

ISOLASI DAN ANALISA GENISTEIN DARI TEMPE BUSUK MENGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM

Isolation and Analysis of Genistein of Overripe Tempe using Column Chromatography Method

Hartati Soetjipto*, Yohanes Martono, dan Zulfa Yuniarti

Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana, Jl. Diponegoro
No. 52-60 Salatiga 50711 Jawa Tengah

*Email: hartati.sucipto@staff.uksw.edu

ABSTRACT

Genistein is one of the aglycone isoflavone compounds in tempe that has various biochemical activities, including anticancer, antitumor, and antioxidants. Commonly used isoflavone extraction methods resulted in isoflavone crude extract. The aim of this study was to isolate the genistein of overripe tempe through determining the appropriate combination of mobile phases in genistein isolation and the determination of genistein content in both crude extract and isolate. The overripe tempe was first extracted, then genistein was isolated from the crude extract using column chromatography method. The determination of mobile phase combination was done by Thin Layer Chromatography while the genistein content was quantitatively determined by using High Performance Liquid Chromatography. The results showed that the appropriate combination of mobile phase for genistein isolation was chloroform : methanol (15 : 1, v/v). Genistein content in the crude extract and isolates were 4737.50 and 31.36 µg/g extract, respectively. The genistein purity in the isolates was 63.80%, while the purity in the isoflavone extract was 31.98%.

Keywords: *genistein, HPLC, isoflavone, overripe tempe, TLC*

ABSTRAK

Genistein merupakan salah satu senyawa isoflavon aglikon dalam tempe yang memiliki bermacam-macam aktivitas biokimia, diantaranya antikanker, antitumor, dan antioksidan. Metode ekstraksi isoflavon yang umum diterapkan, menghasilkan ekstrak kasar isoflavon yang masih berupa campuran. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi genistein dari tempe busuk melalui tahap penentuan kombinasi fase gerak yang tepat dalam isolasi genistein serta penentuan kandungan genistein baik dalam ekstrak kasar maupun isolat. Tempe busuk mula-mula diekstrak, selanjutnya genistein diisolasi dari ekstrak kasar menggunakan metode kromatografi kolom. Penentuan kombinasi fase gerak dilakukan secara Kromatografi Lapis Tipis, sedangkan kandungan genistein secara kuantitatif ditentukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi fase gerak yang tepat untuk isolasi genistein adalah kloroform : metanol (15 : 1, v/v). Kandungan genistein dalam ekstrak kasar dan isolat genistein berturut-turut sebesar 4737,50 dan 31,36 µg/g ekstrak. Kemurnian genistein dalam isolat adalah sebesar 63,80%, sedangkan kemurniannya dalam ekstrak isoflavon adalah sebesar 31,98%.

Kata Kunci: genistein, HPLC, isoflavon, tempe busuk, KLT

PENDAHULUAN

Isoflavon merupakan senyawa polifenol yang termasuk dalam golongan flavonoid. Bahan pangan yang menempati urutan pertama kaitannya dengan kandungan senyawa isoflavon dan derivatnya adalah kedelai. Kandungan total isoflavon pada kedelai berkisar antara 34,39 hingga 48,95 mg/100 g (Bhagwat et al. 2008). Terdapat empat bentuk isoflavon di dalam kedelai, yaitu glikosida, asetil glikosida, malonil glikosida, dan aglikon, yang masing-masing memiliki tiga isomer. Isomer dari isoflavon aglikon yaitu genistein, daidzein, dan glisitein. Menurut Astuti (2008) genistein dan daidzein merupakan isoflavon utama dalam kedelai, diikuti turunan β -glikosida-nya yaitu genistin dan daidzin.

Kandungan isoflavon aglikon dalam kedelai meningkat dengan adanya proses fermentasi (Hong et al. 2012). Tempe merupakan produk fermentasi kedelai yang paling banyak dikonsumsi masyarakat dibandingkan produk fermentasi lainnya. Kandungan genistein dalam tempe mencapai lebih dari dua kali lipat dibandingkan kandungannya dalam kedelai yang belum diolah. Menurut Ahmad et al. (2015), kandungan genistein pada kedelai sebesar 11,10 mg/100 g sedangkan pada tempe sebesar 24,03 mg/100 g. Kandungan isoflavon aglikon dalam tempe diketahui masih meningkat dengan bertambahnya waktu pemeraman. Menurut Riyanto dan Soetjipto (2017), tempe pemeraman hari keempat mengandung isoflavon genistein tertinggi diantara pemeraman hari ke-0 hingga ke-8 yaitu sebesar $26,199 \pm 25,146$ mg/g.

Berbagai penelitian tentang genistein terus dilakukan sehubungan dengan bioaktivitas genistein, diantaranya antikanker, antitumor, dan antioksidan (Ariani dan Hastuti, 2009). Metode ekstraksi isoflavon yang umum diterapkan, menghasilkan ekstrak kasar isoflavon yang berupa campuran antara berbagai senyawa isoflavon baik dalam bentuk glikosida maupun aglikon. Menurut Sartini dkk. (2014), ekstraksi isoflavon kedelai dengan metode maserasi menggunakan *rotary shaker* menghasilkan ekstrak isoflavon yang terdiri dari daidzein, genistein, daidzin, dan genistin. Sama halnya dengan penelitian

tersebut, Kuligowski dkk. (2016) menyatakan ekstraksi kedelai terfermentasi dengan teknik yang berbeda yaitu menggunakan pengadukan (*stirring*) juga menghasilkan hasil ekstrak dengan kandungan serupa.

Dalam penerapannya sebagai senyawa antikanker, antitumor, dan antioksidan, diharapkan diperoleh genistein yang lebih murni. Sebab adanya senyawa lain dapat memberikan kontribusi pada bioaktivitas genistein (Singh-Gupta et al. 2010). Oleh sebab itu, pada penelitian ini akan diisolasi isoflavon genistein dari tempe busuk pemeraman hari keempat. Pemurnian genistein dari ekstrak kasar akan dilakukan secara kromatografi kolom, sedangkan konsentrasi genistein baik dalam ekstrak maupun isolat ditentukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography / HPLC*).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan baku dalam penelitian ini adalah tempe yang diperoleh dari pengrajin tempe di Bugel, Salatiga, Jawa Tengah. Senyawa standar yang digunakan adalah genistein (*Sigma Chemical Co*, Amerika Serikat). Pelarut kimia yang digunakan adalah n-heksana, etanol, kloroform, dan metanol dengan derajat pro analisis produk E-Merck, Jerman.

Peralatan yang digunakan antara lain neraca analitis dengan ketelitian 0,0001 g (Ohaus PA214), grinder (Philips HR-2108), *drying cabinet*, *moisture analyzer* (OHAUS MB 25), peralatan ekstraksi (Soxhlet), *centrifuge*, ultrasonikator (Krisbow Ultrasonic



Gambar 1. Sampel tempe busuk pemeraman hari ke-4

cleaner DSA50-GL2-2.5L), rotary evaporator (Buchi R-114), plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, chamber KLT, seperangkat alat kromatografi kolom, dan HPLC (Knauer Smartline 5000, Smartline pump 1000).

Preparasi sampel

Sampel tempe yang digunakan adalah tempe pemeraman hari ke-4 (Gambar 1). Sampel dipotong tipis-tipis lalu dikeringkan pada *drying cabinet* dengan suhu 50°C selama 2 hari. Sampel selanjutnya dihaluskan dengan grinder dan disimpan dalam wadah kering untuk analisis lebih lanjut.

Pengukuran kadar air

Sebanyak kurang lebih 1 g sampel dimasukkan ke dalam alat *moisture analyzer*. Kadar air sampel akan tertera pada layar monitor alat terhitung sebagai persentase air yang hilang saat proses pemanasan sampel.

Ekstraksi isoflavon

Sampel tempe didefatasi menggunakan pelarut n-heksana (1:5, b/v) selama 3 jam pada alat Soxhlet (Yunindarwati dkk. 2016 yang dimodifikasi). Simplisia yang telah bebas lemak tersebut selanjutnya dikeringkan. Sebanyak 25 g simplisia kering tersebut diekstraksi dengan cara ultrasonikasi menggunakan pelarut etanol 70% (1:6, b/v) selama 1 jam. Ekstrak cair selanjutnya dipisahkan dengan cara sentrifugasi kecepatan rendah (800 rpm) selama 10 menit. Residu yang tersisa diekstraksi kembali sebanyak 2 kali menggunakan pelarut baru. Seluruh ekstrak cair dikumpulkan dan dipekatkan di *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental yang diperoleh ditimbang kemudian dihitung rendemennya berdasarkan persamaan berikut:

$$Rendemen = \frac{\text{berat ekstrak}}{(\text{berat sampel}) - (\text{berat sampel} \times \% \text{ kadar air})} \times 100 \%$$

Kromatografi lapis tipis

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Hessler et al. 1997 yang dimodifikasi) dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak berupa

campuran kloroform : metanol berbagai komposisi. Pengamatan dilakukan di bawah sinar ultra violet dengan panjang gelombang 254 nm. Nilai R_f diukur, kemudian dibandingkan dengan nilai R_f senyawa standar genistein. Perhitungan nilai R_f dihitung dengan persamaan berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa}}{\text{jarak yang digerakkan oleh permukaan pelarut}}$$

Kromatografi kolom

Fase diam yang digunakan pada kromatografi kolom (Asih 2009 yang dimodifikasi) adalah silika gel, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform : metanol pada komposisi yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT. Perbandingan antara sampel dengan fase diam adalah 1 : 10 (b/b). Eluat ditampung pada botol penampung fraksi setiap ± 0,5 mL, kemudian keseluruhan fraksi yang dihasilkan dianalisis menggunakan KLT. Fraksi hasil KLT yang mempunyai pola pemisahan sama (harga R_f sama) digabungkan, kemudian diuapkan.

Penentuan kandungan isoflavon genistein

Identifikasi isoflavon menggunakan metode HPLC dilakukan dengan pengkondisian instrumen HPLC dan pembuatan larutan sampel (César et al. 2006 yang dimodifikasi). Larutan sampel dibuat dengan melarutkan ekstrak dalam 5 mL metanol. Selanjutnya sebanyak 20 µL larutan sampel diinjeksikan ke HPLC setelah pengkondisian HPLC selesai. Kromatogram HPLC dianalisis dengan menggunakan pembanding kromatogram isoflavon genistein standar.

Kondisi operasional instrumen HPLC meliputi fase diam Vertex, Euroshper 100-5 C18, 250 × 4,6 mm (WL 75) dan fase gerak menggunakan campuran metanol : asam asetat 0,1% dengan perbandingan 48:52 (v/v). Kecepatan alir yang digunakan sebesar 1,2 mL/min dengan volum injeksi 20 µL dan menggunakan detektor UV 254 nm.

Analisis data

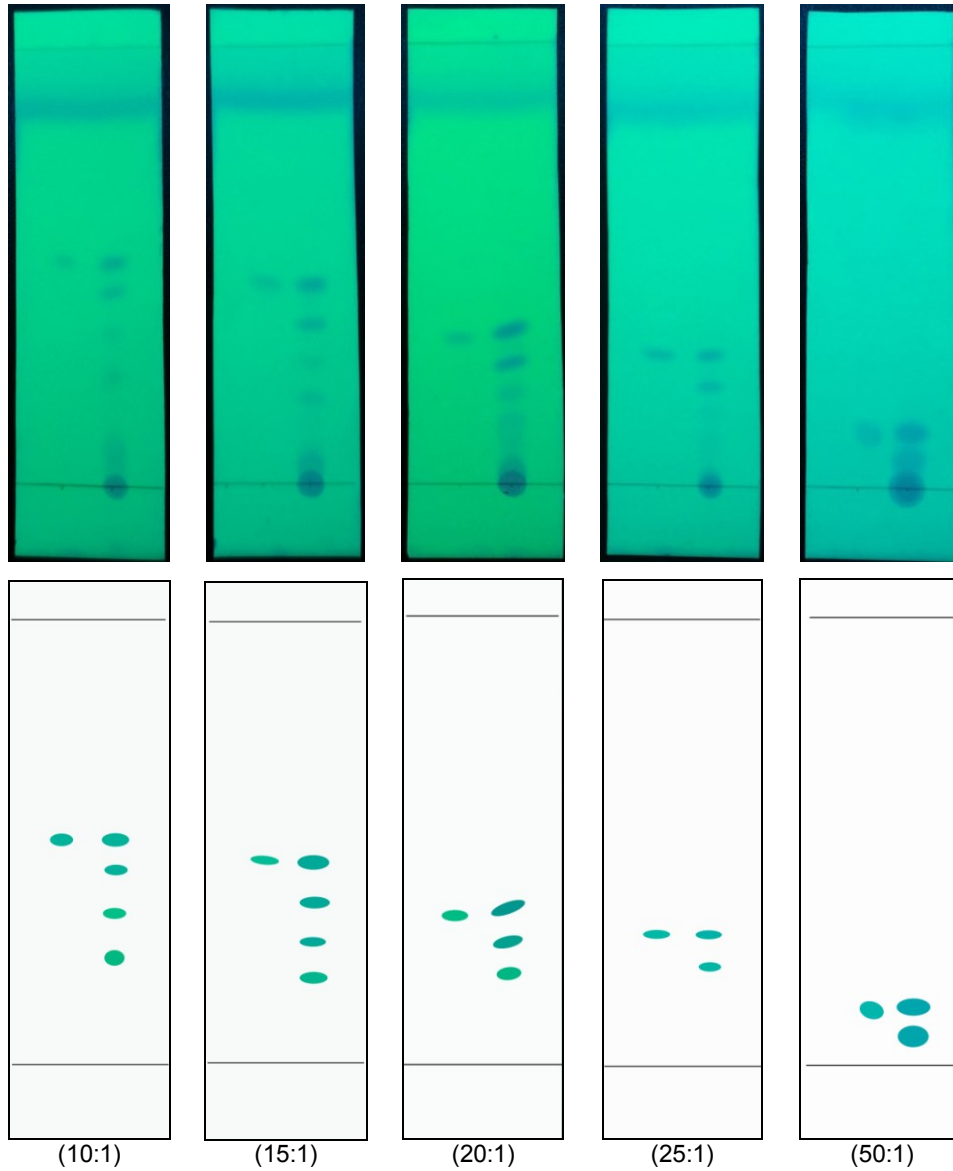
Analisis kuantitatif genistein secara HPLC dilakukan dengan metode standar eksternal. Konsentrasi genistein dalam sampel dapat diketahui dengan memplotkan area puncak analit pada kurva baku standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran kadar air

Berdasarkan proses pengukuran, kadar air dari serbuk tempe busuk yang

sudah kering sebesar 6,51%. Dibandingkan dengan penelitian Riyanto dan Soetjipto (2017), dimana kadar air serbuk tempe hari ke-4 yang sudah dikeringkan sebesar 4,566%, penelitian ini menghasilkan nilai



Gambar 2. Hasil analisis KLT perbandingan standar genistein dengan ekstrak isoflavon tempe. (Keterangan: Fase gerak =CHCl₃ : CH₃OH (v/v); fase diam = plat silika gel; noda kiri = standar genistein; noda kanan = ekstrak isoflavon tempe)

Tabel 1. Hasil KLT ekstrak isoflavon tempe dan standar genistein pada berbagai perbandingan fase gerak

Nilai Rf	Fase gerak CHCl ₃ : CH ₃ OH (v/v)				
	10 : 1	15 : 1	20 : 1	25 : 1	50 : 1
Standar Genistein	0,50	0,45	0,33	0,28	0,12
Noda 1	0,50	0,45	0,35	0,28	0,12
Noda 2	0,43	0,35	0,27	0,22	0,07
Noda 3	0,33	0,27	0,2	0,17	—
Noda 4	0,25	0,18	—	—	—

kadar air yang lebih tinggi. Menurut Rosida dkk. (2009), kadar air sampel dipengaruhi oleh kadar air awal bahan bakunya. Selain itu, perbedaan ukuran sampel juga sangat mempengaruhi nilai kadar air sampel tersebut (Purnama dkk. 2012). Nilai kadar air yang diperoleh digunakan untuk menentukan berat kering dari sampel pada perhitungan rendemen ekstrak.

Rendemen ekstrak isoflavan

Ekstrak isoflavan diperoleh melalui ekstraksi tempe fermentasi hari ke-4, dengan metode ultrasonikasi menggunakan pelarut etanol 70% yang sebelumnya telah melewati tahap defatisasi menggunakan pelarut n-heksana. Rendemen ekstrak isoflavan yang diperoleh sebesar 24,87% (b/b). Lewidharti dkk. (2015) melaporkan bahwa tempe fermentasi hari ke-4 yang diekstrak secara maserasi dengan pelarut metanol 80%, menghasilkan rendemen sebesar 30,31% (b/b). Dibandingkan dengan hasil penelitian tersebut, penelitian ini menghasilkan rendemen ekstrak yang lebih rendah. Hal ini disebabkan karena efisiensi ekstraksi secara ultrasonikasi juga dipengaruhi oleh frekuensi gelombang ultrasonik selain dipengaruhi pemilihan pelarut, waktu ekstraksi, dan suhu ekstraksi.

Paparan gelombang ultrasonik yang terlalu lama dapat mengganggu stabilitas senyawa isoflavan. Paparan tersebut menimbulkan adanya disosiasi ultrasonik sehingga terbentuk senyawa radikal. Kehadiran senyawa radikal (spesies berenergi tinggi) tersebut menyebabkan terjadinya reaksi oksidatif pada proses ekstraksi yang mempengaruhi stabilitas senyawa (Rostagno et al. 2009). Perbedaan perlakuan pada sampel tempe, termasuk sumber bahan baku pembuatan tempe (varietas, kematangan, dan tempat tumbuh kedelai), dan cara pengolahan tempe yang digunakan juga berpengaruh terhadap rendemen ekstrak yang dihasilkan (Suharto dkk. 2017).

Kromatografi lapis tipis

Hasil analisis kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak isoflavan pada berbagai perbandingan fase gerak dilihat di bawah sinar UV 254 nm (Gambar 2). Ekstrak yang di-KLT dibandingkan dengan standar genistein pada setiap perbandingan fase gerak.

Rf ekstrak yang relatif bernilai sama dengan Rf standar membuktikan bahwa noda yang muncul adalah genistein (Tabel 1). Perbandingan kloroform : metanol (10 : 1, v/v) dan (15 : 1, v/v) menghasilkan pemisahan 4 noda, kloroform : metanol (20 : 1, v/v) dan (25 : 1, v/v) 3 noda, dan kloroform : metanol (50 : 1, v/v) 2 noda. Semakin banyak perbandingan kloroform yang digunakan, Rf yang dihasilkan semakin rendah dan noda yang muncul semakin sedikit. Hal ini disebabkan karena senyawa yang akan dipisahkan semakin tertahan pada fase diam karena pengaruh polaritas baik dari senyawa, fase diam, maupun fase gerak. Rf yang beragam merupakan hasil dari berbagai tingkat afinitas antara komponen campuran dengan fase diam dan gerak.

Hasil KLT pada fase gerak kloroform : metanol (10 : 1, v/v) sesuai dengan penelitian Jyoti et al. (2015) dimana Rf dari genistein standar sebesar 0,50. Noda pemisahan yang terbentuk pada fase gerak kloroform : metanol (20 : 1, v/v) menunjukkan *tailing*, dimana noda cenderung miring ke arah kanan. Hal ini diduga disebabkan karena kondisi *chamber* yang belum jenuh sehingga mempengaruhi migrasi fase gerak menjadi tidak lurus. Menurut Sherma dan Fried (2003), parameter-parameter yang menyebabkan *tailing* adalah volume sampel yang berlebihan saat diaplikasikan ke plat KLT, keaktifan plat KLT, jarak pengembang, dan kejenuhan *chamber*.

Noda pemisahan yang berhimpit pada fase gerak kloroform : metanol (50 : 1, v/v) disebabkan karena polaritas fase gerak yang kurang sesuai sehingga tidak mampu memisahkan komponen senyawa secara maksimal. Noda yang berhimpit juga dapat disebabkan oleh volume sampel yang berlebihan saat diaplikasikan ke KLT (Bele dan Khale 2011).

Hasil yang diperoleh menunjukkan fase gerak kloroform : metanol (10 : 1, v/v) memberikan pemisahan yang paling baik dilihat dari nilai Rf yang dihasilkan. Senyawa isoflavan yang dipisahkan dengan fase gerak tersebut, memenuhi parameter optimum yaitu nilai Rf berada pada pendistribusian di wilayah 0,2-0,8 (Shewiyu et al. 2012). Namun untuk fase gerak yang digunakan pada kromatografi kolom,

diharapkan jarak pemisahan antar noda lebih panjang (terutama untuk noda genistein dengan noda berikutnya) sehingga nantinya dapat diperoleh senyawa yang lebih murni. Sehingga pada kromatografi kolom digunakan fase gerak kloroform : metanol dengan perbandingan 15 : 1 (v/v).

Hasil KLT yang diperoleh tidak hanya digunakan untuk menentukan kombinasi fase gerak yang tepat untuk isolasi, namun juga dapat digunakan untuk memperkirakan berapa senyawa yang terpisahkan berdasarkan jumlah noda pemisahan yang muncul. Oleh sebab itu, tahapan optimasi fase gerak untuk isolasi senyawa penting dilakukan sebelum tahapan isolasi itu sendiri.

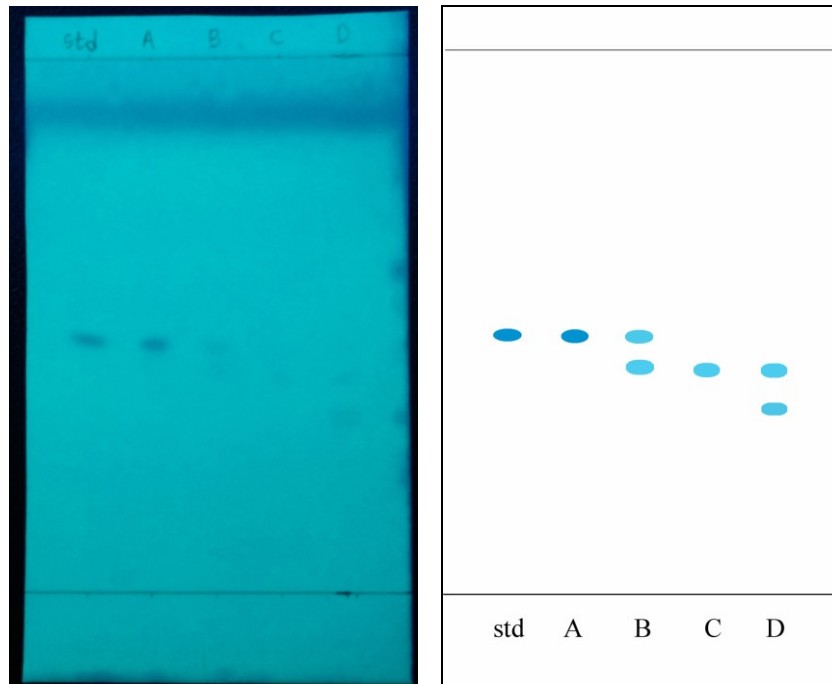
Kromatografi kolom

Terhadap 0,305 g ekstrak isoflavan tempe, dilakukan proses pemisahan dengan menggunakan fase diam silika gel 60 (70-100 Mesh) sebanyak 3 g (panjang kolom 20 cm, diameter 1 cm) menggunakan fase gerak kloroform : metanol (15 : 1, v/v). Hasil kromatografi kolom adalah 66 fraksi (tiap fraksi ± 0,5 mL). Selanjutnya terhadap fraksi-fraksi tersebut dilakukan KLT gabungan dimana tiap fraksi dianalisis menggunakan KLT, fase gerak kloroform : metanol (10 : 1, v/v). Fraksi-fraksi yang

membentuk noda dengan nilai Rf relatif sama, digabungkan menjadi satu kelompok fraksi. Hasil dari KLT gabungan, membentuk 4 kelompok fraksi yaitu fraksi A, B, C, dan D (Gambar 3).

Fraksi A merupakan gabungan dari fraksi ke-22 hingga 33, fraksi B dari fraksi ke-34 hingga 40, fraksi C dari fraksi ke-41 hingga 45, sedangkan fraksi D dari fraksi ke-46 hingga 60. Fraksi pertama hingga fraksi ke-21 dan fraksi ke-61 hingga 66 tidak memperlihatkan adanya noda pemisahan yang menunjukkan bahwa pada fraksi tersebut hanya terdapat fase gerak.

Fraksi A dan B menunjukkan positif genistein karena terbentuk noda dengan nilai Rf yang sama dibandingkan dengan Rf standar genistein, yaitu sebesar 0,47. Fraksi A dinilai relatif lebih murni sebagai isolat genistein secara KLT karena menghasilkan noda tunggal, sedangkan fraksi B menghasilkan dua noda dimana noda kedua diduga masih termasuk senyawa golongan isoflavan yang terkandung dalam tempe. Fraksi A inilah yang selanjutnya disebut isolat genistein dan digunakan untuk analisis lanjutan. Fraksi B, C, dan D menghasilkan noda sangat tipis. Hal ini diduga karena kadar senyawa isoflavan dalam fraksi tersebut sangat rendah.

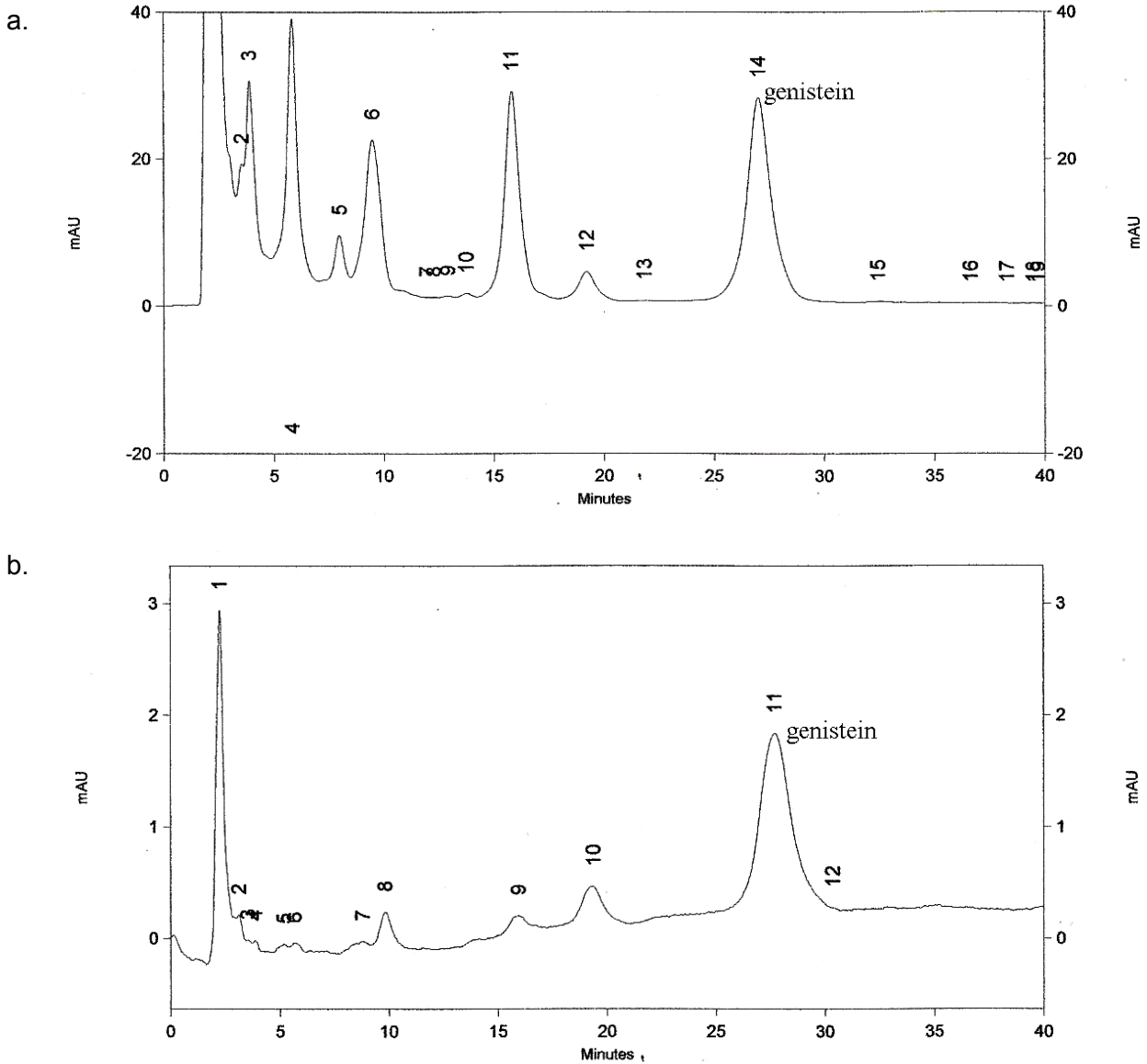


Gambar 3. Hasil analisis KLT perbandingan standar genistein dengan fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom. (Keterangan: fase gerak = CHCl₃ : CH₃OH (10 : 1, v/v); fase diam = plat silika gel; noda kiri ke kanan = standar genistein, fraksi A, fraksi B, fraksi C, dan fraksi D)

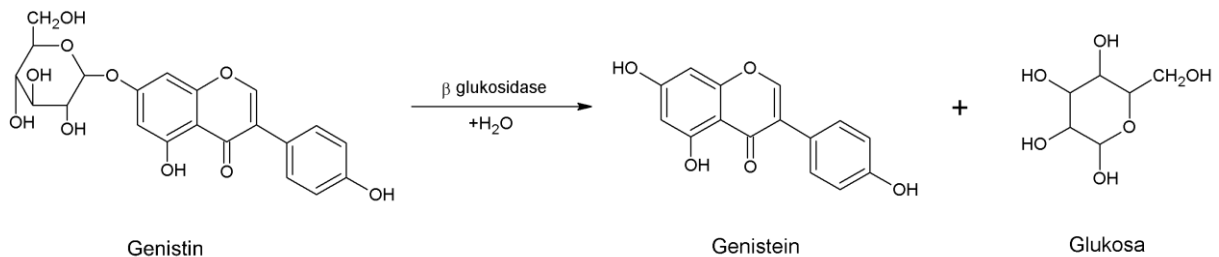
Kadar isoflavon genistein

Kadar isoflavon genistein baik dalam ekstrak kasar isoflavon tempe maupun isolat genistein hasil kromatografi kolom ditentukan secara kuantitatif menggunakan HPLC. Analisis kuantitatif genistein

dilakukan dengan menggunakan metode standar eksternal dengan memplotkan area puncak analit pada kurva baku standar. Kromatogram HPLC ekstrak isoflavon tempe dan isolat genistein ditunjukkan pada Gambar 4. Puncak genistein ekstrak isoflavon dan isolat genistein berturut-turut



Gambar 4. Kromatogram HPLC (a). ekstrak isoflavon tempe dan (b). isolat genistein



Gambar 5. Reaksi hidrolisis genistin menjadi genistein (Rostagno et al. 2009)

muncul pada waktu retensi 27,000 dan 27,683 menit. Puncak-puncak lain yang terdeteksi diduga merupakan senyawa golongan isoflavan, salah satu diantaranya yang dominan diduga merupakan daidzein (tR = 15,800 menit).

Kadar genistein dari hasil analisis dengan HPLC pada ekstrak isoflavan sebesar 4737,50 µg/g ekstrak. Dibandingkan dengan hasil penelitian Yunindarwati dkk.(2016), penelitian ini menghasilkan ekstrak dengan kadar genistein yang lebih tinggi. Yunindarwati dkk. (2016) melaporkan bahwa ekstrak kedelai terfermentasi *Aspergillus oryzae* hari ke-4 mengandung genistein sebesar 54,373 ± 1,755 µg/g ekstrak.

Salah satu penyebab perbedaan kadar genistein dalam ekstrak, diduga disebabkan oleh jenis kapang yang digunakan dalam proses pembuatan tempe. Cheng et al. (2010) menyatakan bahwa jenis kapang yang berbeda, memiliki aktivitas biotransformasi isoflavan yang berbeda pula. Menurut Lee dan Chou (2006), *Rhizopus* sp. no. 2 menunjukkan peningkatan tertinggi isoflavan aglikon dalam fermentasi koji kacang hitam sebesar 2,9 hingga 58,9% setelah fermentasi, dibandingkan dengan *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, dan *Rhizopus azygosporus* yang hanya berkisar 18,9 – 38,9% setelah fermentasi.

Biotransformasi isoflavan glikosida (genistin) menjadi isoflavan aglikon (genistein) terjadi akibat reaksi hidrolisis oleh aktivitas enzim β-glukosidase. Reaksi hidrolisis genistin menjadi genistein ditunjukkan pada Gambar 5.

Kadar genistein dalam isolat terukur sebesar 31,36 µg/g ekstrak. Bila dibandingkan dengan kadar genistein dalam ekstrak kasar yang diisolasi (yang digunakan untuk kromatografi kolom), yaitu sebesar 248,66 µg/g ekstrak, maka dapat ditentukan persen perolehan kembali (% recovery) yaitu sebesar 12,61%. Rendahnya % recovery yang diperoleh diduga disebabkan karena ada sebagian genistein yang belum terpisah dengan senyawa lain (masih dalam bentuk campuran) (Gambar 3), selain itu terdapat keterbatasan pada sistem kromatografi kolom yang mempengaruhi hasil pemisahan. Menurut Beller dan Hilleary

(1976), kolom yang digunakan untuk kromatografi kolom harus dielusi dengan campuran pelarut yang setidaknya memiliki polaritas seperti pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel. Keterbatasan tersebut sering menyebabkan pemisahan dan goresan komponen menjadi tidak baik.

Bila dibandingkan antara isolat (31,36 µg/g ekstrak) dengan ekstrak isoflavan (4737,50 µg/g ekstrak), genistein yang terisolasi dalam isolat relatif lebih rendah. Hal ini menunjukkan metode isolasi yang dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel 60 (70-100 Mesh) dan fase gerak kloroform : metanol (15 : 1, v/v) masih perlu dikembangkan lebih lanjut agar % recovery genistein dapat lebih sempurna.

Kemurnian genistein dihitung berdasarkan area puncak kromatogram (Gambar 4), yaitu dengan membagi area puncak genistein dengan total area puncak-puncak yang ada. Sehingga kemurnian genistein dalam isolat sebesar 63,80%. Dibandingkan dengan kemurniannya dalam ekstrak isoflavan sebesar 31,98%, kemurnian genistein dalam isolat lebih besar hampir mencapai 2× lipat. Namun, kemurnian tersebut dinilai masih belum cukup besar sehingga seperti yang sudah disebutkan sebelumnya, metode yang diterapkan pada penelitian ini masih perlu dikembangkan lebih lanjut.

KESIMPULAN

Kombinasi fase gerak yang tepat dalam isolasi genistein adalah kloroform : metanol (15 : 1, v/v). Kandungan genistein dalam ekstrak kasar isoflavan tempe busuk hari ke-4 dan isolat genistein berturut-turut sebesar 4737,50 dan 31,36 µg/g ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad A, Ramasamy K, Majeed ABA, Mani V (2015) Enhancement of β-secretase inhibition and antioxidant activities of tempeh, a fermented soybean cake through enrichment of bioactive aglycones. *Pharm Biol* 53:758–766. doi: 10.3109/13880209.2014.942791
- Ariani SRD, Hastuti W (2009) Analisis isoflavan dan uji aktivitas antioksidan pada tempe dengan variasi lama waktu fermentasi dan metode ekstraksi.

- Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia, Pp 568–580. 18 Maret 2009, Surakarta
- Asih IARA (2009) Isolasi dan identifikasi senyawa isoflavon dari kacang kedelai (*Glycine max*). *J Kimia* 3:33–40
- Astuti S (2008) Isoflavon kedelai dan potensinya sebagai penangkap radikal bebas. *J Tek Industri dan Hasil Pertanian* 13:126–136
- Bele AA, Khale A (2011) An overview on thin layer chromatography. *Int J Pharma Sci Res* 2:256-267. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.2(2).256-67
- Beller NR, Hilleary CJ (1976) A sample preparation technique for column chromatography. *J Chem Educ* 53: 498. doi: 10.1021/ed053p498
- Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM (2008) USDA database for the isoflavone content of selected foods: Release 2.0. Nutrient Data Laboratory, United State of America
- Cheng KC, Lin JT, Wu JY, Liu WH (2010) Isoflavone conversion of black soybean by immobilized *Rhizopus* spp. *Food Biotechnol* 24: 312-331. doi: 10.1080/08905436.2010.524459
- César IC, Braga FC, Soares CD, Nunan EA, Pianetti GA, Condessa FA, Barbosa TA, Campos LM (2006) Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *J Chromatogr B* 836:74–78. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.03.030
- Hessler PE, Larsen PE, Constantinou AI, Schram KH, Weber JM (1997) Isolation of isoflavones from soy-based fermentations of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea*. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:398–404. doi: 10.1007/s002530050947
- Hong GE, Mandal PK, Lim KW, Lee CH (2012) Fermentation increases isoflavone aglycone contents in black soybean pulp. *Asian J Animal Vet Adv* 7:502-511. doi: 10.3923/ajava.2012.502.511
- Jyoti, Agrawal SS, Saxena S, Sharma A (2015) Phytoestrogen "genistein": Its extraction and isolation from soybean seeds. *Int J Phramacogn Phytochem Res* 7:1121-1126
- Kuligowski M, Pawłowska K, Jasińska-Kuligowska I, Nowak J (2016) Isoflavone composition, polyphenols content and antioxidative activity of soybean seeds during tempeh fermentation. *CyTA J Food* 15:27-33. doi: 10.1080/19476337.2016.1197316
- Lee IH, Chou CC (2006) Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *J Agric Food Chem* 54:1309-1314. doi: 10.1021/jf058139m
- Lewidharti RS, Soetjipto H, Andini S (2015) Dinamika konsentrasi genistein dalam proses pembusukan tempe kedelai. Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VII. 18 April 2015, Surakarta
- Purnama FA, Dewi L, Hastuti SP (2012) Kadar air, abu, protein dan karbohidrat pada tahap pembuatan tempe. Skripsi, Universitas Kristen Satya Wacana
- Riyanto CA, Soetjipto H (2017) Solvent optimization for genistein isolation of "rotten tempe" by high performance liquid chromatography method. *J Eksakta*: 17:111-118
- Rosida DF, Sudaryati HP, Constantia F (2009) Kajian peran angkak pada kualitas tempe kedelai-lamtoro gung (*Leucaena leucocephala*). *J Rekapangan* 6:64-72
- Rostagno MA, Villares A, Guillamon E, Garcia-Lafuente A, Martinez JA (2009) Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J Chromatogr A* 1216:2–29. doi: 10.1016/j.chroma.2008.11.035
- Sartini, Djide MN, Permana AD, Ismail (2014) Ekstraksi isoflavon kedelai dan penentuan kadarnya secara Ultra Fast Liquid Chromatografi (UFLC). *J Sainsmat* 3:130-134. doi: 10.2685/sainsmat3211202014
- Sherma J, Fried B (2003) Handbook of Thin-Layer Chromatography, Third Edition. Marcel Dekker Inc, New York
- Shewiyo DH, Kaale E, Risha PG, Dejaegher B, Smeyers-Verbeke J, Vander-Heyden Y (2012) Optimization of a reversed-phase-high-performance thin-layer chromatography method for the separation of isoniazid, ethambutol, rifampicin and pyrazinamide in fixed-dose combination antituberculosis

- tablets. J Chromatogr A 1260:232–238. doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.044
- Singh-Gupta V, Zhang H, Yunker CK, Ahmad Z, Zwier D, Sarkar FH, Hillman GG (2010) Daidzen effect on hormone refractory prostate cancer in vitro and in vivo compared to genistein and soy extract: Potentiation of radiotherapy. Pharm Res 27:1115-1127. doi: 10.1007/s11095-010-0107-9
- Suharto KF, Soetjipto H, Martono Y (2017) Pengaruh lama fermentasi tempe terhadap kandungan total senyawa fenolik dan isoflavon genistein. ALCHEMY J Penelitian Kimia 13:230-240. doi: 10.20961/alchemy.v13i2.5094
- Yunindarwati E, Ulfa EU, Puspitasari E, Hidayat MA (2016) Penentuan kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase kedelai (*Glycine max*) terfermentasi *Aspergillus oryzae*. J Ilmu Kefarmasian Indones 14:1–7