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mempunyai warna kuning.
- 30

3. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mempunyai kadar air < 5%.
- 5 4. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mengandung sedikitnya 175 mg% genistein.
- 10 5. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mengandung sedikitnya 125 mg% daidzein.
6. Suatu metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang mencakup:
  - 15 ~ pembentukan bahan baku kering kedua dari tempe dengan cara memasukkan tempe tersebut ke dalam oven pada suhu 50<sup>0</sup> C selama 24 jam;
  - ~ pembentukan bahan baku partikel kedua dari bahan baku kering kedua dengan mengecilkan ukuran bahan baku kering kedua tersebut menjadi kurang dari 20 sama dengan 0,6 mm dengan cara di-*blender*;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-defatisasi kedua dari bahan baku partikel kedua melalui proses defatisasi bahan baku partikel kedua tersebut menggunakan petroleum eter dengan perbandingan 25 bahan baku partikel kedua dan petroleum eter sebesar satu banding dua;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-maserasi kedua dari bahan baku ter-defatisasi kedua melalui proses maserasi bahan baku ter-defatisasi tersebut 30 menggunakan petroleum eter selama 24 jam dengan meletakkan bahan baku ter-defatisasi kedua tersebut di atas *shaker* yang diatur pada putaran 155 rpm;

- ~ pembentukan larutan kental kedua dari bahan baku ter-maserasi kedua melalui proses:
  - ~ pemisahan bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dari petroleum eter;
  - 5 ~ pengeringan bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dengan menggunakan oven pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam;
  - ~ pengekstraksian bahan baku ter-maserasi kedua dengan metode maserasi dengan cara mengadukkan selama 4,5 - 6 jam bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dengan pelarut etanol dengan perbandingan bahan baku ter-maserasi kedua dan pelarut etanol sekurang-kurangnya satu banding tiga menggunakan 10 *shaker* pada putaran 155 rpm;
  - 15 ~ penguapan pelarut etanol dari bahan baku ter-maserasi kedua tersebut hingga 90% menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 175 mbar;
  - 20
- ~ pembentukan ekstrak kental kedua dari larutan kental kedua dengan cara menguapkan larutan kental kedua tersebut dengan oven pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  sampai kental;
- 25
- ~ pembentukan fraksi etil asetat kedua dari ekstrak kental kedua dengan cara fraksinasi ekstrak kental kedua tersebut menggunakan metode ekstraksi *liquid-liquid* dengan menggunakan pelarut etil asetat dan air dengan perbandingan ekstrak kental terhadap pelarut etil asetat dan air satu berbanding limabelas; dan 30

~ pembentukan ekstrak kering kedua dari fraksi etil asetat kedua dengan cara menguapkan fraksi etil asetat kedua tersebut pada oven dengan suhu 50<sup>0</sup> C.

- 5 7. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mempunyai warna kuning.
- 10 8. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mempunyai kadar air < 5%.
- 15 9. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mengandung sedikitnya 175 mg% genistein.
- 20 10. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mengandung sedikitnya 125 mg% daidzein.

20

25

30

## Abstrak

**METODE EKSTRAKSI ISOFLAVON AGLIKON DARI KEDELAI  
DAN PRODUK TURUNAN DARI KEDELAI TERSEBUT**

5    Invensi ini menyediakan suatu metode ekstraksi isoflavon  
      aglikon terstandar genistein dan daidzein. Dimulai  
      dengan proses fermentasi kedelai menggunakan ragi  
      *Rhizopus sp.* Selanjutnya menghancurkan kedelai atau  
      produk turunan dari kedelai tersebut menjadi kecil yang  
10   kemudian didefatisasi dengan menggunakan petroleum eter,  
      dan selanjutnya dikeringkan. Serbuk hasil defatisasi  
      dihaluskan kembali sampai ukuran tertentu kemudian  
      dimaserasi menggunakan etanol dengan kadar tertentu  
      selama waktu tertentu sehingga menghasilkan maserat  
15   kental yang kemudian diekstraksi kembali dengan metode  
      ekstraksi liquid-liquid menggunakan etil asetat dan air.  
      Fraksi etil asetat dikeringkan sehingga membentuk  
      ekstrak kering yang kaya akan isoflavon aglikon.

**Klaim**

1. Suatu metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang mencakup:
  - ~ penyiapan bahan baku dari kedelai melalui proses pencucian dan perendaman kedelai tersebut dalam wadah berisi air bersih selama 12 - 18 jam, pemasakan kedelai tersebut, fermentasi kedelai tersebut dengan ragi *Rhizopus sp*, dan mendinginkan kedelai tersebut selama 3 hari;
  - ~ pembentukan bahan baku kering dari bahan baku dengan cara memasukkan bahan baku tersebut ke dalam oven pada suhu 50<sup>0</sup> C selama 24 jam;
  - ~ pembentukan bahan baku partikel dari bahan baku kering dengan mengecilkan ukuran bahan baku kering tersebut menjadi kurang dari sama dengan 0,6 mm dengan cara di-*blender*;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-defatisasi dari bahan baku partikel melalui proses defatisasi bahan baku partikel tersebut menggunakan petroleum eter dengan perbandingan bahan baku partikel dan petroleum eter sebesar satu banding dua;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-maserasi dari bahan baku ter-defatisasi melalui proses maserasi bahan baku ter-defatisasi tersebut menggunakan petroleum eter selama 24 jam dengan meletakkan bahan baku ter-defatisasi tersebut di atas *shaker* yang diatur pada putaran 155 rpm;
  - ~ pembentukan larutan kental dari bahan baku ter-maserasi melalui proses:
    - ~ pemisahan bahan baku ter-maserasi tersebut dari petroleum eter;
    - ~ pengeringan bahan baku ter-maserasi tersebut dengan menggunakan oven pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 24 jam;

- ~ pengekstraksian bahan baku ter-maserasi dengan metode maserasi dengan cara mengadukkan selama 4,5 - 6 jam bahan baku ter-maserasi tersebut dengan pelarut etanol dengan perbandingan bahan baku ter-maserasi dan pelarut etanol sekurang-kurangnya satu banding tiga menggunakan *shaker* pada putaran 155 rpm;
- 5
- ~ penguapan pelarut etanol dari bahan baku ter-maserasi tersebut hingga 90% menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 175 mbar;
- 10
- ~ pembentukan ekstrak kental dari larutan kental dengan cara menguapkan larutan kental tersebut dengan oven pada suhu 50°C sampai kental;
- 15
- ~ pembentukan fraksi etil asetat dari ekstrak kental dengan cara fraksinasi ekstrak kental tersebut menggunakan metode ekstraksi *liquid-liquid* menggunakan pelarut etil asetat dan air dengan perbandingan ekstrak kental terhadap pelarut etil asetat dan air satu berbanding limabelas; dan
- 20
- ~ pembentukan ekstrak kering dari fraksi etil asetat dengan cara menguapkan fraksi etil asetat tersebut pada oven dengan suhu 50<sup>0</sup> C.
- 25
2. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mempunyai warna kuning.
- 30

3. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mempunyai kadar air < 5%.
- 5 4. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mengandung sedikitnya 175 mg% genistein.
- 10 5. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari kedelai yang sesuai dengan Klaim 1, dimana ekstrak kering tersebut mengandung sedikitnya 125 mg% daidzein.
6. Suatu metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang mencakup:
  - 15 ~ pembentukan bahan baku kering kedua dari tempe dengan cara memasukkan tempe tersebut ke dalam oven pada suhu 50<sup>0</sup> C selama 24 jam;
  - ~ pembentukan bahan baku partikel kedua dari bahan baku kering kedua dengan mengecilkan ukuran bahan baku kering kedua tersebut menjadi kurang dari 20 sama dengan 0,6 mm dengan cara di-*blender*;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-defatisasi kedua dari bahan baku partikel kedua melalui proses defatisasi bahan baku partikel kedua tersebut menggunakan petroleum eter dengan perbandingan 25 bahan baku partikel kedua dan petroleum eter sebesar satu banding dua;
  - ~ pembentukan bahan baku ter-maserasi kedua dari bahan baku ter-defatisasi kedua melalui proses maserasi bahan baku ter-defatisasi tersebut 30 menggunakan petroleum eter selama 24 jam dengan meletakkan bahan baku ter-defatisasi kedua tersebut di atas *shaker* yang diatur pada putaran 155 rpm;

- ~ pembentukan larutan kental kedua dari bahan baku ter-maserasi kedua melalui proses:
  - ~ pemisahan bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dari petroleum eter;
  - 5 ~ pengeringan bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dengan menggunakan oven pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam;
  - ~ pengekstraksian bahan baku ter-maserasi kedua dengan metode maserasi dengan cara mengadukkan selama 4,5 - 6 jam bahan baku ter-maserasi kedua tersebut dengan pelarut etanol dengan perbandingan bahan baku ter-maserasi kedua dan pelarut etanol sekurang-kurangnya satu banding tiga menggunakan 10 *shaker* pada putaran 155 rpm;
  - 15 ~ penguapan pelarut etanol dari bahan baku ter-maserasi kedua tersebut hingga 90% menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 175 mbar;
  - 20
- ~ pembentukan ekstrak kental kedua dari larutan kental kedua dengan cara menguapkan larutan kental kedua tersebut dengan oven pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  sampai kental;
- 25
- ~ pembentukan fraksi etil asetat kedua dari ekstrak kental kedua dengan cara fraksinasi ekstrak kental kedua tersebut menggunakan metode ekstraksi *liquid-liquid* dengan menggunakan pelarut etil asetat dan air dengan perbandingan ekstrak kental terhadap pelarut etil asetat dan air satu berbanding limabelas; dan 30

~ pembentukan ekstrak kering kedua dari fraksi etil asetat kedua dengan cara menguapkan fraksi etil asetat kedua tersebut pada oven dengan suhu 50<sup>0</sup> C.

- 5 7. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mempunyai warna kuning.
- 10 8. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mempunyai kadar air < 5%.
- 15 9. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mengandung sedikitnya 175 mg% genistein.
- 20 10. Metode ekstraksi isoflavon aglikon dari tempe yang sesuai dengan Klaim 6, dimana ekstrak kering kedua tersebut mengandung sedikitnya 125 mg% daidzein.

20

25

30