

# Penetapan Kadar Genistein Biji Kedelai (*Soya max* Piper) Lokal dan Impor Secara Densitometri Lapis Tipis dan KCKT

\*Siti Kusmardiyani, Asri Dwijayanti, Komar Ruslan Wirasutisna

*Kelompok Keilmuan Biologi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung,  
Jalan Ganesha 10 Bandung 40132*

## Abstrak

Biji kedelai (*Soya max* Piper) impor sangat banyak digunakan di Indonesia terutama sebagai bahan baku utama makanan olahan seperti tahu dan tempe. Genistein, senyawa isoflavon dalam biji kedelai, dilaporkan memiliki aktivitas estrogenik dan antioksidan kuat. Penelitian ini bertujuan menetapkan kadar genistein biji kedelai lokal dan impor serta menemukan metode penetapan kadar tanpa preparasi sampel yang dapat dikerjakan dalam waktu singkat. Simplisia biji kedelai diekstraksi dengan cara panas menggunakan metanol. Sebagian simplisia delipidasi terlebih dahulu dengan n-heksana sebelum diekstraksi. Kadar genistein ditetapkan secara densitometri lapis tipis dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Secara berurutan, kadar genistein biji kedelai lokal dan impor ditetapkan secara densitometri lapis tipis adalah  $19,51 \pm 4,59 \mu\text{g/g}$  dan  $21,69 \pm 3,98 \mu\text{g/g}$ . Sedangkan secara KCKT adalah  $19,99 \pm 3,79 \mu\text{g/g}$  dan  $21,12 \pm 3,19 \mu\text{g/g}$ . Kadar genistein biji kedelai lokal dan impor secara densitometri lapis tipis dan KCKT tidak berbeda bermakna pada aras keberartian 0,05.

**Kata kunci :** *Soya max*, kedelai, genistein.

## Abstract

Imported soybean seed is widely used in Indonesia especially as the main ingredient for tofu and soybean cake (*tempe*). Genistein, an isoflavone in soybean seed, has an estrogenic activity and act as a strong antioxidant. Besides quantifying genistein in the local and imported soybean seeds, this research was also aimed to find a fast and simple quantitative method. Soybean seed crude drugs were extracted by reflux using methanol. Some parts of the crude drug were delipidated using n-hexane before extracted. Genistein was determined using thin layer densitometry and high performance liquid chromatography (HPLC). Quantity of genistein in local and imported soybean seeds determined by thin layer densitometer were  $19,51 \pm 4,59 \mu\text{g/g}$  and  $21,69 \pm 3,98 \mu\text{g/g}$ , respectively. While the quantity obtained by HPLC were  $19,99 \pm 3,79 \mu\text{g/g}$  and  $21,12 \pm 3,19 \mu\text{g/g}$ , respectively. Both methods showed no significant difference in probability of 0.05.

**Keywords:** *Soya max*, soybean, genistein.

## Pendahuluan

Penggunaan biji kedelai (*Soya max* Piper) dalam kehidupan masyarakat Indonesia sangatlah luas terutama sebagai bahan baku makanan olahan seperti tahu, tempe, kecap, dan taoco. Kebutuhan biji kedelai di Indonesia mencapai dua juta ton per tahun dan 70-80 persen dari jumlah ini dipenuhi oleh biji kedelai impor yang berasal dari Argentina, Amerika, Cina, dan India. Kebutuhan masyarakat akan biji kedelai impor berada jauh di atas kebutuhan biji kedelai lokal karena biji kedelai impor lebih bersih dan dapat mengembang dengan lebih baik sehingga menghasilkan produk makanan olahan dalam jumlah yang lebih besar. Beberapa penelitian menyatakan bahwa biji kedelai banyak mengandung isoflavon dalam bentuk daidzein dan genistein. Penelitian lebih lanjut menyatakan bahwa genistein dapat mencegah terjadinya kanker payudara dan prostat (Fukutake *et al.* 1996), mengurangi resiko terjadinya osteoporosis (Arjmandi *et al.* 1998), menghambat kerja 3-hidroksi-3-metilglutarat koenzim A (HMG-KoA) reduktase sehingga dapat menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh (Sung *et al.* 2004), dan memiliki aktivitas

antioksidan yang tinggi (Fengshan *et al.* 2004). Genistein yang terkandung dalam biji kedelai terdapat dalam beberapa bentuk seperti aglikon bebas, glukosida, asetil-glukosida, dan malonil-glukosida. Dari bentuk-bentuk tersebut, aglikon bebas genistein memiliki aktivitas biologis yang paling tinggi (Fengshan *et al.* 2004).

Mengingat banyaknya penggunaan biji kedelai impor di Indonesia dan besarnya potensi genistein sebagai senyawa aktif dalam biji kedelai, dilakukan penetapan kadar genistein biji kedelai lokal dan impor untuk mengetahui kualitas biji kedelai yang terbaik. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menetapkan kadar suatu senyawa aktif. Tetapi metode ini membutuhkan preparasi sampel dan waktu pengerjaan yang cukup lama sehingga kurang sesuai untuk jumlah sampel yang banyak. Oleh karena itu diperlukan metode penetapan kadar yang dapat dikerjakan dalam waktu relatif singkat dan tanpa preparasi sampel. Salah satu metode penetapan kadar yang memenuhi kriteria ini adalah densitometer kromatografi lapis tipis. Penelitian ini bertujuan

---

\*Penulis korespondensi. E-mail: kusmardiyani@fa.itb.ac.id

mengetahui perbedaan hasil penetapan kadar genistein sebagai senyawa aktif biji kedelai secara KCKT dan densitometri lapis tipis. Penetapan kadar secara densitometri lapis tipis tidak berbeda dengan KCKT sehingga densitometri lapis tipis dapat digunakan sebagai metode penetapan kadar tanpa preparasi sampel yang dapat dikerjakan dalam waktu relatif singkat terutama untuk jumlah sampel yang besar.

## Percobaan

### Bahan

Biji kedelai lokal dan import, n-heksana destilasi, metanol *pro* analisis, asam asetat *pro* analisis, kloroform *pro* analisis, asetonitril *pro* HPLC, aluminium (III) klorida, asam klorida, toluene, amonia, besi (III) klorida, gelatin, natrium asetat, natrium hidroksida, pembanding Genistein (Fluka), pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Steasny, dan pereaksi Liebermann-Burchard, membran 0,45 µm, pelat silika gel GF254 (Merck).

### Alat

Penggiling bahan baku simplisia, seperangkat alat refluks, seperangkat alat penguap hampa udara berputar, mikroskop, bejana kromatografi lapis tipis (KLT), seperangkat alat penetapan kadar air, densitometer (CAMAG TLC scanner 3), kolom ODS Hypersil (4,5 x 200µm dengan ukuran partikel 5 µm, Hewlett Packard), seperangkat alat KCKT (Hewlett Packard seri 1100).

### Pembuatan serbuk simplisia

Biji kedelai lokal diperoleh dari pemasok biji kedelai di daerah Pasir Koja dan biji kedelai impor diperoleh dari pemasok biji kedelai asal Amerika di daerah Pasir Koja. Pengumpulan bahan dilakukan pada bulan November 2007. Biji kedelai kemudian dideterminasi secara makroskopik dan mikroskopik. Selanjutnya biji kedelai dipisahkan dari pengotor yang ada (sortasi) kemudian digiling dan dikeringkan dalam lemari pengering hingga diperoleh serbuk simplisia.

### Penetapan parameter mutu simplisia

Penetapan parameter mutu simplisia meliputi karakterisasi simplisia secara makroskopik dan mikroskopik, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar abu larut air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar air, dan penetapan susut pengeringan.

### Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia serbuk simplisia dilakukan terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, kuinon, dan steroid/triterpenoid.

### Ekstraksi

Sebanyak 10 g serbuk simplisia ditimbang seksama dan ditambahkan 50 mL n-heksan, dikocok selama 20 menit, dan disaring. Residu yang diperoleh diekstraksi kembali dua kali dengan cara yang sama. Setelah seluruh proses ini selesai, residu diekstraksi dengan cara panas menggunakan 50 mL metanol dan disaring. Residu yang diperoleh diekstraksi kembali satu kali dengan cara yang sama. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan penguap hampa udara berputar. Sebanyak 10 g serbuk simplisia langsung diekstraksi dengan cara panas menggunakan 50 mL metanol dan disaring. Residu yang diperoleh diekstraksi kembali satu kali dengan cara yang sama. Semua filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan penguap hampa udara berputar.

### Penetapan kadar genistein

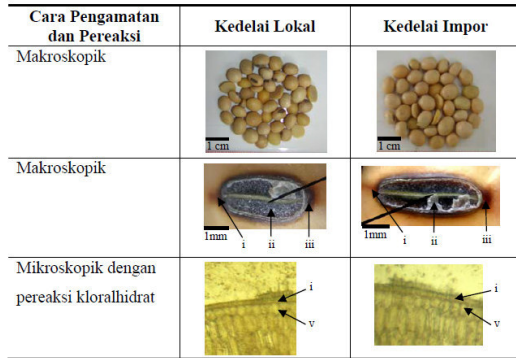
Kadar genistein dari ekstrak pekat ditetapkan menggunakan metode densitometer kromatografi lapis tipis dan KCKT. Sistem KLT yang digunakan adalah fase diam silika gel GF<sub>254</sub>, fase gerak kloroform-metanol (8:2 v/v). Preparasi sampel untuk KCKT dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan kloroform. Sebagian ekstrak dikeringkan dengan penguap hampa udara berputar, dilarutkan dalam air, dan diekstraksi cair-cair. Kadar genistein diukur dari fraksi air yang diperoleh. Sistem KCKT yang digunakan adalah fase diam kolom *ODS Hypersil*, fase gerak gradien asetonitril 20-100% dan asam asetat 1% dengan detektor ultraviolet (UV) pada panjang gelombang 261 nm.

### Hasil Dan Pembahasan

Hasil determinasi biji kedelai dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar abu larut air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar air, dan penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada Tabel 1.

Secara keseluruhan, mutu kedua simplisia yang digunakan tidak berbeda. Perbedaan antara keduanya hanya ditemukan pada kadar abu total dan kadar sari. Hal ini dapat disebabkan jumlah zat dalam kedelai impor lebih banyak dibandingkan kedelai lokal sehingga jumlah sari yang dapat terlarut dalam pelarut air dan etanol, jumlah mineral dan unsur organik didalam biji kedelai impor lebih besar dibandingkan dengan biji kedelai lokal.

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, kuinon, dan steroid/triterpenoid dalam simplisia. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel 2.



**Gambar 1.** Pengamatan biji, bagian biji, dan sayatan biji kedelai lokal dan impor dengan bagian yang ditunjuk: i. rafe, ii. hilum, iii. mikropil, v. jaringan palisade, v. jaringan jam pasir.

**Tabel 1.** Hasil Penetapan Parameter Mutu Simplisia

Parameter	Kedelai Lokal (% b/b)	Kedelai Impor (% b/b)
Kadar abu total	4,89	5,15
Kadar abu tidak larut asam	0,47	0,48
Kadar abu larut air	1,77	1,49
Kadar sari larut air	27,81	32,38
Kadar sari larut etanol	8,46	16,34
Kadar air	3,49*	3,19*
Susut pengeringan	4,89	3,29

Keterangan : \* = persen dalam v/b

**Tabel 2.** Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia

Golongan Senyawa	Kedelai Lokal	Kedelai Impor
Alkaloid	-	-
Flavonoid	+	+
Tanin	-	-
Saponin	-	-
Kuinon	-	-
Steroid/ Triterpenoid	+	+

Keterangan: (+) simplisia bereaksi positif terhadap pereaksi yang diujikan.  
(-) simplisia bereaksi negatif terhadap pereaksi yang diujikan.

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya senyawa flavonoid dan steroid/triterpenoid dalam kedua simplisia. Penapisan fitokimia pada kedelai lokal dan impor tidak menunjukkan hasil yang berbeda dan sesuai dengan pustaka yang mengatakan bahwa biji kedelai mengandung steroid dalam bentuk

sterol, sitosterol, dan stigmasterol (Samuelsson 1999) dan flavonoid (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan 2001).

Ekstraksi dilakukan dengan cara panas karena genistein merupakan senyawa yang stabil terhadap panas dan dapat larut dengan baik dalam metanol. Ekstraksi dilakukan dua kali untuk memaksimalkan jumlah genistein yang tersari dari simplisia. Pada sebagian simplisia dilakukan delipidasi dengan n-heksana sebelum dilakukan proses ekstraksi karena jumlah lemak yang tinggi dalam biji mungkin dapat mengganggu proses penetapan kadar. Normal heksana digunakan sebagai pelarut dalam proses delipidasi karena dapat melarutkan lemak dengan baik sehingga hanya sedikit lemak yang akan tertinggal dalam simplisia.

Secara berurutan, kadar genistein dalam biji kedelai lokal yang didelipidasi dan tanpa delipidasi adalah  $20,09 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$  dan  $19,51 \pm 4,59 \mu\text{g/g}$  dan dalam biji kedelai impor adalah  $20,34 \pm 1,35 \mu\text{g/g}$  dan  $21,69 \pm 3,98 \mu\text{g/g}$ . Kadar genistein biji kedelai yang didelipidasi berbeda berarti pada aras keberartian 0,05 dengan kadar genistein biji kedelai tanpa delipidasi karena adanya sejumlah genistein yang larut dalam pelarut yang digunakan untuk delipidasi. Delipidasi tidak diperlukan dalam penetapan kadar genistein biji kedelai karena lemak dalam biji kedelai tidak mengganggu proses penetapan kadar secara densitometri lapis tipis dan KCKT serta adanya genistein yang larut dalam pelarut untuk delipidasi dapat menyebabkan kesalahan dalam proses penetapan kadar.

Kadar genistein ditetapkan secara densitometri lapis tipis dan KCKT. Pengukuran dengan densitometer menghasilkan data luas daerah di bawah kurva dan kadar genistein dalam sampel dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi.

Secara berurutan, kadar genistein biji kedelai lokal dan impor yang ditetapkan dengan densitometer lapis tipis adalah  $19,51 \pm 4,59 \mu\text{g/g}$  dan  $21,69 \pm 3,98 \mu\text{g/g}$ . Kadar genistein biji kedelai lokal dan impor secara densitometri lapis tipis tidak berbeda secara bermakna pada aras keberartian 0,05.

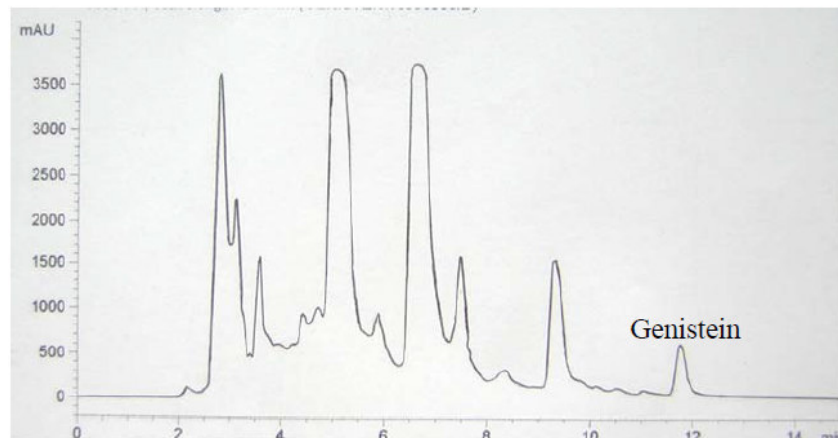
Pengukuran kadar genistein secara KCKT membutuhkan preparasi sampel untuk mengurangi jumlah senyawa yang dapat mengganggu pengukuran sehingga puncak genistein dapat teridentifikasi dengan lebih baik. Kromatogram ekstrak sebelum dan setelah preparasi dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3. Secara berurutan, kadar genistein biji kedelai lokal dan impor yang ditetapkan dengan KCKT adalah  $19,99 \pm 3,79 \mu\text{g/g}$  dan  $21,12 \pm 3,19 \mu\text{g/g}$ . Kadar

genistein biji kedelai lokal dan impor secara KCKT tidak berbeda secara bermakna pada aras keberartian 0,05.

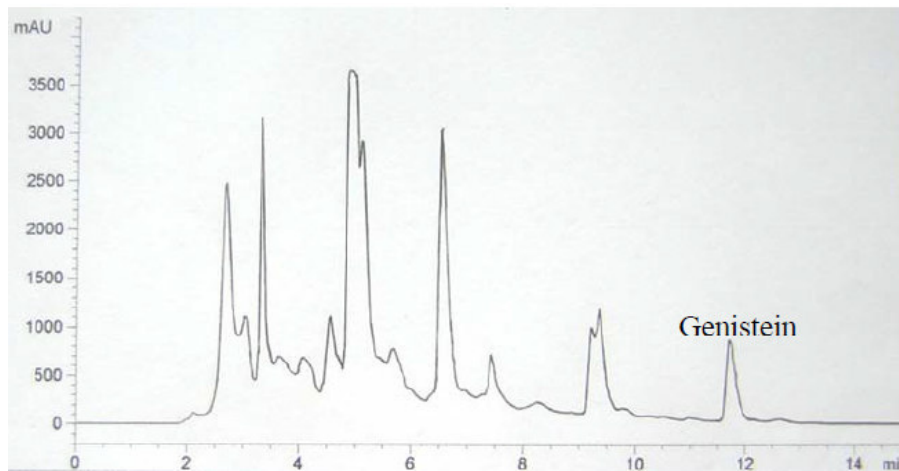
Secara berurutan, kadar genistein biji kedelai lokal yang ditetapkan dengan densitometer lapis tipis dan KCKT adalah  $19,51 \pm 4,59 \mu\text{g/g}$  dan  $19,99 \pm 3,79 \mu\text{g/g}$ . Sedangkan kadar genistein biji kedelai impor adalah  $21,69 \pm 3,98 \mu\text{g/g}$  dan  $21,12 \pm 3,19 \mu\text{g/g}$ . Kadar genistein yang diukur secara densitometri lapis tipis dan KCKT tidak berbeda secara bermakna pada aras keberartian. Pustaka menyebutkan kadar genistein

serbuk kedelai adalah  $18,2 \mu\text{g/g}$  (Fukutake *et al.* 1996).

Hasil penelitian menunjukkan kadar genistein biji kedelai lokal dan impor yang lebih besar dibandingkan dengan pustaka yaitu  $19,99 \pm 3,79 \mu\text{g/g}$  dan  $21,12 \pm 3,19 \mu\text{g/g}$ . Hal ini disebabkan oleh perbedaan sampel kedelai yang digunakan sehingga ada perbedaan dalam jumlah senyawa yang terkandung di dalamnya akibat perbedaan lingkungan tumbuh.



**Gambar 2.** Kromatogram KCKT ekstrak biji kedelai sebelum preparasi dengan fase diam *ODS Hypersil*, fase gerak asetonitril 20-100% dan asam asetat 1%, dan detektor UV 261 nm.



**Gambar 3.** Kromatogram KCKT ekstrak biji kedelai setelah preparasi dengan fase diam *ODS Hypersil*, fase gerak asetonitril 20-100% dan asam asetat 1% dan detektor UV 261 nm.

## **Kesimpulan**

Secara berurutan, kadar genistein biji kedelai lokal dan impor yang ditetapkan dengan densitometer lapis tipis adalah  $19,51 \pm 4,59 \mu\text{g/g}$  dan  $21,69 \pm 3,98 \mu\text{g/g}$ . Sedangkan secara KCKT adalah  $19,99 \pm 3,79 \mu\text{g/g}$  dan  $21,12 \pm 3,19 \mu\text{g/g}$ . Kadar genistein biji kedelai lokal dan impor secara densitometri lapis tipis dan KCKT tidak berbeda secara bermakna pada aras keberartian 0,05.

Delipidasi tidak diperlukan dalam penetapan kadar genistein biji kedelai secara densitometri lapis tipis dan KCKT. Preparasi sampel diperlukan dalam penetapan kadar genistein secara KCKT. Densitometri lapis tipis dapat dijadikan sebagai metode penetapan kadar tanpa preparasi sampel yang dapat dilakukan dalam waktu relatif singkat dengan hasil pengukuran yang tidak berbeda bermakna dengan KCKT.

## **Daftar Pustaka**

Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CM, Juma S, Drum ML, Hollis BW, Kukreja SC, 1998, Role of Soy Protein with Normal or Reduced Isoflavone Content in Reversing Bone Loss Induced by Ovarian Hormone Deficiency in Rats, *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1358S-1363S.

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2001, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, jil.2, Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI, Jakarta, 321-322.

Fengshan MA, Cholewa E, Mohamed T, Peterson CA, Guzen M, 2004, Cracks in the Palisade Cuticle of Soybean Seed Coats Correlate with their Permeability in Water, *Annals. Botany* 94: 213-228.

Fukutake M, Takashi M, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K, 1996, Quantification of Genistein and Genistin in Soybeans and Soybean Products, *Food Chem. Toxicol.* 34: 457-461.

Sung JH, Choi SJ, Lee SJ, Park KH, Moon TW, 2004, Isoflavones Found in Korean Soybean Paste as 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(5): 1051-1058.

Samuelsson G, 1999, *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy*, 4th ed., Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 174-175.