

Uji Aktivitas Ekstrak Terpurifikasi Daun Umbi Bit (*Beta vulgaris*) Sebagai Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya

Activity Test Of The Purified Extract Bit Leaves (*Beta vulgaris*) as Antioxidant and Determination Of Total Flavonoid Content

Diah Pratimasari^{1*}, Dian Puspitasari², Noor Anisa Mahanani³^{1,2,3} Bachelor Pharmacy, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Indonesia

Article Info	ABSTRAK
Article history: Received 10,20,2021 Revised 11,29,2023 Accepted 12,12,2023	Ekstrak etanol daun umbi bit memiliki kandungan senyawa fenol dan flavonoid yang tinggi, sehingga dapat berpotensi sebagai antioksidan. Ekstrak etanol daun umbi bit memiliki kelemahan masih tercampur dengan komponen lain yang tidak diperlukan sehingga pengembangan sediaan menjadi terbatas. Terkait hal tersebut, penelitian ini bermaksud untuk menghilangkan senyawa yang tidak dibutuhkan sebagai antioksidan, serta untuk melihat pengaruh purifikasi terhadap aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid total dalam ekstrak. Ekstrak terpurifikasi diperoleh melalui fraksinasi suspensi ekstrak daun umbi bit dengan menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya secara berurutan yaitu n-heksana dan etil asetat. Uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap Ekstrak Etanol Daun Umbi Bit (EEDUB), Ekstrak Terpurifikasi Daun Umbi Bit (ETDUB) dan kuersetin sebagai kontrol positif. Aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil (DPPH). Kadar flavonoid total dari EEDUB dan ETDUB ditentukan dengan spektrofotometer menggunakan AlCl ₃ . Aktivitas antioksidan yang dihasilkan EEDUB adalah IC ₅₀ 157,87 µg/mL, sedangkan ETDUB memiliki nilai IC ₅₀ 129,60 µg/mL. Kadar flavonoid total dari EEDUB adalah 2,82% ± 0,85 QE, sedangkan kadar flavonoid total ETDUB adalah 2,90 ± 1,16 % QE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ETDUB memiliki kadar kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan EEDUB. Hal ini juga menunjukkan proses purifikasi ekstrak pada daun umbi bit belum maksimal
Kata kunci DPPH Kolorimetri Spektrofotometer UV Fraksinasi	
Keywords: DPPH Colorimetry Spectrophotometer UV Fractionation	
	ABSTRACT The ethanol extract of beetroot leaves contains high levels of phenolic and flavonoid compounds, making it potentially beneficial as an antioxidant. However, the ethanol extract of beetroot leaves has a disadvantage as it is still mixed with other components that are not necessary, limiting its formulation development. In relation to this, the purpose of this research is to eliminate unwanted compounds as antioxidants and to observe the impact of purification on the antioxidant activity and total flavonoid content of the extract. The production of purified extract involves fractionating the suspension of beetroot leaf extract using solvents with different polarities, namely n-hexane and ethyl acetate, in sequence. Antioxidant activity tests are conducted on Ethanol Extract of Beetroot Leaves (EEDUB), Purified Extract of Beetroot Leaves (ETDUB), and quercetin as a positive control. Antioxidant activity is assessed using 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH). The total flavonoid content of EEDUB and ETDUB is determined with a spectrophotometer using AlCl ₃ . The antioxidant activity of EEDUB is indicated by an IC ₅₀ value of 157.87 µg/mL, while ETDUB has an IC ₅₀ value of 129.60 µg/mL. The total flavonoid content of EEDUB is 2.82% ± 0.85 QE, and for ETDUB, it is 2.90% ± 1.16 QE. The research results show that ETDUB has a higher flavonoid content and antioxidant activity compared to EEDUB. This also indicates that the purification process of the beetroot leaf extract has not reached its maximum effectiveness.

Corresponding Author:

Diah Pratimasari

Bachelor Pharmacy, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Indonesia

Jl. Raya Solo - Baki, Bangorwo, Kwarasan, Kec. Grogol, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah 57552

Email: diah_pratimasari@stikesnas.ac.id

This is an open-access article under the [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.

1. PENDAHULUAN

Ketidakseimbangan radikal bebas dalam tubuh dapat mengakibatkan berbagai macam penyakit diantaranya diabetes melitus, *heart disease*, *atherosclerosis*, penyakit liver dan kanker [1] Kondisi tersebut memerlukan asupan antioksidan dari luar tubuh untuk menyeimbangkan reaksi dari radikal bebas tersebut. Flavonoid adalah senyawa bahan alam dengan potensi antioksidan [2]

Senyawa flavonoid tersebar luas di alam dalam buah-buahan maupun sayuran, salah satunya adalah daun umbi bit [3], [4]. Tanaman bit adalah tanaman yang berasal dari wilayah mediterania. Tanaman ini banyak dimanfaatkan sebagai asupan untuk diet [3]. Buah bit mengandung pigmen betalain yang menyebabkan warna umbi buah bit (*Beta vulgaris*) memiliki warna merah keunguan. Pigmen tersebut juga terdapat dalam daun umbi bit. Selain mengandung betalain, daun umbi bit juga kaya akan flavonoid, terutama kuersetin dan kaemferol, vitamin, mineral, glikosida, saponin, tannin dan komponen fenolik lainnya[4].

Ekstrak etanol daun umbi bit memiliki kandungan fenolik yang tinggi yaitu 16,55 mg GAE/g FW dan kandungan flavonoid yang juga tinggi yaitu 1,5 mg QE/g FW[3]. Namun, ekstrak kasar memiliki kelemahan yaitu masih tercampur dengan komponen lain yang tidak diperlukan sehingga pengembangan sediaan akan terbatas. Purifikasi ekstrak dapat dilakukan untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang tidak diinginkan seperti klorofil, lemak, dan resin dari ekstrak terpurifikasi daun umbi bit (*Beta vulgaris* L) sebagai antioksidan.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa proses purifikasi ekstrak secara langsung menggunakan etil asetat menghasilkan total flavonoid yang tidak berbeda signifikan dengan ekstrak kasarnya [5]. Hal tersebut mendasari penelitian ini untuk melakukan proses fraksinasi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya. Kebaruan pada penelitian ini adalah adanya proses purifikasi terhadap ekstrak etanol daun umbi bit, sehingga diharapkan dapat menghasilkan berupa ekstrak umbi bit yang terpurifikasi dengan baik sehingga lebih optimal dalam memberikan aktivitas antioksidan.

2. METODE

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang dipergunakan oven (Memmert®), *rotary evaporator* (IKA®), *waterbath* (Memmert®), spektroskopi UV-Vis (Shimidzu®), kuvet (Hellma®), *moisture balance* (Radwag®), corong pisah (Iwaki®). Bahan yang dipergunakan diantaranya adalah daun *Beta vulgaris* var Ribra (L) Moq.), pelarut teknis (etanol 70%, n-heksana, etil asetat), pelarut pro analisis: etanol (Merck®), *2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil* (Sigma Aldrich®), AlCl₃ ((Merck®), Standar kuersetin (Sigma Aldrich®).

2.2. Cara kerja

Persiapan Bahan

Daun *Beta vulgaris* yang dipanen dari Kecamatan Selo, Boyolali, Jawa Tengah disortasi basah, dilanjutkan dengan pencucian dan perajangan. Rajangan daun umbi bit kemudian dikering anginkan selama kurang lebih 24 jam. Selanjutnya proses pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40°C, dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan mesh no 60.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Umbi Bit (EEDUB).

Serbuk simplisia daun umbi bit sebanyak 1 kg di maserasi dengan 7,5 Liter etanol teknis 70% selama total 5 hari. Pada hari ke-3 dilakukan proses penyaringan dan



perendaman kembali dengan pelarut yang sama sebanyak 2,5 liter selama sisa waktunya. Ekstrak cair yang dihasilkan perendaman pertama serta kedua kemudian digabung dan dipekatkan hingga kental.

Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Daun Umbi Bit (ETDUB).

EEDUB ditimbang sebanyak 20 gram dan disuspensikan dalam 50 mL etanol 30%. Kemudian dilakukan purifikasi dengan metode fraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya secara berurutan. Pelarut pertama yang digunakan adalah pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:1 dengan etanol 30%. Setelah itu fraksinasi dilanjutkan dengan pelarut etil asetat. Fraksi etil asetat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan, hingga diperoleh ekstrak kental terpurifikasi daun umbi bit (ETDUB) [6]

Kontrol Kualitas EEDUB dan ETDUB

Kontrol kualitas EEDUB dan ETDUB dilakukan berdasarkan pengamatan tampilan fisik masing-masing ekstrak dan analisis kandungan fitokimianya. Kandungan fitokimia yang dianalisis adalah senyawa polifenol, flavonoid, saponin, alkaloid dan steroid dengan menggunakan reagen untuk skrining fitokimia [7]

Uji Aktivitas Antioksidan EEDUB dan ETDUB

Aktivitas antioksidan EEDUB dan ETDUB dilakukan menggunakan metode yang disesuaikan dari penelitian Murwanto dan Santosa (2012). Konsentrasi larutan baku DPPH adalah 0,4 mM dalam etanol pa. Larutan uji dibuat dengan mereaksikan 2,0 mL larutan baku DPPH dan sampel uji pada beberapa konsentrasi kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol pa dan ditunggu selama 35 menit. Larutan uji yang dihitung aktivitas penghambatan oksidannya adalah EEDUB, ETDUB dan kontrol positif yaitu kuersetin. Larutan kontrol dan berbagai larutan uji setelah ditunggu 35 menit, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi tersebut selanjutnya di hitung % penangkap radikal dengan menggunakan persamaan 1 :

$$\frac{\text{Abs kontrol DPPH} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs kontrol DPPH}}$$

Abs kontrol DPPH

Pengujian untuk masing-masing larutan uji kemudian dibuat persamaan regresi liniernya dimana (x) merupakan konsentrasi sample, dan (y) adalah % penghambatan radikal. Hasil persamaan regresi linier selanjutnya digunakan untuk menentukan nilai *Inhibitory Concentration (IC50)* [8]

Penentuan Kadar Flavonoid Total EEDUB dan ETDUB

Kadar flavonoid total ditentukan dengan Metode yang dimodifikasi dari penelitian Krisridwani et al. (2021). Penentuan kadar diawali dengan membuat persamaan regresi linier kuersetin pada 5 konsentrasi baku kuersetin yaitu 50, 70, 90, 110 dan 130 dalam pelarut etanol pa. 1,0 mL masing-masing varian konsentrasi kuersetin ditambahkan 1,0 mL AlCl₃ 10% dan 8 mL CH₃COOH 5%. Larutan tersebut direaksikan selama OT dan absorbansinya dianalisis menggunakan panjang gelombang maksimum. 0,035 g EEDUB dan 0,035 g ETDUB dilarutkan dengan etanol pa hingga volumenya 10,0 mL. Selanjutnya, direaksikan dengan proses yang sama seperti kuersetin, hingga diperoleh absorbansi pada masing-masing sampel [9]

3. HASIL

Persentase rendemen dari EEDUB dan ETDUB ditampilan pada **Tabel 1.**

Tabel 1. Persentase Rendemen

No	Jenis Ekstrak	Presentase (%)
1	EEDUB	7,25
2	ETDUB	32



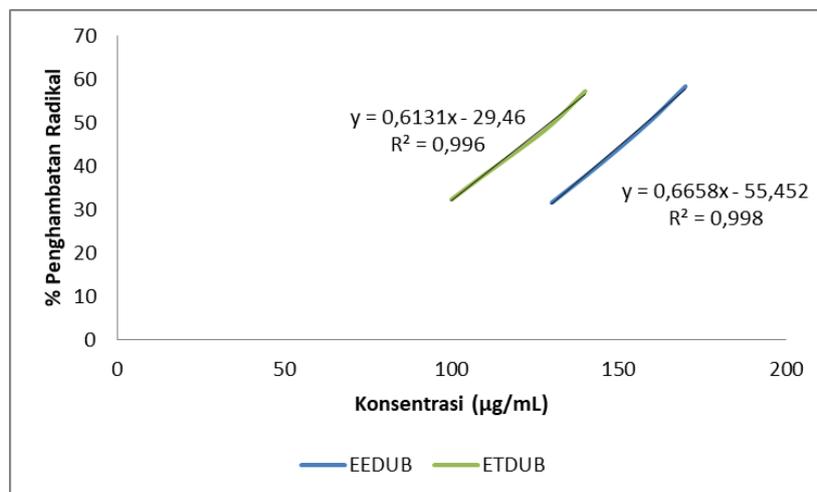
Identifikasi terhadap kandungan kimia EEDUB dan ETDUB dilakukan dengan mengamati terbentuknya endapan dan atau perubahan warna yang terjadi pada EEDUB dan ETDUB. Hasil identifikasi tersebut ditampilkan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Perbandingan kandungan kimia EEDUB dan ETDUB

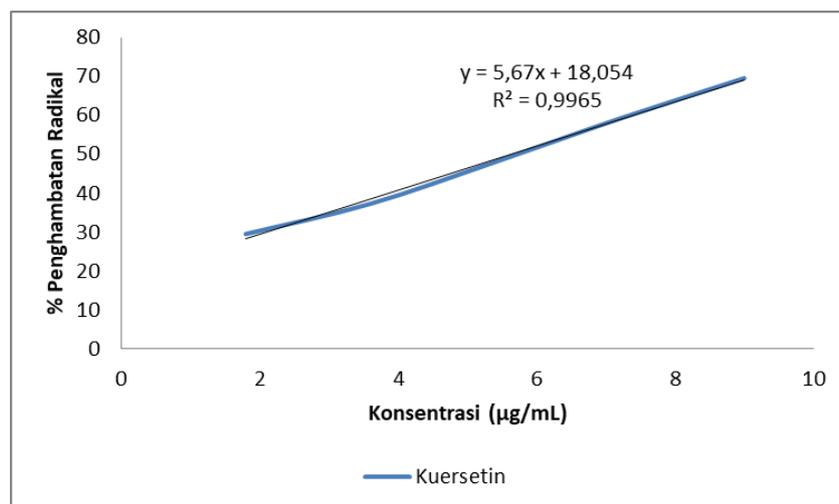
Senyawa	EEDUB	ETDUB
Polifenol	+	+
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Alkaloid	+	+
Steroid	-	-

Keterangan : (+) Mengandung senyawa, (-) Tidak mengandung senyawa

Aktivitas antioksidan EEDUB, ETDUB dianalisis melalui kurva hubungan antara konsentrasi EEDUB dan ETDUB dengan % penghambatan radikal yang dituangkan pada **Gambar 1**, sedangkan hubungan konsentrasi kuersetin dengan % penghambatan radikal ditampilkan pada **Gambar 2**. Nilai IC₅₀ dari EEDUB dan ETDUB dibandingkan dengan nilai flavonoid total yang diperoleh pada **Gambar 3**.

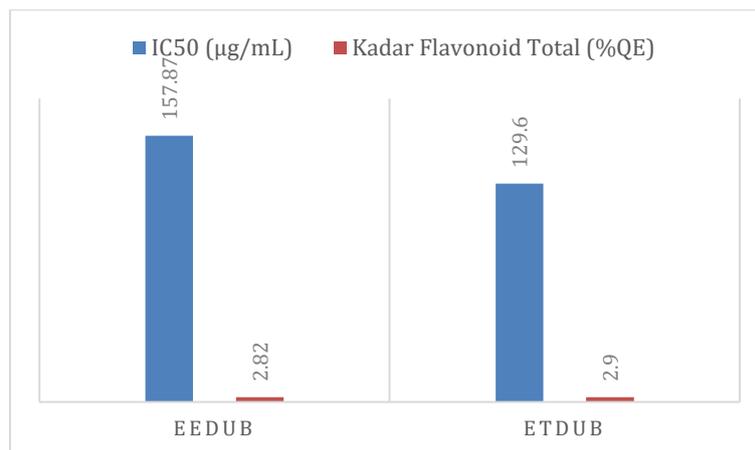


Gambar 1. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Penghambatan Radikal dari EEDUB dan ETDUB



Gambar 2. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Penghambatan Radikal dari Kuersetin





Gambar 3. Profil nilai IC₅₀ dan kadar flavonoid total pada EEDUB serta ETDUB

Kadar flavonoid total EEDUB dan ETDUB ditetapkan menggunakan metode kolorimetri dengan spektrofotometer, pada panjang gelombang 414 nm. Hasil penetapan kadar flavonoid total tersebut ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total EEDUB dan ETDUB

Sampel	Kadar Flavonoid (%QE)	Kadar Flavonoid rata-rata ± SD (%QE)
EEDUB	2,79	2,82 ± 0,02
	2,85	
	2,81	
ETDUB	2,86	2,90 ± 1,16
	2,90	
	2,94	

4. PEMBAHASAN

Daun umbi bit merah yang digunakan pada penelitian ini adalah daun umbi bit yang dipanen pada pagi hari. Hal ini bertujuan untuk menghindari proses transpirasi yang dapat menurunkan kualitas dari simplisia [10]. Daun umbi bit yang telah dipanen di sortasi basah untuk menghilangkan tanah, maupun komponen lain yang tidak diinginkan dan dilanjutkan dengan proses pencucian. Daun umbi bit yang sudah bersih kemudian di rajang untuk memudahkan proses pengeringan. Proses pengeringan dimulai dengan mengering-anginkan daun umbi bit yang telah dicuci selama kurang lebih 24 jam, untuk mempersiapkan daun umbi bit sebelum dikeringkan dengan menggunakan oven. Hal ini dilakukan agar mencegah terjadinya kebusukan pada daun umbi bit, karena daun umbi bit memiliki sifat yang cenderung basah. Setelah dilakukan kering-angin, sampel daun bit kemudian di keringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C untuk meminimalisir terjadinya kerusakan senyawa flavonoid yang bersifat termolabil [11]

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstraksi simplisia daun umbi bit adalah maserasi. Metode ini merupakan metode ekstraksi dingin sehingga sesuai untuk menarik senyawa metabolit sekunder yang termolabil seperti flavonoid. Kadar flavonoid dalam bahan alam dapat berkurang 15-78% jika mengalami pemanasan pada proses ekstraksinya [12]. Pada proses maserasi dilakukan penggantian pelarut yang bertujuan untuk mencegah kejenuhan larutan, sehingga proses ekstraksi berjalan dengan optimal.

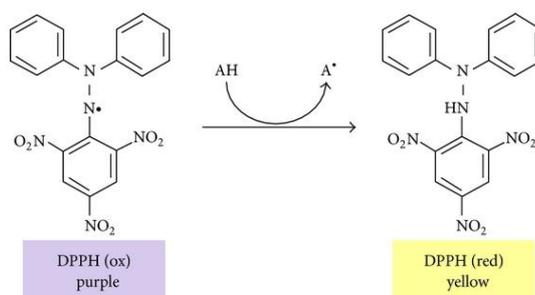
Rendemen ekstrak kental daun umbi bit (EEDUB) yang diperoleh adalah 7,25%. Ekstrak kental kemudian dipurifikasi dengan menggunakan metode partisi cair-cair.



Purifikasi ekstrak bertujuan untuk menghilangkan komponen-komponen yang tidak dibutuhkan pada ekstrak seperti klorofil, lemak maupun klorofil, sehingga ekstrak yang dihasilkan diharapkan dapat menghasilkan aktivitas yang lebih baik. Purifikasi dilakukan melalui partisi cair-cair menggunakan corong pisah. Prinsip metode purifikasi dengan metode partisi adalah memisahkan zat-zat dengan polaritas tertentu menggunakan pelarut yang sesuai polaritasnya. Hal ini didasarkan pada prinsip *like dissolve like*. Pelarut pelarut n-heksan yang bersifat non polar digunakan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat non polar dan dilanjutkan dengan penarikan menggunakan etil asetat yang bersifat semi polar. Rendemen Ekstrak Terpurifikasi Daun Umbi Bit (ETDUB) yang dihasilkan dibandingkan dengan ekstrak kasarnya adalah 32%.

Kontrol kualitas terhadap masing-masing ekstrak dilakukan dengan melakukan analisis terhadap tampilan fisik dari masing-masing ekstrak dan kandungan fitokimianya. EEDUB memiliki warna coklat kehijauan yang pekat, sedangkan ETDUB memiliki warna yang coklat yang lebih terang dan sedikit kemerahan. Selanjutnya, dianalisis kandungan fitokimia pada EEDUB dan ETDUB dengan menggunakan reagen tertentu. Hasil pengujian kandungan fitokimia ditampilkan pada tabel 2. Berdasarkan tabel 2 terdapat kesamaan profil kandungan fitokimia pada EEDUB dan ETDUB yaitu sama-sama mengandung polifenol, flavonoid, saponin dan alkaloid, serta negatif mengandung steroid. Hal ini dapat menunjukkan bahwa proses purifikasi yang dilakukan pada EEDUB belum maksimal memisahkan kandungan-kandungan yang ada pada ekstrak. Namun berdasarkan data rendemen ETDUB terhadap ekstrak dapat dilihat ada kemungkinan senyawa yang dihilangkan pada proses purifikasi. Hal tersebut juga diperkuat dengan tampilan fisik dari kedua ekstrak tersebut. ETDUB memiliki warna yang lebih cerah dibandingkan dengan EEDUB. Hal ini dapat disebabkan oleh hilangnya kandungan klorofil, lipid ataupun zat ballast yang terjadi pada proses purifikasi dengan menggunakan n-heksana. Selain itu warna kemerahan pada ETDUB dapat disebabkan karena kandungan pigmen warna yang lebih tertarik pada pelarut yang lebih polar dibandingkan n-heksana.

EEDUB dan ETDUB kemudian dianalisis aktivitas antioksidannya menggunakan DPPH. DPPH● adalah suatu molekul radikal yang memiliki sifat stabil. Penentuan aktivitas antioksidan suatu senyawa didasarkan pada kemampuan suatu senyawa untuk mendonorkan elektron maupun atom hidrogennya pada radikal DPPH, sehingga dapat menetralkan sifat radikal DPPH [13]. Reaksi netralisasi radikal ditandai dengan perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning pucat sampai tidak berwarna [14]. Reaksi tersebut ditampilkan pada Gambar 4. Proses tersebut juga ditandai dengan terjadinya penurunan absorbansi DPPH ketika diamati dengan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 4. Reaksi antioksidan dan radikal DPPH [14]

Panjang gelombang DPPH yang diperoleh pada masing-masing konsentrasi adalah 515 nm. Panjang gelombang ini mendekati panjang gelombang DPPH yang digunakan oleh Purwanto *et al.* (2021) [15]. Selain penetapan panjang gelombang maksimal, salah satu parameter yang ditentukan sebelum pengujian aktivitas antioksidan adalah *Operating Time (OT)*. OT diamati terhadap kuersetin yang direaksikan dengan DPPH pada setiap menit hingga diperoleh absorbansi yang konstan. Hal tersebut menunjukkan bahwa reaksi yang terjadi antara DPPH dengan kuersetin telah terjadi sempurna. *OT* yang digunakan pada penelitian ini adalah 35 menit.

Penetapan aktivitas antioksidan dilakukan terhadap EEDUB, ETDUB dan kuersetin. Kuersetin berperan sebagai kontrol positif. Hal ini dikarenakan, kuersetin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan [8]. Kontrol positif digunakan untuk memastikan validitas metode yang digunakan. Persentase penghambatan radikal didapatkan dari hubungan antara konsentrasi dengan % penghambatan radikal. Gambar 1 memberikan informasi bahwa konsentrasi EEDUB dan ETDUB yang bereaksi dengan DPPH semakin tinggi akan menghasilkan persentase penghambatan radikal yang semakin tinggi. Hal ini serupa juga dengan kuersetin yang memiliki % penghambatan yang semakin tinggi ketika konsentrasinya ditingkatkan. Selain informasi tersebut, Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan terjadinya perbedaan konsentrasi yang cukup jauh antara EEDUB dan ETDUB jika dibandingkan dengan kuersetin dalam menghambat radikal. Konsentrasi penghambatan antioksidan dituangkan dalam nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi penghambatan 50% radikal oleh suatu senyawa. Nilai IC_{50} diperoleh dengan memasukkan nilai 50 sebagai nilai Y pada kurva baku yang diperoleh dengan membuat hubungan antara konsentrasi dan % penghambatan pada tiap sampel pengujian.

IC_{50} dapat digunakan untuk melihat kekuatan aktivitas antioksidan dari suatu senyawa. Tabel 4 menunjukkan kategori kekuatan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} .

Tabel 4. Kategori antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} [16]

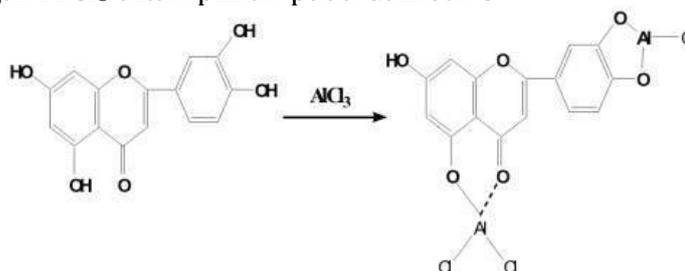
Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Sifat Antioksidan
50 <	Sangat kuat
50 - 100	Kuat
100 - 150	Sedang
>150	Lemah

IC_{50} yang diperoleh dari EEDUB, ETDUB dan kuersetin pada penelitian ini masing-masing adalah 157,87 $\mu\text{g/mL}$; 129,60 $\mu\text{g/mL}$ dan 5,63 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan data tersebut maka EEDUB memiliki aktivitas antioksidan dengan kekuatan antioksidan yang lemah, ETDUB termasuk dalam senyawa dengan kemampuan aktivitas yang sedang sedangkan kuersetin merupakan suatu antioksidan dengan kategori sangat kuat. Aktivitas antioksidan dari kuersetin ini selaras dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa kuersetin merupakan antioksidan dengan kategori yang sangat kuat [8]. Aktivitas antioksidan ETDUB lebih baik dibandingkan dengan EEDUB. Hal tersebut disebabkan karena pada ETDUB komponen-komponen yang tidak memiliki kontribusi dalam aktivitas antioksidan seperti klorofil, lemak dan lipid telah terpisahkan. Hilangnya komponen-komponen yang tidak diinginkan tersebut mengakibatkan kemampuan aktivitas senyawa yang memiliki kemampuan antioksidan dalam sampel tersebut lebih bisa bekerja secara efisien, karena tidak terganggu dengan



senyawa-senyawa yang tidak dibutuhkan. Sejalan dengan itu Nurfiana *et al.* (2017) yang membuktikan bahwa aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat lebih baik dibanding ekstrak kasarnya [17].

Kadar flavonoid total dari EEDUB dan ETDUB ditetapkan dengan menggunakan metode kolorimetri. Metode kolorimetri merupakan metode penetapan kuantitatif yang melibatkan bahan yang berwarna. Perbedaan intensitas warna yang dihasilkan akan menghasilkan absorbansi yang berbeda [18]. Metode kolorimetri memiliki keunggulan yaitu kemudahannya dalam menetapkan jumlah/kadar zat yang sangat kecil [19]. Kombinasi antara prinsip kolorimetri dan penggunaan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis akan memudahkan dalam penetapan kuantitatif suatu senyawa. Kadar flavonoid total yang ditetapkan secara kolorimetri dilakukan dengan mereaksikan larutan sampel dan reagen AlCl_3 10%. AlCl_3 akan membentuk kompleks dengan flavonoid pada gugus hidroksil dan keton yang saling bertetangga atau dengan gugus hidroksil yang saling bertetangga. AlCl_3 akan berikatan dengan gugus keton pada C_4 dan gugus OH pada C_3 atau C_5 flavonoid sehingga membentuk senyawa kompleks yang stabil berwarna kuning. Baku pembanding yang digunakan pada penentuan kadar flavonoid total ini adalah kuersetin. Hal ini disebabkan kuersetin merupakan senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun umbi bit dan memiliki gugus keton pada C_4 dan gugus OH pada C_3 atau C_5 , sehingga dapat bereaksi dengan AlCl_3 [4]. Reaksi pembentukan kompleks yang terjadi antara flavonoid dengan AlCl_3 ditampilkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi pembentukan kompleks flavonol dan AlCl_3 [20]

Penetapan kadar dimulai dengan pengukuran OT dan panjang gelombang maksimal. OT diperoleh dengan mereaksikan kuersetin dengan reagen AlCl_3 10% dan CH_3COOH 5%, kemudian dibaca serapannya pada setiap menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil. OT yang diperoleh pada penelitian ini adalah 18 – 21 menit. Waktu tersebut merupakan waktu terjadinya reaksi yang optimal antara kuersetin dengan reagen pengkompleks yaitu AlCl_3 10% dan CH_3COOH 5%. Panjang gelombang maksimal kuersetin yang diperoleh adalah 414 nm, nilai ini tidak berbeda signifikan dengan penelitian sebelumnya [21]. Kurva kalibrasi kuersetin dibuat dengan menghubungkan konsentrasi kuersetin dan serapan yang dihasilkan pada tiap konsentrasi tersebut. Nilai koefisien korelasi (r) pada kurva kalibrasi tersebut adalah 0,996278.

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan terhadap EEDUB dan ETDUB dengan replikasi sebanyak 3x dengan data yang dilihat pada Tabel 3. Tabel tersebut menunjukkan ETDUB memiliki kadar flavonoid total yang lebih besar dibandingkan EEDUB. Hasil tersebut menggambarkan proses purifikasi pada ekstrak daun umbi bit tidak mengurangi kadar flavonoid totalnya, bahkan berdasarkan data tersebut dapat dilihat bahwa proses purifikasi meningkatkan kadar flavonoid yang pada ekstrak daun umbi bit. Meskipun berdasarkan hasil analisis kandungan fitokimia menunjukkan purifikasi belum terjadi maksimal. Hal ini dapat dipengaruhi karena penggunaan etanol 30% pada purifikasi mampu melarutkan flavonoid dengan lebih luas. Hal ini seperti

yang ditunjukkan pada hasil analisis kualitatif yang dilakukan pada penelitian Puspitasari, D dan Pramono, S (2015) [6]. Berdasarkan hal tersebut, dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk memaksimalkan proses purifikasi ekstrak.

Pada penelitian ini juga dapat dilihat hubungan antara kadar flavonoid total yang terdapat dalam EEDUB dan ETDUB. Gambar 3 memperlihatkan bahwa ETDUB yang memiliki kadar flavonoid total lebih besar menunjukkan nilai IC₅₀ yang lebih kecil. Hal tersebut menjelaskan bahwa semakin tinggi kadar flavonoid yang ada pada suatu sampel, akan menghasilkan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi. Selain itu hal tersebut membuktikan bahwa salah satu senyawa yang memiliki peran dalam menghasilkan aktivitas antioksidan pada daun umbi bit adalah flavonoid.

5. KESIMPULAN

Ekstrak terpurifikasi daun umbi bit (ETDUB) memiliki persamaan kandungan fitokimia yang menunjukkan proses purifikasi belum terjadi maksimal. Kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan ETDUB lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasarnya (EEDUB).

6. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih peneliti sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi dalam Hibah Penelitian Dosen Pemula Tahun 2020-2021 dan Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional No kontrak 067/E4.1/AK/04/PT/2021 yang telah mendukung terselenggaranya penelitian ini.

7. DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. Elsayed Azab, A. A Adwas, A. S. Ibrahim Elsayed, A. A Adwas, A. S. Ibrahim Elsayed, and F. A. Quwaydir, "Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body," *JABB*, vol. 6, no. 1, pp. 43-47, Feb. 2019, doi: 10.15406/jabb.2019.06.00173.
- [2] N. Andarwulan, R. Batari, D. A. Sandrasari, B. Bolling, and H. Wijaya, "Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia," *Food Chemistry*, vol. 121, no. 4, pp. 1231-1235, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.033.
- [3] U. Gawlik-Dziki, L. Dziki, J. Anisiewicz, E. Habza-Kowalska, M. Sikora, and D. Dziki, "Leaves of White Beetroot As a New Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Compounds," *Plants*, vol. 9, no. 8, p. 944, Jul. 2020, doi: 10.3390/plants9080944.
- [4] Z. Mzoughi et al., "Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*): Nutritional, phytochemical composition and biological activities," *Food Research International*, vol. 119, pp. 612-621, May 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.039.
- [5] B. H. A. Huda, H. Susanti, and N. Sugihartini, "Pengaruh purifikasi terhadap Profil Organoleptis, Rendemen, Total Fenol dan Total Flavonoid dari Ekstrak Etanol 96% daun kelor (*Moringa oleifera* L.)," *Jurnal Farmasi Indonesia*, vol. 17, no. 2, 2020, doi : 10.31001/jfi.v17i2.983.
- [6] A. D. Puspitasari and S. Pramono, "Perbandingan Metode Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Bee Propolis Dari Lebah Madu (*Apis Mellifera*) Berdasarkan Kadar Flavonoid Total Dihitung Sebagai Rutin," *Trad. Med. J.*, Vol. 20(2), p 76-81, 2015, doi : 10.22146/tradmedj.8076
- [7] W. P. Jones and A. D. Kinghorn, "Extraction of Plant Secondary Metabolites," in *Natural Products Isolation*, vol. 864, S. D. Sarker and L. Nahar, Eds., in *Methods in*



- Molecular Biology, vol. 864. , Totowa, NJ: Humana Press, 2012, pp. 341–366. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1_13.
- [8] P. E. Murwanto and D. Santosa, “Penangkapan Radikal Dpph (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil),” *Majalah Obat Tradisional*, 2012. doi : 10.22146/tradmedj.8011
- [9] A. Krisridwany, M. R. Tatra, D. P. Sukamdi, and J. Brawijaya, “Perbandingan Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Biji Kelor (*Moringa oleifera* L.) dan Biji Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.),” *Jurnal Farmasi Indonesia*, vol. 19, no. 1, 2022. doi : 10.31001/jfi.v19i1.1264
- [10] B. R. Prawoto and J. G. Kartika, “Pengelolaan Aspek Produksi dan Pasca Panen Sayuran Daun Secara Aeroponik dan Hidroponik : Studi Kasus Lembang, Bandung,” *AGROB*, vol. 4, no. 1, pp. 9–19, Jan. 2016, doi: 10.29244/agrob.v4i1.14994.
- [11] S. N. Kautsari, A. Humaedi, D. R. Wijayanti, and M. Safaat, “Kadar Total Fenol dan Flavonoid Ekstrak Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Melalui Metode Ekstraksi Microwave,” *ALCHEMY J.Pen.Kim*, vol. 17, no. 1, p. 96, Mar. 2021, doi: 10.20961/alchemy.17.1.46497.96-104.
- [12] H. Saadah, H. Nurhasnawati, and V. Permatasari, “Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine Palmifolia*(L.)Merr) Dengan Metode Spektrofotometri” *Jurnal Borneo Journal of Pharmascientech*, vol. 01, no. 01, 2017. doi : 10.51817/bjp.v1i1.46
- [13] P. Molyneux, “The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,” *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 26, no. 2, 2004.
- [14] J. Teixeira, A. Gaspar, E. M. Garrido, J. Garrido, and F. Borges, “Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview,” *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1155/2013/251754.
- [15] D. S. Purwanto, H. Susanti, and N. Sugihartini, “Pengaruh Purifikasi Terhadap Kandungan Zat Aktif dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 50% Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.),” *jfi*, vol. 18, no. 2, pp. 97–108, Nov. 2021, doi: 10.31001/jfi.v18i2.1232.
- [16] S. Fegghi-Najafabadi, L. Safaeian, and B. Zolfaghari, “In vitro antioxidant effects of different extracts obtained from the leaves and seeds of *Allium ampeloprasum* subsp. *persicum*,” *J Herbmед Pharmacol*, vol. 8, no. 3, pp. 256–260, May 2019, doi: 10.15171/jhp.2019.37.
- [17] G. Nurfiana, L. Mindi, and M. Novia, “Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil),” *Jurnal Farmasi Indonesia*, Vol.14 no 1, doi : 10.31001/jfi.v14i1.358 .
- [18] S. Gummedi and M. Kommoju, “Colorimetric Approaches To Drug Analysis And Applications“ A Review,” *AJPTR*, vol. 9, no. 1, pp. 14–37, Feb. 2019, doi: 10.46624/ajptr.2019.v9.i1.002.
- [19] “Kajian Perbandingan Buah Black Mulberry (*Morus Nigra* L.) Dengan Air Terhadap Karakteristik Spreadable Processed Cheese Black Mulberry,” *PFTJ*, Jan. 2020, doi: 10.23969/pftj.v6i3.2175.
- [20] D. A. A. Makuasa and P. Ningsih, “The Analysis of Total Flavonoid Levels In Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) Using UV-Vis Spectrofotometry Methods,” *J. Appl. Sci. Eng. Technol. Educ.*, vol. 2, no. 1, pp. 11–17, May 2020, doi: 10.35877/454RI.asci2133.
- [21] T. G. Arikalang, S. Sudewi, and J. A. Rorong, “Daun Gedi Hijau (*Abelmoschus Manihot* L.) yang Diukur,” *Jurnal Farmasi Indonesia*, vol. 7, no. 3, 2018, DOI: 10.30595/pji.v9i3.762

