

Profil Isoflavon Sebagai Fitoestrogen pada Berbagai Leguminoceae Lokal

Isoflavones Profile as Phytoestrogens in Various Local Leguminoceae

Cicilia Novi Primiani^{1*}, Joko Widiyanto¹, Winda Rahmawati¹, Gabriella Chandrakirana²

¹ Biology Education, Faculty of Mathematics and Science, PGRI Madiun University, Indonesia
Jl. Setiabudi No. 85 Madiun 63118, Indonesia

²Biology Department, Faculty of Science, Brawijaya University, Indonesia
Jl Veteran, Ketawanggede, Malang, 65145, Indonesia

*Corresponding author: primiani@unipma.ac.id

Abstract: Isoflavones are chemical compounds with estrogen-like structures, and are found in many Leguminoceae plants. The isoflavone compounds present in plants are often called phytoestrogen compounds. This study aims to analyze isoflavone compounds in local Leguminoceae seeds, is *Cajanuscajan L.*, *Vignaradiata*, *Arachishypogaea*, *Phaseolusvulgaris L.* and *VignaunguiculataL.* Analytical method using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with control system: SCL 10 AVP, solvent delivering unit: LC 20 AT, Column oven: CTO 10 ASVP, detector: SPD 20 A UV Vis Detector, Column: C 18,5 μm Shimadzu 120 x 4.6 mm, Column temperature 25^o C, Mobile phase: A. Phosphoric acid in water 0,1% B. Acetonitrile 25%, Mobile phase method: Isocratic method, Flow rate: 1 ml/min, Injection volume: 5 μl , Wavelength detector: UV 280 nm, Run time 40 min. The results showed the presence of daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, dan genistein compounds. *probing prompting* feasible used to improve student learning outcomes MTs Al-Musthofawiyah Palang.

Keywords: leguminoceae, isoflavon, fitoestrogen, HPLC

1. PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sumber daya alam hayati kacang-kacangan lokal dengan keragaman potensi yang dapat dikembangkan dalam bidang pangan dan kesehatan. Keragaman kacang-kacangan lokal merupakan potensi sebagai sumber diversifikasi pangan, yang diharapkan dapat meningkatkan ketahanan pangan. Kacang-kacangan lokal di Indonesia merupakan tumbuhan famili Leguminoceae/Fabaceae antarlain kedelai, buncis, bengkuang, kacang hijau, kacang panjang, kacang merah, kacang tanah, kacang kapri, kacang gude, kacang merah, kacang tolo, kacang tunggak, dan masih banyak lagi. Potensi kacang-kacangan lokal tersebut belum dikembangkan secara optimal sehingga pemanfaatannya relatif terbatas.

Kedelai merupakan spesies Leguminoceae yang dikenal oleh masyarakat, sehingga kedelai banyak dibudidayakan dan dikembangkan dalam bidang pangan. Kebutuhan kedelai untuk masyarakat tidak sebanding dengan produktivitasnya. Kebutuhan kacang kedelai di Indonesia semakin meningkat, sementara produktivitas kedelai belum mencukupi, oleh karena itu masih perlu mengimpor kacang kedelai.

Leguminoceae lainnya belum dikembangkan secara maksimal. Kacang-kacangan lokal masih terbatas dimanfaatkan sebagai bahan pangan sayuran yang dimanfaatkan untuk kebutuhan sehari-

hari. Tumbuhan Leguminoceae lokal perlu dikembangkan disamping kedelai, sehingga kacang-kacangan lokal lainnya dapat berkembang setara dengan kedelai. Kandungan nilai gizi Leguminoceae sangat baik sebagai sumber nutrisi bermanfaat bidang kesehatan. Salah satu kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada Leguminoceae adalah Isoflavon. Isoflavon merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder dengan beragam senyawa turunannya. Isoflavon merupakan fitokimia yang terdistribusi secara meluas pada tanaman khususnya famili Leguminoceae/Fabaceae (Prasad *et al.*, 2010). Isoflavon sebagai salah satu metabolit sekunder pada tumbuhan yang tersebar di berbagai bagian tubuh tumbuhan. Isoflavon pada tumbuhan atau produk olahan makanan biasanya berada sebagai bentuk derivat glikosida (Wang & Murphy, 1994). Isoflavon merupakan salah satu metabolit sekunder yang tersebar di berbagai bagian tubuh tumbuhan sebagai bentuk glikosida 6''-O- malonyl-7-O- β -D-glucoside dan 6''-O-acetyl-7-O- β -D-glucosida yang secara biologis inaktif (Wiseman *et al.*, 2002).

Struktur kimia isoflavon mirip dengan 17 β estradiol, Ko (2014). sehingga mempunyai sifat fisiologis dalam sistem tubuh mirip estrogen. Berdasarkan sifat fisiologisnya, maka berbagai penelitian isoflavon khususnya isoflavon pada tumbuhan semakin berkembang terutama manfaatnya dalam bidang pangan dan kesehatan.

Teknik analisis dan identifikasi berbagai senyawa derivat isoflavon juga telah banyak dilakukan, khususnya metode Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS/MS) (Ha *et al.*, 2006). Hasil penelitian isoflavon telah banyak dimanfaatkan dan telah dikomersialkan, misalnya sebagai produk suplemen makanan dan suplemen kesehatan. Tujuan penelitian adalah menganalisis isoflavon pada biji leguminosae antara lain: kacang gude (*Cajanus cajan* L.), kacang hijau (*Vigna radiata*), kacang tanah (*Arachis hypogaea*), kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan kacang tunggak (*Vigna unguiculata* L.).

2. METODE

Senyawa standar isoflavon (*genistin*, *daidzin* dan *glisitin*, Daidzein, Genistein, glycitein), akuabides, asam acetat, HPLC grade, acetonitrile, akuades. Perangkat HPLC, Timbangan digital, labu takar, syringe HPLC, Penyaring vaccum, degassing, pipet ukur. Penentuan prosedur diadopsi dan dikembangkan berdasar pada Murphy (1980) dan Eldridge (1982).

1.1 Persiapan larutan standar

Larutan standar meliputi daidzein dan genistein dibuat dalam seri standar 0, 1, 5, 10, 25, 50 (ppm). Larutan dibuat menggunakan akuabides dalam 100 ml.

1.2 Persiapan sampel

Sampel padat 5-10 g, diletakkan dalam mortal, kemudian dilarutkan dalam akuabides 100 ml. Larutan dihomogenisasi dengan vortex selama 10 menit. Larutan didiamkan selama 30 menit, kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 42, selanjutnya diambil filtratnya. Filtrat yang telah diperoleh disentrifuge 8000 rpm selama 20 menit untuk diambil supernatan. Larutan supernatan diambil 1 ml, dilarutkan dengan akuabides 10 ml.

1.3 Persiapan HPLC

Sebelum diinjek ke HPLC (semua larutan baik larutan standar, larutan sampel) dan fase gerak (eluen) dilakukan proses penyaringan dengan membran PTFE dan *degassing*. Larutan standar dan larutan sampel sebelum diinjek dilakukan penyaringan dengan membran selulosa nitrat pada *syringe* injektor HPLC. Perangkat alat HPLC dilakukan pengaturan pada parameter sebagai berikut: a) perangkat HPLC Shimadzu, b) *system controller* SCL 10 AVP, c) *solvent delivering unit* LC 20 AT, d) *column oven* CTO 10 ASVP, e) *detector* SPD 20A UV VIS *detector*, f) *column* C18 5 μ m 10 x 4,6 mm Shimadzu, g) *column temperature* 25 $^{\circ}$ C, h) *mobile phase* Acetonitrile 20% dalam acetic acid 3%, i) *mobile phase method* isocratic, j) *flow rate* 0,8 ml/min, k) *injection volume* 20 μ l, l) *wavelength detector* 261 nm, m) *run*

time 60 minutes, n) *software* HPLC *lab solution* ver 5.6.1. *for windows*

1.4 Pelaksanaan analisis

Beberapa langkah yang dilakukan dalam pelaksanaan analisis adalah: a) menyalakan komputer (PC), pompa, controller, oven, dan detector, b) menjalankan aplikasi *lab solution* pada PC, jika semua perangkat terhubung dengan baik, maka pada icon pompa, controller, oven dan detector menunjukkan posisi "on", c) klik pompa sehingga icon pompa menyala dan tunggu sampai 20 menit, d) lakukan *baseline* sampai tercapai kondisi "pass", jika belum tercapai "not pass", perlu mengulangi lagi sampai tercapai status "pass", e) melakukan injeksi sampel dengan *syringe* pada injektor dan klik icon "inject sample" pada layar monitor komputer, f) menunggu 60 menit untuk "run time" sehingga akan terbentuk grafik pada monitor grafik, g) setelah waktu *run time* habis, otomatis HPLC akan "stop" dan *save* hasil yang diperoleh, h) melakukan tahapan e sampai g pada sampel-sampel yang lain atau standar, i) setelah semua selesai, lakukan tahapan "post run"

1.5 Pelaksanaan post run

Beberapa langkah yang dilakukan dalam pelaksanaan analisis adalah: a) menjalankan aplikasi *lab solution*, klik icon "post run", b) mencari *file* yang telah tersimpan pada PC dengan cara klik *file*, c) membuka *file* standar d) melakukan penghitungan persamaan regresi standar dengan cara klik *calculation* kemudian *save* hasil yang diperoleh, e) melakukan penghitungan dengan cara klik "calculation" kemudian mengisi kolom seperti massa sampel, pengenceran, lokasi *file regresi* standar dan klik "run" dan secara otomatis komputer akan menghitung kadar dari kromatogram yang diperoleh, f) melakukan penyimpanan *file* dengan cara klik *file* kemudian klik *save*.

1.6 Pelaksanaan penyimpanan file

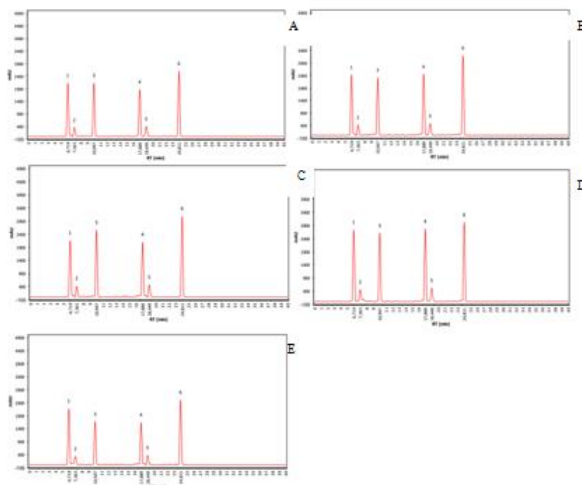
File data kromatogram yang diperoleh, selanjutnya disimpan dengan menjalankan aplikasi *lab solution* dengan cara klik icon "post run" dan mencari *file* yang telah tersimpan pada pc dengan cara klik *file*, selanjutnya melakukan *save as* dalam bentuk *pdf*

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis HPLC, profil senyawa isoflavon pada kacang gude kacang hijau kacang tanah, kacang merah dan kacang tunggak terdapat pada data kromatografi dengan spesifikasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dengan sistem kontrol: SCL 10 AVP, solvent delivering unit: LC 20 AT, Column oven: CTO 10 ASVP, detector: SPD 20 A UV Vis Detector, Column: C 18,5 μ m Shimadzu 120 x 4.6 mm, Column temperature 25 $^{\circ}$ C, Mobile phase: A. Phosphoric acid in water 0,1% B. Acetonitrile 25%, Mobile phase method: Isocratic method, Flow rate: 1 ml/min, Injection volume: 5 μ l, Wavelength detector:



UV 280 nm, Run time 40 min. Hasil kromatogram lima spesies Leguminosae lokal seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. HPLC kromatogram A Kromatogram isoflavon kacang gude, B. Kromatogram isoflavon kacang hijau, C. Kromatogram isoflavon kacang tanah, D. Kromatogram isoflavon kacang merah, E. Kromatogram isoflavon kacang tunggak.

Senyawa isoflavon pada kelima tumbuhan Leguminosae (kacang gude, kacang hijau, kacang tanah, kacang merah, dan kacang tunggak) dianalisis secara kimiawi menggunakan metode HPLC. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) merupakan metode analisis kimiawi dengan prinsip kromatografi. Kromatografi merupakan suatu teknik dengan prinsip pemisahan molekul berdasarkan padaperbedaan pola gerak (pergerakan) molekul antara fase gerak dan fase diam. Prinsip kromatografi adalah melakukan pemisahan komponen berupa molekul yang berada pada larutan menggunakan kolom. Molekul yang terlarut dalam fase gerak, akan melewati kolom yang merupakan fase diam. Molekul yang memiliki ikatan kuat dengan kolom akan cenderung bergerak lebih lambat dibandingkan molekul yang berikatan lemah. Berbagai komponen senyawa yang terelusi dari kolom, komponen tersebut dapat dianalisis dengan menggunakan detektor.

Hasil uji hplc kromatogram menunjukkan bahwa kacang gude, kacang hijau, kacang tanah, kacang merah, dan kacang tunggak mengandung senyawa isoflavon daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, dan genistein dengan kadar bervariasi. Perbedaan kadar masing-masing senyawa isoflavon mengidentifikasi bahwa tumbuhan kacang-kacangan lokal tersebut mengandung senyawa isoflavon dengan kadar yang berbeda. Genistein merupakan isoflavon dengan kadar tertinggi pada masing-masing leguminosae tersebut. Hasil kromatogram tabel.

Tabel 1. Isoflavon Pada Berbagai Spesies Leguminosae

Sa mp el	Komponen isoflavon (µg/g)					
	daid zin	glyc itin	genis tin	daid zein	glyc itein	genis tein
Kac ang hija u	173, 6126	33,7 717	226, 8455	271, 5286	45,1 973	363, 6071
Kac ang mer ah	95,0 1581	36,0 717	255, 6525	3058 7114	48,6 400	341, 1278
Kac ang tun gga k	154, 9999	25,8 780	163, 9516	180, 0304	34,2 728	284, 5398
Kac ang gud e	151, 9717	28,4 248	209, 1406	206, 9256	38,2 727	294, 7539
Kac ang tana h	153, 4744	32,9 633	251, 2331	229, 9582	43,6 436	350, 1609

Sumber: data kromatografi

Isoflavon merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder, banyak ditemukan dalam berbagai spesies tumbuhan Leguminosae/Fabaceae di seluruh dunia. Isoflavon pada berbagai tumbuhan ditemukan dalam bentuk glikosida (Wang dan Murphy, 1994). Isoflavon dalam sirkulasi darah berada dalam bentuk aglikon dan konjugat sulfat, sebagian besar diekskresikan dalam bentuk konjugat glukuronat dan konjugat sulfat dalam urin serta sedikit dalam sirkulasi enterohepatik (Setchell, 1995; Bouker dan Clarke, 2000).

Berdasarkan struktur kimia isoflavon menyerupai struktur kimia 17 β estradiol (Ko, 2014), serta mampu berikatan dengan reseptor estrogen pada ER α dan ER β (Totta *et al.*, 2005; Mense *et al.*, 2007). Ikatan isoflavon dengan reseptor estrogen menyebabkan isoflavon memiliki aktivitas estrogenik di dalam tubuh (Dweck, 2006; Mense *et al.*, 2007; Nynca *et al.*, 2009). Senyawa isoflavon sebagai kelompok senyawa fitoestrogen meskipun senyawa tersebut bukan hormon tetapi karena strukturnya mirip dengan 17 β estradiol mampu menduduki reseptor estrogen dan mampu menimbulkan efek layaknya estrogen endogen sendiri (Glazier dan Bowman, 2001). Struktur dan sifat kimia isoflavon yang mirip hormon estrogen, maka senyawa isoflavon sering disebut sebagai fitoestrogen (Nilsson *et al.*, 2001).

Sifat-sifat estrogenik isoflavon dapat dianalisis berdasarkan berbagai hasil penelitian. Hasil-hasil penelitian telah banyak dipublikasikan bahwa senyawa isoflavon beserta turunannya memiliki potensi pada organ tubuh hasil-hasil penelitian telah menyebutkan bahwa senyawa-senyawa fitoestrogen mempunyai banyak manfaat bagi kesehatan. Hasil penelitian primiani, (2018) menyatakan bahwa kacang gude (*cajanus cajan* L. Mill sp.) Dapat digunakan sebagai estrogen alami pada tikus betina, dengan ditandai dengan terjadinya proliferasi epitel vagina dan uterus. Kacang kedelai dan famili leguminosae lainnya telah diteliti dapat mencegah terjadinya rapuh tulang dan dapat digunakan sebagai antioksidan (Vamaguchi dan Weitzmann, 2009). Hasil penelitian mengandung genistein dan daidzein, sebagai antikanker mamae (sukanya dan Gayathri, 2014).

4. SIMPULAN

Simpulan hasil penelitian menunjukkan bahwa kacang gude (*cajanus cajan* L.), kacang hijau (*vigna radiata*), kacang tanah (*arachis hypogaea*), kacang merah (*phaseolus vulgaris* L.) Dan kacang tunggak (*vigna unguiculata* L.) Dengan metode hplc mengandung senyawa turunan isoflavon daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, dan genistein.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada bapak Muhammad Arisandy yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini

6. DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, Bouker, K. B., & Hilakivi-Clarke, L. (2000). Genistein: does it prevent or promote breast cancer?. *Environmental Health Perspectives*, 108(8), 701.
- Dweck, A. C. (2006). Isoflavones, phytohormones and phytosterols. *Journal of applied cosmetology*, 24(1), 17.
- Eldridge, A. C. (1982). High-performance liquid chromatography separation of soybean isoflavones and their glucosides. *Journal of chromatography. A*, 234(2), 494-496.
- Glazier, M. G., & Bowman, M. A. (2001). A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Archives of internal medicine*, 161(9), 1161-1172.
- Ha, H., Lee, Y. S., Lee, J. H., Choi, H., & Kim, C. (2006). High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in medicinal herbs. *Archives of pharmacal research*, 29(1), 96.
- Ko, K. P. (2014). Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(17), 7001-7010.
- Murphy, P. A. (1981). Separation of genistin, daidzin and their aglucones, and coumesterol by gradient high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 211(1), 166-169.
- Mense, S., Chhabra, J., & Bhat, H. (2007). Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanism of action.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., ... & Gustafsson, J. Å. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*, 81(4), 1535-1565.
- Nynca, A., Jablonska, O., Slomczynska, M., Petroff, B. K., & Ciereszko, R. E. (2009). Effects of phytoestrogen daidzein and estradiol on steroidogenesis and expression of estrogen receptors in porcine luteinized granulosa cells from large follicles. *Acta physiologica Polonica*, 60(2), 95.
- Prasad, S., Phromnoi, K., Yadav, V. R., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta medica*, 76(11), 1044-1063.
- Primiani, C. N. (2018, May). Estrogenicity of the isoflavone genistein pigeon pie seeds (*Cajanus cajan* L. Mill sp.) on reproductive organs in rat. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1025, No. 1, p. 012061). IOP Publishing.
- Setchell, K. D. R. (1995). Non-steroidal estrogens of dietary origin: possible roles in health and disease, metabolism and physiological effects. In *Proc. Nutr. Soc. NZ* (Vol. 20, pp. 1-21).
- Sukanya, S., & Gayathri, G. (2014). Variability in the distribution of daidzein and genistein in legume sprouts and their anticancer activity with mcf-7 breast cancer cells. *Acad J Cancer Res*, 7, 173-8.
- Totta, P., Acconcia, F., Virgili, F., Cassidy, A., Weinberg, P. D., Rimbach, G., & Marino, M. (2005). Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor- β in cultured human cancer cells. *The Journal of nutrition*, 135(11), 2687-2693.
- Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(8), 1666-1673.
- Wiseman, H., Casey, K., Clarke, D. B., Barnes, K. A., & Bowey, E. (2002). Isoflavone aglycon and glucoconjugate content of high-and low-soy UK foods used in nutritional studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(6), 1404-1410.



Yamaguchi, M., & Weitzmann, M. N. (2009). The estrogen 17β -estradiol and phytoestrogen genistein mediate differential effects on osteoblastic NF- κ B activity. *International journal of molecular medicine*, 23(2), 297-301.

Diskusi:

Penanya:

Jayusman

(Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan)

Masukan:

Hasil penelitian jamur dapat dikelompokkan dengan cara pendekatan filogenik

Pertanyaan:

Apa manfaat dari jamur kayu yang dapat digunakan dalam kehidupan sehari-hari?

Jawab:

Jamur yang dapat dimanfaatkan adalah sebagai contoh *Ganoderma*, jamur tiram dan jamur kuping. Sedangkan manfaat lain juga ada yang dapat digunakan sebagai biopulping

Penanya:

S. Hafidhawati (Universitas Muhammadiyah Buton)

Apakah jamur kayu yang ditemukan ada yang ditemukan dalam 2 tempat?

Jawab:

Jamur yang ditemukan tidak ada yang hidup di 2 tempat