



Penentuan Kadar Fenolik Total dan Peredaman Radikal Bebas Ekstrak Metanol Daun Bayam Hijau (*Amaranthus hybridus* L) dengan DPPH

Devika Nurhasanah ^{a,1,*}, Sutri Hud Mafa ^{a,2}, Nofran Putra Pratama ^{a,3}

^a Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, Jl. Siliwangi, Ringroad Barat, Sleman, 55293, Indonesia

¹ devika.pharmacist@gmail.com*; ² sutrimafa30998@gmail.com; ³ nofranputrapratama@gmail.com

* corresponding author

ABSTRACT

ARTICLE INFO

Background: Free radicals are molecules that have one or more free or unpaired electrons, so that free radicals are unstable. Free radicals can be inhibited in the presence of antioxidant compounds. The compound antioxidant can be obtained from various sources, one of which is from the green spinach plant. *Amaranthus hybridus* L. is a herbaceous plant from the *Amaranthaceae* family that contains natural antioxidant compounds, namely phenolic compounds.

Objective: This study aimed to determine the total phenolic levels contained in methanol extract of *Amaranthus hybridus* L. and what is the value of IC₅₀ methanol extract of *Amaranthus hybridus* L. which is able to reduce DPPH free radicals.

Method: *Amaranthus hybridus* L. were extracted with methanol solvent by maceration method in a ratio (1:10). Then a qualitative analysis was carried out in the form of phytochemical screening, identification of phenolic compounds by Thin Layer Chromatography (TLC) method using the methanol mobile phase: chloroform: n-hexane (1:9:1 v/v/v) and the stationary phase of silica gel GF₂₅₄. Quantitative analysis of the total phenolic content test, and free radical suppression activity test by DPPH method which was measured using a UV-Vis spectrophotometer to calculate IC₅₀.

Result: Methanol extract of *Amaranthus hybridus* L. positively contains alkaloid compounds, phenolics, flavonoids, saponins, and tannins. The TLC R_f quercetin value is 0.475, and the R_f extract is two spots namely 0.35 and 0.837. Total phenolic content of 1.150 ± 0.025% and a free radical suppression activity of IC₅₀ value of 14.786 ppm.

Conclusion: Methanol extract of *Amaranthus hybridus* L. could be categorized as very strong.

Article history

Received: 21 Oktober 2024

Revised: 1 November 2024

Accepted: 15 November 2024

Keywords

Amaranthus hybridus L.

DPPH

Free radical activity

Total phenolic

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



I. Pendahuluan

Radikal bebas adalah suatu molekul yang memiliki satu atau lebih elektron bebas yang tidak berpasangan, dan memiliki bersifat tidak stabil. Radikal bebas yang memiliki sifat tidak stabil, dapat mengikat molekul yang reaktif atau senyawa-senyawa disekitarnya untuk memperoleh pasangan



elektron dan mencapai kestabilan. Radikal bebas dapat terbentuk dalam tubuh dan terjadi kapan saja sehingga dapat menyebabkan timbulnya berbagai penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, kanker, arterosklerosis serta penuaan dini. Radikal bebas dapat dihambat dengan adanya suatu senyawa yang dikenal sebagai antioksidan [1].

Antioksidan merupakan molekul yang cukup stabil untuk menetralkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, sehingga mengurangi kapasitasnya untuk merusak [2]. Senyawa yang memiliki sifat antioksidan dapat diperoleh dari berbagai sumber, salah satunya adalah senyawa fenolik dari tanaman bayam. Tanaman bayam merupakan salah satu tanaman tahunan dari keluarga *Amaranthaceae* yang memiliki kandungan senyawa antioksidan seperti fenol, β -karoten, likopen, anthosianin, flavonoid dan saponin [3].

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar fenolik total dan peredaman radikal bebas ekstrak metanol daun bayam hijau (*Amaranthus hybridus* L.) dengan DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Peredaman radikal bebas DPPH merupakan salah satu metode yang baik untuk mengukur aktivitas antioksidan suatu sampel. Analisis dengan metode DPPH dilihat berdasarkan kemampuan senyawa untuk mendonorkan atom hidrogen. Pelarut yang digunakan yaitu metanol dimana metanol dapat melarutkan senyawa polar (memiliki titik didih tinggi, titik leleh, tekanan uap rendah, dan tegangan permukaan tinggi) dan non polar (memiliki titik didih rendah, titik leleh, tekanan uap tinggi, dan tegangan permukaan rendah) [4], sehingga memudahkan untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder dalam sampel yang digunakan.

2. Metode

2.1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat: Toples maserasi, ayakan 40 mesh, batang pengaduk, gelas beaker, botol semprot, *grinder*, corong *buchner*, cawan petri, gunting, erlenmeyer, gelas ukur, *hotplate*, kaca arloji, labu ukur, lemari asam, mikropipet, *moisture content balance*, timbangan analitik, oven, pipet tetes, pipet ukur, pompa vakum, lemari asam, propipet, bejana KLT, sendok tanduk, spatula, rak tabung reaksi, spatel kayu, spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, termometer, *vortex*.

Bahan: Daun bayam hijau, Aquadest, AlCl_3 , aluminium foil, air panas, asam asetat, HCl pekat, blue tip, white tip, etanol *p.a.*, eter, FeCl_3 , kain, kertas saring, metanol teknis, metanol *p.a.*, kloroform, n-heksan, natrium karbonat 7%, n-butanol, pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, pereaksi wagner, plat silika gel GF₂₅₄, reagen *Folin-Fiocalteu*, serbuk magnesium, vitamin C, asam galat, standar DPPH, kuersetin.

2.2. Determinasi dan persiapan sampel

Determinasi digunakan (*A. hybridus* L.) bagian tanaman utuh yang terdiri dari daun, batang, dan akar bayam hijau. Sampel daun bayam hijau yang digunakan diambil pagi hari pukul 08.00-12.00 WIB sebanyak 3 kg pada bulan Juni 2022 dari petani di Desa Berdaya Candibinangun, Kecamatan Pakem, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Daun bayam hijau yang telah diperoleh sortasi basah untuk menghilangkan bagian yang tidak perlu/pengotor ataupun benda asing yang menempel pada daun dengan cara membuang bagian yang tidak layak digunakan. Setelah itu, dikeringkan di oven suhu $\pm 45^\circ\text{C}$ untuk memperoleh simplisia kering (ditandai dengan simplisia mudah hancur saat digenggam). Simplisia yang telah kering, selanjutnya dilakukan penyerbukan dengan menggunakan *grinder* dan di ayak menggunakan ayakan 40 mesh.

2.3. Pembuatan ekstrak metanol daun bayam

Ditimbang 250 gram serbuk dimasukan dalam wadah maserasi dengan pelarut metanol (1:10) lalu disimpan pada tempat gelap selama 72 jam sambil dilakukan pengadukan setiap 6 jam selama 5 menit. Kemudian diremaserasi (1:5) selama 2 hari. Hasil dari maserasi dan remaserasi kemudian di saring dengan menggunakan pompa vakum dan dikentalkan hingga didapatkan ekstrak kental.

2.4. Uji kadar air

Ditimbang simplisia kering daun bayam hijau sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam *moisture content balance* yang bertujuan untuk mengetahui kadar kelembapan pada ekstrak yang digunakan [5].

2.5. Uji alkaloid

Dilakukan tiga kali pengujian dengan menggunakan pereaksi yang berbeda yaitu pereaksi *wagner*, pereaksi *mayer*, dan pereaksi *dragendrof*. Ekstrak diambil sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam 5 mL HCl pekat yang dibagi menjadi tiga bagian pada plat tetes, kemudian ditambahkan 5-7 tetes reagen *wagner*, *mayer*, *dragendrof* pada masing-masing tabung sampai menunjukkan perubahan warna [6].

2.6. Uji fenolik

Diambil 2 mg ekstrak di masukkan dalam gelas beaker, lalu dilarutkan dengan 1 mL eter. Setelah itu, diambil lapisan eter lalu ditempatkan di atas plat tetes kemudian ditambah dengan 2-3 tetes FeCl_3 sehingga terjadi perubahan warna [7].

2.7. Uji flavonoid

Diambil 2 mg sampel ekstrak, tambahkan air panas sebanyak 1-2 mL dan masukkan serbuk magnesium 2 mg, kemudian homogenkan. Ditambahkan HCl pekat 4-5 tetes dan etanol 4-5 tetes lalu kocok hingga merata [7].

2.8. Uji saponin

Diambil 5 mg gram ekstrak dicampur dengan 5 mL aquadest dan kocok kuat hingga membentuk busa atau buih [8].

2.9. Uji tanin

Diambil 2 mg ekstrak lalu ditambahkan dengan FeCl_3 2-3 tetes lalu apabila terbentuk warna hijau/biru kehitaman [8].

2.10. Pengujian KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Penjenuhan bejana menggunakan fase gerak metanol : kloroform : n-heksan pada perbandingan 1 mL : 9 mL : 1 mL larutan uji ekstrak daun bayam hijau dibuat dengan konsentrasi sebanyak 50000 ppm. Standar yang digunakan yakni kuersetin dengan konsentrasi 2.000 ppm. Prosedur KLT menggunakan fase diam berupa plat KLT silika gel F_{2454} . Kemudian di elusi dan diamati pada UV 254 dan 366 nm.

2.11. Penetapan kadar fenolik total ekstrak daun bayam hijau

Pengukuran kadar fenol total menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Hal ini didasarkan pada metode Chun *et al.*, dalam Djuleng A *et al.* [7] dengan menggunakan asam galat sebagai standar. Ditimbang 5 mg asam galat dilarutkan dalam metanol *p.a* 10 mL dengan diperoleh konsentrasasi 500 ppm. Selanjutnya dibuat konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Diambil reagen *Folin-Ciocalteu* 0,1 mL, ditambahkan dengan larutan asam galat 0,1 mL (konsentrasi 30 ppm), larutan natrium karbonat 7% 1 mL dan di ad aquadest 5 mL lalu di *scanning* pada panjang gelombang maksimum 600-800 nm.

Diambil 0,1 mL larutan standar stok (konsentrasi 30 ppm) dan tambahkan 0,1 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, 1 mL natrium bikarbonat 7%, dan aquadest ad 5 mL. Lalu di *scanning* menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada waktu 0-2 jam dengan selang waktu 2 menit sampai diperoleh nilai absorbansi yang stabil.

Diambil 0,1 mL masing-masing konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, kemudian ditambahkan 0,1 mL pereaksi *Folin-Ciocalteu*, kocok, dan diamkan selama kurang lebih 4 menit, kemudian tambahkan 1 mL natrium karbonat 7% dan kocok sampai homogen. Lalu tambahkan aquadest ad 5 mL dan biarkan selama 60 menit pada suhu ruang. Kemudian lakukan pengukuran sebanyak 3 kali replikasi pada absorbansi panjang gelombang 748 nm.

Diambil sampel 40 mg dilarutkan 10 mL metanol *p.a.* Lalu diambil 0,1 mL, tambahkan 0,1 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, kocok dan diamkan selama kurang lebih 4 menit, kemudian dihomogenkan dengan 1 mL larutan natrium karbonat 7% dan aquadest ad 5 mL dikocok homogen. Diamkan selama 60 menit pada suhu ruang. Lalu diukur sebanyak 3 kali replikasi pada panjang gelombang 748 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

2.12. Pengujian antioksidan DPPH

Larutan DPPH (0,1 mM) DPPH dengan nilai BM 394,32 ditimbang sebanyak 3,9 mg, di larutkan menggunakan metanol *p.a* 100 mL. Larutan standar Vitamin C dibuat dengan konsentrasi 10 ppm kemudian dibuat seri kadar 2, 4, 6, dan 8 ppm [4]. Penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH. Spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 400 nm – 600 nm. Penentuan *operating time* dengan panjang gelombang 516 nm dan waktu 1 jam tiap 1 menit.

Larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 500 ppm dan dibuat konsentrasi 5, 10, 25, 50, dan 100 ppm. Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas sampel dilakukan dengan mengambil 50 μ L larutan seri pada masing-masing tabung reaksi kosong dan tambahkan 4000 μ L DPPH. Setelah itu, diamkan 20 menit dan diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis 516 nm.

Nilai konsentrasi IC_{50} merupakan laju penghambatan radikal bebas DPPH pada berbagai konsentrasi. Sehingga dapat dinyatakan dalam persamaan regresi linier $y = a + bx$. Nilai y adalah 50 dan nilai x adalah nilai IC_{50} .

3. Hasil dan Pembahasan

Daun bayam hijau yang digunakan pada penelitian ini diambil pada pagi hari pukul 08.00-12.00 WIB dari petani di Desa Berdaya Candibinangun, Kecamatan Pakem, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pengambilan sampel pada waktu tersebut dikarenakan proses fotosintesis daun lebih optimal pada pagi hari dengan kondisi fisik yang lebih segar dan hijau atau dapat juga dipengaruhi oleh kadar senyawa aktif (fenolik) yang terkandung dalam sampel [9]. Selanjutnya dilakukan proses determinasi tanaman bayam hijau yang bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas yang jelas dari tanaman dan menghindari kesalahan pada saat pengumpulan bahan utama yang diteliti [10]. Berdasarkan hasil determinasi dibuktikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah benar tanaman (*Amaranthus hybridus* L.) dari famili *Amaranthaceae*, bagian yang diteliti pada saat determinasi adalah tanaman utuh yang terdiri dari daun, batang, dan akar.

Proses persiapan sampel dimulai dengan mencuci daun bayam hijau yang diperoleh dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada daun. Sampel yang telah dicuci bersih kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 45^{\circ}C$. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air sampel sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi enzimatik yang dapat menyebabkan penguraian kandungan kimia pada daun bayam hijau yang digunakan [11]. Simplisia kering ditandai dengan mudah hancur saat digenggam. Selanjutnya dilakukan penyerbukan dengan menggunakan grinder dan di ayak menggunakan ayakan 40 mesh. Pengayakan bertujuan agar memperoleh ukuran partikel yang sama atau seragam dan juga untuk memperbesar kontak dengan pelarut pada proses penyerian saat melakukan ekstraksi dan mempermudah penarikan senyawa aktif pada simplisia oleh pelarut yang digunakan [10].

Pembuatan ekstrak metanol daun bayam hijau menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan metode yang sederhana, murah, dan mudah dilakukan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari dan untuk meningkatkan efektifitas ekstraksi dilakukan pengadukan dan remaserasi. Cairan penyari yang digunakan yaitu metanol karena pelarut yang bersifat polar, sehingga mampu menarik senyawa fenolik yang terdapat dalam sampel. Filtrat yang diperoleh dari meserasi dan remaserasi kemudian dilakukan penguapan hingga didapatkan ekstrak kental. Penguapan bertujuan untuk menghilangkan atau mengurangi larutan penyari agar tidak mempengaruhi pengujian berikutnya [10]. Rendemen ekstrak methanol daun bayam yakni 22,024%. Menurut Farmakope Herbal Indonesia, hasil yang didapatkan tersebut termasuk kategori baik karena tidak kurang dari 9,7%. Lalu dilakukan uji organoleptik hasil yang diperoleh yaitu warna hijau tua pekat sampai kehitaman, rasa pahit sedikit asam, bau/aroma khas bayam dan memiliki tekstur/bentuk

kental yang lengket. Pada hasil pengamatan yang dilakukan didapatkan bahwa hasil uji organoleptik sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Moilati *et al.*, [12]. Selanjutnya dilakukan uji kadar air menggunakan alat *moisturizer content balance* dan diperoleh hasil sebesar 5,70% dan termasuk kategori baik karena tidak lebih dari 10 % (FHI, 2017). Jika kadar air tinggi maka dapat mempercepat pertumbuhan mikroba sehingga dapat merusak, memperpendek waktu simpan dan mempengaruhi kualitas simplisia [5].

Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu tumbuhan dan juga mengetahui ada tidaknya komponen senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak metanol daun bayam hijau [13]. Berdasarkan Tabel 1, ekstrak metanol daun bayam hijau positif mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin dan tanin. dan tanin yang telah sesuai dengan literatur [14]. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat basa dan mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji alkaloid didapatkan hasil positif pada uji *mayer*, *wagner*, dan *dargendorf*. Uji *mayer* menunjukkan adanya endapan putih yang menandakan positif mengandung senyawa alkaloid. Uji *wagner* positif terbentuk warna coklat kemerahan, karena atom nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Uji *dargendorf* positif terbentuknya endapan jingga, yang merupakan kalium alkaloid dimana atom nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam [13]. Pengujian senyawa fenolik dan tanin dilakukan dengan menambahkan pereaksi besi (III) klorida ($FeCl_3$) dengan hasil positif terbentuknya warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan. Perubahan warna terjadi karena terbentuk ikatan kovalen koordinasi antara ion besi (III) dengan gugus hidroksil yang ada pada senyawa tersebut. Flavonoid merupakan senyawa polar yang memiliki banyak gugus hidroksil, pada identifikasi flavonoid serbuk magnesium + HCl pekat yang akan membentuk gelembung-gelembung dihidrogen (H_2). Penambahan HCl pekat, akan menghidrolisis flavonoid glikosida menjadi aglikon yang kemudian membentuk kompleks dengan magnesium terbentuk warna merah, jingga atau kuning. Saponin merupakan senyawa yang bersifat polar sehingga dapat larut dengan air. Saponin juga memiliki gugus non polar yaitu terpenoid/steroid. Senyawa yang memiliki gugus polar dan non polar dapat bersifat aktif dipermukaan sehingga dengan pengocokan menggunakan air (suatu agregat dari molekul surfaktan yang terdispersi dalam suatu koloid cair) dan larutan koloidal yang akan tampak seperti buih [1].

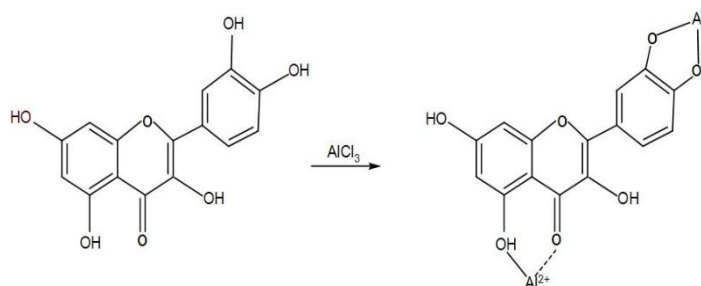
Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia

Identifikasi senyawa	Pereaksi	Hasil	Literatur [14]
Alkaloid	Wagner	+	Coklat kemerahan
	Mayer	+	Endapan putih
	Dragendorf	+	Endapan jingga
Fenolik	$FeCl_3$	+	Terbentuk warna hijau kehitaman
Flavonoid	HCl pekat	+	Terbentuk warna merah, orange atau kuning
Saponin	Aquadest	+	Adanya busa/buih
Tanin	$FeCl_3$	+	Terbentuk warna hijau, biru kehitaman

Ket: (+) positif : mengandung senyawa; (-) negatif : tidak mengandung senyawa

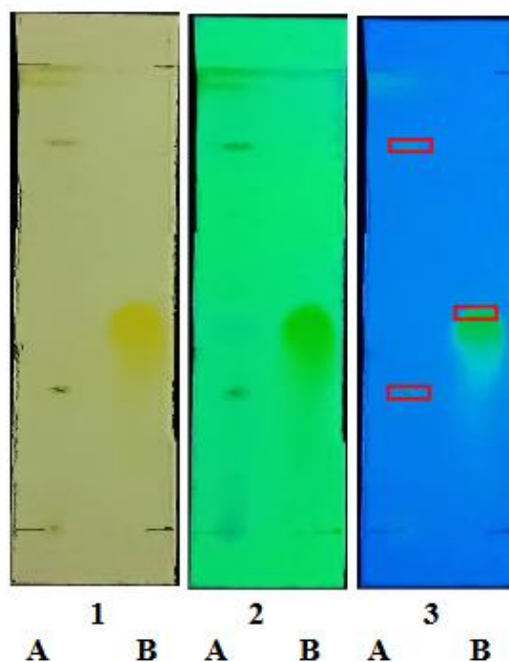
Identifikasi kandungan senyawa fenolik ekstrak metanol daun bayam hijau menggunakan metode KLT. Pemilihan metode KLT dikarenakan analisis pemisahan yang sederhana, memerlukan waktu yang cepat, mudah mengerjakannya, dan menggunakan peralatan yang relatif murah [15]. Prinsip kerja KLT yaitu didasarkan pada pemisahan komponen kimia yang ditentukan oleh fase gerak dan fase diam. Fase gerak digunakan dari beberapa campuran pelarut berdasarkan tingkat kelarutannya dengan dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk menentukan fase gerak yang dapat memisahkan senyawa dalam sampel. Hasil optimasi fase gerak yang telah dilakukan didapatkan hasil yang paling optimal pada fase metanol : kloroform : n-heksan (1: 9: 1 v/v/v). Hal ini sesuai dengan penelitian Gwatidzo *et al.*, [16] dengan hasil fase geraknya naik, terjadi pemisahan sampel dan kuersetin yang terelusi dengan baik dan didapatkan bercak noda. Fase diam yang digunakan berupa plat silika gel F₂₅₄ yakni berupa *aluminium foil* yang dilapisi adsorben silika aluminium oksida dan selulosa yang bersifat polar. Uji KLT terlebih dahulu dilakukan penjenuhan bejana dengan fase gerak (eluen). Penjenuhan bejana dengan fase gerak bertujuan agar seluruh permukaan didalam bejana

homogen terisi uap eluen sehingga rambatan yang dihasilkan oleh silika gel baik dan beraturan. Bejana yang diisi fase gerak, diketahui telah jenuh dengan cara diberi kertas saring yang ditandai dengan eluen yang merambat keluar melalui kertas saring pada proses elusi, dimana silika gel akan mengabsorpsi fase gerak. Bejana yang telah jenuh, selanjutnya dimasukkan plat KLT yang sudah ditotolkan ekstrak daun bayam hijau dan standar kuersetin, ditunggu hingga fase gerak mencapai batas, lalu plat diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Dibaca hasil penotolan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm diamati bercak noda setelah disemprot dengan $AlCl_3$, penyemprotan pereaksi kompleks $AlCl_3$ akan membentuk senyawa kompleks dengan standar kuersetin yang menghasilkan bercak noda warna kuning yang lebih jelas pada standar kuersetin dan ekstrak. Kuersetin merupakan salah satu senyawa fenolik yang termasuk dalam golongan flavonoid yang dapat bereaksi dengan $AlCl_3$, reaksi antara kuersetin dan $AlCl_3$ dapat dilihat pada (Gambar 1) [2], [16].



Gambar 1. Reaksi Kuersetin dengan $AlCl_3$ [2]

Hasil pengujian KLT setelah diamati dibawah sinar tampak, sinar UV 254 dan sinar UV 366 nm terdapat bercak noda setelah penyemprotan $AlCl_3$ karena pereaksi tersebut akan menghasilkan bercak noda berwarna kuning yang menandakan adanya golongan senyawa fenolik pada sampel. Berdasarkan gambar 2, hasil nilai R_f diperoleh standar kuersetin 0,475, dan ekstrak metanol daun bayam hijau didapat 2 spot yaitu 0,35 dan 0,837 diduga kemungkinan ada banyak kandungan senyawa fenolik golongan lain yang terdapat didalam ekstrak metanol daun bayam hijau.



Gambar 2. Profil KLT Ekstrak Metanol Daun Bayam Hijau (*Amaranthus hybridus* L.)

Keterangan: 1. Deteksi dengan sinar UV visibel/tampak; 2. Deteksi dengan sinar UV 254; 3. Deteksi dengan sinar UV 366. A) Ekstrak metanol daun bayam hijau; B) Standar kuersetin. Fase diam silika gel GF254 ; Fase gerak = metanol : Kloroform : n-heksan (1 : 9 : 1 v/v/v)

Penentuan kadar fenolik total ekstrak metanol daun bayam hijau dianalisis secara kuantitatif dengan metode *Folin-Ciocalteu*. Hal ini didasarkan pada metode Chun *et al.* dalam Djuleng A *et al.* [7] menggunakan asam galat sebagai standar. Metode *Folin-Ciocalteu* adalah metode yang paling umum dengan pengerjaan yang sederhana digunakan untuk menentukan kandungan kadar fenolik total pada tanaman. Pada penetapan kadar fenolik total ekstrak metanol daun bayam hijau, diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum yang dibuat dengan konsentrasi 30 ppm dengan cara melakukan *scanning* panjang gelombang pada rentang 600-800 nm diperoleh hasilnya yaitu 748 nm dan penentuan *operating time* bertujuan untuk menentukan waktu pengukuran suatu larutan saat sudah selesai bereaksi yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil [17]. Hasil *operating time* fenolik yang diperoleh yaitu 60 menit sesuai literatur [18]. Kemudian dilakukan penentuan kurva baku standar hubungan antara konsentrasi asam galat dengan nilai absorbansinya, dengan konsentrasi yang digunakan yaitu 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Pada data kurva baku didapatkan persamaan regresi linearnya adalah $y = 0,00965x + 0,1341$ dan nilai r (koefisien korelasi) yang mendekati satu menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang baik antara kadar asam galat dan absorbansi dengan nilai r sebesar 0,9957 dan r^2 sebesar 0,9914. Hasil dari persamaan regresi linear yang diperoleh tersebut kemudian akan digunakan untuk menghitung nilai kadar fenolik total yang terkandung dalam ekstrak metanol daun bayam hijau. Kadar fenolik total dari sampel ekstrak metanol daun bayam hijau dibuat dengan 40 mg/10 mL metanol *p.a* yang dilakukan dengan 3 kali replikasi yang bertujuan untuk memperoleh data yang lebih akurat, sehingga hasil kadar fenolik total ekstrak metanol daun bayam hijau diperoleh nilai yaitu sebesar $1,150 \pm 0,025$. Hal ini dibuktikan dalam penelitian yang dilakukan Naspera *et al.*, [19] dengan menggunakan sampel yang sama yaitu daun bayam hijau memiliki kadar senyawa fenolik total sebesar 0,940 mg/g, dimana diketahui bahwa semakin besar kandungan senyawa fenolik total yang diperoleh maka semakin tinggi aktivitas peredaman radikal bebas begitupun sebaliknya, dalam hal ini dapat dinyatakan bahwa kadar fenolik total telah memenuhi syarat karena memiliki nilai kadar yang lebih tinggi dari penelitian sebelumnya [19].

Pada pengujian peredaman radikal bebas, dilakukan uji peredaman radikal bebas pada ekstrak metanol daun bayam hijau menggunakan metode peredaman radikal DPPH dengan mengukur aktivitas peredaman radikal bebas dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm dan waktu OT stabil DPPH bereaksi dengan vitamin C yaitu pada menit ke-20. Hasil pengujian peredaman radikal bebas pada ekstrak metanol daun bayam hijau dinyatakan dalam persen peredaman radikal pada standar vitamin C diperoleh persamaan regresi linear $y = 98,132x + 4,975$ dan nilai koefisien korelasi (r) yaitu 0,936 sedangkan pada ekstrak diperoleh persamaan regresi linear $y = 2,928x + 4,704$ dan nilai koefisien korelasi (r) yaitu 0,898. Persamaan regresi linear didapat dari plot antar konsentari (x) vs % penangkal radikal bebas (inhibisi) (y). Hasil tersebut kemudian digunakan untuk menghitung *Inhibitory Concentration* (IC_{50}). Nilai IC_{50} ini berfungsi agar diketahui seberapa besar kemampuan yang dapat menghambat 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50} menandakan bahwa senyawa antioksidan didalam sampel sangat kuat, begitu juga sebaliknya semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa antioksidan didalam sampel semakin lemah. Hasil nilai IC_{50} yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu standar vitamin C sebesar 0,458 ppm dan ekstrak metanol daun bayam hijau sebesar 14,786 ppm keduanya termasuk kategori mengandung antioksidan yang sangat kuat. Yang didukung juga dengan hasil uji antioksidan yang diperoleh dari penelitian daun bayam hijau dengan pengaruh suhu dan konsentarsi gum arab 8% Awaliyah *et al.*, [20] IC_{50} sebesar 42,63 ppm, sedangkan dalam penelitian Guntarti & Ruliyani, [2] mengatakan bahwa ekstrak etanol daun bayam hijau IC_{50} sebesar $209,395 \pm 0,607 \mu\text{g/mL}$, lalu dalam penelitian Naspera *et al.*, [19] mengatakan bahwa ekstrak etanol daun bayam hijau IC_{50} sebesar $28,196 \mu\text{g/mL}$, dan selanjutnya dalam penelitian Rahmani *et al.*, [21] mengatakan bahwa pengaruh kualitas nutrisi *microgreen* bayam hijau diperoleh IC_{50} sebesar $20,207 \pm 7,768 \mu\text{g/mL}$. IC_{50} merupakan parameter yang berkaitan dengan konsentrasi antioksidan yang mampu menyerap/menangkal 50% radikal DPPH [22].

Berdasarkan hasil analisis statistik yang telah dilakukan dengan menggunakan SPSS nilai IC_{50} ekstrak metanol daun bayam hijau dan vitamin C menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,005$). Pada penelitian ini, didapatkan hasil IC_{50} vitamin C dan ekstrak metanol daun bayam yang diperoleh dengan nilai IC_{50} vitamin C lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak metanol daun bayam, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak metanol daun bayam lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas peredaman

radikal bebas vitamin C. Aktivitas antioksidan dengan nilai yang rendah dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu memiliki sifat yang mudah rusak akibat terpapar oksigen, metode ekstraksi yang kurang cukup untuk menarik suatu senyawa yang memiliki sifat antioksidan pada simplisia, dan lamanya masa simpan ekstrak [22]. Perbedaan nilai IC₅₀ antara vitamin C dan ekstrak metanol dari daun bayam hijau disebabkan karena vitamin C merupakan salah satu senyawa standar murni dan terdapat empat gugus hidroksil dengan secara langsung menyumbangkan satu elektron untuk membentuk senyawa non-reaktif, sedangkan ekstrak metanol daun bayam hijau masih terdiri dari beberapa senyawa.

4. Kesimpulan

1. Kadar fenolik total yang diperoleh dalam ekstrak metanol daun bayam hijau (*Amaranthus hybridus* L.) yaitu sebesar $1,150 \pm 0,025$ %.
2. Aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak metanol daun bayam hijau tergolong kategori sangat kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 14,786 ppm.

Referensi

- [1] S. Handayani, I. Kurniawati, and F. Abdul Rasyid, "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Karet Kebo (*Ficus Elastica*) dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazil)," *J. Farm. Galen. (Galenika J. Pharmacy)*, vol. 6, no. 1, pp. 141–150, Mar. 2020, doi: 10.22487/j24428744.2020.v6.i1.15022.
- [2] Guntarti Any and R. Anita, "Penetapan Flavonoid Total Dan Uji Aktivitas Antioksidan Bayam (*Amaranthus Tricolor* L.) Varietas Giti Merah Dan Giti Hijau," *J. Farm. Sains Dan Prakt.*, vol. 6, no. 1, pp. 2579–4558, 2020, doi: <http://journal.ummg.ac.id/index.php/pharmacy>.
- [3] B. C. Chinko and F. S. Amah-Tariah, "Haemostatic Effects of Ethanolic Extracts of *Amaranthus hybridus* on Wistar Rats," *Int. Blood Res. Rev.*, pp. 14–21, Apr. 2020, doi: 10.9734/ibr/2020/v1i1130121.
- [4] P. Wulandari, Herdini, and A. Yumita, "Uji Aktivitas Antioksidan DPPH dan Aktivitas Terhadap *Artemia Salina* Leach Ekstrak Etanol 96% Daun Seledri (*Apium Graveolens* L.)," *Saintech Farma*, vol. 8, no. 2, 2015.
- [5] Y. Trinovita, Y. Mundriyastutik, Z. Fanani, and A. N. Fitriyani, "Evaluasi Kadar Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Daun Sangketan (*Achyranthes aspera*) Dengan Spektrofotometri," *Indones. J. Farm.*, vol. 4, no. 1, 2019.
- [6] L. Nurjana, N. P. Pratama, and K. Rahayu, "Pengaruh Perbedaan Pelarut Dalam Ekstraksi Herba Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH," Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, 2021.
- [7] A. Djuleng, K. Rahayu, and N. P. Pratama, "Identifikasi Senyawa Total Fenolik dan Total Flavonoid dalam Ekstrak Larut Etanol Daun Kupu-Kupu (*Bauhinia Purpurea* L.) dengan Spektrofotometri," Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, 2021.
- [8] F. Purwasari, D. Nurhasanah, and N. P. Pratama, "Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH (2,2 Diphenyl-1- Pikrilhidrazil) Ekstrak Etanol Daun Kupu-Kupu (*Bauhinia purpurea* L.)," Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, 2021.
- [9] I. K. Dwinatari and Y. B. Murti, "Pengaruh waktu pemanenan dan tingkat maturasi daun terhadap kadar vitexikarpin dalam daun legundi (*Vitex trifolia* L.)," *Tradit. Med. J.*, vol. 20, no. 2, pp. 105–111, 2015, [Online]. Available: <http://jurnal.ugm.ac.id/TradMedJ/article/view/8080%0A>
- [10] Diniatik, "Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanolik Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.) Dengan Metode Spektrofotometri," *Kartika-Jurnal Ilm. Farm.*,

- vol. 3, no. 1, pp. 1–5, 2015.
- [11] Kusnadi and E. T. Devi, “Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) Dengan Metode Refluks,” *Pancasakti Sci. Educ. J.*, vol. 2, no. 1, pp. 56–57, 2017.
- [12] V. O. Moilati, P. V. Y. Yamlean, and G. Rundengan, “Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.) Dan Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl),” *Pharmaccon*, vol. 9, no. 3, pp. 372–380, 2020.
- [13] R. Hilma, R. A. Devid, F. Haiyul, and M. Almurdati, “Profil Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Katemas (*Euphorbia heterophylla* L.),” in *Prosiding Seminar Nasional POKJANAS TOI Ke-52 Tahun 2017*, 2017, pp. 81–91.
- [14] Kusmiati, “Kemampuan Senyawa Lutein Dari Daun Bayam (*Amaranthus* Sp) Untuk Menetralkan Oksidan T-Bhp Dalam Sel Darah,” *Pus. Penelit. Bioteknol. - LIPI. Bogor*, pp. 691–697, 2012.
- [15] T. M. Dewi, H. Diar, and H. Syarif, “Analisis Kualitatif Residu Antibiotika Tetrasiklin Pada Madu,” in *Prosiding Penelitian SPeSIA Farmasi 2015*, 2015.
- [16] L. Gwatidzo, P. Dzomba, and M. Mangena, “TLC Separation And Antioxidant Activity Of Flavonoids From *Carissa bispinosa*, *Ficus sycomorus*, and *Grewia bicolor* fruits,” *Nutrire*, vol. 43, no. 1, p. 3, Dec. 2018, doi: 10.1186/s41110-018-0062-5.
- [17] Muhammad Nur Fauzi, Joko Santoso, and Aldi Budi Riyanta, “Uji Kualitatif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Buah Maja (*Aegle Marmelos* (L.)Correa) dengan Metode DPPH,” *J. Ris. Farm.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–8, Jul. 2021, doi: 10.29313/jrf.v1i1.25.
- [18] R. Supriningrum, H. Nurhasnawati, and S. Faisah, “Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Serunai (*Chromolaena odorata* L.) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis,” *Al Ulum J. Sains Dan Teknol.*, vol. 5, no. 2, p. 54, Apr. 2020, doi: 10.31602/ajst.v5i2.2802.
- [19] R. L. Naspera, Abdullah, and C. Jose, “Analisis Kandungan Fenolik, Vitamin C, Dan Aktivitas Antioksidan Dari Bayam Hijau (*Amaranthus hybridus*) Yang Ditanam Secara Organik,” *Bid. Biokimia Jur. Kim.*, pp. 1–11, 2013.
- [20] I. N. Awaliyah, M. Machfudloh, and A. Takwanto, “Pengaruh Suhu Dan Konsentrasi Gum Arab Terhadap Aktivitas Antioksidan (IC50) Pada Proses Spray Drying Bayam Hijau (*Amaranthus hybridus* L.),” *Distilat J. Teknol. Separasi*, vol. 5, no. 2, pp. 200–205, 2019.
- [21] A. F. Rahmani, S. Mubarak, M. A. Soleh, and B. M. P. Prawiranegara, “Evaluasi Kualitas Nutrisi Microgreen Bayam Merah dan Hijau Menggunakan Cahaya Buatan,” *Kultivasi*, vol. 20, no. 3, Dec. 2021, doi: 10.24198/kultivasi.v20i3.33365.
- [22] P. Molyneux, “The Use Of The Stable Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity,” *Songklanakar J. Sci. Technol.*, vol. 26, no. 2, pp. 212–219, 2004.