



SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA V
"Kontribusi Kimia dan Pendidikan Kimia dalam Pembangunan
Bangsa yang Berkarakter"
Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS
Surakarta, 6 April 2013



**MAKALAH
PENDAMPING**

**BIOKIMIA
(Kode : H-10)**

ISBN : 979363167-8

EFEKTIVITAS EKSTRAKSI ISOFLAVON (FAKTOR-2, DAIDZEIN, GLISITEIN DAN GENISTEIN) DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL TEMPE KEDELAI KUNING (*Glycine max L Merril*)

Sri Retno Dwi Ariani*

Prodi Kimia, PMIPA, FKIP, UNS, Jl. Ir Sutami 36A Ketingan Solo Solo, Indonesia

* Keperluan korespondensi, email : sriretnodwiariani@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas teknik ekstraksi isoflavon (faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein) dari tempe kedelai, pada satu alur ekstraksi, yang pertama adalah ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sehingga dihasilkan ekstrak etanol 70% (ekstrak pertama) dan ekstrak etanol 70% tersebut dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut heksana dan etil asetat sehingga dihasilkan fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% (ekstrak kedua). Sampel pada penelitian ini adalah kedelai kuning dari Purwodadi Jawa Tengah. Prosedur penelitian ini adalah sebagai berikut : (1) pembuatan tempe meliputi : sortasi kedelai, pencucian, perendaman selama 24 jam, pengukusan selama 45 menit, pendinginan, penambahan ragi tempe produksi LIPI merek "RAPRIMA" yang mengandung *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, fermentasi selama 48 jam pada suhu kamar sehingga dihasilkan tempe, (2) ekstraksi tempe dengan metode A meliputi : penggilingan tempe dengan blender, maserasi dengan etanol 70%, penyaringan, penguapan dengan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak pertama, (3) ekstraksi tempe dengan metode B meliputi : penggilingan tempe dengan blender, maserasi dengan etanol 70%, penyaringan, penguapan dengan *rotary evaporator*, fraksinasi dengan pelarut n-heksan, fraksinasi lanjutan dengan pelarut etil asetat, fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% yang terbentuk dipisahkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kedua, (4) identifikasi isoflavon terhadap ekstrak pertama dan kedua dengan metode HPLC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat total ekstrak (g) per 100 g tempe kedelai kuning dengan metode ekstraksi A = 6.8565 g sedangkan metode ekstraksi B = 0.0120 g. Kadar masing-masing isoflavon untuk metode ekstraksi A berturut-turut untuk faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein (g) /100 g tempe kedelai kuning adalah : 0,2283 g ; 2,4937 g ; 1,7340 g ; 0,6342 g, sedangkan metode ekstraksi B adalah : 0,0002 g ; 0,0073 g ; 0,0033 g ; 0,0011 g. Walaupun ditinjau dari berat total ekstrak maupun kadar isoflavon, metode A menunjukkan kadar yang lebih tinggi, tetapi dari kromatogram HPLC menunjukkan bahwa komponen kimia dari ekstrak yang didapat dari metode B adalah yang lebih murni.

Kata Kunci : *Kedelai kuning, isoflavon, faktor-2, daidzein, glisitein, genistein*

PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu makanan fermentasi tradisional asli Indonesia yang dihasilkan melalui proses

fermentasi kedelai dengan kapang *Rhizopus spp.* [1,2]. Pada umumnya bahan dasar tempe adalah kedelai kuning. Selain Indonesia, tempe telah dikonsumsi pula

secara luas di Malaysia, Bangladesh, Amerika Serikat, Amerika Latin, Suriname dan Jepang [2]. Masyarakat Indonesia yang secara tradisi telah lama mengkonsumsi tempe, banyak diuntungkan dari berbagai faktor karena produk tersebut mengandung senyawa gizi maupun senyawa aktif yang tinggi. Senyawa aktif dalam tempe dihasilkan melalui proses biotransformasi dan biosintesa oleh mikroba, khususnya pada proses perendaman dan fermentasi. Salah satu jenis senyawa aktif yang terkandung dalam tempe adalah isoflavon. [2,3].

Isoflavon yang terdapat dalam biji kedelai dorman adalah dalam bentuk isoflavon glikosida yaitu isoflavon yang terikat pada glikosida. Jenis isoflavon tersebut adalah daidzin, genistin dan glisitin. Isoflavon glikosida tersebut mempunyai aktivitas fisiologis yang rendah. Selama proses pengolahan, baik melalui perendaman atau fermentasi, isoflavon glikosida dapat terhidrolisis menjadi aglukan isoflavon dan glikosida. Aglukan isoflavon tersebut adalah genistein, daidzein dan glisitein. Selanjutnya pada proses fermentasi kedelai, daidzein dapat mengalami proses hidrosilasi lebih lanjut sehingga menjadi aglukan isoflavon faktor-2 [3,4,5,6].

Salah satu aktivitas fisiologis yang menonjol dari isoflavon daidzein (*7,4'-trihidroksi isoflavon*), genistein (*5,7,4'-trihidroksi isoflavon*), glisitein (*6-metoksi-7,4'-trihidroksi isoflavon*) dan faktor-2 (*6,7,4'-trihidroksi isoflavon*) adalah aktivitas antioksidan. Antioksidan dibutuhkan oleh tubuh, diantaranya untuk menghambat

proses penuaan dini serta mencegah penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, kolesterol tinggi, jantung koroner, *diabetes militus*, tumor, dan kanker. Disamping sebagai antioksidan, isoflavon daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2 juga mempunyai khasiat lain diantaranya sebagai estrogenik, anti inflamasi, anti hemolisis, anti konstriksi pembuluh darah, menurunkan kadar trigliserida VLDL (*very low density lipoprotein*) dan LDL (*low density lipoprotein*) serta meningkatkan HDL (*high density lipoprotein*) [6,7,8].

Salah satu metode ekstraksi isoflavon yang sering dilakukan dalam penelitian adalah ekstraksi bertingkat dengan pelarut metanol 80%. Metanol 80% merupakan pelarut yang optimum untuk menghasilkan isoflavon, tetapi metanol bersifat toksik. Untuk itu perlu dicari alternatif pengganti pelarut metanol. Salah satu pelarut yang dapat dipertimbangkan adalah etanol 70% (kepolarannya mendekati metanol 80%). Dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan pelarut etanol 70%, kemudian terhadap ekstrak kasar tersebut dilakukan proses ekstraksi bertingkat/fraksinasi dengan pelarut heksana dilanjutkan dengan pelarut etil asetat, sehingga dihasilkan fraksi etil asetat yang mengandung isoflavon [1, 9,10].

Dalam rangka pengembangan penelitian tentang metode ekstraksi isoflavon, maka perlu diketahui sejauh mana efektifitas teknik ekstraksi isoflavon (faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein) dari tempe kedelai kuning, pada satu alur ekstraksi, yang pertama adalah ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut

etanol 70% sehingga dihasilkan ekstrak etanol 70% (ekstrak pertama) dan ekstrak etanol 70% tersebut dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut heksana dan etil asetat sehingga dihasilkan fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% (ekstrak kedua).

METODE PENELITIAN

Sampel pada penelitian ini adalah kedelai (*Glycine max L Merril*) kuning dari Purwodadi Jawa Tengah.

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah : ragi tempe produksi LIPI merek "RAPRIMA", etanol 70% *Food Grade*, akuabides, akuades, air, heksana teknis yang sudah didestilasi, etil asetat teknis yang sudah didestilasi, Daidzein standar (*Sigma Chemical Co*), Glisitein standar (*Sigma Chemical Co*), Genistein standar (*Sigma Chemical Co*), Faktor-2 standar (*Sigma Chemical Co*), plastik dan kertas saring.

Peralatan yang digunakan antara lain: seperangkat alat dapur untuk membuat tempe, blender *Philips*, pipet mikro merek *Master Pet*, seperangkat alat HPLC *Perkin Elmer*, alat-alat gelas yang lazim dipakai.

Prosedur percobaan adalah sebagai berikut :

Pembuatan Tempe Kedelai

Seratus gram biji kedelai kuning direndam dengan 1000 ml air selama 24 jam. Pada saat perendaman, air diganti tiap 4 jam. Sambil direndam dilakukan pengupasan kulit kedelai. Selesai perendaman, lalu dicuci bersih dan ditiriskan. Kedelai kupas dikukus selama 45 menit. Setelah itu diangkat dan diangin-

inginkan. Selanjutnya kedelai rebus di campur dengan ragi tempe produksi LIPI merek "RAPRIMA" yang mengandung *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 (0,2 g), lalu difermentasi selama 48 jam pada suhu kamar sehingga dihasilkan tempe [2,7,11].

Pembuatan Ekstrak Etanol Tempe Kedelai Kuning Madura

Seratus gram tempe kedelai ditambah 500 ml etanol 70%, lalu diblender. Campuran ini dimaserasi selama 24 jam. Setelah itu sehingga diperoleh filtrat I dan residu I. Filtrat I disimpan, sedangkan residu I ditambahkan dengan 200 ml etanol 70%, dikocok hingga homogen dan didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya disaring hingga diperoleh filtrat II dan residu II. Filtrat II disimpan, sedangkan residu II ditambahkan dengan 200 ml etanol 70%, dikocok dan didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya disaring hingga diperoleh filtrat III dan residu III. Filtrat I, filtrat II dan filtrat III digabung, sedangkan residu III dibuang. Filtrat gabungan disaring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50^o C hingga diperoleh ekstrak etanol 70% (ekstrak pertama) [11].

Fraksinasi Ekstrak Etanol 70%

Ekstrak etanol 70% diambil 1 mg untuk diuji HPLC dan sisanya dilanjutkan ekstraksi bertingkat dengan pelarut n-heksana. Fase bawah yang terbentuk diambil dan diekstraksi dengan etil asetat. Dari fraksinasi dengan etil asetat, diambil fraksi etil asetat yang merupakan fase atas. Kemudian ditambahkan Na₂SO₄ dan disaring, filtrat lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C sampai

terbentuk isolat yang disebut fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% (ekstrak kedua) [1,7,9,10].

Identifikasi Isoflavon dengan Metode HPLC

Membuat larutan uji 100 ppm dengan cara melarutkan 0,1 mg isolat ke dalam 10 ml metanol 80 %. Larutan dihomogenkan dengan cara disentrifugasi. Sebanyak 20 µl larutan uji dipipet dan diinjeksikan pada injektor HPLC. Dari proses ini akan dihasilkan kromatogram HPLC yang siap dianalisis [11,12].

Teknik Analisis Data

Perhitungan kandungan isoflavon dalam sampel dilakukan dengan menganalisa kromatogram HPLC. Adanya puncak kromatogram yang memiliki waktu retensi yang sama atau mendekati waktu retensi faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein standar menunjukkan adanya faktor-2, daidzein glisitein dan genistein dalam sampel ekstrak pertama dan ekstrak kedua. Analisis secara kuantitatif bertujuan untuk mengetahui kadar masing-masing senyawa isoflavon (faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein). Kadar masing-masing isoflavon dapat dihitung dengan cara mengalikan % luas area dalam kromatogram dengan berat ekstrak total yang diperoleh [7,11,12].

HASIL DAN PEMBAHASAN

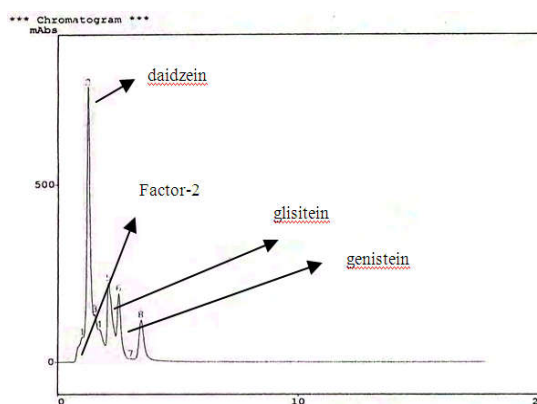
Pembuatan Tempe Kedelai Kuning

Biji kedelai yang digunakan adalah biji kedelai kuning dari daerah Purwodadi Jawa Tengah yang bentuknya utuh, keras, berwarna kuning dan tidak terdapat cacat pada seluruh permukaannya seperti bekas

hama, busuk atau terbelah. Biji kedelai yang telah dipilih selanjutnya direndam dalam air selama 24 jam. Selama perendaman, biji kedelai dikupas kulitnya. Biji kedelai yang telah dihilangkan kulit arinya (kedelai kupas) selanjutnya dicuci, ditiriskan dan dikukus selama 45 menit. Selanjutnya kedelai kukus diangin-anginkan untuk mengurangi kadar air berlebih. Kemudian ditambahkan ragi tempe sebagai inokulum. Kedelai yang telah diinokulasi, dikemas dalam plastik dan dilubangi. Lalu difermentasi selama 48 jam pada suhu kamar hingga terbentuk tempe yang berwarna putih, tekstur kompak dan flavour spesifik tempe.

Hasil Ekstraksi dengan Etanol 70%

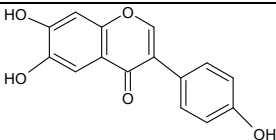
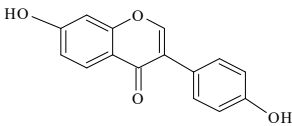
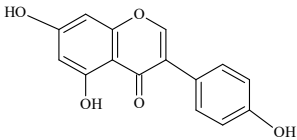
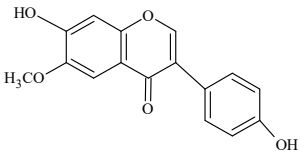
Dari proses ekstraksi dengan metode maserasi terhadap tempe kedelai dengan pelarut etanol 70% diperoleh ekstrak etanol 70% (ekstrak pertama) yang berbentuk ekstrak padat, pasta, berwarna kuning kecoklatan, dengan rendemen sebesar 6.8565 gram/100 gram tempe. Adapun kromatogram HPLC ekstrak etanol 70% tempe kedelai kuning dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram HPLC ekstrak etanol 70% tempe kedelai kuning

Analisis dengan HPLC dilakukan untuk mengidentifikasi adanya senyawa isoflavon daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2 yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% dari tempe kedelai kuning. Isoflavon adalah salah satu senyawa yang termasuk dalam golongan flavonoid (1,2-diarilpropana). Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa-senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linear yang terdiri dari tiga atom karbon [13]. Adapun struktur dari senyawa isoflavon faktor-2, daidzein, genistein dan glisitein ada pada tabel 1.

Tabel 1. Struktur senyawa isoflavon faktor-2, daidzein, genistein dan glisitein

No	Nama Senyawa	Struktur
1.	Faktor-2	
2.	Daidzein	
3.	Genistein	
4.	Glisitein	

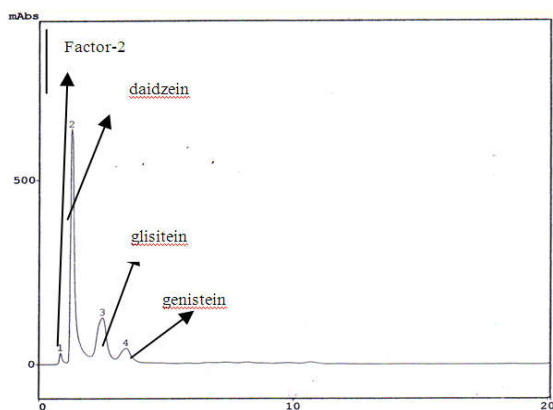
Pada kromatogram HPLC dari ekstrak etanol 70% tempe kedelai kuning dapat dilihat adanya delapan puncak dengan data seperti yang tertera pada

tabel 2 dalam lampiran. Dari delapan puncak tersebut dapat disimpulkan bahwa empat puncak dari delapan puncak yang ada, teridentifikasi sebagai senyawa isoflavon yaitu daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2. Empat puncak yang lain merupakan senyawa *unknown* yang terkandung dalam tempe kedelai. Adanya delapan puncak yang terbentuk dan masih agak bertumpang tindih, menunjukkan bahwa metode ekstraksi ini masih menghasilkan ekstrak dengan komponen kimia yang masih beragam (kurang murni).

Dari proses ekstraksi dengan metode maserasi terhadap tempe kedelai dengan pelarut etanol 70% tersebut dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut heksana sebanyak lima kali dan dengan pelarut etil asetat sebanyak lima kali sehingga dihasilkan fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% (ekstrak kedua) yang berbentuk ekstrak padat, pasta, berwarna kuning muda, dengan rendemen sebesar 0.012 gram/100 gram tempe kedelai kuning. Adapun kromatogram HPLC fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% tempe kedelai kuning dapat dilihat pada gambar 2 pada lampiran. Pada kromatogram HPLC dari fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% tempe kedelai dapat dilihat adanya empat puncak dengan data yang tertera pada tabel 3.

Tabel 2. Data kromatogram HPLC ekstrak etanol 70% tempe kedelai kuning

Isoflavon	Luas (area)	Persen Luas (%)
Faktor-2	1127464	3,3382
Daidzein	12283263	36,3769
Glisitein	8540404	25,2861
Genistein	3124382	9,2506
Unknown	222550	0,6589
Unknown	4271356	12,6465
Unknown	4198476	12,4307
Unknown	7162	0,0212



Gambar 2. Kromatogram HPLC fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% tempe kedelai kuning

Empat puncak yang dihasilkan tampak tidak bertumpah tindih dan tampak sangat mulus dibandingkan kromatogram pada ekstrak pertama. Dari data kromatogram tersebut akan tampak bahwa ekstrak kedua lebih murni daripada ekstrak pertama dan hanya mengandung 4 jenis isoflavon yaitu daidzein, ganistein, glisitein dan faktor-2.

Tabel 3. Data kromatogram HPLC fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% tempe kedelai kuning

Isoflavon	Luas (area)	Persen Luas (%)
Faktor-2	257981	2,0303
Daidzein	7766317	61,1200
Glisitein	3526981	27,6782
Genistein	1165396	9,1715

Dari berat ekstrak yang dihasilkan dan persen luas (%) masing-masing puncak dari kromatogram dapat dihitung kandungan masing-masing isoflavon per 100 gram tempe kedelai kuning dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kandungan isoflavon (g/100 g tempe)} = \text{Persen luas (\%)} \times \text{berat total ekstrak (g)}$$

Dari rumus perhitungan di atas di dapatkan kandungan masing-masing isoflavon/100 gram tempe kedelai kuning, yang dapat dilihat pada tabel 4 pada lampiran. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi pertama dengan etanol 70%, lebih besar dari ekstrak kedua yang merupakan hasil fraksinasi dengan pelarut heksana yang dilanjutkan dengan pelarut etil asetat. Hal ini kemungkinan disebabkan karena tidak semua isoflavon yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% terekstrak semua secara sempurna oleh etil asetat. Pada penelitian ini fraksinasi dengan etil asetat dilakukan sebanyak 5 kali. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak hasil fraksinasi sangat baik dijadikan sebagai data untuk penelitian yang bersifat kualitatif, tetapi tidak dapat menunjukkan kandungan yang sebenarnya

dari sampel yang kita teliti. Fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% dari hasil penelitian ini sudah dapat diidentifikasi lebih lanjut dengan LC-MS atau dari fraksi tersebut

juga dapat dilanjutkan dengan pemisahan satu per satu komponen kimianya dengan metode HPLC preparatif atau kromatografi kolom atau kromatografi lapis preparatif.

Tabel 4. Berat ekstrak dan kandungan isoflavon dalam ekstrak

Jenis Ekstrak	Ekstrak Etanol 70%		Kandungan Isoflavon (g/100 g tempe)	Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol 70% Tempe Kedelai Kuning	
	Persen Luas (%)	Berat Ekstrak (g)		Persen Luas (%)	Berat Ekstrak (g)
Faktor-2	3,3382	6.8565	0.2283	2,0303	0.0120
Daidzein	36,3769		2.4937	61,1200	0.0073
Glisitein	25,2861		1.7340	27,6782	0.0033
Genistein	9,2506		0.6342	9,1715	0.0011

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat total ekstrak (g) per 100 g tempe kedelai kuning dengan metode ekstraksi A = 6.8565 g sedangkan metode ekstraksi B = 0.0120 g. Kadar masing-masing isoflavon untuk metode ekstraksi A berturut-turut untuk faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein (g) /100 g tempe kedelai kuning adalah : 0,2283 g ; 2,4937 g ; 1,7340 g ; 0,6342 g, sedangkan metode ekstraksi B adalah : 0,0002 g ; 0,0073 g ; 0,0033 g ; 0,0011 g. Walaupun ditinjau dari berat total ekstrak maupun kadar isoflavon, metode A menunjukkan kadar yang lebih tinggi, tetapi dari kromatogram HPLC menunjukkan bahwa komponen kimia dari ekstrak yang didapat dari metode B adalah yang lebih murni.

Senyawa Faktor-2 Hasil Biokonversi Isoflavon pada Tahu oleh *Rhizopus Oligosporus (L41)*, *BioSMART*, 5, 1, hal. 8-12.

- [2] R.B. Kasmidjo, 1990, *Tempe : Mikrobiologi dan Biokimia Pengolahan serta Pemanfaatannya*. Yogyakarta, PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- [3] Sutrisno Koswara, 1995, *Isoflavon Senyawa Multimanfaat dalam Kedelai*, IPB, Bogor.
- [4] S. Pawiroharsono, 1996, *Aspek Mikrobiologi Tempe*, Bunga Rampai Tempe Indonesia, Yayasan Tempe Indonesia, Jakarta.
- [5] Gyorgy, S., Murata, K. and Ikehata, H., 1964, Antioxydant Isolated From Fermented Soybean, *Nature*, 23, 4947, p. 870-872.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Sri Retno Dwi Ariani, 2003, Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung

- [6] S. Pawiroharsono, 2001, *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*, diakses 03 Pebruari 2007.
- [7] Sri Retno Dwi Ariani dan Wiji Hastuti, 2009, Analisis Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Tempe dengan Variasi Lama Waktu Fermentasi dan Metode Ekstraksi, *Prosiding Seminar Kimia dan Pendidikan Kimia I*, Surakarta.
- [8] W. Sunarno, dan S.R.D. Ariani, 2001, Identifikasi Awal Senyawa Faktor-2 pada Tempe selama Proses Fermentasi Hari Ke-0, 1, 2, 3, 4 dan 5, *Paedagogia*, 4, 1.
- [9] Fajar Restuhadi, 1993, *Studi Pendahuluan Biokonversi Isoflavon pada Proses Fermentasi Kedelai Menggunakan Rhizopus spp. L.4l.*, Thesis, Magister Kimia ITB, Bandung.
- [10] A. Rudiretna, 1991, *Studi Pendahuluan Biokonversi Isoflavon pada Proses Fermentasi Tempe dengan Teknik Peredaman (Submerge)*, Thesis, Magister Kimia ITB, Bandung.
- [11] Sri Retno Dwi Ariani, Sri Handajani dan Sri Handayani, 2011, Studi Kandungan Isoflavon Dan Aktivitas Antioksidan Secara In Vitro Pada Tempe Kedelai Kuning (*Glycine Max L Merrill*) Madura Dengan Variasi Lama Waktu Fermentasi, *Prosiding Seminar Kimia dan Pendidikan Kimia III*, Surakarta.
- [12] Sri Retno Dwi Ariani, 2010, Characterization of The Isoflavones (Daidzein, Genistein, Factor-2 and Glycitein) from Ethanol Extract of Velvet Bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) Tempeh, *The 2nd International Conference on Chemical Sciences Proceeding*, Yogyakarta, October 14-16 th 2010, p. 169-172.
- [13] Manitto, P., 1992, *Biosintesis Produk Alam*, (Terj. Koensumardiyah). Semarang : IKIP Semarang Press.