

PENGARUH METODE EKSTRAKSI TERHADAP KANDUNGAN FENOLIK TOTAL DAN FLAVONOID TOTAL PADA EKSTRAK ETANOL BUNCIS (*Phaseolus vulgaris* L.)

EFFECT OF EXTRACTION METHOD ON TOTAL PHENOLIC CONTENT AND TOTAL FLAVONOID IN GREEN BEANS ETHANOL EXTRACT (*Phaseolus vulgaris* L.)

Lalu Mulyawan Mustika Candra^{1*}, Yayuk Andayani², Dyke Gita Wirasisya¹

¹Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Mataram, Mataram, Indonesia

²Program Studi Pascasarjana Pendidikan IPA Universitas Mataram, Mataram, Indonesia

*Email: mulyawaaan@gmail.com

Diterima: 18 Januari 2021. Disetujui: 20 Mei 2021. Dipublikasikan: 2 Juni 2021

Abstrak: Secara empiris, buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) digunakan sebagai fitoterapi pada pengobatan seperti meluruhkan air seni, menurunkan kadar gula dalam darah, dan menurunkan tekanan darah tinggi karena mengandung metabolit sekunder, terutama fenolik. Mutu buncis sebagai obat herbal dapat dinilai melalui keseragaman kadar bioaktif fenolik yang dipengaruhi oleh faktor bibit, lingkungan, panen, dan pengolahan pasca panen. Penelitian dengan desain *Post Test Only Group Design* ini bertujuan untuk menentukan metode ekstraksi yang baik dalam memperoleh kadar fenolik yang optimal. Sampel diperoleh dari hasil panen petani binaan di Daerah Kabupaten Lombok Timur. Metode ekstraksi yang digunakan yakni maserasi, soxhletasi, reflux, dan sonikasi menggunakan pelarut etanol 96%. Analisis kadar fenolik dan flavonoid dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Data diolah secara kuantitatif dengan analisis statistik menggunakan SPSS v.16.0 for windows. Kandungan flavonoid dinyatakan dalam mg ekuivalen quercetin per gram berat kering (mg QE / g) sedangkan kandungan fenol dalam mg ekuivalen asam galat per gram berat kering (mg GAE / g). Ekstraksi soxhlet menghasilkan kandungan fenolik (8,02 mg GAE / g) dan flavonoid (0,71 mg QE / g) yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode lain. Oleh karena itu, sangat disarankan untuk menggunakan ekstraksi Soxhlet untuk penelitian lebih lanjut mengenai fenolik dan flavonoid dari buncis (*Phaseolus vulgaris* L.).

Kata Kunci: buncis (*Phaseolus vulgaris* L.), fenolik, flavonoid, metode ekstraksi

Abstract: Empirically, green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are used as phytotherapy in medications such as lowering blood sugar and high blood pressure because they contain high phenolic and flavonoids. The quality of green beans as herbal medicine can be assessed through the uniformity of its secondary metabolites levels that might be influenced by seed, environment, harvest, and post-harvest processing. This research that used *Post Test Only Group Design* aims to determine a good extraction method in obtaining the highest level of phenolic and flavonoid. Samples were obtained from farmers in the East Lombok Regency. The extraction methods used for the research were maceration, soxhlet extraction, reflux, and sonication, as well as 96% ethanol as a solvent. The analysis of total phenolic and flavonoid was carried out by using a spectrophotometric assay. The flavonoid content was expressed in mg of quercetin equivalent per gram of dry weight (mg QE/g) while phenolic content in mg of gallic acid equivalent per gram of dry weight (mg GAE/g). The soxhlet extraction results in higher phenolic (8,02 mg GAE/g) and flavonoid (0,71 mg QE/g) content compared to other methods. Therefore, it is highly suggested to use Soxhlet extraction to further research phenolic and flavonoids from green beans (*Phaseolus vulgaris* L.).

Keywords: green beans (*Phaseolus vulgaris* L.), phenolics, flavonoids, extraction method

PENDAHULUAN

Tanaman buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) merupakan tanaman semusim yang berbentuk perdu. Buncis merupakan salah satu sayuran kelompok kacang-kacangan yang digemari masyarakat karena kaya akan vitamin dan sumber protein [1]. Buncis mengandung senyawa metabolit sekunder seperti saponin, fenol, alkaloid, flavonoid, steroid dan triterpenoid [2]. Khususnya senyawa fenolik yang diketahui mempunyai beberapa efek yaitu antioksidan, antiinflamasi, antiproliferasi, antimutagenik, antimikrobia, antikarsinogenik, dan pencegahan terhadap penyakit jantung [3].

Khususnya senyawa flavonoid yang memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan, salah satunya sebagai antioksidan. Flavonoid merupakan antioksidan primer yang dapat menangkap radikal bebas pada konsentrasi rendah dan dapat berperan sebagai prooksidan jika konsentrasi radikal bebas sangat tinggi. Flavonoid bertindak sebagai antioksidan dengan cara dioksidasi oleh radikal sehingga menghasilkan radikal yang lebih stabil atau netral [4].

Penggunaan metode ekstraksi dapat mempengaruhi kadar senyawa seperti fenol dan flavonoid [5]. Terdapat berbagai macam teknik

ekstraksi yang digunakan untuk memperoleh komponen bioaktif. Mulai dari teknik konvensional seperti maserasi, sokletasi, dan refluks, hingga teknik yang lebih maju seperti ekstraksi gelombang mikro, ekstraksi ultrasonik, dan ekstraksi fluida superkritis [6]. Untuk memperoleh ekstrak dengan aktivitas biologi tertinggi serta dalam pengembangan obat herbal maka perlu dilakukan observasi metode ekstraksi [7].

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Utami, dkk. Pada tahun 2015 terhadap kadar fenolik total dan flavonoid total daun sukun (*Artocarpus altitis fosberg*) melaporkan bahwa ekstraksi dengan menggunakan metode refluks dan metode maserasi diperoleh hasil kadar fenolik total dan flavonoid total yang berbeda [5]. Penelitian lain yang dilakukan oleh Safitri, dkk. pada tahun 2018 terhadap kadar fenolik total dan flavonoid total ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan metode ekstraksi yang berbeda yakni metode perkolasi, maserasi, soxhlet dan refluks menunjukkan bahwa kadar fenolik total dan flavonoid total yang diperoleh hasilnya juga berbeda [8].

Pengujian dengan membandingkan pengaruh penggunaan metode ekstraksi yang berbeda terhadap kadar fenolik total dan flavonoid total ini, belum pernah dilakukan pada tanaman buncis. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan variasi metode ekstraksi untuk menghasilkan ekstrak dengan kadar fenolik total dan flavonoid total yang paling baik.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Buah buncis, kertas saring whatman no.3, asam klorida pekat, akuades, standar asam galat, serbuk Mg, standar kuersetin, etanol p.a, aluminium klorida 5%, aluminium klorida 2% dan natrium asetat 1 M, amil alkohol, natrium karbonat 5%, etanol 96%, asam asetat 5%, ferri klorida 1%, dan Folin-Ciocalteu. alat-alat gelas Iwaki, bejana maserasi, blender Kirin, kain hitam, kain mori, rak tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, timbangan analitik Ohaus, spektrofotometer UV-Visible Specord 200, sonikator Elmasonic, mixer, Vortex dan hotplate Labnet.

Persiapan Sampel Buncis

Sampel buah buncis diperoleh dari hasil panen sawah petani binaan di daerah Kabupaten Lombok Timur sebanyak 6 kg. Buah buncis yang terkumpul disortasi, dicuci dengan air bersih yang mengalir sebanyak 3 kali, ditiiriskan dan dirajang. Kemudian sampel dikeringkan menggunakan sinar matahari dimana sampel ditutup dengan kain hitam. Selanjutnya disortasi kering, dikemas dan disimpan di tempat yang gelap untuk digunakan lebih lanjut. Pada penggunaan lebih lanjut, sampel buncis yang kering kemudian di blender untuk memperluas

permukaan sampel, Sampel diayak menggunakan ayakan dengan ukuran mesh no.18 dan selanjutnya sampel diekstraksi menggunakan beberapa metode ekstraksi

Persiapan Ekstraksi

Sebanyak 100 g serbuk simplisia buncis diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Perbandingan serbuk simplisia dan pelarut yang digunakan adalah 1:10. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian yaitu maserasi, refluks, soxhletasi, dan sonikasi.

Maserasi dilakukan dengan mencampurkan simplisia buncis dengan etanol 96% ke dalam bejana kaca pada suhu ruang selama 24 jam. Selama maserasi berlangsung, sampel diaduk setiap 1 jam pada 6 jam pertama.

Refluks dilakukan dengan memasukkan simplisia ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambahkan etanol 96% dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 3 jam [9].

Soxhletasi dilakukan dengan menimbang sebanyak 25 gram simplisia dan dibungkus dengan kertas saring, ikat kedua bagian ujungnya dengan benang, lalu masukkan ke dalam tabung soxhlet (*thimble*), tambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 250 mL yang dibagi menjadi 2 bagian, 150 mL dimasukkan ke dalam labu soxhlet (labu alas bulat) dan 100 mL dimasukkan ke dalam tabung soxhlet untuk membasahi sampel. Proses ekstraksi dilakukan dengan suhu 70°C sampai tetesan siklus menjadi jernih.

Sonikasi dilakukan dengan mencampurkan simplisia buncis dengan etanol 96% ke dalam bejana kaca. Ekstraksi dilakukan dengan bantuan sonikator. Ekstraksi dilakukan selama 60 menit dan diaduk setiap 15 menit dan langkah diulangi sebanyak 2 kali, kemudian disaring. Sonikasi dijalankan pada frekuensi 20 kHz dengan kontrol suhu 30°C [10]. Ekstrak cair (maserat) yang telah diperoleh dari masing-masing metode ekstraksi kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C.

Skrining Fitokimia

Uji Fenolik. diimasukkan 0,5 g sampel ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL akuades, lalu panaskan sampai mendidih selama 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah 2 tetes larutan $FeCl_3$ 1% akan terbentuk warna hijau atau hitam kehijauan menunjukkan adanya fenolik [11].

Uji Flavonoid. Sebanyak 0,1 g ekstrak dimasukan kedalam gelas piala kemudian ditambahkan 5 mL aquades dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2 mg pita Mg, 1 mL HCl pekat dan 1

mL amilalkohol. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol [2].

Penetapan Kadar Fenolik Total

Penentuan *Operating Time* dengan cara mengambil sebanyak 300 µL larutan asam galat konsentrasi 30 ppm dan ditambah 1,5 mL reagen Folin Ciocalteu (1:10), kemudian divortex dan didiamkan selama 3 menit. Selanjutnya, larutan tersebut ditambahkan 1,2 mL larutan Na₂CO₃ 7,5 % dan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-120 menit pada panjang gelombang 765 nm [12].

Penentuan panjang gelombang maksimum dengan cara mengambil sebanyak 300 µL larutan asam galat konsentrasi 30 ppm dan ditambah 1,5 mL reagen Folin Ciocalteu (1:10), kemudian divortex dan didiamkan selama 3 menit. Selanjutnya, larutan tersebut ditambahkan 1,2 mL larutan Na₂CO₃ 7,5 %, divortex homogen, dan diamkan larutan pada suhu kamar dalam range *operating time* (OT) [12]. Absorbansi akan diukur pada panjang gelombang 400 – 800 nm [13].

Pembuatan kurva baku asam galat dengan cara mengambil sebanyak 300 µL larutan asam galat konsentrasi 15, 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm. kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (µg/mL) dengan absorbansi. Pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (*triplo*) [12].

Sebanyak 10 mg ekstrak dari masing-masing ekstrak buncis dilarutkan dengan 10 mL akuades. Larutan diperoleh dipipet sebanyak 300 µL, dan ditambah 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu. Larutan divortex dan didiamkan selama 3 menit, kemudian ditambah 1,2 mL pelarut Na₂CO₃ 7,5 % dan didiamkan lagi pada *range operating time* pada suhu kamar. Absorbansi ekstrak diukur pada panjang gelombang maksimum [12]. Perhitungan kandungan fenolik total menggunakan rumus berikut.

$$\text{TPC} = \frac{C \cdot V \cdot fp}{g}$$

Keterangan:

TPC = *Total Phenolic Content*

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = Faktor pengenceran

g = beratsampel yang digunakan (gram)

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penentuan *operating time* (OT) dilakukan menggunakan larutan standar kuersetin 50 µg/mL, sebanyak 0,5 mL. Larutan kemudian direaksikan dengan 0.10 mL AlCl₃ 10%. Ditambahkan 0.10 mL larutan natrium asetat 1 M dan 2.80 mL akuades. Campuran larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 428 nm

dengan interval waktu 1 jam dalam selang waktu 5 menit sampai diperoleh nilai absorbansi yang stabil [14].

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dilakukan dengan membuat larutan standar kuersetin 50 µg/mL, sebanyak 0,5 mL. Larutan kemudian direaksikan dengan 0.10 mL AlCl₃ 10%. Ditambahkan 0.10 mL larutan natrium asetat 1 M dan 2.80 mL akuades. Larutan diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar dan diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-500 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tinggi merupakan panjang gelombang maksimum [14].

Penentuan Larutan Standar Kuersetin dilakukan dengan membuat larutan induk kuersetin 2000 µg/mL, sebanyak 0.02 g kuersetin ditimbang dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL. Larutan baku kerja kuersetin 100 µg/mL dibuat dengan mengencerkan larutan induk 2000 µg/mL sebanyak 1 mL larutan induk diencerkan dengan etanol p.a hingga 20 mL. Kemudian dibuat serangkaian larutan standar dengan konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60 dan 70 µg/mL. Sejumlah 0.5 mL dari masing-masing larutan standar ditambah 0.10 mL AlCl₃ 10%, 0.10 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan 2.80 mL akuades. Kemudian larutan diinkubasi selama *range operating time* pada suhu kamar. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi kuersetin (µg/mL) dengan absorbansi. Pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (*triplo*) [14].

Pada penetapan kadar flavonoid, larutan blanko dibuat dengan etanol p.a 0.5 mL ditambahkan 0.10 mL AlCl₃ 10%, 0.10 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan 2.80 mL akuades. Setelah itu diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Setiap pengukuran serapan dibandingkan terhadap blanko.

Larutan uji ekstrak dibuat dengan melarutkan 0.2 g ekstrak dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 20.000 µg/mL. Larutan uji tersebut kemudian dipipet sebanyak 0.5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 0.10 mL aluminium klorida AlCl₃ 10%, 0.10 mL natrium asetat 1 M dan 2.80 mL akuades. Larutan diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (*triplo*). Kadar flavonoid ditentukan dengan rumus sebagai berikut.

$$TFC = \frac{C \cdot V \cdot fp}{g}$$

Keterangan:

TFC = Total Flavonoid Content

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

Fp = Faktor pengenceran

g = berat sampel yang digunakan (gram)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Sampel

Ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan kandungan metabolit sekunder dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada sifat bahan dan senyawa yang akan dipisahkan [15]. Penelitian ini menggunakan beberapa metode ekstraksi yakni maserasi, refluks, soxhletasi, dan sonikasi (*Ultrasound Assisted Extraction*). Kelebihan cara maserasi yaitu proses pengerjaan serta alat yang digunakan sederhana, biaya lebih murah, dan menghindari kerusakan senyawa-senyawa yang termolabil. Metode refluks memiliki kelebihan yaitu dapat mengekstraksi sampel yang memiliki tekstur kasar. Metode soxhletasi memiliki kelebihan yaitu proses ekstraksi yang cepat [16]. Sedangkan metode sonikasi memiliki kelebihan yaitu meningkatkan penetrasi pelarut karena adanya kavitasasi dan dapat dijalankan pada suhu rendah [17].

Pemilihan etanol 96% sebagai pelarut karena dapat melarutkan senyawa polar seperti senyawa fenol dan flavonoid [18]. Keunggulan dari pelarut etanol yaitu mudah ditemukan, universal, dan murah [19]. Hasil rendemen ekstrak dapat

dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Rendemen Ekstrak

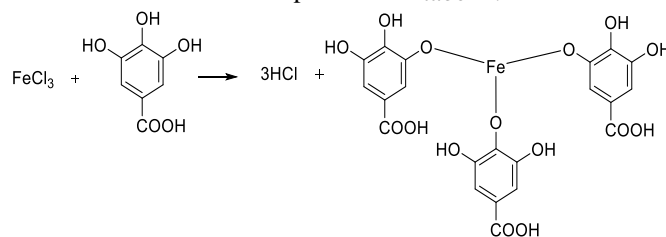
Ekstraksi	implisia (g)	endemen ekstrak (%)
Maserasi	100	23,88
Refluks	100	22,11
Soxhletasi	100	23, 19
Sonikasi	100	24,76

Skrining Fitokimia

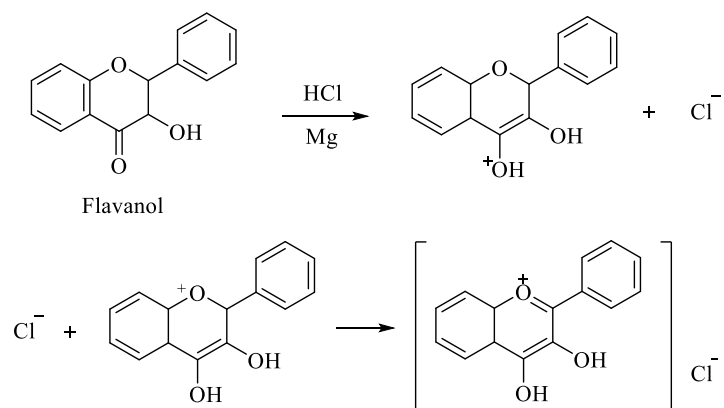
Hasil dari skrining fitokimia fenolik dapat dilihat pada tabel 2 dan flavonoid pada tabel 3.

Senyawa fenol dapat dideteksi dengan penambahan larutan $FeCl_3$ 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau hijau kehitaman [11]. Penambahan reagen $FeCl_3$ % pada larutan ini bereaksi dengan gugus hidroksil pada cincin aromatis dari senyawa fenol seperti pada gambar 1.

Senyawa Flavonoid dapat diuji dengan tes Shinoda, dimana akan terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid [2]. Perubahan warna ini disebabkan oleh penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat akan mereduksi senyawa flavonoid. Reduksi ini menyebabkan senyawa flavonoid menjadi bentuk aglikonnya. Senyawa ini kemudian membentuk kompleks dengan magnesium sehingga menimbulkan warna kuning pada larutan [21]. Reaksi uji fitokimia flavonoid dapat diilustrasikan seperti pada gambar 1. Hasil pengujian flavonoid dapat dilihat pada tabel 2.







Gambar 1. Reaksi Identifikasi Fenol [20]

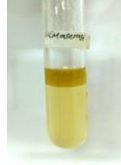





Gambar 2. Reaksi Identifikasi Flavonoid [20].

Tabel 2. Hasil Rendemen Ekstrak

Metode Ekstraksi	Hasil Skrining Fitokimia Fenol	
	Sampel Ekstrak	Hasil
Maserasi		+
Sonikasi		+
Refluks		+
soxhletasi		+

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak

Metode Ekstraksi	Hasil Skrining Fitokimia Flavonoid	
	Sampel Ekstrak	Hasil
Maserasi		+
Sonikasi		+
Refluks		+
Soxhletasi		+

Penetapan Kadar Fenolik Total

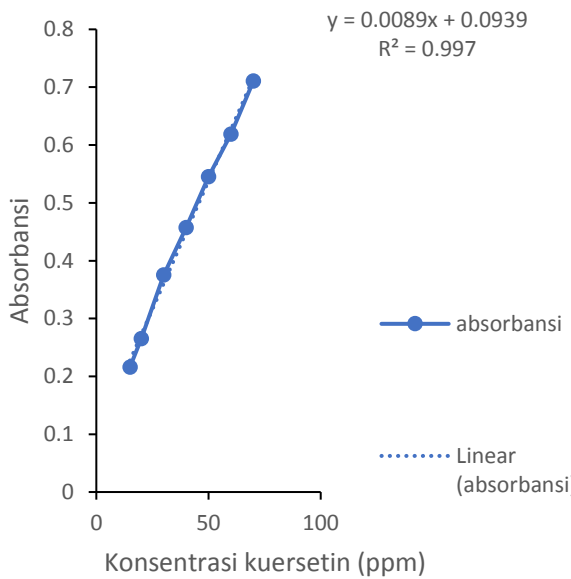
Penetapan kadar fenolik total dilakukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Prinsip dari metode ini adalah reduksi fosfomolibdatfosfotungstat oleh inti aromatis senyawa fenolik sehingga terbentuk kompleks molibdenum tungsten yang berwarna biru [22]. Reaksi antara reagen Folin-Ciocalteu dan senyawa fenolik hanya dapat terjadi pada suana basa, sehingga diperlukan penambahan natrium karbonat untuk membuat lingkungannya menjadi basa. Suasana basa ini dapat mendisosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat [23].

Kurva baku asam galat dibuat dengan seri konsentrasi 15, 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm. Asam galat dipilih karena merupakan salah satu senyawa fenolik dengan struktur sederhana, memiliki sifat yang stabil, dan tersedia dalam keadaan murni [22]. Melalui kurva standar asam galat tersebut akan diperoleh persamaan regresi linier yang kemudian digunakan untuk menentukan kadar fenolik total ekstrak etanol dan ekstrak air daging buah kacang panjang. Pengukuran absorbansi asam galat dilakukan menggunakan panjang gelombang maksimum 760 nm dengan operating time selama 45 menit. Absorbansi standar asam galat dapat dilihat pada tabel 4. Kurva kalibrasi asam galat yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 3.

Hasil penelitian diperoleh persamaan linier $y = 0,0089x + 0,0939$ dengan nilai r^2 sebesar 0.997. Persamaan regresi linier ini kemudian digunakan untuk menghitung kadar fenolik total pada sampel ekstrak. Penetapan kadar fenolik sampel ekstrak dilakukan dengan mengukur absorbansi sampel ekstrak dengan spektrofotometer UV-Visible. Larutan sampel ekstrak etanol buncis dari masing-masing metode ekstraksi dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Hasil kadar fenolik total ekstrak etanol dan ekstrak air daging buah kacang panjang dapat dilihat pada table 5.

Tabel 4. Hasil Kurva Kalibrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
15	0.2161
20	0.2655
30	0.3755
40	0.4573
50	0.5455
60	0.6187
70	0,7105



Gambar 3. Kurva kalibrasi Asam Galat

Tabel 5. Hasil Kadar Fenolik Total

Ekstraksi	Rep	Kadar Fenolik Total (mg GAE/g)	\bar{x} (mg GAE/g)
Soxhletasi	1	8,0888	8,0250
	2	8,1338	
	3	7,8525	
Maserasi	1	7,3125	7,5050
	2	7,7438	
	3	7,4588	
Refluks	1	7,1175	7,1313
	2	7,0275	
	3	7,2488	
Sonikasi	1	7,0538	7,0488
	2	7,0238	
	3	7,0688	

Kurva baku kuersetin dibuat dengan seri konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm. Kuersetin adalah flavonoid golongan flavonol dengan gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga yang nantinya dapat membentuk kompleks dengan $AlCl_3$. Melalui kurva standar kuersetin tersebut akan diperoleh persamaan regresi linier yang kemudian digunakan untuk menentukan kadar flavonoid total ekstrak etanol buncis. Pengukuran absorbansi kuersetin dilakukan menggunakan panjang gelombang maksimum 438 nm dengan operating time selama 20 menit. Absorbansi standar kuersetin dapat dilihat pada tabel 6. Kurva kalibrasi kuersetin yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 4.

Hasil penelitian diperoleh persamaan linier $y = 0,010x + 0,041$ dengan nilai r^2 sebesar 0.996. Persamaan regresi linier ini kemudian

digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total pada sampel ekstrak. Penetapan kadar flavonoid sampel ekstrak dilakukan dengan mengukur absorbansi sampel ekstrak dengan spektrofotometer UV-Visible. Larutan sampel ekstrak etanol buncis dari masing-masing metode ekstraksi dibuat dengan konsentrasi 20000 ppm. Hasil kadar flavonoid total ekstrak etanol buncis dapat dilihat pada table 7.

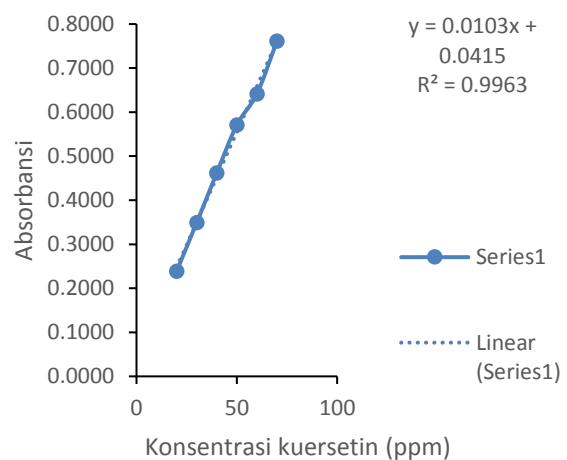
Data dari penelitian ini berupa kadar fenolik total (mg GAE/g ekstrak) yang dapat dilihat pada tabel 4. Hasil kadar fenolik total menunjukkan pada metode ekstraksi soxhletasi memiliki rata-rata kadar fenolik total tertinggi sebesar 8,0250 mg GAE/g ekstrak dan kadar fenolik terkecil terdapat pada metode ekstraksi refluks dengan rata-rata fenolik total sebesar 7,1313 mg GAE/g ekstrak.

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode kolorimetri. Metode kolorimetri menggunakan penambahan pereaksi berupa $AlCl_3$. $AlCl_3$ akan bereaksi dengan gugus keton pada C4 dan gugus OH pada C3 atau C5 pada senyawa flavon atau flavonol membentuk senyawa kompleks yang stabil berwarna kuning. Senyawa yang digunakan sebagai standar pada penetapan kadar flavonoid ini adalah kuersetin, karena kuersetin merupakan flavonoid yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga [24].

Tabel 6. Hasil Kurva kalibrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
20	0.2390
30	0.3489
40	0.4620
50	0.5710
60	0.6413
70	0,7611



Gambar 4. Kurva kalibrasi kuersetin

Tabel 7. Hasil Kadar Flavonoid Total

Ekstraksi	Rep	Kadar	
		Flavonoid Total (mg QE/g)	\bar{x} (mg QE/g)
Soxhletasi	1	0,7280	0,7102
	2	0,6930	
	3	0,7095	
Maserasi	1	0,5096	0,5108
	2	0,5115	
	3	0,5112	
Refluks	1	0,4396	0,4460
	2	0,4386	
	3	0,4599	
Sonikasi	1	0,3388	0,3505
	2	0,3558	
	3	0,3570	

Data dari penelitian ini berupa kadar flavonoid total (mg QE/g ekstrak) yang dapat dilihat pada tabel 4. Hasil kadar flavonoid total menunjukkan pada metode ekstraksi soxhletasi memiliki rata-rata kadar tertinggi sebesar 0,7102 mg QE/g ekstrak dan kadar terkecil terdapat pada metode ekstraksi refluks dengan rata-rata fenolik total sebesar 0,3505 mg QE/g ekstrak.

Analisis dilanjutkan dengan pengujian hipotesis One Way ANOVA. Berdasarkan jenis metode ekstraksi, kandungan total fenol dan total flavonoid pada metode maserasi, refluks, sonikasi, dan soxhletasi berbeda nyata.

Berdasarkan hasil penetapan kadar fenolik total dan flavonoid total yang diperoleh dari masing-masing metode ekstraksi diperoleh kadar yang lebih tinggi pada metode soxhletasi. Soxhletasi adalah metode ekstraksi dengan prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Hal ini menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan ini kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan menyebabkan uap mengembun menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping soxhlet maka akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang inilah yang akan menghasilkan ekstrak yang baik [25].

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Settharaksa, dkk. pada tahun 2012 melaporkan bahwa suhu dan lamanya waktu pemanasan pada proses ekstraksi dapat berpengaruh terhadap kadar senyawa yang diperoleh. Pada umumnya kelarutan zat aktif yang diekstrak akan bertambah besar dengan bertambah tingginya suhu.[26]. Akan tetapi, peningkatan suhu ekstraksi juga perlu diperhatikan, karena suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada bahan yang sedang

diproses [27]. Pada penelitian ini diketahui metode soxhletasi menggunakan suhu yang paling tinggi dibandingkan refluks, sonikasi dan maserasi. Senyawa fenol dan flavonoid diketahui merupakan senyawa yang bersifat stabil terhadap pemanasan dengan suhu tertentu. Meningkatnya suhu menyebabkan terjadinya peningkatan kadar [28].

Waktu ekstraksi juga sangat berpengaruh terhadap senyawa yang dihasilkan. Waktu ekstraksi yang tepat akan menghasilkan senyawa yang optimal. Waktu ekstraksi yang terlalu lama akan menyebabkan ekstrak terhidrolisis, sedangkan waktu ekstraksi yang terlalu singkat menyebabkan tidak semua senyawa aktif terekstrak dari bahan [29]. Waktu ekstraksi sangat mempengaruhi hasil, terutama terhadap nilai transfer massa. Semakin lama waktu kontak antara solut dengan solvent selama proses ekstraksi maka semakin banyak pula jumlah unsur-unsur kandungan kimia yang terekstrak [30].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh metode ekstraksi terhadap total kandungan fenolik dan flavonoid pada ekstrak etanol kacang hijau (*Phaseolus vulgaris* L.). Hasil penelitian menunjukkan bahwa total fenolik dan flavonoid yang diperoleh secara signifikan lebih tinggi dengan metode ekstraksi soxhlet dibandingkan dengan maserasi, sonikasi, dan refluks.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Rihana, S., Heddy, Y. B. S., dan Maghfoer, M. D., (2013). Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Buncis (*Phaseolus Vulgaris* L.) Pada Berbagai Dosis Pupuk Kotoran Kambing dan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Dekamon. *Jurnal Produksi Tanaman*. 1(4), 369-77.
- [2] Nugrahani, Yayuk Andayani dan Aliefman Hakim. 2016. Skrining Fitokimia dari Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus Vulgaris* L.) dalam Sediaan Serbuk. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*. 2(1), 35-42.
- [3] Ghosh, D., dan Konishi, T., (2007). Anthocyanins and Anthocyanin-Rich Extract : Role in Diabetes and Eye Function, Asia Pac. *Journal Clin Nutr*.6(2),200- 208.
- [4] Arifin, B. dan Ibrahim, S., 2018. Struktur, Bioaktivasi dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*. 6(1), 21-19.
- [5] Utami, R. D., Yuliawati, K. M., dan Syafnir, L. (2015). Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan Daun Sukun (*Artocarpus Altilis* (Parkinson) Fosberg). *Prosiding Farmasi Unisba*. 1(2), 280-6.

- [6] Jaya, F. (2017). *Produk-produk Lebah Madu dan Hasil Olahannya*. Malang: UB Media, 37.
- [7] Desmiaty, Y., Elya, B., Saputri, F. C., Dewi, I. I., dan Hanafi, M. (2019). Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Kandungan Senyawa Polifenol dan Aktivitas Antioksidan pada *Rubus fraxinifolius*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 17(2),227-31.
- [8] Safitri, I., Nuria, MC, dan Puspitasari, AD 2018. Perbandingan Kadar Flavonoid dan Fenol Total Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) pada Berbagai Metode Ekstraksi. *Inovasi Teknik Kimia*, 3 (1), 31-36.
- [9] Wijaya, H., Novitasari, dan Jubaidah, S., (2018). Perbandingan Metode Ekstraksi terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambai Laut (*Sonneratia Caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 4(1), 79-83.
- [10] Widyasanti, A., Tri, H., dan Dadan, R., (2018). Ekstraksi Teh Putih Berbantu Ultrasonik Pada Berbagai Amplitudo. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 7(3), 112.
- [11] Banu, K. S and Cathrine, DR. L. (2015). General Techniques Involved in Phytochemical Analysis. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS)*. 2(4), 25-32.
- [12] Andriani, D. dan Murtisiwi, L. (2018). Penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol bunga telang (*clitoria ternatea* l.) dengan spektrofotometri uv-vis. *Cendekia Journal of Pharmacy*. 2(1), 32-8.
- [13] Hapsari, A.M., Masfria, dan Dalimunthe, A., 2018. Pengujian kandungan total fenol ekstrak etanol tempuyung (*Shoncus arvensis* L.). *Tropical Medicine Conference Sciences*. Vol. 01 No. 2018, p. 284-90.
- [14] Chang, C., Yang, M., Wen, H., dan Chern, J., 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol 10, No 3, p.1978-1982.
- [15] Mukhriani. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. 7(2), 362.
- [16] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
- [17] Silva, G. O. D., Achala, T. A., dan Malamige, M. W. A., (2017). Extraction Methods Qualitative and Quantitative Techniques for Screening of Phytochemicals from Plants. *American Journal of Essential Oils and Natural Product*. 5(2), 29-32.
- [18] Subianto, C., Srianta, I., dan Kusumawati, N., (2013). Pengaruh Proporsi Air dan Etanol sebagai Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Biji Durian dengan Metode Phosphomolibdenum dan DPPH. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*. 12(2), 75-80.
- [19] Novianty. (2016). Pengaruh Kepolaran Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Brazil Batu (*Psidium guineense* L.) dengan Metode DPPH. *Jurnal Farmako Bahahari*. 7(1), 29-35.
- [20] Setiabudi, D. A., dan Tukiran. (2017). Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Klampok Watu (*Syzygium litorale*). *UNESA Journal of Chemistry*. 6(3), 157.
- [21] Wardana, A. P. dan Tukiran. 2016. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Klorofom Tumbuhan Gowok (*Syzygium polyecephalum*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pembelajarannya*. Vol. 1, p. 1-5.
- [22] Senet, M. R. M., Raharja, I. G. M. A. P., Darma, I. K. T., Prastakarini, K. T., Dewi, N. M. A., dan Parwata, I. M. O. A., (2018). Penentuan Kandungan Total Flavonoid dan Total Fenol dari Akar Kersen (*Muntingia calabura*) serta Aktivitasnya sebagai Antioksidan. *Jurnal Kimia*. 12(1),13-8.
- [23] Ukieyanna, E. (2012). Aktivitas antioksidan, kadar fenolik, dan flavonoid total tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth). Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor
- [24] Sari, AK, dan Ayuhecacia, N., 2017. Penentuan Kadar Fenolik Total dan Total Flavonoid Ekstrak Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) asal Kalimantan Selatan. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2 (2), 327-335.
- [25] Anam, C., Tri, W.A., dan Romadhon (2014). Pengaruh Pelarut yang Berbeda Pada Ekstraksi *Spirulina Platensis* Serbuk Sebagai Antioksidan dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 3(4), 106-112.
- [26] Settharaksa, S., Jongjareonrak, A., Hmadhlu, P., Chansuwan, W., dan Siripongvutikorn, S. (2012). Flavonoid, Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Thai Hot Curry Paste Extract and Its Ingredients as Affectes of pH, Solvent Types, and High Temperature. *International Food Research Journal*. 19(4), 1581-1587.

- [27] Margareta, S., Handayani, N. Indraswati dan H. Hindraso. (2011). Ekstraksi Senyawa Phenolics Pandanus Amaryllifolius Roxb. sebagai Antioksidan Alami. *Widya Teknik*. 10(1), 21-30.
- [28] Riadini, R. K., Sidharta, B. B. R., dan Pranata, F. S., (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynurapro cumbens* (Lour.) Merr) Berdasarkan Perbedaan Metode Ekstraksi dan Umur Panen. *E-Journal*. 9, 1-8.
- [29] Budiyanto, A. Dan Yulianingsih. (2008). Pengaruh Suhu dan Waktu Ekstraksi terhadap Karakter Pektin dari Ampas Jeruk Siam (*Citrus nobilis* L). *J. Pascapanen*. 5(2),37-44.
- [30] Irvan., Manday, P. B. dan Sasmitra, J. (2015). Ekstraksi 1,8 Cineole dari Minyak Daun Eucalyptus Urophylla dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 4(3) ,52-57.