

Perbandingan Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol Biji Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Fraksi Metanol Biji Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus*) Menggunakan Metode DPPH

Rezkiyah Anatasya Dwi Murni Hulungo¹, Hamsidar Hasan^{1*}, A. Mu'thi Andy Suryadi¹, Endah Nurrohanta Djuwarno¹, Wiwit Zuriati Uno¹

Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo,
Jl. Jenderal Sudirman No. 06 Kota Gorontalo 96128, Indonesia

*Email: hamsidar.hasan@ung.ac.id (Phone/Whatshapp : 082195312988)

ABSTRACT

Antioxidant compounds are a group of phytochemical compounds that have the potential to counteract free radicals and are often found in plants. *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus radiatus* L. are plants that belong to the same family Fabaceae. Both of these plants have great potential as antioxidants. This study aims to determine the comparison of antioxidant activities in methanol extracts of common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) and mung bean seeds (*Phaseolus radiatus* L.) using DPPH method. This research uses qualitative and quantitative analysis methods. Qualitative analysis uses phytochemical screening and Thin Layer Chromatography analysis, while quantitative analysis uses the UV-Vis spectrophotometry method at a wavelength of 517 nm with concentration variations of 20, 40, 60, 80 and 100 µg/mL. The research results show that the IC₅₀ value in the fraction of common bean seeds is 27.51 µg/mL, while in the fraction of mung bean seeds is 51.62 µg/mL. Based on the Whitney Test statistical analysis, the antioxidant activity in the fraction of common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) is greater than the fraction of mung bean seeds (*Phaseolus radiatus* L.), where there is a significant difference between the two samples (Asymp. Sig. <0,05).

Keywords:

Antioxidant; Common_Bean_Seeds; Mung_Bean_Seeds; DPPH; UV-Vis Spectrophotometry

Received:

2026 -01-23

Accepted:

2026 -06-12

Online:

2026 -06-20

ABSTRAK

Senyawa antioksidan merupakan suatu kelompok senyawa fitokimia yang berpotensi dalam menangkal radikal bebas dan sering ditemukan dalam tumbuhan. *Phaseolus radiatus* L. dan *Phaseolus vulgaris* L. merupakan tumbuhan yang berasal dari family yang sama yaitu Fabaceae. Dimana kedua tanaman ini memiliki banyak potensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan aktivitas antioksidan pada fraksi metanol biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) menggunakan metode DPPH. Metode penelitian ini menggunakan metode analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif menggunakan metode skrining fitokimia dan analisis Kromatografi Lapis Tipis, sedangkan analisis kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 µg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ pada fraksi biji

kacang merah sebesar 27.51 µg/mL. Sedangkan pada fraksi biji kacang hijau sebesar 51.62 µg/mL. Berdasarkan analisis statistik *Mann Whitney Test*, analisis antioksidan pada fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) lebih besar dibandingkan dengan fraksi biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) dimana terdapat perbedaan yang signifikan dari kedua sampel (*Asymp Sig.* < 0.05).

Kata Kunci:

Antioksidan; Biji_Kacang_Merah; Biji_Kacang_Hijau; DPPH; Spektrofotometri_UV-Vis

Diterima:
23-01-2026

Disetujui:
12-06-2026

Online:
20-06-2026

1. Pendahuluan

Masalah kesehatan yang terjadi akhir-akhir ini di Indonesia yaitu insiden meningkatnya jumlah penyakit degeneratif. Menurut data Organisasi Kesehatan Dunia, penyakit degeneratif terbentuk disebabkan karena adanya radikal bebas yang menjadi salah satu penyebab utama kematian di seluruh dunia. Akibatnya radikal bebas menumpuk di dalam tubuh dan menimbulkan penyakit degeneratif diantaranya hipertensi, kanker, diabetes, jantung koroner, rematik, katarak, stroke, penyakit jantung, arteriosklerosis, iskemia, dan penyakit neurodegenerative.

Radikal bebas diartikan sebagai suatu zat yang terdiri dari satu atau lebih elektron bebas, bersifat sangat aktif dan tidak dapat terkontrol juga dapat menimbulkan terjadinya kerusakan sel ataupun kematian sel (penuaan). Untuk menangkal tertumpuknya zat radikal bebas maka diperlukan senyawa antioksidan yang merupakan suatu substansi penghambat proses oksidasi [1]. Antioksidan bekerja dengan cara memberikan elektronnya, kemudian berikatan dengan elektron yang bebas dan menghentikan proses rangkaian reaksi radikal bebas yang mematikan.

Antioksidan alami mampu menjaga tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh molekul oksigen yang bersifat reaktif, mengurangi risiko penyakit degeneratif, dan mengurangi peroksidasi lemak dalam makanan [2]. Antioksidan alami dapat diperoleh dari tumbuhan yang umumnya memiliki senyawa fitokimia yang bersifat antioksidan diantaranya polifenol/fenolik, flavonoid, alkaloid, steroid dan terpenoid yang tersebar di bagian tanaman seperti batang, daun, biji, buah, bunga, akar, dan serbuk sari [1].

Kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) adalah satu diantara varietas polong-polongan yang bersifat sebagai antioksidan dengan kemampuan dapat mengatasi bermacam-macam penyakit. Kacang merah dapat menurunkan resiko terjadinya kerusakan pada pembuluh darah yang disebabkan oleh diabetes, mengurangi konsentrasi kolesterol dalam sirkulasi darah, mengurangi resiko tumbuhnya sel kanker di payudara dan usus besar. serta menurunkan konsentrasi glukosa dalam sirkulasi darah [3]. Sedangkan kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) adalah satu diantara varietas polong-polongan yang sering dikonsumsi masyarakat Indonesia dan memiliki potensi sebagai antioksidan. Kandungan serat yang terdapat pada kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) yang mudah larut dapat mengurangi kadar kolestrol di dalam tubuh, selain itu kacang hijau juga berpotensi untuk mencegah terjadinya kanker dan menurunkan laju pertumbuhan sel-sel tumor maupun kanker. Senyawa antioksidan yang ada di dalam tanaman kacang hijau bagus untuk memelihara ketahanan tubuh. Tidak hanya itu kacang hijau juga memiliki kadar glukosa yang rendah, sehingga bagi penderita diabetes baik untuk mengonsumsinya [4].

Berdasarkan uraian diatas, akan dilakukan kajian lebih lanjut mengenai senyawa aktif dalam fraksi metanol biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) dan fraksi metanol biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) baik secara kualitatif dan kuantitatif serta membandingkan aktivitas antioksidan pada fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) dan fraksi biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.).

2. Metode

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu alat semprot, bejana maserasi, batang pengaduk, blender, cawan porselen, *chamber* KLT, gelas kimia, gelas ukur, kain saring, kuvet, labu ukur, lampu UV 254 nm dan 366 nm, neraca analitik, pipet tetes, rak tabung reaksi, spatula logam, spektrofotometri UV-Vis, sudip, tabung reaksi, dan vial.

Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu, aluminium foil, aquades, DPPH, etanol 70%, etil asetat, FeCl₃, HCl pekat, kertas saring, lempeng KLT, metanol, metanol p.a, n-Heksan, pereaksi dragendrof, sampel biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) serbuk magnesium (Mg), dan silika gel.

Pengambilan Sampel

Sampel biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) diperoleh dari Kecamatan Kawangkoan, Kabupaten Minahasa, Provinsi Sulawesi Utara dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) diperoleh dari Kecamatan Tapa, Kabupaten Bonebolango, Provinsi Gorontalo. Sampel diproses melalui serangkaian langkah, termasuk sortasi dalam keadaan basah, pencucian, pemotongan, pengeringan, dan sortasi kering, sehingga menghasilkan simplisia dari biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) yang siap untuk diekstraksi.

Determinasi Tanaman

Determinasi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo untuk memverifikasi bahwa simplisia yang akan digunakan adalah biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.).

Pengolahan Sampel

Sampel biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L) yang telah dikumpulkan, dibersihkan dari kotoran dan kemudian disortir dalam keadaan basah. Setelah pembersihan menyeluruh di bawah air mengalir, sampel dibiarkan kering dengan cara diangin-anginkan. Proses pengeringan dilakukan selama sekitar 3 hari. Setelah itu, dilakukan sortasi kering, dan sampel biji kacang merah dan biji kacang hijau dihaluskan menggunakan blender. Dengan demikian, sampel yang telah dihaluskan disimpan pada suhu kamar setelah disegel dengan hati-hati dalam wadah kering.

Pembuatan Ekstrak

Biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) yang telah dihaluskan kemudian diekstraksi secara bertahap menggunakan teknik maserasi dengan pelarut yang bervariasi dalam tingkat kepolarannya, yakni n-heksan, etil asetat, dan metanol. Tahap maserasi dimulai dengan menimbang 500 g simplisia

biji kacang merah dan biji kacang hijau yang sudah dikeringkan, lalu mencampurkannya dengan 1500 mL pelarut n-heksan sampai sampel benar-benar terendam. Maserasi dilakukan selama tiga kali sehari, dengan sedikit pengadukan setiap enam jam, hal ini dilakukan selama tiga hari berikutnya. Setelah 3 hari, untuk membedakan residu dan filtrat, ekstrak disaring menggunakan kertas saring. Residu (ampas) dari simplisia dikeringkan dengan diangin-anginkan. Selanjutnya residu dimaserasi dalam kurun waktu 3 x 24 jam menggunakan 1500 mL pelarut etil asetat, menggunakan protokol yang sama. Residu dan filtrat dipisahkan setelah tiga periode 24 jam. Setelah itu, residu (ampas) simplisia dikeringkan kembali kemudian dimaserasi dengan proses yang sama dan 1500 mL pelarut metanol. Filtrat hasil ekstraksi kemudian diuapkan dengan diangin-anginkan hingga diperoleh fraksi kental.

Skrining Fitokimia

Identifikasi Flavonoid

Tabung reaksi yang sudah diberi label dipenuhi dengan fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) sebanyak ± 1 mL. Selanjutnya, tiga tetes HCl pekat dan 0,5 mg magnesium ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga.

Identifikasi Steroid/Triterpenoid

Dalam tabung reaksi yang telah diberi label, fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) dimasukkan sebanyak ± 1 mL. Kemudian ditambahkan CH_3COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan beberapa menit. Adanya steroid menunjukkan warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu.

Identifikasi Saponin

Tabung reaksi yang sudah diberi label dipenuhi dengan fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) sebanyak ± 1 mL. Selanjutnya, satu tetes HCl 2 N ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan uji busa dilakukan dalam air panas untuk mendeteksi. Adanya saponin ditunjukkan jika busa bertahan selama 30 menit tanpa kunjung hilang.

Identifikasi Alkaloid

Dalam tabung reaksi yang sudah diberi label, fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) dimasukkan sebanyak ± 1 mL. Setelah itu, tabung ditambahkan 3 tetes pereaksi *Dragendroff* jika positif mengandung alkaloid maka akan terbentuk endapan berwarna jingga.

Identifikasi Tanin

Dalam tabung reaksi yang sudah diberi label, fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) dimasukkan sebanyak ± 1 mL. Setelah itu dicampur dengan 1 mL klorida besi (III) 3%. Endapan hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

Analisis Senyawa Antioksidan Pada Fraksi Biji Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) Dan Biji Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.) Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diamnya adalah silika gel GF254, dan fase geraknya mengandung n-heksana, etil asetat, dan kloroform. Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan melarutkan sedikit sampel atau fraksi yang mengandung senyawa antioksidan dari biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) dalam pelarut yang sesuai. Kemudian, sampel tersebut ditotolkan di plat KLT dan ditempatkan di dalam bejana yang sudah terisi dengan eluen. Plat KLT yang telah ditotolkan dengan fraksi dielusi menggunakan fase gerak n-heksana: etil asetat: kloroform dalam perbandingan tertentu (7:3:1). Setelah itu, lempeng KLT didiamkan pada suatu bejana tersebut hingga eluen mencapai garis batas yang telah dibuat. Kemudian Plat KLT dikeluarkan dari bejana dan diangin-anginkan. Setelah pengeringan, pelat diperiksa pada 366 nm di bawah sinar UV, dan 1,1-Difenil-2-Pikril Hidrazil (DPPH) disemprotkan pada noda yang dapat dibaca. Lempeng kemudian dibiarkan kering hingga warnanya berubah dari ungu menjadi kuning, menandakan adanya aktivitas antioksidan.

Uji Aktivitas Antioksidan

Pembuatan Larutan DPPH 0,05 mM

Untuk membuat larutan DPPH, 0,98 mg DPPH ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Setelah itu, campuran dihomogenisasi dengan cara melarutkannya dalam 50 mL metanol per pelarut. Labu ukur ditutup dengan aluminium foil untuk melindunginya dari cahaya.

Pembuatan Larutan Blangko

Untuk membuat 2 mL, larutan DPPH 0,05 mM diencerkan dengan 2 mL metanol PA. Setelah masa inkubasi 30 menit pada suhu 37°C, serapan campuran pada panjang gelombang maksimum ditentukan.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Tabung reaksi berisi 2 mL larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikilhidrazil) 0,05 mM diisi dengan 2 mL metanol pa, diaduk untuk memastikan homogenitas, dan kemudian dimasukkan ke dalam vial untuk pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515–520 nm.

Pembuatan Larutan Sampel

Pembuatan larutan induk konsentrasi 1000 µg/mL

Fraksi biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) sebanyak 30 mg ditimbang untuk menghasilkan larutan stok 1000 µg/mL. Selanjutnya kedua bagian tersebut dihomogenisasi dan dilarutkan dalam 30 mL metanol pa. sambil diaduk.

Pembuatan larutan uji seri konsentrasi

Dengan memipet 0,6, 1,5, 1,8, 2,4, dan 3 mL larutan fraksi metanol biji kacang merah dan biji kacang hijau 1000 µg/mL, dilakukan variasi konsentrasi pada fraksi metanol biji kacang merah dan biji kacang hijau dengan variasi 20, 40, 60, 80, dan 100 µg/mL. Botol itu kemudian diisi hingga 5 mL metanol.

Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Untuk membuat larutan uji, 2 mL larutan sampel dan 2 mL larutan DPPH digabungkan, diaduk hingga tercampur sempurna, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah itu, panjang gelombang 517 nm digunakan untuk mendeteksi serapan.

Perhitungan nilai %inhibisi dan IC 50

Nilai serapan yang diperoleh dari pengukuran spektrofotometri UV-Vis dapat dimanfaatkan untuk menentukan persentase penghambatan suatu bahan tertentu. Dengan menggunakan persamaan, presentase penghambatan radikal DPPH ditentukan: [5]

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blangko} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Blangko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorban Blanko = Absorbansi DPPH tidak dengan sampel

Absorban Sampel = Absorbansi DPPH dengan penambahan sampel

Selanjutnya dengan menggunakan persamaan tersebut dibuat kurva regresi linier untuk menentukan nilai IC₅₀: [5]

$$Y = a + bx$$

Keterangan:

Y = % Inhibisi

a = Gradien

x = Konsentrasi (µg/mL)

b = Konstanta

Konsentrasi yang diperoleh dari persamaan $Y = a + bx$ bila persentase penghambatannya 50 dikenal dengan nilai IC₅₀

3. Hasil dan Pembahasan

Determinasi Tanaman

Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan menggunakan referensi mengenai Sistematika Tumbuhan Tinggi serta mengenai Flora Untuk Sekolah Indonesia Cetakan Ketiga, dan didapatkan kebenaran bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini benar tanaman biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan tanaman biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.)

Hasil Ekstraksi Biji Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Biji Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.)

Sampel biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) di ekstraksi menggunakan metode maserasi bertingkat. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode ekstraksi maserasi bertingkat. Metode maserasi bertingkat merupakan proses ekstraksi yang digunakan untuk mendapatkan senyawa-senyawa tertentu dari bahan organik, seperti tumbuhan atau herbal. Proses ini melibatkan perendaman bahan mentah dalam pelarut tertentu

untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang larut di dalamnya. Namun, yang membedakan maserasi bertingkat adalah pengulangan proses tersebut dengan menggunakan pelarut baru untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang masih tersisa dalam bahan sisa setelah ekstraksi pertama.

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Biji Kacang Merah dan Biji Kacang Hijau

Sampel	Pelarut	Berat sampel (g)	Volume pelarut (mL)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Biji Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	N-heksan	500	3000	28	5,6
	Etil Asetat	489	3000	43,8	8,9
	Metanol	470	3000	62,9	13,3
Biji Kacang Hijau (<i>Phaseolus radiatus</i> L.)	N-heksan	500	3000	30	6
	Etil Asetat	483	3000	48,2	9,9
	Metanol	472	3000	59,6	12,6

Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil ekstraksi dari maserasi bertingkat dengan sampel biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) sebanyak 500 g menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 3000 mL diperoleh fraksi kental sebanyak 28 g dengan jumlah persen rendemen sebanyak 5,6 %, sebanyak 489 g sampel yang diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 3000 mL diperoleh fraksi kental sebanyak 43,8 g dengan jumlah persen rendemen sebanyak 8,9 %, sebanyak 470 g sampel yang diekstraksi menggunakan pelarut metanol sebanyak 3000 mL diperoleh fraksi kental sebanyak 62,9 g dengan jumlah persen rendemen sebanyak 13,3 %. Sedangkan pada hasil ekstraksi dari maserasi bertingkat dengan sampel biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) sebanyak 500 g menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 3000 mL diperoleh fraksi kental sebanyak 30 g dengan jumlah persen rendemen sebanyak 6 %, sebanyak 483 g sampel yang diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 3000 mL diperoleh fraksi kental sebanyak 48,2 g dengan jumlah persen rendemen sebanyak 9,9 %, sebanyak 472 g sampel yang diekstraksi menggunakan pelarut metanol sebanyak 3000 mL diperoleh fraksi kental sebanyak 59,6 g dengan jumlah persen rendemen sebanyak 12,6 %. Sehingga dapat dikatakan bahwa hasil persen rendemen fraksi metanol mempunyai persen rendemen yang lebih besar dibandingkan fraksi etil asetat dan n-heksan.

Analisis Kualitatif Senyawa Antioksidan Fraksi Metanol biji Kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Fraksi Metanol Biji Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.) Analisis Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder suatu bahan alam. Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang dapat memberikan gambaran mengenai kandungan senyawa tertentu dalam bahan alam yang akan diteliti. Metode skrining fitokimia secara kualitatif dapat dilakukan melalui reaksi warna dengan menggunakan suatu pereaksi tertentu. Adapun senyawa target yang bersifat sebagai antioksidan diantaranya flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, steroid dan triterpenoid [6].

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Daun Jarak Pagar dan Jarak Merah

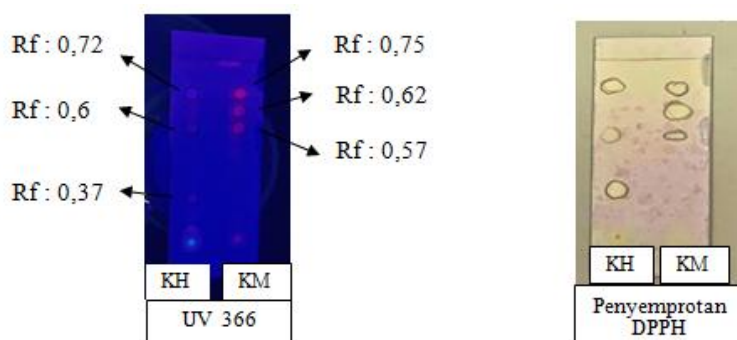
Sampel	Jenis Pengujian	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Biji Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Flavonoid	Magnesium + HCl	Merah, kuning, jingga	Positif
	Alkaloid	Dragendroff	Endapan jingga	Positif
	Tanin	Besi klorida	Biru tua, hitam kehijauan	Positif
	Saponin	Air panas + HCl	Buih	Negatif
	Steroid & Terpenoid	CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄	Biru, hijau & merah, ungu	Negatif
Biji Kacang Hijau (<i>Phaseolus radiatus</i> L.)	Flavonoid	Magnesium + HCl	Merah, kuning, jingga	Positif
	Alkaloid	Dragendroff	Endapan jingga	Positif
	Tanin	Besi klorida	Biru tua, hitam kehijauan	Positif
	Saponin	Air panas + HCl	Buih	Negatif
	Steroid & Terpenoid	CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄	Biru, hijau & merah, ungu	Negatif

Tabel 2 menunjukkan data hasil uji skrining fitokimia senyawa antioksidan pada fraksi metanol biji kacang merah positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin. pada fraksi metanol biji kacang hijau positif mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid. Flavonoid dapat diuji keberadaannya menggunakan Mg dan HCl pekat. Senyawa flavonoid dapat menghasilkan warna merah, kuning atau jingga ketika tereduksi dengan Mg dan HCl [7]. Pada pereaksi dragendorf, jika suatu senyawa mengandung alkaloid, maka pada pengujian dengan reagen Dragendorff akan membentuk endapan berwarna merah bata, coklat orange, atau jingga, karena senyawa alkaloid akan berinteraksi dengan ion tetraiodobismutat (III). Senyawa tanin adalah senyawa yang bersifat polar karena adanya gugus OH, oleh karena itu ketika sampel ditambahkan FeCl₃ akan terjadi perubahan warna seperti biru tua atau hijau kehitaman yang menandakan adanya senyawa tannin [8]. identifikasi senyawa Saponin dilakukan dengan penambahan aquades yang sudah dipanaskan, kemudian disaring. Filtrat dikocok. Terbentuknya lapisan busa mengindikasikan adanya saponin [9]. identifikasi senyawa steroid/terpenoid ditambahkan 10 tetes asetat anhidrida dan 3 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil uji reaksi positif terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah dan terbentuk warna hijau untuk hasil positif mengandung steroid [10].

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pengujian secara kualitatif juga dapat dilakukan dengan analisis menggunakan kromatografi lapis tipis. Dimana pengujian ini dilakukan untuk menegaskan hasil uji kualitatif skrining fitokimia senyawa antioksidan pada fraksi metanol biji kacang merah dan fraksi metanol biji kacang hijau. Metode kromatografi lapis tipis (KLT) bertujuan untuk mengetahui senyawa kimia yang terdapat di dalam suatu sampel yang di lihat dari nilai Rf pada suatu sampel mendekati atau sama dengan nilai rf pembanding. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu analisis sederhana yang dapat digunakan untuk melakukan penegasan terhadap senyawa kimia yang terkandung pada tumbuhan disamping skrining fitokimia. Nilai Rf dan warna noda yang diperoleh pada KLT dapat memberikan identitas senyawa yang terkandung [11].

Adapun prinsip dari KLT di mana suatu analit bergerak melintasi lapisan fase diam di bawah pengaruh fase gerak, yang bergerak melalui fase diam. Semakin polar suatu senyawa fase gerak, semakin besar partisi ke dalam fase diam gel silika, semakin sedikit waktu yang dibutuhkan fase gerak untuk bergerak menyusuri plat sehingga semakin pendek jarak tempuh senyawa tersebut menaiki plat dalam waktu tertentu [12]. Pada penelitian ini metode kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan fase diam berupa plat KLT GF254 dengan fase gerak eluen n-heksan : etil Asetat : kloroform. Dalam pemilihan fase gerak dapat ditentukan melalui eksperimen *trial and error* hingga didapatkan eluen yang sesuai guna memberikan hasil pemisahan yang baik.



Gambar 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Biji Kacang Merah dan Biji Kacang Hijau

Keterangan :

KH = Kacang Merah

KM = Kacang Hijau

Berdasarkan hasil profil KLT di atas pada fraksi metanol biji kacang merah diperoleh 3 bercak noda dengan nilai Rf yaitu 0,57; 0,62; 0,75. Sedangkan pada fraksi metanol biji kacang hijau diperoleh 3 bercak noda dengan nilai Rf yaitu 0,37; 0,6; 0,72. Hasil setelah dilakukan penyemprotan dengan larutan DPPH diperoleh perubahan warna ungu menjadi kuning pada fraksi metanol biji kacang merah dan biji kacang hijau. Berdasarkan literatur nilai Rf flavonoid yaitu pada rentang 0,2-0,75 [13]. Nilai Rf alkaloid yang paling umum yaitu 0,07-0,62 [14]. Nilai Rf Tanin yaitu 0,07-0,77 [15]. Range nilai Rf terpenoid yaitu 0,2 – 0,8 [16]. Nilai saponin standar yaitu sebesar 0,565 [17]. Senyawa-senyawa dengan nilai Rf yang sama menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama atau mirip.

Hasil bercak noda yang telah didapatkan dilakukan uji kualitatif antioksidan dengan cara disemprotkan dengan pereaksi DPPH dan didapatkan hasil perubahan warna menjadi kuning. Hal ini menandakan bahwa kedua fraksi bersifat sebagai antioksidan. Prinsip dasar dalam uji antioksidan menggunakan metode DPPH adalah adanya reaksi kimia antara senyawa antioksidan dan radikal bebas DPPH melalui mekanisme reaksi donasi atau pemberian atom hidrogen oleh senyawa antioksidan ke radikal bebas DPPH yang mengakibatkan adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning atau dari ungu pekat menjadi ungu pudar [18].

Analisis Kuantitatif Senyawa Antioksidan Fraksi Metanol Biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Fraksi Metanol Biji Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.).

Analisis kuantitatif aktivitas antioksidan pada fraksi metanol biji kacang merah dan fraksi metanol biji kacang hijau ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. spektrofotometri UV-Vis digunakan dalam uji aktivitas antioksidan DPPH untuk memantau perubahan absorbansi yang disebabkan oleh reaksi antara senyawa antioksidan dalam sampel dengan radikal DPPH, yang memberikan informasi tentang efektivitas antioksidan dari senyawa tersebut.

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada sampel biji kacang merah dan biji kacang hijau dengan spektrofotometri UV-Vis, dibuat terlebih dahulu larutan blanko menggunakan DPPH dengan konsentrasi 0,05 mM dalam metanol p.a sebanyak 50 mL dan larutan sampel fraksi biji kacang merah dan biji kacang hijau dengan konsentrasi 1000 µg/mL kemudian diencerkan menjadi beberapa seri dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL lalu diinkubasi selama 30 menit. Tujuan diinkubasi selama 30 menit karena reaksi berjalan lambat sehingga sampel membutuhkan waktu untuk dapat bereaksi dengan radikal bebas [19]. Selanjutnya dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum pada larutan blanko agar dapat mengetahui daerah serapan tertinggi yang dihasilkan berupa nilai absorbansi. Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan agar absorbansi sampel berada pada panjang gelombang maksimum sehingga didapat hasil yang maksimal [20]. Hasil penentuan panjang gelombang DPPH konsentrasi 0,05 mM diperoleh panjang gelombang maksimum 517nm. Serapan blanko DPPH dan larutan seri sampel diukur sebanyak tiga kali (triplo) guna meningkatkan akurasi data yang diperoleh. Hasil serapan yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai persen inhibisi.

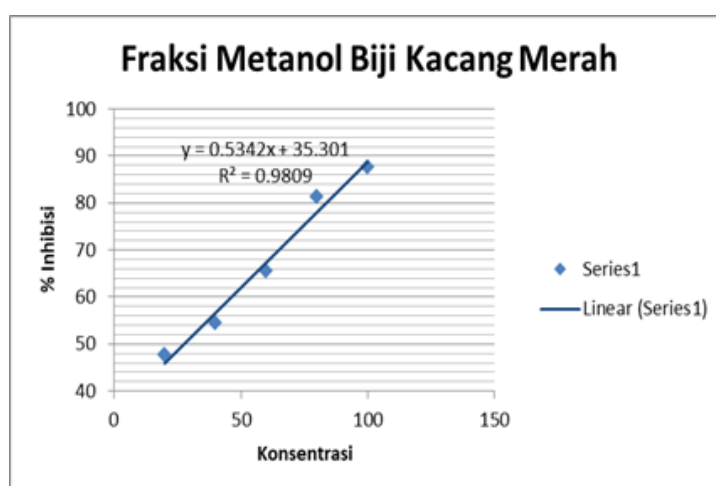
Tabel 3. Hasil Persen Inhibisi Dan Nilai IC₅₀ Fraksi Biji Kacang Merah

Konsentrasi (µg/mL)	Adsorbansi		% Inhibisi	IC ₅₀ (µg/mL)
	Blanko	Sampel		
20	0,732	0,383	47.67	27.51
40	0,732	0,333	54.50	
60	0,732	0,252	65.57	
80	0,732	0,137	81.28	
100	0,732	0,09	87.70	

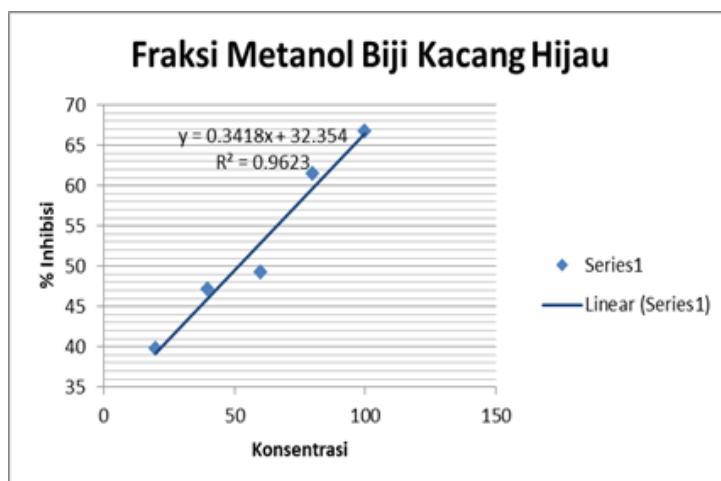
Tabel 4. Hasil Persen Inhibisi Dan Nilai IC₅₀ Fraksi Biji Kacang Hijau

Konsentrasi (µg/mL)	Adsorbansi Blanko	Adsorbansi Sampel	% Inhibisi	IC ₅₀ (µg/mL)
20	0,732	0,441	39.75	51.62
40	0,732	0,387	47.13	
60	0,732	0,372	49.18	
80	0,732	0,282	61.47	
100	0,732	0,243	66.75	

Dari nilai absorbansi yang telah diperoleh, digunakan untuk menentukan hasil % inhibisi dan IC 50. Berdasarkan tabel 3. didapatkan pada fraksi methanol biji kacang merah nilai % inhibisi secara berturut-turut yaitu 47.67%, 54.50%, 65.57%, 81.28%, 87.70%. Sedangkan hasil pada tabel 4. didapatkan pada fraksi methanol biji kacang hijau nilai % inhibisi secara berturut-turut yaitu 39.75%, 47.13%, 49.18%, 61.47%, 66.75%. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka akan semakin tinggi juga nilai % inhibisi. Semakin besar konsentrasi sampel maka akan semakin kecil nilai absorbansi yang didapat. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang ditambahkan berdampak pada persentase inhibisi yang semakin meningkat. Dalam hal ini absorbansi yang diperoleh semakin rendah yang menunjukkan semakin banyak radikal bebas yang dihambat [21]. Hasil pengukuran nilai IC₅₀ pada fraksi metanol biji kacang merah yang ditunjukkan pada tabel 3. diperoleh hasil sebesar 22,234 µg/mL. Sedangkan hasil pengukuran nilai IC₅₀ pada fraksi methanol biji kacang hijau yang ditunjukkan pada tabel 4. diperoleh hasil sebesar 43.371 µg/mL. Berdasarkan hasil tersebut fraksi metanol biji kacang merah memiliki aktivitas antioksidan yang dapat dikategorikan sangat kuat karena memiliki nilai nilai IC₅₀ < 50 µg/mL, dan fraksi metanol biji kacang hijau memiliki aktivitas antioksidan yang dapat dikategorikan kuat karena memiliki nilai nilai IC₅₀ > 50 µg/mL

**Gambar 2.** Kurva Regresi Linier Larutan Fraksi Biji Kacang Merah

Pada gambar kurva regresi linear didapatkan nilai R square sampel fraksi metanol biji kacang merah sebesar 0.9809. Dari kurva regresi linear didapatkan nilai $y = 0.5342x + 35.301$ untuk menentukan nilai IC₅₀ dari sampel fraksi metanol biji kacang merah.



Gambar 3. Kurva Regresi Linier Larutan Fraksi Biji Kacang Hijau

Pada gambar kurva regresi linear didapatkan nilai R square sampel fraksi metanol biji kacang hijau (*Phaseolus vulgaris* L.) sebesar 0.9623. Dari kurva regresi linear didapatkan nilai $y = 0.3418x + 32.354$ untuk menentukan nilai IC₅₀ dari sampel fraksi metanol biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.).

Hasil yang diperoleh dari aktivitas antioksidan pada fraksi metanol biji kacang merah dan fraksi metanol biji kacang hijau dianalisis dengan menggunakan analisis statistik non parametrik *Mann Whitney Test*. Uji *Mann Whitney* merupakan uji nonparametrik yang digunakan untuk menguji ada tidaknya perbedaan dari dua populasi yang saling independen. Uji *Mann Whitney* merupakan alternatif dari uji *t* untuk dua populasi independen ketika asumsi normalitas populasi tidak terpenuhi [21].

Tabel 5. Hasil Uji Statistik Non Parametrik *Mann Whitney*

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Rank	Asymp. Sig. (2-tailed)
Kacang merah (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	5	11.60	174.00	0.015
Kacang Hijau (<i>Phaseolus radiatus</i> L.)	5	19.40	291.00	

Berdasarkan hasil data tersebut diperoleh nilai uji statistik non parametrik *mann whitney test* bahwa nilai *Asymp. Sig (2 talled)* sebesar 0.015, artinya nilai uji statistik pada sampel biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) memiliki hasil $< 0,05$. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari kedua sampel

4. Kesimpulan

Fraksi metanol biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan tannin. Sedangkan pada fraksi metanol biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) positif mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid. Berdasarkan uji kualitatif dengan uji kromatografi lapis tipis dimana noda yang diperoleh setelah direaksikan dengan DPPH terjadi perubahan warna menjadi warna kuning. Hal ini menandakan bahwa pada fraksi methanol biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan fraksi methanol biji kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) positif

mengandung senyawa yang bersifat sebagai antioksidan. Hasil ini diperkuat dengan uji kuantitatif diperoleh nilai IC₅₀ dari fraksi methanol biji kacang merah sebesar 27.51 µg/mL yang dapat dikategorikan sangat kuat karena memiliki nilai nilai IC₅₀ < 50 µg/mL, sedangkan pada fraksi metanol biji kacang hijau diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 51.62 µg/mL yang dapat dikategorikan kuat karena memiliki nilai nilai IC₅₀ > 50 µg/mL. Hasil ini berdasarkan analisis statistik terdapat perbedaan yang signifikan terhadap aktivitas antioksidan pada fraksi metanol biji kacang merah dan fraksi metanol biji kacang hijau. Didapatkan peringkat rata-rata pada fraksi methanol biji kacang merah lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi methanol biji kacang hijau (Asymp. Sig < 0,05).

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada dosen pembimbing dan dosen penguji, dosen-dosen farmasi, staf pegawai, di Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga Dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo.

Referensi

- [1]. Rija'i, H. R., Syafnir, L., & Rismawati, E. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bertingkat Daun Sirih Hitam (*Piper acre* Blume.) dengan Peredaman Radikal Bebas DPPH (1, 1-Difenil-2-Pikril Hidrazil). *Prosiding Farmasi*, 58-64..
- [2]. Yuhernita, Y., & Juniarti, J. (2011). Analisis senyawa metabolit sekunder dari ekstrak metanol daun surian yang berpotensi sebagai antioksidan. *Makara Journal of Science*, 15(1), 27..
- [3]. Desri Fiftianasari. (2016). *Penggunaan Tepung Kacang Merah Sebagai Bahan Substitusi Pada Rolkara (Rolade Tepung Kacang Merah) Dan Mocakara (Mouse Cake Tepung Kacang Merah)*. Program Studi Teknik Boga. Fakultas Teknik. Universitas Negeri Yogyakarta.
- [4]. Debby Amalia Briliansari. 2014. *Pengaruh Pemberian Kacang Hijau (Phaseolus radiatus L.) Terhadap Pencegahan Peningkatan Kadar Glukosa Darah Pada Tikus Putih Strain Wistar (Rattus novergicus) Bunting*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- [5]. Katrin, K., & Bendra, A. (2015). Aktivitas Antioksidan Ekstrak, Fraksi dan Golongan Senyawa Kimia Daun *Premna oblongata* Miq. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(1), 3..
- [6]. Rissa Laila Vifta, Yustisia Dian Advistasari. (2018). Skirining Fitokimia. Karakterisasi, dan Penentuan kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto. *Prosiding Seminar Nasional Unimus*. Vol.1.
- [7]. Abdul Rahman Wahid, Safwan. (2019). Skirining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Terhadap Ekstrak Tanaman Ranting Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L). *Jurnal Ilmu Kefarmasian*. Vol. 1 No. 1.
- [8]. Indah Sulistyarini, Diah Arum Sari, Tony Ardian Wicaksono. (2020). Skirining Fitokimia Snyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*.
- [9]. Wulan Agustina, Nurhamidah, Dewi Handayani. (2017). Skirining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Beberapa Fraksi Dari Kulit Batang Jarak (*Ricinus communis* L.) *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. Vol. 1 (2). Hal. 117-122.
- [10]. Djati Wulan Kusumo, Susanti, Erma Kusuma Ningrum, Citra Hayu Adi Makayasa. (2022). Skirining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Pada Ekstrak Etanol

- Bunga Pepaya (*Carica Papaya* L.) (Phytochemical Screening Of Secondary Metabolites In *Papaya* Flowers / *Carica Papaya* L. *Journal Of Current Pharmaceutical Sciences*. Vol. 5 No. 2. Hal. 478-483.
- [11]. Dyera Forestryana, Arnida. (2020). Phytochemical Screenings and Thin Layer Chromatography Analysis of Ethanol Extract Jeruju Leaf (*Hydrolea spinose* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*. Vol 11 No. 2 Hal. 113-124.
- [12] Syahmani, Leny, Rilia Iriani, Noor Elfa. (2017). Penggunaan Kitin Sebagai Alternatif Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis Dalam Praktek Kimia Organik. *Jurnal Vidya Karya*. Vol. 32 No. 1 Hal 1-11.
- [13] Yusnita Usman, Rahmatullah Muin. (2023). Uji Kualitatif Dan Perhitungan Nilai Rf Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Daun Gulma Siam. *Journal Of Pharmaceutical Science And Herbal Technology*. Vol. 1 No.1 Hal. 10-16.
- [14] Ade Ferdinan, Fitri Sri Rizki, Nunik Rahmawati. (2021). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Alkaloid Dalam Ekstrak Etanol Daun Pandan Hutan Jenis Baru (*Freycinetia sessiliflora* Rizki). *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional*. Vol. 1 No. 2.
- [15]. Ade Ferdinan, Fitri Sri Rizki, Erwan Kurnianto, Kurniawan. (2022). Fraksinasi Dan Identifikasi Senyawa Tani Dari Ekstrak Pandan Hutan (*Freycinetia sessiliflora* Rizki). *Jurnal Borneo*. Vol. 2 No. 2 Hal. 93-98.
- [16]. Muhammad Taupik, A. Mu'thi Andy Suryadi, Jafar La Kilo, Wiwit Zuriati Uno, Samsul Bahri Badjeber. (2022). Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun *Spigelia anthelmia* L. Dan Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *Journal Syifa Sciences And Clinical Research*. Vol. 4 No. 3.
- [17]. Binti Dwi Rahmawati. (2016). *Profil Kadar Saponin Pada Beberapa Bagian Umbi Akar Tallnum paniculatum Hasil Kultivasi Petani Di Daerah Plosoklaten Kediri*. Artikel Skripsi. Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan. Universitas Nusantara Persatuan Guru Republik Indonesia.
- [18] Khoirul Ngibad Dan Lilla Puji Lestari. (2020). Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Fenolik Total Daun Zodiak (*Evodia suaveolens*). *Jurnal Penelitian Kimia*. Vol. 16 No. 1 Hal. 94-109.
- [19] Hasan, H., Thomas, N. A., Hiola, F., Ramadhani, F. N., & Ibrahim, A. S. (2022). Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) dengan metode 1, 1-diphenyl-2 picrylhydrazyl (DPPH). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 2(1), 67-73.
- [20] Oppie Anngela, Afidatul Muadifah, Dhanang Prawira Nugraha. (2021). Validasi Metode Penetapan Kadar Borakspada Kerupuk Puli Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*. Vol. 3 No. 4 Hal. 375-381.
- [21] Prisilia Moniung, Marina F.O, Singkoh, Regina R. Butarbutar. (2022). Potensi Alga *Halmymenia durvillei* Sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Jurnal Bio Logos*. Vol 12 No. 1 Hal. 39-45.