

# KANDUNGAN FLAVONOID DAN FENOLIK TOTAL SERTA AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BIJI GALUR-GALUR HARAPAN KEDELAI YANG TERINFEKSI *Phakopsora pachyrhizi*

Eriyanto Yusnawan\* dan Alfi Inayati

Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi  
Jl. Raya Kendalpayak km 8 Kotak Pos 66 Malang 65101

\*e-mail: yusnawan@yahoo.com

## ABSTRAK

Penyakit karat pada tanaman kedelai yang disebabkan oleh *Phakopsora pachyrhizi* merupakan salah satu penyakit utama yang menjadi faktor pembatas peningkatan produksi. Penelitian yang menghubungkan antara kandungan metabolit sekunder biji kedelai dengan infeksi patogen ini jarang dilaporkan. Metabolit sekunder salah satu fungsinya berperan dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap patogen. Metabolit sekunder juga dilaporkan bermanfaat untuk kesehatan manusia. Penelitian bertujuan untuk mendapatkan galur harapan kedelai dengan kandungan flavonoid dan fenolik total yang tinggi setelah terinfeksi *P. pachyrhizi*. Kandungan flavonoid total diukur dengan metode  $AlCl_3$ , sedangkan fenolik total diukur dengan reagen Folin-Ciocalteu. Dari 12 galur yang diuji, galur harapan (GH) 5 dan GH 9 mengalami kenaikan flavonoid total 13% yang sedikit lebih rendah dari varietas Wilis sebagai pembanding (15,6%). GH 5 juga memiliki kandungan fenolik total yang lebih tinggi dibandingkan dengan galur yang lain, yaitu 2,73 mg *gallic acid equivalent/g* atau meningkat 2% setelah infeksi. Aktivitas antioksidan biji galur ini mengalami penurunan 2,3% setelah tanaman terinfeksi penyakit karat.

Kata kunci: kedelai, *Phakopsora pachyrhizi*, fenolik, flavonoid, aktivitas antioksidan

## ABSTRACT

**Total flavonoid, phenolic contents and antioxidant activity of soybean promising line seeds infected by *Phakopsora pachyrhizi*.** Soybean rust disease caused by *Phakopsora pachyrhizi* is one of the most important diseases which limits soybean production. Research on the relationship between plant secondary metabolites and rust pathogen infection is limited. One of the roles of secondary metabolites is plant defense against pathogen infection. These secondary metabolites have also been reported to have beneficial effects to human health. This research aimed to obtain soybean promising lines with high total flavonoid and phenolic contents after being infected with *P. pachyrhizi*. Total flavonoid was determined using  $AlCl_3$  method, whereas total phenolic was estimated using Folin-Ciocalteu reagent. GH 5 and GH 9 had 13% of the increase in total flavonoid. The increase was less than that of Wilis as a check (15.6%). The GH 5 also had total phenolic content higher than that of the others, which was 2.73 mg gallic acid equivalent/g or increased by 2% after infection. Antioxidant activity of the seed of this line decreased by 2.3% after infection.

Keywords: soybean, *Phakopsora pachyrhizi*, phenolic, flavonoid, antioxidant activity

## PENDAHULUAN

Infeksi penyakit karat yang disebabkan oleh *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. menyebabkan kehilangan hasil kedelai hingga 80%, tergantung pada tingkat kerentanan ta-

naman dan waktu infeksi (Twizeyimana *et al.* 2008). Menurut Riberio *et al.* (2009), patogen ini menyebabkan daun lebih cepat menguning dan gugur sebelum pengisian polong. Tanaman kedelai yang terinfeksi patogen ini akan mensintesis senyawa metabolit sekunder, terutama golongan fenolik secara berlebihan (Lygin *et al.* 2009).

Senyawa fenolik dan flavonoid mempunyai peran yang penting sebagai pertahanan kimiawi melawan infeksi patogen dan serangan serangga hama (Jaganath and Crozier 2010). Penelitian secara komprehensif mengenai peran flavonoid sebagai senyawa anti patogen tanaman telah dilaporkan oleh Kramer *et al.* (1984) dan Weidenborner *et al.* (1990). Subklas isoflavon menghambat beberapa patogen tular tanah. Daidzein, genistein, dan glycitein efektif menghambat *Fusarium culmorum* (Kramer *et al.* 1984), *Rhizoctonia solani* dan *Sclerotium rolfsii* (Weidenborner *et al.* 1990).

Dalam beberapa tahun terakhir, peran senyawa fenolik dan flavonoid untuk kesehatan manusia semakin penting dalam perkembangan ilmu nutrisi. Konsumsi jangka panjang makanan yang mengandung senyawa fenolik dan flavonoid terbukti mampu mengurangi risiko penyakit degeneratif seperti kanker endometrium, kanker payudara dan kanker prostat maupun penyakit yang berhubungan dengan defisiensi estrogen (Baird *et al.* 1995, Fournier *et al.* 1998).

Penelitian yang menghubungkan antara infeksi patogen dengan perubahan kandungan flavonoid dan fenolik pada biji kedelai jarang dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan biji galur harapan kedelai dengan kandungan flavonoid dan fenolik total yang tinggi setelah terinfeksi *P. pachyrhizi*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium dan rumah kaca Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, Malang. Penelitian terdiri dari lima tahap, yaitu penanaman dan inokulasi, preparasi sampel, pengukuran kandungan fenolik total, pengukuran kandungan flavonoid total, dan pengukuran aktivitas antioksidan.

**Penanaman dan inokulasi.** Dua set tanaman ditanam dalam pot secara terpisah. Masing-masing genotipe ditanam dalam tiga pot, dua tanaman/pot dan diulang sebanyak tiga kali. Set pertama dilakukan inokulasi karat daun pada umur tiga dan empat minggu setelah tanam, set kedua tidak diinokulasi.

**Preparasi sampel.** Biji-biji galur harapan kedelai dipersiapkan sesuai dengan cara yang dilakukan oleh Xu dan Chang (2007, 2008) dengan 80% metanol sebagai pelarut.

**Pengukuran kandungan fenolik total.** Kandungan fenolik total dianalisis menurut Singleton dan Rossi (1965) dan Singleton *et al.* (1999). Kandungan fenolik total dinyatakan dalam *gallic acid equivalents* (mg GAE/g) menggunakan kurve baku asam galat.

**Pengukuran kandungan flavonoid total.** Flavonoid total dianalisis menggunakan metode yang dikembangkan oleh Heimler *et al.* (2005). Hasil pengukuran dinyatakan dengan (+)-*catechin equivalents* (mg CAE/g) dengan kurve standar (+)-*catechin*.

**Pengukuran aktivitas antioksidan.** Aktivitas antioksidan diukur dengan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) sesuai dengan metode yang dikembangkan oleh Chen dan Ho (1995). Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam Trolox *equivalent* (Mmol TE) per gram sampel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Infeksi *P. pachyrhizi* pada galur-galur harapan kedelai yang diuji menyebabkan perubahan kandungan flavonoid total biji yang bervariasi (antara -6,4–15,6%) (Tabel 1). Tidak semua galur mengalami kenaikan kandungan flavonoid total. Wilis sebagai varietas pembanding merupakan varietas yang responsif terhadap infeksi *P. pachyrhizi*. Kandungan flavonoid total meningkat 15,6% setelah terinfeksi, dari 0,65 mg CAE/g menjadi 0,75 mg CAE/g. Kenaikan kandungan flavonoid total yang hampir sama (7,4–13,7%) dijumpai pada semua galur, kecuali GH 1, GH 6, GH 7, GH 8, GH 10, dan GH 12. Dari galur-galur tersebut, GH 5 dan GH 9 merupakan dua galur yang mengalami kenaikan kandungan flavonoid total yang sedikit lebih rendah dari Wilis, yaitu sekitar 13% setelah terinfeksi karat. Kandungan flavonoid total keduanya meningkat dari 0,62 mg CAE/g menjadi 0,70 mg CAE/g untuk GH 5 dan dari 0,61 mg GAE/g menjadi 0,69 mg CAE/g untuk GH 9.

Tabel 1. Kandungan flavonoid total galur-galur harapan kedelai pada perlakuan inokulasi dan non inokulasi *P. pachyrhizi*.

Galur	Kandungan flavonoid (mg CAE/g)		Kenaikan (%)*
	Inokulasi	Non inokulasi	
GH 1	0,68 bcde	0,64 cd	5,8 bcde
GH 2	0,67 cde	0,60 f	11,5 abc
GH 3	0,69 bc	0,62 def	12,3 abc
GH 4	0,65 de	0,59 f	10,4 abc
GH 5	0,70 b	0,62 def	13,0 abc
GH 6	0,66 de	0,66 bc	0,2 def
GH 7	0,67 cde	0,69 b	-1,7 ef
GH 8	0,68 bcde	0,72 a	-6,4 f
GH 9	0,69 bc	0,61 ef	13,8 ab
GH 10	0,65 e	0,64 cde	2,1 de
GH 11	0,68 bcd	0,63 cde	7,4 abcd
GH 12	0,67 cde	0,64 cde	4,7 cde
Wilis	0,75 a	0,65 cd	15,6 a

Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji LSD ( $\alpha = 5$ ).

\* Angka negatif menunjukkan penurunan kandungan flavonoid total.

Perubahan kandungan fenolik total biji kedelai setelah terinfeksi karat daun juga menunjukkan adanya variasi (-12,6% hingga 12,5%) (Tabel 2). Tidak seperti halnya pada kenaikan kandungan flavonoid total yang mencapai 13%, GH 5 dan GH 9 hanya mengalami kenaikan fenolik total sebesar 2,1% dan 5,5%. Dari dua galur tersebut, hanya GH 5 yang mempunyai kandungan fenolik total tertinggi (2,73 mg GAE/g) setara dengan fenolik total GH 3 (2,60 mg GAE/g) setelah terinfeksi karat. Wilis sebagai varietas pembanding mengalami penurunan kandungan fenolik total sebesar 5,6%, menurun dari 2,52 mg GAE/g menjadi 2,37 mg GAE/g.

Tabel 2. Kandungan fenolik total galur-galur harapan kedelai pada perlakuan inokulasi dan non inokulasi *P. pachyrhizi*.

Galur	Kandungan fenolik (mg GAE/g)		Kenaikan (%)
	Inokulasi	Non inokulasi	
GH 1	2,36 de	2,58 ab	-8,6 fg
GH 2	2,52 bc	2,60 ab	-3,1 def
GH 3	2,60 ab	2,67 a	-2,5 def
GH 4	2,53 bc	2,51 bc	0,9 bcde
GH 5	2,73 a	2,68 a	2,1 bcd
GH 6	2,41 cd	2,43 c	-0,7 cde
GH 7	1,99 f	2,03 e	-1,8 cdef
GH 8	1,97 f	2,25 d	-12,6 g
GH 9	2,23 e	2,11 e	5,5 abc
GH 10	2,07 f	2,27 d	-8,6 fg
GH 11	2,01 f	1,87 f	7,5 ab
GH 12	2,38 d	2,12 e	12,5 a
Wilis	2,37 d	2,52 bc	-5,6 efg

Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji LSD ( $\alpha = 5$ ).

\* Angka negatif menunjukkan penurunan kandungan fenolik total.

Senyawa fenolik dan flavonoid yang terkandung dalam biji kedelai dilaporkan memiliki aktivitas biologis anti radikal bebas yang dapat menangkap senyawa oksigen reaktif dan mempunyai aktivitas menangkap radikal hidroksil dan radikal ion superoksida. Perubahan aktivitas antioksidan dari kedua belas galur berkisar antara -19,4% hingga 6,2% (Tabel 3). Aktivitas antioksidan biji GH 5 mengalami penurunan 2,3% setelah terinfeksi karat, dari 4,52 Mmol TE/g menjadi 4,42 Mmol TE/g. Varietas Wilis mengalami kenaikan aktivitas antioksidan sebesar 2,2%.

Tabel 3. Aktivitas antioksidan galur-galur harapan kedelai pada perlakuan inokulasi dan non inokulasi *P. pachyrhizi*.

Galur	Aktivitas antioksidan (Mmol TE/g)		Kenaikan (%)
	Inokulasi	Non inokulasi	
GH 1	4,44 de	4,48 bc	-0,9 de
GH 2	4,63 abc	4,36 d	6,2 a
GH 3	4,57 bc	4,34 d	5,2 ab
GH 4	4,53 cd	4,45 bc	1,9 cd
GH 5	4,42 e	4,52 b	-2,3 e
GH 6	4,69 a	4,66 a	0,7 cd
GH 7	3,21 f	3,31 g	-3,1 e
GH 8	2,93 g	3,31 g	-11,4 f
GH 9	4,60 abc	4,47 bc	2,8 bc
GH 10	2,79 h	3,46 f	-19,4 h
GH 11	3,27 f	3,85 e	-14,9 g
GH 12	4,65 ab	4,61 a	0,7 cd
Wilis	4,53 cd	4,44 c	2,2 c

Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji LSD ( $\alpha = 5$ ).

\* Angka negatif menunjukkan penurunan aktivitas antioksidan.

Fenolik dan flavonoid total yang diukur pada biji kedelai setelah terinfeksi *P. pachyrhizi* adalah fenolik dan flavonoid yang disintesis selama perkembangan jaringan tanaman dan yang disintesis setelah terinfeksi karat (Lattanzio *et al.* 2006, Petkovsek *et al.* 2011). Respon kenaikan metabolit sekunder yang tidak sama antar galur dimungkinkan karena faktor genetik dan juga disebabkan oleh sintesis metabolit sekunder baik fenolik maupun flavonoid terkonsentrasi pada daerah di sekitar infeksi dan meningkat pada tahap awal infeksi yang diikuti dengan peningkatan aktivitas enzim ammonia liase (Dimberg dan Peterson 2009), terutama pada kasus reaksi hipersensitif, sehingga metabolit sekunder tidak terdistribusi secara merata hingga ke biji.

Faktor lain yang mungkin menjadi penyebab kenaikan kandungan metabolit sekunder yang bervariasi adalah senyawa fenolik akan membentuk polimer berantai panjang yang sukar terdegradasi dan tidak mudah larut seperti yang ditemukan pada beberapa kasus infeksi patogen tanaman. Polimer ini akan membentuk senyawa lignin pada dinding sel (Lygin *et al.* 2009). Fenolik yang tidak mudah larut menjadi tidak terkuantifikasi dengan metode pengukuran dalam penelitian ini.

Peningkatan aktivitas antioksidan biji kedelai salah satunya ditentukan oleh peningkatan kemampuan menangkap radikal bebas secara langsung. Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang berperan dalam proses penangkapan radikal bebas. Awalnya flavonoid teroksidasi oleh radikal dan kemudian berubah menjadi lebih stabil yang membentuk radikal yang kurang reaktif (Korkina and Afanasev 1997). Pada tanaman, peningkatan aktivitas antioksidan merupakan respon untuk melindungi diri dari pengaruh senyawa oksigen reaktif yang biasa dihasilkan oleh patogen di dalam jaringan tanaman (Pritchard *et al.* 2000).

## KESIMPULAN

GH 5 yang mengalami kenaikan kandungan flavonoid dan fenolik total sebesar 13,0% dan 2,1% setelah terinfeksi penyakit karat dapat dipertimbangkan untuk dipilih sebagai galur yang responsif terhadap perubahan kandungan metabolit sekundernya akibat infeksi karat. Pertimbangan lain yang diperhatikan terutama tingkat ketahanan galur terhadap infeksi, penampilan agronomi dan preferensi konsumen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Baird, D.D., Umbach, D.M., Lansdell, L., Hughes, C.L., Setchell, K.D., Weinberg, C.R., Haney, A.F., Wilcox, A.J. and McLachlan, J.A. 1995. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J. Clin. Endocr. Metabol.*, 80:1685–90.
- Chen, C. and Ho, C. 1995. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *J. Food Lipids* 2:35–46.
- Dimberg, L.H and Peterson, D.M. 2009. Phenols in spikelets and leaves of field-grown oats (*Avena sativa*) with different inherent resistance to crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*). *J. Sci Food Agric.*, 89:1815–1824.
- Fournier, D.B., Erdman, J.W. and Gordon, G.B. 1998. Soy, its components, and cancer prevention: a review of the in vitro, animal, and human data. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 7: 1055–65.
- Heimler, D., Vignolini, P., M.G., and Romani, A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant

- activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *J. Agric. Food Chem.*, 53:3053–3056.
- Jaganath, I.B and Crozier, A. 2010. Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. In C.G. Fraga (ed.). *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. John Wiley and Sons, Inc. 1–49 pp.
- Korkina L.G., dan Afanas'ev, I.B. 1997. Antioxidant and cleating properties of flavonoid. *Adv Pharmacol.* 38:151–163.
- Kramer, R.P., Hindorf, H., Jha, H.C., Kallage, J. and Zilliken, F. 1984. Antifungal activity of soybean and chickpea isoflavones and their reduced derivatives. *Phytochemistry*, 23: 2203–2205.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Adv.Res.* 23–67.
- Lygin, A. V., Li, S., Vittal, R., Widholm, J.M., Hartman, G.L., and Lozovaya, V.V. 2009. The Importance of Phenolic Metabolism to Limit the Growth of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathol.* 99(12):1412–1420.
- Petkovsek, M.M., Slatnar, A., Veberic, R., Stampar, F., Solar, A. 2011. Phenolic response in green walnut husk after the infection with bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Physiol. Mol. Plant pathol.*, 76:159–165.
- Pritchard, S.G., Santen, E.V., Qiu J., Weaver, D.B., Prior, S.A., Roger, H. 2000. The Influence of elevated CO<sub>2</sub> on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Aust J. Plant Physiol.*, 2:1061–1068.
- Ribeiro, A.S., Ferraz de Toledo, J.F. and Ramalho, M.A.P. 2009. Selection Strategies of Segregant Soybean Populations for Resistance to Asian Rust. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2009001100012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2009001100012&script=sci_arttext) [16 August 2012].
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16:144–158.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. 1991. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Lester, P. (ed.) *Methods in Enzymol.* Academic Press.
- Twizeyimana, M., Ojiambo, P.S., Ikotun, T., Ladipo, J.L., Hartman, G.L., and Bandyopahyay, R. 2008. Evaluation of soybean germplasm for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria. *Plant Dis.*, 92:947–952.
- Weidenborner, M., Hindorf, H., Chandra, J.H., Tsotsonos, P. and Egge, H. 1990. Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytochemistry*, 29:801–803.
- Xu, B. and Chang, S.K.C. 2007. A Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*, 72:S159–S166.
- Xu, B. and Chang, S.K.C. 2008. 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.*, 56:8365–8373.