Industria: Jurnal Teknologi dan Manajemen Agroindustri
http://www.industria.ub.ac.id
ISSN 2252-7877 (Print) ISSN 2549-3892 (Online)
https://doi.org/10.21776/ub.industria.2017.006.03.6

Kadar Isoflavon Aglikon pada Ekstrak Susu Kedelai dan Tempe

Determination of Isoflavon Aglicone in Extract of Soymilk and Tempeh

Muammar Fawwaz*, Ayu Natalisnawati, Muzakkir Baits
Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia
Jl. Urip Sumoharjo, Makassar 90231, Indonesia
*muammar.fawwaz@umi.ac.id

Received: 08th September, 2017; 1st Revision: 03rd November, 2017; 2nd Revision: 10th November, 2017; Accepted: 05th December, 2017

Abstrak

Susu kedelai dan tempe adalah pangan olahan yang digemari masyarakat Indonesia dan menjadi salah satu sumber protein nabati yang terbuat dari kedelai. Kedelai mengandung senyawa isoflavon glikosida yang bermanfaat untuk kesehatan sebagai pencegah penyakit kardiovaskuler, kanker, diabetes, hipertensi, osteoporosis, obesitas dan menopause. Isoflavon glikosida memiliki struktur yang lebih kompleks, sehingga perlu mengalami proses biokimiawi untuk menyederhanakan strukturnya agar mudah diserap oleh tubuh. Isoflavon glikosida akan disederhanakan menjadi bentuk aglikon selama proses fermentasi dan hidrolisis kimiawi. Genistein merupakan salah satu bentuk isoflavon aglikon yang banyak ditemui pada produk kacang-kacangan. Susu kedelai dan tempe merupakan produk olahan dari kedelai, perbedaannya adalah tempe telah mengalami proses fermentasi, sehingga diyakini memiliki kadar isoflavon aglikon yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar genistein pada ekstrak susu kedelai dan tempe dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Sampel diekstraksi dengan menggunakan etil asetat, sehingga diperoleh ekstrak kental, selanjutnya diukur kadar genistein dengan metode spektrofotometri UV-Vis, menggunakan baku standar. Hasil penelitian diperoleh kadar genistein pada ekstrak susu kedelai dan tempe yaitu masing-masing 0.613 dan 5.519% (b/b). Hal ini menunjukkan bahwa kadar isoflavon aglikon lebih tinggi pada tempe dibanding susu kedelai.

Kata kunci: genistein, isoflavon aglikon, susu kedelai, tempe

Abstract

Soymilk and tempeh are a processed food that is popular with Indonesian society and becomes one of vegetable protein source made from soybean. Soy contains isoflavones glycosides are useful for health as preventions of cardiovascular disease, cancer, diabetes, hypertension, osteoporosis, obesity, and menopause. Isoflavones glycosides have more complex structures, so they need to undergo biochemical processes to simplify their structure and are easily absorbed by the body. Isoflavones glycosides will be simplified into aglycone forms during chemical fermentation and hydrolysis processes. Genistein is one form of isoflavone aglycone that is commonly found in nuts products. Soymilk and tempeh are processed products from soybeans, the difference is tempeh has undergone a fermentation process, so it is believed to have high levels of isoflavone aglycone. The purpose of this study was to determine the genistein content in the extract of soymilk and tempeh by using UV-Vis spectrophotometry. The sample was extracted by using ethyl acetate, so obtained by viscous extract, then measured its genistein level by UV-Vis spectrophotometry method, using standard reference. The result showed that genistein content of soymilk and tempeh extract were 0.613 and 5.519% (w/w), respectively. This indicates that isoflavone aglycone content is higher in tempeh than soymilk.

***Keywords**: genistein, isoflavone aglycone, soymilk, tempeh*

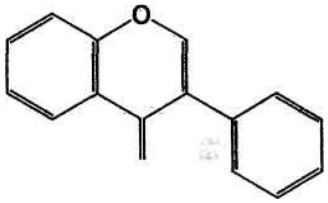
PENDAHULUAN

Terdapat dua spesies dasar kedelai yaitu *Glycine soja* (kedelai hitam) dan *Glycine max* (kedelai hijau, putih atau kuning). *Glycine soja* adalah tanaman yang berasal dari wilayah Asia tropis seperti Asia Tenggara, sementara *Glycine max* adalah tanaman yang berasal dari wilayah Asia subtropik seperti Jepang Selatan dan RRC. Tanaman ini kemudian menyebar ke Indonesia, Asia Tenggara, Jepang, dan Korea (DIY Agricenter, 2015).

Kedelai termasuk dalam golongan *leguminosae* yakni kacang-kacangan yang umumnya golongan ini banyak ditemukan senyawa isoflavon (Zubik & Meydani, 2003; Astuti, 2008). Isoflavon termasuk dalam golongan flavonoid yang merupakan senyawa polifenolik. Stuktur kimia dasar dari isoflavon hampir sama seperti flavon, yaitu terdiri dari 2 cincin benzen (A dan B) dan terikat pada cincin C piran heterosiklik, tetapi orientasi cincin B nya berbeda. Pada flavon, cincin B diikat oleh karbon nomor 2 cincin tengah C, sedangkan isoflavon diikat oleh karbon nomor 3 (Schmidl &

Labuza, 2000).

Isoflavon pada kedelai terdapat dalam empat bentuk yaitu: 1. Bentuk aglikon (non gula): genistein, daidzein, dan glycitein; 2. Bentuk glikosida: daidzin, genistin dan glisitin; 3. Bentuk asetilglikosida: 6”-O-asetil daidzin, 6”-Oasetil genistin, 6”-O-asetil glisitin dan; 4. Bentuk malonilglikosida: 6”-O-malonil daidzin, 6”-O-malonil genistin, 6”-Omalonil glisitin (Astuti, 2008). Diantara bentuk isoflavon tersebut, isoflavon aglikon terutama genistein menunjukkan aktivitas antioksidatif tertinggi (Purwoko, 2004). Genistein adalah fitoestrogen berfungsi sebagai estrogen ketika kadar estrogen dalam tubuh rendah dengan aktifitas sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM) alami (Setchell, 2001), yang cenderung tidak mengganggu jaringan reproduksi, karena merupakan agonis reseptor estrogen (Reinwald *et al.*, 2010).



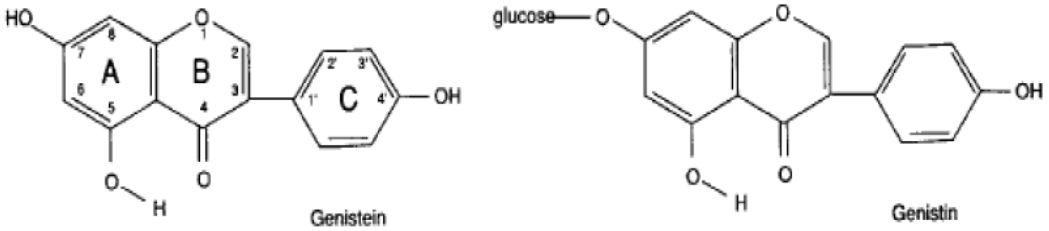
Gambar 1. Struktur umum isoflavon (Schmidl & Labuza, 2000).

Isoflavon pada kedelai dalam bentuk glikosida yaitu genistin, daidzin dan glisitin. Isoflavon dalam bentuk glikosida tidak dapat diserap oleh tubuh, agar bisa diserap maka isoflavon tersebut perlu dihidrolisis oleh enzim β −glucosidase dalam usus untuk melepaskan ikatan glikosidanya (Yamaguchi, Igarashi, Sakai, Degawa, & Ozawa, 2005). Isoflavon dalam bentuk aglikon seperti genistein, daidzein dan glisitein lebih mudah diserap oleh usus halus sebagai bagian dari misel yang dibentuk oleh empedu. Isoflavon yang sebagian larut lemak dan sebagian berikatan dengan protein dengan kekuatan yang lemah membuat sirkulasi isoflavon di dalam darah bersifat kompleks. Isoflavon kemungkinan didistribusikan melalui darah ke hati atau didaur ulang sebagai bagian dari cairan empedu dan sirkulasi enterohepatik (Schmidl & Labuza, 2000).

Upaya untuk memperbaiki daya absorbsi isoflavon, dapat dilakukan melalui proses hidrolisis diluar tubuh melalui metode kimiawi dan fermentasi untuk melepaskan molekul gula pada isoflavon glikosida tersebut. Proses hidrolisis dilakukan dengan memanfaatkan asam kuat seperti HCl dan H_2SO_4 sementara proses fermentasi dapat dilakukan dengan meggunakan beberapa jenis mikroorganisme probiotik (Polkowski & Mazurek, 2000).

Salah satu bentuk olahan kedelai yang telah mengalami proses fermentasi adalah tempe, proses ini memanfaatkan kapang *Rhizopus*. Pembuatan tempe sering menggunakan kapang *Rhizopus microsporus* dan *Rhizopus oryzae* yang memiliki aktivitas enzim β-glukosidase yang berbeda. Aktivitas enzim β-glukosidase dari *R. microsporus* var. *chinensis* lebih kuat dari pada *R. Oryzae* (Purwoko, Pawiroharsono, & Gandjar, 2001). Susu kedelai adalah salah satu produk minuman yang diperoleh dari hasil ekstraksi kedelai (Astawan, 2004). Bagi mereka yang alergi terhadap protein hewani, susu kedelai dapat dijadikan pengganti susu sapi karena susunan asam amino dari susu kedelai hampir sama dengan susunan asam aminio susu sapi (Sarwono & Saragih, 2003). Susu kedelai adalah minuman berprotein tinggi. Susu kedelai juga mengandung air, fosfor, lemak, kalsium, zat besi karbohidrat, vitamin B kompleks (kecuali B12), dan provitamin A (Astawan, 2004).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Fawwaz, Wahyudin, & Djide (2014) menemukan bahwa proses hidrolisis kedelai melalui pendekatan enzimatis dengan menggunakan bakteri probiotik *Lactobacillus bulgaricus* diperoleh genistein dengan kadar yang tinggi dibanding sebelum proses hidrolisis, sama halnya jika proses hidrolisis menggunakan *Lactobacillus acidophilus* (Fawwaz & Wahyuni, 2015). Berdasarkan data tersebut, penelitian ini bertujuan mengetahui berapa kadar genistein yang terkandung pada susu kedelai dan tempe sebagai contoh olahan ke-



Gambar 2. Perbedaan struktur genistein dan genistin (Schmidl & Labuza, 2000).

delai yang beredar di pasaran dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Pada penelitian ini menggunakan gelas (*Pyrex*), mikropipet (*Memmert*), spektrofotometri UV-Vis (*Thermo Scientific*), timbangan analitik dan vortex (*IKA®Genesis*). Bahan yang digunakan adalah aquadest, etil asetat (*Merck*), genistein G6649 (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*), methanol (*Merck*), susu kedelai tanpa merek dan tempe yang dibungkus daun pisang diperoleh dari pasar traditional di wilayah Kota Makassar.

Ekstraksi Susu Kedelai

Sampel susu kedelai sejumlah 500 mL ditambahkan 500 mL cairan penyari etil asetat dengan perbandingan 1:1 (v/v), dilakukan pemisahan dengan menggunakan corong pisah, diambil lapisan etil asetat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40ºC hingga diperoleh ekstrak kental untuk dilakukan penetapan kadar genistein (Fawwaz & Wahyuni, 2015).

Ekstraksi Tempe

Sampel tempe sejumlah 50 g ditambahkan aquadest 50 mL, kemudian dihaluskan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat ditambahkan 50 mL cairan penyari etil asetat dengan perbandingan 1:1 (b/v), dilakukan pemisahan dengan menggunakan corong pisah. Lapisan etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40ºC hingga diperoleh ekstrak kental untuk dilakukan penetapan kadar genistein (Fawwaz & Wahyuni, 2015).

Pembuatan Larutan Stok dan Kurva Baku

Larutan stok konsentrasi 200 ppm dibuat dengan cara menimbang genistein sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam metanol sebanyak 5 mL. Dari larutan tersebut dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 5 mL metanol sehingga diperoleh konsentrasi 40 ppm. Genistein standar tersebut selanjutnya dipipet masing-masing sejumlah 0.25, 0.5, 0.75 dan 1 mL kemudian dilarutkan dalam metanol hingga volumenya 5 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 2, 4, 6 dan 8 ppm. Deret konsentrasi standar dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 261 nm sebagai panjang gelombang maksimum genistein yang diperoleh dari hasil *running lamda max*. Dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan regresi linier (Fawwaz, Wahyudin, & Djide, 2014).

Analisis Kadar Genistein Susu Kedelai

Ekstrak susu kedelai ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 10 mL metanol, lalu disaring, sehingga diperoleh larutan ekstrak. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya hingga garis tanda, dikocok hingga homogen (faktor pengenceran 10x). Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 261 nm (Fawwaz, Wahyudin, & Djide, 2014).

Analisis Kadar Genistein Tempe

Ekstrak tempe ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 10 mL metanol, lalu disaring sehingga diperoleh larutan ekstrak. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya hingga garis tanda, dikocok hingga homogen, kemudian dilakukan pengenceran dengan memipet 1 mL larutan lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya hingga garis tanda, dikocok hingga homogen (faktor pengenceran 100x). Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 261 nm (Fawwaz, Wahyudin, & Djide, 2014).

Analisis Data

Data diperoleh dari hasil pengukuran kandungan genistein dalam susu kedelai dan tempe dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Dari hasil pengukuran, area yang diperoleh dicatat, lalu dihitung kadarnya menggunakan persamaan regresi linear:

$$y = a + bx$$

Keterangan :

y = variabel terikat
x = variabel bebas
a = intersep
b = koefisien regresi/slop

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isoflavon merupakan salah satu jenis senyawa polifenol yang memiliki struktur yang menyerupai estrogen sehingga mampu memberikan efek seperti estrogen. Isoflavon juga sering disebut sebagai senyawa turunan fitoestrogen dengan aktivitas estrogenic (Lampe, 2003). Kedelai relatif rendah karbohidrat namun tinggi protein. Dibandingkan dengan jenis kacang-kacangan lainnya, kedelai memiliki kandungan isoflavon

yang lebih tinggi. Isoflavon berfungsi sebagai antioksidan dan memiliki efek biologis mirip dengan estrogen. Isoflavon dapat mengurangi risiko osteoporosis, *atherosclerosis* dan *neurodegeneration*, menurunkan prevalensi kanker prostat dan kanker payudara, mengurangi *atherogenesis* dan menurunkan reabsorpsi tulang karena isoflavon dapat mencegah oksidasi *Low-Density Lipoprotein* (LDL) (Otieno, Ashton, & Shah, 2006).

Jumlah isoflavon dari setiap produk olahan kedelai Produk olahan kedelai bervariasi, tergantung pada proses pengolahannya. Susu kedelai dan tempe merupakan produk olahan kedelai yang cukup disukai oleh masyarakat Indonesia dan menjadi salah satu sumber protein khususnya protein nabati (Rosida, Yulistiani, & Kumalasari, 2008). Kedelai mengandung senyawa flavonoid yang lebih dikenal sebagai isoflavon, dimana isoflavon kedelai bermanfaat untuk kesehatan misalnya untuk penyakit kardiovaskuler, kanker, diabetes, hipertensi, osteoporosis, obesitas, menopause (Winarsi, 2010). Sari kedelai (*soymilk*) kurang begitu dikenal dibandingkan dengan produk olahan kedelai yang lain misalnya tahu dan tempe tetapi jumlah isoflavon total dari susu kedelai cukup besar, yaitu 9,56 mg/100 g. (*United States Department of Agriculture & Agricultural Research Service*, 2016).

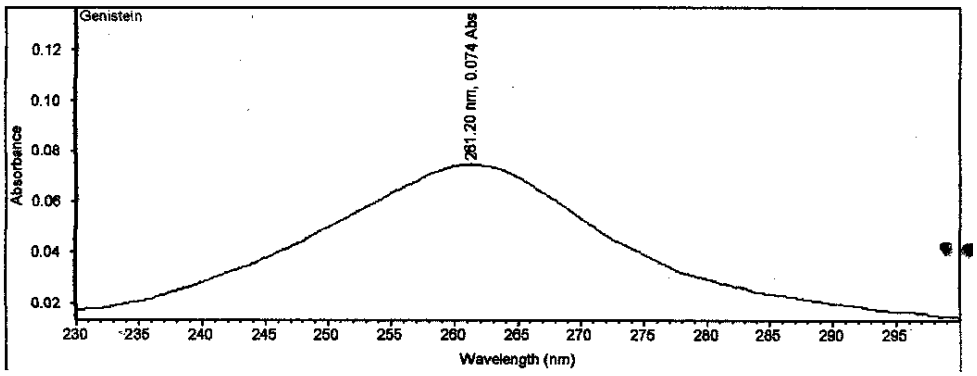
Ekstraksi pada kedua sampel dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut organik etil asetat pada corong pisah (Fawwaz, Akbar, Pratama, Saleh, & Baits, 2016), hal ini dikarenakan etil asetat memiliki konstanta dielektrik sebesar 6.0 yang menunjukkan sifat semi polar dan memiliki toksisitas rendah. Ekstraksi dengan etil asetat berfungsi untuk mengikat senyawa-senyawa isoflavon genistein yang juga mempunyai sifat semi polar. Penggunaan etil asetat juga memudahkan dalam proses penghilangan komponen gula dalam ekstrak dari hasil fermentasi atau hidrolisis. Fase etil asetat yang mengikat senyawa isoflavon tersebut ditampung kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, yang bertujuan untuk menguapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kental.

Analisis kadar isoflavon aglikon pada ekstrak susu kedelai dan tempe menggunakan standar genistein sebagai baku pembanding, karena genistein merupakan salah satu senyawa isoflavon aglikon yang ditemukan dalam jumlah besar pada kelompok tanaman *leguminosae* (Yamaguchi *et al*., 2005). Kurva baku genistein dibuat pada beberapa deret konsentrasi yaitu 2, 4, 6 dan 8 ppm. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan melalui proses *running lamda max* pada salah satu variasi konsentrasi yang telah disiapkan dengan rentan panjang gelombang 200-400. Puncak serapan tertinggi diperoleh pada panjang gelombang 261 nm. Gambar 3 menunjukkan puncak serapan maksimum genistein.

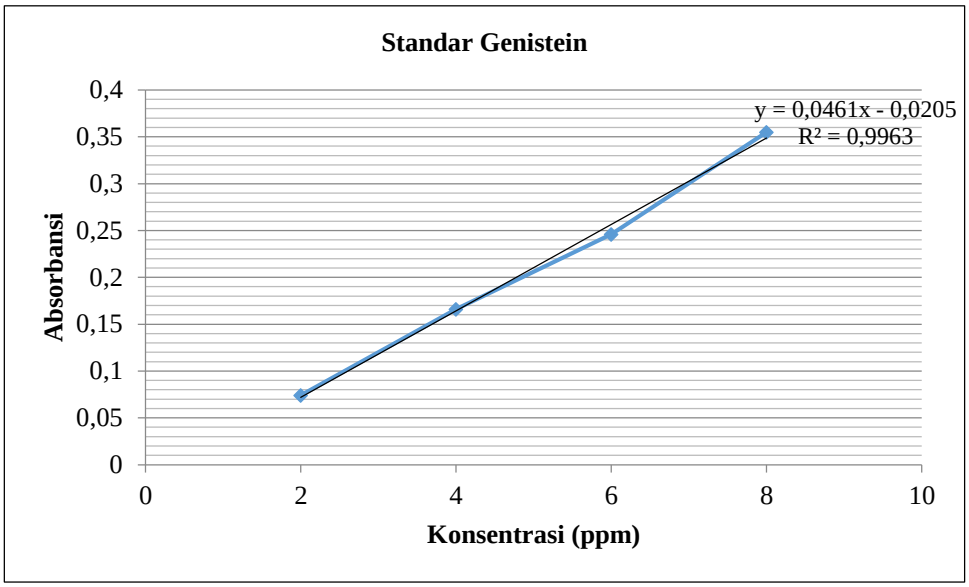
Deret konsentrasi genistein yang telah disiapkan diukur absorbannya pada panjang gelombang maksimum, sehingga diperoleh data absorbansi pada Tabel 1. Data absorbansi selanjutnya dibuat persamaan regresi linier y = a + bx sebagai dasar perhitungan kadar genistein pada sampel. Linieritas juga dibutuhkan untuk melihat adanya hubungan antara konsentrasi dan absorbansi, sehingga dapat dipastikan bahwa metode yang digunakan valid dan alat yang digunakan masih memadai. Berikut persamaan regresi linier yang ditunjukkan pada Gambar 4.

Tabel 1. Data kurva baku genistein

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
2	0,074
4	0,166
6	0,246
8	0,355



Gambar 3. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum genistein



Gambar 4. Persamaan regresi linier genistein pada panjang gelombang 261 nm

Tabel 2. Hasil penetapan kadar genistein pada susu kedelai dan tempe

Sampel		Absorbansi (Y)	Kadar genistein larutan uji (mg/L)	Kadar genistein sampel (µg/mg)	% Kadar rata-rata (b/b)
Ekstrak susu kedelai	1	0,254	5,956	0,591	0,613
	2	0,266	6,217	0,617	
	3	0,273	6,369	0,632	
Ekstrak tempe	1	0,221	5,239	5,217	5,519
	2	0,231	5,456	5,433	
	3	0,253	5,934	5,909	

Hasil perhitungan yang diperoleh menunjukkan bahwa kadar genistein ekstrak tempe jauh lebih tinggi yakni 5 kali lebih besar dibandingkan susu kedelai, ini membuktikan bahwa proses fermentasi mampu melepaskan ikatan gula pada isoflavon glikon sehingga menghasilkan aglikon seperti genistein. Meskipun demikian kadar genistein pada tempe masih lebih rendah dibandingkan penelitian sebelumnya yang mengukur kadar genistein kedelai setelah fermentasi menggunakan *Lactobacillus bulgaricus* menunjukkan kadar yang tinggi pada 3 replikasi yakni masing-masing 50.61 µg/mg, 49.71 µg/mg and 49.40 µg/mg (Fawwaz, Wahyudin, & Djide, 2014). Hal ini membuktikan bahwa proses fermentasi yang dilakukan menggunakan *Lactobacillus bulgaricus* lebih efektif menghasilkan genistein dibandingkan proses fermentasi pada produksi tempe.

Proses fermentasi tempe kedelai, menggunakan mikroorganisme kapang seperti *Rhizopus olygosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* (dapat terdiri atas kombinasi dua spesies atau ketiganya), biji kedelai yang telah direbus, dan lingkungan pendukung yang terdiri dari suhu, pH dan kelembaban nisbi yang sesuai (Kustyawati, 2009). Starter pembuatan tempe juga dapat digunakan saat proses fermentasi tempe selain kapang murni (Heridiansyah, Nur'aini, & Darius, 2014).

Upaya untuk menarik senyawa isoflavon aglikon secara maksimal pada kedelai terkait dengan pemanfaatannya dalam dunia kesehatan yang mampu mengatasi berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, osteoporosis, penyakit jantung dan lain sebagainya (Otieno *et al*., 2006). Dengan melihat pemanfaatan isoflavon aglikon yang begitu besar, tetap perlu memperhatikan dosis dan subjek pengguna dikarenakan beberapa hasil penelitian yang menunjukkan adanya efek infertilitas genistein pada hewan coba tikus jantan dewasa (Shibayama *et al*., 2001).

Sekresi hormon testosteron bisa diturunkan dengan memberikan genistein pada ayam (Opałka, Kamińska, Ciereszko, & Dusza, 2004). Pada saat kapasitas dan motilitas spermatozoa, aktivitas protein tirosin kinase dapat dihambat dengan memberikan genistein (Bajpai, Asin, & Doncel, 2003). Shibayama *et al*., (2001) menyatakan bahwa genistein dengan dosis 10 µg, 100 µg dan 1000 µg yang diberikan pada tikus

mampu menurunkan tingkat reseptor estrogen didalam sel Leydig, menurunkan motilitas spermatozoa serta menurunkan berat testis. Berbeda halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al.*, (2004) setelah diberikan genistein dosis 2,5 mg/kg terhadap tikus jantan dewasa tidak menyebabkan terjadinya hiperplasia sel-sel epitelium kelenjar prostat sehingga perlu memperhatikan dosis terapi genistein untuk menghindari efek antifertil yang dimilikinya.

Penelitian tentang pemanfaatan kedelai terus berkembang khususnya dalam dunia kesehatan. Sebagai bangsa yang telah memanfaatkan produk olahan kedelai secara turun-temurun sudah sepatutnya turut andil dalam penelitian tersebut. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa tempe dan tahu memiliki kadar genistein masing-masing sebesar 0.613 dan 5.519% (b/b).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar genistein rata-rata pada ekstrak tempe 5 kali lebih tinggi dibanding pada ekstrak susu kedelai, hal ini terjadi karena produk tempe mengalami proses fermentasi sementara susu kedelai merupakan produk langsung dari kedelai tanpa proses fermentasi.

Daftar Pustaka

Astawan, M. (2004). *Sehat Bersama Aneka Serat Pangan Alami*. Jakarta: Tiga Serangkai.

Astuti, S. (2008). Isoflavon kedelai dan potensinya sebagai penangkap radikal bebas. *Teknologi Industri Dan Hasil Pertanian Universitas Lampung*, *13*(2), 126–136.

Bajpai, M., Asin, S., & Doncel, G. F. (2003). Effect of tyrosine kinase inhibitors on tyrosine phosphorylation and motility parameters in human sperm. *Archives of Andrology*, *49*(3), 229–246. https://doi.org/10.1080/01485010390196715

DIY Agricenter. (2015). Kedelai. Retrieved January 22, 2015, from http://agricenter.jogjaprov.go.id/index.php?action=generic_content.main&id_gc=130

Fawwaz, M., Akbar, N., Pratama, M., Saleh, A., & Baits, M. (2016). High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones aglycone in Indonesian soybean. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *7*(10), 4230–4233. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(10).4230-33

Fawwaz, M., Wahyudin, E., & Djide, M. N. (2014). The effects of isoflavone soybean (Glycine max (L) merill) fermentation results by Lactobacillus bulgaricus towards in vitro osteoblast cell proliferation. *International Journal of PharmTech Research*, *6*(2), 666–670.

Fawwaz, M., & Wahyuni. (2015). Research Article Osteoblast cell proliferation activity of isoflavone aglycones from fermented soybean (Glycine max (L) Merill) by Lactobacillus acidophilus. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *7*(1), 781–784.

Heridiansyah, N., Nur'aini, H., & Darius. (2014). Pengaruh jenis tempe dan bahan pengikat terhadap karakteristik nugget tempe. *Pengaruh Jenis Tempe Dan Bahan Pengikat Terhadap Karakteristik Nugget Tempe*, *I*(1), 109–118.

Kustyawati, M. E. (2009). Kajian peran yeast dalam pembuatan tempe. *Agritech*, *29*(2), 64–70.

Lampe, J. W. (2003). Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *Environmental Health*, (7), 888–894. https://doi.org/10.1091/mbc.E05

Lee, B. J., Kang, J. K., Jung, E. Y., Yun, Y. W., Baek, I. J., Yon, J. M., … Nam, S. Y. (2004). Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. *Journal of Veterinary Science*, *5*(3), 227–234.

Opałka, M., Kamińska, B., Ciereszko, R., & Dusza, L. (2004). Genistein affects testosterone secretion by Leydig cells in roosters (Gallus gallus domesticus). *Reproductive Biology*, *4*(2), 185–193.

Otieno, D. O., Ashton, J. F., & Shah, N. P. (2006). Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by Bifidobacterium animalis, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei. *Food Research International*, *39*(4), 394–407. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.08.010

Polkowski, K., & Mazurek, A. P. (2000). Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, *57*(2), 135–155. https://doi.org/10.2741/1430

Purwoko, T. (2004). Kandungan isoflavon aglikon pada tempe hasil fermentasi Rhizopus microsporus var. oligosporus: pengaruh perendaman. *BioSMART*, *6*(2), 85–87.

Purwoko, T., Pawiroharsono, S., & Gandjar, I. (2001). Biotransformasi isoflavon oleh Rhizopus oryzae UICC 524. *BioSMART*, *3*(2), 7–12.

Reinwald, S., Mayer, L. P., Hoyer, P. B., Turner, C. H., Barnes, S., & Weaver, C. M. (2010). A longitudinal study of the effect of genistein on bone in two different murine models of diminished estrogen-producing capacity. *Journal of Osteoporosis*, *2010*, 1–14. https://doi.org/10.4061/2010/145170

Rosida, Yulistiani, R., & Kumalasari, I. (2008). Pengaruh tingkat subtistusi tepung ampas tahu fermentasi terhadap daya cerna protein dan mutu biskuit crackers. In *Seminar Nasional Pangan 2008 Peningkatan Keamanan Pangan Menuju Pasar Global* (pp. 165–170). Yogyakarta: Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia Cabang Yogyakarta.

Sarwono, B., & Saragih, Y. P. (2003). *Membuat Aneka Tahu*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Schmidl, M. K., & Labuza, T. P. (2000). *Essentials of Functional Foods*. Gaithersburg: Aspen Publishers.

Setchell, K. D. R. (2001). Soy isoflavones—benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Journal of the American College of Nutrition*, *20*(5), 354S–362S. https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719168

Shibayama, T., Fukata, H., Sakurai, K., Adachi, T., Komiyama, M., Iguchi, T., & Mori, C. (2001). Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocrine Journal*, *48*(6), 655–663. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11873863

United States Department of Agriculture, & Agricultural Research Service. (2016). *National Nutrient Database for Standard Reference Release 28 slightly revised May , 2016 Full Report*. Maryland.

Winarsi, H. (2010). *Protein Kedelai & Kecambah Manfaatnya bagi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.

Yamaguchi, M., Igarashi, A., Sakai, M., Degawa, H., & Ozawa, Y. (2005). Prolonged Intake of dietary fermented isoflavone-rich soybean reinforced with zinc affects circulating bone biochemical markers in aged individuals. *Journal of Health Science*, *51*(2), 191–196. https://doi.org/10.1248/jhs.51.191

Zubik, L., & Meydani, M. (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(6), 1459–1465.