

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL BIJI EDAMAME (*Glycin max (L) Merril*) DENGAN METODE DPPH

Hadi Barru Hakam Fajar Siddiq*, Rosida, Erika Fauziah Prabawati
Akademi Farmasi Jember
Jl. Pangandaran No. 42 Jember 68125
email: hakamfajar@gmail.com

ABSTRACT

Antioxidants are compounds that can inhibit oxidation reactions with the free radicals and molecules are highly reactive. According to the previous research, edamame (Glycin max (L) Merril) plant is one of the plants that contains isoflavon compound that serves as an antioxidant. This study aims to determine the antioxidant activity of edamame extracts. This study is an experimental study. Edamame beans extract obtained by remaceration during 24 hours using 96% ethanol. The concentration of edamame beans extract were make different concentration from 90 ppm, 121,3 ppm, 143 ppm, 173,1 ppm. The extract then added with 0,02 g of DPPH free radicals that have been dissolved in 100 mL of 96% ethanol. Those solutions were measured at wavelength 516,5 nm by an UV-Vis spectrophotometer. Vitamin C used as positive control. The result of Antioxidant activity of edamame beans extract has IC50 value of 177,2 ppm and Vitamin C as a control has a IC50 value 0,18 ppm. It means that 177,2 ppm of edamame beans extract classified as low antioxidant.

Keywords : *edamame beans (Glycin max L Merril, Antioxidant activity, DPPH method*

PENDAHULUAN

Edamame (*Glycin max (L) Merril*) memiliki banyak manfaat bagi tubuh. Selain rasanya yang nikmat, edamame merupakan sumber protein yang baik. Daya cernanya lebih baik karena kandungan tripsin-inhibitor tergolong rendah. Tidak hanya itu, kandungan isoflavon yang dimiliki edamame bersifat antioksidan sehingga dapat mendukung sistem imun, terutama dalam menangkal radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker, penuaan dini, dan berbagai penyakit lainnya. Dalam satu mangkuk kecil edamame terdapat sekitar 17 gram protein. Kandungan lain edamame adalah asam amino esensial. Satu porsi edamame berkontribusi sekitar 10% asupan harian zat besi dan vitamin C, 8% asupan harian vitamin A, 8,1 gram serat, dan mengandung 189 kilo kalori.

Edamame bermanfaat terhadap beberapa macam penyakit salah satunya kanker. Kanker dapat disebabkan radikal bebas yang terlalu banyak tertimbun didalam tubuh. Dalam kondisi tersebut, antioksidan mampu menangkap radikal bebas dan menetralkannya (Muaris, 2013).

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan, radikal bebas yang tinggi dalam tubuh dapat memicu munculnya berbagai penyakit degeneratif. Oleh sebab itu, tubuh kita memerlukan suatu substansi penting, yakni antioksidan yang dapat membantu

melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredam dampak negatifnya (Winarsi, 2007).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Berdasarkan cara memperolehnya, antioksidan dapat digolongkan menjadi dua jenis yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintesis. Antioksidan alami adalah antioksidan yang diperoleh dari tanaman sejenis sayuran-sayuran, buah-buahan, rempah-rempahan, umbi, dan biji-bijian. Senyawa yang umumnya terkandung dalam antioksidan alami adalah fenol, polifenol, flavonoid, isoflavon dan asam organik. Antioksidan sintetik adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil reaksi sintesa reaksi kimia (Trilaksana, 2003). Salah satu tanaman sumber antioksidan alami adalah biji edamame (*Glycin max (L.) Merril*), karena biji edamame menurut Muaris (2013) mengandung isoflavon yang merupakan senyawa antioksidan.

Berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan biji edamame. Pengujian antioksidan dilakukan dengan menggunakan DPPH sebagai radikal bebas yang stabil. Metode aktivitas antiradikal bebas DPPH merupakan metode terpilih untuk menapis aktivitas antioksidan bahan alam (Molyneux, 2004). Uji DPPH atau 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil merupakan suatu

radikal bebas yang stabil dan tidak membentuk dimer akibat delokalisasi dari elektron bebas pada seluruh molekul. Delokalisasi elektron bebas ini juga mengakibatkan terbentuknya warna ungu pada larutan DPPH sehingga bisa diukur absorbansinya pada panjang gelombang sekitar 515-520 nm. Larutan DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, maka warna ungu dari larutan akan hilang seiring dengan tereduksinya DPPH. Hasil dari uji ini diinterpretasikan sebagai IC₅₀, yaitu jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50%. Pada metode ini tidak diperlukan substrat sehingga memiliki keuntungan, yaitu lebih sederhana dan waktu analisis yang lebih cepat.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dari ekstrak biji edamame. Langkah awal penelitian ini yaitu remaserasi yang merupakan pemisahan senyawa zat aktif dari simplisia, dan mengoptimalkan konsentrasi. Langkah selanjutnya meneteskan DPPH pada zat baku.

Populasi dan Sampel

Populasi yang akan digunakan dalam penelitian adalah biji edamame yang diambil dari PT. Mitra Tani Dua Tujuh Jember. Sampel yang akan diuji adalah biji edamame secara acak yang diambil dari PT. Mitra Tani Dua Tujuh Jember. Biji dikupas dari kulitnya dan dicuci sampai bersih, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai kadar air berkurang, selanjutnya dihaluskan menggunakan blender.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Neraca analitik, peralatan maserasi, cawan penguap, labu ukur 10-100 mL, erlenmeyer 250 mL, pengaduk kaca, cawan porselin, rotary evaporator, pipet tetes, tabung reaksi, gelas beker 250 mL, mesin penggiling (blender), kuvet dan spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan bahan yang digunakan adalah Biji edamame yang diperoleh dari PT. Mitra Tani 27, DPPH, etanol 96 %, dan aquadest.

Prosedur Penelitian

Sampel biji edamame (Glycin max (L) Merril) diambil dari PT. Mitra Tani Dua Tujuh Jember. Sampel biji edamame (kurang lebih sebanyak 1,5 kg) dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian diangin-anginkan sampai kadar air berkurang, selanjutnya dihaluskan dengan mesin penggiling (blender). Selanjutnya

Pembuatan ekstrak biji edamame dilakukan dengan menggunakan metode remaserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 hari, kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat dan residu (Harbone, 2006). Filtrat yang terkumpul kemudian di evaporator pada suhu 50 °C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan ekstrak kental biji edamame. Selanjutnya 20 mg ekstrak edamame dilarutkan dalam 100 mL etanol = 0,2 mg/ml=200 ppm dan dibuat menjadi konsentrasi 90; 121,3; 143; dan 173,3 ppm. Konsentrasi Vitamin C yang digunakan adalah 0,12; 0,18; 0,2; dan 0,4 ppm.

Pembuatan larutan DPPH 0,02% (0,02 g/100 mL). DPPH yang ditimbang sebanyak 0,02 g dilarutkan dalam 100 mL etanol 96 %. Kemudian larutan DPPH diambil 500 µL ditambahkan pada sampel berbagai konsentrasi dan vitamin C berbagai konsentrasi serta ditambahkan etanol sampai volumenya 1800 µL. Selanjutnya masing-masing dikocok kemudian diukur panjang gelombang maksimum dan absorbansinya.

Semua larutan ekstrak dan larutan standar positif (vitamin C) dikuvet dan diukur absorbansinya pada menit ke 0,10,20,30. Kemudian amati perubahan warna secara kualitatif dari warna ungu pekat menjadi kuning, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Setelah nilai absorbansi didapat, dihitung persen hambatan masing-masing larutan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_{\text{sampel}})}{\text{Abs}_0} \times 100 \%$$

Abs₀

Data antioksidan pada radikal DPPH (% hambatan) ekstrak biji edamame dianalisis dan dihitung nilai IC₅₀. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti aktivitas antioksidan semakin kuat. Pada penelitian ini nilai IC₅₀ dianalisis dan dihitung menggunakan persamaan regresi linear. Data persen hambatan dan konsentrasi larutan digunakan untuk mencari nilai IC₅₀ dengan persamaan regresi linier $y = a + bx$, dimana y adalah persen hambat 50 (senilai 50) dan x adalah nilai IC₅₀.

Tabel 1. Klasifikasi Aktivitas Antioksidan (Blois, 1958)

No	Nilai IC ₅₀	Antioksidan
1	< 50 ppm	Sangat Kuat
2	50 – 100 ppm	Kuat
3	101 – 150 ppm	Sedang
4	151 – 200 ppm	Lemah
5	> 200 ppm	Sangat Lemah

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian secara kualitatif yaitu melihat perubahan warna secara visual ekstrak yang sudah diberi larutan DPPH dan penelitian secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Penelitian secara kualitatif bertujuan untuk melihat dan membandingkan perubahan warna pada setiap konsentrasi ekstrak dan standar vitamin C yang telah diberi larutan DPPH. Pada prinsipnya larutan ekstrak yang mengandung senyawa antioksidan akan memberikan perubahan warna dari ungu menjadi berwarna kuning hal ini dikarenakan Mekanisme penangkapan radikal DPPH yaitu melalui donor atom H dari senyawa antioksidan yang menyebabkan peredaman warna radikal pikrilhidrazil yang berwarna ungu menjadi pikrilhidrazil berwarna kuning yang non radikal (Molyneux, 2004). Berikut ini gambar larutan seri vitamin C dan ekstrak biji edamame.



Gambar 1. Larutan Seri Vitamin C Konsentrasi 0,4 ppm, 0,2ppm, 0,18 ppm, 0,12 ppm (Dibaca dari kiri ke kanan)



Gambar 2. Larutan Seri Sampel Ekstrak biji edamame Konsentrasi 173,1 ppm, 147 ppm, 121,3 ppm, 90 ppm (Dibaca dari kiri ke kanan)

Hasil dari penelitian kualitatif ini untuk standar vitamin C pada gambar 1 terlihat perbedaan warna dari berbagai macam konsentrasi larutan. Pada konsentrasi 0,12 ppm terlihat warna ungu yang lebih pekat dibandingkan konsentrasi 0,18 ppm, 0,2 ppm dan konsentrasi 0,4 ppm. Hal ini disebabkan baru sedikit elektron bebas pada DPPH yang diikat oleh antioksidan. Sedangkan untuk konsentrasi 0,4 terjadi perubahan warna menjadi kuning hal ini dikarenakan elektron bebas DPPH seluruhnya telah terikat oleh antioksidan. Analisis kualitatif

pada ekstrak biji edamame yang dilihat pada gambar 2 yaitu terlihat perbedaan warna dari berbagai macam konsentrasi larutan. Pada konsentrasi 90 ppm terlihat warna ungu yang lebih pekat dibandingkan konsentrasi konsentrasi 121,3 ppm, 147 ppm dan 173,1 ppm. Hal ini disebabkan baru sedikit elektron bebas pada DPPH yang diikat oleh antioksidan. Sedangkan untuk konsentrasi 173,1 ppm terjadi perubahan warna menjadi kuning hal ini dikarenakan elektron bebas DPPH seluruhnya telah terikat oleh antioksidan. Dari hasil perubahan warna dari ekstrak dan vitamin C berbagai konsentrasi dapat dilihat bahwa larutan yang konsentrasinya lebih tinggi maka kemampuan dalam merendam DPPH menjadi lebih tinggi.

Penelitian secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menentukan absorbansi DPPH pada larutan ekstrak dan standar vitamin C yang nantinya digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak masuk dalam kategori manakah dalam tabel klasifikasi Blois (Blois, 1958).

Tahapan dalam penelitian kuantitatif yaitu pertama dilakukan penentuan panjang gelombang optimum DPPH dengan pelarut etanol 96%. Panjang gelombang yang digunakan pada spektrofotometer UV-Vis dari 400 nm - 800 nm. Panjang gelombang optimum dapat dilihat pada tabel 2 dimana didapat panjang gelombang optimum DPPH 516,5 nm dengan absorbansi 1,025. Tujuan penentuan gelombang optimum untuk mengetahui ketika absorpsi mencapai maksimum sehingga meningkatkan proses absorpsi larutan terhadap sinar. Setelah dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum DPPH selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi standar vitamin C.

Tabel 2. Penentuan Penentuan Panjang Gelombang Optimum.

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
520,5	1,015
518,5	1,021
516,5	1,025
514,5	1,024
512,5	1,02
510,5	1,012

Pengukuran standar vitamin C dilakukan dengan interval waktu absorbansi yaitu pada waktu 0 menit, 10 menit, 20 menit dan 30 menit hal ini digunakan untuk mengetahui pada waktu manakah didapat absorbansi DPPH optimum. Setelah didapat data hasil absorbansi dari berbagai konsentrasi pada waktu 0 menit, 10 menit, 20 menit, 30 menit selanjutnya masing-masing konsentrasi vitamin

C dan ekstrak biji edamame dibandingkan, hal ini digunakan untuk mengetahui pada menit berapakah vitamin C dan ekstrak biji edamame mencapai absorbansi optimum.

Tabel 3. Hasil Absorbansi Vitamin C ditambah larutan DPPH pada 0 Menit, 10 Menit, 20 Menit, 30 Menit

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			
	0'	10'	20'	30'
0,12	0,87	0,591	0,575	0,53
0,18	0,83	0,5	0,48	0,44
0,2	0,79	0,473	0,472	0,47
0,4	0,63	0,27	0,251	0,251

Tabel 4. Hasil Absorbansi Ekstrak edamame pada 0 Menit, 10 Menit, 20 Menit, 30 Menit

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			
	0'	10'	20'	30'
90	0,87	0,575	0,530	0,480
121,3	0,79	0,511	0,498	0,458
147	0,68	0,43	0,37	0,36
173,1	0,59	0,39	0,35	0,297

Berdasarkan perbandingan absorbansi dengan waktu absorbansi pada masing-masing konsentrasi ekstrak biji edamame dan vitamin C dapat dilihat bahwa absorbansi optimum terdapat pada waktu 10 menit dimana absorbansi stabil sampai menit ke 30 atau absorbansi tidak jauh berbeda. Sedangkan pada menit ke 0 mengalami penurunan absorbansi yang banyak atau absorbansi masih tidak stabil dalam merendam DPPH.

Data absorbansi dan konsentrasi ekstrak biji edamame dan vitamin C yang didapat pada waktu optimum yaitu 10 menit kemudian diolah datanya untuk menentukan besar % penghambat dengan cara absorbansi DPPH dikurangi absorbansi sampel kemudian dibagi absorbansi DPPH selanjutnya dikali seratus, hasil % penghambat dapat dilihat pada tabel 5 dan tabel 6.

Tabel 5. Perhitungan % Penghambatan Vitamin C

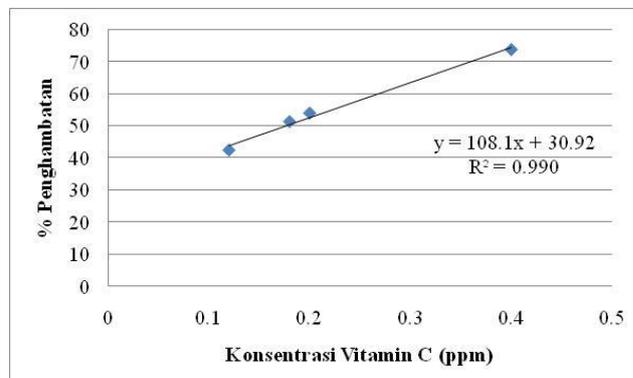
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Penghambatan (%)
0,12	0,591	42,34
0,18	0,5	51,22
0,2	0,473	53,85
0,4	0,27	73,65

Tabel 6. Perhitungan % Penghambatan Ekstrak Biji Edamame

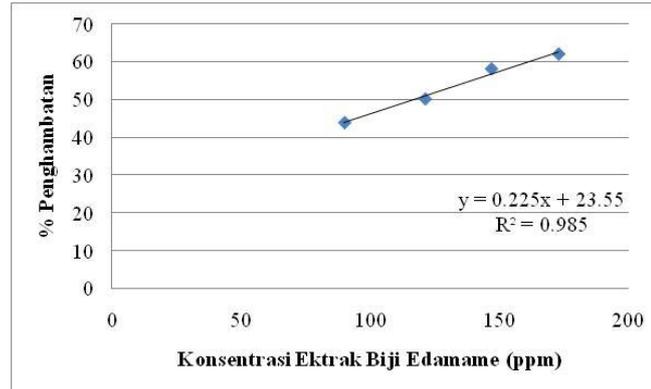
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Penghambatan (%)
90	0,575	43,90
121,3	0,511	50,14
147	0,43	58,05
173,1	0,39	61,95

Tujuan menentukan % penghambat yaitu untuk menentukan seberapa besar kemampuan vitamin C dan ekstrak dapat menghambat radikal DPPH dan % penghambat digunakan untuk menentukan IC₅₀ (inhibitor concentration 50%) bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak biji edamame yang mampu menghambat aktivitas radikal sebesar 50% (Molyneux, 2004).

Berdasarkan data penghambatan di atas, dapat dibuat kurva kalibrasi untuk pembuatan persamaan regresi DPPH yang menghubungkan antra persen penghambatan dengan konsentrasi vitamin C dan hubungan persen penghambatan dengan ekstrak biji edamame, seperti gambar 3 dan 4. Regresi linier yang didapat oleh vitamin C yaitu $y = 108,1x + 30,92$ sedangkan ekstrak biji edamame yaitu $y = 0,2255x + 23,55$ kemudian dari regresi linier tersebut dimasukkan dalam persamaan $y = a + bx$, dimana y adalah % hambat 50 (senilai 50) dan x adalah nilai IC₅₀.



Gambar 3. Kurva Hubungan antara % penghambatan dengan konsentrasi vitamin C



Gambar 4. Kurva Hubungan antara % penghambatan dengan konsentrasi Ekstrak Biji Edamame

Hasil dari perhitungan didapat nilai IC_{50} vitamin C sebesar 0,18 ppm dan IC_{50} ekstrak biji edamame sebesar 177,2 ppm, dari kedua IC_{50} tersebut dapat disimpulkan vitamin C memiliki antioksidan sangat kuat sedangkan ekstrak biji edamame lemah, karena vitamin C < 50 ppm dan ekstrak edamame antara 151 - 200 dilihat dari tabel klasifikasi blois (Blois, 1958).

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Vitamin C memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} 0,18 ppm dengan metode DPPH.
- Ekstrak biji edamame memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} sebesar 177,2 ppm yang dalam tabel klasifikasi blois merupakan antioksidan yang bersifat lemah.

Daftar Pustaka

- Blois, M.S. 1958. *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Nature, Vol.181:119-1200
- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia*. Diterjemahkan: Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB. Hal69-70.
- Molyneux P. 2004. The Use Stable Free Radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity.

Songklanakarini J Sci Technol. Vol. 26(2):201-210

Muaris H.K . 2013. *Khasiat Edamame untuk Kestabilan Tubuh dan Gizi Edamame*, Edisi kedua, PT.Gramedia pustaka utama, Jakarta.

Trilaksani W. 2003. *Antioksidan: jenis, sumber, mekanisme kerja, dan peran terhadap kesehatan makalah penelitian*. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas (Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan)*. Kanisius, Yogyakarta

Sengaja dikosongkan