

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KULIT BUAH KACANG KRATOK
(PHASEOLUS LUNATUS) DAN KULIT BUAH KACANG GUDE (CAJANUS CAJAN)
DENGAN METODE DPPH SERTA PENETAPAN KADAR TOTAL FLAVONOID
DAN FENOL**

Wempi Budiana*, Aris Suhardiman, Opik Kirana

Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Jl Soekarno Hatta No 754 Cibiru Bandung, Indonesia

Email: wempi.budiana@stfb.ac.id

Received: 29 October 2018; Revised: November 2018; Accepted: December 2018; Available online: January 2019

ABSTRACT

Free radicals are molecules or atoms that have one or more unpaired electrons. Free radical compounds are very reactive and always try to find an electron pair so that the condition is stable. The presence of free radicals in the body is the cause of various chronic and degenerative diseases. This study aimed to determine the antioxidant activity and total flavonoid content and total phenolics from plant extracts of rind Phaseolus lunatus and Cajanus cajan. Extraction was carried out by using reflux method using solvents in stages, n-hexane, ethyl acetate, and ethanol. Evaluation of antioxidant activity was carried out by TLC and visible UV-Vis spectrophotometry with DPPH method. Determination of total flavonoid content, total phenolics using UV-Vis spectrophotometry. The results of antioxidant activity testing, the total content of flavonoids and phenols showed that ethanol extract of Cajanus cajan rind was the best with IC₅₀ values of 22.07 µg / mL, 2.39 mg QE / 100 mg, 9.83mg GAE / 100 mg. The conclusion was that the ethanol extract of rind of Cajanus cajan had very strong antioxidant activity.

Keywords: DPPH, Cajanus cajan, Phaseolus lunatus.

ABSTRAK

Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Senyawa radikal bebas sangat reaktif dan selalu berusaha mencari pasangan elektron agar kondisinya stabil. Adanya radikal bebas dalam tubuh menjadi penyebab dari berbagai penyakit kronis dan degeneratif. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan dan kandungan flavonoid total dan fenolat total dari ekstrak tumbuhan kulit buah *Phaseolus lunatus* dan kulit buah *Cajanus cajan*. Ekstraksi dilakukan dengan metode refluks menggunakan pelarut secara bertingkat, n-heksana, etil asetat, dan etanol. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara KLT dan spektrofotometri UV-Sinar tampak dengan metode DPPH. Penentuan kadar flavonoid total, fenolat total menggunakan spektrofotometri UV-Visibel. Hasil pengujian aktivitas antioksidan, kadar total flavonoid dan fenol menunjukkan ekstrak etanol kulit buah kacang gude adalah yang paling bagus dengan nilai berturut-turut nilai IC₅₀ sebesar 22,07 µg/mL, 2,39 mg QE/100 mg, 9,83 mg GAE/100 mg. Kesimpulan hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah kacang gude memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat.

Kata kunci: DPPH, *Cajanus cajan*, *Phaseolus lunatus*.

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Senyawa radikal bebas sangat reaktif dan selalu berusaha mencari pasangan elektron agar kondisinya stabil. Radikal bebas pada konsentrasi yang tinggi dapat menghasilkan stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan struktur sel, termasuk kerusakan lipid, protein dan DNA. Adanya radikal bebas dalam tubuh menjadi penyebab dari berbagai penyakit kronis dan degeneratif (Pham-Huy, 2008).

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat laju oksidasi molekul lain atau menetralkan radikal bebas (Fajriani, dkk., 2007). Tubuh kita memerlukan suatu antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas mengingat begitu banyaknya radikal bebas yang berasal dari luar tubuh seperti makanan yang mengandung bahan pengawet, pewarna, lalu polusi udara, debu, asap rokok dan radiasi ultraviolet merupakan penyumbang radikal bebas yang cukup besar. Tubuh tidak mempunyai sistem pertahanan antioksidan yang berlebihan, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka dibutuhkan antioksidan eksogen (Zuhra, dkk., 2008).

Kacang kratok (*Phaseolus lunatus*) dan kacang gude (*Cajanus cajan*) merupakan tanaman yang termasuk kedalam famili Fabaceae. Kedua tanaman ini semula adalah tumbuhan liar dengan sebaran sangat luas dikawasan beriklim sedang dan dataran tinggi kawasan tropis. Tanaman kacang kratok merupakan tanaman yang merambat rendah dan mempunyai biji yang berbentuk kecil (Munip, 2008). Sedangkan pada tanaman gude merupakan perdu dengan tinggi mencapai 3 m, tumbuhan ini juga merupakan kacang tahunan dengan umur yang tidak terlalu panjang hanya 1-5 tahun. Kedua tanaman ini sangat mudah tumbuh. Pada saat ini, kecenderungan masyarakat untuk kembali kepada obat bahan alam semakin meningkat serta potensinya sebagai obat bahan alam yang banyak, sangat menarik perhatian untuk dapat dikembangkan lagi, salah satunya adalah pengujian aktivitas antioksidan pada kulit buah kacang kratok dan kulit buah kacang gude. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk pengembangan obat tradisional pada umumnya dan mampu menjadi pilihan alternatif sebagai penangkal radikal bebas.

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan dengan banyaknya kandungan-kandungan metabolit pada kacang kratok (*Phaseolus lunatus*) dan kacang gude (*Cajanus cajan*) membuat tanaman tersebut terutama dari ekstrak tanaman kacang ini jika dimanfaatkan mempunyai aktivitas antioksidan. Kulit biji kacang kratok mengandung senyawa bioaktif triptamin, alkilamin, steroid, flavonoid, kumarin, kardenolin dan kacang gude juga diketahui bahwa gude mengandung flavonoid, [saponin](#), dan [polifenol](#). Sedangkan batangnya mengandung flavonoid, saponin, dan [tanin](#). Selain itu dalam kacang kratok telah dilakukan penelitian terhadap aktivitas antioksidan secara *in vitro* dari fraksi biji kacang kratok (Widowati dkk, 2007) yang dilaporkan memiliki khasiat sebagai antioksidan. Mengingat pentingnya fungsi senyawa yang berperan sebagai antioksidan, maka penelitian dari tanaman kulit kacang kratok (*Phaseolus lunatus*) dan kacang gude (*Cajanus cajan*) ini perlu dilakukan.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dilakukan meliputi beberapa tahap, yaitu penyiapan bahan, karakterisasi simplisia, ekstraksi, skrining fitokimia, pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH serta penetapan kadar total fenol, flavonoid dan karotenoid.

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman, dan pengolahan bahan. Karakterisasi simplisia meliputi penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar abu tidak larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar air dan susut pengeringan.

Penapisan fitokimia (skrining fitokimia). Penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, kuinon, steroid/triterpenoid dan polifenol (Farnsworth, 1966).

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode ekstraksi refluks bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary vaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental yang masih dapat dituang.

Pengujian aktivitas antioksidan secara kualitatif dilakukan dengan penotolan pada KLT dimana perbandingan yang digunakan adalah vitamin C, kemudian digunakan DPPH 0,2 % dalam metanol sebagai penampak bercak. Adanya aktivitas antioksidan ditunjukkan secara visual oleh bercak berwarna kuning atau dengan latar belakang ungu pada lempeng, yang stabil selama 30 menit.

Pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif dengan metode peredaman DPPH. menggunakan spektrofotometri UV- sinar tampak melalui pencampuran larutan DPPH dengan larutan uji dengan perbandingan 1:1, volume kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan (Apak et al, 2007).

Kadar fenol total ekstrak ditentukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu, asam galat digunakan sebagai standar. Hasil dinyatakan sebagai miligram GAE (ekuivalensi asam galat) dalam 100 gram simplisia (Folin, 1944). Penetapan kadar Flavonoid total dilakukan dengan metode Ordon, kuersetin digunakan sebagai standar hasilnya dinyatakan sebagai g QE/100 g (Ordon et al, 2006).

Alat dan Bahan

Alat : alat refluks, neraca analitik, *beaker glass*, tabung reaksi, *erlenmeyer*, kaca arloji, gelas ukur, cawan porselen, batang pengaduk, aluminium foil, *plastic wrap*, kuvet, labu ukur, pipet volume, spektrofotometer UV-Visibel Shimadzu 1800, oven, spatel, kertas saring abu, chamber, *rotary evaporator*.

Bahan: ekstrak kulit buah kacang kratok dan kulit buah kacang gude, metanol p.a, kloroform, *n*-heksana, etil asetat, etanol 96%, silika F₂₅₄, asam galat, pereaksi *Folin-Ciocalteu*, kuersetin, toluen, butanol, aseton, asam format, amil alkohol, natrium hidroksida, aluminium (III) klorida 10%, bubuk Magnesium, DPPH sigma, Pereaksi *Dragendorff* (bismuth (III) nitrat, asam nitrat, kalium iodida), pereaksi *Mayer* (merkuri (III) klorida, kalium iodida), serbuk magnesium, gelatin, pereaksi *Lieberman-Bouchard* (asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi simplisia bertujuan untuk memastikan kualitas dari suatu simplisia yang digunakan. Pemeriksaan karakteristik simplisia meliputi penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar abu larut air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol dan susut pengeringan.

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Simplisia

Uji karakterisasi	Hasil pengamatan %(b/b)	
	Kulit buah kacang kratok	Kulit buah kacang gude
Kadar Abu Total	6,291	7,253
Kadar Abu Larut Air	3,213	4,221
Kadar Abu Tidak Larut Asam	2,525	2,145
Kadar Sari Larut Air	32	31
Kadar Sari Larut Etanol	21,5	22,6
Kadar Air	8,312*	8,521*
Susut Pengeringan	9,98	9,55

Keterangan *: % v/b

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa apa saja yang terdapat di dalam simplisia. Skrining fitokimia untuk kulit buah kacang kratok dan kulit buah kacang gude meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, kuinon dan steroid/triterpenoid.

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia

Golongan Senyawa	Hasil	
	Serbuk simplisia kulit buah kacang kratok	Serbuk simplisia kulit buah kacang gude
Alkaloid	+	-
Flavonoid	+	+
Saponin	-	+
Kuinon	+	+
Tanin FeCl ₃ 1%	+	+
Steroid	-	-
Triterpenoid	+	+
Tanin (gelatin 1%)	-	-

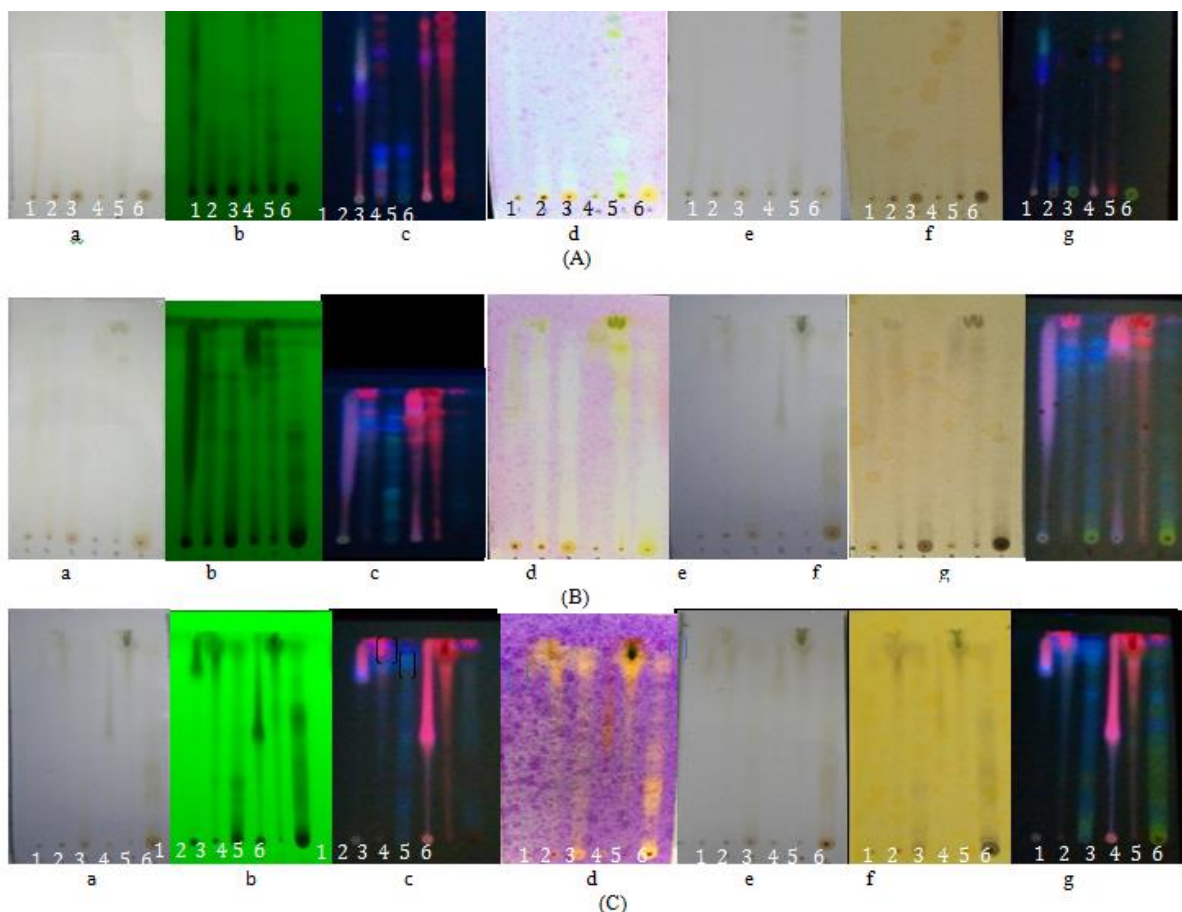
Keterangan : (+) dideteksi terdapat senyawa
 (-) dideteksi tidak terdapat senyawa

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan secara bertingkat, simplisia sebanyak 200 gram diekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 96%. Refluks untuk masing-masing sampel dilakukan sebanyak 3 kali pada rentang suhu 70 – 75 °C. Hasil ekstraksi dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ini bertujuan untuk menarik senyawa yang terkandung pada simplisia sesuai dengan kepolarannya.

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak

Simplisia	Ekstrak pekat (g)	Rendemen (%)
Kacang kratok n-heksana	1	0,5
Kacang kratok etil asetat	1,57	0,79
Kacang kratok etanol 96%	13,58	6,79
Kacang gude n-heksana	1,34	0,67
Kacang gude etil asetat	3,17	1,58
Kacang gude etanol 96%	34,22	17,11



Gambar 1 : Kromatografi lapis tipis ekstrak *Phaseolus lunatus* dan , *Cajanus cajan* fase diam silica gel GF₂₅₄ pra salut dan pengembang (A) non polar [n-heksana – etil asetat (7:3)], (B) pengembang semi polar [Kloroform – metanol (9:1)], (C) pengembang polar [etil asetat -asam format – air(8:1:1)]. ekstrak *Phaseolus lunatus*: (1) ekstrak n-heksana, (2) ekstrak etil asetat, (3) ekstrak etanol. ekstrak *Cajanus cajan* : (4) ekstrak n-heksana, (5) ekstrak etil asetat, (6) ekstrak etanol, (a) visual, (b) sinar UV λ 254 nm, (c) sinar UV λ 365 nm, (d) penampak bercak DPPH 0,2% dalam MeOH, (e) H₂SO₄ 10%, (f) AlCl₃ 10 %, (g) FeCl₃ 10%.

Dari hasil pemantauan ekstrak dengan membandingkan tiga fase gerak pada tingkat kepolaran yang berbeda-beda dengan menggunakan fase gerak non polar, semi polar, dan polar bahwa keenam ekstrak ketika dilihat lebih spesifik yang aktif antioksidan pada ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol yang ditandai dengan terdapat bercak warna kuning pada latar belakang ungu setelah disemprotkan DPPH 0,2%. Akan tetapi jika dilihat dari tingkat kekuatan antioksidan, termasuk tingkat kekuatan antioksidan yang sangat lemah, namun jika pada ekstrak etanol *Cajanus cajan* tingkat kekuatan antioksidan nya sangat kuat. Lalu digunakan penampak bercak FeCl₃ 10% untuk melihat adanya golongan senyawa fenol yang ditandai dengan adanya bercak warna hitam setelah disemprotkan penampak bercak FeCl₃ 10% dan hasilnya menunjukkan warna hitam(f). Pada senyawa golongan flavonoid digunakan penampak bercak AlCl₃ 10%. Flavonoid akan berwarna kuning kehijauan setelah disemprotkan dengan penampak bercak AlCl₃ 10% pada sinar UV λ 365 nm. Akan tetapi dari keenam ekstrak yang menimbulkan warna kuning kehijauan hanya pada ekstrak etanol.

Penetapan Kadar Total Flavonoid dan Fenolat

Penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak kulit buah kacang kratok dan kacang gude. dilakukan dengan cara kolorimetri menggunakan Metode Ordon, yaitu suatu metode menggunakan AlCl₃ sebagai pembentuk kompleks, yang akan membentuk warna dengan flavonoid. Intensitas warna diukur secara spektrofotometri. Penetapan kadar fenol menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu*.

Prinsip metode *Folin-Ciocalteu* adalah reaksi oksidasi dan reaksi kolorimetrik untuk mengukur semua senyawa fenolik dalam sampel uji. Pereaksi *Folin-Ciocalteu* merupakan larutan kompleks ion polimerik yang dibentuk dari asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfatungstat.

Tabel 4. Hasil Kadar Flavonoid Total

Sampel	Kadar Flavonoid mg QE/100 mg Ekstrak	
	Kulit buah kacang kratok	Kulit buah kacang gude
n-Heksana	0,33±0,03	1,43±0,11
Etil asetat	1,79±0,02	1,94±0,01
Etanol 96%	1,28±0,01	2,39±0,16

Berdasarkan hasil yang diperoleh kadar flavonoid terendah terdapat pada ekstrak n-heksana kulit buah kacang kratok sebesar 0,33±0,03 mg QE/mg Ekstrak, sedangkan kadar flavonoid tertinggi terdapat pada ekstrak etanol kulit buah kacang gude yaitu 2,39±0,16 mg QE/mg ekstrak. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan flavonoid yang terdapat pada ekstrak etanol kulit buah kacang gude paling banyak dibandingkan dengan ekstrak yang lainnya.

Tabel 5. Hasil Kadar Fenol Total

Sampel	Kadar Fenol mg GAE/100 mg Ekstrak	
	Kulit buah kacang kratok	Kulit buah kacang gude
n-Heksana	2,40±0,39	2,83±0,57
Etil asetat	3,11±0,57	7,97±0,16
Etanol 96%	4,86±0,29	9,83±0,78

Dari hasil tabel penetapan kadar fenol total dapat disimpulkan bahwa sampel yang memiliki kadar fenol paling tinggi terdapat pada ekstrak etanol 96% Kulit buah kacang gude yaitu sebesar 9,83±0,781 mg GAE/100 mg ekstrak. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan fenol yang terdapat pada ekstrak etanol 96% Kulit buah kacang gude paling banyak dibandingkan dengan ekstrak yang lainnya.

Uji Aktivitas Antioksidan DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit buah kacang kratok dan kacang gude dilakukan secara kuantitatif dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) dimana pengujiannya dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Tabel 5. Hasil Aktivitas Antioksidan DPPH

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL /ppm)	
	Kulit buah kacang kratok	Kulit buah kacang gude
n-Heksana	1395,93±0,12	1263,27±0,13
Etil asetat	461,81±0,12	262,92±0,11
Etanol 96%	358,66±0,12	22,07±0,14
Standar Vitamin C	8,931±0,011	

Berdasarkan hasil yang diperoleh pengujian aktivitas antioksidan yang paling kuat terdapat pada ekstrak etanol 96% kulit buah kacang gude dimana diperoleh nilai IC_{50} sebesar 22,07 $\mu\text{g/mL}$ artinya pada ekstrak etanol tersebut memiliki banyak senyawa yang mendonorkan elektronnya pada radikal bebas DPPH. Sedangkan aktivitas antioksidan yang paling lemah terdapat pada ekstrak n-heksana kacang kratok dengan nilai IC_{50} 1395,93 $\mu\text{g/mL}$. Pengujian antioksidan pada ekstrak ini dibandingkan dengan antioksidan yang sudah ada yaitu vitamin C (asam askorbat). Penggunaan pembandingan ini untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan yang ada pada setiap ekstrak, dibandingkan dengan antioksidan sintetik yang sering digunakan seperti vitamin C. Dari hasil yang didapat, nilai IC_{50} dari berbagai ekstrak, data yang mendekati hanya ekstrak etanol 96% pada tanaman kulit kacang gude.

KESIMPULAN

Dari hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak yang tertinggi terdapat pada ekstrak etanol kulit buah kacang gude yang hasilnya (IC_{50}) yaitu 22,07 $\mu\text{g/mL}$ yang termasuk kedalam antioksidan yang sangat kuat. Pada hasil penetapan kadar fenol total hasil tertinggi terdapat pada ekstrak etanol 96% kacang gude yaitu $9,837 \pm 0,7818$ mg GAE/100mg ekstrak. Dan juga Pada hasil penetapan kadar flavonoid total tertinggi terdapat pada ekstrak etanol 96% kacang gude yaitu $2,394 \pm 0,1626$ mg QE/100 mg ekstrak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan, Direktorat Riset dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DRPM) Kemenristek DIKTI yang telah memberikan dana dalam skema Penelitian Dosen Pemula (PDP) tahun anggaran 2018 sesuai surat keputusan Nomor 1/EKPT/2018.

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. : Farmakope Herbal Indonesia Jilid I, Depkes RI, Jakarta.
2. Depkes RI., 2001. Pedoman Pelayanan Pusat Sterilisasi (CSSD) di Rumah Sakit. Departemen Kesehatan RI, Jakarta, Hal : 1-7.
3. Ditjen POM (2000). Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
4. Fajriani, S., Darmawan, A., Sundowo, A., dan Artanti, N. 2007. Isolasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Etil Asetat Daun Benalu (*Dendrophthoe pentandra* L. Miq) yang tumbuh pada Inang Lobi-Lobi. *Jurnal Kimia Indonesia*, **2(1)**, 17-20
5. Farnsworth, N.R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **55 (3)**, 263.
6. Folin, Octo, Ciocalteu dan Vintila. 1944. On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *Jour. Bio Chem.*, 73,627-650.
7. Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Edisi kedua, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerbit ITB, Bandung
8. Heyne, K., 1987, Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid II Badan Litbang Kehutanan, Jakarta.
9. Molyneux, P. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science Technology*. **26(2)**,211–219.
10. Munip, A. 2001. *Potensi Tanaman koro dalam upaya Meningkatkan kegiatan Agribisnis*. Yogyakarta: Simposium Nasional Perhimpunan Ilmu Pemuliharaan Tanaman Indonesia.
11. Ordonez, A.A., Gomez, J.G, Vattuone, M.A., dan Isla, M.I. 2006. Antioxidant Activities of *Sechium edulesvuart* Extract, *Food Chemistry*, **97**, 452-458.
12. Pham-Huy LA, He Hua, dan Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*, **4(2)**, 89–96.
13. Robinson, T. 2000. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Edisi ke-4 Terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB Press, Bandung.
14. Winton dalam Eko. 2001; Munip, 2008: Tinjauan Pustaka Koro Glinding (*Phaseolus lunatus*).
15. Wahyu Widowati, M.Si, Retnaningsih, MP, dan Lindayani. 2007. Isolasi Senyawa Antioksidan dan Antidiabetes dari Biji Kacang Koro. UNIVERSITAS KATOLIK.

16. Zuhra, C.F., Tarigan, J. dan Sitohang, H. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgynous* (L) Merr). *Jurnal Biologi Sumatera*, **3(1)**, 7-10.