

ANALISIS BERBAGAI METODE IDENTIFIKASI ISOFLAVON: LITERATUR REVIEW
ANALYSIS OF VARIOUS ISOFLAVONE IDENTIFICATION METHODS: LITERATURE REVIEW

Vriezka Mierza^{1*}, Fitri Aida¹, Hajar Hartati¹, Herdiana Verliani¹, Nisa Alifia Zahra¹, Rika Valensia.

¹Universitas Singaperbangsa Karawang, Karawang, Jawa Barat. Indonesia.

*Author e-mail: vriezka.mierza@fikes.unsika.ac.id, aidaaafitr@gmail.com

ABSTRACT

Isoflavone is included in the phytoestrogens, a natural plant substance with a structure similar to 17- β -estradiol. It can bind to estrogen receptors so that isoflavones can prevent or slow down forms of cancer related to Alzheimer's hormones, osteoporosis, and others. Isoflavones are also included in the flavonoids found in fruits such as berries, grapes and are most abundant in soybeans and other nuts. From the literature study that has been conducted, it was found that there are several methods for identifying isoflavone compounds, including HPLC/HPLC, TLC, UV-Vis Spectrophotometry, Mass Spectrophotometry, and others. Of the many types of isoflavones that exist, the most commonly identified isoflavones are genistein and daidzein, which can be found in samples of soybeans, soy milk, and processed tempeh. The isoflavone content identified by each researcher differs in terms of the quantity and type of isoflavone content. This is because in identifying isoflavones, there are factors that influence them. The duration of fermentation has an effect because it is related to the presence of dissolved compounds during the fermentation process, which results in differences in the quantity of isoflavones, besides that the reactive and easily oxidized nature of isoflavones causes isoflavones to bind to other compounds to form new unknown compounds so that isoflavones are no longer identified.

Keywords: *Isoflavones, daidzein, genestein, soybeans, HPLC*

ABSTRAK

Isoflavon termasuk kedalam fitoestrogen yaitu zat tumbuhan alami yang memiliki struktur mirip dengan 17- β -estradiol dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen sehingga isoflavon dapat mencegah atau memperlambat bentuk kanker yang berkaitan dengan hormon alzheimer, osteoporosis dan lainnya. Isoflavon juga termasuk ke dalam flavonoid yang dapat ditemukan pada buah-buahan seperti beri, anggur dan paling banyak terkandung dalam kacang kedelai dan kacang-kacangan lainnya. Dari studi literatur yang telah dilakukan didapatkan bahwa terdapat beberapa metode dalam mengidentifikasi senyawa isoflavon diantaranya: HPLC/KCKT, KLT, Spektrofotometri UV-Vis, Spektrofotometri Massa dan lainnya. Dari sekian banyak jenis isoflavon yang ada, jenis isoflavon yang paling banyak teridentifikasi adalah genistein dan daidzein yang dapat ditemukan pada sampel kacang kedelai, susu kedelai, dan olahan tempe. Kandungan isoflavon yang diidentifikasi setiap peneliti memiliki perbedaan baik dari segi kuantitas kandungan isoflavon ataupun jenis dari isoflavon itu sendiri. Hal itu disebabkan karena dalam mengidentifikasi isoflavon terdapat faktor-faktor yang memengaruhinya. Lama waktu fermentasi berpengaruh karena berkaitan dengan adanya senyawa yang terlarut selama proses fermentasi yang mengakibatkan adanya perbedaan kuantitas isoflavon, selain itu juga sifat reaktif dan mudah teroksidasi dari isoflavon menyebabkan isoflavon berikatan dengan senyawa lain membentuk senyawa baru yang tidak diketahui sehingga isoflavon tidak lagi teridentifikasi.

Kata kunci: *Isovalfon, daidzein, genestein, kacang kedelai, HPLC.*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis dengan penghasil kedelai (*Glycine max (L.) Merrill*), tanaman sub-tropis milik Leguminoceae, sehingga banyak penelitian dilakukan dalam meningkatkan kualitas nutrisi kedelai, seperti membudidayakan varietas kedelai baru. Tingginya nutrisi pada kedelai menyebabkan meningkatnya konsumsi kedelai membawa minat dalam meningkatkan budidaya dan karakteristiknya (Jiao et al., 2012).

Tumbuhan menghasilkan metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan dari stres biotik dan abiotik. Isoflavon merupakan salah satu metabolit sekunder yang merupakan komponen utama dalam kedelai dihasilkan oleh tanaman melalui sintesis *2-hydroxyisoflavone synthase* dan diklasifikasikan menjadi empat kelompok, diantaranya: aglikon, glukosida, malonyl glukosida, dan asetil glukosida. Senyawa ini tidak disintesis oleh mikroorganisme, oleh karena itu, kedelai adalah sumber utama senyawa isoflavon di alam. Isoflavon dalam kedelai memiliki beberapa efek kesehatan yang dimanfaatkan dalam obat-obatan untuk mengobati kanker, penyakit alzheimer, aterosklerosis, diabetes, dan agen anti-inflamasi (Panche et al., 2016).

Diantara empat bentuk isoflavon, aktivitas biologis tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon yaitu, genistein, daidzein, dan glycitein. Isoflavon aglikon diserap lebih cepat dan memiliki jumlah lebih besar daripada glukosida dalam tubuh manusia. Genistein dan daidzein dilaporkan sebagai senyawa utama dengan jumlah signifikan yang terkandung dalam kedelai (Sulistiyowati et al., 2018). Kandungan isoflavon dalam kedelai tergantung pada faktor genetik dan lingkungan, termasuk iklim, lokasi tanam, tahun tanam, tanggal tanam dalam tahun tanam tertentu, dan kondisi penyimpanan (Szymczak et al., 2017).

Isoflavon adalah subkelas flavonoid yang memiliki struktur difenilpropana, polifenol yang mengandung 15 karbon dengan dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh jembatan tiga karbon, oleh karena itu pengaturan C6-C3-C6 (Crozier et al., 2009; Miadoková, 2009). Menurut *Nomenklatur International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, struktur isoflavon adalah 3-fenilkromon-4-satu. Perbedaan struktural utama antara isoflavon dan flavon adalah di mana karbon cincin-C cincin-B ditempatkan dalam kerangka flavonoid. Cincin-B dalam isoflavon melekat pada C-3, sedangkan

cincin flavon berada pada C-2. Sumber alami isoflavon termasuk keluarga *Fabaceae*, semanggi merah (*Trifolium pratense*), alfalfa (*Medicago sativa*), kudzu (*Pueraria lobate*), dan spesies dari genus *Genista* (Bustamante-Rangel et al., 2018). Di antara mereka, kedelai adalah sumber alami utama untuk isoflavon. Kedelai terutama mengandung 12 jenis isoflavon sesuai dengan jenis aglikon dan gugus fungsi (Popa & Rusu, 2017).

Identifikasi dan kuantifikasi isoflavon dalam kedelai memerlukan serangkaian proses pemisahan dan deteksi. Banyak prosedur analisis yang melibatkan metode kromatografi, seperti LC, kromatografi lapisan tipis (KLT), dan kromatografi gas (GC). Pemisahan molekul menggunakan kromatografi pertama kali dikembangkan oleh Mikhail Semyonovich Tsvet pada Tahun 1903 (Bustamante-Rangel et al., 2018). Pewarnaan KLT berbasis silika digunakan untuk pemisahan dan identifikasi senyawa sampai pertengahan 1900-an, sebelum metode instrumental mulai umum digunakan. Karakteristik volatilitas dari molekul isoflavon memerlukan proses derivatisasi jika dianalisis oleh GC. Sistem LC memiliki banyak keuntungan seperti persiapan sampel yang kurang padat, kemungkinan pemulihan sampel, penerapan yang luas, dan prosedur otomatis yang andal (Bustamante-Rangel et al., 2018).

Sistem analitik berbasis LC seperti HPLC dan *ultra-performance liquid chromatography (UPLC)* telah berhasil digunakan untuk analisis simultan isoflavon kedelai (Bustamante-Rangel et al., 2018). Dalam HPLC, pemisahan fase terbalik (RP) dibantu dengan octadecylsilyl silica (ODS) adalah teknik analisis yang paling umum untuk isoflavon kedelai. Dua pelarut yang paling umum, metanol dan asetonitril, digunakan sebagai fase bergerak dalam sistem pemisahan LC dengan kolom RP (reverse phase) (Jang et al., 2019). Analisis simultan isomer flavon dan flavonol menunjukkan pemisahan yang baik ketika suhu oven kolom adalah 40 °C daripada 20 °C (Jang et al., 2019).

Dalam Analisis secara spektrofotometri Uv-vis, ada banyak laporan yang memastikan pada karakteristik spektrum UV isoflavon kedelai (Foudah & Abdel-Kader, 2017). Puncak penyerapan sinar UV senyawa isoflavon kedelai berada pada 245-270 nm. Sementara puncak bahu isoflavon kedelai berada pada 310-330 nm, karena cincin-B yang melekat pada C-3 dalam isoflavon mempengaruhi spektrum UV (Bustamante-Rangel

et al., 2018; Foudah & Abdel-Kader, 2017). Penelitian ini dilakukan dengan mereview beberapa jurnal dengan menganalisis sistem metode yang digunakan dalam identifikasi kandungan senyawa isoflavon.

METODE

Metode yang digunakan oleh peneliti adalah *systematic literatur review* yaitu melakukan kajian dari berbagai sumber. Studi literatur ini dilakukan dengan menggunakan bantuan database seperti

Google Scholar, *Pubmed*, *Sciencedirect*, dan *Google Cendekia* dengan kata kunci “isoflavon”, “identifikasi isoflavon” dan “isoflavon pada tumbuhan”.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan studi literatur, didapat beberapa sumber artikel yang mengidentifikasi keberadaan isoflavon menggunakan instrumen dan sampel yang bervariasi. Data tersebut disajikan dalam tabel:

Tabel 1 Identifikasi Isoflavon dengan Berbagai Metode

No	Sumber	Metode	Sampel	Hasil
1	Daud et al., 2019.	HPLC dan spektrofotometri MS	Kedelai varietas Dena I	Pada kromatogram, ekstrak sampel dengan genistein memiliki puncak pada waktu retensi hampir sama yakni 24,696 menit pada sampel dan 24,490 menit pada genistein yang berarti terdapat isoflavon jenis genistein pada sampel. Didapatkan konsentrasi genistein pada ekstrak Dena I yaitu 0,0524 mg/g, untuk membuktikan bahwa waktu retensi 24,699 menit adalah genistein, ekstrak Dena I juga dianalisis menggunakan spektrometer MS yang bekerja sebagai perangkap ion dalam mendeteksi keberadaan genistein yang memiliki berat molekul 271. Sampel terkonfirmasi mengandung genistein setelah muncul puncak ion molekul pada m/z 542,90 yang mewakili berat dimer molekul genistein.
2.	Li et al., 2014	HPLC	<i>Glycine max</i> (Kacang kedelai)	12 isoflavon standar terdiri dari daidzein, glicitin, genistein, malonildaidzin, malonilglisitin, malonilgenistin, asetildaidzin, asetilglisitin, asetilgenistin, daidzein, glisitin dan genistein ditemukan pada sampel. 6 isoflavon utama komponen termasuk daidzin, glicitin, genistin, malonyldaidzin, malonylglycitin, dan

				malonylgenistin terdeteksi pada biji kedelai dihitung kadarnya sedangkan sisanya tidak dihitung karena kadarnya terlalu kecil. Kadar rata-rata isoflavon adalah daidzin 246.76 µg g ⁻¹ , glisitin 46.53 µg g ⁻¹ , genisitin 443.56 µg g ⁻¹ , malonildaidzin 533.72 µg g ⁻¹ , malonilglisitin 71.83 µg g ⁻¹ , dan malonilgenistin 1077.29 µg g ⁻¹ .
3	Nemitz et al., 2015	ultra-fast liquid chromatography method (UFLC)	Kacang kedelai	Persamaan isoflavon yang berhasil di determinasi adalah Daidzein $y = 20071x - 325.95$ $R^2 = 0.998$, Glisitein $y = 22006x - 624.98$ $R^2 = 0.998$ dan Genistein $y = 37002x - 298.39$ $R^2 = 0.998$. λ (max) daidzein 248/301, glisitein 256/319 dan genistein 260
4	Istiani et al., 2015.	HPLC	Ekstrak Tempe Kacang Kedelai, Ekstrak Tempe Koro Pedang Utuh dan Rajang	Kadar isoflavon tertinggi pada tempe koro utuh dan rajang diperoleh pada proses fermentasi selama 1 hari dengan nilai total pada tempe koro utuh yaitu 0,786% dan pada tempe koro rajang yaitu 0,590%, sedangkan kadar Isoflavon tertinggi tempe kacang kedelai diperoleh pada proses fermentasi selama 2 hari dengan nilai totalnya yaitu 1.812%
5	Setiawati et al., 2014	KLT	Tempe	Sampel yang diuji menunjukkan mengandung isoflavon jenis genistein dilihat dari terdapat peak 1 pada ekstrak yang memiliki Rf sama dengan genistein sebagai standar. Dilakukan penetapan kadar dengan melakukan 5 kali replikasi dengan hasil kadar isoflavon dalam tempe yang dihitung sebagai genistein adalah $0,151 \pm 0,005$ % b/b.
6	Sulistyowati et al., 2018	HPLC	Kacang kedelai dengan varietas (Anjasmoro, Argomulyo dan Gema)	Kandungan isoflavon dalam 100 g sampel varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Gema secara berturut-turut adalah - Daidzein : 18,69 mg, 29,68 mg, 14,15 mg

- Genistein : 23,67 mg, 22,15 mg, dan 21,22 mg

7	Fawwaz et al., (2017)	Spektrofotometri UV-VIS	Susu kedelai dan tempe	Kadar isoflavon genistein pada ekstrak tempe lebih tinggi 5 kali lipat daripada ekstrak susu kedelai dengan rata-rata kadar isoflavon ekstrak tempe 5.519 µg mg ⁻¹ dan rata-rata kadar isoflavon ekstrak susu kedelai 0.613 µg mg ⁻¹
8	Sulistiani et al., 2014	HPLC	Tempe dibuat dari kedelai hitam (<i>Glycine soja</i>), koro hitam (<i>Lablab purpureus</i>), dan koro kratok (<i>Phaseolus lunatus</i>)	Tempe berbahan dasar kedelai hitam yang difermentasi 2 hari mengandung , daidzein 1,2947g, glisitein 0,9670 g, genistein 2,3424 g sehingga isoflavon total 4,6202 g. Tempe koro hitam fermentasi 1 hari mengandung daidzein 0,0401 g, glisitein 0,1145 g, genistein 0,4404 g) dengan isoflavon total 0,0699 g. Tempe koro kratok yang difermentasi 3 hari mengandung genistein 1,7252 g dengan isoflavon total 1,7288 g.
9.	Sartini et al., 2014	UFLC	Kacang kedelai yang dikupas dan tidak dikupas kulit arinya yang diekstrak dengan pelarut yang berbeda yaitu air panas, etanol 70%, aseton 70%, dan metanol.	Kadar isoflavon tertinggi didapatkan pada ekstrak kacang kedelai dengan kulit ari dan diekstrak dengan pelarut metanol sebanyak 15,9 %. Kadar masing-masing isoflavon tersebut adalah daidzein 1.14, genistein 1.50, daidzin 9.25 dan genistein 4.01

Penelitian yang dilakukan Daud et al., (2019) menggunakan metode instrumen HPLC yang kemudian dilanjutkan dengan spektrofotometri massa dalam mengidentifikasi senyawa isoflavon khususnya jenis genistein pada sampel biji kedelai varietas Dena I. HPLC digunakan untuk optimasi penentuan panjang gelombang dengan teknik elusi

isokratik menggunakan variasi komposisi asetonitril:asam asetat 0,1% (20:80; 25:75; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40). Variasi komposisi fase gerak menyebabkan perubahan nilai pH fase gerak. Dalam analisis ini nilai pH berperan penting dalam menentukan waktu retensi dan selektivitas pemisahan. Pada metode ini dihasilkan 6 puncak,

namun puncak tersebut masih berdekatan, hal ini menunjukkan bahwa pemisahan senyawa isoflavon kurang baik dengan keadaan ini. Oleh karena itu, untuk meningkatkan pemisahan, teknik elusi isokratik diubah menjadi elusi gradien. Elusi gradien dilakukan dengan memvariasikan komposisi fase geraknya hingga didapat 7 puncak utama sebagai kondisi optimum untuk elusi dan digunakan untuk pemisahan lebih lanjut dan penentuan isoflavon. Selanjutnya, dilakukan analisis menggunakan spektrometri massa untuk melihat waktu retensi berdasarkan puncak sehingga didapat berat molekul senyawa genistein seperti pada tabel.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Istiani et al., (2015) telah dilakukan pengujian isoflavon dengan menggunakan biji koro pedang dan produk tempunya dalam keadaan utuh ataupun rajang sebagai sampelnya. Hal pertama yang dilakukan oleh peneliti adalah membuat sampel tempe dengan menggunakan kedelai, tempe yang menggunakan koro pedang utuh dan rajang. Kemudian setelah itu dilakukan ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi kurang lebih selama 3 hari dengan pelarut etanol 70%. Kemudian filtrat hasil proses maserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* selama 30 menit dengan suhu 50°C sehingga dihasilkan ekstrak pekat. Dalam proses ekstraksi ini pemilihan pelarut etanol 70% ini dianggap sesuai karena sifat kepolarannya hampir mendekati metanol, sementara itu metanol tidak dipilih karena dalam skala komersial dianggap bersifat toksik sekalipun metanol merupakan pelarut yang optimum untuk mengekstrak isoflavon. Setelah didapatkan ekstrak kental tahap selanjutnya adalah identifikasi senyawa isoflavon menggunakan metode HPLC. Analisis yang dilakukan peneliti adalah untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa isoflavon jenis daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2. Dalam jurnal yang ditulis oleh Istiani et al., (2015) terdapat perbedaan kandungan senyawa isoflavon dari setiap sampel dengan waktu fermentasi yang berbeda-beda. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi hal tersebut diantaranya: sifat isoflavon yang reaktif dan mudah teroksidasi memungkinkan senyawa isoflavon telah berikatan dengan senyawa lain dan membentuk senyawa baru sehingga menjadi tidak teridentifikasi sebagai isoflavon, kemudian pada jenis kedelai jumlah kandungan isoflavon dapat dipengaruhi oleh varietas, waktu panen dan lokasi penanaman, sementara perbedaan kandungan senyawa

isoflavon antara koro pedang dan rajang adalah kemungkinan karena adanya senyawa-senyawa yang terlarut saat perendaman lebih banyak pada koro pedang rajang dibandingkan koro pedang utuh sehingga kandungan isoflavon koro perang utuh lebih banyak.

Metode HPLC juga digunakan pada sumber lain yang ditulis oleh Sulistyowati et al., (2018) dalam mengidentifikasi kandungan isoflavon kedelai dari berbagai varietas (Anjasmoro, Argomulyo dan Gema). Jenis isoflavon yang diidentifikasi adalah daidzein dan genistein. Pada literatur ini sampel yang digunakan dilarutkan dengan pelarut metanol 50% perbandingan penyari 1:10. Pada hasil analisis HPLC atau KCKT kromatogram yang muncul pada menit menit awal bukan merupakan isoflavon daidzein atau genistein. Hal ini menunjukkan bahwa masih banyak golongan isoflavon yang lebih polar dari daidzein dan genistein yang telah tertarik menggunakan pelarut metanol, itu berarti daidzein dan genistein merupakan senyawa isoflavon yang lebih non-polar. sementara itu kromatogram daidzein baru muncul di menit ke-6 dan untuk genistein di menit ke-10. Perhitungan kadar daidzein dan genistein dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang maksimal 254 nm kemudian data luas puncak kromatogram dimasukkan ke dalam persamaan regresi yaitu pada daidzein $y = 27658x - 13410$, $r = 0,991$ dan genistein yaitu $y = 32726x - 15917$, $r = 0,999$ sehingga didapatkan hasil kadar daidzein dan genistein seperti pada tabel di atas.

Pada penelitian yang dilakukan Li et al., (2014) dipilih asetonitril sebagai fase gerak menggunakan gradien linier, dan berhasil memisahkan dan mengidentifikasi bentuk asetil maloni dan komponen isoflavon dengan cukup baik, seperti MD, MGL, MG, AD, AGL, dan AG dengan kondisi HPLC yang diterapkan. Jika tidak, karena sedikit absorbansi, tekanan rendah, dan kapasitas elusi yang baik, fase gerak asetonitril sebagai fase gerak memberikan resolusi dan efisiensi deteksi yang lebih baik daripada metanol dalam analisis HPLC. Meskipun metode spektrofotometer UV dapat dengan cepat dapat mendeteksi jumlah total isoflavon, namun tidak dapat secara akurat membedakan dan mendeteksi komponen isoflavon tunggal. Sementara sebagian besar metode HPLC lainnya telah memilih beberapa bentuk isoflavon sebagai standar, seperti D, G, DE, dan GE untuk menentukan komponen utama isoflavon, masih

sulit untuk diidentifikasi semua bentuk isoflavon dalam biji kedelai. Dipilih 12 bentuk isoflavon sebagai standar untuk mengidentifikasi secara akurat semua bentuk isoflavon. Berdasarkan hasil penentuan tersebut, digunakan satu standar akurat (D) sebagai standar perhitungan dalam formula untuk menghitung jumlah komponen isoflavon untuk meningkatkan presisi data isoflavon dalam penelitian ini. Dalam penelitian ini, peneliti memilih metode ekstraksi yang tidak ada proses hidrolisis untuk mendapatkan jumlah isoflavon yang sebenarnya, yang menunjukkan signifikansi pada penelitian isoflavon.

Pada penelitian Nemitz et al., (2015) UFLC dipilih dalam penelitian ini untuk mencapai pemisahan dengan resolusi yang baik dalam waktu singkat. Ekstrak kedelai dimasukkan ke dalam hidrolisis asam karena isoflavon glikosida adalah jenis isoflavon utama dalam kedelai, tetapi untuk sifat dan aktivitas permeabilitas ke kulit yang lebih tinggi terutama adalah peran penting dari jenis aglikon. Namun bila produk turunan kedelai seperti makanan atau ekstrak diserahkan ke kondisi asam, senyawa yang lain dapat diperoleh. Misalnya, adanya gula di bawah kondisi pH ekstrim dan suhu tinggi biasanya menginduksi reaksi Maillard, atau proses karamelisasi. Keduanya fenomena ini dapat mengakibatkan produksi aldehida uranik, seperti hidroksimetilfurfural (HMF) dan furfural. Senyawa ini dilaporkan sebagai beracun, dan untuk alasan ini, pemurnian ekstrak dengan asam menjadi penting sebelum mereka dapat digunakan dalam produk farmasi. Akibatnya, pengembangan metode analisis yang memungkinkan kuantifikasi dan deteksi HMF dan EMF menjadi perlu pastikan senyawa beracun ini dihilangkan dari ekstraknya. Dengan cara ini, metode UFLC terbukti mampu memisahkansenyawa beracun dari IA, oleh karena itu, cocok untuk kontrol kualitas proses pemurnian.

Pada penelitian yang dilakukan Fawwaz et al., (2017) ekstraksi pada sampel yang digunakan yaitu sampel ekstrak susu kedelai dan ekstrak tempe dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut organik etil asetat pada corong pisah, hal ini dilakukan dengan alasan etil asetat memiliki sifat semi polar dan dipilih etil asetat juga dikarenakan senyawa tersebut memiliki sifat toksisitas rendah. Ekstraksi dengan etil asetat yang bersifat semi polar berfungsi untuk mengikat senyawa-senyawa isoflavon genistein yang juga mempunyai sifat semi polar. penggunaannya juga ditujukan agar dapat memisahkan komponen gula

yang terbentuk saat proses fermentasi dan hidrolisis. Analisis kadar isoflavon aglikon pada kedua sampel menggunakan standar genistein sebagai baku pembanding, hal ini dikarenakan genistein merupakan jenis senyawa isoflavon aglikon yang memiliki kadar yang cukup besar. Hasil akhir dari perhitungan kadar genistein yang diperoleh menunjukkan bahwa kadar genistein pada ekstrak tempe jauh lebih tinggi dibandingkan ekstrak susu kedelai dengan perbandingan 5 kali lipat lebih besar. hal ini membuktikan bahwa peran proses fermentasi mampu melepaskan ikatan gula pada isoflavon glikon sehingga menghasilkan lebih banyak isoflavon aglikon contohnya adalah genistein. hal ini dinilai lebih menguntungkan karena aktivitas senyawa isoflavon aglikon lebih berperan banyak dalam bidang kesehatan daripada senyawa isoflavon glikon.

Pada penelitian Sulistiani et al., (2014) proses ekstraksi digunakan dengan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi. Dipilih pelarut etanol 70% sebagai pelarut untuk ekstraksi karena diketahui etanol 70% dapat mengikat senyawa isoflavon dengan baik, sementara metode maserasi dipilih karena dinilai sederhana dan dapat dengan baik menarik senyawa isoflavon. Hasil dapat dilihat dengan adanya puncak-puncak yang memiliki waktu retensi relatif sama dengan larutan standar senyawa isoflavon daidzein, glisitein, dan genistein akan menunjukkan bahwa dalam sampel tersebut terdapat senyawa yang sama dengan larutan baku standar tersebut yaitu isoflavon daidzein, glisitein, dan genistein. Analisis kuantitatif atau perhitungan kadar senyawa isoflavon dilakukan dengan cara menghitung area di bawah puncak luas (kurva puncak yang dihasilkan saat proses HPLC). Konsentrasi senyawa isoflavon daidzein, glisitein, dan genistein dapat diketahui dengan mengalikan persentase luas masing-masing ketiga senyawa isoflavon tersebut dengan massa ekstrak etanol yang dihasilkan.

Pada penelitian yang dilakukan Setiawati et al., (2014) fase gerak yang dipakai untuk pemisahan dengan metode KLT menghasilkan pemisahan isoflavon tempe yang terbaik diantaranya metanol: kloroform (7:3); kloroform:etil asetat: metanol (8:1:0,5) dan kloroform: metanol:asam asetat (9:1:0,15). Dipilih campuran fase gerak terakhir karena memiliki jarak elusi 10 cm dan memberikan pemisahan terbaik dengan resolusi 1,57. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuji menggunakan TLC-scanner dan didapat peak 1 pada ekstrak

mempunyai nilai Rf yang sama dengan peak larutan standar genistein. sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat genistein dalam sampel. Setelah uji kualitatif isoflavon yang dilakukan pada sampel, dilakukan uji kuantitatif dengan menghitung kadar isoflavon genistein di dalam sampel ekstrak tempe.

Pada penelitian Sulistyowati et al., (2018) didapat 254 nm sebagai panjang gelombang maksimal untuk analisis simultan daidzein dan genistein. Dihitung luas daerah bawah puncak dengan memasukan luas puncak kromatogram ke dalam persamaan regresi ($y = 27658x - 13410$, $r = 0,991$), sehingga didapatkan konsentrasi daidzein dan genistein yang terbentuk dalam satuan $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada kedelai varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Gema seperti pada tabel.

Pada penelitian yang dilakukan Sartini et al., (2014), hasil analisis kadar isoflavon dari sampel ekstrak kedelai dengan perlakuan kulit ari tidak dilepas didapatkan kadar isoflavon relatif lebih tinggi daripada sampel dengan kacang kedelai yang dilepaskan kulit arinya. Kadar isoflavon dari ekstrak atau sari kedelai dianalisis menggunakan *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC) dengan kolom: Shim-Pack Vp-Ods; system fase terbalik, suhu kolom 40°C, volume injeksi 10 ul, dektektor Photodiode array (UV). Fase gerak Metanol-Air. Kondisi untuk Penentuan Genistin (Fase gerak: Metanol - Air (90:10), Daidzin (Fase gerak : Metanol - Air (85:15), Genistein (Fase gerak: Metanol - Air (80:20), Daidzein (Fase gerak : Metanol - Air (80:20), Didapat waktu retensi daidzein 4,085, genistein 2,185, daidzein 3,412, dan genistin 1,725. Kadar isoflavon sampel disajikan pada tabel diatas.

KESIMPULAN

Senyawa isoflavon merupakan senyawa non polar yang paling banyak ditemukan pada kacang kedelai. Jenis isoflavon yang paling banyak ditemukan pada kedelai adalah genistein dan daidzein. Isoflavon sendiri dapat diidentifikasi melalui beberapa metode diantaranya adalah HPLC atau KCKT, KLT, UFLC, Spektrofotometri Massa dan Spektrofotometri UV-Vis. Dari beberapa metode yang ada metode HPLC merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam mengidentifikasi isoflavon. Metode HPLC banyak dipilih karena dinilai mempunyai beberapa kelebihan yaitu mudah dalam pengoperasian dan memiliki kapasitas yang tinggi sehingga metode ini dinilai tepat dalam mengidentifikasi suatu senyawa salah satunya adalah senyawa isoflavon ini (Hirjani

et al., 2018). Dari beberapa literatur yang kami temukan terdapat perbedaan jumlah kandungan senyawa isoflavon meski menggunakan sampel yang sama. Hal ini bisa terjadi karena banyak faktor. Faktor tersebut diantaranya adalah varietas sampel yang berbeda, waktu tanam dan waktu panen sampel, jika menggunakan sampel tempe maka waktu fermentasi kacang yang digunakan akan berpengaruh pada banyaknya kandungan senyawa isoflavon hal ini dikarenakan adanya kemungkinan senyawa isoflavon yang ikut terlarut selama fermentasi, dan dilihat dari sifat isoflavon yang termasuk reaktif juga bisa menjadi faktor banyak sedikitnya isoflavon yang teridentifikasi karena dengan sifat reaktif dan mudah teroksidasi isoflavon bisa berikatan dengan senyawa lain dan membentuk senyawa baru sehingga saat diidentifikasi senyawa isoflavon tertentu tidak terdeteksi.

REFERENSI

- Bustamante-Rangel, M., Delgado-Zamarreño, M. M., Pérez-Martín, L., Rodríguez-Gonzalo, E., & Domínguez-Álvarez, J. (2018). Analysis of Isoflavones in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 391–411. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12325>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Daud, A., Sulistyarti, H., Retnowati, R., & Ginting, E. (2019). High Performance liquid chromatography (hplc) method for determination of isoflavones content in shade-tolerant soybean dena i. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 546(3). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/546/3/032004>
- Fawwaz, M., Natalisnawati, A., & Baits, M. (2017). Kadar Isoflavon Aglikon pada Ekstrak Susu Kedelai dan Tempe Determination of Isoflavon Aglicone in Extract of Soymilk and Tempeh. *Industria: Jurnal Teknologi Dan Manajemen Agroindustri*, 6(3), 152–158. <https://doi.org/10.21776/ub.industria.2017.006.03.6>
- Foudah, A. I., & Abdel-Kader, M. S. (2017). Isoflavonoids. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*, 5. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68701>

- Hirjani, H., Mudasir, M., & Pranowo, H. D. (2018). Prediction of High Performance Liquid Chromatography Retention Time for Some Organic Compounds Based on Ab initio QSPR Study. *Acta Chimica Asiana*, 1(1), 24–29. <https://doi.org/10.29303/aca.v1i1.6>
- Istiani, Y., Handajani, S., & Pangastuti, A. (2015). Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku koro pedang (*Canavalia ensiformis*). *Biofarmasi*, 13(2), 50–58.
- Jang, D., Jung, Y. S., Kim, M.-S., Oh, S. E., Nam, T. G., & Kim, D.-O. (2019). Developing and Validating a Method for Separating Flavonoid Isomers in Common Buckwheat Sprouts Using HPLC-PDA. *Foods*, 8(11), 549. <https://doi.org/10.3390/foods8110549>
- Jiao, Z., Si, X., Zhang, Z., Li, G., & Cai, Z. (2012). Compositional study of different soybean (*Glycine max* L.) varieties by ¹H NMR spectroscopy, chromatographic and spectrometric techniques. *Food Chemistry*, 135(1), 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.091>
- Li, B., Tian, L., Zhang, J., Huang, L., Han, F., Yan, S., Wang, L., Zheng, H., & Sun, J. (2014). Construction of a high-density genetic map based on large-scale markers developed by specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq) and its application to QTL analysis for isoflavone content in *Glycine max*. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1086>
- Miadoková, E. (2009). Isoflavonoids - an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(4), 211–218. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0021-3>
- Nemitz, M. C., Yatsu, F. K. J., Bidone, J., Koester, L. S., Bassani, V. L., Garcia, C. v., Mendez, A. S. L., von Poser, G. L., & Teixeira, H. F. (2015). A versatile, stability-indicating and high-throughput ultra-fast liquid chromatography method for the determination of isoflavone aglycones in soybeans, topical formulations, and permeation assays. *Talanta*, 134, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.10.062>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Popa, D.-S., & Rusu, M. E. (2017). Isoflavones: Vegetable Sources, Biological Activity, and Analytical Methods for Their Assessment. In *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66531>
- Sartini, Djide, M. N., Permana, D., & Ismail. (2014). Ekstraksi Isoflavon Kedelai dan Penentuan Kadarnya Secara Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) Soybean Isoflavones Extraction and Analysis Their Concentration by Ultra Fast Liquid Chromatography. *Jurnal Sainsmat*, 3(2), 130–134. <http://ojs.unm.ac.id/index.php/sainsmat>
- Setiawati, A., Yuliani, S. H., Istyastono, E. P., Gani, M. R., Veronica, E. F., Putri, D. C. A., Putra, R. E., Putra, D. C., & Kurniawan, A. M. (2014). Analisis kuantitatif isoflavon tempe secara cepat dan sederhana menggunakan metode kromatografi lapis tipis-densitometri. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 11(1), 13–17.
- Sulistiani, H. R., Handayani, S., & Pangastuti, A. (2014). Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (*Glycine soja*), koro hitam (*Lablab purpureus*), dan koro kratok (*Phaseolus lunatus*). *Biofarmasi*, 12(2), 62–72.
- Sulistiyowati, E., Martono, S., Riyanto, S., Lukitaningsih, E., Farmasi, S., Tinggi Ilmu Farmasi, S., Pharmasi Semarang, Y., & Letnan Jendral Sarwo Edie Wibowo Km, J. (2018). Analisis Daidzein dan Genistein pada Kedelai (*glycine max* L. Merril) Varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Dena 2 Menggunakan Metode KCKT. *Media Farmasi Indonesia*, 13(1), 1299–1304.
- Szymczak, G., Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Zapala, K., Strzemski, M., & Kocjan, R. (2017). Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.015>