

Mikroanalisis Kandungan Senyawa Fenolik Total Ekstrak Biji Kedelai dengan Reagen Folin-Ciocalteu

Microanalysis of Total Phenolic Contents in Soybean Grain Extract Using Folin-Ciocalteu Reagent

Eriyanto Yusnawan* dan Joko Susilo Utomo

Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi
Jalan Raya Kendalpayak Km 8, Kotak Pos 66, Malang Jawa Timur 65101, Indonesia
*E-mail: eyusnawan@litbang.pertanian.go.id

Naskah diterima 11 Maret 2016, direvisi 13 Maret 2017, disetujui diterbitkan 27 Maret 2017

ABSTRACT

Phenolic compounds in plants function as a chemical defense system to inhibit the growth of pathogens. Folin-Ciocalteu (FC) reagent may be used to estimate the total phenolic compounds using spectrophotometry. Microanalysis of the phenolic compounds using FC reagent has not been widely used. This study aimed to develop a rapid method in estimating total phenolic compounds in soybean grain extract using a 96-wells microplate. An optimum kinetic reaction was achieved after 90 minutes of incubation. Responses of 25–1,000 µg/ml of gallic acid were linear ($r = 0.99$). Small amount of reagent was needed in the Microplate 2 (MP) technique. This method was more efficient, practical and environmentally friendly. Hundreds of samples could be analysed using the MP 2 in a shorter time, very useful when working with large number of soybean germplasm collection.

Keywords: Soybean, grain extract, microanalysis, phenolic compound.

ABSTRAK

Senyawa fenolik berperan penting bagi tanaman, terutama pada sistem pertahanan secara kimiawi untuk melawan infeksi patogen. Analisis senyawa fenolik secara spektrofotometri dapat dilakukan dengan reagen Folin-Ciocalteu, akan tetapi metode cepat analisis senyawa ini dalam skala mikro belum banyak dilakukan. Penelitian bertujuan untuk mengembangkan metode cepat analisis kandungan senyawa fenolik total ekstrak biji kedelai dengan mikroanalisis menggunakan 96-well microplate. Reaksi kinetik optimum format MP2 terjadi pada menit ke-90 setelah inkubasi. Linearitas kurva asam galat (GA) ($r = 0,99$) diperoleh dari konsentrasi 25–1.000 µg/ml. Mikroanalisis dengan format microplate 2 (MP2) untuk mengukur kandungan fenolik total ekstrak biji kedelai dikategorikan akurat berdasarkan nilai recovery yang diperoleh (90-95%). Format MP2 dapat digunakan untuk menganalisis sampel dalam jumlah banyak dan dalam waktu singkat serta memerlukan sedikit reagen, sehingga lebih praktis dan dinilai ramah lingkungan.

Kata kunci: Kedelai, ekstrak biji, mikroanalisis, senyawa fenolik.

PENDAHULUAN

Senyawa fenolik disintesis secara alami oleh tanaman selama pertumbuhan normal maupun sebagai respon terhadap cekaman biotik dan abiotik, seperti infeksi, luka, radiasi sinar UV, dan berperan sebagai sinyal molekul antara tanaman dan mikroorganisme simbiosis (Arfaoui *et al.* 2007, Boue *et al.* 2009, Mandal *et al.* 2010, Couto *et al.* 2011, Dardanelli *et al.* 2012, Silva *et al.* 2013, Yusnawan 2013). Tanaman leguminosae kaya akan kandungan senyawa fenolik, sebagai contoh biji kedelai memiliki kisaran fenolik total 3,04-5,71 mg ekuivalen catechin/g (Malencic *et al.* 2007, Riedl *et al.* 2007). Senyawa fenolik dominan yang terdapat dalam biji leguminosae adalah flavonoid, asam fenolat, dan prosoyanidin (Amarowicz and Pegg 2008).

Senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh biji dan akar tanaman pada awal perkecambahan berperan untuk melawan patogen tular tanah dan serangga pemakan akar (Makoi and Ndakidemi 2007). Senyawa ini juga berfungsi untuk mencegah infeksi penyakit daun dan biji (Oh *et al.* 2008, Lygin *et al.* 2009, Mikulic-Petkovsek *et al.* 2011, Ruiz-Garcia and Gomez-Plaza 2013). Aktivitas senyawa fenolik secara spesifik bergantung pada ragam strukturnya. Sebagai contoh, senyawa fenolik tanaman leguminosae antara lain cajanin, medicarpin, glyceolin, rotenone, coumestrol, phaseolin, phaseolinin, isoflavonoid, dan flavonoid berperan sebagai fitoantispin dan fitoaleksin serta nematisidal terhadap patogen tular tanah dan serangga hama (Makoi and Ndakidemi 2007).

Pengukuran senyawa fenolik total pada tanaman dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri dan kromatografi (Naczki and Shahidi 2004, Ma and Cheung 2007, Du *et al.* 2010, Liu *et al.* 2010, Jun-Ming *et al.* 2011,

Sanchez-Rangel *et al.* 2013). Secara spektrofotometri, reagen Folin-Ciocalteu (FC) banyak digunakan karena memiliki banyak kelebihan, di antaranya metode sederhana (*simple*), sensitif, dapat diulang (*reproducible*), hasilnya relatif akurat, tidak memerlukan peralatan spesifik dan canggih, telah digunakan secara luas untuk mengukur antioksidan fenolik, dan pengaruh matrik dari sampel dapat diminimalkan pada pemilihan panjang gelombang 600-800 nm (Huang *et al.* 2005, Prior *et al.* 2005, Ainsworth and Gillespie 2007, Berker *et al.* 2013).

Reaksi yang terjadi antara reagen FC dengan sampel adalah reaksi oksidasi reduksi kolorimetrik gugus hidroksil pada sampel yang diuji dengan larutan kompleks ion polimerik asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfat dalam reagen FC (Singleton and Rossi 1965, Singleton *et al.* 1999). Volume akhir reaksi antara sampel dengan reagen FC mencapai milliliter pada format baku (FB) untuk mengukur senyawa fenolik total (Singleton and Rossi 1965, Singleton *et al.* 1999). Hingga saat ini tidak ada metode sederhana universal yang dapat digunakan untuk mengukur senyawa fenolik dengan hasil akurat secara kuantitatif (Prior *et al.* 2005). Oleh karena itu, modifikasi dan optimasi dilakukan sesuai dengan sampel yang akan dianalisis.

Salah satu modifikasi dan optimasi yang dilakukan adalah dengan cara menyederhanakan FB yang dikembangkan oleh Singleton dan Rossi (1965) menjadi mikroanalisis dalam volume reagen mikroliter. Mikroanalisis senyawa fenolik belum banyak dilakukan, hal ini dibuktikan dengan publikasi yang masih sedikit (Attard 2013). Mikroanalisis telah dilakukan untuk pengukuran fenolik total dalam urin (Medina-Remon *et al.* 2009), produk makanan (Magalhaes *et al.* 2010), buah, dan daun (Attard 2013) dengan cara memodifikasi konsentrasi reagen FC dan natrium karbonat (NC). Mikroanalisis untuk mengukur kandungan senyawa fenolik total dalam ekstrak biji kedelai belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode cepat pengukuran kandungan fenolik total ekstrak biji kedelai dalam skala mikro yang dilakukan dalam 96-well microplate menggunakan reagen FC.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Pangan, Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, Malang, tahun 2013. Bahan yang digunakan untuk keperluan optimasi dalam pengujian makro dan mikroanalisis adalah biji kedelai varietas Anjasmoro yang diperoleh dari hasil panen di Kebun Percobaan Kendalpayak, Malang, pada musim kemarau. Biji kedelai yang digunakan dipilih yang utuh dan tidak rusak.

Penyediaan Sampel dan Ekstraksi

Biji kedelai sebanyak 50 g dihaluskan dengan penggiling sampel (*sample grinder*) (Cyclotec Sample Mill, Sweden) hingga diperoleh partikel ukuran 80 *mesh*. Partikel kedelai diekstraksi dengan pelarut aseton 50% (Xu and Chang 2007). Ekstraksi maserasi dilakukan dengan cara merendam partikel kedelai dalam pelarut (1:10 ; b/v). Setelah dikocok selama 2 jam dengan kecepatan 125 rpm, ekstrak diinkubasi dalam ruang gelap selama 18 jam. Cairan bening dipisahkan dari ampas dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit. Ekstraksi dengan cara yang sama dilakukan untuk kedua kali dan cairan bening yang kedua digabung dengan cairan yang pertama untuk dianalisis. Sampel disimpan maksimal selama 2 x 24 jam pada suhu 8°C.

Penyiapan Larutan Standar, Penentuan Waktu Kestabilan, dan Linieritas Kurva

Larutan stok 3,4,5-*trihydroxybenzoic acid* atau asam galat (GA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US) dengan konsentrasi 2.000 µg dibuat dengan cara melarutkan ke dalam etanol 70%. Sonikasi larutan stok pada frekuensi 40 kHz selama 5 menit dilakukan untuk membantu melarutkan GA sebelum diencerkan secara berseri.

Larutan stok diencerkan hingga diperoleh konsentrasi larutan mulai dari 25 µg hingga 1.000 µg. Seri larutan standar ini digunakan pada pengukuran kandungan fenolik total dengan FB maupun metode cepat menggunakan format 96-*microwell plate*. Seri larutan standar direaksikan dengan reagen FC sesuai dengan prosedur pengukuran kandungan fenolik total menggunakan FB, *microplate* 1 (MP1), maupun *microplate* 2 (MP2). Waktu inkubasi yang dioptimal dilakukan mulai dari menit ke-10 hingga menit ke-130, dengan interval 10 menit untuk pembacaan nilai absorbansi.

Spiking, Recovery Study, dan Akurasi

Dua konsentrasi GA berbeda (100 mg/ml dan 25 mg/ml) ditambahkan ke dalam ekstrak biji kedelai (1:1 v/v), sehingga diperoleh konsentrasi akhir GA dalam ekstrak sebesar 50 mg/ml dan 12,5 mg/ml (*spiking*). Larutan campuran ini digunakan sebagai bahan untuk *recovery study*. Sebanyak 50 ml (tanpa pengenceran) dan 20 ml (setelah diencerkan 1:10 v/v) larutan campuran diukur kandungan fenolik totalnya menggunakan FB dan format MP2. Sebagai blanko digunakan etanol 70%.

Akurasi dihitung berdasarkan nilai *recovery* menggunakan rumus $recovery = (A \times 100) / A_t$ (Blainski *et al.* 2013), di mana A = nilai absorbansi aktual ekstrak biji kedelai setelah penambahan GA, A_t = nilai absorbansi

teoritis ekstrak biji kedelai setelah penambahan GA yang diperoleh dari kurva standar untuk masing-masing konsentrasi. Metode MP2 yang dikembangkan dinyatakan akurat apabila nilai *recovery* berkisar antara 85-115%.

Pengukuran Kandungan Fenolik Total menggunakan Format Baku

Pengukuran kandungan fenolik total menggunakan reagen FC, yang diadopsi dari metode Singleton dan Rossi (1965) serta Singleton *et al.* (1999), dilakukan dalam volume total 5 ml yang sesuai dengan volume *cuvette* (dimensi: 12,5 mm x 12,5 mm x 45 mm). Campuran larutan yang terdiri atas larutan standar atau ekstrak biji kedelai (50 μ l), aquades (3.000 μ l), reagen FC (250 μ l) dan 20% Na_2CO_3 (750 μ l) dihomogenisasi dengan cara di-*vortex* dan diinkubasi selama 8 menit pada suhu ruang. Sebanyak 950 μ l aquades ditambahkan dan campuran larutan diinkubasi selama 10-130 menit. Nilai absorbansi dibaca dengan spektrofotometer (Genesys 10uv, Thermo Scientific, US) pada panjang gelombang 655 nm dengan GA sebagai standar. Kandungan fenolik total dinyatakan dengan ekuivalen GA (GAE/g sampel) (Xu and Chang 2007).

Pengukuran Kandungan Fenolik Total Menggunakan Format MP1

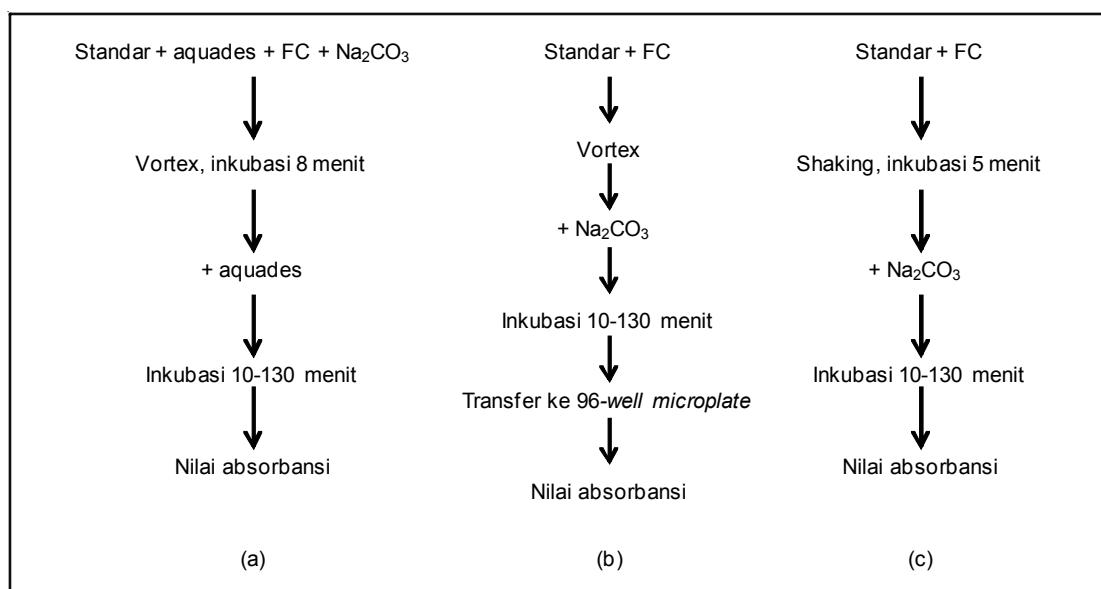
Pengukuran kandungan fenolik pada jaringan daun yang dikembangkan oleh Ainsworth dan Gillespie (2007) menggunakan 96-*well microplate* dilakukan dengan cara mereaksikan larutan standar atau sampel, reagen FC,

dan larutan Na_2CO_3 dengan volume masing-masing 100 μ l, 200 μ l, dan 800 μ l. Larutan standar atau sampel direaksikan dengan 10% reagen FC dan dimasukkan ke dalam 2 ml *microtube*. Campuran larutan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Larutan 700 ml Na_2CO_3 ditambahkan ke dalam *microtube* dan diinkubasi selama 10-130 menit untuk optimasi. Sebanyak 200 μ l ditransfer ke dalam 96-*microplate* dan nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 655 nm dengan *microplate reader* (Bio-Rad model 680, US).

Pengukuran Kandungan Fenolik Total Menggunakan Pengembangan Format MP2

Campuran antara larutan standar atau sampel, reagen FC, dan larutan 20% Na_2CO_3 dibuat dengan perbandingan 10:75:15 (v/v/v), sehingga sesuai volume pada 96-*well microplate*. Larutan standar atau ekstrak biji kedelai yang diencerkan 1:10 v/v dan 6,67% reagen FC dimasukkan ke dalam sumuran (*well*) pada 96-*well microplate*. Campuran larutan tersebut dihomogenisasi dengan *microplate reader* yang diatur pada mode *shaking* dan diinkubasikan selama 5 menit. Larutan 20% Na_2CO_3 ditambahkan dan diinkubasikan selama 10-130 menit untuk optimasi. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 655 nm dengan *microplate reader*. Kandungan fenolik total ekstrak biji kedelai dinyatakan dengan ekuivalen GA (GAE/g sampel).

Secara garis besar perbedaan langkah pengukuran senyawa fenolik dengan pendekatan FB, MP1, dan MP2 disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tahapan pengukuran senyawa fenolik total dengan reagen Folin-Ciocalteu menggunakan format: (a) baku (Singleton and Rossi 1965; Singleton *et al.* 1999; Xu and Chang 2007), (b) *microplate* 1 (Ainsworth and Gillespie 2007), dan (c) pengembangan format *microplate* 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Waktu Kestabilan Reaksi

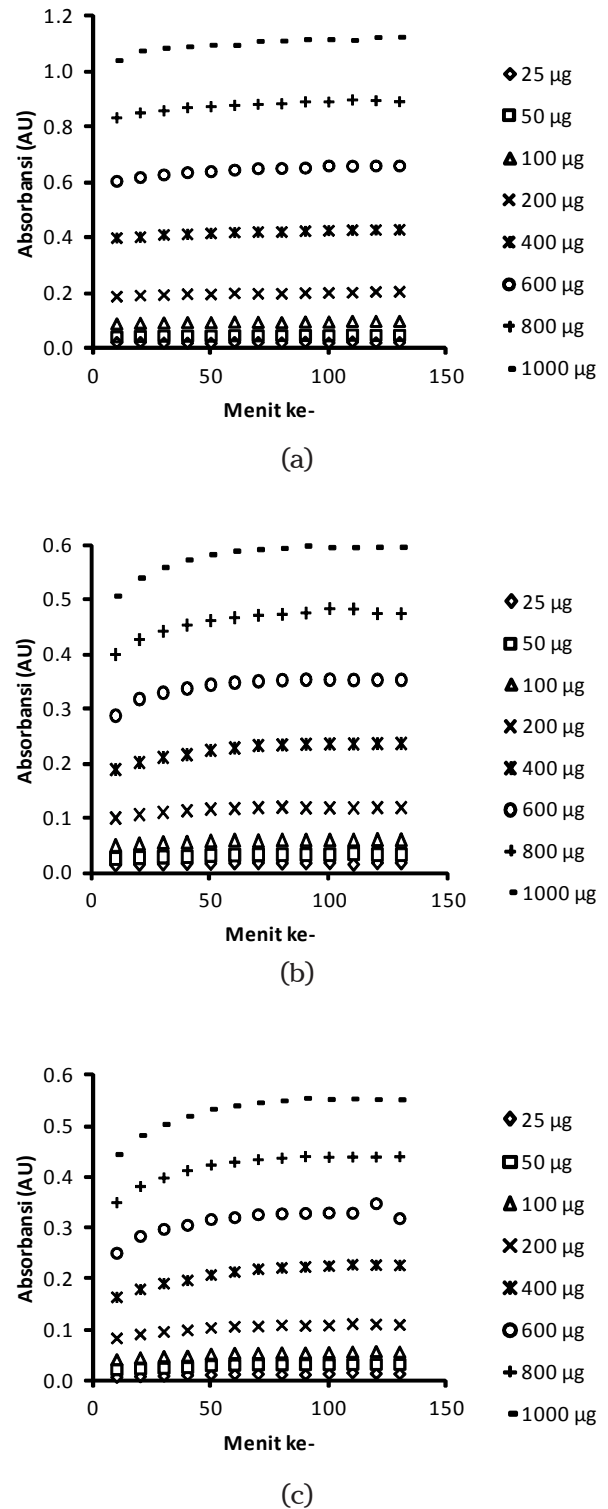
Penentuan waktu kestabilan reaksi atau waktu inkubasi bertujuan untuk menetapkan waktu yang diperlukan pada proses reaksi senyawa dengan pereaksi sehingga dapat dibaca nilai absorbansi. Waktu kestabilan optimum ditentukan dengan cara menentukan waktu inkubasi yang memberikan nilai absorbansi konstan pada saat pembacaan dibandingkan dengan nilai absorbansi pada pembacaan berikutnya.

Kenaikan nilai absorbansi pada semua konsentrasi, mulai menit ke-90 hingga menit ke-130, lebih rendah dibandingkan dengan menit ke-10 hingga menit ke-80. Hal ini terjadi pada pengukuran dengan FB maupun format MP1 dan MP2 (Gambar 2). Pada konsentrasi GA tertinggi (1.000 µg), fluktuasi nilai absorbansi terjadi pada pengukuran menggunakan FB, terutama mulai menit ke-40. Pengukuran nilai absorbansi pada konsentrasi tertinggi menggunakan format MP1 maupun MP2 menghasilkan fluktuasi nilai absorbansi yang lebih rendah pada pengamatan menit yang sama dengan FB. Waktu inkubasi untuk mencapai kestabilan reaksi senyawa fenolik dengan reagen FC, baik menggunakan format MP1 maupun MP2, terjadi pada menit ke-90. Waktu inkubasi ini dipilih untuk optimasi langkah selanjutnya dan digunakan untuk pengukuran senyawa fenolik ekstrak biji kedelai.

Optimasi Kurva Standar dan Linearitas Kurva

Untuk mengoptimasi dan mengetahui kisaran deret standar yang diperlukan guna pengukuran kadar fenolik dalam biji kedelai maka 36 ekstrak diukur kandungan fenolik totalnya. Pembacaan nilai absorbansi ekstrak terletak pada kisaran 0,170–0,230 absorbance unit (AU) pada pengukuran dengan FB dengan kisaran 0,120–0,160 AU pada format MP1 maupun MP2. Jika diinterpolasikan dengan ekuivalen GA, kedua kisaran nilai absorbansi tersebut terletak pada kisaran GA 50–400 µg/ml, sehingga rentang deret standar dapat ditentukan untuk dioptimasi. Konsentrasi yang lebih rendah (0–<50 µg/ml GA) dan yang lebih tinggi (>400–1.000 µg/ml GA) digunakan untuk mengetahui linearitas kurva GA.

Kurva standar GA yang diuji dengan FB, MP1, dan MP2 menunjukkan respon linear pada konsentrasi 25–1.000 µg/ml (Gambar 3). Nilai *r* yang mendekati satu (*r* = 0,99) menunjukkan ketiga kurva standard memiliki respon linear dan dapat digunakan untuk pengukuran sampel ekstrak biji kedelai. *Slope* atau gradien kurva yang lebih landai diperoleh pada format MP1 dan MP2. Hal ini disebabkan oleh nilai absorbansi pada kedua format ini



Gambar 2. Respon deret standar asam galat dengan konsentrasi 25-1000 µg yang diinkubasikan selama 130 menit dengan interval 10 menit diuji dengan format (a) baku (FB), (b) *microplate* 1 (MP1), dan (c) *microplate* 2 (MP2). Keterangan: \diamond = 25 µg, \square = 50 µg, \triangle = 100 µg, \times = 200 µg, $*$ = 400 µg, o = 600 µg, $+$ = 800 µg, dan $-$ = 1000 µg.

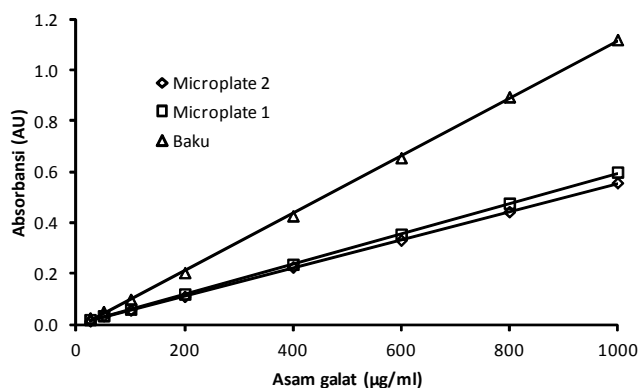
lebih rendah daripada FB. Pada konsentrasi tertinggi (1.000 µg/ml), nilai absorbansi MP1 (0,598 AU) dan MP2 (0,556 AU) hanya sekitar setengah nilai absorbansi FB (1,117 AU).

Kebutuhan GA, Reagen FC, dan NC

Total kebutuhan GA, reagen FC, dan 20% NC untuk masing-masing format berbeda-beda (Tabel 1). Secara umum, pengukuran fenolik total per sampel dengan FB memerlukan reagen lebih banyak dibandingkan dengan MP1 dan MP2. Kebutuhan reagen pada format MP2 lebih sedikit dibandingkan dengan FB maupun MP1. Analisis senyawa fenolik total menggunakan format MP2 dapat menghemat GA, reagen FC, dan NC hingga 1:25 dibandingkan dengan pengukuran menggunakan FB. Hal yang sama dijumpai pada volume akhir reaksi setelah pengenceran dan penambahan aquades. Perbandingan volume akhir reaksi antara MP2 dan FB adalah 1:25.

Spiking, Recovery Study, dan Akurasi

Untuk mengetahui pengaruh matriks dalam ekstrak biji kedelai terhadap hasil pengukuran fenolik total yang dinyatakan dengan ekuivalen GA maka *spiking* dengan dua konsentrasi GA yang berbeda bertujuan untuk mengetahui nilai *recovery*-nya. Hasil perhitungan *recovery* dari kedua format analisis yang berbeda menunjukkan 102-106% *recovery* didapatkan dari analisis menggunakan FB pada konsentrasi *spiking* GA 50 mg/ml, sedangkan 90-95% *recovery* diperoleh dari analisis menggunakan format MP2 (Tabel 2). *Spiking* GA dalam ekstrak biji kedelai pada konsentrasi yang lebih rendah, yaitu 12,5 mg/ml, diperoleh nilai *recovery* sebesar 92-117% pada analisis dengan FB dan 90-92% *recovery* pada analisis dengan format MP2. Metode analisis menggunakan FB maupun MP2 untuk mengukur kandungan fenolik total ekstrak biji kedelai



Gambar 3. Kurva linear standard asam galat (konsentrasi 25–1000 µg) yang diperoleh dari format baku (FB), *microplate* 1 (MP1) dan *microplate* 2 (MP2).

dikategorikan akurat berdasarkan nilai *recovery* yang diperoleh.

Hubungan antara Pengukuran Kandungan Fenolik Total FB dan MP2

Hasil pengukuran fenolik total dengan FB dan format MP2 dari 36 sampel ekstrak biji kedelai menunjukkan kedua format berkorelasi positif yang tercermin dari nilai r 0,95 (atau $r^2 = 0,897$) (Gambar 4). Hasil pengukuran senyawa fenolik yang tinggi dari sampel FB terbaca tinggi pula pada pengukuran dengan MP2, demikian sebaliknya. Kandungan fenolik total menggunakan FB maupun MP2 diperoleh dari analisis pada hari dan waktu bersamaan untuk menghindari kemungkinan timbulnya perbedaan hasil karena perbedaan waktu, mengingat format MP2 bertujuan untuk pengukuran kandungan senyawa fenolik total dalam ekstrak biji kedelai.

Hasil Pengukuran Kandungan Fenolik Total Ekstrak Biji Kedelai dengan FB vs MP2

Dari 36 ekstrak biji kedelai yang dianalisis, kandungan fenolik total yang diestimasi menggunakan FB dan MP2 menunjukkan adanya variasi antarsampel (Gambar 5). Kandungan fenolik total berkisar antara $2,75 \pm 0,25$ mg GAE/g hingga $4,68 \pm 0,46$ mg GAE/g dengan FB dan $2,93 \pm 0,01$ mg GAE/g hingga $4,95 \pm 0,42$ mg GAE/g dengan MP2. Hasil pengukuran kandungan fenolik total dari satu sampel dengan FB maupun MP2 tidak menunjukkan perbedaan berarti jika mempertimbangkan nilai simpangan deviasi.

Pengembangan metode baru menggunakan ekstrak sampel yang berbeda untuk mengukur kandungan senyawa perlu dioptimasi sebelum metode analisis yang dikembangkan dibakukan atau distandarisasi, termasuk optimasi waktu inkubasi. Hal ini selaras dengan pendapat Ainsworth dan Gillespie (2007) yang

Tabel 1. Asam galat, reagen Folin-Ciocalteu, dan natrium karbonat yang diperlukan untuk analisis senyawa fenolik dengan format baku (FB), *microplate* 1 (MP1), dan *microplate* 2 (MP2).

Reagen	Format analisis (µl)		
	FB	MP1	MP2
Asam galat	50	100	2
Folin-Ciocalteu ^a	250	20	10
Na ₂ CO ₃ ^b	750	297	30
Volume akhir reaksi	5.000	1.100	200

^a reagen FC yang digunakan adalah FC stok sebelum diencerkan, ^b konsentrasi Na₂CO₃ sebesar 20%

menyatakan bahwa waktu inkubasi perlu dioptimasi apabila menggunakan sampel dari spesies dan jaringan yang berbeda. Pertimbangan lain adalah metode analisis yang didasarkan pada batas waktu tertentu untuk pembacaan absorbansi (*endpoint*), penentuan waktu merupakan hal yang sangat penting. Sedikit selisih waktu inkubasi maka hasilnya tidak dapat dipertanggungjawabkan (Prior *et al.* 2005).

Pertimbangan penentuan lama waktu hingga 130 menit didasarkan pada waktu inkubasi minimal yang diperlukan pada pengukuran fenolik total menggunakan FB menurut Singleton *et al.* (1999). Pada FB, Singleton *et al.* (1999) mensyaratkan waktu inkubasi minimal reaksi senyawa fenolik dengan reagen FC untuk mencapai kestabilan adalah 120 menit. Hasil optimasi waktu kestabilan 90 menit dalam penelitian ini dapat menghemat waktu 30 menit dibandingkan dengan metode analisis yang dikembangkan oleh Singleton *et al.* (1999), Slavin *et al.* (2009) dan Xu dan Chang (2007, 2008a, 2008b), yang menginkubasikan larutan standar dan sampel selama 120 menit untuk mencapai kestabilan. Jika dilihat dari kepraktisan analisis, pengukuran senyawa fenolik menggunakan format MP2 lebih singkat dibandingkan dengan metode MP1, karena meniadakan satu langkah, yaitu tahap pencampuran larutan GA dengan 10% reagen FC dalam *microtube* (Gambar 1).

Pada suhu ruang, reaksi oksidasi sampel oleh reagen FC berjalan lambat dan belum sempurna pada saat pembacaan nilai absorbansi. Oleh karena itu, lama inkubasi dan waktu pembacaan menjadi titik kritis. Hal ini menjadi dasar perlunya larutan standar selalu disertakan setiap kali pengukuran sampel (Waterhouse 2002), seperti yang dilakukan dalam penelitian ini. Percepatan waktu reaksi untuk mencapai kestabilan warna dapat dilakukan antara lain dengan cara meningkatkan suhu reaksi. Menurut George *et al.* (2005) dan Cicco *et al.* (2009), reaksi yang dilakukan pada suhu

40°C dan 50°C mengurangi waktu inkubasi menjadi 20 dan 15 menit dibandingkan dengan suhu ruang. Pada beberapa analisis, reaksi yang melibatkan suhu lebih tinggi berisiko merusak atau mendekomposisi senyawa fenolik yang sensitif terhadap suhu tinggi (*thermolabile*) sehingga hasil pengukuran menjadi lebih rendah dari kandungan fenolik aktual (Magalhaes *et al.* 2010), sehingga langkah ini tidak dilakukan sebagai bagian dari optimasi.

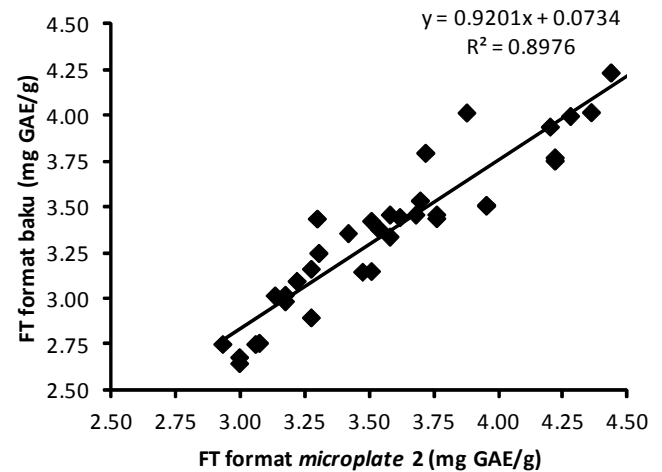
Suatu pengukuran senyawa yang akan dibakukan idealnya memenuhi beberapa persyaratan, di antaranya harus memiliki kisaran konsentrasi linear untuk analisis (*analytical range*) (Prior *et al.* 2005). Pemilihan kisaran deret standar bergantung pada jenis ekstrak yang dianalisis, misalnya kisaran linear 50-2,5 mM GA diperlukan untuk mengukur kandungan fenolik total dalam ekstrak jaringan tanaman (Ainsworth and Gillespie 2007). Kisaran deret standar ini berbeda apabila senyawa fenolik yang diukur adalah yang terkandung dalam ekstrak biji kedelai. Nilai $r = 0,99$ adalah nilai linearitas ideal dari kurva standar, seperti yang ditunjukkan oleh Ainsworth dan Gillespie (2007) serta Xu dan Chang (2007).

Pengukuran senyawa fenolik dalam sampel agar hasil analisis dapat dipertanggungjawabkan harus mempertimbangkan beberapa hal, yaitu (a) perbandingan volume yang tepat antara pereaksi basa dan reagen FC, (b) waktu reaksi optimal dan suhu untuk pembentukan warna, (c) panjang gelombang saat analisis, dan (d) penggunaan GA sebagai kurva standar (Prior *et al.* 2005). Keempat persyaratan ini telah dipenuhi ketika mengoptimasi format MP2 yang dibandingkan dengan FB sebagai referensi.

Tabel 2. Hasil *recovery study* dari dua konsentrasi *spiking* asam galat dalam ekstrak biji kedelai yang dianalisis menggunakan format baku (FB) dan *microplate* 2 (MP2).

Sampel ^a	Spiking asam galat (µg/ml)	Recovery (%) ^b	
		FB	MP2
S1	50	106	95
S2	50	106	94
S3	50	102	90
S4	12,5	100	92
S5	12,5	92	92
S6	12,5	117	90

^a Sampel yang digunakan adalah ekstrak biji kedelai dalam 50% aseton, ^b persentase *recovery* dihitung mengikuti metode yang dikembangkan Blainski *et al.* (2013)



Gambar 4. Korelasi antara kandungan fenolik total dari 36 ekstrak biji kedelai yang diukur dengan metode baku dan *microplate* 2. FT = kandungan fenolik total sampel.

Mengingat reaksi senyawa fenolik dengan reagen FC adalah reaksi kinetik yang hasilnya dipengaruhi oleh konsentrasi reagen FC, tingkat basa, dan suhu inkubasi (Magalhaes *et al.* 2010), maka perbandingan semua reagen yang terlibat dalam reaksi konsisten mengikuti rasio 1:25 untuk GA, reagen FC, dan NC apabila format MP2 dan FB dibandingkan. Menurut Magalhaes *et al.* (2010), perbandingan konsentrasi reagen yang berimbang ini menjadi syarat penting supaya senyawa fenolik bereaksi sempurna dengan reagen FC.

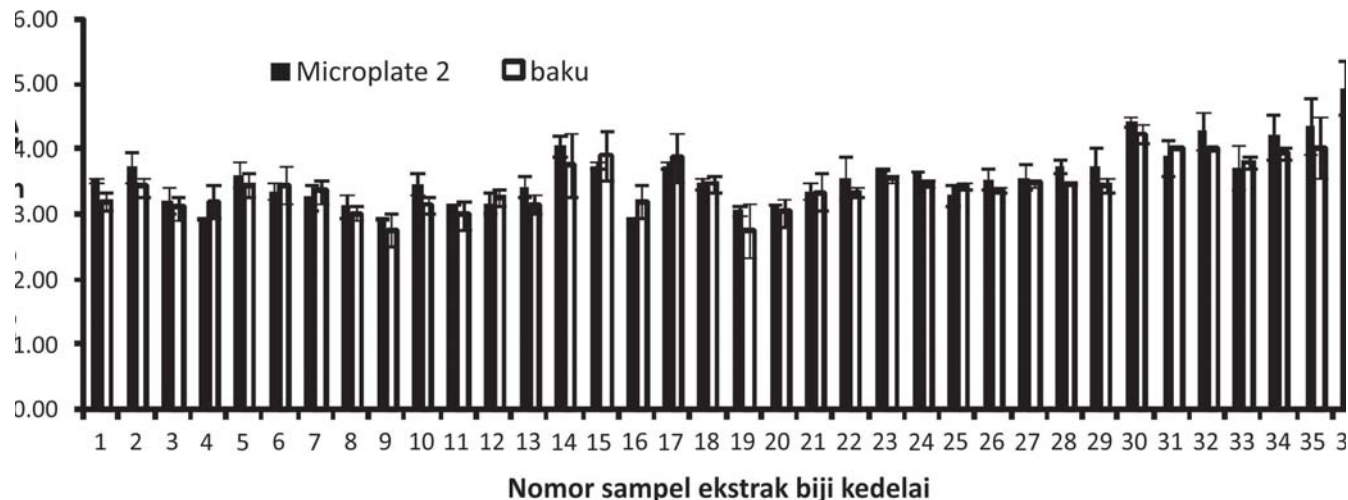
Selain linearitas kurva standar, metode yang akan dibakukan juga harus dapat membedakan atau mengenal senyawa nontarget (Prior *et al.* 2005). Percobaan *spiking* dan *recovery study* bertujuan untuk menjawab ada tidaknya pengaruh senyawa nontarget dalam sampel atau yang disebut dengan efek matriks. Ekstrak sampel yang tidak dimurnikan mengandung banyak senyawa, di antaranya dapat bereaksi dengan reagen FC, terutama senyawa oksidan selain fenolik (Ainsworth and Gillespie 2007). Pengaruh senyawa oksidan lain dapat bersifat menghambat maupun bersinergi (Singleton and Rossi 1965, Huang *et al.* 2005). Efek menghambat terjadi akibat kompetisi oksidan dengan reagen FC atau oksidasi udara setelah penambahan larutan basa (Singleton and Rossi 1965, Ainsworth and Gillespie 2007). Efek sinergi atau aditif terutama bersumber dari gula tereduksi dan asam askorbat (Huang *et al.* 2005, Everette *et al.* 2010).

Penghambatan reaksi FC dapat diketahui apabila nilai *recovery* pada *spiking* dengan GA pada konsentrasi tertentu kurang dari 100%. Efek sinergi yang berasal dari senyawa selain fenolik terdeteksi apabila nilai *recovery* lebih dari 100%. Nilai tersebut ideal untuk sampel tanpa

efek matriks. Pada percobaan menggunakan ekstrak biji kedelai dengan format MP2, pengaruh efek matriks dapat diabaikan karena nilai *recovery* yang diperoleh masuk ke dalam kisaran yang disyaratkan oleh Blainski *et al.* (2013), yaitu 85-115%, atau dapat dikatakan akurat mengingat ekstrak yang digunakan tanpa dipurifikasi.

Pada saat analisis senyawa fenolik menggunakan reagen FC dengan FB atau sampel dianalisis satu per satu, terdapat jumlah maksimal sampel yang mampu ditangani pada saat bersamaan, karena perlu waktu untuk membuang larutan dalam *cuvette*, pencucian *cuvette*, dan pengisian kembali larutan sampel yang akan dibaca nilai absorbansi berikutnya. Langkah terbaik yang dilakukan adalah memberi jeda pembacaan selama 1 menit untuk meminimalkan kesalahan pembacaan karena menghindari perbedaan waktu inkubasi, sehingga penambahan FC dalam sampel juga harus diatur dengan interval 1 menit (Attard 2013). Menurut Waterhouse (2002), seorang analis hanya dapat menangani 20 sampel per hari, yang dibagi menjadi dua kali analisis. Jika masing-masing sampel diulang dua kali dan empat konsentrasi standar, termasuk blanko diukur dalam sekali analisis, maka hanya 50 pembacaan nilai absorbansi dapat dilakukan dalam satu hari. Attard (2013) bahkan menyarankan optimalnya hanya 14 pembacaan dapat dilakukan dalam sekali pengukuran dengan hasil akurat. Cara ini menyita banyak waktu dan penyimpanan pembacaan absorbansi semakin besar apabila bekerja dengan sampel dalam jumlah banyak.

Mikroanalisis senyawa fenolik menggunakan 96-well *microplate* mempunyai keunggulan dan dapat digunakan untuk menganalisis sampel dalam jumlah banyak. Selain itu, pembacaan nilai absorbansi deret



Gambar 5. Kandungan fenolik total dari tiap ekstrak biji kedelai ($n = 36$) yang diukur menggunakan dua format yang berbeda (\square = format baku, \blacksquare = format *microplate 2*). Bar menunjukkan simpangan deviasi dari tiga pengukuran.

standar GA dan semua sampel dapat dilakukan kurang dari 1 menit dengan *microplate reader* sehingga meminimalkan deviasi antarulangan. Dalam satu kali analisis setidaknya 24 sampel dapat diukur apabila delapan deret standar GA termasuk blanko diulang tiga kali. Sisa 72 sumuran dapat digunakan untuk menganalisis 24 sampel dengan tiga ulangan. Apabila dalam satu hari seorang analis dapat mengerjakan enam *microplate* maka 144 sampel dapat diselesaikan. Jika 144 sampel ini dianalisis menggunakan FB maka seorang analis membutuhkan waktu lebih dari 7 hari untuk menyelesaikannya, mengingat analis hanya mampu menyelesaikan 20 sampel per hari. Menurut Attard (2013), pengurangan jumlah deret standar masih mungkin dilakukan dari delapan menjadi enam konsentrasi sehingga sampel yang dianalisis dalam satu *microplate* berjumlah 26 sampel.

Kelebihan lain dari format MP2 adalah menghemat pemakaian reagen dan menghasilkan sedikit limbah. Di beberapa negara yang mengatur residu limbah kimia harus seminimal mungkin, mikroanalisis menjadi salah satu solusi sehingga prosedur analisis yang dikerjakan lebih ramah lingkungan (*greener analytical procedure*) (Magalhaes *et al.* 2010). Terlepas dari beberapa kelebihan yang dimiliki, format MP2 memiliki beberapa kelemahan antara lain memerlukan konsistensi pemipetan reagen karena bekerja dalam skala mikroliter dan perlu pengenceran serta pencampuran reagen secara merata. Adakalanya dijumpai variasi antarulangan yang tinggi dari satu sampel karena tidak konsisten dalam pemipetan. Apabila penyimpangan pembacaan nilai absorbansi antarulangan lebih dari 5% karena pemakaian reagen FC, tergantung pada reaksi kinetik (Waterhouse 2002), maka alternatif yang dapat dilakukan adalah memperbanyak ulangan dari satu sampel.

KESIMPULAN

Pengembangan metode cepat untuk mengukur kandungan fenolik total ekstrak biji kedelai dapat menggunakan reagen FC yang dioptimasi dalam skala mikro dalam *96-well microplate*. Format analisis ini terbukti akurat dengan nilai *recovery* 90-95%. Format MP2 dapat digunakan untuk menganalisis sampel dalam jumlah banyak dan dalam waktu singkat serta memerlukan sedikit reagen sehingga lebih ramah lingkungan. Mikroanalisis ini sangat bermanfaat terutama bila digunakan untuk mengestimasi fenolik total sampel plasma nutfah atau galur hasil persilangan dalam jumlah ribuan untuk mengetahui ekspresi ketahanan kimiawi biji terhadap patogen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Etika Dewi Sukmana, S.Si yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian. Sebagian biaya penelitian ini didanai oleh Pemerintah Indonesia melalui DIPA Kementerian Pertanian, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainsworth, E.A. and K.M. Gillespie. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. protoc.* 2(4):875-877.
- Amarowicz, R. and R.B. Pegg. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *J. Lipid Sci.* 110(10):865-878.
- Arfaoui, A., A. El Hadrami, Y. Mabrouk, B. Sifi, A. Boudabous, I. El Hadrami, F. Daayf, and M. Cherif. 2007. Treatment of chickpea with Rhizobium isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiol. Biochem.* 45(6-7): 470-479.
- Attard, E. 2013. A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Cent. Eur. J. Biol.* 8(1):48-53. DOI: 10.2478/s11535-012-0107-3.
- Berker, K.I., F.A. Ozdemir Olgun, D. Ozyurt, B. Demirata, and R. Apak. 2013. Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 61(20):4783-4791.
- Blainski, A., G.C. Lopes, and J.C.P. De Mello. 2013. Application and analysis of the Folin-Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules.* 18(6):6852-6865.
- Boue, S.M., T.E. Cleveland, C. Carter-Wientjes, B.Y. Shih, D. Bhatnagar, J.M. McLachlan, and M.E. Burow. 2009. Phytoalexin-enriched functional foods. *J. Agric. Food Chem.* 57(7):2614-2622.
- Cicco, N., M.T. Lanorte, M. Paraggio, M. Viggiano, and V. Lattanzio. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* 91(1):107-110.
- Couto, C., L.R. Silva, P. Valentao, E. Velazquez, A. Peix, and P.B. Andrade. 2011. Effects induced by the nodulation with *Bradyrhizobium japonicum* on *Glycine max* (soybean) metabolism and antioxidant potential. *Food Chem.* 127(4): 1487-1495.
- Dardanelli, M.S., F.J.F. De Cordoba, J. Estevez, R. Contreras, M.T. Cubo, M.A. Rodriguez-Carvajal, A.M. Gil-Serrano, F.J. Lopez-Baena, R. Bellogin, H. Manyani, F.J. Ollero, and M. Megias. 2012. Changes in flavonoids secreted by *Phaseolus vulgaris* roots in the presence of salt and the plant growth-promoting rhizobacterium *Chryseobacterium balustinum*. *Appl. Soil Ecol.* 57:31-38.
- Du, G., H.Y. Zhao, Q.W. Zhang, G.H. Li, F.Q. Yang, Y. Wang, Y.C. Li, and Y.T. Wang. 2010. A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in *Radix Puerariae* using microwave-assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1217(5): 705-714.

- Everette, J.D., Q.M. Bryant, A.M. Green, Y.A. Abbey, G.W. Wangila, and R.B. Walker. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *J. Agric. Food Chem.* 58(14):8139-8144.
- George, S., P. Brat, P. Alter, and M.J. Amiot. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 53(5):1370-1373.
- Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53(6):1841-1856.
- Jun-Ming, S., S. Bao-Li, H. Fen-Xia, Y. Shu-Rong, Y. Hua, and A. Kikuchi. 2011. Rapid HPLC method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds. *Agric. Sci. China.* 10(1): 70-77.
- Liu, P., B. Yang, and H. Kallio. 2010. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major*) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.* 121(4):1188-1197.
- Lygin, A.V., S. Li, R. Vittal, J.M. Widholm, G.L. Hartman, and V.V. Lozovaya. 2009. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathol.* 99: 1412-1420.
- Ma, Y. and P.C. Cheung. 2007. Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds by Enzymatic and Chemical Methods A Comparison of Structure-Activity Relationship. *J. Agric. Food Chem.* 55(10): 4222-4228.
- Magalhaes, L.M., F. Santos, M.A. Segundo, S. Reis, and J.L. Lima. 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta.* 83(2):441-447.
- Makoi, J.H. and P.A. Ndakidemi. 2007. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *Afr. J. Biotechnol.* 6(12):1358-1368.
- Malencic, D., M. Popovic, and J. Miladinovic. 2007. Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. *Molecules.* 12:576-581.
- Mandal, S.M., D. Chakraborty, and S. Dey. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant. Signal Behav.* 5(4):359-368.
- Medina-Rejon, A., A. Barrionuevo-Gonzalez, R. Zamora-Ros, C. Andres-Lacueva, R. Estruch, M.A. Martinez-Gonzalez, J. Diez-Espino, and R.M. Lamuela-Raventos. 2009. Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Anal. Chim. Acta.* 634(1):54-60.
- Mikulic-Petkovsek, M., A. Slatnar, R. Veberic, F. Stampar, and A. Solar. 2011. Phenolic response in green walnut husk after the infection with bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 76(3): 159-165.
- Naczki, M. and F. Shahidi. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* 1054(1):95-111.
- Oh, S., J.A. Kim, H. Jeon, J.C. Park, Y.J. Koh, R. Hur, and J.S. 2008. Antifungal activity of eucalyptus-derived phenolics against postharvest pathogens of kiwifruits. *Plant Pathol J.* 24:322-327.
- Prior, R.L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53(10):4290-4302.
- Riedl, K.M., J.H. Lee, M. Renita, S.K. St Martin, S.J. Schwartz, and Y. Vodovotz. 2007. Isoflavone profiles, phenol content, and antioxidant activity of soybean seeds as influenced by cultivar and growing location in Ohio. *J. Sci. Food Agric.* 87:1197-1206.
- Ruiz-Garcia, Y. and E. Gomez-Plaza. 2013. Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture* 3(1):33-52.
- Sanchez-Rangel, J.C., J. Benavides, J.B. Heredia, L. Cisneros-Zevallos, and D.A. Jacobo-Velazquez. 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* 5(21):5990-5999.
- Silva, L.R., M.J. Pereira, J. Azevedo, R. Mulas, E. Velazquez, F. Gonzalez-Andres, P. Valentao, and P.B. Andrade. 2013. Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* enhances the organic and fatty acids content of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds. *Food Chem.* 141(4):3636-3648.
- Singleton, V. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16(3):144-158.
- Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In P. Lester (ed). *Methods in Enzymology.* Academic Press. p.152-178.
- Slavin, M., Z. Cheng, M. Luther, W. Kenworthy, and L.L. Yu. 2009. Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grown soybean lines with altered fatty acid profiles. *Food Chem.* 114(1):20-27.
- Waterhouse, A.L. 2002. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* John Wiley and Sons. p.II.1.1-II.1.8.
- Xu, B. and S.K.C. Chang. 2007. A Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* 72(2):S159-S166.
- Xu, B. and S.K.C. Chang. 2008a. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* 56(16):7165-7175.
- Xu, B. and S.K.C. Chang. 2008b. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 56(18):8365-8373.
- Yusnawan, E. 2013. The effect of rhizobium inoculation on total flavonoid, phenolic contents, and antioxidant activity of soybean seeds. p. SA 478-SA 482. In: Sularso, N. A. Indriyani (eds). *Proceedings National Olympiad and International Conference.* Purwokerto. Muhammadiyah Purwokerto University. SA 478-SA 482.

