



Submissions

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

Diah Pratimasari, Dian Puspitasari, Noor Anisa

Submission

Review

Copyediting

Production

Submission Files

Search

| | | |
|--------|--|--------------|
| 5160-1 | diah_pratimasari, Author; Artikel Diah Pratimasari.docx | Article Text |
| 5390-1 | luciavita, Journal editor; rev_1430-Article Text-5187-1-18-20211023 (1).docx | Article Text |

Download All Files

Pre-Review Discussions

Add discussion

| Name | From | Last Reply | Replies | Closed |
|----------------------------|---------------------|----------------------------|---------|--------------------------|
| pre-review | luciavita Oct/20 | diah_pratimasari Oct/23 | 1 | <input type="checkbox"/> |

POTENSI EKSTRAK TERPURIFIKASI DAUN UMBI BIT (*Beta vulgaris*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTALNYA

POTENTIAL OF PURIFIED EXTRACT BIT LEAVES (*Beta vulgaris*) AS ANTIOXIDANTS AND DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID LEVELS

Diah Pratimasari¹, Dian Puspitasari², Diah Pratimasari*
Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional
email: diah_pratimasari@stikesnas.ac.id

(tanggal diterima: hh-bb-tttt, tanggal disetujui: hh-bb-tttt)

INTISARI

Ekstrak etanol daun umbi bit memiliki kandungan fenolik dan flavonoid yang tinggi, sehingga memiliki aktivitas antioksidan yang potensial, namun, ekstrak kasar memiliki kelemahan yaitu masih tercampur dengan komponen lain yang tidak diperlukan sehingga pengembangan sediaan akan terbatas. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengembangan potensi fraksi dari ekstrak daun umbi bit dalam bentuk ekstrak terpurifikasi daun umbi bit (*Beta vulgaris*) sebagai antioksidan. Selain itu penelitian ini juga bertujuan untuk melihat pengaruh purifikasi ekstrak terhadap kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan.

Pembuatan ekstrak terpurifikasi dilakukan dengan prinsip partisi menggunakan pelarut yang bersifat non polar yaitu n-heksana, kemudian dilanjutkan dengan menggunakan etil asetat, dan selanjutnya diuapkan hingga memperoleh ekstrak terpurifikasi yang kental. Uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap Ekstrak Etanol Daun Umbi Bit (EEDUB) dan Ekstrak Terpurifikasi Daun Umbi Bit (ETDUB) serta kuersetin sebagai kontrol positif. Aktivitas antioksidan terhadap sampel uji dilakukan dengan menggunakan DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil). Penetapan kadar flavonoid total dari EEDUB dan ETDUB dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa EEDUB memiliki nilai IC₅₀ 157,87 µg/mL, sedangkan ETDUB memiliki nilai IC₅₀ 129,60 µg/mL. Kadar flavonoid total dari EEDUB adalah 2,82% ± 0,85 QE dan ETDUB memiliki kadar flavonoid total 2,90 ± 1,16 % QE. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa EEDUB memiliki kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan ETDUB. Hal ini menunjukkan bahwa proses purifikasi ekstrak pada daun umbi bit tidak mengurangi kadar flavonoid dan aktivitas antioksidannya.

Kata kunci: DPPH; Purifikasi; Kolorimetri; AlCl₃

ABSTRACT

The ethanol extract of beetroot leaves has high phenolic and flavonoid content, so it has prospective antioxidant activity, however, the crude extract has a weakness that it is still mixed with other components that are not needed so that the development of the preparation will be limited. Therefore, in this study, the potential fraction of beetroot leaf extract in the form of purified extract of beetroot leaf (*Beta vulgaris*) as an antioxidant. In addition, this study aims to see the effect of purification on total flavonoid levels and antioxidant activity.

The purified extract was made using the partition principle using a non-polar solvent n-hexane then continued with ethyl acetate, and then evaporated to obtain a thick purified extract. Antioxidant activity tests were carried out on the Ethanol Extract of Beetroot Leaf (EEDUB) and Purified Extract of Beetroot Leaf (ETDUB) as well as quercetin as a positive control. The antioxidant activity of the test samples was carried out using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Commented [Ma1]: Tidak sesuai panduan. Judul tertulis "potensi" baiknya ini dihilangkan saja, karena isi nya hanya ada uji aktivitas.

Commented [Ma2]: Kata yang harus dihindari. belum terlihat posisi penelitian dan novelty dari penelitian ini. Metode cukup tuliskan saja metode nya: kata partisi tidak tepat, karena hanya menggunakan metode ECC dengan 3 jenis pelarut. Kata purifikasi juga tidak tepat karena hasil ECC masih mengandung banyak senyawa.

Bagian hasil tidak menggambarkan hasil secara menyeluruh dan belum menjawab tujuan,

Commented [Ma3]: Tujuan diawal adalah untuk meningkatkan kemurnian, tp hasil tidak signifikan, perlu ada jawaban atas masalah ini, apakah ECC berhasil atau tidak?



Determination of total flavonoid content from EEDUB and ETDUB was carried out using the colorimetric method.

The results of the antioxidant activity test showed that EEDUB had an IC50 value of 157.87 µg/mL, while ETDUB had an IC50 value of 129.60 µg/mL. The total flavonoid content of EEDUB is 2.82% ± 0.85 QE and ETDUB has a total flavonoid content of 2.90 ± 1.16% QE Conclusion: Based on the results of the study, it can be concluded that EETDUB has better levels of flavonoids and antioxidant activity than EEDUB. This indicates that the extract purification process in beetroot leaves does not reduce its flavonoid content and antioxidant activity.

Key words: DPPH, Purification, Colorimetry, AlCl₃

1. PENDAHULUAN

Radikal bebas yang tidak seimbang 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. Salah satu senyawa alami yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan adalah flavonoid (2)(3)(4).

Flavonoid tersebar luas di alam dalam buah-buahan maupun sayuran, salah satunya adalah daun umbi bit(5)(6). Tanaman umbi bit merupakan tanaman yang berasal dari wilayah mediterania, yang banyak dimanfaatkan sebagai asupan untuk diet (5). Buah bit merupakan salah satu bahan pangan yang kaya akan pigmen betalainin, Pigmen inilah yang menyebabkan warna umbi buah bit (*Beta vulgaris*) memiliki warna merah keunguan. juga terdapat dalam daun umbi bit. Selain mengandung betalainin, daun umbi bit juga kaya akan flavonoid, terutama kuersetin dan kaemferol, vitamin, mineral, glikosida, saponin, tannin dan komponen fenolik lainnya(6).

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(5) namun, ekstrak kasar memiliki kelemahan yaitu masih tercampur dengan komponen lain yang tidak diperlukan sehingga pengembangan sediaannya akan terbatas. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengembangan dengan melakukan purifikasi dari ekstrak untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang tidak diinginkan seperti klorofil, lemak, dan resin, serta melihat potensi dari ekstrak terpurifikasi daun umbi bit (*Beta vulgaris* L) sebagai antioksidan. Proses purifikasi ekstrak selain memiliki manfaat juga menimbulkan kekhawatiran akan berkurangnya kadar metabolit yang ada pada ekstrak terpurifikasi. Hal tersebut yang melatar belakangi peneliti untuk menetapkan kadar flavonoid total pada ekstrak terpurifikasi daun umbi bit dan membandingkan dengan ekstrak kasarnya. Peneliti juga ingin melihat hubungan antara kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak terpurifikasi daun umbi bit.

Commented [Ma4]: Pendahuluan tidak fokus pada masalah yang akan dikaji dan terlalu banyak pengertian umum yang muncul disini.

Saran:

Fokus saja pada:

1. Posisi penelitian
2. Novelty
3. Tunjukan alur penelitian dengan jelas.
4. Tujuan harus tertulis dengan jelas.

tunjukkan apa saja yang sudah diteliti, sehingga anda bisa menunjukkan bagaian mana yang belum dilakukan dan bagaimana urgensi penelitian ini.



2. METODE PENELITIAN

2.1. ALAT DAN BAHAN

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : oven (Mettler®), rotary evaporator (IKA®), waterbath (Mettler®), spektroskopi UV-Vis (Shimadzu®), kuvet (Hellma®), moisture balance (Radwag®), corong pisah (Iwaki®), alat-alat gelas (Iwaki®, Pyrex®). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah daun umbi bit merah (*Beta vulgaris* var Ribra (L) Moq.), pelarut teknis (etanol 70%, n-heksana, etil asetat), pelarut pro analisis: etanol (Merck®), DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*) (Sigma Aldrich®), AlCl₃ ((Merck®), Standar kuersetin (Sigma Aldrich®).

Commented [Ma5]: Alat lab umum tidak perlu ditulis.

2.2. CARA KERJA

Persiapan Bahan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun umbi bit merah (*Beta vulgaris*) yang dipanen dari Kecamatan Selo, Boyolali, Jawa Tengah. Daun umbi bit kemudian di sortasi basah, dilanjutkan dengan pencucian dan perajangan. Rajangan daun umbi bit kemudian dikering anginkan selama kurang lebih 24 jam, dan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Simplisia daun umbi bit kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan mesh no 60.

Commented [Ma6]: Cara kerja umum tidak perlu terlalu rinci (tulis metode nya saja)

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Umbi Bit (EEDUB).

Serbuk simplisia daun umbi bit sebanyak 1 kg di maserasi dengan etanol 70% sebanyak 7,5 Liter pada wadah kaca yang tertutup rapat dan terhindar dari sinar matahari selama 3 hari. Setelah 3 hari, dipisahkan filtrat dan ampasnya, kemudian ampas direndam kembali dengan menggunakan 2,5 L etanol 70% selama 2 hari, selanjutnya dipisahkan antara filtrat dan ampasnya. Filtrat hasil perendaman pertama dan kedua kemudian digabung dan dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator dan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental.

Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Daun Umbi Bit (ETDUB).

Ekstrak kental daun umbi bit ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditambahkan 50 mL etanol 30% dan diaduk hingga ekstrak tersari dalam etanol 30%. Kemudian dilakukan partisi menggunakan n-heksana dan etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian dipekatkan, hingga diperoleh ekstrak kental terpurifikasi (7).

Commented [Ma7]: Penting untuk dituliskan brp perbandingan pelarut yang digunakan dan berapa koefisien partisi nya.

Uji Aktivitas Antioksidan EEDUB dan ETDUB.

Aktivitas antioksidan EEDUB dan ETDUB dilakukan menggunakan metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*) yang dimodifikasi dari penelitian Murwanto dan Santosa (2012)(8). Larutan baku DPPH 0,4 mM dibuat dengan melarutkan 15,7 mg serbuk DPPH dengan menggunakan etanol pa. ad 100,0 mL. Larutan kontrol DPPH dibuat dengan melarutkan 2,0 mL larutan baku DPPH dengan etanol pa sampai dengan 10,0 mL. 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 yang diperoleh dari larutan kontrol dan berbagai larutan uji kemudian di hitung % penangkap radikal dengan menggunakan persamaan 1 :

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

Pengujian untuk masing-masing larutan uji kemudian dibuat persamaan regresi liniernya dengan (x) adalah konsentrasi sampel, dan (y) adalah % penghambatan radikal. Persamaan regresi linier yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai *Inhibitory Concentration (IC50)*.

Penetapan Kadar Flavonoid Total EEDUB dan ETDUB

Kurva kalibrasi kuersetin dibuat dengan membuat 5 seri konsentrasi baku kuersetin yaitu 50, 70, 90, 110 dan 130 dalam pelarut etanol pa. Masing-masing varian konsentrasi kuersetin dipipet 1,0 mL, ditambahkan 1,0 mL AlCl₃ 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Campuran didiamkan selama OT dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. EEDUB dan ETDUB masing-masing sebanyak 0,035 g dilarutkan dengan menggunakan etanol pa hingga volumenya 10,0 mL. Selanjutnya, 1,0 mL dari masing-masing larutan sampel dipipet dan ditambahkan AlCl₃ 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Campuran kemudian didiamkan selama OT dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis(9).

3. HASIL DAN 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).

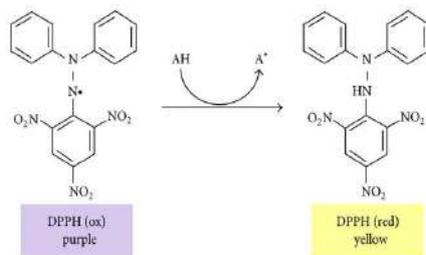
Simplisia daun umbi bit di ekstraksi menggunakan metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode yang tidak memerlukan proses pemanasan dalam proses penarikan senyawanya. Metode ini sesuai untuk menarik senyawa metabolit sekunder yang termolabil, salah satunya adalah flavonoid. Kadar flavonoid dalam 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.

Ekstrak daun umbi bit yang sudah 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 dengan menggunakan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah. Prinsip metode purifikasi dengan metode partisi adalah menarik zat-zat yang bersifat non polar dengan menggunakan pelarut yang bersifat non polar. Penarikan ini menggunakan prinsip *like dissolve like* menggunakan pelarut n-heksan yang bersifat non polar dan dilanjutkan dengan etil asetat yang bersifat semi polar.

Metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan EEDUB dan ETDUB adalah metode DPPH. DPPH• merupakan suatu molekul radikal yang bersifat stabil. Penentuan aktivitas antioksidan dari suatu senyawa didasarkan pada kemampuan suatu senyawa untuk dapat mendonorkan elektron maupun atom hidrogennya pada radikal DPPH, sehingga dapat menetralkan sifat radikal DPPH(13). Kemampuan netralisir terhadap radikal DPPH ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari DPPH menjadi kuning pucat sampai tidak berwarna (14). Reaksi yang terjadi antara antioksidan dan radikal DPPH seperti yang ditampilkan pada Gambar 1. Proses ini juga ditandai dengan terjadinya penurunan absorbansi DPPH ketika diamati dengan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 1. Reaksi antioksidan dan radikal DPPH (14)

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH didahului dengan penetapan panjang gelombang maksimal DPPH dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang ditetapkan dengan melakukan *scanning* serapan larutan DPPH pada seri konsentrasi. Panjang gelombang DPPH yang diperoleh pada masing-masing konsentrasi adalah 515 nm. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi larutan yang berbeda tidak mempengaruhi panjang gelombang yang diperoleh. Selain penetapan panjang gelombang maksimal, salah satu parameter yang ditentukan sebelum pengujian aktivitas antioksidan adalah *Operating Time (OT)*. Penentuan OT dilakukan dengan

Commented [Ma8]: Tidak ada:

1. Randemen ekstraksi
2. Sifat fisika dan uji kandungan kimia ekstrak kasar
3. Randemen hasil ECC
4. Sifat fisika dan hasil uji kandungan kimia hasil ECC
5. Pembahasan mengenai keberhasilan kegiatan ECC.

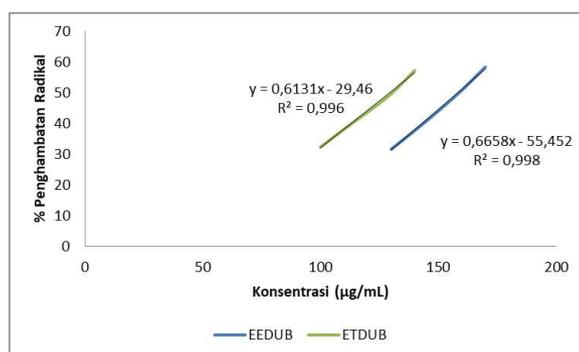
hal diatas menjadi data yang sangat penting dalam pembahasan uji aktivitas yang dilakukan.

Perlu juga ada kajian dari literatur lain sebagai pembandingan dari hasil yang didapatkan.

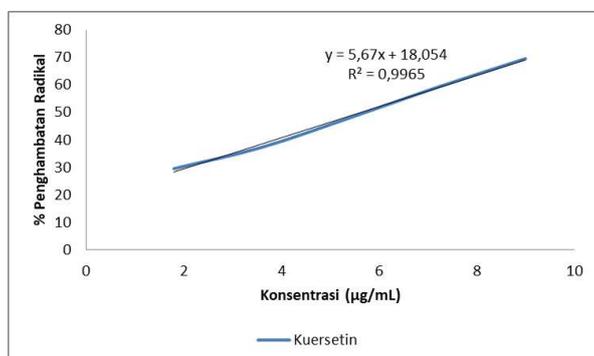


mereaksikan DPPH dengan kuersetin, kemudian diamati perubahan absorbansinya pada setiap waktu, hingga diperoleh absorbansi yang konstan. Absorbansi yang konstan menunjukkan bahwa reaksi yang terjadi antara DPPH dengan kuersetin telah terjadi sempurna. *Operating time* yang digunakan pada penelitian ini adalah 35 menit.

Pengujian 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 pada penelitian ini bertujuan untuk menguji validitas metode yang digunakan (membandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya) (15). Persentase penghambatan radikal dari EEDUB, ETDUB dan kuersetin dihitung dengan membuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan % penghambatan radikal. Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi EEDUB dan ETDUB yang bereaksi dengan DPPH maka 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, pada Gambar 2 dan Gambar 3 dapat dilihat bahwa terjadi 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 suatu senyawa untuk dapat menghambat 50% radikal. 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.



Gambar 2. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Penghambatan Radikal dari EEDUB dan ETDUB



Gambar 3. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Penghambatan Radikal dari Kuersetin

IC₅₀ merupakan parameter yang digunakan untuk melihat aktivitas antioksidan dari suatu senyawa. Kekuatan antioksidan suatu senyawa berdasarkan nilai IC₅₀ seperti yang ditampilkan pada Tabel 1(16).

Tabel 1. Kekuatan antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀(16)

| Nilai IC ₅₀ (µg/mL) | Sifat Antioksidan |
|--------------------------------|-------------------|
| 50 < | Sangat kuat |
| 50 - 100 | Kuat |
| 100 - 150 | Sedang |
| >150 | Lemah |

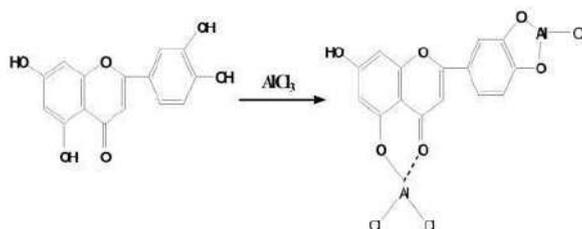
IC₅₀ dari EEDUB, ETDUB dan kuersetin yang diperoleh pada penelitian ini masing-masing adalah 157,87 µg/mL; 129,60 µg/mL dan 5,63 µg/mL. Berdasarkan data tersebut maka EEDUB memiliki aktivitas antioksidan dengan kekuatan antioksidan yang lemah, ETDUB termasuk dalam senyawa dengan kemampuan aktivitas yang sedang sedangkan kuersetin memiliki kekuatan antioksidan yang sangat kuat. Aktivitas antioksidan yang kuat dari kuersetin menunjukkan bahwa metode yang digunakan pada penelitian ini sama dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa kuersetin memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat (8)

ETDUB memiliki kemampuan aktivitas antioksidan yang lebih baik, hal ini dapat 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.

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(17). Metode kolorimetri memiliki kelebihan yaitu kemudahannya dalam menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil(18). Kombinasi antara prinsip kolorimetri dan penggunaan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis akan memudahkan dalam penetapan kuantitatif suatu senyawa.

Penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode kolorimetri dilakukan dengan penambahan reagen $AlCl_3$ 10%. $AlCl_3$ akan membentuk kompleks dengan gugus hidroksil dan keton yang saling bertetangga atau dengan gugus hidroksil yang saling bertetangga pada senyawa flavonoid. Pada senyawa flavonol misalnya, $AlCl_3$ akan bereaksi dengan gugus keton pada C_4 dan gugus OH pada C_3 atau C_5 sehingga membentuk senyawa kompleks yang stabil berwarna kuning. Senyawa baku yang digunakan pada penetapan kadar flavonoid total ini adalah quersetin. Hal ini dikarenakan quersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keton pada C_4 dan gugus OH pada C_3 atau C_5 , selain itu quersetin juga merupakan salah satu senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun umbi bit(6). Reaksi pembentukan kompleks yang terjadi antara flavonoid dengan $AlCl_3$ seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi pembentukan kompleks flavonol dan $AlCl_3$ (19)

Penetapan kadar dimulai dengan pengukuran OT dan panjang gelombang maksimal. OT diperoleh dengan mereaksikan quersetin dengan reagen $AlCl_3$ 10% dan asam asetat 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 quersetin dengan reagen pengkompleks yaitu $AlCl_3$ 10% dan asam asetat 5%. Panjang gelombang quersetin yang diperoleh adalah 414 nm. Panjang gelombang maksimal ini berdekatan dengan panjang gelombang maksimal quersetin pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu 415 nm(20). OT dan panjang gelombang maksimal yang diperoleh kemudian digunakan untuk mengukur serapan dari baku quersetin dan sampel dalam penentuan kadar flavonoid total.

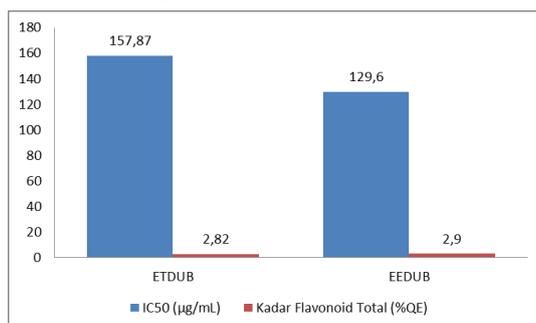
Kurva kalibrasi quersetin dibuat dengan menghubungkan konsentrasi quersetin dan serapan yang dihasilkan pada tiap konsentrasi tersebut. Berdasarkan kurva kalibrasi tersebut dihasilkanlah persamaan regresi linier yaitu $Y = 0,005751X + 0,03113$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,996278.

Nilai r yang mendekati 1 menunjukkan bahwa terjadi hubungan yang linier antara konsentrasi dan serapan dari larutan kuersetin. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan terhadap EEDUB dan ETDUB dengan replikasi sebanyak 3x dengan data yang dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total EEDUB dan ETDUB

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

Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar flavonoid total dari ETDUB lebih besar dibandingkan EEDUB. Hal ini menunjukkan bahwa proses purifikasi yang 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. Hal tersebut dimungkinkan dapat terjadi karena komponen flavonoid yang terdapat dalam daun umbi bit didominasi oleh flavonoid yang bersifat semi polar dan polar.



Gambar 5. Profil nilai IC₅₀ dan kadar flavonoid total pada EEDUB dan ETDUB

Pada penelitian ini juga dapat dilihat hubungan antara kadar flavonoid total yang terdapat dalam EEDUB dan ETDUB. Gambar 5 menunjukkan 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, dan ini membuktikan bahwa flavonoid merupakan salah satu senyawa yang bertanggung jawab dalam aktivitas antioksidan dari daun umbi bit.

4. KESIMPULAN

Ekstrak Terpurifikasi Daun Umbi Bit (ETDUB) memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan Ekstrak Etanol Daun Umbi Bit (EEDUB). Nilai IC₅₀ ETDUB adalah 129,60 µg/mL masuk ke dalam kategori antioksidan dengan kekuatan sedang, sedangkan EEDUB memiliki nilai IC₅₀ 157,87 µg/mL yang masuk ke dalam kategori antioksidan berkekuatan lemah. Kadar flavonoid total ETDUB adalah 2,90 ± 1,16 % QE yang lebih tinggi dibandingkan dengan EEDUB yang memiliki kadar flavonoid total 2,82% ± 0,85 QE. Hal ini menunjukkan bahwa proses purifikasi ekstrak pada daun umbi bit tidak mengurangi kadar flavonoid dan aktivitas antioksidannya.

Commented [Ma9]: Kesimpulan terlalu kompleks. Inti penelitian belum terjawab dengan jelas.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan terima kasih 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 atas dukungannya pada penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

1. Adwas A, Elsayed ASI, Azab AE, Quwaydir A. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng Rev* [Internet]. 2019;6(1-2019):43-7. Available from: <http://medcraveonline.com>
2. Andarwulan N, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chem* [Internet]. 2010;121(4):1231-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.033>
3. Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *Int J Mol Sci*. 2013;14(2):3540-55.
4. Yadnya Putra AAGR, Samirana PO, Andhini DAA. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid Potensial Antioksidan dari Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.). *J Farm Udayana*. 2020;(January):90.
5. Gawlik-Dziki U, Dziki L, Anisiewicz J, Habza-Kowalska E, Sikora M, Dziki D. Leaves of white beetroot as a new source of antioxidant and anti-inflammatory compounds. *Plants*. 2020;9(8):1-14.
6. Mzoughi Z, Chahdoura H, Chakroun Y, Cámara M, Fernández-Ruiz V, Morales P, et al. Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*): Nutritional, phytochemical composition and biological activities. *Food Res Int* [Internet]. 2019;119:612-21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.039>
7. Metode P, Ekstrak P, Bee T, Rutin DS. Comparison of Methods of Producing Bee Propolis Purified Extract Based on Total Flavonoid

Commented [Ma10]: Ikuti panduan. DOI artikel harus dicantumkan.



- Content Using Rutin As Standard. *Tradit Med J.* 2015;20(2):81–6.
8. Eko Murwanto P, Santosa D. Uji Aktivitas Antioksidan Tumbuhan *Cynara scolimus L., Artemisia china L., Borreria repensDC., Polygala paniculata L.* Hasil Koleksi Dari Taman Nasional Gunung Merapi Dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). *Maj Obat Tradis.* 2012;17(3):53.
 9. Asmorowati H, Lindawati NY. Penetapan kadar flavonoid total alpukat (*Persea americana Mill.*) dengan metode spektrofotometri. *Ilm Farm.* 2019;15(2):51–63.
 10. Prawoto BR, Kartika JG. Pengelolaan Aspek Produksi dan Pasca Panen Sayuran Daun Secara Aeroponik dan Hidroponik : Studi Kasus Lembang, Bandung. *Bul Agrohorti.* 2016;4(1):9–19.
 11. Kautsari SN, Humaedi A, Wijayanti DR, Safaat M. Kadar Total Fenol dan Flavonoid Ekstrak Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Melalui Metode Ekstraksi Microwave. *ALCHEMY J Penelit Kim.* 2021;17(1):96.
 12. Sa'adah H, Nurhasnawati H, Permatasari V. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia(L.)Merr*) dengan Metode Spektrofotometri. *J Borneo J Pharmascientech.* 2017;01(01):1–9.
 13. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity. *Songklanakarinn J Sci Technol.* 2004;26(May):211–9.
 14. Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Res Int.* 2013;2013(July).
 15. Widiasanti A, Rohdiana D, Ekatama N. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Teh Putih (*Camellia sinensis*) dengan Metode DPPH (2,2 Difenil-1-Pikrilhidrazil). *J Fortech [Internet].* 2016;1(1):2016. Available from: <http://ejournal.upi.edu/index.php>
 16. Feghhi-Najafabadi S, Safaeian L, Zolfaghari B. In vitro antioxidant effects of different extracts obtained from the leaves and seeds of *Allium ampeloprasum subsp. Persicum.* *J HerbMed Pharmacol.* 2019;8(3):256–60.
 17. Gummadi S, Kommoju M. Colorimetric Approaches To Drug Analysis And Applications – A Review. *Am J PharmTech Res.* 2019;9(1):14–37.
 18. Food P, Journal T, Studi P, Pangan T, Teknik F, Pasundan U. KAJIAN PERBANDINGAN BUAH BLACK MULBERRY (*Morus nigra L.*) DENGAN AIR TERHADAP KARAKTERISTIK SPREADABLE PROCESSED CHEESE BLACK MULBERRY. *Pas Food Technol J.* 2020;6(3):183–91.
 19. Makuasa DAA, Ningsih P. Analysis of Total Flavonoid Levels In Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata L.*) Using UV-Vis



- Sepctrofotometry Methods. 2020;2(1).
20. Sudewi S, Pontoh J. OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS DALAM PENENTUAN KANDUNGAN TOTAL FENOLIK PADA EKSTRAK DAUN GEDI HIJAU (*Abelmoschus manihot* L.) YANG DIUKUR DENGAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS. *Pharmacon*. 2018;7(3):32-41.

