

Penapisan Fitokimia, Uji BSLT, dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies Papilionaceae

RATNA DJAMIL*, TRIA ANELIA

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
Jln. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640.

Diterima 20 Maret 2009, Disetujui 24 Agustus 2009

Abstract: According to literatures, many plants of Papilionaceae family such as red bean (*Phaseolus vulgaris* L.), green bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) and soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) contain flavonoid, isoflavonoid and vitamin E. They all have antioxidant activity and are potential to reduce free radical. This research was aimed to identify secondary metabolites of crude powders and extracts of red bean, green bean and soybean. The bioactivity of each extracts was evaluated with Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method for preliminary assesment of toxicity. It was also evaluated for antioxidant activity using 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) method. The results showed that red bean, green bean and soybean contain saponin, flavonoid, steroid/triterpenoid, coumarin, and tannin. The result of BSLT showed that LC_{50} (Lethality Concentration 50) of red bean was 213.21 ppm; green bean 390.71 ppm; and soybean 252.75 ppm. The result of DPPH tests showed that IC_{50} (Inhibition Concentration 50) of red bean was 47.54 ppm; green bean 95.08 ppm; and soybean 90.43 ppm.

Keywords: Papilionaceae, free radical, antioxidant, DPPH, BSLT.

PENDAHULUAN

DEWASA ini, dunia kedokteran dan kesehatan telah banyak membahas tentang radikal bebas (*free radical*) dan antioksidan. Hal ini dilakukan karena sebagian besar penyakit degeneratif diawali oleh reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh. Reaksi oksidasi terjadi setiap saat; ketika kita bernafas pun terjadi reaksi oksidasi. Reaksi ini memicu terbentuknya radikal bebas yang sangat aktif, yang dapat merusak struktur serta fungsi sel. Namun, reaktivitas radikal bebas tersebut dapat dihambat oleh sistem antioksidan yang melengkapi sistem kekebalan tubuh⁽¹⁾.

Di sisi lain, terjadi "booming" produk makanan dan minuman yang berlabel antioksidan dan dikatakan dapat melawan kerja radikal bebas. Produk-produk antioksidan tersebut dijual dengan harga yang cukup mahal. Padahal, komponen antioksidan terdapat di alam secara melimpah, baik dalam buah-buahan, sayur-sayuran maupun kacang-kacangan⁽¹⁾.

Antioksidan didefinisikan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi

dengan radikal bebas reaktif membentuk senyawa non-radikal bebas yang tidak reaktif dan relatif stabil. Sementara itu, radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya.

Berbagai kemungkinan dapat terjadi sebagai akibat kerja radikal bebas, termasuk gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, penyakit autoimun, penyakit degeneratif, hingga kanker^(1,2).

Kanker merupakan penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis pada organisme multiseluler. Jenis penyakit kanker yang banyak terdapat pada masyarakat saat ini adalah kanker payudara, prostat, hati, limfoma, darah, dan kanker mulut rahim⁽³⁾.

Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi dua, yaitu antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis merupakan sistem pertahanan utama (primer) terhadap kondisi stres oksidatif. Termasuk kelompok ini adalah enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase. Sedangkan yang termasuk kelompok antioksidan non-enzimatis adalah vitamin A, C, E, β -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin, isokatekin, dan asam lipoat^(1,2).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol kacang

* Penulis korespondensi, Hp. 08128170958
e-mail: ratnadj_ffup@yahoo.co.id

merah (*Phaseolus vulgaris* L.), kacang hijau (*Phaseolus aureus* Roxb.), dan kacang kedelai (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Selain itu, dilakukan pula uji toksisitas menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk mengetahui aktivitas biologisnya.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Simplisia dari biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.), kacang hijau (*Phaseolus aureus* Roxb.), dan kacang kedelai (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.), DPPH, metanol *pro analysis*, air suling, vitamin C, larva udang *Artemia salina* Leach, air laut, kloroform, asam klorida 1:10, asam klorida pekat, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, serbuk magnesium, amil alkohol, natrium hidroksida 1 N, feri (III) klorida, formaldehida, natrium asetat, eter, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, alkohol, dan ammonia 30%. Peralatan utama yang digunakan terdiri dari spektrofotometer UV-vis, tabung reaksi, timbangan analitik, *homogenizer*, tangas air (*waterbath*), botol gelap, pipet tetes, mikro pipet, pipet volume, batang pengaduk, kertas Whatmann, vakum rotavapor, aluminium foil, lumpang dan alu, gelas ukur, labu tentukur, vial, inkubator, cawan penguap, kertas saring, corong pisah, wadah penetas, kaca pembesar, dan lampu TL 18 Watt.

METODE. Determinasi tanaman. Determinasi terhadap tanaman kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.), kacang hijau (*Phaseolus aureus* Roxb.), dan kacang kedelai (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) dilakukan di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong, Bogor.

Pengumpulan dan penyediaan bahan. Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah biji tanaman kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.), kacang hijau (*Phaseolus aureus* Roxb.), dan kacang kedelai (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) yang diperoleh dari Balitro. Penyediaan simplisia dilakukan dengan cara bahan segar dibersihkan dari pengotor, dikeringkan, kemudian digiling menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat.

Pembuatan ekstrak kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai. Sebanyak 100 g serbuk biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.), kacang hijau (*Phaseolus aureus* Roxb.), dan kacang kedelai (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) masing-masing diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol sampai tersari sempurna. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan rotavapor vakum sampai didapat ekstrak kental.

Penapisan fitokimia. Penapisan fitokimia terhadap serbuk. Identifikasi golongan alkaloid.

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dilembabkan dengan 5 ml amonia 30% dan digerus dalam mortir, kemudian ditambah 20 ml kloroform dan digerus dengan kuat. Campuran tersebut disaring dengan kertas saring, filtrat berupa larutan organik diambil (sebagai larutan A). Sebagian dari larutan A (10 ml) diekstraksi dengan 10 ml larutan HCl 1:10 dengan pengocokan tabung reaksi, diambil larutan bagian atasnya (larutan B). Larutan A diteteskan beberapa tetes pada kertas saring dan disemprot atau ditetesi dengan pereaksi Dragendorff; terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Larutan B dibagi dalam dua tabung reaksi, masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff dan Mayer; terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

Identifikasi golongan steroid dan triterpenoid.

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam (dalam wadah dengan penutup rapat), kemudian disaring dan diambil filtratnya. Sebanyak 5 ml dari filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Buchard). Terbentuknya warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid atau triterpenoid.

Identifikasi golongan flavonoid. Terhadap 2 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang kemudian digunakan sebagai larutan percobaan. Ke dalam 5 ml larutan percobaan (dalam tabung reaksi) dibubuhkan serbuk atau lempeng magnesium secukupnya dan ditambah 1 ml asam klorida pekat serta 5 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Terbentuknya warna pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Identifikasi golongan saponin. Sebanyak 10 ml larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi golongan flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok selama 10 detik secara vertikal, kemudian dibiarkan 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes asam klorida 1% (encer) busa tetap stabil.

Identifikasi golongan tanin. Terhadap 2 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 ml air, dididihkan selama 15 menit, didinginkan, dan disaring dengan kertas saring, kemudian filtrat dibagi dua bagian. Ke

dalam filtrat bagian pertama ditambahkan larutan feri (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Ke dalam filtrat bagian kedua ditambahkan 15 ml pereaksi Stiasny (formaldehida 30% : HCl pekat = 2:1), dan dipanaskan di atas tangas air. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekuat. Selanjutnya endapan disaring, filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat, dan ditambahkan beberapa tetes larutan feri (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat.

Identifikasi golongan kuinon. Sebanyak 5 ml larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi flavonoid, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa golongan kuinon.

Identifikasi golongan kumarin. Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi (volume 20 ml), ditambahkan 10 ml kloroform, kemudian dipasang corong (yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air) pada mulut tabung dan dipanaskan 20 menit di atas penangas air lalu didinginkan, dan disaring dengan kertas saring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering, ke dalam residu ditambahkan 10 ml air panas dan didinginkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 ml larutan ammonia 10%. Fluoresensi hijau atau biru yang terbentuk di bawah lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm menunjukkan adanya senyawa golongan kumarin.

Identifikasi golongan minyak atsiri. Sebanyak 2 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi (volume 20 ml), lalu ditambahkan 10 ml larutan petroleum eter. Pada mulut tabung dipasang corong yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air, kemudian dipanaskan selama 10 menit di atas tangas air dan, setelah dingin, disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diuapkan pada cawan penguap, residu dilarutkan dalam pelarut alkohol sebanyak 5 ml dan disaring dengan kertas saring. Residu yang berbau aromatik menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri.

Penapisan fitokimia terhadap ekstrak.
Identifikasi golongan alkaloid. Sebanyak 40 mg ekstrak dilembabkan dengan 5 ml ammonia 30% digerus dalam mortir, kemudian ditambah 20 ml kloroform dan digerus dengan kuat. Campuran tersebut disaring dengan kertas saring, filtrat berupa larutan organik diambil (sebagai larutan A). Sebagian dari larutan A (10 ml) diekstraksi dengan 10 ml larutan HCl 1:10 dengan pengocokan tabung

reaksi dan diambil larutan bagian atasnya (larutan B). Larutan A diteteskan beberapa tetes pada kertas saring dan disemprot atau ditetesi dengan pereaksi Dragendorff. Terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Larutan B dibagi dalam dua tabung reaksi dan masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff dan Mayer; terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

Identifikasi golongan steroid dan triterpenoid. Sebanyak 20 mg ekstrak dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam (dalam wadah dengan penutup rapat), kemudian disaring dan diambil filtratnya. Sebanyak 5 ml dari filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Buchard). Terbentuknya warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid atau triterpenoid.

Identifikasi golongan flavonoid. Terhadap 40 mg ekstrak ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang akan digunakan sebagai larutan percobaan. Ke dalam 5 ml larutan percobaan (dalam tabung reaksi) ditambahkan serbuk atau lempeng magnesium secukupnya dan ditambah 1 ml asam klorida pekat dan 5 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Terbentuknya warna pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Identifikasi golongan saponin. Sebanyak 10 ml larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi golongan flavonoid terhadap ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok selama 10 detik secara vertikal, kemudian dibiarkan 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes asam klorida 1% (encer) busa tetap stabil.

Identifikasi golongan tanin. Terhadap 40 mg serbuk simplisia ditambahkan 100 ml air, dididihkan selama 15 menit, didinginkan dan disaring dengan kertas saring, kemudian filtrat dibagi dua bagian. Ke dalam filtrat bagian pertama ditambahkan larutan feri (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Ke dalam filtrat bagian kedua ditambahkan 15 ml pereaksi Stiasny (formaldehida 30% : HCl pekat = 2:1) dan dipanaskan di atas penangas air. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekuat. Selanjutnya

endapan disaring, filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat, dan ditambahkan beberapa tetes larutan feri (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat.

Identifikasi golongan kuinon. Sebanyak 5 ml larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi flavonoid terhadap ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa golongan kuinon.

Identifikasi golongan kumarin. Sebanyak 40 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi (volume 20 ml) dan ditambahkan 10 ml kloroform. Setelah dipasang corong (yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air) pada mulut tabung, tabung reaksi dipanaskan 20 menit di atas penangas air dan didinginkan. Setelah penyaringan dengan kertas saring, filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering dan ke dalam residu ditambahkan 10 ml air panas, kemudian didinginkan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 0,5 ml larutan ammonia 10%. Terjadinya fluoresensi hijau atau biru di bawah amati di bawah sinar ultraviolet pada panjang gelombang 366 nm menunjukkan adanya senyawa golongan kumarin.

Identifikasi golongan minyak atsiri. Sebanyak 40 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi (volume 20 ml), lalu ditambahkan 10 ml larutan petroleum eter. Pada mulut tabung dipasang corong yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air, kemudian dipanaskan selama 10 menit di atas penangas air dan setelah dingin disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diuapkan dalam cawan penguap, residu dilarutkan dalam pelarut alkohol sebanyak 5 ml lalu disaring dengan kertas saring. Residu yang berbau aromatik menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri.

Preparasi ekstrak kacang merah, kacang hijau dan kacang kedelai. Uji toksisitas secara BSLT. Pengujian BSLT dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach. dilakukan terhadap ekstrak metanol.

Penetasan telur *Artemia salina* Leach. Disiapkan air laut sintetik dengan melarutkan 38 g garam tanpa iodium dalam 1 l air atau mengambil air laut langsung, kemudian disaring dengan kertas Whatman. Bejana penetas disekat sehingga memiliki dua sisi ruang, yaitu sisi terbuka dan tertutup. Telur *Artemia salina* Leach. Dimasukkan ke dalam bejana penetas yang telah berisi air laut/air laut sintetik tersebut dan disinari dengan lampu TL 18 Watt. Setelah 24 jam, telur yang telah menetas menjadi *nauplii* dipindahkan ke tempat lain, dan 24 jam kemudian *nauplii* tersebut dapat digunakan sebagai

hewan uji.

Persiapan larutan uji. Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1000, 100, dan 10 bpj, masing-masing dengan tiga kali pengulangan. Sebanyak 1 vial digunakan untuk kontrol. Larutan induk dibuat dengan menimbang 20 mg ekstrak yang dilarutkan dalam 2 ml pelarut yang sesuai. Jika sampel sukar larut, ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 1% sebanyak 0,1-50,0 μ l.

Uji toksisitas. Dipipet berturut-turut 500, 50, dan 5 μ l larutan induk tersebut di atas dan masing-masing dimasukkan ke dalam vial kemudian diuapkan sampai kering. Masing-masing konsentrasi dibuat dengan tiga kali pengulangan, kemudian ke dalam masing-masing vial dimasukkan 3 ml air laut dan 10 ekor *nauplii* dan ditambahkan air laut sampai 5 ml. Jika sampel sukar larut dalam air laut, ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 1%. Larutan diaduk sampai homogen, untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan. Dihitung tingkat kematian atau mortalitas dengan menggunakan analisis probit, yaitu dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dan jumlah total larva. Dibuat grafik log konsentrasi terhadap mortalitas. Nilai LC_{50} diperoleh dengan cara menarik garis pada nilai 50% dari sumbu mortalitas sampai memotong sumbu grafik. Perpotongan garis ditarik ke garis konsentrasi di mana konsentrasi zat yang menyebabkan kematian 50% larva yang disebut LC_{50} . Untuk menghitung LC_{50} digunakan kurva yang menyatakan log konsentrasi sebagai sumbu x dan % mortalitas sebagai sumbu y. Hasil LC_{50} diperoleh dari perpotongan garis tersebut kedua sumbu tersebut. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $LC_{50} < 1000$ bpj⁽⁴⁾.

Uji aktivitas antioksidan dengan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Pembuatan larutan DPPH (0,2 mM). Lebih kurang 8 mg DPPH (BM 394,32) ditimbang, lalu dilarutkan dengan metanol *pro* analisis hingga 100 ml, kemudian ditempatkan dalam botol gelap.

Pembuatan larutan blanko. Dipipet 1 ml larutan DPPH (0,2 mM) ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5 ml, lalu ditambahkan metanol hingga tanda, dan dihomogenkan. Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil.

Pembuatan larutan uji. Ditimbang lebih-kurang 5 mg sampel, lalu dilarutkan dalam 5,0 ml metanol *pro* analisis (1000 bpj); larutan ini merupakan larutan induk. Sebanyak 25, 50, 125, 250, dan 500 μ l larutan induk dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5,0 ml untuk mendapatkan konsentrasi sampel 5, 10, 25, 50, dan 100 μ g/ml. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH dan ditambahkan

dengan metanol *pro* analisis sampai tanda 5 ml. Campuran dihomogenkan dan mulut tabung ditutup dengan aluminium foil.

Pembuatan larutan vitamin C sebagai kontrol positif. Ditimbang lebih kurang 5 mg vitamin C, lalu dilarutkan dalam 5,0 ml metanol *pro* analisis (1000 bpj), larutan ini merupakan larutan induk. Dipipet 20, 30, 40, 50, dan 60 μ l larutan induk ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5,0 ml untuk mendapatkan konsentrasi 4, 6, 8, 10, dan 12 μ g/ml. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH (0,2 mM) dan ditambahkan dengan metanol *pro* analisis sampai tanda 5,0 ml. Larutan dihomogenkan, dan mulut tabung ditutup dengan aluminium foil.

Pengukuran serapan. Larutan uji dengan beberapa konsentrasi diinkubasi dalam tangas air 37°C selama 30 menit, serapan diukur pada panjang gelombang maksimum 517 nm menggunakan spektrofotometer ultraviolet-cahaya tampak.

Cara perhitungan. Persentase inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut: hambatan (inhibisi) = {(serapan blanko – serapan sampel) x 100%} / serapan blanko. Nilai IC_{50} (*inhibition concentration 50*) adalah konsentrasi antioksidan (μ g/ml) yang mampu memberikan persen penangkapan radikal bebas sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Nilai IC_{50} diperoleh dari perpotongan garis antara daya hambatan dan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke

dalam persamaan $y = a + bx$, di mana $y=50$ dan nilai x menunjukkan IC_{50} . Ekstrak dinyatakan aktif sebagai antioksidan bila nilai IC_{50} kurang dari 200 μ g/ml^(5,6).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi tanaman. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong, Bogor, untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis *Phaseolus vulgaris* L. (kacang merah), *Phaseolus aureus* Roxb. (kacang hijau) dan *Glycine soja* Sieb. & Zucc. (kacang kedelai).

Ekstraksi. Sebanyak 100,0056 gram serbuk simplisia kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.), 100,0037 gram serbuk simplisia kacang hijau (*Phaseolus aureus* Roxb.) dan 100,0062 gram serbuk simplisia kacang kedelai (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) dimaserasi sebanyak 9 kali pada suhu kamar dengan menggunakan pelarut metanol masing-masing 500 ml hingga tersari sempurna. Ekstrak yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan vakum rotavapor. Ekstraksi dilakukan dengan metanol dimaksudkan agar semua senyawa tersari dengan baik, karena metanol merupakan pelarut yang bersifat universal dan dapat mengekstraksi semua senyawa metabolit.

Tabel 1. Hasil ekstraksi metanol kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai.

Ekstrak	Bobot ekstrak (g)	Warna ekstrak	Rendemen (%)
Kacang merah	10,3313	Coklat kemerahan	10,33
Kacang hijau	9,3515	Hijau	9,35
Kacang kedelai	22,7029	Coklat kekuningan	22,70

Penapisan fitokimia. Penapisan fitokimia menurut Farnsworth dilakukan terhadap serbuk kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.), kacang hijau (*Phaseolus aureus* Roxb.), dan kacang kedelai (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) untuk mengidentifikasi golongan senyawa kimia yang terkandung di dalam serbuk daun tersebut. Hasil penapisan fitokimia serbuk dan ekstrak kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Uji hayati pendahuluan secara BSLT. Terhadap ekstrak metanol kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai dilakukan uji hayati pendahuluan dengan metode BSLT. Pengerjaan dimulai dengan penetasan telur *Artemia salina* Leach. Setelah 24 jam telur yang sudah menetas menjadi *nauplii*

dipindahkan ke tempat lain, 24 jam setelah itu *nauplii* tersebut sudah dapat digunakan sebagai hewan uji. Disiapkan sembilan vial untuk tiga tingkat konsentrasi, yaitu 1000, 100, dan 10 bpj serta tiga vial untuk kontrol. Selanjutnya dihitung tingkat kematian atau mortalitas dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah total larva untuk mendapatkan nilai LC_{50} .

Dari hasil penelitian uji hayati pendahuluan ini diketahui bahwa ekstrak metanol kacang merah memiliki aktivitas biologi tertinggi dibandingkan ekstrak metanol kacang hijau dan kacang kedelai. LC_{50} ekstrak metanol kacang merah sebesar 213,21 bpj, sedangkan LC_{50} ekstrak metanol kacang hijau 390,71 bpj, dan kacang kedelai 252,75 bpj.

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia serbuk kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai.

Nama Senyawa	Hasil Pengamatan		
	Kacang merah	Kacang hijau	Kacang kedelai
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	+	+
Tanin	+	+	+
Kuinon	-	-	-
Steroid / triterpenoid	+	+	+
Kumarin	+	+	+
Minyak atsiri	-	-	-

Tabel 3. Hasil penapisan fitokimia ekstrak metanol kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai.

Nama Senyawa	Hasil Pengamatan		
	Kacang merah	Kacang hijau	Kacang kedelai
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	+	+
Tanin	+	+	+
Kuinon	-	-	-
Steroid / triterpenoid	+	+	+
Kumarin	+	+	+
Minyak atsiri	-	-	-

Tabel 4. Hasil uji hayati pendahuluan ekstrak metanol kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai secara BSLT.

Ekstrak	Nilai LC ₅₀ (bpj)
Kacang merah	213,21
Kacang hijau	390,71
Kacang kedelai	252,75

Tabel 5. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai dengan metode DPPH.

Ekstrak	Nilai IC ₅₀ (bpj)
Kacang merah	47,54
Kacang hijau	95,08
Kacang kedelai	90,43

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Penelitian dengan metode DPPH untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai dengan dilakukan dengan melihat nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi antioksidan yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Dari hasil ini didapat nilai IC₅₀ ekstrak metanol kacang merah sebesar 47,54 bpj yang merupakan nilai IC₅₀ teraktif dibandingkan ekstrak lainnya. Tetapi, nilai IC₅₀ dari ekstrak metanol kacang merah (juga kacang hijau dan kacang kedelai, tentunya) tersebut masih jauh lebih rendah dibanding nilai IC₅₀ vitamin C sebagai

kontrol positif yang sebesar 5,11 bpj. Dengan demikian, aktivitas antioksidan ekstrak yang diteliti juga lebih rendah dari vitamin C. Berdasarkan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, kekuatan antioksidan ekstrak uji berturut-turut dari yang tertinggi hingga terendah adalah: ekstrak metanol kacang merah, ekstrak metanol kacang kedelai, dan ekstrak metanol kacang hijau.

SIMPULAN

Dari hasil penapisan fitokimia terhadap serbuk dan ekstrak metanol kacang merah, kacang hijau, dan

kacang kedelai ditunjukkan adanya senyawa saponin, flavonoid, steroid/triterpenoid, kumarin, dan tanin. Berdasarkan hasil uji hayati pendahuluan dengan metode BSLT diketahui bahwa ekstrak metanol kacang merah memiliki aktivitas biologi tertinggi dengan nilai LC_{50} 213,21 bpj. Sementara itu, nilai LC_{50} ekstrak metanol kacang hijau adalah 390,71 bpj dan ekstrak metanol kacang kedelai 252,75 bpj. Dari hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH diketahui bahwa ekstrak metanol kacang merah memiliki IC_{50} teraktif dibandingkan ekstrak lainnya. IC_{50} ekstrak metanol kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai berturut-turut adalah sebesar 47,54; 95,08, dan 90,43 bpj.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam kacang merah, kacang hijau, dan kacang kedelai yang bersifat sebagai antioksidan dan bersifat toksik terhadap *Artemia salina* Leach.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winarsi H. Antioksidan alami dan radikal bebas. Ed. V. Yogyakarta: Kanisius; 2007. hal. 11-2, 15-6, 18, 78, 147-8.
2. Sofia D. Antioksidan dan radikal bebas. Diambil dari: <http://www.chem-is-try.org>. Diakses 2 Februari 2008.
3. Aryanti. Isolasi senyawa antikanker dari tanaman keladi tikus (*Typhonium divaricatum* (Lodd) Decne). Jurnal Bahan Alam Indonesia. 2003.3(2):188-90.
4. Meyer BN. Brine shrimp a convenient general bioassay for active plant constituent. Planta Medika. 1982.(45):31-4.
5. Kim YH. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. Korea: Division of food science and biotechnology Kyungnam University; 2008. p. 303-11.
6. Hanani E, Mun'im A, Ryany S. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia sp* dari kepulauan seribu. Majalah Ilmu Kefarmasian. 2005.2(3):130.