

## Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* terhadap Kadar Genistein Kedelai (*Glycine max*) (*Aspergillus oryzae* Effect on Genistein Content of Soybean (*Glycine max*))

Estika Yunindarwati, Evi Umayah Ulfa, Endah Puspitasari, Mochammad Amrun Hidayat  
Fakultas Farmasi, Universitas Jember  
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121  
e-mail korespondensi: estik4@gmail.com

### Abstract

Mayor isoflavone in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is in glycoside form, while the aglycone isoflavone has higher bioactivity. Fermentation was aimed to converse glycoside isoflavone into aglycone isoflavones. In this study, soybean was fermented by *Aspergillus oryzae*. Fermentation was done for 3 day. The purpose of this study was to determine genistein content of fermented soybean extract. Genistein, the most abundance aglycone isoflavone in soybean, used as the reference substance. It was separated by Thin Layer Chromatography (TLC) using toluene:ethyl acetate:acetone:formic acid (20:4:2:1) as mobile phase. Densitometric measurement was carried out at 266 nm. The result showed that the genistein content in fermented soybean extracts was  $0.1256 \pm 3.62.10^{-3}$  w/w.

**Keywords:** fermented soybean, *Aspergillus oryzae*, genistein content, TLC densitometry

### Abstrak

Bentuk isoflavon utama dalam kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) adalah aglikon, padahal senyawa isoflavon aglikon memiliki bioaktivitas yang lebih baik. Fermentasi dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi aglikon. Pada penelitian ini, kedelai difermentasi menggunakan *Aspergillus oryzae*. Fermentasi dilakukan selama 3 hari. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar genistein kedelai terfermentasi *A. oryzae*. Genistein merupakan isoflavon terbesar yang terkandung di dalam kedelai, digunakan sebagai *marker*. Genistein dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan campuran toluen:etil asetat:aseton:asam format (20:4:2:1) sebagai fase gerak. Pengukuran densitometri dilakukan pada 266 nm. Hasil penetapan kadar genistein menunjukkan kadar genistein ekstrak kedelai terfermentasi adalah  $0,1256 \pm 2,10^{-3}$  b/b.

**Kata kunci:** kedelai terfermentasi, *Aspergillus oryzae*, kadar genistein, KLT densitometri

### Pendahuluan

Senyawa golongan flavonoid yang banyak ditemukan pada tanaman kacang-kacangan terutama pada kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) adalah isoflavon [1]. Kandungan senyawa isoflavon total dalam kedelai sebesar 1,2-4,2 mg/g sampel kering [2]. Senyawa isoflavon yang terdapat pada kedelai berbentuk aglikon (daidzein, genistein, glisitein), glikosida (daidzin, genistin, glisitin), malonil glikosida, dan asetil glikosida [3]. Senyawa tersebut memiliki berbagai macam aktivitas biologis seperti mampu menghambat pertumbuhan sel kanker [4], antioksidan [5],

inhibitor tirosinase [1], dan mengurangi risiko penyakit jantung [6]. Bentuk isoflavon aglikon memiliki bioaktivitas yang lebih baik daripada bentuk glikosida [7], sedangkan isoflavon mayor dalam kedelai memiliki bentuk glikosida [8]. Isoflavon glikosida dapat mengalami konversi menjadi aglikon melalui proses fermentasi [9]

Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme, seperti bakteri, khamir maupun kapang [10]. Salah satu kapang yang telah secara luas dimanfaatkan dalam proses fermentasi makanan adalah *Aspergillus oryzae*. Kapang ini mampu menghasilkan enzim  $\beta$ -glukosidase [11] yang dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi aglikon [12].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar genistein kedelai varietas Baluran terfermentasi *A. oryzae*. Salah satu isoflavon aglikon terbesar dalam kedelai adalah

genistein [2]. Oleh karena itu, genistein digunakan sebagai *marker* dalam penetapan isoflavon aglikon kedelai. Metode penetapan kadar yang digunakan adalah KLT Densitometri.

## Metode Penelitian

### Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Densitometer (Camag) dan perangkat komputer dengan program winCATS. Bahan yang digunakan adalah standar genistein (Tocris Bioscience), lempeng KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), metanol p.a (Fluka), n-heksana teknis, etanol 70 % teknis, kedelai varietas Baluran yang dipanen saat berumur 70 hari (diperoleh dari Desa Pontang, Kecamatan Ambulu, Kabupaten Jember), isolat *A. oryzae* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember)

### Prosedur penelitian

#### Pembuatan Kedelai Fermentasi

Sebanyak 500 gram kedelai Baluran dicuci dan direndam dalam air selama 24 jam. Setelah itu, kulit ari kedelai dihilangkan, lalu disterilisasi dan dimatangkan menggunakan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan 10 ml inokulum suspensi spora *A. oryzae* 10<sup>6</sup>/ml pada kedelai matang. Kedelai yang telah dicampur dengan inokulum kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari [13]. Selanjutnya, kedelai terfermentasi dikeringkan menggunakan oven suhu 60 °C selama 30 jam, lalu dihaluskan menggunakan blender. Masing-masing serbuk kedelai diayak menggunakan ayakan mesh 80. Serbuk yang telah diperoleh ditimbang untuk proses selanjutnya.

#### Ekstraksi

Serbuk kedelai terfermentasi dilakukan proses penghilangan lemak (*defatting*) menggunakan soxhlet menggunakan pelarut n-heksana (1:5) selama 3 jam [14]. Ekstraksi dilakukan dengan metode ultrasonikasi berulang. Serbuk yang telah bebas lemak sebanyak 50 gram diekstraksi dengan pelarut etanol 70% (1:6) [14], selama 1 jam. Selanjutnya, campuran diendapkan menggunakan sentrifugasi 2600 rpm selama 10 menit. Residu yang tersisa diekstraksi kembali sebanyak 2 kali menggunakan pelarut etanol 70 % yang baru. Filtrat hasil sentrifugasi dikumpulkan lalu dipisahkan dengan *rotary evaporator* kemudian dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* [15]. Ekstrak kental kedelai terfermentasi yang telah diperoleh dilakukan perhitungan rendemen ekstrak.

#### Preparasi larutan standar dan sampel

Preparasi larutan standar genistein dilakukan dengan membuat larutan induk 400 dan

500 µg/ml (dalam metanol p.a.) kemudian diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar yang berada pada rentang 2-40 µg/ml. Untuk preparasi larutan sampel sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dengan metanol p.a. sampai volum 10 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 5 mg/ml (replikasi 3 kali) [16].

#### Penetapan kadar

Larutan standar dan sampel ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub> sebanyak 6 dan 2 µL. Selanjutnya, lempeng tersebut dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan eluen yang terdiri dari toluen:etil asetat:aseton:asam format (20:4:2:1) [17] dan dibiarkan tereluasi sampai panjang lempeng 9 cm. Lempeng dikeringkan dan noda yang terbentuk dipindai pada panjang gelombang 266 nm. Uji kemurnian dan identitas genistein dalam standar dan sampel juga dilakukan dengan cara mengamati kromatogram genistein yang telah terbentuk dan dicek spektra kemurnian dan identitas puncak standar dan sampelnya. Area yang dihasilkan dari pemindaian masing-masing sampel, dimasukkan dalam persamaan kurva baku standar genistein. Kurva baku standar genistein diperoleh dari massa genistein yang ditotolkan pada lempeng dengan area hasil pemindaian densitometer. Kadar genistein dihitung dalam kadar % b/b.

## Hasil Penelitian

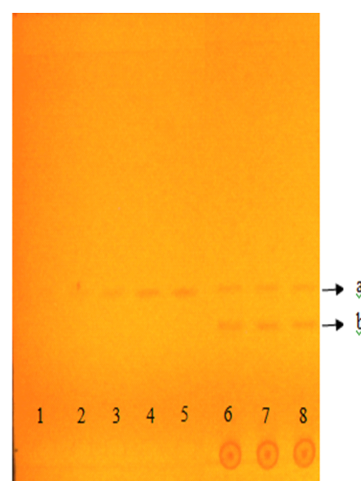
### Ekstraksi

Hasil ekstraksi dari kedelai terfermentasi menghasilkan rendemen sebesar 17 %.

### Penetapan kadar

#### Hasil eluasi lempeng KLT

Hasil eluasi lempeng KLT yang dilihat dibawah sinar UV 254 nm, disajikan pada Gambar 1.

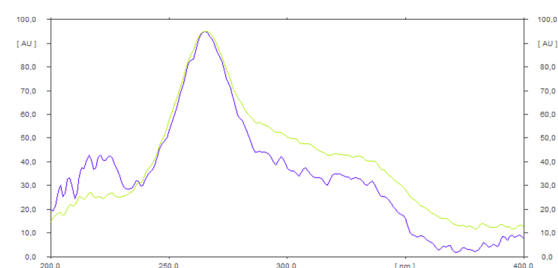


Gambar 1. Hasil KLT ekstrak kedelai terfermentasi hari ke-3 yang dilihat dengan sinar UV 254 nm.

Keterangan : standar genistein (noda 1-5, nilai Rf noda 1 sebesar 0,4, noda 2-5 masing-masing sebesar 0,39) dan sampel kedelai terfermentasi (noda 6-8, tampak dua noda, masing-masing noda memiliki nilai Rf 0,30 dan 0,40).

Hasil uji kemurnian dan identitas

Spektra standar genistein dan masing-masing sampel hasil uji kemurnian dan identitas ditunjukkan pada Gambar 2. Data korelasi kemurnian dan identitas disajikan pada Tabel 1 dan 2.



Gambar 2. Spektra standar genistein dan sampel  
Keterangan:

Tabel 1. Data korelasi uji kemurnian

	r(s,m)	r(m,e)	kemurnian
Genistein	0,999888	0,999036	ok
Kedelai fermentasi	0,999851	0,999552	ok

Tabel 2. Data korelasi uji identitas

	r(s,s)	r(s,a)	identitas
Genistein	0,999678		N/A
Kedelai fermentasi	0,999678	0,997262	ok

Spektra standar genistein  
Spektra kedelai terfermentasi

Hasil penetapan kadar genistein

Area genistein dalam sampel yang dihasilkan dari pemindaian dengan densitometer dimasukkan dalam persamaan kurva baku  $y = 27,16x + 125,55$  dengan nilai  $r = 0,999$  untuk memperoleh massa genistein dalam sampel. Hasil penetapan kadar genistein  $\pm$  SD ( $n=3$ ) pada ekstrak kedelai terfermentasi *A. oryzae* dengan metode KLT densitometri sebesar  $0,1256 \pm 3,362 \cdot 10^{-3} \% \text{ b/b}$ .

## Pembahasan

Fermentasi pada kedelai memiliki peranan penting dalam meningkatkan isoflavon aglikon.

Salah satu senyawa isoflavon aglikon utama yang terdapat dalam kedelai adalah genistein [2]. Genistein dapat diperoleh dari transformasi isoflavon glikosida melalui reaksi deglikosilasi akibat aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase. Enzim ini menyerang glukosa yang berikatan pada flavonoid posisi C3 dan C7 [7]. Reaktivitas. Proses transformasi Rendemen hasil ekstraksi kedelai terfermentasi hari ke-3 sebesar 17 %. Jumlah rendemen ekstrak menunjukkan banyaknya komponen senyawa yang dapat terekstraksi.

Gambar 1 merupakan foto lempeng KLT pada sinar UV 254 nm. Pemeriksaan lempeng KLT dibawah sinar UV bertujuan untuk mengetahui noda yang teredam. Hasil penyinaran lempeng di bawah sinar UV menunjukkan terdapat sampel yang memiliki 2 noda yang teredam. Noda genistein pada sampel adalah noda yang memiliki nilai Rf yang hampir sama dengan standar genistein, yang ditunjukkan dengan notasi huruf "a" pada gambar. Noda yang ditunjukkan dengan huruf "b" kemungkinan merupakan noda daidzein. Menurut penelitian pustaka [17], noda daidzein memiliki nilai Rf 0,25. Pada penelitian ini, noda "b" juga memiliki nilai Rf yang hampir sama dengan Rf daidzein tersebut.

Selain dilihat dengan nilai Rf, ada atau tidaknya genistein dalam sampel dapat diketahui juga dengan uji kemurnian dan identitas. Gambar 2 menunjukkan spektra genistein dalam standar dan sampel hasil uji kemurnian dan identitas. Spektra tersebut dibandingkan pada posisi *peak*, yaitu posisi *start* (s), posisi puncak/maksimum (m), dan posisi *end* (e).

Kemurnian analit dalam sampel dapat dilihat berdasarkan nilai  $r(s,m)$  dan  $r(m,e)$ . Nilai  $r(m,e)$  menunjukkan korelasi antara spektra yang diambil pada posisi puncak *peak* (m) dan akhir puncak (e). Dalam tabel 1 dapat diketahui bahwa nilai korelasi spektra genistein lebih dari 0,990 yang berarti analit dalam sampel murni [18].

Pada uji identitas analit ditunjukkan berdasarkan nilai  $r(s,s)$  dan  $r(s,a)$ . Nilai  $r(s,s)$  menunjukkan korelasi antara dua *track* standar yang mempunyai konsentrasi yang sama. Nilai  $r(s,a)$  menunjukkan korelasi spektra antara *track* standar dan *track* analit dalam sampel. Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa nilai korelasi yang didapatkan lebih dari 0,990 yang berarti analit dalam sampel identik dengan standar genistein [18].

Hasil penetapan kadar genistein menunjukkan bahwa kadar genistein pada ekstrak kedelai terfermentasi *A. oryzae* adalah  $0,1256 \pm 3,62 \cdot 10^{-3} \text{ b/b}$ . Menurut Nam [19], kadar genistein kedelai varietas Aga3 terfermentasi oleh *A. oryzae* NL5 hari ke-3 sebesar  $519 \pm 13 \mu\text{g/g}$ . Kadar isoflavon pada kedelai bervariasi, bergantung pada beberapa faktor yakni varietas, kualitas biji, masa panen, dan lokasi penanaman [8]. Adanya perbedaan hasil penelitian ini dengan

sebelumnya kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan varietas kedelai dan varietas kapang yang digunakan akan menyebabkan perbedaan genistein yang terkandung didalamnya.

### Simpulan dan Saran

Kadar genistein kedelai terfermentasi *A. oryzae* sebesar  $0,1256 \pm 3,62 \cdot 10^{-3}$  b/b. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menganalisis jenis dan jumlah masing-masing isoflavon pada kedelai Baluran dengan fermentasi *A. oryzae*.

### Daftar Pustaka

- [1] Chang TS. An update review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009; 10: 2440-2475.
- [2] Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone composition in America and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J Agri Food Chem.* 1996;42: 1964-67.
- [3] Dhaubhadel S. Regulation of isoflavonoid biosynthesis in soybean seeds. Canada: Southern crop protection and food research center; 2011. p.243-258.
- [4] Onozawa M, Fukuda K, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T, Wakabayashi K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Jpn J Clin Oncol.* 1998; 28(6): 360-363.
- [5] Chae GY, Ha BJ. The comparative evaluation of fermented and non-fermented soybean extract on antioxidant and whitening. *Toxicol Res.* 2011; 27(40): 205-209.
- [6] Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T, Tobe, K, Saito M, Kataoka S, et al. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J Nutri.* 2000; 130(8): 1887-1893.
- [7] Pandit NT, Patravale VB. Design and optimization of a novel method for extraction of genistein. *Indian J Pharma Scie.* 2011; 73(20): 184-192.
- [8] Teekachunhatean S, Hanprasertpong N, Teekachunhatean T. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds grown in Thailand. *Int J Agronomy.* 2013; 163573: 1-11.
- [9] Huynh NT, Camp JV, Smagghe G, Raes K. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes : A review. *Int J Mol Sci.* 15: 19369-19388.
- [10] Suprihatin. Teknologi fermentasi. Surabaya: Penerbit UNESA; 2010.
- [11] Barbesgaard P, Hheldt-Hansen H, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae* : a review. *App Micro Biotech.* 1992; 36: 569-572.
- [12] Punjaisee C, Chaiyasut C, Chansakaow S, Tharata S, Visessanguan W, Punjaisee S. 8-hydroxygenistein formation of soybean fermented with *Aspergillus oryzae* BCC 3088. *Afr J Agric Res.* 2011; 6(4): 785-789.
- [13] Lee IH, Hung YH, Chou CC. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic, and antocyanin contents of black bean. *Int J Food Micro.* 2008; 121: 150-156.
- [14] Hui M, Tiansheng Q, Hai Z. Methods for extracting, separating, identifying and quantifying daidzein and genistein. *Chinese J App Envi Bio.* 2005; 3: 2-5.
- [15] Luthria DL, Biswas R, Natarajan S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chem.* 2007; 105: 325-333.
- [16] Rahman L, Warnida H, Djide N. Pengaruh fermentasi sari kedelai dengan *Lactobacillus* sp. Terhadap kadar dan profil kromatografi lapis tipis genistein serta formulasinya dengan granul efervesen. *Jurnal ilmu kefarmasian indonesia.* 2012; 49: 1264-1266.
- [17] Yuan D, Chen Y, Bai X, Pan Y, Kano Y. 2006. TLC and HPLC analysis of soy isoflavones in semen sojae praeparatum. *Asia J Tradisional Med.* 2006; 1: 3-4.
- [18] Indrayanto G, Yuwono M. Validation of TLC analyses in encyclopedia of chromatography. Surabaya: Airlangga University Indonesia; 2003.
- [19] Nam DH, Kim HJ, Lim JS, Kim KH, Park CS, Kim JH, et al. Simultaneous enhancement of free isoflavone content and antioxidant potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. *J Food Sci.* 2011; 76(8): 194-200.