

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETIL ASETAT KECAMBACH KEDELAI HITAM (*Glycine soja*) YANG DIHIDROLISIS DENGAN ASAM KLOORIDA

Nurisyah^{1*}, Alfrida Monica Salasa², Elisabeth Natalia Barung³, dan Ratna Sari Dewi⁴

^{1,2,4}Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Makassar

³Jurusan farmasi Poltekkes Kemenkes Manado

^{*}Koresponden : Nurisyah, E-mail : nurisyah31@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v15i1.797>

ABSTRAK

Isolflavon dalam kecambah kedelai hitam (*Glycine soja*) berada dalam bentuk glikosida. Hidrolisis dengan asam dapat mengubah isolflavon glikosida menjadi isolflavon aglikon dan glukosa. Isolflavon diperoleh melalui ekstraksi dengan pelarut etanol dan campuran etanol dan HCL secara maserasi.. Penelitian bertujuan membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak tanpa hidrolisis dan yang dihidrolisis. Penelitian dilakukan dengan mengekstraksi senyawa isolflavon dari ekstrak etanol dengan pelarut etil asetat. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan mengukur jumlah DPPH yang tereduksi dari senyawa antioksidan sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan dihitung sebagai % pengikatan DPPH oleh sampel, kemudian ditentukan nilai IC₅₀ sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat kecambah kedelai hitam tanpa hidrolisis sebesar 341,88 ppm dan ekstrak terhidrolisis sebesar 179,204 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak terhidrolisis memiliki aktivitas antioksidan 2 kali lebih kuat dari ekstrak tanpa hidrolisis.

Kata kunci : kecambah, kedelai hitam, hidrolisis,, aktivitas antioksidan.

PENDAHULUAN

Konsep “*From Food To Cosmetic*” menarik perhatian produsen untuk memproduksi kosmetika yang berbahan dasar bahan alam karena selain dinilai lebih aman, kosmetika yang berbahan dasar dari makanan dan tanaman sudah terbukti mempunyai efektivitas yang baik untuk kesehatan maupun kecantikan. Kosmetika berbahan dasar alam juga dinilai lebih ramah lingkungan (Qiushi C., 2009).

Kecambah atau disebut juga tauge merupakan tunas muda dari biji kacang-kacangan yang disemaikan. Berdasarkan kandungan kimia kecambah, maka diyakini bahwa kecambah dapat dikembangkan sebagai bahan aktif pembuatan kosmetika *skin whitening* dan antioksidan. Pemanfaatan kedelai hitam (*Glycine soja*) kurang mendapat perhatian dan tidak sepopuler kedelai kuning dikarenakan warnanya yang kurang menarik.

Biji kedelai yang mengandung senyawa isolflavon yang termasuk dalam kelompok flavonoid sebagai penghasil antioksidan alami (Astuti et al. 2009, Zaheer dan Akhtar 2017). Isolflavon merupakan

senyawa metabolit sekunder yang dapat mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti penuaan dini, dan osteoporosis, mengurangi risiko penyakit kardiovaskular, serta mengurangi sindrom menopause pada wanita (Wong et al. 2008; Xiao 2008; Zhang et al. 2012).

Dibandingkan dengan kedelai kuning, kedelai hitam memiliki kandungan total polifenol, flavonoid dan antosianin yang lebih tinggi daripada kedelai kuning. Berdasarkan hasil penelitian Yuliana (2003), proses perkecambahan dapat meningkatkan produksi senyawa fenolik, dan meningkatkan aktivitas antioksidannya. Devi et al. (2009) melaporkan kandungan total isolflavon varietas kedelai asal India yang diolah menjadi beberapa produk diantaranya kecambah kedelai memiliki kandungan total isolflavon tertinggi dengan kisaran 602-794 mg/kg, lebih tinggi dibandingkan biji kedelai (568-730 mg/kg).

Senyawa isolflavon ini pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa gula melalui ikatan glukosida. Jenis senyawa isolflavon ini terutama adalah genistin, daidzin, dan

glisitin. Bentuk senyawa demikian ini mempunyai aktivitas fisiologis kecil. Selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun proses non-fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi, terutama melalui proses hidrolisa sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon yang lebih tinggi aktivitasnya.

Isoflavon dalam kedelai terdapat dalam 4 bentuk, yaitu bentuk malonil-glikosida, asetil-glikosida, glikosida, dan aglikon (bebas). Kandungan tertinggi isoflavon dalam kedelai adalah malonil- dan asetilglikosida (Kudou et al., 1991). Di antara keempat bentuk isoflavon, aktivitas antioksidatif tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein. Isoflavon malonil-glikosida dan asetil-glikosida mudah terdeesterifikasi menjadi isoflavon glikosida dengan perlakuan suhu tinggi (di atas 40°C) (Kudou et al., 1991). Hidrolisis dengan asam atau enzim β -glukosidase dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon dan glukosa (Purwoko et al., 2001). Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kecambah kedelai hitam yang dihidrolisis maupun tanpa hidrolisis dengan asam klorida.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah Kedelai hitam organik yang diperoleh dari produsen di Kota Bogor. Bahan pembantu adalah natrium alginat. Bahan kimia yang dibutuhkan adalah etanol, etil asetat, heksan, HCl, DPPH dan akuades.

Alat yang akan digunakan adalah *magnetic stirrer hot plate*, Mikropipet, Rotavapor vakum, cawan porselen, timbangan analitik, Spektrofotometer UV-VIS dan alat-alat gelas untuk analisis.

Pembuatan Kecambah

Biji kedelai hitam direndam dalam larutan natrium alginat 2% selama 4 jam, kemudian dikecambahkan selama 64 jam (mengacu pada penelitian Pertiwi, 2013)

Proses Ekstraksi

1. Ekstraksi tanpa hidrolisis

Kecambah segar yang telah dibersihkan dikeringkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari. Setelah kering, sampel diserbukkan dengan cara diblender dan diayak dengan ayakan mesh 40. Kemudian sampel uji sebanyak 250 g dimasukkan ke erlemeyer, ditambahkan dengan pelarut dietil eter sebanyak 400 mL. Dishaker selama 4 jam, disaring. Residu dishaker kembali menggunakan etanol 96% selama 4 jam, proses ekstraksi dilakukan beberapa kali dengan pelarut yang sama sampai diperoleh ekstrak yang tidak berwarna lagi. Campuran disaring menggunakan kertas saring Whatman nomor 41. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapor. Setelah itu, dilakukan pemisahan dengan etil asetat menggunakan corong pisah. Fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian disaring, dan dipekatkan kembali dengan rotavapor. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dikeringkan dengan cara diuapkan di atas penangas air suhu 60 °C hingga kering.

2. Ekstraksi yang dihidrolisis dengan HCL

Kecambah segar yang telah dibersihkan dikeringkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari. Setelah kering, sampel diserbukkan dengan cara diblender dan diayak dengan ayakan mesh 40. Kemudian sampel uji sebanyak 250 g dimasukkan ke erlemeyer, ditambahkan dengan pelarut dietil eter sebanyak 400 mL. Dishaker selama 4 jam, disaring. Residu dishaker kembali menggunakan campuran HCl 2 N dan etanol 96% dengan nisbah 1:8 selama 4 jam. Campuran disaring menggunakan kertas saring Whatman nomor 41. Filtrat yang diperoleh dipanaskan pada suhu 60 °C di atas *magnetic stirrer* selama 2 jam, kemudian ekstrak dinetralkan menggunakan NaHCO₃ lalu dipekatkan menggunakan rotavapor. Setelah itu, dilakukan pemisahan dengan etil asetat menggunakan corong pisah. Fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian disaring, dan dipekatkan dengan rotavapor. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dikeringkan dengan cara diuapkan di

atas penangas air suhu 60 °C hingga kering.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Dibuat deret konsentrasi larutan kerja sampel dalam pelarut etanol, deret konsentrasi larutan kerja yang dibuat diatur sedemikian rupa sehingga nilai konsentrasi sampel yang dapat mengikat 50% radikal bebas (DPPH) berada dalam deret konsentrasi yang dibuat. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur masing-masing 1,0 mL larutan kerja dimasukkan ke dalam wadah (vial) tertutup aluminium foil, kemudian ditambahkan 4,0 ml larutan DPPH 40 ppm. Larutan dikocok, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan dengan pengulangan (replikasi) sebanyak 3 kali. Dilakukan pula perlakuan blangko menggunakan pelarut etanol yang dicampur dengan DPPH. Kemudian dihitung % pengikatan (% Inhibisi) DPPH dan ditentukan nilai IC₅₀ sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kedelai hitam mempunyai kandungan fenolik, tanin, antosianin dan isoflavin serta aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding kedelai kuning (Xu dan Chang, 2007). Menurut Xu dan Chang (2007) kedelai hitam kandungan flavonoidnya 6 kali lebih banyak dibanding kedelai kuning.

Kedelai hitam yang digunakan sebagai bahan baku dalam penelitian ini terlebih dahulu dikecambahkan. Perkecambahan dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan kandungan senyawa fenolik yang berfungsi sebagai zat antioksidan meningkat. Menurut Aminah dan Wikanastri (2012) nilai dan kandungan gizi kacang-kacangan menjadi lebih baik setelah melalui proses perkecambahan. Selama proses perkecambahan pada kacang-kacangan sebagian sistem enzim menjadi aktif dan terjadi perubahan.

Reaksi yang terjadi selama perkecambahan meliputi hidrolisis, oksidasi, dan sintesis (Malette et al. 1960). Reaksi hidrolisis terjadi mulai dari tahap awal perkecambahan yaitu imbibisi air. Tahap imbibisi air dapat dilakukan dengan cara perendaman dalam air atau biji diletakkan dalam lingkungan yang jenuh dengan uap air.

Pada penelitian ini, kecambah dibuat dengan cara sampel kedelai hitam berbiji kecil (varietas Malika) terlebih dahulu dicuci dengan air, kemudian direndam dalam larutan alginat 2%b/v. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Andarwulan dan Purwiyatno (2004), bahwa peningkatan komponen *bioaktif* selama perkecambahan pada proses perendaman dapat ditambahkan beberapa bahan-bahan sebagai larutan perendaman seperti *sodium alginate* 2%.

Senyawa fenolik dapat diproduksi pada kacang-kacangan yang terelisitasi selama proses perkecambahan. Tumbuhan yang terinfeksi oleh mikroorganisme akan merespon dengan sistem pertahanan salah satunya dengan peningkatan produksi senyawa fenolik, sehingga dapat diperoleh kecambah kacang yang mengandung antioksidan fenol (Andarwulan dan Purwiyatno, 2001).

Kedelai hitam memiliki kadar lemak total sebesar 35,61%, kandungan lemak yang tinggi dapat menghambat proses penarikan/ekstraksi senyawa lainnya. Oleh karena itu Proses ekstraksi dimulai dengan sampel terlebih dahulu diekstraksi pelarut dietil eter kemudian dishaker dengan kecepatan 200 rpm selama 4 jam. Pelarut dietil eter dipisahkan, dan residu dikeringkan hingga bebas dari pelarut dietil eter. Kemudian dilakukan ekstraksi dalam pelarut etanol 96% yang dicampur HCl dan pelarut etanol 96% tanpa HCl, Kedua pelarut tersebut digunakan untuk menghasilkan ekstrak yang dihidrolisis dan tanpa hidrolisis. Ekstrak yang dihasilkan masing-masing difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat untuk selanjutnya ditentukan aktivitas antioksidannya menggunakan pereaksi DPPH.

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa semakin besar konsentrasi, serapan terukur semakin kecil. Hal ini menunjukkan semakin besar konsentrasi jumlah larutan DPPH yang tereduksi semakin besar sehingga serapan terukur (sisa DPPH) semakin kecil, oleh karena itu semakin besar konsentrasi % inhibisi (pengikatan DPPH) semakin besar pula. Adanya perbedaan konsentrasi perlakuan pada ke dua sampel ekstrak disebabkan karena pada orientasi awal penelitian ini dilakukan pencarian deret konsentrasi larutan sampel yang nilai IC₅₀

berada dalam deret konsentrasi larutan sampel yang dibuat.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat hasil hidrolisis dan tanpa hidrolisis, menunjukkan bahwa ada hubungan yang linear antara konsentrasi % pengikatan radikal bebas (DPPH) seperti yang terlihat pada Gambar 1 dan 2.

Perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kecambah yang telah dihidrolisis dan tanpa hidrolisis dengan HCl dapat dilihat pada Berdasarkan grafik hubungan konsentrasi terhadap % inhibisi sampel, maka ditentukan nilai IC_{50} untuk menentukan potensi aktivitas antioksidannya. Perbandingan nilai IC_{50} ekstrak yang dihidrolisis dan tanpa hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 3

Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat kecambah kedelai hitam yang telah dihidrolisis terhadap pengikatan radikal bebas (DPPH) adalah sebesar 179,204 ppm. Jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} ekstrak etil asetat kecambah kedelai hitam yang tanpa hidrolisis dengan nilai IC_{50} sebesar 341,88 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat terhidrolisis aktivitas antioksidannya lebih kuat dari ekstrak etil asetat yang tanpa hidrolisis.

Sejalan dengan penelitian Fawwaz (2014), yang menyatakan bahwa kandungan isoflavon jenis genistein pada kedelai hitam yang telah mengalami hidrolisis secara enzimatik menggunakan bakteri probiotik *Lactobacillus bulgaricus* adalah sebesar 4,99% (b/b), dan yang menggunakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* diperoleh kadar genistein sebesar 3,46% (b/b). Penelitian David, DKK (2009) menunjukkan bahwa kandungan total isoflavon varietas kedelai yang diolah menjadi beberapa produk diantaranya kecambah kedelai memiliki kandungan total isoflavon lebih tinggi dibandingkan dengan biji kedelai. Secara alami, isoflavon pada kedelai hampir seluruhnya terdapat dalam bentuk β -glikosida (glikon). Bentuk glikosida dipertahankan oleh tanaman sebagai bentuk inaktif sehingga dibutuhkan sebagai antioksidan. Hidrolisis dengan asam atau enzim β -glukosidase dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon dan glukosa (Purwoko *et al*, 2001).

KESIMPULAN

Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat kecambah kedelai hitam tanpa hidrolisis sebesar 341,88 ppm dan ekstrak terhidrolisis sebesar 179,204 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak terhidrolisis memiliki aktivitas antioksidan 2 kali lebih kuat dari ekstrak tanpa hidrolisis.

DAFTAR PUSTAKA

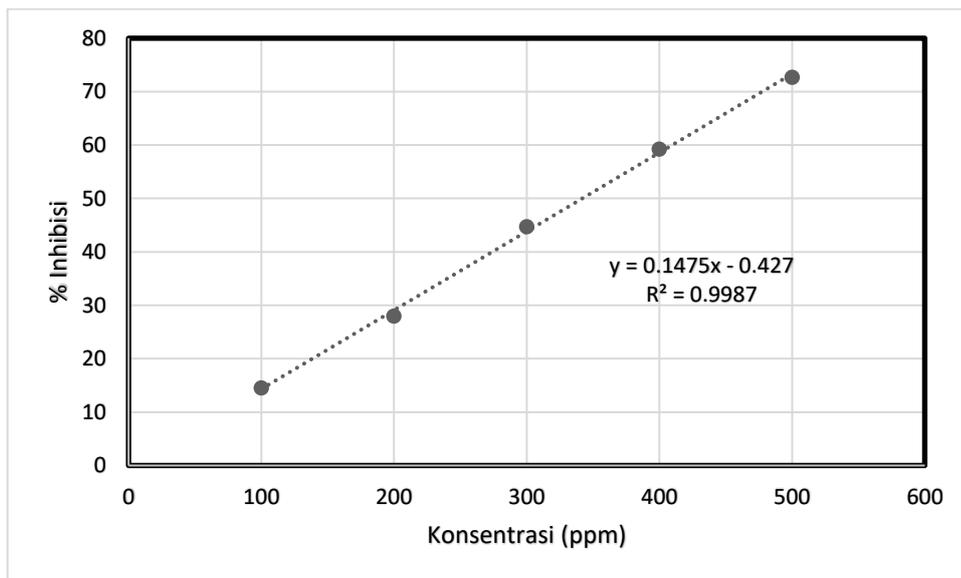
- Aminah dan Wikanastri (2012) Karakteristik Kimia Tepung Kecambah Serealida Dan Kacangkacangan Dengan Variasi Blanching, Seminar Hasil-Hasil Penelitian – LPPM UNIMUS 2012
- Andarwulan, N dan Purwiyatno H. *Optimasi Produksi Antioksidan pada Proses Perkecambahan Biji-Bijian dan Divesifikasi Produk Pangan Fungsional*. Absolut, Yogyakarta. 2001. Hal 2-3 Astuti S, Muchtadi D, Astawan M, Purwantara B, Wresdiyati T. 2009. Kualitas spermatozoa tikus yang diberi tepung kedelai kaya isoflavon, seng (Zn) dan vitamin E. *Media Peternakan* 32(10): 12-21.
- Devi MKA, Gondi M, Sakhtivelu G, Giridhar P, Rajasekaran T, Ravishankar GA. 2009. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry* 114: 771-776.
- Fawwaz, M., Akbar. N., Pratama M., Saleh, A and Baits, M. 2016. High Performance Liquid chromatographic Analysis Of Isoflavones Aglycone In Indonesian Soybean. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. IJPSR ; Vol. 7(10): 4230-4233.
- Kudou, S., Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura and K. Okubo. 1991. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seed (*Glycine max* Merrill). *Agric. Biol. Chem.* 55: 2227 – 2233.
- Purwoko, T., Pawiroharsono, S., & Gandjar, I. (2001). Biotransformasi isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524. *BioSMART*, 3(2), 7–12.
- Qiushi C., 2009, Evaluate the effectiveness of the natural cosmetic product compared to chemical-based product. *International Journal of Chemistry*, 1, 57-59

- Wong MCY, Emery PW, Preedy VR, Wiseman H. 2008. Health benefit of isoflavones in functional foods? Proteomic and metabolomic advances. *Inflammopharmacology* 16(5); 235-239.
- Xiao CW. 2008. Health effects of soy protein and isoflavone in humans. *The Journal of Nutrition* 138(6): 1244-1249.
- Xu B and Chang SK. 2008. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* 56:7165–7175.
- Zaheer K dan Akhtar MH. 2017. An updated review of dietary isoflavone: nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 57(6):1280-1293.
- Zhang X, Gao YT, Yang G, Li H, Cai Q, Xiang YB, Ji BT, Franke AA, Zheng W, and Shu XO. 2012. Urinary isoflavonoids and risk of coronary hearth disease. *Int. J. Epidemiol.* 41: 1367-1375.

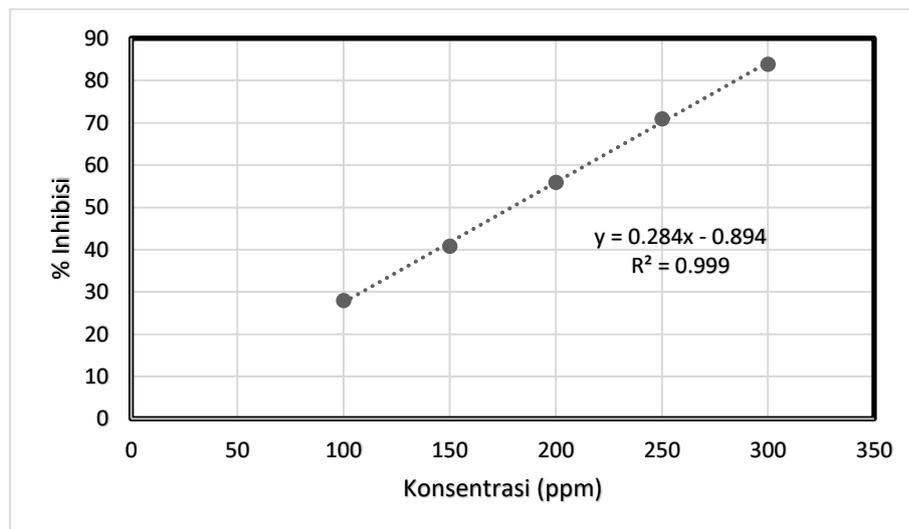
Tabel 1. Data pengukuran aktivitas antioksidan sampel ekstrak terhidrolisis dan tanpa hidrolisis

No	Ekstrak terhidrolisis	Ekstrak tanpa hidrolisis
----	-----------------------	--------------------------

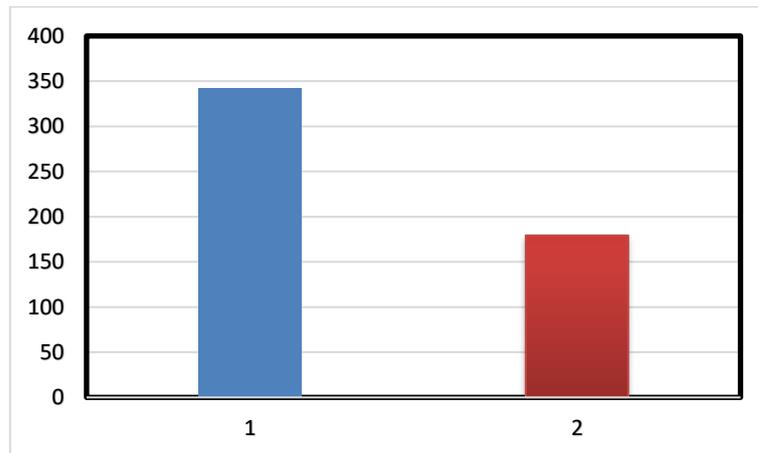
	Konsentrasi (ppm)	Serapan	% Inhibisi	Konsentrasi (ppm)	Serapan	% Inhibisi
1	100	0,66885	27,96	100	0,79355	14,54
2	150	0,54956	40,81	200	0,66859	27,99
3	200	0,40916	55,93	300	0,51364	44,68
4	250	0,26938	70,99	400	0,37868	59,22
5	300	0,14966	83,88	500	0,25372	72,67
	Blanko	0,92851	-	Blanko	0,92851	-



Gambar 1. Kurva hubungan konsentrasi terhadap % inhibisi fraksi etil asetat kecambah kedelai hitam tanpa hidrolisis



Gambar 2. Kurva hubungan konsentrasi terhadap % inhibisi fraksi etil asetat kecambah kedelai hitam terhidrolisis



Gambar 3. Perbandingan nilai IC₅₀ hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kecambah kedelai hitam tanpa hidrolisis (1) dan ekstrak terhidrolisis (2)