

ANALISIS DAIDZEIN DAN GENISTEIN PADA KEDELAI (*Glycine max L. Merrill*) VARIETAS ANJASMORO, ARGOMULYO DAN DENA 2 MENGGUNAKAN METODE KCKT

Etty Sulistyowati^{1*}, Sudibyo Martono², Sugeng Riyanto², Endang Lukitaningsih²

¹Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi “Yayasan Pharmasi Semarang”

Jl. Letnan Jendral Sarwo Edie Wibowo Km. 1, Plamongansari, Pucanggading, Semarang.

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Jl. Sekip Utara, Sinduadi, Mlati, Yogyakarta

*email : sulistyowati_etty@yahoo.com

ABSTRAK

Kedelai (*Glycine max L. Merrill*) tidak hanya digunakan sebagai sumber protein, tetapi juga sebagai pangan fungsional yang dapat mencegah timbulnya penyakit-penyakit degeneratif, dikarenakan kandungan isoflavon. Senyawa ini dikenal memiliki kesamaan molekul dengan estrogen. Penggunaan isoflavon sebagai alternatif hormon konvensional terapi telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir, karena aktivitas estrogenik dan efek samping yang rendah. Daidzein dan genistein merupakan isoflavon yang banyak terdapat dalam kedelai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan daidzein dan genistein pada kedelai (*Glycine max L. Merrill*) varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Gema yang dihasilkan dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) Malang. Penyarian senyawa aktif digunakan metanol hasil optimasi, selanjutnya dianalisis kandungan daidzein dan genistein dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Sistem KCKT yang digunakan dilengkapi kolom RP-C18 Sun FireTM C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5µm), detektor *Photo Dioda Array* (PDA), sistem elusi isokratik, fase gerak metanol-air yang mengandung asam asetat 0,1 % (53:47), kecepatan alir 1,0 mL/menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan daidzein dan genistein pada kedelai (*Glycine max L. Merrill*) varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Gema diperoleh kadar daidzein dan genistein masing-masing adalah 18,69 mg/100g dan 23,67 mg/100g; 29,68 mg/100 g dan 22,15 mg/100 g; 14,15 mg/100 g dan 21,22 mg/100 g.

Kata kunci: Anjasmoro, Argomulyo, Gema, Daidzein, Genistein, KCKT

Latar Belakang

Beberapa negara penghasil kedelai termasuk Indonesia mulai mengarahkan objek penelitiannya pada peningkatan mutu gizi kedelai. Lembaga lembaga riset pengembangan benih kedelai untuk petani juga telah menghasilkan varietas-varietas kedelai unggul yang akan ditawarkan ke petani agar hasil panen yang diperoleh semakin lama semakin baik. Kedelai berperan penting sebagai sumber pangan khususnya pangan fungsional (*functional food*). Kedelai tidak hanya digunakan sebagai sumber protein, tetapi juga sebagai pangan fungsional yang dapat mencegah timbulnya penyakit-penyakit degeneratif, dikarenakan kandungan isoflavon yang ada pada kedelai (Wang dan Murphy, 1994). Menurut BPOM definisi pangan

fungsional adalah pangan olahan yang mengandung satu atau lebih komponen fungsional (*bioactive compounds*) yang berdasarkan kajian ilmiah, yaitu pembuktian uji klinis, benar-benar mempunyai fungsi fisiologis yang terbukti bermanfaat bagi kesehatan, serta dapat dipertanggungjawabkan makanan atau bahan adanya kandungan unsur non gizi yang berkhasiat bagi kesehatan. Pangan fungsional merupakan pangan yang dapat disajikan, serta dikonsumsi sehari-hari sebagai menu/diet yang memenuhi standar mutu, persyaratan keamanan dan memiliki karakteristik sensoris yang sama seperti makanan pada umumnya, seperti penampakan, meliputi warna, tekstur, ukuran, konsistensi serta cita rasa yang dapat diterima konsumen. Salah satu aspek penting dari

kedelai sebagai sumber pangan fungsional adalah kandungan isoflavonnya merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman melalui sintesis oleh *2-hydroxyisoflavone synthase* (IFS). Senyawa tersebut tidak disintesis oleh mikroorganisme, oleh karena itu, tanaman ini merupakan sumber utama penghasil senyawa isoflavon di alam. Kedelai dinilai memiliki kandungan isoflavon cukup tinggi, dan terbanyak terdapat pada biji, khususnya pada bagian hipokotil (*germ*) yang akan tumbuh menjadi tanaman, sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama. Umumnya kedelai tumbuh pada ketinggian 500 m di atas permukaan laut dengan iklim panas dan curah hujan rata-rata 200 mm/bulan. Polong kedelai berisi 1-4 biji kedelai, tanaman kedelai merupakan tanaman berumur pendek, berkisar 70-90 hari (Pitojo S.,2003). Namun jenis kedelai, lokasi geografis, dan metode pengolahan memiliki pengaruh besar pada kandungan zat aktif pada kedelai (Hong dkk., 2011). Isoflavon dalam kedelai terdiri dari malonil-glikosida, asetil-glikosida, glikosida, dan aglikon. Diantara keempat bentuk isoflavon, aktivitas biologis tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein (5,7,4-trihidroksi isoflavon), daidzein (7,4-dihidroksi isoflavon) dan glisitein (6-metoksi-7,4-dihidroksi isoflavon) (Tipkanon dkk., 2010). Selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun non fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi, terutama melalui proses hidrolisis sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon isoflavon yang lebih tinggi aktivitasnya. Senyawa aglikon isoflavon tersebut adalah genistein, daidzein dan glisitein. Mazur (1998) menyampaikan bahwa dari beberapa bahan pangan yang telah dianalisis, diketahui kedelai menempati urutan pertama, mengandung daidzein sebesar 10,5 - 85 mg/100 g berat kering dan genistein sebesar 26,8-120,5 mg/100 g berat kering. Manfaat isoflavon bagi kesehatan manusia cukup banyak di antaranya berperan penting untuk mencegah timbulnya penyakit-penyakit degeneratif. Senyawa ini dikenal memiliki kesamaan molekul dengan estrogen. Penggunaan isoflavon sebagai alternatif hormon konvensional telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir, karena aktivitas

estrogenik dan efek samping yang rendah. Kandungan isoflavon kedelai berdasarkan data di Jepang bahwa 30 g berkontribusi lebih dari 23 mg total genistein dan 10 mg daidzein. Masyarakat Jepang mengkonsumsi 25-50 mg isoflavon setiap hari setara dengan satu sampai dua penyajian makanan ber bahan baku kedelai. Potensi isoflavon kedelai potensi untuk mengurangi risiko osteoporosis pascamenopause dan penyakit kardiovaskular pada wanita telah diteliti (Suthar dkk., 2001; Uesugi dkk., 2002). Senyawa aktif dalam kedelai yang bertanggung jawab terhadap aktivitas biologis diantaranya daidzein dan genistein. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa genistein, isoflavon pada kedelai dapat mencegah kanker (Ravindranath dkk., 2004), kanker payudara (Kang dkk., 2009). Senyawa daidzein genistein dapat mencegah osteoporosis pada perempuan pascamenopause (Herwana dkk., 2015), sebagai anti-inflamasi dan mengurangi cedera paru (Parida dkk., 2015), antimetastatis kanker prostat pada manusia (Pavese dkk., 2014). Di bidang pangan, ternyata pakan ternak yang diperkaya daidzein dapat meningkatkan kualitas daging sapi (Zhao dkk., 2014). Berdasarkan penelitian Izumi dkk. (2000) senyawa isoflavon bentuk aglikon lebih mudah dan cepat diserap tubuh, begitu juga aktivitas biologis isoflavon aglikon lebih tinggi dibandingkan bentuk glikosidanya (Munro dkk., 2003; Yatsu dkk., 2016). Agar diperoleh informasi kandungan daidzein dan genistein dalam kedelai yang tepat, diperlukan suatu metode analisis yang reliabel, akurat dan cepat. Informasi kandungan senyawa tersebut sangat penting dalam kaitannya pada pemenuhan sumber kedelai dan kacang yang baik agar memiliki manfaat sebagai sumber pangan fungsional. Di Indonesia telah dilakukan pengembangan benih kedelai varietas unggul pada lembaga lembaga riset yang ada, salah satu lembaga yang telah menghasilkan berbagai varietas kedelai adalah Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) Malang. Kedelai varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Gema merupakan kedelai unggulan berdasarkan SK Mentan : 1248/Kpts/SR.120/12/2014 (Balitkabi, 2015). Selama ini, Balitkabi hanya menentukan kandungan protein total dan asam folat dalam varietas kedelai yang dihasilkan untuk dasar evaluasi dalam menentukan varietas kedelai mana yang akan dijual ke para petani untuk

ditanam di ladang. Di samping itu, faktor jumlah kedelai yang dapat dipanen serta ketahanan terhadap hama dan penyakit dijadikan dasar pula dalam mengevaluasi varietas-varietas kedelai. Oleh karena itu, analisis terhadap kandungan isoflavon (daidzein dan genistein) dalam varietas kedelai produksi Balitkabi Malang merupakan parameter penentu yang baru dalam memutuskan jenis kedelai mana yang paling baik untuk ditanam oleh petani. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan teknik pemisahan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Berbagai kondisi sistem KCKT yang dilengkapi dengan detektor PDA (*Photo Detector Array*) untuk analisis kedua senyawa ini dalam kedelai telah dilakukan untuk memperoleh metode analisis yang valid. *Reversed phase* KCKT digunakan untuk memisahkan senyawa semipolar sampai nonpolar, kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Fase gerak yang digunakan dalam kromatografi cair-padat dapat digunakan campuran air dan metanol, asetonitril atau tetrahidrofur. Berbagai kombinasi fase gerak air, metanol, asetonitril berbasis asam asetat, asam fosfat, asam trifluoroasetat, asam format dimaksudkan untuk menentukan polaritas yang akan mempengaruhi pemisahan senyawa. Penggunaan fase gerak metanol : air berbasis asam asetat telah dilakukan Isabela da Costa C'esar dkk., 2006; M.A. Rostagno dkk., 2009;) berdasarkan penelitian tersebut maka peneliti akan mengembangkan metode analisis daidzein dan genistein menggunakan fase gerak metanol : air yang akan diaplikasikan dalam sampel kedelai. Pemilihan metanol sebagai fase gerak dibandingkan asetonitril dikarenakan kekuatan pemisahan analit terhadap senyawa. Penggunaan fase gerak dengan perbandingan tertentu ditujukan untuk mendapatkan selektivitas sehingga terjadi perubahan jarak puncak antar kromatogram yang satu dan yang lainnya terutama kromatogram yang saling berhimpitan khususnya kromatogram yang menjadi target analisis. Elusi dilakukan dengan cara menjaga komposisi fase gerak tetap selama elusi (isokratik) karena fase gerak yang homogen dapat dipertahankan untuk memperoleh reproduksibilitas pemisahan kromatogram. Fase diam yang digunakan *Oktadesil silika* (ODS) atau C-18 *end-capping* sehingga dapat

mencegah interaksi adsorpsi antara analit dengan residu silanol dan logam yang terdapat pada silika dikarenakan residu silanol telah ditutup dengan gugus trimetilsilil dan digunakan silika dengan kemurnian tinggi. C-18 ini mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat : HPLC Waters detektor PDA, kolom Sun Fire™ C-18 (4,6 x 150 mm, 5µm), *software* komputer untuk pengoperasian KCKT, *sonicator*, *sentrifuge*, kertas saring Whatman no 1, membran filter (*cellulose nitrate*) 0,45 µm, membran filter (*milipore*) 0,45 µm, membran filter (*Phenex NY*) 0,45 µm

Bahan : Baku Daidzein (Sigma), baku Genistein (Sigma), air pro HPLC dari Merck, metanol derajat *Liquid Chromatography* dari Merck, metanol (derajat pro analisis dari Merck), varietas kedelai (*Glycine max* L. Merrill) Anjasmoro, Argomulyo dan Gema.

Jalannya Penelitian

Preparasi Sampel

Kedelai varietas Anjasmoro, Argomulyo, Gema dihaluskan menggunakan grinder sehingga didapatkan serbuk kedelai. Serbuk kedelai diayak menggunakan ayakan ukuran 40/50 mesh untuk mendapatkan keseragaman ukuran. Setelah didapatkan serbuk sampel dengan keseragaman ukuran dilakukan penimbangan seksama serbuk kedelai. Maserasi dilakukan dengan metanol 50% perbandingan penyari 1 :10. Maserat yang telah didapatkan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no 1 sebanyak 2 kali penyaringan, dilanjutkan sentrifuge selama 10 menit. Maserat yang didapat dilakukan penyaringan kembali menggunakan membran filter (*cellulose nitrate*) 0,45 µm. Maserat dilakukan sonifikasi selama 10 menit sebelum diinjeksikan ke dalam KCKT.

Kondisi KCKT

Analisis daidzein dan genistein pada maserat kedelai menggunakan metode KCKT dilakukan dengan tahapan analisis sebagai berikut:

Penyiapan fase gerak

Komposisi fase gerak (A) Metanol dan fase gerak (B) Air yang mengandung 0,1% asam asetat, diatur sesuai komposisi yang dikehendaki dan sistem elusi yang digunakan isokratik. Pengaturan komposisi fase gerak dilakukan secara otomatis dalam sistem KCKT.

Penyiapan Baku

Ditimbang seksama 1,0 mg daidzein dan genistein, dilarutkan dalam metanol sampai 5,0 mL. Kemudian dibuat deret konsentrasi masing-masing 20, 40, 60, 80 dan 100 µg/mL. Dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimal pada panjang gelombang 200-400 nm, sehingga diperoleh untuk daidzein 249 dan genistein 259 nm. Selanjutnya panjang gelombang maksimal tersebut digunakan untuk deteksi senyawa daidzein dan genistein secara KCKT. Profil senyawa pada kromatogram KCKT dapat diketahui berdasarkan waktu retensi dan konsentrasi zat aktif dapat diketahui berdasarkan tinggi dan luas puncak. Penetapan waktu retensi, tinggi dan luas puncak dilakukan dengan menggunakan hasil maserasi yang telah dilakukan penyaringan, disonifikasi sebelum diinjeksikan ke dalam sistem KCKT yang tercantum dibawah:

Fase diam	: Sun Fire TM C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Fase gerak	: Metanol : Air yang mengandung asam asetat glasial 0,1%(v/v) perbandingan 53 : 47
Kecepatan alir	: 1,0 mL/menit
Sistem injeksi	: Autosampler
Volume injeksi	: 10 µL
Detektor	: Photo Diode-Array (PDA)

Analisis dan Perhitungan Kadar Daidzein dan Genistein dalam sampel kedelai

Fase gerak yang digunakan disesuaikan dengan kelarutan analit yang akan dilakukan pemisahan, *Reversed phase* dilakukan karena kepolaran relatif antara fase diam dan fase gerak. Setelah dilakukan analisis menggunakan KCKT, maka akan diperoleh data luas area puncak daidzein dan genistein dari tiap-tiap sampel. Data yang diperoleh yaitu luas area kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi

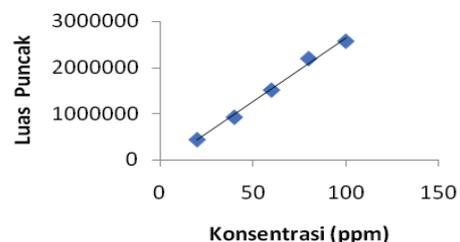
standar (sebagai sumbu X) terhadap luas area puncak kromatogram (sebagai sumbu Y), sehingga didapatkan informasi konsentrasi sesuai dengan satuan dalam regresi linear. Selanjutnya dengan memperhatikan faktor pengenceran dan berat sampel yang ditimbang, maka akan didapatkan konsentrasi daidzein maupun genistein yang ada dalam sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

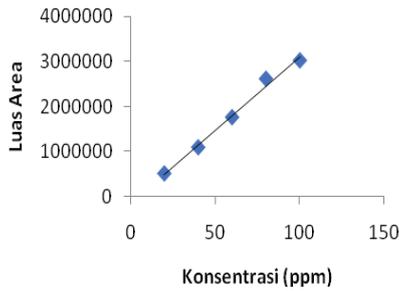
Analisis dan Perhitungan Kadar Daidzein dan Genistein dalam sampel kedelai

Hasil kromatogram baku senyawa daidzein dan genistein akan diperoleh data waktu tambat, tinggi dan luas puncak kromatogram untuk masing-masing perbandingan cairan penyari. Sistem HPLC dinyatakan baik jika nilai koefisien variasi waktu tambat $\leq 1\%$, nilai lempeng teori ≥ 2000 , sementara nilai *asymmetry factor* yang dapat diterima adalah $\leq 1,5$ (Snyder dkk., 1997).

Meode analisis dengan KCKT dilakukan untuk mengidentifikasi suatu senyawa berdasarkan waktu retensi yang sama atau mendekati waktu retensi senyawa baku yang diinjeksikan dalam kondisi sistem KCKT yang sama dengan sampel. Detektor PDA merupakan detektor UV-Vis yang mampu menampilkan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda pada sekali proses metode KCKT berjalan. Untuk sampel yang mengandung banyak senyawa masih bisa dibedakan karena tiap puncak yang terpisah mempunyai panjang gelombang yang berbeda beda. Dibandingkan dengan baku daidzein dan genistein, akhirnya detektor ini mampu mengidentifikasi senyawa target.

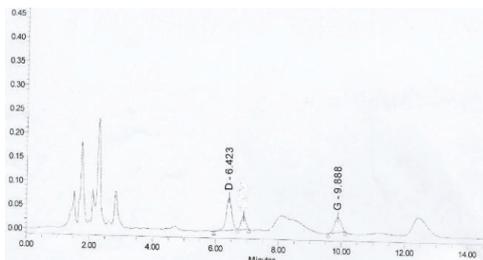


Gambar 1. Kurva Baku Daidzein Secara KCKT

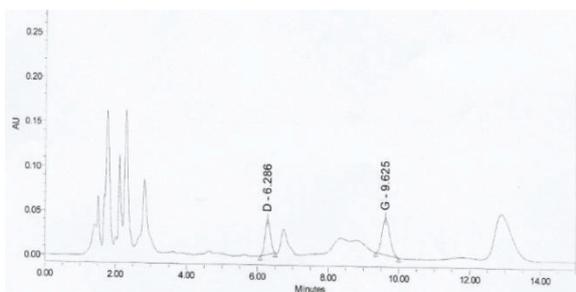


Gambar 2. Kurva Baku Genistein Secara KCKT

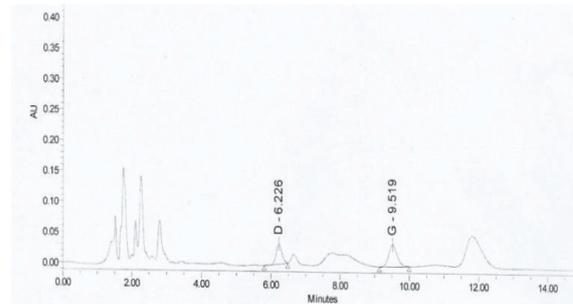
Hasil analisis sampel kedelai dengan KCKT menunjukkan bahwa pada menit awal telah muncul banyak kromatogram pada waktu retensi yang berdekatan, ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi ini masih menghasilkan sari dengan komponen kimia yang beragam, termasuk kandungan sembilan isoflavon glikosida yang bersifat lebih polar telah tersari juga menggunakan pelarut metanol (Sun dkk., 2011). Hal tersebut menunjukkan bahwa isoflavon aglikon yaitu daidzein dan genistein bersifat kurang polar dibandingkan senyawa-senyawa isoflavon yang lain. Gambar berikut ini merupakan contoh kromatogram sampel kedelai yang dimaserasi menggunakan cairan penyari metanol-air dianalisis dengan KCKT pada kondisi operasional optimumnya.



Gambar 3. Kromatogram kedelai Anjasmoro



Gambar 4. Kromatogram kedelai Argomulyo



Gambar 5. Kromatogram kedelai Gema

Perhitungan Kadar Daidzein dan Genistein dalam sampel kedelai

Panjang gelombang maksimal untuk analisis simultan daidzein dan genistein dilakukan pada 254 nm seperti yang dilakukan Isabela da Costa C'esar dkk.(2006). Data luas puncak kromatogram yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi yang diperoleh, sehingga didapatkan konsentrasi daidzein dan genistein yang terbentuk dalam satuan $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data luas puncak kromatogram tersebut kemudian dibuat perhitungan menggunakan persamaan regresi $y = 27658x - 13410$, $r = 0,991$ untuk mendapatkan kadar daidzein, sedangkan kadar genistein didapatkan dari persamaan $y = 32726x - 15917$, $r = 0,999$.

Dengan perhitungan menggunakan kurva regresi diatas maka perhitungan kadar daidzein dan genistein pada kedelai varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Gema masing-masing 18,69 mg/100 g ; 29,68 mg/100 g dan 14,15 mg/100 g sedangkan kadar genistein yaitu 23,67 mg/100 g ; 22,15 mg/100 g dan 21,22 mg/100 g. Hasil ini sesuai dengan penelitian tentang kedelai bahwa Mazur (1998) menyampaikan dari beberapa bahan pangan yang telah dianalisis, diketahui kedelai menempati urutan pertama, mengandung daidzein sebesar 10,5 - 85 mg/100 g berat kering dan genistein sebesar 26,8-120,5 mg/100 g berat kering.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan kandungan zat aktif daidzein dan genistein dalam kedelai (*Glycine max* L. Merrill) pada masing masing kedelai varietas Anjasmoro, Argomulyo dan Gema diperoleh kadar daidzein dan genistein masing-masing adalah 18,69 mg/100g dan 23,67 mg/100g; 29,68 mg/100 g dan 22,15 mg/100g; 14,15 mg/100g dan 21,22 mg/100g.

DAFTAR PUSTAKA

- Herwana, E., Setiabudy, R., Soegondo, S., Baziad, A., and Hidayat, A., 2015. Soy isoflavone supplementation increases equol-producing capability in postmenopausal women with osteopenia. *Universa Medicina*, **31**: 120–130.
- Hong, J.-L., Qin, X.-Y., Shu, P., Wang, Q., Zhou, Z.-F., Wang, G.-K., 2011. Comparative study of isoflavones in wild and cultivated soybeans as well as bean products by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and chemometric techniques. *European Food Research and Technology*, **233**: 869–880.
- Isabella da Costa César, I., Braga, F.C., Soares, C.D.V., de Aguiar Nunan, E., Pianetti, G.A., Condessa, F.A., 2006. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *Journal of Chromatography B*, **836**: 74–78.
- Kang, X., Jin, S., and Zhang, Q., 2009. Antitumor and Antiangiogenic Activity of Soy Phytoestrogen on 7, 12-Dimethylbenz [α] anthracene-Induced Mammary Tumors Following Ovariectomy in Sprague–Dawley Rats. *Journal of food science*, **74**: H237–H242.
- Kementerian Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, 2015, *Deskripsi Varietas Unggul Kedelai 1918–2014*, Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi), Malang.
- Munro, I.C., Harwood, M., Hlywka, J.J., Stephen, A.M., Doull, J., Flamm, W.G., 2003. Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition Reviews*, **61**: 1–33.
- Parida, S., Singh, T.U., Thangamalai, R., Reddy, C.E.N., Panigrahi, M., Kandasamy, K., 2015. Daidzein pretreatment improves survival in mouse model of sepsis. *Journal of Surgical Research*, **197**: 363–373.
- Pavese, J.M., Krishna, S.N., and Bergan, R.C., 2014. Genistein inhibits human prostate cancer cell detachment, invasion, and metastasis. *The American journal of clinical nutrition*, **100**: 431S–436S.
- Pitojo Setijo, 2003. *Benih Kedelai*, Kanisius, Yogyakarta.
- Ravindranath, M.H., Muthugounder, S., Presser, N., and Viswanathan, S., 2004. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Complementary and Alternative Approaches to Biomedicine*. Springer, 121–165.
- Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamón, E., García-Lafuente, A., and Martínez, J.A., 2009. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, **1216**: 2–29.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 25, 653, 644, 668, 685, 688, 705-706.
- Suthar, A.C., Banavalikar, M.M., Biyani, M.K., dan others, 2001. Pharmacological activities of genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): Part II-Anti-cholesterol activity, effects on osteoporosis & menopausal symptoms. *Indian journal of experimental biology*, **39**: 520–525.
- Sun, J., Sun, B., Han, F., Yan, S., Hua, Y., and Akio, K., 2011. Rapid HPLC method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds. *Agricultural Sciences in China*, **10**: 70–77.
- Tipkanon, S., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Suwonsichon, T., Prinyawiwatkul, W., and Xu, Z., 2010. Optimizing time and temperature of enzymatic conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soy germ flour. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**: 11340–11345.
- Wang, H. dan Murphy, P.A., 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, **42**: 1666–1673.
- Yatsu, F.K., Koester, L.S., and Bassani, V.L., 2016. Isoflavone-aglycone fraction from *Glycine max*: a promising raw material for isoflavone-based pharmaceutical or nutraceutical products. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **26**: 259–267.
- Zhao, X.-H., Yang, Z.-Q., Bao, L.-B., Wang, C.-Y., Gong, J.-M., Fu, C.-B., 2014. Daidzein enhances intramuscular fat deposition and improves meat quality in finishing steers.