

ANALISIS KUANTITATIF ISOFLAVON TEMPE SECARA CEPAT DAN SEDERHANA MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS- DENSITOMETRI

AGUSTINA SETIAWATI¹, SRI HARTATI YULIANI^{2*}, MICHAEL RAHARJA GANI², EVY FENNY VERONICA², DINA CHRISTIN AYUNING PUTRI², REZA EKA PUTRA¹, DAVID CHANDRA PUTRA², AGNES MUTIARA KURNIAWAN³, ENADE PERDANA ISTYASTONO^{3,4}

¹Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

²Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

³Laboratorium Kimia Analisis, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

⁴Pusat Studi Lingkungan Hidup, Universitas Sanata Dharma, Soropadan, Condongcatur, Yogyakarta

Email korespondensi: srihartati.yuliani@gmail.com

Abstract: Rapid and simple quantitative analysis isoflavones tempe using densitometric TLC has been done. The mobile phase of the system was chloroform: methanol: ethylacetate (45: 5: 0.75). Thin layer chromatography was performed on aluminium TLC *plates*. Ascending distance of 1 μ L sample was performed 10 cm. Then the *plate* was scanned at 261 nm. A linear relationship obtained at 0.08 - 2 μ g/spot with $r = 0.9986$. The LOD and LOQ of isoflavone were 0.014 μ g/spot and 0.048 μ g/spot. Genistein contained in tempe was 0.151 ± 0.005 % b/b.

Keywords: *tempe, isoflavon, TLC*

1. Pendahuluan

Tempe adalah makanan sumber protein nabati yang sudah lama dibuat oleh masyarakat Indonesia. Bahan utama pembuatan tempe adalah kedelai. Kedelai telah terbukti mempunyai banyak manfaat pada kesehatan. Isoflavon ditemukan dalam jumlah yang signifikan pada kedelai (Zhang et al., 2007). Tempe kaya akan isoflavon; antara lain genistein (5,7,4'- trihidroksi flavon) and daidzein (7,4'- dihidroksi flavon). Proses fermentasi dapat meningkatkan kandungan isoflavon dalam tempe (Hong et al., 2012).

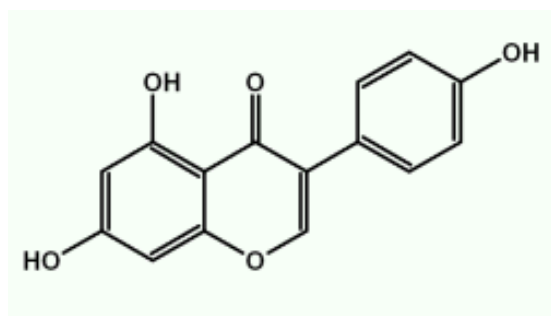
Beberapa penelitian membuktikan bahwa isoflavon kedelai mempunyai aktivitas antikanker. Isoflavon kedelai terbukti berpotensi sebagai antikanker payudara (Barnes, 1997; Verma and Goldin, 1998; Rahal and Simmen, 2010). Selain itu, isoflavon tempe mempunyai kemampuan menangkap radikal bebas (Zielonka et al., 2003) dan menstimulasi produksi asam hialuronat (Miyazaki et al., 2002). Kemampuan isoflavon pada penyakit jantung diantaranya berguna bagi penderita hipertensi, arteriosklerosis, infark kardiak,

dan hiperlipidemia. Isoflavon juga berguna untuk mencegah osteoporosis melalui mekanisme berikatan secara kuat dengan ER- β dan ER- α (Watanabe et al., 2002).



Gambar 1. Tempe

Dengan demikian, tempe dijadikan salah satu sumber isoflavon yang potensial. Oleh karena itu, perlu ada metode untuk penetapan isoflavon dalam tempe untuk mengetahui kandungan isoflavon di dalam tempe. Penetapan kadar isoflavon biasanya dilakukan dengan menggunakan HPLC (Yuan et al., 2006), HPTLC (Khan et al., 2010), dan KLT (Yuan et al., 2006). Pada penelitian ini akan dilakukan penetapan kadar isoflavon tempe dengan metode yang mudah dan cepat menggunakan KLT-densitometri.



Gambar 2. Struktur genistein, isoflavon utama dalam tempe

2. Bahan dan Metode Penelitian

Bahan yang digunakan: tempe yang dipasarkan di DIY, *plate* KLT Silica 60 F254, E-Merck, Germany, 200 x 200 mm, kloroform (*Merck*), metanol (*Merck*), asam asetat (*Merck*).

3. Tata Cara Penelitian

3.1. Ekstraksi isoflavon tempe

Sebanyak 100 g tempe yang telah ditumbuk kasar ditambah dengan 200 mL petroleum eter dan didiamkan selama 30 menit. Tempe disaring, tempe yang telah didefatisasi ditambah dengan 200 mL air dan diblender, tempe yang telah halus ditambah 300 mL etanol teknis dan kemudian dimaserasi semalaman. Maserat yang didapat dipekatkan dengan rotari evaporator pada suhu 60 C sampai volume konstan.

3.2. Analisis Kadar Isoflavon Tempe

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk menetapkan kadar isoflavon yang terkandung dalam tempe. Fase diam yang digunakan adalah *plate* aluminium KLT. Fase gerak dalam sistem ini adalah kloroform: metanol: asam asetat (45:5:0,75). Sampel sebanyak 1 μ L ditotolkan menggunakan Camag's linomat pada 15 mm dari dasar *plate*, spot dikeringkan dengan gas N₂. *Plate* kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* Wheaton yang telah dijenuhi dengan fase gerak. Elusi fase gerak dilakukan sepanjang 100 mm. *Plate* kemudian dikeringkan sampai semua fase gerak menguap pada suhu kamar dan dilakukan *scanning* menggunakan Camag's *TLC Scanner* yang telah dilengkapi dengan *software* winCAT. Deteksi dilakukan dengan

modifikasi metode (Huang and Liu, 2012) pada panjang gelombang 261 nm.

Linearitas. Linearitas diuji dengan menggunakan 5 seri konsentrasi standar genistein. Lima seri kadar tersebut ditotolkan sehingga jumlah genistein tiap totolan adalah 0,08 – 2 μ g/totolan. Korelasi antara luas area puncak dan konsentrasi standar genistein selanjutnya ditentukan.

Presisi. Variabilitas metode analisis dipelajari menggunakan metode presisi *intraday* dan *interday*. Parameter yang digunakan untuk menghitung kriteria presisi adalah % KV (% koefisien variasi). Persentase koefisien variasi yang dapat diterima dalam penelitian ini menurut Horwitz adalah 8% (Gonzalez and Herrador, 2007).

Akurasi. Standar adisi digunakan untuk menguji akurasi dari metode analisis. Sebanyak tiga konsentrasi larutan standar genistein ditambahkan ke dalam ekstrak tempe dan dihitung persentase *recovery*. Kriteria penerimaan persen *recovery* pada penelitian ini adalah 90 – 107% (Gonzalez and Herrador, 2007).

4. Hasil dan Pembahasan

Tempe adalah makanan tradisional Indonesia yang terbuat dari kedelai. Kedelai sebagai bahan utama pembuatan kaya akan isoflavon. Isoflavon ditemukan dalam jumlah yang signifikan pada kedelai (Zhang et al., 2007). Genistein, daidzein, dan glycitein adalah isoflavon aglikon yang terdapat dalam tempe (Rostagno et al., 2007). Proses fermentasi kedelai menjadi tempe tidak merusak kandungan isoflavon di dalamnya.

Fase gerak yang 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). Campuran fase gerak terakhir dan jarak elusi 10 cm memberikan pemisahan terbaik dengan resolusi 1,57. Pemisahan dikatakan baik jika resolusi > 1,25. Berdasarkan *scanning* panjang gelombang yang dilakukan terhadap standar genistein maupun sampel

ekstrak tempe didapatkan panjang gelombang maksimum pada 261 nm.

Evaluasi terhadap linearitas dilakukan dengan menggunakan 5 seri kadar dimana dalam tiap totolan mengandung 0,08 – 2 µg genistein. Penetapan kadar genistein mempunyai persamaan linear $y = 44,848x - 353,46$ dengan koefisien korelasi $R = 0,9986$ dan $R^2 = 0,9973$. Rasio signal noise yang digunakan dalam perhitungan LOD dan LOQ adalah 3 dan 10. LOD dan LOQ isoflavon yang di dapat dengan sistem ini adalah 0,014 µg/totolan dan 0,048 µg/totolan.

Variabilitas metode yang terjadi diukur dengan menggunakan presisi intraday dan interday. Parameter yang digunakan pada metode ini adalah %KV. Presisi intraday dan interday yang ditemukan dalam sistem ini adalah 0,43% dan 2,38%. Kriteria penerimaan % KV yang diterima dalam penelitian ini adalah berdasarkan Horwitz yaitu kurang dari 8% (Gonzalez and Herrador, 2007). Dapat disimpulkan bahwa metode ini mempunyai presisi yang baik.

Akurasi metode ditentukan dengan metode standar adisi. Larutan standar genistein ditambahkan ke dalam ekstrak isoflavon tempe. Persentase *recovery* ditentukan pada 3 level konsentrasi. Hasil

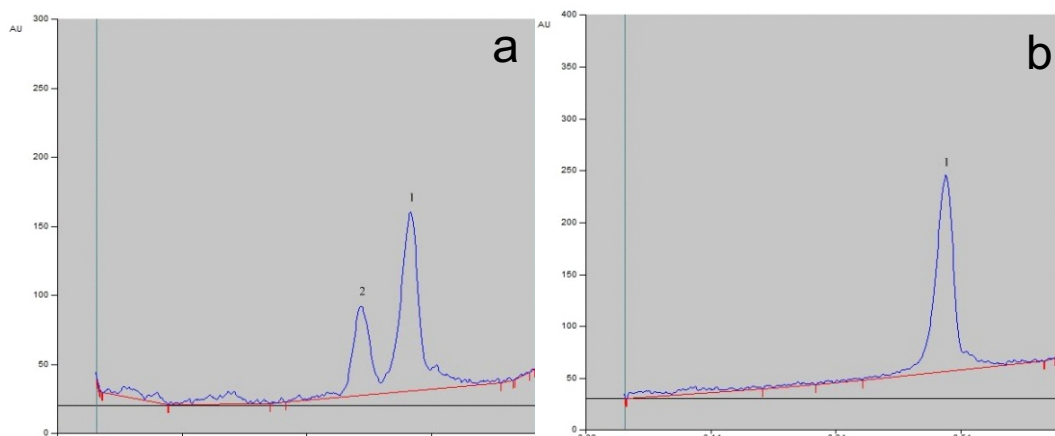
menunjukkan *recovery* metode 95,99 – 106,27% pada 400 ppm, 94,24 – 106,27% pada 450 ppm dan 98,33 – 103,86% pada 500 ppm. Menurut kriteria penerimaan *recovery* metode adalah 90 – 107% (Gonzalez and Herrador, 2007); dengan demikian disimpulkan bahwa *recovery* metode yang digunakan adalah memenuhi kriteria.

Ekstraksi isoflavon dari tempe dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebelum proses maserasi tempe di defatisasi menggunakan petroleum eter. Proses ini dilakukan untuk menghilangkan fase lemak yang terdapat dalam tempe.

Penanganan selama proses ekstraksi menggunakan suhu tidak lebih dari 60 C untuk menjaga supaya kandungan aktif ekstrak tempe tidak rusak. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuji menggunakan TLC-scanner. Gambar 3 di atas memperlihatkan bahwa di dalam sampel terdapat genistein. Hal tersebut dapat dipastikan dengan adanya peak 1 pada ekstrak yang mempunyai Rf sama dengan peak pada standar genistein. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak tempe yang dihasilkan mengandung genistein yang merupakan isoflavon. Hasil uji ekstrak menggunakan TLC scanner menghasilkan

Tabel 1. Ringkasan Parameter Validasi Isoflavon Tempe

Parameter	Results
Linearity	
Rentang	0,08 – 2 µg/totolan
Persamaan linear	$Y = 44,848x - 353,46$
Koefisien korelasi	0,9986
R kuadrat	0,9973
Presisi (% KV)	
Intraday (n=3)	0,43
Interday (n=3)	2,38
Limit of detection	0,014 µg/totolan
Limit of quantification	0,048 µg/totolan
Recovery	
Konsentrasi 400 ppm	95,99 – 106,27%
Konsentrasi 450 ppm	94,24 – 106,78%
Konsentrasi 500 ppm	98,33 – 103,86%



Gambar 3. Peak hasil scanning menggunakan Camag's TLC scanner dengan software WinCAT pada sampel ekstrak tempe (a) dan standar genistein (b).
Genistein ditunjukkan peak 1 dengan Rf 0,51

Tabel 2. Kadar Genistein dalam Tempe

Kadar ekstrak (ppm)	Ekstrak tempe (mg)	Kadar isoflavon tempe (% b/b)	Rata-rata	SD
405,58	202,79	0,142	0,151	0,005
435,06	217,53	0,153		
430,38	215,19	0,151		
427,95	213,97	0,150		
446,52	223,26	0,157		

peak dengan Rf sama dengan standar genistein (Gambar 3). Ekstrak tempe mengandung salah satu senyawa golongan isoflavon, yaitu genistein. Setelah memastikan adanya isoflavon yang terdeteksi sebagai genistein, maka penetapan kadar dapat dilanjutkan dengan melakukan 5 kali replikasi dengan hasil seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Dalam penelitian ini kadar isoflavon dalam tempe yang dihitung sebagai genistein adalah $0,151 \pm 0,005$ % b/b.

5. Kesimpulan

Metode TLC- densitometrik merupakan metode yang cepat dan sederhana untuk menentukan kadar isoflavon dalam tempe. Kadar genistein dalam tempe dalam penelitian ini adalah $0,151$ % b/b.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh DP2M DIKTI melalui dana Penelitian Hibah Bersaing tahun anggaran 2013.

Daftar Pustaka

- Barnes, S. 1997. The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 46, 169–179.
- Gonzalez, A.G. and Herrador, M.A. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 227–238.
- Huang, M. and Liu, D. 2012. Thin Layer Chromatography Densitometric Determination of Soybean Isoflavones in Wild Soybean (*Glycine soja*) Seeds. *Asian Journal of Chemistry*. 24, 1322.
- Khan, H.N., Gupta, R., Farooqi, H., Habib, A. and Akhtar, P. 2010. Biochemical analysis of *Glycine max* seeds under different germinating periods and densitometric analysis of genistein. *Journal of Phytochemistry*, 2, 83–86.
- Miyazaki, K., Hanamizu, T., Iizuka, R. and Chiba, K. 2002. Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15, 175–183.
- Rahal, O.M. and Simmen, R.C.M. 2010. PTEN and p53 cross-regulation induced by soy

- isoflavone genistein promotes mammary epithelial cell cycle arrest and lobuloalveolar differentiation. *Carcinogenesis*, 31, 1491–1500.
- Rostagno, M. a, Palma and M. and Barroso, C.G. 2007. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica chimica acta*, 597, 265–272.
- Verma, S.P. and Goldin, B.R. 1998. Effect of soy-derived isoflavonoids on the induced growth of MCF-7 cells by estrogenic environmental chemicals Effect of Soy-Derived Isoflavonoids on the Induced Growth of MCF-7 Cells by Estrogenic Environmental Chemicals. *Nutrition and Cancer*, 30, 232–239.
- Watanabe, S., Uesugi, S. and Kikuchi, Y. 2002. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56, 302–312.
- Yuan, D., Chen, Y., Bai, X., Pan, Y. and Kano, Y. 2006. TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen Sojae Praeparatum. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 1, 3–9.
- Zhang, E.J., Ng, K.M. and Luo, K.Q. 2007. Extraction and Purification of Isoflavones from Soybeans and Characterization of Their Estrogenic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6940–6950.
- Zhang, J., Xu, S., Zhang, S. and Du, Z. 2008. Preparation and Characterization of Tamarind Gum/Sodium Alginate Composite Gel Beads. *Iranian Polymer Journal* 17, 899–906.
- Zielonka, J., Gbicki, J. and Gryniewicz, G. 2003. Radical scavenging properties of genistein. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 958–965.