

KEDELAI HITAM (*Glycine soja*) TERHIDROLISIS SEBAGAI SUMBER FLAVONOID TOTAL

Muammar Fawwaz¹, Diana Syam Muliadi, A. Muflihunna

Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia

¹muammar.fawwaz@umi.ac.id

ABSTRACT

Flavonoids are natural phenolic compounds found in almost all plants that have potential as antioxidants. Based on previous research, stating that black soybeans contain compounds of flavonoids. This analysis aims to establish the levels of total flavonoids on ethanol extract of black soybean hydrolyzed. Determination of total flavonoid levels of ethanol extract of black soybean hydrolyzed has been made with UV-Vis spectrophotometry method. Black soybean hydrolyzed using HCl and extracted using ethanol 70%. The extracts obtained were analyzed qualitative by the method of coloring reaction and quantitative analysis using UV-Vis spectrophotometer, where quercetin is used as a reference standard. Measurements were performed at maximum wavelength of 444.45 nm. The research showed the average level of total flavonoids is 11.83 mgQE / g extract or 1,163 %. In conclusion extract of black soybean hydrolyzed rich of total flavonoids, and it is related to the activity as antioxidant.

Keywords: Flavonoid, black soybean, hydrolysis, UV-Vis Spectrophotometry.

I. PENDAHULUAN

Di Indonesia jumlah varietas kedelai hitam yang yang dikembangkan sangat minim. Padahal dari segi syarat tumbuh kedelai hitam (*Glycine soja*) lebih cocok ditanam di 7 daerah tropis. Cikuray dan Merapi merupakan dua varietas unggul kedelai hitam yang memiliki kadar protein cukup tinggi, akan tetapi ukuran bijinya tergolong kecil. Sedangkan pada Mallika, varietas kedelai hitam yang dilepas tahun 2007, memiliki biji kecil (9,50 g/100 biji) dengan kadar protein lebih rendah (37%) (Ginting E, 2009).

Kedelai hitam memiliki kandungan protein 40,4g/100g dan antioksidan yakni antosianin dan isoflavan. Kandungan total polifenol, flavonoid dan antosianin yang lebih tinggi daripada kedelai kuning, yakni masing-masing 6,13 mg/g ; 2,19 mg/g ; 0,65 mg/g. Isoflavan merupakan antioksidan golongan flavonoid yang biasa terdapat pada kedelai dan memiliki efek bermanfaat pada penderita Diabetes Melitus dengan meningkatkan serum insulin dan komponen insulin pankreas (Mueller, 2012).

Kedelai memiliki kandungan isoflavan (golongan flavonoid) begitu juga kedelai hitam. Isoflavan merupakan suatu zat dalam kedelai yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan serta mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas. Kedelai hitam memiliki kandungan antioksidan lebih tinggi dibandingkan kedelai kuning (Dajanta, 2013).

Isoflavan jenis genistein pada kedelai hitam (*Glycine soja*) sebesar 4.99% (b/b) pada ekstrak kedelai yang telah mengalami hidrolisis secara enzimatis dengan menggunakan bakteri probiotik *Lactobacillus bulgaricus*, begitupula penelitian selanjutnya yang menggunakan bakteri *Lactobacillus*

acidophilus diperoleh kadar genistein sebesar 3.46% (b/b) (Fawwaz, 2014).

Kadar flavonoid total yang terkandung dalam Kedelai hitam sebesar 1,78 mg RE /g yang jelas lebih tinggi dari kadar flavonoid total yang terkandung pada kedelai kuning yaitu sebesar 0,57 mg RE /g (Shun-Cheng Ren, 2011). Kadar genistein pada ekstrak biji kedelai hitam terhidrolisis sebanyak 6,574% dan non-hidrolisis sebanyak 3,007% (Fawwaz, 2016).

Berdasarkan uraian diatas maka dilakukan penelitian mengenai penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol kedelai hitam (*Glycine soja*) terhidrolisis dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas (*pyrex*), magnetic stirrer (*As One*), mikropipet (*Dragon Lab*), oven (*memmert*), seperangkat alat maserasi, spektrofotometer ultraviolet-visible (*Thermo Scientific E.201*), timbangan analitik (*Ohaus*), dan timbangan Neraca (*Ohaus*).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, aluminium klorida 10%, aquades, FeCl₃, ekstrak dari kacang kedelai hitam (*Glycine soja*), etanol 70%, etanol 96%, (p.a, Merck), HCl 2 N (p.a, Merck), kalium asetat 1 M (p.a, Merck), kuersetin (p.a, Merck), dan serbuk magnesium.

B. Pengambilan dan pengolahan Sampel

Sampel kedelai hitam (*Glycine soja*) dibersihkan dari kulit ari yang melekat pada kacang kedelai menggunakan air hangat. Setelah dibersihkan,

sampel kedelai hitam dikeringkan dalam wadah bersih dan dihaluskan, kemudian sampel kedelai hitam (*Glycine soja*) siap untuk di ekstraksi.

C. Metode Ekstraksi

Biji kedelai dihaluskan dan ditambahkan cairan penyari etanol 70% dengan perbandingan 1:2 g/mL, hasil campuran ini kemudian dipanaskan pada suhu 90°C, diaduk secara konstan selama 2 jam. Campuran dipisahkan dari zat terlarutnya menggunakan vakum filter. Filtrat ditambahkan 37% HCl hingga pH campuran mencapai 3. Campuran ini kemudian dipanaskan pada suhu 90°C, diaduk secara konstan selama 2 jam. Campuran selanjutnya ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:1 mL/mL dan diaduk secara konstan pada suhu kamar. Endapan yang terbentuk dipisahkan menggunakan vakum filter. Hasil endapan yang diperoleh kemudian disimpan didalam Freezer (Zhang, 2007).

D. Analisis Kualitatif Flavonoid

Sebanyak 100 mg ekstrak ditambahkan etanol 96%. Kemudian dipanaskan. Lapisan atas dipipet dan ditambahkan dengan HCl pekat 2 N dan serbuk Mg. Flavonoid: terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Ditjen POM, 1989).

Sebanyak 1 gram sampel diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 mL larutan uji, kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃. Terbentuknya warna hijau atau hijau biru menunjukkan adanya senyawa flavonoid dalam bahan (Harbone, 1987).

E. Analisis Kuantitatif Flavonoid

1. Pembuatan Kalium asetat 1 M

Ditimbang sebanyak 0,982 gram Kalium asetat kemudian dilarutkan dengan air suling hingga 10 mL.

2. Pembuatan Aluminium klorida 10%

Ditimbang sebanyak 1 gram Aluminium klorida kemudian dilarutkan dengan air suling hingga 10 mL.

3. Pembuatan Larutan Stok Kuersetin

Ditimbang sebanyak 10 mg kuersetin kemudian dilarutkan dengan etanol 96% hingga 10 mL (1000 ppm). Kemudian dipipet sebanyak 0,5 mL

dan dicukupkan dengan etanol 96 % hingga 5 mL (100 ppm). Kemudian dilakukan beberapa pengenceran lagi dengan beberapa seri konsentrasi.

Untuk membuat konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm masing-masing larutan stok dipipet 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL dan 0,7 mL, lalu dicukupkan dengan etanol 96% sampai volume akhir 5 mL (Chang *et al.*, 2002).

4. Penentuan λ_{maks}

Panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan *running* larutan kuersetin pada range panjang gelombang 400-600nm. Absorbansi maksimum yang diperoleh pada panjang gelombang tertentu merupakan panjang gelombang maksimum kuersetin.

5. Pengukuran larutan standar kuersetin

Pada seri konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm masing-masing dipipet sebanyak 1,5 mL dan ditambahkan dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 mL larutan AlCl₃ 10%, dan 0,1 Kalium asetat 1 M, kemudian dicukupkan hingga 5 mL aquades dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruangan. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 444,45 nm, dengan larutan blanko campuran 1,5 mL etanol 96%, 0,1 mL AlCl₃ dan 0,1 mL Kalium asetat, selanjutnya dihomogenkan dan dicukupkan dengan aquades hingga 5,0 mL. Kemudian dibuat kurva baku dan didapatkan persamaan garis lurus (Chang *et al.*, 2002).

6. Pentapan Kadar Flavonoid Total

Kandungan flavonoid total ditentukan sesuai dengan prosedur Chang (2002) menggunakan kuersetin sebagai standar referensi. Ditimbang ekstrak Kedelai terhidrolisis 5 mg dilarutkan dalam etanol 96% hingga 5 mL (1000 ppm). Larutan uji (1,5 mL) ditambahkan dengan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 mL Aluminium klorida 10%, 0,1 mL Kalium asetat 1 M, dan di cukupkan hingga 5 mL dengan aquades, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan. Selanjutnya, absorbansi sampel tersebut diukur pada panjang gelombang 444,45 nm. Larutan dibuat dalam 3 kali replikasi sehingga kadar flavonoid yang di peroleh didapat sebagai ekuivalen kuersetin/g ekstrak.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Tabel 1. Hasil Analisis Kualitatif ekstrak etanol kedelai hitam terhidrolisis

Sampel	Pereaksi	Warna	Ket
Ekstrak Etanol Kedelai Hitam Terhidrolisis	Serbuk Mg + HCl pekat	Merah	(+)
	FeCl ₃	Hijau keruh	(+)

Keterangan:

(+) = Menunjukkan adanya flavonoid

Tabel 2. Hasil penetapan kadar flavonoid total % (b/b) pada ekstrak etanol kedelai hitam terhidrolisis.

Replikasi	Absorbansi (y)	Kandungan Flavonoid total awal (mg/L)	Kandungan Total Flavonoid (mgQE/g Ekstrak)	Rata-rata Kandungan Flavonoid total mgQE/g	% Kadar Flavonoid
1	0,474	11,9444	11,485		
2	0,496	12,5555	11,8448	11,8317	1,1837%
3	0,517	13,1388	12,1655		

B. Pembahasan

Kedelai hitam adalah salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat berasal dari genus *Glycine*. Tumbuhan ini mempunyai peranan yang sangat penting dalam budaya Asia baik sebagai makanan, minuman maupun sebagai obat. Khasiat yang memiliki kadar protein cukup tinggi, akan tetapi ukuran bijinya tergolong kecil.

Sebagian besar kandungan Flavonoid total dalam kedelai hitam ataupun jenis-jenis lain dari produk olahan kedelai hitam terdapat dalam bentuk glikosida yang berkonjugasi dengan mengikat satu molekul gula. Untuk menarik senyawa aglikon yang terkandung dalam kacang kedelai hitam perlu dilakukan ekstraksi hidrolisis. Pada penelitian ini metode ekstraksi hidrolisis yang digunakan adalah cara kimia dengan menggunakan salah satu bahan kimia yaitu asam (HCl) yang dapat mengurai glikosida menjadi glikon dan aglikon.

Kacang kedelai hitam yang sudah halus ditimbang sebanyak 125 gram. Kemudian sampel ditambahkan cairan penyari etanol 70% dengan perbandingan 1:2 g/mL, agar sampel terendam semua. Pelarut etanol dapat menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar dari jaringan sel sampel, etanol tidak menyebabkan pembengkakan pada membrane sel dan memperbaiki stabilitas bahan terlarut. Proses ekstraksi ini dipanaskan pada suhu 90°C, diaduk secara konstan selama 2 jam untuk menarik senyawa kimia dari

sampel secara sempurna. Campuran dipisahkan dari zat terlarutnya menggunakan vakum filter.

Filtrat ditambahkan 37% HCl hingga pH campuran mencapai 3 untuk mengurai glukosa menjadi aglikon. Campuran ini kemudian dipanaskan pada suhu 90°C, diaduk secara konstan selama 2 jam. Campuran selanjutnya ditambahkan aquadest dengan perbandingan 1:1 mL/mL dan diaduk secara konstan pada suhu kamar. Pada saat ditambahkan aquades, campuran langsung berubah menjadi keruh keputihan yang menandakan proses hidrolisis berhasil, dimana komponen glikon larut dalam air sementara aglikon tidak larut sehingga membentuk endapan. Endapan yang terbentuk dipisahkan menggunakan vakum filter. Kemudian hasil endapan di simpan didalam Freezer. Dari proses tersebut diperoleh berat ekstrak kedelai terhidrolisis sebanyak 1,5975 gram dengan rendamen sebanyak 1,278%. Rendamen merupakan persentase bagian bahan baku yang dapat digunakan atau dimanfaatkan dengan total bahan baku. Rendamen yang semakin besar menandakan bahwa bahan baku tersebut memiliki peluang untuk dimanfaatkan lebih besar dibandingkan bahan baku yang memiliki nilai rendamen rendah atau kecil.

Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui komponen kimia pada tanaman dengan menggunakan reaksi warna dengan pereaksi tertentu. Uji flavonoid ekstrak etanol kedelai hitam terhidrolisis dilakukan dengan dua pengujian yaitu: pertama, diujikan dengan serbuk Mg ditambahkan beberapa tetes HCl pekat,

terbentuk warna merah. Kedua, diujikan dengan FeCl_3 terbentuk warna hijau tua atau hijau kotor. Hasil identifikasi menunjukkan ekstrak kedelai terhidrolisis positif mengandung senyawa flavonoid.

Uji kuantitatif flavonoid total dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk mengukur seberapa besar kandungan flavonoid yang terdapat pada ekstrak etanol kedelai terhidrolisis, dimana Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis. Pada pengujian Spektrofotometri UV-Vis digunakan larutan standar kuersetin. Yang terlebih dahulu dilakukan *running* dari panjang gelombang 400-600 nm. Hasil *running* menunjukkan panjang gelombang maksimal standar baku kuersetin berada pada panjang gelombang 444,45 nm. Alasan digunakan panjang gelombang maksimal dalam pengukuran spektrofotometri yaitu karena pada panjang gelombang maksimal memiliki kepekaan maksimal dimana perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar. Selain itu pada panjang gelombang maksimal bentuk kurva absorbansi memenuhi hukum Lambert-Beer.

Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan linieritas antara absorbansi dengan konsentrasi larutan analit dan berbanding terbalik dengan transmitansi. Larutan standar kuersetin dibuat dalam beberapa seri konsentrasi yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm. Pada rangkaian seri konsentrasi tersebut, masing-masing ditambahkan 1,5 mL etanol 96% yang berfungsi sebagai pelarut dan ditambahkan 0,1 mL aluminium klorida 10% yang berfungsi untuk memberikan efek batokromik, sehingga reaksi warna yang terbentuk dapat diamati dan dapat diukur pada daerah visible. Kemudian ditambahkan 0,1 mL kalium asetat 1 M, yang berfungsi sebagai penstabil, agar efek batokromik yang telah terjadi dapat dipertahankan. Lalu kemudian dicukupkan dengan penambahan aquades hingga 5 mL, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan dengan tujuan agar reaksi antara larutan standar kuersetin dan pereaksi dapat berlangsung dengan sempurna. Kemudian diukur masing-masing seri konsentrasi tersebut pada panjang gelombang maksimum 444,45 nm. Hasil absorbansi dari rangkaian konsentrasi yang tercatat kemudian dihasilkan kurva kalibrasi linear kuersetin yaitu $y = 0.037x + 0.039$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) yang diperoleh sebesar 0.999 (gambar 4).

Begitupula pada pengukuran absorbansi sampel ekstrak etanol kedelai hitam terhidrolisis masing-masing dibuat dalam tiga replikasi, dimana larutan sampel ditambahkan AlCl_3 terjadi pembentukan kompleks warna flavonoid dan AlCl_3 yang berwarna kuning yang memberikan efek batokromik. Selain itu digunakan pula pereaksi kalium asetat dan aquades sebagai pentabil agar didapat

larutan berwarna kuning konstan (gambar 8). Efek batokromik pada sampel diharapkan mampu membuat senyawa flavonoid terdeteksi secara spesifik pada spektrofotometri sehingga hasil pengukuran lebih akurat. Kuvet yang digunakan dalam analisis ini adalah kuvet kuarsa yang terbuat dari silika memiliki kualitas yang lebih baik. Hal ini disebabkan karena kuvet terbuat dari kaca dan plastik yang dapat menyerap UV sehingga penggunaannya hanya pada spektrofotometer sinar tampak (VIS). Kuvet kuarsa biasanya berbentuk persegi panjang dengan lebar 1 cm.

Dari hasil penelitian ini kandungan flavonoid total ekstrak etanol kedelai terhidrolisis adalah 11,638 mgQE/g ekstrak, yang berarti tiap berat ekstrak etanol kedelai hitam terhidrolisis terkandung 11,638 mg atau 1,163% flavonoid yang setara dengan kuersetin.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa, kadar flavonoid total dari ekstrak etanol kedelai hitam terhidrolisis yaitu 11,638 mgQE/g ekstrak atau 1,163 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, S., 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. **13**(2): 126-136.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, **10**(3): 178-182.
- Cheng, S. R., Liu, Z. L., Wang, P., 2011. Proximate composition and flavonoids content and in vitro antioxidant activity of 10 varieties of legume seeds grown in China. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. **6**(2), pp. 301-308.
- Dajanta, K., Janpum, P. & Leksing, W. 2013. Antioxidant Capacities, Total Phenolics and Flavonoids in Black and Yellow Soybeans Fermented by *Bacillus subtilis*: A Comparative Study of Thai Fermented Soybeans (thunao). *International Food Research Journal*. Vol. 20 (6): 3125-3132.
- Ditjen POM., 1989. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Departemen Kesehatan RI: Jakarta.
- Fawwaz, M., Wahyudin, E., Djide, N.M., 2014. The Effect of Isoflavon Soybean (*Glycine max*(L) Merrill) Fermentation Result by *Lactobacillus bulgaricus* Toward In Vitro Osteoblast Cell Proliferation, *International Journal of PharmTech*, ISSN: 0974-4304.

- 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.
- Ginting, E. dan M.M, Adie., 2007. *Sifat fisik dan kimia lima galur kedelai hitam serta kualitas kecap yang dihasilkan*. hlm. 495–510. Bogor.
- Harbone, J.B., 1987. *Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisa tumbuhan*. Terbitan Kedua. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. ITB: Bandung.
- Mueller. 2012. Soy intake and risk of type 2 diabetes mellitus in Chinese Singaporeans. Soy intake and risk of type 2 diabetes. *Eur J nutr.*; 51(8): 1022-40.