

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Peneliti

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Mei 2024 di Laboratorium Bahan Alam Farmasi dan Laboratorium Kimia Farmasi program studi Farmasi S1 program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu UVmini-1240*), oven (*Yenaco Drying Oven*), sonikator (*Fengyu*), waterbath (*DFS*), blender (*Philips*), pisau, ayakan mesh 30, neraca analitik (*Ohaus*), vortex (*Labnet*), tabung reaksi (*Pyrex*), beaker glass (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), rak tabung reaksi, Erlenmeyer (*pyrex*), mikropopet (*Dragon lab*), pipet tetes, corong (*pyrex*), labu ukur (*pyrex*) dan batang pengaduk (*pyrex*).

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia akar, batang, dan daun tanaman mangrove (*Rhizophora mucronate* Lam.), aluminium foil, kertas saring, aquadest (H₂O), asam trikloroasetat (TCA) 10%, asam oksalat, besi (III) klorida (FeCl₃) 0,1 %, etanol 96%, kalium ferrisianida (K₃Fe(CN)₆) 1%, kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), natrium hidroksida (NaOH), dan asam askorbat (vitamin C).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar, batang, dan daun tanaman mangrove (*Rhizophora mucronate* Poir.) dengan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), dengan variabel sebagai berikut:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan dari adanya variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol akar, batang, dan daun tanaman mangrove (*Rhizophora mucronate* Poir.).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas, karakteristik subjek yang diukur setelah mendapat perlakuan. Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang dilihat dari ekstrak etanol.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang sengaja dikendalikan dan dibuat konstan untuk meminimalisir pengaruh lain dari luar selain variabel bebas. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel, jenis sampel, suhu ekstraksi, tempat penelitian, metode, jenis pelarut, cara pembuatan dan uji yang dilakukan.

3.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar, batang, dan daun tanaman mangrove (*Rhizophora mucronate* Poir.).

3.4.1 Determinasi Tanaman

Pemeriksaan atau determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Prodi Farmasi S1 Universitas Bhamada Slawi. Tujuan determinasi untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang akan diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Klau & Hesturini, 2021).

3.4.2 Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar, batang, dan daun tanaman mangrove diperoleh dari Desa Kaliwlingi, Kecamatan Brebes, Kabupaten Brebes. Akar yang digunakan dalam penelitian ini yaitu akar berwarna coklat, batang yang muda, dan daun mangrove muda yang berada pada posisi 1-4 yang dihitung dari pucuk daun, dan semua sampel dibersihkan dengan cara pencucian sampel dengan air mengalir, kemudian akar, batang, dan daun tanaman mangrove dipotong dan dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutup kain hitam hingga mengering. Kemudian dihaluskan menggunakan blender, setelah itu diayak menggunakan ayakan nomer mesh 30/40. Kemudian dilanjutkan dengan proses ekstraksi menggunakan metode sonikasi (Warsinah, *et al.*, 2007).

3.4.3 Ekstraksi Sampel dengan Metode Sonikasi

Timbang sebanyak 100 g serbuk simplisia akar, batang, dan daun tanaman mangrove yang telah kering, kemudian dimasukkan ke dalam beaker glas 250 mL, dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 450 mL dengan perbandingan serbuk simplisia dan pelarut yang digunakan adalah (1:3). Serbuk yang telah dilarutkan kemudian dimasukan kedalam sonikator dengan frekuensi 35 KHz, suhu 35°C selama 30 menit . Hasil ekstraksi disaring dan filtratnya dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40–50°C. Ekstrak kemudian diuapkan menggunakan *water bath* hingga didapatkan ekstrak kental (Sholihah *et al.*, 2017).

3.4.4 Skrining Fitokimia

Berikut ini beberapa skrining fitokimia yaitu uji fitokimia menggunakan metode reaksi warna dan uji penegasan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) : senyawa flavonoid, senyawa saponin, senyawa tannin, senyawa steroid dan senyawa alkaloid.

3.4.4.1 Senyawa Flavonoid

Ekstrak etanol akar, batang, dan daun tanaman mangrove masing-masing diambil 0,5 g dimasukan kedalam tabung reaksi, tambahkan aquadest 5 mL lalu kocok dan panaskan. Ditambahkan pada sampel berupa serbuk magnesium sebanyak 0,2 g dan 3 tetes HCl pekat. Sampel dikocok dan diamati perubahan yang terjadi. Hasil positif mengandung flavonoid jika

terbentuk warna merah, kuning atau jingga (Hasma & Winda, 2019).

Uji penegasan untuk senyawa flavonoid dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis dengan cara menotolkan masing-masing sampel pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄, kemudian dielusikan dengan fase gerak asam asetat glacial : butanol : air (1:4:5). Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning cokelat setelah diuapi ammonia dan berwarna biru pada UV 254 nm pada Rf 0,94 yang menegaskan adanya kandungan flavonoid (Yuda *et al.*, 2017).

3.4.4.2 Senyawa saponin

Disiapkan ekstrak etanol akar, batang, dan daun tanaman mangrove 0,5 g dimasukkan kedalam tabung reaksi. Masing-masing sampel ditambahkan 10 mL aquadest masukkan dalam tabung reaksi, panaskan kemudian dinginkan dan saring. Dikocok selama 10 detik kemudian terbentuk buih dan tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Hasil positif mengandung saponin jika terbentuk buih (Yuda *et al.*, 2017).

Uji penegasan untuk senyawa saponin dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjenuhkan fase gerak yang digunakan kloroform : metanol : aquades dengan rasio 14:6:1 kemudian ekstrak etanol akar, batang dan daun ditotolkan pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu

dideteksi dibawah sinar UV 254 nm, disemprot dengan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat selanjutnya dipanaskan selama 5 menit pada suhu 105°C akan nampak noda berwarna biru. Nilai Rf yang identik dengan senyawa saponin berada pada noda dengan nilai Rf 0,86 (Ngginak *et al.*, 2021).

3.4.4.3 Senyawa Tanin

Sebanyak 0,5 g dari masing-masing ekstrak etanol sampel ditambahkan 10 mL aquadest lalu didihkan selama 5 menit kemudian disaring dan ditambahkan 3 – 4 tetes FeCl₃ 1%. Jika larutan terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Hasma & Winda, 2019).

Uji penegasan untuk senyawa tanin dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjenuhkan fase gerak yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa tannin adalah methanol : air (6:4) kemudian ekstrak etanol akar, batang dan daun ditotolkan pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu dideteksi dibawah sinar UV 254 nm, disemprotkan dengan penampakan noda FeCl₃ 5 %. Hasil positif pada plat KLT terdapat noda berwarna biru kehitaman maka mengandung senyawa tannin. Nilai Rf yang identik dengan senyawa tannin pada noda nilai RF 0,92 (La et al., 2020).

3.4.4.4 Senyawa Steroid

Uji steroid dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 g masing-masing ekstrak etanol sampel ditimbang menambahkan masing-masing sampel dengan 2-3 mL kloroform lalu ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat dan 2-3 tetes H₂SO₄ pekat. Pembentukan warna biru sampai hijau menunjukkan hasil positif adanya steroid (Mahmiah & Sudjarwo, 2019).

Uji penegasan untuk senyawa steroid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjenuhkan fase gerak yang terdiri dari n-heksana : etil asetat (6:4), ekstrak etanol akar, batang dan daun ditotolkan pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu dideteksi dibawah sinar UV 254 nm, kemudian penyemprot dengan pereaksi Liebermann Burchard, selanjutnya dipanaskan selama 5 menit pada suhu 105°C. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru-violet atau merah-violet dan nilai R_f 0,77 (Fajriaty et al., 2018).

3.4.4.5 Senyawa Alkaloid

Sebanyak 0,5 g masing-masing ekstrak etanol sampel ditimbang, dimasukan kedalam tabung reaksi, dilarutkan dengan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, kemudian dibagi menjadi 3 bagian, hasil positif mengandung alkaloid jika ditambahkan pereaksi mayer akan membentuk endapan putih (putih kuning) dan jika ditambahkan pereaksi wagner akan menghasilkan endapan coklat

dan jika ditambahkan pereaksi dragondrof menghasilkan endapan merah jingga (Larumpaa et al., 2022).

Uji penegasan untuk senyawa alkaloid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan cara menjuhkan Fase gerak yang digunakan methanol : etil asetat : air (100 :13,5:10) ekstrak etanol akar, batang dan daun ditotolkan pada fase diam silica gel 60 F₂₅₄. Plat KLT dikeringkan lalu dideteksi dibawah sinar UV 254 nm, kemudian disemprotkan dengan penampak noda menggunakan pereaksi Dragendorff. Hasil positif adanya senyawa alkaloid ditunjukkan terbentuknya noda berwarna jingga pada UV 254 (La et al., 2020). Nilai Rf yang identik dengan senyawa alkaloid pada noda nilai Rf 0,94 (Wigati & Rahardian, 2018).

3.4.5 Penyiapan Larutan Pereaksi

3.4.5.1 Penyiapan Larutan Dapar Fosfat 0,2 M pH 6,6

Sebanyak 2 g NaOH dan dilarutkan dengan aquades bebas CO₂ hingga tepat 250 mL dalam labu takar. Kemudian sebanyak 6,8 g KH₂PO₄ yang dilarutkan dengan aquades bebas CO₂ sebanyak 250 mL dalam labu takar. Kemudian dipipet sebanyak 17 mL NaOH dimasukkan dalam labu takar dan dicampurkan 50 mL KH₂PO₄, selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan aquades bebas CO₂ hingga 200 mL (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023).

3.4.5.2 Penyiapan Larutan Kalium Ferrisianida ($K_3Fe(CN)_6$) 1%

Sebanyak 1 g kalium ferrisianida dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023).

3.4.5.3 Penyiapan Larutan Klorida ($FeCl_3$) 0,1%

Sebanyak 0,1 g $FeCl_3$ dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023).

3.4.5.4 Penyiapan Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10%

Sebanyak 10 g TCA dalam aquades dan diencerkan dalam labu takar 100 mL (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023).

3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP

3.4.6.1 Penyiapan Larutan Kurva Baku

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan sebanyak 50 mg asam askorbat dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga batas labu takar 50 mL (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023).

3.4.6.2 Pembuatan Larutan Seri Kadar Asam Askorbat

Larutan stok 1000 ppm dipipet masing-masing 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 dan 1 mL. Dimasukkan dalam labu tentukur 10 mL hingga diperoleh konsentrasi 60, 70, 80, 90 dan 100 ppm ditambahkan 1 mL dapar fosfat pH 6,6 dan 1 mL larutan $K_3Fe(CN)_6$ 1 %, selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 mL TCA 10 %, larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit,

setelah proses sentrifugasi diambil 1 mL lapisan bagian atas kedalam labu tentukur 5 mL, ditambahkan 1 mL aquadest bebas CO₂ dan 0,4 mL FeCl₃ dan dicukupkan etanol p.a hingga tanda batas kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 689 nm (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023)

3.4.6.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan standar asam askorbat 80 ppm yang dilarutkan dengan etanol p.a hingga 10 mL, diambil 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL dapar fosfat pH 6,6 dan 1 mL larutan K₃Fe(CN)₆ 1 %, selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50⁰C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 mL TCA 10 %, larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, setelah proses sentrifugasi diambil 1 mL lapisan bagian atas kedalam labu tentukur 5 mL, ditambahkan 1 mL aquadest bebas CO₂ dan 0,4 mL FeCl₃ dan dicukupkan etanol p.a hingga tanda batas. Pengujian panjang gelombang diukur nilai absorbansinya pada setiap panjang gelombang dalam kisaran 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023).

3.4.6.4 Penentuan *operating time* (OT)

Larutan standar asam askorbat 80 ppm yang dilarutkan dengan etanol p.a hingga 10 mL, diambil 1 mL kemudian larutan dicampurkan dengan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6)

dan 1 mL dapar kalium ferrisianida 1% dalam labu ukur 10 mL tambahkan hingga tanda batas, kemudian serapan diukur pada menit ke 0 sampai ke 30 menit (Rahayu *et al.*, 2021).

3.4.6.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP

Sebanyak 5 mg masing-masing sampel ekstrak etanol dilarutkan dalam 5 mL etanol 96%, lalu dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 mL $K_3Fe(CN)_6$ 1% setelah itu, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA lalu disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge dipipet 1 mL lapisan bagian atas ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL $FeCl_3$ 0,1%. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada waktu *operating time* yang diperoleh dan Panjang gelombang maksimum. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/ gr sampel (Ilyas, Dwijayanti & Barium., 2023).

Setelah didapat nilai absorbansi maksimum, sampel kemudian dihitung total antioksidan dengan cara dimasukan dalam regresi kurva standar dengan persamaan linier:

$$Y = bx + a$$

Penentuan aktivitas antioksidan:

$$\text{Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{konsentrasi sampel} \times \text{volume sampel}}{\text{Bobot sampel}} \times Fp$$

Keterangan:

C = Konsetrasi Sampel atau nilai x (mg AAE/L)

V = Volume Ekstrak yang digunakan (L)

Fp = Faktor pengenceran

G = Bobot Sampel yang digunakan (gram)

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan pada Panjang gelombang maksimum pada spektrofotometer UV-Vis sehingga didapatkan nilai berupa absorbansi. Setelah didapatkan nilai absorbansi maksimum, sampel kemudian dihitung total antioksidan dengan cara dimasukkan dalam regresi kurva standar dengan persamaan linier.

Data yang terkumpul selanjutnya dilakukan analisis menggunakan program *IBM SPSS Statistics 25 Version* dengan uji *One Way ANOVA* yang berfungsi untuk melihat signifikansi perbedaan kekuatan antioksidan dari ketiga sampel akar, batang dan daun tanaman mangrove.