



Pengaruh pemberian sampah organik terhadap pertumbuhan dan kandungan astaxanthin pada pupa *black soldier fly* (*Hermetia illucens* (Linnaeus))

Effect of organic waste feeding on the growth and astaxanthin content in black soldier fly (*Hermetia illucens* (Linnaeus)) pupae

Arkhey Sidauruk, Aniek Prasetyaningsih*, Kukuh Madyaningrana

Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana
Jalan Wahidin Sudirohusodo 5-25, Yogyakarta 55224, Indonesia

(diterima Agustus 2023, disetujui Maret 2024)

ABSTRAK

Black soldier fly (*Hermetia illucens* (Linnaeus)) atau BSF merupakan serangga pengolah sampah organik yang fase larvanya memiliki kandungan nutrisi tinggi sehingga berpotensi sebagai sumber protein alternatif pakan dan pangan. Astaxanthin merupakan senyawa antioksidan yang lazim diperoleh dari tumbuhan, alga, dan Crustacea. Deteksi astaxanthin pada *Bombyx mori* (Linnaeus) menjadi titik tolak dugaan bahwa astaxanthin potensial ditemukan pada serangga lain termasuk BSF. Penelitian bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian jenis pakan sampah organik terhadap pertumbuhan larva BSF dan kandungan astaxanthin pada pupa BSF. Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan jenis pakan sampah organik berupa sisa buah dan sayur (BS), ampas tahu (AT), sisa nasi (N), campuran sisa buah dan sayur, ampas tahu dan sisa nasi (C). Pakan ternak T51 digunakan sebagai kontrol. Setiap perlakuan pakan diulang 3 kali. Parameter penelitian terukur meliputi parameter pertumbuhan larva berupa berat, panjang, dan karakteristik larva; dan parameter kandungan senyawa kimia termasuk astaxanthin pada pupa BSF. Ekstraksi pupa dilakukan dengan metode maserasi *triphasic* menggunakan kombinasi 5 pelarut berupa n-heptane, etil asetat, acetonitrile, butanol-1, dan akuades, sedangkan identifikasi senyawa dilakukan menggunakan uji kualitatif terpenoid, uji *thin layer chromatography* (TLC), dan liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Hasil penelitian menunjukkan bahwa buah dan sayur (BS) paling berpengaruh meningkatkan pertambahan ukuran tubuh larva dengan berat $0,09 \pm 0,04$ gram/larva dan panjang $1,49 \pm 0,31$ cm/larva. Analisis LC-MS mendeteksi senyawa dereplikasi lutein, anisodamine, derivat resveratrol, dehydroarginine, dan senyawa dereplikasi astaxanthin dengan massa molekul sebesar 597,23 m/z pada larva BSF yang diberi pakan buah dan sayur.

Kata kunci: astaxanthin, dekomposer, larva, pertumbuhan, pupa, sampah organik

ABSTRACT

Black soldier flies (*Hermetia illucens* (Linnaeus)) or BSF are insects that process organic waste, with larvae rich in nutrients and potential as an alternative protein source for food and feed. Astaxanthin, an antioxidant found in plants, algae, and crustaceans, is also assumed to be present in insects like BSF. This study examined the impact of feeding different organic wastes on BSF larval growth and astaxanthin content in its pupae. The experimental design involved four treatments: fruit and vegetable scraps (BS), tofu pulp (AT), rice leftovers (N), and a mix of fruit and vegetable scraps, tofu pulp and rice left-over (C), with animal feed T51 as control. Each treatment was repeated three times. Growth parameters of BSF such as weight, length, and larval characteristics, along with the

*Penulis korespondensi: *Aniek Prasetyaningsih, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana
Jalan Wahidin Sudirohusodo 5-25, Yogyakarta 55224, Indonesia, Email: aniek@staff.ukdw.ac.id

chemical content of pupae, including astaxanthin, were measured. Pupae were extracted using a triphasic maceration method with n-heptane, ethyl acetate, acetonitrile, butanol-1, and distilled water. Compound identification was done using terpenoid qualitative tests, thin layer chromatography (TLC), and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The findings revealed that fruit and vegetable scraps (BS) significantly increased larval body size, with a weight of 0.09 ± 0.04 grams/larvae and a length of 1.49 ± 0.31 cm/larvae. LC-MS analysis detected lutein derivatives, anisodamine, resveratrol derivatives, dehydroarginine, and astaxanthin derivatives with a molecular mass of 597.23 m/z in BSF larvae fed on fruit and vegetable scraps.

Key words: astaxanthin, decomposer, growth, larvae, organic waste, pupae

PENDAHULUAN

Larva *black soldier fly* (*Hermetia illucens* (Linnaeus)) yang merupakan serangga dari Famili Stratiomyidae dan Ordo Diptera mempunyai kemampuan untuk mengurai sampah organik. Selain itu, larva *black soldier fly* (BSF) berpotensi digunakan sebagai sumber protein alternatif (Mangunwardoyo et al. 2011) karena larva BSF memiliki kandungan protein yang tinggi dengan kisaran 40–50% dan kandungan lemak berkisar 29–32% (Bosch et al. 2014). Fitur nutrisi yang dimiliki larva BSF menjadikannya sebagai salah satu sumber nutrisi bagi pakan ternak dan berpotensi sebagai pangan manusia (Iñaki et al. 2022). Selain fitur nutrisi yang dimilikinya, nilai unggul larva BSF juga didukung oleh kecenderungannya untuk tidak menjadi vektor penyakit (Wardhana 2016). Selain itu, ketika BSF bertelur di suatu tempat, BSF akan menghasilkan suatu senyawa tertentu yang mengakibatkan lalat rumah (*Musca domestica* Linnaeus) tidak mau bertelur ditempat yang sama (Tomberlin et al. 2009). Hal ini juga mendukung potensi BSF dalam mengurangi penyakit yang dibawa oleh serangga vektor, seperti lalat rumah.

Astaxanthin merupakan salah satu senyawa karotenoid yang tergolong dalam kelompok xantofil (Lopez et al. 2004). Astaxanthin banyak digunakan di bidang farmasetikal karena potensinya sebagai antikanker, antiinflamasi, antidiabetes, dan tinggi akan antioksidan (Davenelli et al. 2018). Sifat antioksidan tinggi menjadi properti utama astaxanthin dengan daya antioksidan yang dimilikinya sepuluh kali lipat lebih kuat dibanding dengan β -karoten (Hussein et al. 2006). Astaxanthin umum diperoleh dari tumbuhan dan alga karena astaxanthin hanya diproduksi dari mekanisme fotosistem (Matthews

et al. 2003) sehingga pada dasarnya hewan tidak dapat menghasilkan sumber astaxanthin sendiri. Namun demikian, astaxanthin dapat ditemukan pada ulat sutra *Bombyx mori* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae). Yuasa et al. (2014) mengatakan bahwa *B. mori* merupakan salah satu serangga yang memiliki kandungan astaxanthin pada pupanya. Keberadaan astaxanthin dalam *B. mori* mengantar dugaan kandungan astaxanthin pada jenis serangga lain seperti BSF. Apabila kandungan astaxanthin ditemukan pada fase pupa BSF maka nilai guna dari setiap fase metamorphosis BSF akan semakin lengkap dan menegaskan perannya yang multiguna bagi manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian jenis pakan berupa sampah organik terhadap pertumbuhan larva BSF dan kandungan astaxanthin pada pupa BSF.

BAHAN DAN METODE

Budi daya BSF dengan pemberian berbagai jenis pakan

Budi daya larva dimulai dengan pemberian perlakuan pada larva berumur 7 hari setelah menetas. Larva berumur 7 hari ini didapat dari peternak maggot yang diberi pakan dedak dengan campuran air dengan perbandingan 1 : 1. Penggunaan larva BSF yang tidak berasal dari penetasan telur mandiri ini didasarkan pada alasan efisiensi waktu penelitian. Perlakuan pakan yang digunakan dalam penelitian meliputi beberapa perlakuan pakan sampah organik yang terdiri atas (1) sisa buah dan sayur (BS); (2) pakan ampas tahu (AT); (3) sisa nasi (N), campuran antara sisa buah dan sayur, ampas tahu dan sisa nasi (C); dan pakan T51 sebagai kontrol (K). Pakan sampah organik

sisa buah dan sayur (BS) merupakan campuran dari sisa buah dan sayur, seperti apel, melon, semangka, jeruk, buah naga, tomat, mangga, pear, kubis, sawi, kangkung, dan timun dengan perbandingan pemberian buah dan sayur 1:1. Buah dan sayur yang diberikan merupakan buah sayur kualitas yang kurang baik yang diperoleh dari pasar tradisional. Pakan T51 merupakan pakan ternak yang terbuat dari campuran dedak, tepung jagung, tepung bungkil kedelai, dan beragam bahan lain. Kandungan nutrisi penting pakan T51 adalah protein yang berkisar 18,5–20,5%, lemak 4% dan abu 8%. Beberapa penelitian untuk pertumbuhan larva BSF menggunakan pakan T51 ini sebagai media kontrol laju pertumbuhan larva BSF (Royen 2022; Swastoko et al. 2023). Dua penelitian tersebut menunjukkan bahwa larva BSF yang diberi pakan T51 lebih cepat memasuki fase pupa. Pakan campuran pada dasarnya merupakan kombinasi dari keempat jenis pakan sebelumnya (buah sayur, ampas tahu, sisa nasi, dan pakan T51 dengan perbandingan 1 : 1 : 1 : 1. Pemberian pakan dilakukan setiap 3 hari sekali sebanyak 3 kali berat larva awal. Setiap perlakuan diulang 3 kali. Masing-masing satuan perlakuan menggunakan 200 gram larva dengan pemberian pakan sebanyak 400 gram yang merupakan nilai dari dua kali berat larva.

Parameter pertumbuhan larva yang diukur adalah berat larva, panjang larva, dan perilaku aktivitas larva dalam media. Pengukuran panjang larva dilakukan menggunakan alat berupa penggaris, sedangkan berat larva menggunakan timbangan analitik. Pengukuran dilakukan dengan cara mengukur 3 larva pada masing-masing satuan perlakuan secara acak dan diukur setiap tiga hari sekali selama 21 hari. Parameter aktivitas larva dalam media diamati melalui sifat pergerakannya (motilitas) saat memakan sampah organik yang diberikan kepada larva BSF tersebut. Pengamatan dilakukan secara visual kualitatif dengan membandingkan aktif tidaknya pergerakan larva dalam setiap media pakan. Pengamatan tersebut dilakukan secara berkala setiap 3 hari sekali bersamaan dengan pengukuran panjang dan berat tubuh larva BSF.

Ekstraksi pupa BSF

Proses ekstraksi selanjutnya dilakukan dengan menggunakan pupa BSF yang telah ditinggalkan oleh lalat setelah memasuki fase metamorfosis

imago. Pupa yang ditinggalkan tersebut yang kemudian diekstrak menggunakan metode maserasi *triphasic* yang menggunakan kombinasi 5 pelarut dengan sifat kepolaran berbeda. Solven yang digunakan merupakan kombinasi pelarut N-heptane (non-polar), *ethyl acetate* (semi polar), *acetonitrile* (polar), butanol-1 (non-polar), dan air (polar) dengan perbandingan 6,6 : 4,2 : 8,7 : 2,4 : 8,1 untuk masing-masing sampel dalam total volume campuran 30 ml. (Gori et al. 2021). Pupa BSF dihaluskan dengan blender kemudian ditimbang sejumlah 2 gram. Sampel kemudian dimasukkan dalam corong pemisah bersama dengan campuran pelarut dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, hasil ekstraksi diambil dan dievaporasi dalam suhu ruangan. Hasil evaporasi ditimbang dan diencerkan dalam larutan dimetil sulfoksida (DMSO) hingga 10 ml (Gori et al. 2021).

Uji terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan mencampur ekstrak pupa BSF dengan kloroform, kemudian ditambahkan 0,005 ml asam anhidrat dan 0,2 ml H₂SO₄ pekat. Warna ungu kecoklatan yang terbentuk pada sampel menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan warna hijau kebiruan menunjukkan senyawa steroid (Syafitri et al. 2014). Keberadaan senyawa terpenoid pada sampel bisa mengindikasikan kemungkinan terdapatnya senyawa astaxanthin sehingga sampel kemudian dianalisis lebih lanjut dengan uji *thin layer chromatography* (TLC) sebagai konfirmasi keberadaan kelompok senyawa terpenoid dan uji *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) untuk eksplorasi kemungkinan nama senyawa kelompok terpenoid yang terdeteksi.

Uji *thin layer chromatography* (TLC) dan *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS)

Uji TLC dilakukan sebagai uji konfirmasi untuk uji terpenoid kualitatif bagi seluruh sampel ekstrak, dan dilakukan dengan menggunakan fase diam berupa gel silika, dan fase gerak berupa *acetonitrile* dan methanol dengan perbandingan 7 : 3. Uji TLC dideteksi menggunakan pancaran sinar UV. Uji LC-MS dilakukan bagi sampel ekstrak yang benar-benar mengandung kelompok senyawa terpenoid. Sampel untuk uji LC-MS dilarutkan dalam solven DMSO 10% dan dilakukan

menggunakan metode ES+ dengan waktu retensi 22 menit.

Analisis data

Analisis statistik terhadap data pertambahan panjang dan berat larva BSF dilakukan menggunakan uji non parametrik berupa uji Kruskal Wallis karena merupakan analisis hasil rancangan percobaan acak lengkap dilakukan tanpa melihat normalitas dan homogenitas data, sedangkan hasil uji LC-MS berupa kromatogram dianalisis menggunakan *software Masslynx*.

HASIL

Pertumbuhan larva BSF

Pertumbuhan larva BSF yang diberi pakan berbagai sampah organik menunjukkan hasil yang berbeda dalam hal berat tubuh larva. Larva yang diberi makan buah dan sayur (BS) dan pakan

campuran (C) memiliki bobot tubuh yang lebih berat dibandingkan dengan perlakuan lainnya, sedangkan larva yang diberi makan ampas tahu (AT) dan nasi (N) memiliki bobot yang lebih ringan dari perlakuan sebelumnya, namun tidak lebih berat dari kontrol. Pemberian pakan sampah organik berupa sisa buah dan sayur (BS) juga memberikan pertambahan panjang larva BSF paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan pakan sampah organik lainnya, meskipun tidak ada perbedaan signifikan pada nilai panjang larva BSF yang dihasilkan dari pemberian pakan yang berbeda tersebut (Tabel 1). Selain itu, larva dan pupa pada setiap perlakuan memiliki karakteristik maupun perilaku yang berbeda (Tabel 2).

Uji terpenoid

Berdasarkan warna yang dihasilkan pada uji terpenoid, terdapat perbedaan warna yang dihasilkan oleh ekstrak sampel pupa BSF pada setiap perlakuan pakan. Ekstrak cangkang pupa

Tabel 1. Pertumbuhan berat dan panjang larva *black soldier fly*

Table 1. Weight and length growth of black soldier fly larvae

Perlakuan (Treatment)	Berat (Weight) (mg)	Panjang (Length) (cm)
BS	93,2 ± 0,05 a	1,49 ± 0,31
AT	68,4 ± 0,03 c	1,31 ± 0,29
N	60,9 ± 0,02 c	1,21 ± 0,30
K	72,4 ± 0,03 b	1,28 ± 0,30
C	93,0 ± 0,05 a	1,39 ± 0,37

BS: buah dan sayur (*fruit and vegetable scraps*); AT: ampas tahu (*tofu pulp*); N: nasi (*rice leftovers*); C: campuran sisa buah dan sayur, ampas tahu dan sisa nasi (*mix of fruit and vegetable scraps, tofu pulp and rice left-over*); K: pakan ternak T51 (kontrol) (*animal feed T51 (control)*). Notasi yang ditandai huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Kruskal Wallis taraf 5%. (*Notations marked with the same letter are not significantly different in Kruskal Wallis test at 5% level*).

Tabel 2. Karakteristik pertumbuhan larva *black soldier fly* dengan ragam perlakuan pakan

Table 2. Growth characteristics of black soldier fly larvae with various feed treatments

Perlakuan (Treatment)	Waktu menjadi pupa (Time to pupae)	Bentuk (Shape)	Warna (Colour)	Motilitas larva (Larval motility)
Buah dan sayur (Fruit and vegetable)	25 hari (25 days)	Besar (Large)	Coklat gelap (Dark brown)	Sedang (Medium)
Ampas tahu (Tofu pulp)	20 hari (20 days)	Kecil (Small)	Putih bersih (Pure white)	Pasif (Passive)
Nasi (Rice leftovers)	16 hari (16 days)	Sedang (Medium)	Putih bersih (Pure white)	Aktif (Active)
Pakan T51 (kontrol) (T51 feeds (control))	13 hari (13 days)	Sedang (Medium)	Coklat (Brown)	Sedang (Medium)
Campuran (Combination)	24 hari (24 days)	Besar (Large)	Coklat gelap (Dark brown)	Sedang (Medium)

BSF yang diberi perlakuan pakan buah dan sayur (BS), campuran (C), dan kontrol (T51) menunjukkan adanya warna ungu kecoklatan (Gambar 1). Hal ini menandakan adanya senyawa terpenoid secara kualitatif pada ketiga sampel tersebut.

Uji thin layer chromatography (TLC)

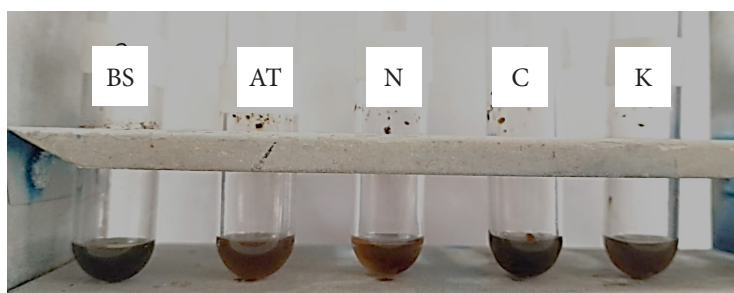
Hasil pengujian TLC menunjukkan adanya adanya noda pada sampel ekstrak pupa BSF yang diberi perlakuan pakan ampas tahu (AT), nasi (N), dan campuran (C) dengan nilai Rf berturut-turut 0,85, 0,85, dan 0,75 (Tabel 3). Sampel ekstrak pupa BSF yang diberi perlakuan pakan lainnya menunjukkan hasil fase gerak yang melewati batas atas lintasan sehingga tidak dapat dihitung nilai Rf nya.

Uji liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

Hasil dari uji LC-MS tiga sampel pupa BSF dari perlakuan pakan berbeda, yaitu buah dan sayur (BS), campuran (C), dan kontrol (T51) yang dipastikan mengandung terpenoid dalam uji kualitatif disajikan dalam Tabel 4. Dari hasil uji LC-MS menunjukkan adanya dereplikasi senyawa

astaxanthin pada waktu retensi 12.22 menit dengan nilai 597,23 m/z (Gambar 2). Keberadaan astaxanthin hanya ditemukan pada sampel ekstrak pupa BSF yang diberi pakan berupa buah dasayur (BS), namun tidak ditemukan pada sampel ekstrak pupa BSF yang diberi pakan campuran (C) dan pakan kontrol T51.

Hasil LC-MS ekstrak pupa BSF yang diberi pakan buah dan sayur (BS) atau sampel 1 menunjukkan adanya 2 dereplikasi senyawa yang dominan. Hal tersebut ditunjukkan melalui puncak kromatogram pada waktu retensi 17.26, 10.53, dan 10.95 menit. Waktu retensi tersebut merupakan puncak tertinggi yang terlihat pada uji LC-MS sampel 1. Kedua dereplikasi senyawa yang dominan tersebut adalah senyawa golongan fosfolipid dan ester. Identifikasi lanjutan dilakukan dengan melihat nilai molekuler massa melalui spektrum massa pada masing-masing puncak. Dereplikasi senyawa golongan fosfolipid ditemukan pada waktu retensi 17.26 dengan nilai molekuler massa 760,60 m/z, sedangkan dereplikasi senyawa ester ditemukan pada waktu retensi 10.53 menit dengan nilai molekuler massa 682,45 m/z dan 10.95 dengan nilai molekuler massa 680,43 m/z.



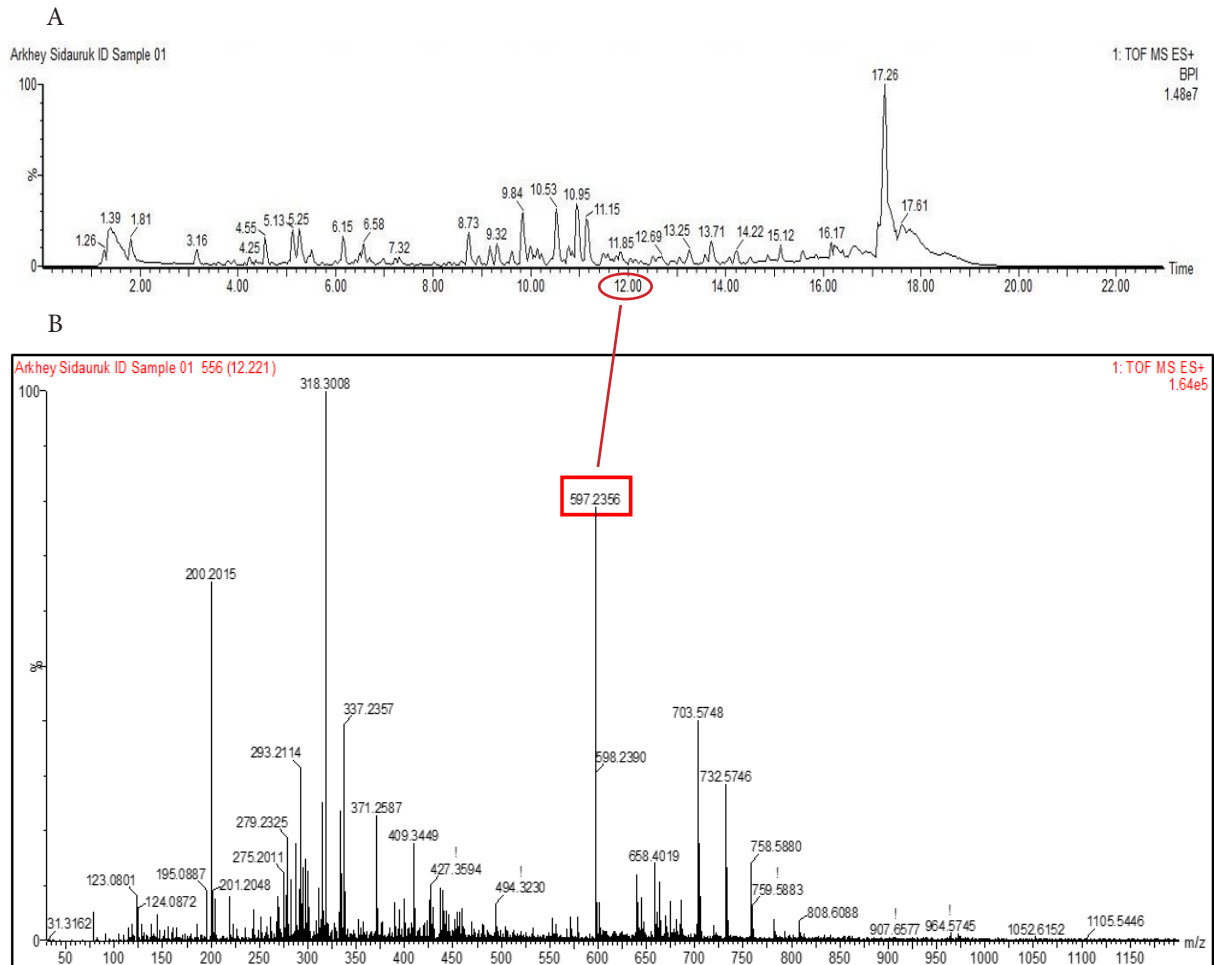
Gambar 1. Hasil uji terpenoid ekstrak pupa *black soldier fly* yang diberi ragam perlakuan pakan. BS: buah dan sayur; AT: ampas tahu; N: nasi; C: campuran; K: pakan T51 (kontrol).

Figure 1. Terpenoid assay results of black soldier fly pupae extracts treated with different feed treatments. BS: fruits and vegetable; AT: tofu pulp; N: rice; C: mixture; K: T51 feed (control).

Tabel 3. Nilai Rf ekstrak pupa *black soldier fly* pada uji thin layer chromatography (TLC)

Table 3. Rf value of black soldier fly pupae extract in thin layer chromatography (TLC) assay

Kode (Code)	Sampel uji (Test sample)	Nilai Rf (Rf value)
a	Kontrol (Control) (Quersetin)	-
b	Buah dan sayur (Fruit and vegetable) (BS)	-
c	Ampas tahu (Tofu pulp) (AT)	0,85
d	Nasi (Rice leftovers) (N)	0,85
e	Pakan kontrol T51 (T51 feed control) (K)	-
f	Campuran (Mixture) (C)	0,75



Gambar 2. Kromatogram LC-MS pada ekstrak sampel 1 (ekstrak sampel perlakuan pakan buah dan sayur), yang ditandai dengan lingkaran merah adalah puncak yang menunjukkan adanya astaxanthin. A: kromatogram LC-MS ekstrak sampel 1 yang teridentifikasi adanya astaxanthin; B: *mass spectra* astaxanthin pada retensi 12 menit 22 detik, massa molekuler 597 m/z.

Figure 2. LC-MS chromatogram of sample extract 1 (fruit and vegetable feed treatment sample extract), marked with red circle is the peak indicating the presence of astaxanthin. A: LC-MS chromatogram of sample 1 extract which identified the presence of astaxanthin; B: *mass spectra* of astaxanthin at retention of 12 minutes 22 seconds, molecular mass 597 m/z.

Hasil LC-MS ekstrak pupa BSF yang diberi pakan campuran (C) atau sampel 2, terdapat banyak puncak yang diperoleh, namun hanya dipilih 3 puncak tertinggi atau dominan pada kromatogram. Ketiga puncak tertinggi pada sampel 2 teridentifikasi pada waktu retensi 10.15; 11.56; dan 16.22 menit. Pada spektrum massa waktu retensi 10.15 menit ditemukan dereplikasi senyawa homoisoflavonoid dengan molekuler massa 343,29 m/z. Puncak kedua ditemukan pada waktu retensi 11.56 menit yang ditunjukkan pada spektrum massa dengan nilai molekuler massa 288,25 m/z teridentifikasi sebagai dereplikasi senyawa anisodamine. Puncak ketiga terdapat dereplikasi senyawa turunan resveratrol pada waktu retensi 16.22 menit dengan nilai 535,27 m/z.

Dari kromatogram LC-MS sampel ekstrak pupa BSF yang diberi pakan kontrol T51 atau sampel 3, diambil 3 puncak tertinggi yang teridentifikasi pada waktu retensi 06.18; 17.08; dan 17.91 menit. Spektrum massa puncak pertama sampel 3 pada waktu retensi 06.18 menit mempunyai nilai molekuler 569,3667 m/z teridentifikasi sebagai dereplikasi senyawa lutein. Spektrum massa waktu retensi 17.08 menit didominasi oleh senyawa dengan massa molekuler 391,28 m/z yang teridentifikasi sebagai dereplikasi senyawa glucopyranoside. Senyawa dominan ketiga pada sampel 3 adalah dereplikasi senyawa *dehydroarginine* dengan nilai 774,60 m/z yang mendominasi pada spektrum massa waktu retensi 17.91 menit (Tabel 4).

Tabel 4. Tiga puncak dominan hasil dereplikasi tiga ekstrak *triphasic* sampel pupa *black soldier fly* pada kromatogram LC-MS

Table 4. Three dominant peaks resulting from dereplication of three *triphasic* extracts of *black soldier fly* pupae samples on LC-MS chromatogram

Sampel (Sample)	Retensi (Retention)	Dereplikasi senyawa (Compound dereplication)	Turunan senyawa (Compound derivatives)	Rumus mol/MW (Formula mol/MW)	m/z	Referensi (Reference)
Sampel 1: Pakan buah dan sayur (Sample 1: Vegetables and fruits)	10.53	Ethyl 4-{6-[(2-[(2,6 diisopropylphenyl) carbamoyl] amino}-1phenylethyl)amino]]-6 oxohexyl}-1 piperazine carboxylate - ethyl acetate (1:1)	Ester	$C_{38}H_{77}N_5O_3$	682,4542	Ashraf-Khorassani et al. (2005)
	10.95	N, N'-(3,3' (Methylazanediy) bis(propane-3,1 diyl))bis(3-methyl-2- (4-methylpiperazin-1-yl) quinoline-4- carboxamide) (DIME-S)	Ester	$C_{39}H_{53}N_9O_2$	680,4388	
	12.22	Astaxanthin	-	$C_{40}H_{52}O_4$	597,2356	Van Breemen et al. (2012)
	17.26	L - α - Phosphatidylcholine; Phosphatidylcholines; Phospholutein	Fosfolipid	$C_{42}H_{80}NO_8P$	760,6083	Dean & Glasgow (2012)
Sampel 2: Pakan campuran (Sample 2: Mixture feeds)	10.15	5,4=,dihydroxy-7,3=, dimethoxy8-methyl homoisoflavanone	Flavonoid	$C_{17}H_{16}O_6$	343,2955	Zhu, et al. (1988)
	11.56	Anisodamine	-	$C_{17}H_{23}NO_4$	288,2534	Chen et al. (2005)
	16.22	Resveratrol derivate	Resveratrol	$C_{14}H_{12}O$	535,2713	Bystrom et al. (2008)
Sampel 3: Pakan T51 (Sample 3: T51 feeds)	06.18	Lutein	Lutein	$C_{40}H_{56}O_2$	569,3667	Rosso & Mercadante (2007)
	17.08	9 -hydroxy - megastigma3,5,8 - trien - 7 -one 9 - O - β D - glucopyranoside	Glucopyranoside	$C_{19}H_{32}O_7$	391,2857	Chunxiao (2017)
	17.91	Dehydroaraginine	-	$C_6H_{12}N_4O_2$	774,6095	Shadpour (2006)

PEMBAHASAN

Berdasarkan data pertumbuhan ukuran larva BSF (Tabel 1) terlihat bahwa perbedaan perlakuan pakan menunjukkan pengaruh terhadap berat larva BSF. Hal ini sejalan dengan penelitian Maulana et al. (2021) yang menyebutkan adanya pengaruh media pakan yang dikonsumsi oleh larva BSF terhadap pertumbuhannya. Pemilihan sumber pakan berupa sampah organik memberikan pengaruh pertumbuhan yang baik bagi BSF, sesuai dengan penelitian Salman et al. (2020) yang mengatakan bahwa sampah organik rumah tangga memberikan efektivitas pertumbuhan 4–5 kali lipat bagi larva BSF. Sistem metabolisme larva BSF juga memiliki kemampuan untuk memanfaatkan protein dan nutrien lain dari pakan untuk membentuk biomassa BSF (Suciati 2017). Perlakuan pakan berupa buah sayur (BS) dan pakan campuran (C) memiliki kandungan nutrisi yang cenderung seimbang sehingga berpotensi dalam mendukung pertumbuhan berat larva BSF (Utama & Mulyanto 2009). Selain mempengaruhi parameter pertumbuhan berupa panjang dan berat larva, pakan yang diberikan juga berpengaruh terhadap karakteristik larva BSF yang meliputi bentuk, warna, perubahan ke fase pupa, dan ketahanan hidup larva. Khusus untuk data ketahanan hidup larva dalam media pakan yang berbeda, secara khusus tidak dilakukan penghitungan dan hanya dilakukan pengamatan secara visual. Meskipun mempunyai kandungan nutrien yang cenderung seimbang, pakan berupa buah sayur dan campuran organik memiliki kandungan air yang tinggi (Mahmud et al. 2009) sehingga dalam penelitian ini didapati menyebabkan matinya sekitar 50–60% larva BSF yang dipelihara pada perlakuan pakan buah dan sayur (BS).

Hasil uji terpenoid menunjukkan sampel ekstrak pupa BSF yang diberi pakan berupa buah sayur, campuran, dan pakan T51 menghasilkan warna ungu kecoklatan. Sejalan dengan penelitian Syafitri et al. (2014), kemunculan warna ungu kecoklatan pada sampel uji menunjukkan adanya senyawa terpenoid dalam sampel sehingga pupa BSF yang larvanya diberi pakan berupa buah sayur, campuran, dan pakan T51 terindikasi mengandung senyawa terpenoid yang merupakan kelompok besar yang astaxanthin tergolong

didalamnya. Uji lanjutan keberadaan astaxanthin dalam ekstrak pupa BSF selanjutnya dilakukan secara semi kuantitatif melalui uji TLC dan LC-MS. Menurut Kobayashi & Sakamoto (1999), dalam analisis menggunakan TLC, senyawa astaxanthin diester memiliki nilai R_f 0,75–0,85, sedangkan astaxanthin monoester memiliki nilai R_f 0,6. Berdasarkan hasil perhitungan R_f dalam uji TLC yang dilakukan dalam penelitian ini, sampel ekstrak pupa BSF yang diberi pakan ampas tahu, nasi, dan campuran terindikasi mengandung astaxanthin secara umum. Namun demikian, uji terpenoid diperlukan sebagai pembanding untuk mengetahui keberadaan senyawa astaxanthin yang merupakan golongan terpenoid pada ekstrak.

Kromatogram hasil analisis LC-MS ekstrak pupa BSF yang diberi pakan buah dan sayur (sampel 1) menunjukkan adanya dereplikasi astaxanthin pada waktu retensi 12.22 menit. Hasil yang disajikan dalam Gambar 3 menunjukkan bahwa spektrum massa waktu retensi 12.22 menit ditemukan adanya senyawa dereplikasi astaxanthin ditemukan pada nilai 597,2356 m/z. Secara umum astaxanthin memiliki massa molekul 597 m/z (Mariutti et al. 2012).

Pada waktu retensi 12.22 menit tidak ditemukan puncak pada sampel 1 (ekstrak pupa BSF yang diberi perlakuan pakan buah dan sayur) yang menunjukkan kuantitas senyawa dereplikasi astaxanthin yang sangat sedikit. Meskipun hasil kromatogram pada waktu retensi 12.22 menit ini belum ditemukan puncak dan cenderung landai, tetapi secara spektrum dapat dilihat bahwa massa molekul senilai 597,2356 m/z cukup mendominasi pada waktu retensi tersebut. Oleh karena waktu retensi 12.22 menit pada sampel 1 tidak menunjukkan adanya puncak pada kromatogram, hal ini kemudian mendorong dilakukannya pengujian terhadap ekstrak pupa BSF yang diberi pakan campuran (sampel 2) dan ekstrak pupa BSF yang diberi pakan T51 (sampel 3) pada waktu retensi yang sama untuk melihat adanya kandungan senyawa astaxanthin pada sampel 2 dan 3 tersebut.

Pada sampel 1 terdapat 1 puncak tertinggi kromatogram pada waktu retensi 17.26 menit (Gambar 4). Jika dibandingkan dengan puncak lain, puncak pada waktu retensi tersebut merupakan puncak tertinggi pada sampel 1. Identifikasi

senyawa yang terkandung pada waktu retensi tersebut dilakukan dengan melihat besar massa molekul yang terbentuk. Puncak pada waktu retensi 17.26 menit memiliki massa molekul 760,6081 m/z. Massa molekul 760 m/z pada dasarnya dimiliki oleh golongan fosfolipid yang memiliki fungsi sebagai patokan dalam pengujian L- α -Phosphatidylcholine (Dean & Glasgow 2012). Tingginya senyawa lipid pada ekstrak sampel 1 dipengaruhi oleh komponen utama ekstrak sampel, yaitu pupa BSF yang terbentuk dari eksoskeleton (Pratiwi et al. 2022). Selain puncak tersebut, diidentifikasi 2 senyawa lain yang terdeteksi memiliki kelimpahan yang cukup tinggi pada waktu retensi 10.53 dan 10.95 (Tabel 4). Kedua senyawa tersebut tergolong dalam senyawa ester atau lebih tepatnya adalah *Tetra-acylated sucrose esters* (Ashraf-Khorassani et al. 2005).

Sampel 2 merupakan sampel ekstrak pupa BSF yang diberi perlakuan pakan organik campuran. Dari sampel ini diambil 3 puncak tertinggi kromatogram LC-MS untuk mengetahui senyawa dominannya. Tiga puncak tertinggi yang teridentifikasi mempunyai waktu retensi 10.15 menit, 11.56 menit, dan 16.22 menit. Pada puncak 10.15 menit (Tabel 4) terdapat nilai massa molekul yang mendominasi, yaitu 343,2955 m/z. Nilai 343,2955 m/z dimiliki oleh dereplikasi senyawa 5,4-dihydroxy-7,3-dimethoxy-8-methyl homoisoflavanone (Zhu et al. 1988). Senyawa tersebut merupakan senyawa flavonoid golongan homoisoflavanoid. Homoisoflavanoid sendiri secara umum sering dimanfaatkan sebagai antibakteri, antiinflamasi, anti-*photoaging*, anti-alergi, dan antioksidan (Nirmal et al. 2015).

Puncak kedua pada sampel 2 terdapat pada waktu retensi 11.56 menit. Senyawa yang mendominasi pada puncak tertinggi ke 2 memiliki massa molekul sebesar 288,2534 m/z. Nilai 288,2534 m/z merupakan dereplikasi senyawa dari anisodamine (Chen et al. 2005). Anisodamine sendiri pada dasarnya merupakan antikolinergik yang banyak dimanfaatkan pada dunia medis, seperti sebagai antiinflamasi (Zhang et al. 2010).

Puncak ketiga pada kromatogram LC-MS sampel 2 ditunjukkan pada waktu retensi 16.22 menit. Massa molekul yang mendominasi pada waktu retensi tersebut adalah 535,2713 m/z. Senyawa yang memiliki massa molekul 535 m/z

merupakan golongan fenolik atau lebih spesifiknya merupakan senyawa turunan dari resveratrol. Oleh karena itu, senyawa yang memiliki massa molekul sebesar 535,2713 m/z merupakan dereplikasi dari turunan senyawa resveratrol (Bystrom et al. 2008). Secara umum senyawa resveratrol memiliki banyak senyawa turunan yang potensial. Aktivitas farmakologi dari turunan senyawa resveratrol di antaranya sebagai antikanker, antimikrobia, antihipertensi, antidiabetes, antipenuaan, anti-*alzheimer*, anti-obesitas, antikolesterol, antioksidan, dan antihiperurisemia (Saraswaty et al. 2020).

Sampel 3 merupakan ekstrak pupa BSF yang diberi perlakuan pakan komersil T51. Pakan T51 dipilih sebagai kontrol karena kandungan protein dan lemak yang tinggi dan terbukti dapat memacu pertumbuhan larva BSF pada penelitian sebelumnya (Swastoko et al. 2023). Sampel 3 memiliki beberapa puncak di sepanjang waktu retensi yang berjalan dan pada sampel ini juga dipilih 3 puncak tertinggi untuk diidentifikasi kandungan senyawanya. Senyawa yang terdeteksi pada puncak pertama dengan waktu retensi 6.18 menit (Tabel 4) memiliki massa molekul sebesar 569,3663 m/z. Massa molekul tersebut dimiliki oleh senyawa dereplikasi dari lutein (Rosso & Mercadante 2007). Senyawa ini merupakan golongan dari hydroxycarotenoids (Rivera et al. 2013) dan memiliki kemampuan yang baik sebagai antioksidan (Krinsky & Deneke 1982).

Puncak tertinggi kedua pada sampel 3 terdapat pada waktu retensi 17.8 menit (Tabel 4). Pada waktu retensi tersebut terdapat senyawa dengan massa molekul 391,2857 m/z yang mendominasi. Menurut Chunxiao (2017), senyawa dengan massa molekul 391 m/z merupakan 9-hydroxy-megastigma-3,5,8-trien-7-one 9-O- β D-glucopyranoside dan merupakan jenis lipid membran yang terkandung dalam membran sel (Lingwood & Simons 2010). Sampel 3 merupakan ekstrak pupa BSF yang didapat dari perlakuan pakan T51 yang teridentifikasi menyediakan asupan protein dan lipid tinggi bagi larva BSF. Lalat BSF sendiri merupakan anggota dari kelas insekta sehingga eksoskeleton pupanya selain disusun oleh kitin juga mengandung biomolekul lipid dan protein (Herdyastuti et al. 2009). Tingginya kandungan protein dan lipid pada makanan

larva juga dapat memengaruhi kandungan lipid pada eksoskeleton sehingga salah satu senyawa dominan pada sampel 3 adalah senyawa lipid berupa 9-hydroxy-megastigma3,5,8-trien-7-one 9-O-βD-glucopyranoside.

Puncak tertinggi ketiga pada sampel 3 terdapat pada waktu retensi 17.91 menit (Tabel 4) yang memiliki massa molekuler sebesar 774,6094 m/z. Nilai massa molekuler 774 m/z dimiliki oleh senyawa *dehydroarginine* yang merupakan anggota dari asam amino (Shadpour 2006). Secara umum kromatogram LC-MS sampel 3 menunjukkan keberadaan kandungan lipid dan protein dalam level yang tinggi. Pemberian pakan T51 pada larva BSF pada sampel 3 menunjukkan pengaruh tingginya kadar protein dan lipid pakan yang diberikan terhadap kandungan protein dan lipid sampel 3 (Herdyastuti et al. 2009).

Rangkaian hasil penelitian ini menunjukkan potensi pupa BSF sebagai sumber alami senyawa karotenoid, seperti astaxanthin dan lutein dengan kandungan senyawa tersebut berkaitan erat dengan jenis pakan yang dikonsumsi oleh serangga tersebut di fase larvanya. Deteksi awal kandungan astaxanthin dalam pupa BSF dalam penelitian ini didapatkan dari larva BSF yang diberi pakan berupa sisa buah dan sayur. Hasil penelitian ini meletakkan dasar pemilihan buah dan sayur tertentu yang telah diketahui mempunyai kandungan astaxanthin tinggi untuk digunakan sebagai pakan larva BSF. Pemberian pakan kulit buah dan sayur yang telah diketahui mengandung astaxanthin tinggi diharapkan dapat mendukung sintesis senyawa serupa pada tubuh BSF, terutama bagian pupa yang ditinggalkan oleh serangga dewasa

KESIMPULAN

Pemberian pakan berupa sampah organik berupa sisa buah sayur memberikan nilai pertambahan berat larva BSF paling baik dibandingkan dengan sampah organik lainnya. Larva yang diberi makan buah sayur juga memiliki kandungan senyawa astaxanthin yang ditemukan dengan nilai 597,2356 m/z pada waktu retensi 12.22, serta terdapat kandungan senyawa fosfolipid dan ester. Selain itu, ekstrak pupa BSF

yang ketika larva diberi makan campuran sampah organik teridentifikasi mengandung senyawa homoisoflavonoid, anisodamine, dan derivat resveratrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashraf-Khorassani M, Nazem N, Taylor L, Coleman, W. 2005. Separation and identification of sucrose esters from turkish tobacco using liquid chromatography-mass spectrometry. *Beiträge zur Tabakforschung International*. 21:380–389. DOI: <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0804>.
- Breemen RB, Dong L, Pajkovic ND. 2012. Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. *International Journal of Mass Spectrometry*. 15:163–172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.07.030>.
- Bosch G, Zhang S, Oonincx DG, Hendrick WH. 2014. Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Journal of Nutritional Science*. 25:3:e29. DOI: <https://doi.org/10.1017/jns.2014.23>.
- Bystrom LM, Lewis BA, Brown DL, Rodriguez E, Obendorf RL. 2008. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits. *Food Chemistry*. 111:1017–1024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.058>.
- Chen H, Wang H, Chen Y, Zhang H. 2005. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Anisodamine and Its Phase I and II Metabolites in Rat Urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 824:21–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.07.036>.
- Chunxiao Jia YZ. 2017. Identification of glycoside compounds from tobacco by high performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion-trap tandem mass spectrometry coupled with electrospray ionization orbitrap mass spectrometry. *Brazilian Chemical Society*. 28:629–640.
- Davenelli S, Nielsen ME, Scapagnini G. 2018. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review. *Nutrients*. 10:522. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10040522>.
- Dean AW, Glasgow BJ. 2012. Mass spectrometric identification of phospholipids in human tears and tear lipocalin. *Investigative Ophthalmology*

- & *Visual Science*. 53:1773–1782. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9419>.
- Gori A, Boucherle B, Rey A, Rome M, Fuzzati N, Peuchmaur M. 2021. Development of an inovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products. *Fitoterapia*. 148:104798. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104798>.
- Herdyastuti N, Raharjo TJ, Mudasir, Matsjeh S. 2009. Chitinase and chitinolytic microorganism: Isolation, characterization and potential. *Indonesian Journal of Chemistry*. 9:37–47. DOI: <https://doi.org/10.22146/ijc.21580>.
- Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*. 69:443–449. DOI: <https://doi.org/10.1021/np050354+>.
- Iñaki GBJ, Antonio PCG, Efrén D, Hiram MR, Daniela GI, Damián RJ. 2022. Black soldier fly: Prospection of the inclusion of insect-based ingredients in extruded foods. *Food Chemistry Advances*. 1:100075. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100075>.
- Kobayashi M, Sakamoto Y. 1999. Singlet oxygen quencing ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 21:265–269. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1005445927433>.
- Krinsky NI, Deneke SM. 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with Carotenoids. *Journal of The National Cancer Insitute*. 69:205–210.
- Lingwood D, Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 327:46–50. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
- Lopez M, Arce L, Garrido J, Rios A, Valcarcel M. 2004. Selective extraction of astaxanthin from Crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta*. 64:726–731. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.048>.
- Mahmud MK. 2009. *Tabel Komposisi Pangan Indonesia (TKPI)*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Mangunwardoyo W, Aulia, Hem S. 2011. Penggunaan bungkil inti kelapa sawit hasil biokonversi sebagai substrat pertumbuhan larva *Hermetia illucens* L (Maggot). *BIOTA*. 16:166–172. DOI: <https://doi.org/10.24002/biota.v16i2.95>.
- Mariutti LRB, Pereira DM, Mercadante AZ, Valentão P, Teixeira N, Andrade PB. 2012. Further insight on the carotenoid profile of the echinoderm *Marthasterias glacialis* L. *MarDrugs*. 10:1498–1510. DOI: <https://doi.org/10.3390/md10071498>.
- Matthews PD, Luo R, Wurtzel ET. 2003. Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: Implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany*. 54:2215–2230. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erg235>.
- Maulana NY, Nurmeiliasari, Fenita Y. 2021. Pengaruh media tumbuh yang berbeda terhadap kandungan air, protein, protein, dan lemak maggot *black soldier fly* (*Hermetia illucens*). *Buletin Peternakan Tropis*. 2:150–157. DOI: <https://doi.org/10.31186/bpt.2.2.149-157>.
- Nirmal NP, Rajput MS, Prasad RG, Ahmad M. 2015. Brazilin from *Caesalpina sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review. *Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8:421–430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.05.014>.
- Pratiwi SN, Utami N, Damayanti PN. 2022. Extraction chitosan and characterization nanoparticle chitosan from pupar sheels of black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Medical Sains Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 7:963–972. DOI: <https://doi.org/10.37874/ms.v7i4.516>.
- Rivera SM, Christou P, Canela-Garayoa R. 2013. Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 33:353–372. DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.21390>.
- Rosso de VV, Mercadante AZ. 2007. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA, MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 55:5062–5072. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0705421>.
- Royen A. 2022. *Pertumbuhan Larva Lalat Tentara Hitam (Hermetia illucens L) yang Diberi Pakan Organik Nabati dan Hewani*. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Kristen Duta Wacana.
- Salman NE, Nofiyanti E, Nurfadhilah T. 2020. Pengaruh dan efektivitas maggot sebagai proses alternatif penguraian sampah organik kota di Indonesia. *Jurnal Serambi Engineering*. 5:835–841. DOI: <https://doi.org/10.32672/jse.v5i1.1655>.
- Saraswaty V, Adnyana IK, Pudjiraharti S, Rachmawati H. 2020. Potential benefits of resveratrol derivatives for treatment and prevention of metabolic syndromes. *Rasayan Journal of Chemistry*. 13:1363–1371. DOI: <https://doi.org/10.31788/RJC.2020.1335815>.
- Shadpour H. 2006. *Two-Dimensional and High-Throughput Electrophoretic Separation of Proteins Using Polymeric Microchips*. Los Angeles: Lousiana State University and Agriculture and Mechanical College.

- Suciati R. 2017. Efektivitas media pertumbuhan maggots *Hermetia illucens* L. (lalat tentara hitam) sebagai solusi pemanfaatan sampah organik. *Biosfer: Jurnal Biologi dan Pendidikan Biologi*. 2:8–13. DOI: <https://doi.org/10.23969/biosfer.v2i1.356>.
- Swastoko ED, Madyaningrana K, Krismono. 2023. Pemanfaatan limbah organik tulang ayam dan sisa nasi sebagai pakan larva lalat tentara hitam (*Hermetia illucens* L.). *Biotropic*. 7:10–24. DOI: <https://doi.org/10.29080/biotropic.v7i2.1876>.
- Syafitri NE, Bintang M, Falah S. 2014. Kandungan fitokimia, total fenol, dan total flavonoid ekstrak buah harendong (*Melastoma affine* D. Don). *Journal Current Biochemistry*. 1:105–115.
- Tomberlin J, Adler PH, Myers HM. 2009. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomidae) in relation to temperature. *Environmental Entomology*. 38:930–934. DOI: <https://doi.org/10.1603/022.038.0347>.
- Utama C, Mulyanto A. 2009. Potensi limbah pasar sayur menjadi starter fermentasi. *Jurnal Kesehatan*. 2:6–13.
- Wardhana AH. 2016. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) as an alternative protein source for animal feed. *WARTOZA*. 26:069–078.
- Yuasa M, Kitamura A, Maoka T, Sakudoh T, Shimada T, Tsuchida K. 2014. Astaxanthin and lutein compete for accumulation into the middle silk gland via yellow cocoon gene (C)-dependent control and produce a red cocoon of *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture*. 83:1–11.
- Zhang J, Huang L, He J, Tomberlin J. 2010. An artificial light source influence mating and oviposition of black soldier flies, *Hermetia illucens*. *Journal of Insect Science*. 10:1–7. DOI: <https://doi.org/10.1673/031.010.20201>.
- Zhu Y, Yan K, Tu G. 1988. Separation and determination of homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 437:265–267. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)90392-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)90392-3).