

## DETEKSI SENYAWA ISOFLAVON DAIDZEIN DAN GENISTEIN PADA KULTUR *IN-VITRO* KALUS KEDELAI (*Glycine Max Merr.*)

Tintrim Rahayu

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Islam Malang

E-mail: stintrimrahayu@yahoo.com

Jl. Mayjen Haryono 193 Malang 65144 Jawa Timur

### ABSTRACT

The aim of this research is to identify the isoflavon compounds in the *in-vitro* cultured callus of soybean (*Glycine max Merr.*). This is an explorative research, in which callus were cultured in the B5 medium supplemented with 2 ppm 2,4 D. The friable callus were found when it was cultured in the solid medium containing 8 g/l agar and 20 g/l sucrose. When the callus and soybean were extracted with ethanol, a yellow colored substance appeared. If further analysis was done with thin layer chromatography (TLC) method employing 0,2 mm thin layer silica gel 60 F254 (DC-Plastikfolien Schicht-dicke), and eluent consisting *n*-Butanol - HCL 0.1 N (1:1), six light blue color nodes appeared under 366 nm UV light. The nodes have the following Rf: 0,14; 0,30; 0,52; 0,63; 0,79 and 0,92 respectively. This TLC result is comparable with the TLC result from soybeans since they have two nodes with the same Rf and color, namely blue color at Rf 0,81 and 0,92 respectively. Further confirmation using HPLC (High Performance Liquid Chromatography) equipped with UV-vis detector and Lichrospher 100RP-18, (10  $\mu$ m) colom, as well as Hitachi D-2500 Chromato-integrator indicated that those similar two nodes identified in the TLC were either daidzein or genistein. They can be detected by HPLC at 250 nm and 260 nm, when they were eluated at the 80% metanol. The HPLC quantitative calculation indicated that concentration of daidzein is four time higher as it was compared with the daidzein concentration in the bean. The concentration of daidzein in the callus remained high up to 4–5 weeks after plantation. It's concentration will decrease when the callus reached 6 weeks after plantation. Genistein as another component of isoflavon is not appear upon callus, while on soybean seeds extracts, both daidzen and genistein are detected.

**Key words:** soybean, *in-vitro* culture, Isoflavon

### PENGANTAR

Isoflavon merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang disintesis oleh tanaman (Prawiroharsono, 2001). Senyawa ini termasuk kelompok flavonoid yang mempunyai aktivitas estrogenik yang potensial. Jika diperhatikan struk-turnya, tampak ada kemiripan dengan hormon estrogen (Robinson, 1995). Pada kedelai (*Glycine max Merr.*) ditemukan dua jenis isoflavon yang tinggi aktifitasnya yaitu daidzein dan genistein dengan kandungan antara 0,5–2 mg/g (Barners, 1998).

Isoflavon pada kedelai sangat bermanfaat dalam bidang farmakologi antara lain mencegah penyakit kar-diovaskuler dengan mengendalikan kolesterol pada kadar yang normal, kanker payudara, prostat, menjaga kesehatan tulang dan menghindari problematika monopause (Barners, 1998)

Metabolit sekunder adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh sel tumbuhan jika ada kelebihan karbon pada aktivitas metabolisme primer (Collin & Edward, 1998). Meskipun telah diketahui bahwa sel tumbuhan bersifat totipoten, yaitu setiap sel tumbuhan membawa seluruh informasi genetik dari tumbuhan induknya, ternyata dengan tehnik kultur jaringan tumbuhan belum tentu dapat mela-kukan biosintesis metabolit sekunder yang identik

dengan tanaman asalnya (Indrayanto, 1999). Bila eksplan dari suatu tanaman ditumbuhkan pada kondisi *in vitro*, maka berdasarkan kemampuan memproduksi metabolit sekundernya dapat dibedakan menjadi 3 golongan. Pertama golongan yang mampu memproduksi metabolit sekunder dengan kandungan relatif lebih banyak atau sama dengan kondisi tanaman *in vivo* nya, kedua ialah golongan yang tidak mampu membentuk metabolit sekunder spesifiknya atau kalau mampu kandungannya relatif kecil dan ketiga adalah golongan yang mampu memproduksi metabolit sekunder tetapi strukturnya berlainan sekali dengan produksi *in vivo* nya (Indrayanto, 1999).

Contoh sistem kultur jaringan tumbuhan yang memproduksi metabolit sekunder identik dengan tanaman asalnya ialah kultur kalus *Agave amaniensis*. Kultur ini mampu memproduksi *hekogenin*, *manogenin*, dan *kamogenin* seperti tanaman asalnya (Indrayanto dkk., 1994 dalam Indrayanto, 1999).

Penggunaan kultur *in vitro* untuk penelitian tentang metabolit sekunder lebih disukai dari pada penggunaan tumbuhan lengkap. Kultur sel memungkinkan deteksi yang lebih sederhana dan mudah untuk memodifikasi kondisi eksperimen (Luckner, 1984). Suatu jaringan eksplan bila ditumbuhkan secara *in vitro*, maka sel-sel eksplan akan

membelah menjadi massa sel yang tidak terdeferensiasi disebut kalus (Albert *et al.*, 1983). Kalus dapat digunakan untuk kultur suspensi, fusi protoplas, regenerasi tumbuhan dan juga untuk memproduksi metabolit sekunder (Thomas & Davey, 1975; Tisserat, 1985).

Genistein dan daidzein merupakan 2 komponen senyawa isoflavon yang aktivitasnya tinggi dan terdapat dalam biji kedelai dalam kondisi *in vivo*. Pada penelitian ini akan dikaji produksi isoflavon melalui kultur *in vitro* kalus dari biji kedelai. Keuntungan dari sistem ini adalah dapat hemat lahan, waktu, tidak tergantung musim, mudah dilakukan upaya-upaya induksi. Mengingat penelitian ini merupakan penelitian awal maka diarahkan pada eksplorasi kandungan senyawa isoflavon pada sistem *in vitro* dari beberapa umur kalus yang berasal dari biji kedelai serta membandingkan dengan kandungan senyawa isoflavon pada sistem *in vivo* baik secara kualitatif maupun kuantitatif dan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan umur kalus dengan kandungan senyawa isoflavon.

## BAHAN DAN CARA KERJA

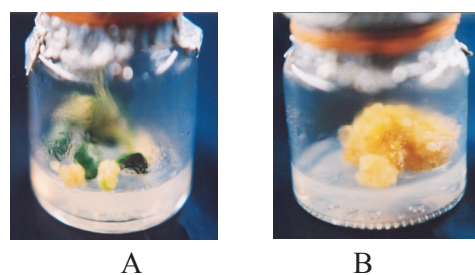
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Kultur Jaringan tumbuhan dan Mikro teknik Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Islam Malang serta Laboratorium Farmakologi Fak. Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Bahan yang digunakan adalah biji kedelai (*Glycine max* Merr. var. Argomulyo) yang diambil dari BALITKABI (Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi), Kendal Payak Malang

Dalam tahap pertama penelitian ini dilakukan penumbuhan kalus dengan medium B<sub>5</sub> ditambah hormon 2,4 D 2 ppm, agar bacto 8 g/l, sukrose 20 g/l. Sebelumnya kedelai direndam dulu dengan larutan GA<sub>3</sub>. Sampel kalus kedelai diambil pada umur 4, 5, 6, 7, dan 8 minggu secukupnya. Masing-masing diekstrak menggunakan pelarut etanol p.a. Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* kemudian dielusui dan dideteksi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) menggunakan fase diam *silicagel* 60 F<sub>254</sub> DC – Plastikfolien Schichtdicke 0,2 mm, dan fase gerak N-butanol: HCL 0,1 N = (1:1) lapisan atas. Identifikasi berikutnya dengan HPLC (*High Performanc Liquid Chromatography*) detector Hitachi L-4250 UV-Vis dengan kolom Lichrospher 100 RP – 18,10 µm serta integrator Hitachi D-2500 Chromato-integrator. Fase gerak menggunakan methanol p.a. 80% dalam aquabides. Volume injeksi 20 µl dan isoflavon dideteksi pada panjang gelombang 250 nm (daidzein) dan 260 nm (genistein), untuk menentukan jenis isoflavon dan kadar yang terkandung pada kalus dibandingkan dengan pada biji kedelai.

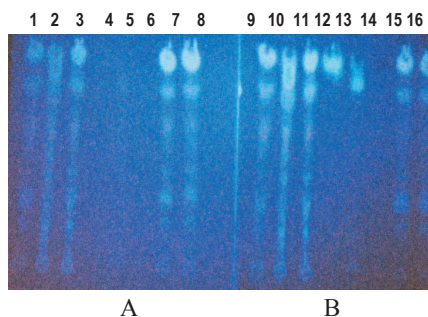
## HASIL

Kalus sebagai bahan analisis terlihat pada gambar 1.(A) Kalus yang siap sebagai inokulan, (B) adalah kalus yang berumur 6 minggu Beratnya sudah mencapai 5 gram bersifat friable, warnanya kekuningan sebelum mencapai umur 4 minggu warna kalus masih putih.

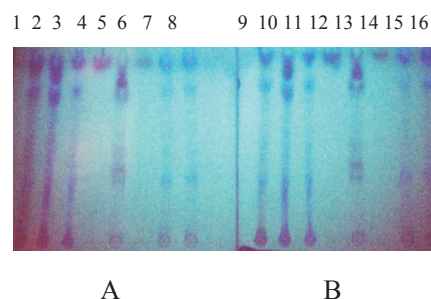
Hasil ekstrak kalus adalah larutan berwarna kuning, munculnya warna kuning memberi indikasi bahwa larutan tersebut mengandung senyawa isoflavon (Markham, 1988).



**Gambar 1.** (A) Kalus yang siap untuk dikultur (B) Kalus berumur 6 minggu



**Gambar 2.** Kromatogram hasil KLT dilihat dengan sinar UV 366 nm (A) sebelum diuapi amonia, (B) setelah diuapi amonia (1, 2, 3, 7, 8) dan (9, 10, 11, 15, 16) adalah umur kalus (4, 5, 6, 7, dan 8) minggu, (4) = daidzein murni (5) = ekstrak kedelai, (6) = Standar tunggal genistein murni.



**Gambar 3.** Kromatogram hasil KLT :dilihat dengan sinar UV 254 nm (A) sebelum diuapi amonia, (B) setelah diuapi amonia (1, 2, 3, 7, 8) dan (9, 10, 11, 15, 16) adalah umur kalus (4, 5, 6, 7 dan 8) minggu, (4) = Standar daidzein murni, (5) = ekstrak kedelai, (6) = Standar tunggal genistein murni.

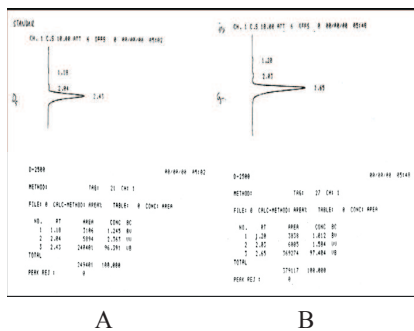
Deteksi dengan KLT di atas (gambar 2), menghasilkan 6 noda berwarna biru muda berpendar dilihat dengan sinar UV 366 nm, mempunyai nilai Rf yang sama dengan standar isoflavon (daidzein dan genistein). Warna noda ekstrak kedelai dan standar tidak memperlihatkan noda berpendar pada sinar UV 254 nm namun berpendar setelah diuapi dengan NH<sub>3</sub> (gambar 3). Hal ini adalah cara menunjukkan bahwa senyawa tersebut mengandung isoflavon.

**DETEKSI DENGAN HPLC**

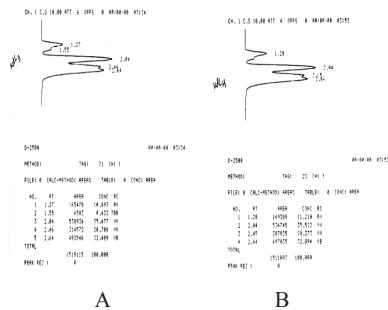
Kromatogram pertama yang dihasilkan pada (gambar 4) adalah standar daidzein dengan waktu retensi 2,43 menit, genistein 2,65 menit.

Hal ini menunjukkan bahwa daidzein kurang terikat pada kolom sampai ke detector. Jadi senyawa yang lebih polar terdeteksi lebih dahulu dari pada yang kurang polar.

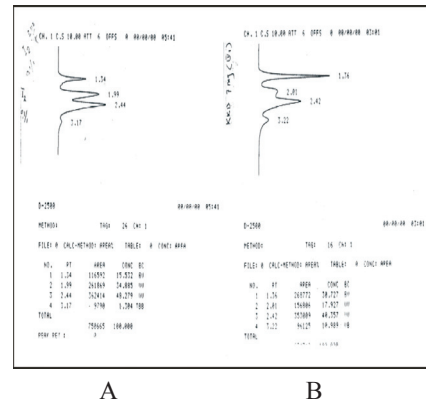
Kromatogram pada (Gambar 5) digunakan sebagai pembandingan pada kondisi *in-vivo* terlihat ada 5 puncak. Ada 2 puncak dengan waktu retensi yang sesuai dengan standar yang digunakan yaitu 2,45 menit untuk daidzein dan 2,46 menit untuk genistein. Ini menunjukkan bahwa ekstrak kedelai mengandung senyawa isoflavon terutama daidzein dan genistein.



Gambar 4. Kromatogram standar murni daidzein dan genistein konsentrasi 5 ppm, waktu retensi daidzein (A) → 2,43 genistein (B) → 2,65 menit

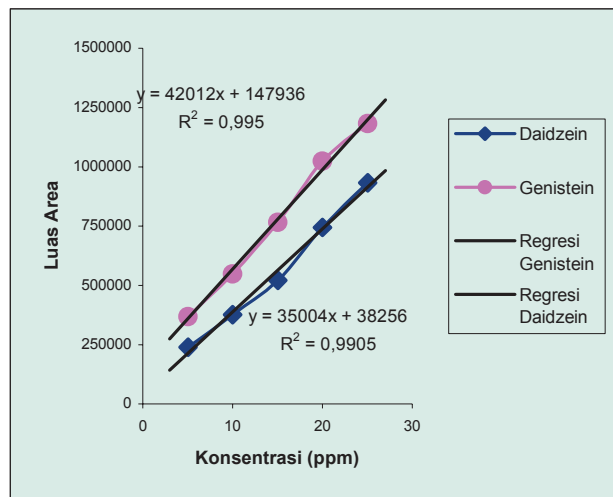


Gambar 5. Pola kromatogram ekstrak kedelai dengan 2 puncak dengan waktu retensi selama 2,46 menit (A) untuk daidzein dan selama 2,64 menit (B) untuk genistein.

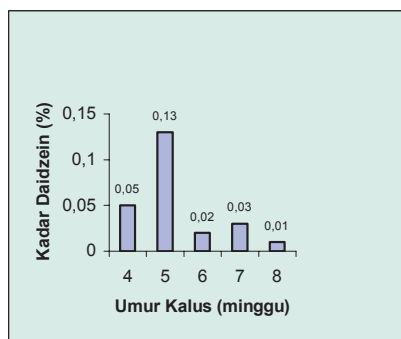


Gambar 6. Pola kromatogram kalus (A) umur 4 minggu, (B) umur 7 minggu

Pola kromatogram kalus pada umur 4, dan 7 minggu (gambar 6) adalah contoh hasil analisis HPLC. Secara umum umur kalus menunjukkan pola yang sama yaitu mempunyai 4 puncak dengan waktu retensi yang berbeda sesuai dengan senyawa yang terkandung. Dari 4 puncak ada satu yang mempunyai waktu retensi antara 2,40–2,44 menit yang menunjukkan waktu retensi untuk daidzein, sedangkan yang mirip dengan genistein tidak ada. Hal ini menunjukkan bahwa dalam kalus kedelai pada berbagai umur memperlihatkan kandungan daidzein. Data luas area dari kurva HPLC dapat dilihat dilihat pada gambar 7 di bawah ini.



Gambar 7. Kurva baku standar isoflavon menentukan regresi daidzein dan genistein. Koefisien korelasi regresi linier daidzein 0,99 dan genistein 0,99. Nilai ini mendekati satu yang berarti kurva tersebut dapat digunakan untuk analisa kuantitatif. Penentuan kadar dari ekstrak kalus dilakukan dengan interpolasi terhadap kurva standar.



**Gambar 8.** Grafik hubungan antara umur kalus dan kadar isoflavon

Atas dasar analisis kuantitatif seperti diilustrasikan pada gambar 7, maka disimpulkan hasil perhitungan kadar daidzein dalam biji kedelai adalah 0,03% lebih rendah dari hasil penghitungan kadar daidzein dalam kalus, khususnya pada saat kalus umur 4–5 minggu yaitu dapat mencapai 0,05–0,13%. Kadar Geidzein kemudian menurun pada umur 6 minggu dan terus turun sampai umur 8 minggu (gambar 8)

## PEMBAHASAN

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa senyawa isoflavon terbentuk pada kondisi *in-vitro*. Senyawa isoflavon yang terbentuk pada kondisi *in-vitro* sama dengan kondisi *in-vivo*, ditinjau dari salah satu komponen senyawa tersebut. Diantara dua komponen daidzein dan genistein yang dikaji hanya daidzein yang terdeteksi pada kalus.

Kandungan senyawa isoflavon yang berupa daidzein pada kultur *in-vitro* lebih tinggi dibandingkan pada kondisi *in-vivo*, khususnya pada umur sampai 5 minggu. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa umur kalus mempengaruhi kandungan daidzein. Kandungannya mulai mening-kat pada umur 4 minggu, dan meningkat lagi paling tinggi pada umur 5 minggu, kemudian mulai menurun pada umur 6 minggu dan terus menurun sampai umur 8 minggu.

Ada indikasi pada penambahan hormon 2,4 D yang lebih tinggi masih ada peningkatan pertumbuhan sehingga

perlu ditingkatkan lagi 3 ppm, 4 ppm sampai 5 ppm, kemudian dilihat pengaruh medium ini terhadap kandungan senyawa isoflavon. Lain dari itu, perlu telaah lebih lanjut, khususnya mencermati kualitas dan varietas biji, untuk menjelaskan diskrepansi dengan hasil penelitian yang sudah dilaporkan sebelumnya yang mengatakan bahwa kadar isoflavon berkisar 0,5–2 mg/g (Barners,1998). Sementara dalam penelitian ini yang menggunakan var. Argomulyo terdeteksi kandungan senyawa isoflavon 0,03 %.

## KEPUSTAKAAN

- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., dan Watson, J.D. 1983. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York & London, 1140.
- Barners, S. 1998. Phytoestrogens and Breast Cancer. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12(4): 559–575.
- Berlin, J. 1988. Formation of Secondary Metabolism in Cultural Plant Cells its impact on Pharmacy, In: Bayai YPS, (ed.). *Biotechnology. Agriculture and Forestry*, vol. Springer Verlag, 1: 37–39.
- Collin, H.A., dan Edward. 1998. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publisher Limited, Singapore, 27–28.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Alih bahasa: Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Indrayanto, G. 1999. Prospek Teknik KJT untuk Produksi Bahan Kimia Alami. *Pidato Pengukuhan Guru Besar UNAIR Surabaya*.
- Luckner, M. 1984. *Secondary Metabolism in Microorganism. Plant and Animals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York & Tokyo.
- Livi, W.G. 1988. *Tehnik Kultur Jaringan Tumbuhan*. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Alih bahasa: Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Morris, P., dan Robbins. 1997. *Manipulating the Chemical Composition of Plant. Iger Inovations*.
- Prawiroharsono, S. 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. *Medika*, 27(4).
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik tumbuhan Tinggi*, Penerjemah: Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung: hal. 191–216.
- Thomas, E., dan Davey, M.R. 1975. *From single cells to plants*. Wykeham Pup. Ltd., London and Winchester.
- Tisserat, B. 1985. *Plant Tissue Culture*. Washington DC: Irl Press Oxford.