

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR DAUN *Bruguiera gymnorrhiza* DENGAN PELARUT DAN LAMA EKSTRAKSI YANG BERBEDA MENGGUNAKAN METODE SONIKASI

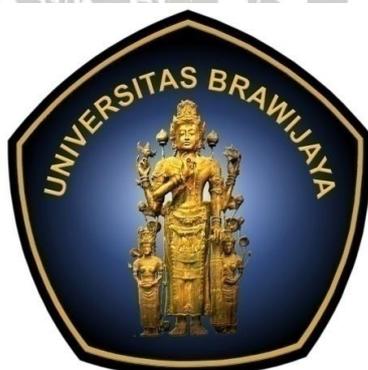
SKRIPSI

Oleh :

YONO ANDRIANTO

NIM. 135080300111081

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2017

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR DAUN *Bruguiera gymnorrhiza* DENGAN PELARUT DAN LAMA EKSTRAKSI YANG BERBEDA MENGGUNAKAN METODE SONIKASI

Oleh:

YONO ANDRIANTO
NIM. 135080300111081

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 22 November 2017
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Pembimbing 1

(Dr. Ir. Titik Dwi Sulistyati, MP)
NIP. 19581231 198601 2 002
Tanggal: 11 DEC 2017

Menyetujui,
Dosen Pembimbing 2

(Dr. Ir. Bambang Budi S., MS)
NIP. 19570119 198601 1 001
Tanggal: 11 DEC 2017



Mengetahui,
Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan

Dr. Ir. Arning Wilujeng E., MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal: 11 DEC 2017

Judul : **UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR DAUN *Bruguiera gymnorhiza* DENGAN PELARUT DAN LAMA EKSTRAKSI YANG BERBEDA MENGGUNAKAN METODE SONIKASI**

Nama Mahasiswa : Yono Andrianto

NM : 135080300111023

Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

PENGUJI PEMBIMBING

Dosen Pembimbing 1 : Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP

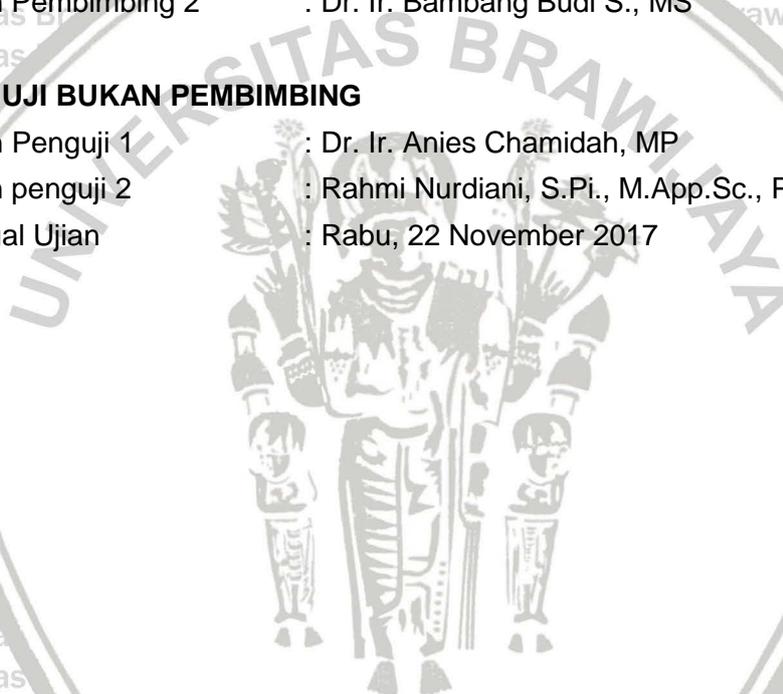
Dosen Pembimbing 2 : Dr. Ir. Bambang Budi S., MS

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Anies Chamidah, MP

Dosen penguji 2 : Rahmi Nurdiani, S.Pi., M.App.Sc., Ph.D

Tanggal Ujian : Rabu, 22 November 2017



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar merupakan hasil karya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, November 2017

Mahasiswa

Yono Andrianto
NIM. 135080300111081



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Yono Andrianto
 NIM : 135080300111081
 Tempat / Tgl Lahir : Pasuruan / 5 Agustus 1995
 No. Tes Masuk P.T. : 1135509556
 Jurusan : Manajemen Sumberdaya Perairan / Pemanfaatan Sumberdaya Perikanan dan Kelautan / Sosial Ekonomi Perikanan dan Kelautan *)
 Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan
 Status Mahasiswa : Biasa / Pindahan / Tugas Belajar / Ijin Belajar
 Jenis Kelamin : Laki-laki / Perempuan *)
 Agama : Islam
 Status Perkawinan : (Sudah Kawin / Belum Kawin *)
 Alamat : Jl. Joko Sambang No.9A RT.01/RW.06 Dusun Gununggangsir, Desa Gunung Gangsir, Kecamatan Beji, Kabupaten Pasuruan Jawa Timur

RIWAYAT PENDIDIKAN

No	Jenis Pendidikan	Tahun		Keterangan
		Masuk	Lulus	
1	S.D	2001	2007	SD Negeri Gunung Gangsir 1
2	S.L.T.P	2007	2010	SMP Negeri 1 Beji
3	S.L.T.A	2010	2013	SMA Negeri 8 Malang
4	Perguruan Tinggi (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan)	2013	2017	Universitas Brawijaya

Demikian riwayat hidup ini saya buat dengan sebenarnya dan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan saya sanggup menanggung segala akibatnya.

Malang, 13 November 2017

Hormat kami

Yono Andrianto

*) Coret yang tidak perlu NIM: 135080300111081

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Tidak lupa pula penulis mengirimkan salam dan shalawat kepada Nabi Besar Muhammad SAW sebagai suri tauladan umat muslim.

Penulis menyadari dalam penyusunan laporan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu dengan rendah hati dan penuh keikhlasan, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang hingga detik ini masih memberikan nikmat kesehatan dan segala nikmat-nikmat lain yang tak ternilai harganya dan Nabi Muhammad SAW yang menjadi panutan nyata bagi umat dalam menjalani kehidupan akhir zaman ini.
2. Kedua orang tua tercinta, kakak dan keluarga besar yang telah membantu dan memberikan doa kepada penulis hingga dapat menyelesaikan laporan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.
4. Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiati, MP. dan Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS. selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan dengan penuh kesabaran hingga terselsaikannya laporan skripsi ini.
5. Dosen penguji Dr. Ir. Anies Chamidah, MP dan Rahmi Nurdiani, S.Pi.,M.App.Sc., Ph.D yang telah memberikan saran dan kritik dalam penyempurnaan laporan skripsi.
6. Keluarga besar Clungup Mangrove Conservartion (CMC) Sendang Biru

yang telah banyak membantu pengambilan sampel.

7. Matera Medika Kota Batu yang sudah membantu selama penelitian.
8. Keluarga besar Laboratorium Anorganik angkatan 2013 Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang yang sudah membantu dan memberikan arahan selama penelitian.
9. Keluarga besar Merjosari Malang yang sudah banyak membantu dan memberikan semangat selama penelitian dan pengerjaan laporan skripsi.
10. Teman-teman satu kelompok skripsi yang sudah membantu dan memberi semangat untuk penyelesaian penelitian dan pengerjaan laporan skripsi ini.
11. Teman-teman satu bimbingan skripsi, tanpa kalian skripsi ini tidak akan selesai dengan baik.
12. Keluarga besar T01 atas dukungan dan semangatnya sehingga dapat menyelesaikan skripsi.
13. Teman-teman Tidar Permai yang sudah banyak membantu dan memberi semangat selama penelitian dan pengerjaan laporan skripsi.
14. Teman-teman satu angkatan lainnya yang sudah bekerja sama dan memberikan dukungan dalam menyelesaikan laporan skripsi ini.

Malang

Penulis

ABSTRAK

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas. Daun *Bruguiera gymnorhiza* diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Metode sonikasi merupakan metode ekstraksi yang dapat mengekstrak senyawa metabolit sekunder menggunakan pelarut dalam waktu yang cepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan aktivitas antioksidan daun *Bruguiera gymnorhiza* dengan pelarut dan lama waktu ekstraksi yang berbeda menggunakan metode sonikasi. Pada penelitian ini didapatkan hasil nilai rendemen tertinggi pada lama ekstraksi 35 menit dengan pelarut n-heksan, etil asetat, etanol yaitu $5,575 \pm 0,132\%$; $6,260 \pm 0,237\%$; $13,668 \pm 0,181\%$, sedangkan terendah pada lama ekstraksi 15 menit dengan pelarut n-heksan, etil asetat, etanol yaitu $1,057 \pm 0,155\%$; $3,090 \pm 0,095\%$; $8,890 \pm 0,281\%$. Nilai Kadar air tertinggi pada ekstrak etanol 25 menit sebesar $17,530,26\%$ dan terendah pada ekstrak n-heksan 25 menit sebesar $5,63 \pm 0,19\%$. Pada uji fitokimia didapatkan pada lama ekstraksi 25 menit dengan ekstrak n-heksan terdeteksi flavonoid, tanin dan steroid, sedangkan ekstrak etil asetat terdeteksi flavonoid, tanin dan steroid, serta ekstrak etanol teridentifikasi alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid, steroid dan saponin. Pada uji total fenol ekstrak 25 menit tertinggi pada ekstrak etanol sebesar $467,310 \pm 5,171$ mg GAE/100 g, sedangkan terendah pada ekstrak n-heksan sebesar $35,769 \pm 1,606$ mg GAE/100 g. Nilai IC_{50} pada uji aktivitas antioksidan ekstrak 25 menit tertinggi pada ekstrak n-heksan sebesar $295,489 \pm 2,620$ ppm, sedangkan terendah pada ekstrak etanol sebesar $48,964 \pm 1,614$ ppm. Hasil Identifikasi senyawa yang diduga memiliki aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol 25 menit diantaranya *procyanidin*, *scoparin*, *rutin*, *quarcetin* dan *rhamnetin*.

Kata kunci: antioksidan, daun *Bruguiera gymnorhiza*, metode sonikasi



ABSTRACT

Antioxidants are a compounds that can neutralize free radcals. Bruguiera gymnorrhiza leaf are known containing secondary metabolite compounds that have high antioxidant activity. Sonication method is an extraction method that can extract the compound of secondary metabolites using a solvent in a short time. This research aimed to determine the content of actioxidant activity of Bruguiera gymnorrhiza leaf with different solvent and extraction time using sonication method. The result obtained the highest yield in the extract of 35 minutes with n-hexane, ethyl acetate, ethanol solvents was $5,575\pm 0,132\%$; $6,260\pm 0,237\%$; $13,668\pm 0,181\%$, while the lowest in extract of 15 minutes with n-hexane, ethyl acetate, ethanol solvent was $1,057\pm 0,155\%$; $3,090\pm 0,095\%$; $8,890\pm 0,281\%$. The highest water content on ethanol extracted was 25 minutes is $17,530,26\%$ amd the lowest on n-hexane extract in 25 minutes extracted was $5,63\pm 0,19\%$. On phytochemicals test were obtained in 25 minutes extracted, extract of n-hexane detected flavonoid, tannins, and steroid, while ethyl acetate extract detected flavonoid, tannins, and steroid, and ethanol extract detected alkaloid, flavonoid, tannins, triterpenoid, steroid dan saponin. On total phenol test in 25 minutes extracted, the highest ethanol extract was $467,310\pm 5,171$ mg GAE/100 g, while the lowest on n-hexane extract was $35,769\pm 1,606$ mg GAE/100 g. On antioxidant activity, The highest IC_{50} value on n-hexane extract was $295,489\pm 2,620$ ppm, while the lowest on ethanol extract was $48,964\pm 1,614$ ppm. The result of compounds identification were suspected having antioxidant activity on ethanol extracts ini 25 minutes such as procyanidin, scoparin, rutin, quarcetin dan rhamnetin.

Key word: *antioocsidant, Bruguiera gymnorrhiza leaf, sonication method*

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa. Atas berkat dan anugrah-Nya penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan Pelarut dan Lama Ekstraksi Yang Berbeda Menggunakan Metode Sonikasi” sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sebagai masukan dan bahan pertimbangan untuk perbaikan pada penulisan selanjutnya. Akhir kata semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat yang sebesar besarnya bagi penulis khususnya dan bagi pihak-pihak yang berkepentingan pada umumnya.

Malang, November 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan	4
1.4. Hipotesis	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
1.6. Waktu dan Tempat	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Klasifikasi dan Morfologi <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	6
2.2. Senyawa Bioaktif <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	7
2.2.1. Alkaloid	7
2.2.2. Flavonoid	8
2.2.3. Tanin	9
2.2.4. Triterpenoid dan Steroid	10
2.2.5. Saponin	11
2.3. Ekstraksi	12
2.3.1. Ekstraksi Maserasi	13
2.3.2. Ekstraksi Perkolasi	14
2.3.3. Ekstraksi Soxhlet	14
2.3.4. Ekstraksi Reflux Dan Destilasi Uap	15
2.3.5. Ekstraksi Sonikasi	15
2.4. Pelarut	16
2.4.1 N-heksan	16
2.4.2 Etil Asetat	17
2.4.3 Etanol	18
2.5. Uji Fitokimia	18
2.6. Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	19
2.7. Uji Total Fenol	19
2.8. Uji Aktivitas Antioksidan	20
2.9. Uji LC-MS (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)	21
3. METODE PENELITIAN	23
3.1. Materi Penelitian	23
3.1.1. Bahan Penelitian	23
3.1.2. Alat Penelitian	23
3.2. Metode Penelitian	24
3.2.1. Variabel Penelitian	25
3.2.2. Parameter Uji	25



3.3. Penelitian Pendahuluan	26
3.3.1. Prosedur Penelitian Pendahuluan	28
– Preparasi Bahan Baku	28
– Ekstraksi Sampel	29
– Perhitungan Rendemen	30
– Uji Kadar Air	30
– Uji Fitokimia	31
• Uji Alkaloid	31
• Uji Flavonoid	31
• Uji Tanin	31
• Uji Steroid dan Triterpenoid	32
• Uji Saponin	32
– Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	32
• Penyiapan Larva <i>Artemia salina</i> Lanch	32
• Penentuan Konsentrasi Larutan Ekstrak Dan Uji Toksitasitas <i>Artemia salina</i> lanch	33
3.4. Penelitian Utama	33
3.4.1. Prosedur Penelitian Utama	33
– Pengujian Total Fenol	34
• Pembuatan Kurva Standard Asam Galat	34
• Penentuan Total Senyawa Fenolat Dengan Metode Folinciocalteu	35
– Uji Aktivitas Antioksidan	43
• Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat.....	36
• Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	37
– Identifikasi Senyawa Bioaktif Menggunakan LC-MS (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry</i>)	38
4. PEMBAHASAN	39
4.1. Penelitian Pendahuluan.....	39
4.1.1 Rendemen Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	39
4.1.2 Kadar Air Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	42
4.1.3 Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	45
4.1.4 Uji Toksitasitas Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	53
4.5. Penelitian Utama	56
4.2.1 Uji Total Fenol Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> ...	56
4.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	58
4.2.3 Hubungan Total Fenol dengan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	61
4.2.4 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LCMS)	64
5. KESIMPULAN DAN SARAN	69
5.1 Kesimpulan	69
5.2 Saran	69



DAFTAR PUSTAKA



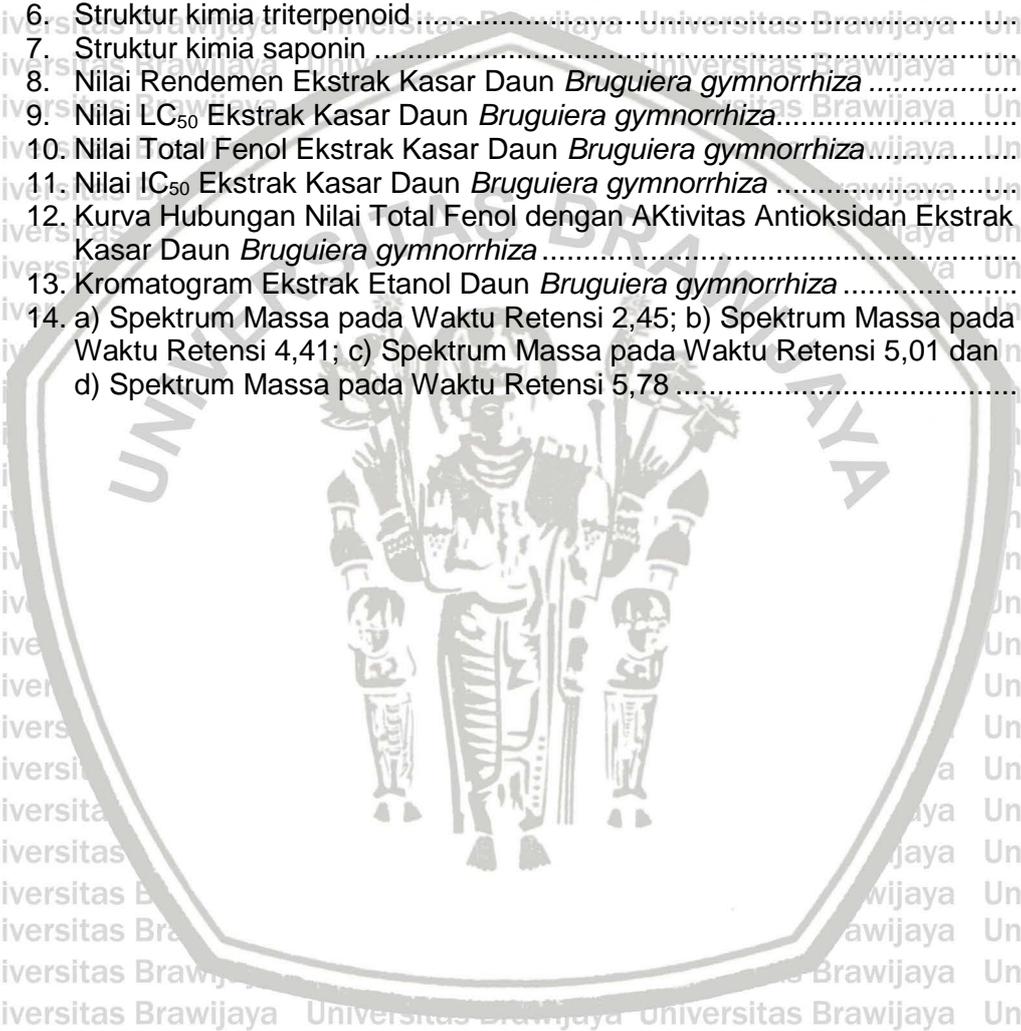
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan	27
2. Rancangan Percobaan Penelitian Utama	34
3. Nilai Kadar Air Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	43
4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	45
5. Dugaan Senyawa yang Bersifat Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	67



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	6
2. Struktur kimia alkaloid.....	8
3. Struktur kimia flavonoid.....	9
4. Struktur kimia tanin.....	10
5. Struktur kimia steroid.....	10
6. Struktur kimia triterpenoid.....	11
7. Struktur kimia saponin.....	12
8. Nilai Rendemen Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	40
9. Nilai LC ₅₀ Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	53
10. Nilai Total Fenol Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	57
11. Nilai IC ₅₀ Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	59
12. Kurva Hubungan Nilai Total Fenol dengan AKtivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	62
13. Kromatogram Ekstrak Etanol Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	65
14. a) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 2,45; b) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 4,41; c) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 5,01 dan d) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 5,78.....	66



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Preparasi Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	79
2. Skema Kerja Ekstraksi Sonikasi Sampel Tepung Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	80
3. Skema Uji Alkaloid Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	81
4. Skema Uji Flavonoid Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	82
5. Skema Uji Tanin Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	83
6. Skema Uji Steroid dan Triterpenoid Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	84
7. Skema Uji Saponin Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	85
8. Skema kerja penetasan telur <i>Artemia salina</i> Leach.	86
9. Skema penentuan larutan ekstrak dan uji toksisitas ekstrak kasar daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	87
10. Skema Kerja Pembuatan Kurva Standar Asam Galat	88
11. Skema Kerja Penentuan Total Senyawa Fenol pada Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	89
12. Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat	90
13. Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera Gymnorrhiza</i>	91
14. Skema Kerja Identifikasi Senyawa Bioaktif Menggunakan LC-MS	92
15. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Toksisitas	93
16. Perhitungan Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM, Konsentrasi Uji Aktivitas Antio-ksidan Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> dan Kons-entras <i>i</i> Larutan Asam Askorbat.....	96
17. Rancangan Penelitian, Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (<i>Analysis of Varience</i>) Rendemen Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	99
18. Data Perhitungan Kadar Air Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	103
19. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (<i>Analysis of Varience</i>) Uji Toksisit- <i>as</i> Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	106
20. Hasil Uji Larutan Standard Asam Galat dan Kurva Kalibrasi Standard A- <i>sam</i> Galat	112
21. Data Hasil Perhitungan Uji Total Fenol dan ANOVA (<i>Analysis of Varien-<i>ce</i></i>) Ekstr-ak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	113
22. Data Hasil Perhitungan Dan ANOVA (<i>Analysis of Varience</i>) Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	116
23. Hasil Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak Etanol Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	131
24. Dokumentasi Penelitian	133



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Timbulnya berbagai penyakit pada manusia semakin beraneka ragam yang disebabkan karena lingkungan, konsumsi makanan dan gaya hidup yang cenderung kurang sehat. Penyakit degeneratif menjadi salah satu penyakit yang dapat menyebabkan kemerosotan fungsi tubuh, katarak dan penuaan dini. Penyebab utamanya dapat disebabkan adanya radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas adalah senyawa yang memiliki atom atau molekul yang satu elektronnya tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan bersifat reaktif (Jacob, *et al.* 2013). Akan tetapi, radikal bebas ini dapat dikurangi dengan cara mengkonsumsi makanan yang mengandung antioksidan (Purwaningsih, *et al.* 2013).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat atau mencegah terjadinya oksidasi pada substrat yang mudah teroksidasi dengan cara mendonorkan satu atom protonnya sehingga membuat radikal bebas menjadi stabil dan tidak reaktif (Huliselan, *et al.* 2015). Ditambahkan oleh Putri, *et al.* (2013), ada beberapa jenis antioksidan yang diijinkan dalam makanan baik dari jenis antioksidan sintetis maupun alami. Akan tetapi, antioksidan sintetis yang diproduksi melalui reaksi kimia dianggap kurang aman dan dapat meningkatkan terjadinya karsinogenik, sehingga penggunaan antioksidan alami dipandang lebih aman sehingga mengalami peningkatan karena diperoleh dari bahan alami salah satunya dari tumbuhan. Mangrove merupakan tumbuhan yang diketahui mengandung senyawa antioksidan pada akar, kulit batang, buah dan daun.

Daun merupakan bagian organ tanaman dalam jumlah yang paling banyak pada tumbuhan. Tetapi daun kurang dimanfaatkan karena dianggap tidak memiliki nilai guna, sehingga terkadang terbuang begitu saja. Menurut Dia, *et al.* (2015),

ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut berbeda mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya flavonoid, tanin, fenol, saponin, steroid dan triterpenoid serta memiliki kandungan antioksidan yang cukup tinggi yaitu pada ekstrak etil asetat didapatkan IC_{50} sebesar 30,39 ppm dan ekstrak etanol yaitu sebesar 34,27 ppm.

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu bahan bisa didapatkan melalui proses ekstraksi. Terdapat berbagai macam metode ekstraksi diantaranya metode maserasi, perkolasi, reperiokolasi, evakolasi, dialokasi, sokletasi, arus balik, dan sonikasi (Khanifah, *et al.* 2015). Metode ekstraksi sonikasi diketahui dapat meningkatkan rendemen ekstrak yang dihasilkan dengan waktu yang lebih cepat sehingga lebih efisien. Hal ini dikarenakan pada metode sonikasi terjadi kavitasi saat diberi perlakuan gelombang ultrasonik untuk memecah dinding sel bahan (Sani, *et al.* 2014). Selain itu, ditambahkan oleh Utami, *et al.* (2009), aktivitas antioksidan ekstrak daun simpur dengan menggunakan metode sonikasi memberikan hasil yang lebih tinggi yaitu mencapai 95,54%, apabila dibandingkan dengan metode ekstraksi gelombang mikro (MAE) dan tekanan tinggi secara berturut-turut sebesar 92,55% dan 94,85%.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan satu tahap ekstraksi maupun bertingkat.

Pada ekstraksi satu tahap hanya digunakan adalah satu pelarut untuk ekstraksi, sedangkan pada ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut (Septiana dan Asnani, 2012). Ditambahkan oleh Mukhriani (2014), pelarut yang digunakan dalam ekstraksi berdasarkan tingkat kepolarannya karena suatu senyawa akan larut dengan pelarut yang sama tingkat polaritasnya. Pelarut yang dapat digunakan dalam ekstraksi, diantaranya golongan pelarut polar yaitu air, etanol dan metanol, sedangkan pelarut semipolar diantaranya etil asetat dan diklorometan serta pelarut nonpolar yaitu n-heksan, petroleum eter dan kloroform.

Waktu ekstraksi yang berbeda dapat mempengaruhi hasil senyawa yang terekstrak. Semakin lamanya waktu ekstraksi maka terjadinya kontak antara pelarut dengan bahan akan semakin maksimal. Menurut Wahyuni dan Widjanarko (2015), waktu yang digunakan pada metode ekstraksi sonikasi yaitu 5 menit, 15 menit dan 25 menit didapatkan pada waktu ekstraksi 25 menit memberikan hasil rendemen tertinggi sebesar 14,65%. hal ini dikarenakan lama waktu ekstraksi 25 menit memberikan waktu yang cukup banyak bagi pelarut untuk menembus dinding sel dan menarik keluar senyawa-senyawa yang terkandung dalam bahan terutama senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Semakin lama waktu ekstraksi maka semakin banyak pula senyawa antioksidan yang terekstrak sehingga aktivitas antioksidan IC_{50} yang dihasilkan semakin menurun.

Tinggi rendahnya antioksidan suatu bahan berbeda-beda, sehingga untuk mengetahui aktivitas antioksidannya diperlukan pengujian. Salah satunya dengan menggunakan metode radikal bebas *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH). Metode DPPH merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasar jenis radikal yang dihambat (Putranti, 2013).

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan penjabaran latar belakang diatas, dapat dirumuskan pernyataan:

1. Bagaimana pengaruh jenis pelarut yang berbeda dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza*?
2. Bagaimana pengaruh lama waktu ekstraksi yang berbeda dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza*?

3. Bagaimana interaksi jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi yang berbeda dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun

Bruguiera gymnorhiza?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Menentukan jenis pelarut yang tepat dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza*.
2. Menentukan lama waktu ekstraksi yang tepat dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza*.
3. Memperoleh interaksi jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terdapat pengaruh jenis pelarut dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza*.
2. Terdapat pengaruh lama waktu ekstraksi dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza* dengan.
3. Terdapat interaksi kombinasi jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi dengan metode sonikasi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga dan instansi lain terkait penggunaan perlakuan jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi yang berbeda dengan metode sonikasi terhadap

aktivitas antioksidan daun *Bruguiera gymnorrhiza* sebagai salah satu jenis tanaman mangrove.

1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai bulan Agustus di Laboratorium Perakayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Keamanan Hasil Pangan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Riset Anorganik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Matera Medika Kota Batu Malang, dan Pusat Laboratorium Forensik Jakarta.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Bruguiera gymnorrhiza*

Tumbuhan tanjang (*B. gymnorrhiza*) di beberapa daerah dikenal dengan nama: bakau daun besar, bakau oranye, kandeka, lindur, pertut, putut, sala-sala, tenggel, tumu dan tanjang. Tumbuhan memiliki ciri morfologi dengan ketinggian mencapai 30 m. Kulit kayu memiliki lentisel, permukaannya halus hingga kasar, berwarna abu-abu tua sampai coklat (warna selalu tidak tetap). Akarnya seperti papan melebar ke samping dibagian pangkal pohon, juga memiliki sejumlah akar lutut. Kayunya yang berwarna merah digunakan sebagai kayu bakar dan pembuatan arang. Daun berbentuk elips-lanset, berwarna hijau dengan ujung meruncing dan panjang 40 cm. Bunga menggantung dengan panjang tangkai bunga antara 9-25 mm, terletak di ketiak daun. Mempunyai daun mahkota warna putih berjumlah 10-14 helai (Liem, *et al.* 2013). *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Bruguiera gymnorrhiza* (Dokumentasi Pribadi, 2017)

Klasifikasi mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* menurut Allen dan Duke (2006) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
 Divisi : *Magnoliophyta*
 Kelas : *Magnoliopsida*
 Ordo : *Myrtales*
 Family : *Rhizophoraceae*
 Genus : *Bruguiera*
 Spesies : *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lamk.

2.2 Senyawa Bioaktif *Bruguiera gymnorrhiza*

Bruguiera gymnorrhiza merupakan salah satu tumbuhan mangrove dari family *Rhizophoraceae* yang dapat digunakan sebagai sumber bahan obat.

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* diantaranya fenol, terpenoid, steroid dan saponin. Senyawa bioaktif tersebut diduga memiliki aktivitas sebagai antikanker (Rastuti, *et al.* 2012).

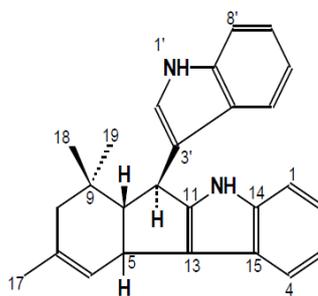
Fitokimia pada dasarnya dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bagian primer dan bagian sekunder yang fungsinya tergantung pada metabolisme tanaman tersebut. Bagian primer terdiri atas gula, asam amino, protein dan klorofil. Sedangkan bagian sekunder terdiri atas alkaloid, terpenoid, saponin, komponen fenol, flavonoid, tanin, dan lain-lain (Jacoeb, *et al.* 2013). Berdasarkan penelitian Utari (2016), daun, kulit batang dan buah *Bruguiera gymnorrhiza* mengandung komponen bioaktif flavonoid, tannin, fenol, saponin, steroid dan triterpenoid. Ditambahkan oleh Sudirman, *et al.* (2014), senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan pada *Bruguiera gymnorrhiza* yaitu flavonoid, fenol dan tanin.

2.2.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan salah satu golongan senyawa organik yang paling banyak ditemukan dalam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari berbagai jenis tumbuh-tumbuhan. Senyawa alkaloid diketahui mengandung atom nitrogen yang memiliki sifat basa dan merupakan bagian dari cincin yang berbentuk heterosiklik. Senyawa ini mempunyai satu atau lebih atom nitrogen yang bentuknya dalam gabungan dan sebagian dari sistem siklik. Alkaloid mempunyai fungsi fisiologi yang menonjol. Senyawa ini sering digunakan secara luas terutama dalam bidang pengobatan, salah satunya yaitu sebagai zat antioksidan (Tengo, *et al.* 2014).

Alkaloid banyak ditemukan pada berbagai jenis tumbuhan, baik di bagian daun, biji, ranting dan kulit kayu. Senyawa alkaloid memiliki keaktifan biologis tertentu, diantaranya memberikan efek memacu kerja sistem saraf, dapat menaikkan tekanan darah, sebagai antimikroba, dapat menjadi obat penenang dan penyakit jantung, serta dapat mengurangi rasa sakit. Pada tumbuhan, alkaloid berfungsi sebagai penguat, melindungi tumbuhan dari serangga dan hama, serta berfungsi untuk mengatur kerja hormon pada tumbuhan (Djoronga, *et al.* 2014).

Struktur kimia alkaloid dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur kimia alkaloid (Hargono, 2003)

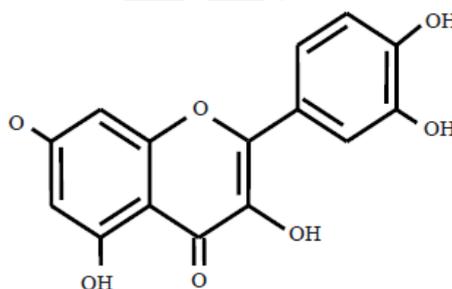
2.2.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan derivat dari senyawa fenol. Secara umum, flavonoid terdiri atas 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Menurut fungsi fisiologisnya flavonoid dikelompokkan menjadi tiga, yaitu antosianin (flavonoid yang berperan sebagai pigmen warna), flavonol dan flavon (perlindungan terhadap radiasi UV berlebih dan sebagai sinyal biologis), dan isoflavon (flavonoid biner yang banyak berperan sebagai senyawa pertahanan) (Pambudi, *et al.* 2014).

Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman, termasuk pada buah, tepung sari dan akar dalam bentuk glikosida. Flavonoid diklasifikasikan menjadi flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, isoflavon, calkon, dihidrokalkon, auron,

antosianidin, katekin dan flavan-3,4-diol. Tanin, polifenol, dan flavonoid merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan karena ketiga senyawa tersebut adalah senyawa-senyawa fenol, yaitu senyawa dengan gugus -OH yang terikat pada cincin aromatik. Selain itu, senyawa ini berfungsi dalam mengatur pertumbuhan, fotosintesis, antimikroba dan antivirus pada tanaman (Utari, 2016).

Struktur kimia flavonoid dapat dilihat pada Gambar 3.



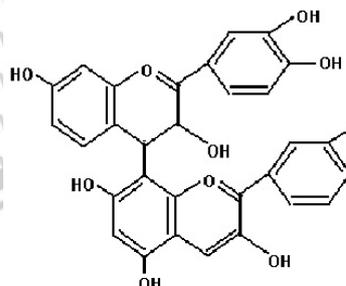
Gambar 3. Struktur kimia flavonoid (Redha, 2010)

2.2.3 Tanin

Tanin adalah senyawa metabolit sekunder dengan komponen yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut. Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Senyawa ini merupakan senyawa metabolit sekunder aktif yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, anti diare, anti bakteri dan antioksidan. Kandungan Tanin pada biji alpukat memiliki aktivitas biologis sebagai antioksidan (Malangngi, *et al.* 2012).

Tanin merupakan komponen zat organik turunan polimer glikosida yang terdapat dalam bermacam-macam tumbuhan, terutama tumbuhan berkeping dua atau dikotil. Ekstrak tanin terdiri dari campuran senyawa polifenol yang sangat kompleks dan biasanya bergabung dengan karbohidrat rendah. Senyawa ini memiliki kemampuan menangkap radikal bebas sehingga dapat dikatakan sebagai

antioksidan. Selain itu, tanin juga sangat efektif sebagai pendonor elektron dan atom hidrogen serta pengkelat logam, sebab senyawa ini memiliki gugus hidroksil dan ikatan rangkap terkonjugasi yang memungkinkan terjadinya delokalisasi elektron (Utari, 2016). Struktur kimia tanin dapat dilihat pada Gambar 4.



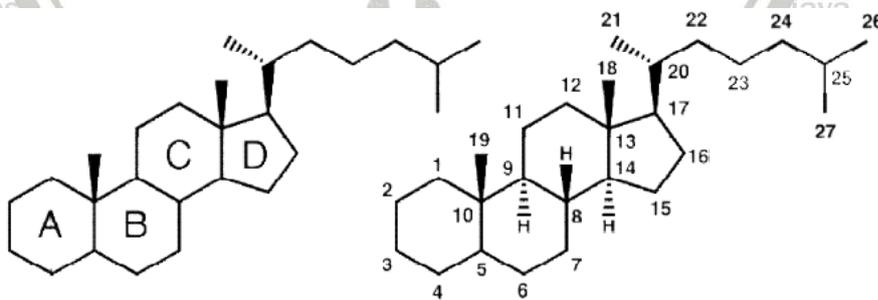
Gambar 4. Struktur kimia tanin (Nurchayanti, 2014)

2.2.4 Steroid dan Triterpenoid

Steroid merupakan turunan dari golongan senyawa triterpenoid. Steroid alami berasal dari berbagai transformasi kimia dari triterpena yaitu lanosterol dan saikoartenol. Senyawa ini dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan obat.

Golongan triterpenoid/steroid ditemukan hampir pada semua jenis tanaman mangrove. Manfaat dari senyawa steroid diantaranya antiradang, antiinflamasi, antikarsinogenik dan pengontrol diabetes dalam uji klinis (Nurchayanti, 2014).

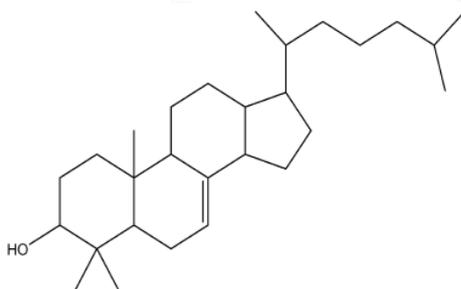
Struktur kimia steroid dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur kimia steroid (Nurchayanti, 2014)

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C-30 asiklik,

yaitu squalene, senyawa ini tidak berwarna, berbentuk kristal, bertitik leleh tinggi, dan bersifat optis aktif. Senyawa triterpenoid yang dapat dijumpai pada tumbuhan berfungsi sebagai pelindung untuk menolak serangga dan serangan mikroba (Utari, 2016). Senyawa ini merupakan turunan dari senyawa terpenoid yang memiliki aktivitas antimikroba. Selain itu turunan dari terpenoid lainnya yang memiliki kesamaan fungsi sebagai antimikroba yaitu monoterpenoid, diterpenoid, saponin dan triterpenoid glikosida (Oktaviani, *et al.* 2015). Struktur kimia triterpenoid dapat dilihat pada Gambar 6.



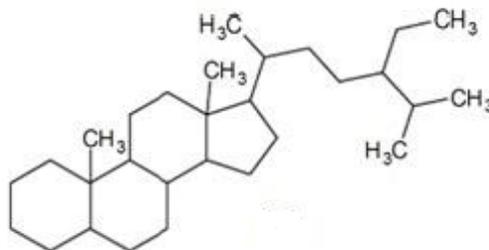
Gambar 6. Struktur kimia triterpenoid (Santoni, *et al.* 2010)

2.2.5 Saponin

Saponin termasuk kedalam golongan glikosida yang umumnya banyak ditemukan pada tumbuhan, memiliki karakteristik berupa buih, mudah larut dalam pelarut polar dan tidak larut dalam pelarut non polar. Senyawa saponin bersifat antioksidan dan *radical scavenger* dengan membentuk hidrogen peroksida sebagai senyawa antara dan dapat menyumbangkan hidrogen pada senyawa radikal DPPH sehingga mengakhiri reaksi rantai radikal (Dia, *et al.* 2016).

Saponin diklasifikasikan menjadi 2 kelompok yaitu: saponin steroid dan saponin triterpenoid. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C-27) dengan molekul karbohidrat, dapat dihidrolisis menghasilkan saraponin yang digunakan sebagai anti jamur dan dapat berkonjugasi dengan asam glukoronida. Senyawa ini dapat digunakan sebagai bahan baku pada proses biosintesis obat

kortikosteroid. Contoh senyawa saponin steroid diantaranya adalah *asparagosides* (*Asparagus officinalis*), *avenocosides* (*Avena sativa*), *disogenin* (*Dioscorea floribunda* dan *Trigonella foenumgraceum*), Sedangkan saponin triterpenoid tersusun atas inti triterpenoid dengan molekul karbohidrat. Saponin jenis ini dapat dihidrolisis menghasilkan sapogenin. Sapogenin mudah dikristalkan melalui reaksi asetilasi sehingga dapat dimurnikan. Contoh senyawa saponin ini adalah turunan α -amyrine, sedangkan senyawa triterpensteroid adalah: *Asiacosida* (*Centella asiatica*), *Bacoside* (*Bacopa monneira*), *Cyclamin* (*Cyclamen persicum*) (Liem, *et al.* 2013). Struktur kimia saponin dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur kimia saponin (Liem, *et al.* 2013)

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan metode pemisahan senyawa yang terkandung dalam suatu bahan tertentu. Prinsip dari ekstraksi ini adalah memisahkan komponen yang ada dalam bahan tersebut yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut tertentu. Ekstraksi dengan pelarut dilakukan dengan mempertemukan bahan yang akan diekstrak dengan pelarut selama waktu tertentu, diikuti pemisahan filtrat terhadap residu bahan yang diekstrak (Septiana dan Asnani, 2012).

Beberapa faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak pada proses ekstraksi diantaranya yaitu faktor kimia seperti jenis dan jumlah senyawa kimia, metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan (Arifianti, *et al.* 2014). Ditambahkan oleh Mukhriani (2014), terdapat berbagai macam metode ekstraksi antara lain

maserasi, sonikasi, perkolasi, *reflux* dan destilasi uap. Metode ekstraksi sonikasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dapat meningkatkan rendemen ekstrak yang dihasilkan dengan waktu yang lebih cepat yaitu 15 menit sehingga lebih efisien. Selain dapat meningkatkan hasil rendemen, metode ekstraksi sonikasi juga efektif digunakan dalam emndapatkan antioksidan pada suatu sampel. Menurut penelitian Utami, *et al.* (2009), aktivitas antioksidan ekstrak daun simpur yang tertinggi terdapat pada ekstrak dengan metode sonikasi, yaitu sebesar 95,54% jika dibandingkan dengan metode esktraksi gelombang mikro (MAE) dan tekanan tinggi yang secara berturut-turut 92,55% dan 94,85%.

Penggunaan pelarut yang berbeda juga dapat mempengaruhi hasil ekstrak. Pelarut yang digunakan berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya karena suatu senyawa akan larut dengan pelarut yang sama tingkat polaritasnya. Perbedaan pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi buah lindur memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan (Jacob, *et al.* 2013). Selain itu lama waktu ekstraksi dapat mempengaruhi mutu ekstrak. Menurut Wahyuni dan Widjanarko (2015), pengaruh lama waktu dalam ekstraksi yaitu semakin lama ekstraksi maka semakin banyak pula senyawa yang akan ikut trekstrak. Salah satunya pada senyawa karotenoid yang terekstrak dalam sampel dengan lama waktu ekstraksi berbeda, hal ini dapat mempengaruhi nilai IC₅₀ pada uji aktivitas antioksidan yang dihasilkan pada suatu ekstrak.

2.3.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan.

Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika

tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014).

2.3.2 Ekstraksi Perkolasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Mukhriani, 2014).

2.3.3 Ekstraksi Soxhlet

Metode ekstraksi *Soxhlet* dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa

yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih (Mukhriani, 2014).

2.3.4 Ekstraksi Reflux dan Destilasi Uap

Pada metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu. Destilasi uap memiliki proses yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai 2 bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Kerugian dari kedua metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi (Mukhriani, 2014).

2.3.5 Ekstraksi Sonikasi

Ekstraksi ultrasonik termasuk salah satu alternatif dari preparasi sampel padat, karena dapat mempermudah dan mempercepat beberapa langkah preparasi, seperti pelarutan, *fusi* dan *leaching*. Hal ini dikarenakan efek dari gelombang ultrasonik yang membentuk *local high temperature* dan gerakan mekanik antar muka zat padat dan zat cair, sehingga akan mempercepat laju perpindahan massa (Sani, *et al.* 2014).

Salah satu sifat dari ultrasonik adalah *non-destructive* dan *non-invasive*, sehingga dengan mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi gelombang ultrasonik dapat merambat dalam medium padat, cair, dan gas. Penggunaan ultrasonik pada proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik dapat lebih cepat, getaran ultrasonik dapat memecahkan dinding sel sehingga kandungan didalamnya dapat keluar dengan cepat (Sari, *et al.* 2012).

2.4 Pelarut

Pemilihan pelarut yang akan dipakai dalam proses ekstraksi harus diperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diisolasi. Sifat yang penting adalah polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa. Pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya sehingga akan mempengaruhi sifat fisikokimia ekstrak yang dihasilkan. Pelarut yang dapat digunakan dalam ekstraksi, diantaranya etanol, metanol, etil asetat, heksana, dan air yang mampu memisahkan senyawa-senyawa yang penting dalam suatu bahan.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan satu tahap ekstraksi maupun bertingkat. Pada ekstraksi satu tahap hanya digunakan satu pelarut untuk ekstraksi, sedang pada ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut (Septiana dan Asnani, 2012).

Pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol atau campurannya dengan air karena pelarut ini merupakan pengekstraksi yang baik untuk semua senyawa dengan berat molekul rendah, seperti saponin dan flavonoid. Jenis pelarut pengekstraksi juga mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak, sesuai konsep *like dissolve like*, dimana senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar (Arifianti, *et al.* 2014). Ditambahkan oleh Mukhriani (2011), jenis pelarut diantaranya pelarut polar (air, etanol dan metanol), pelarut semipolar (etil asetat dan diklorometan) dan pelarut nonpolar (n-heksan, petroleum eter dan kloroform).

2.4.1 N-heksan

Heksan merupakan senyawa hidrokarbon alkana. Heksan memiliki rumus kimia C_6H_{14} . Awalan heks- merujuk pada enam atom karbon yang ada pada heksan sedangkan akhiran -ana berasal dari alkana yang menunjukkan adanya ikatan tunggal penghubung atom-atom karbon. Pada keadaan standar, n-heksan

merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air. Bobot molekul n-heksan sebesar 86,2 gram/mol. N-heksan memiliki titik lebur sebesar -95°C , titik didih 69°C (pada 1 atm) dan densitasnya sebesar 0,6603 gr/ml pada 20°C . Pemilihan n-heksana sebagai pelarut, karena memiliki sifat stabil dan mudah menguap, selektif dalam melarutkan zat, mengekstraksi sejumlah kecil lilin serta dapat mengekstrak zat pewangi dalam jumlah besar (Munawaroh dan Handayani, 2010).

N-heksana dibuat dari hasil penyulingan minyak mentah dimana untuk produk industrinya ialah fraksi yang mendidih pada suhu $65-70^{\circ}\text{C}$. Pelarut ini bersifat inert, memiliki titik didih yang rendah serta dapat melarutkan dengan cepat dan sempurna. Isomer heksana tidak reaktif dan digunakan secara luas sebagai pelarut inert dalam reaksi organik karena heksana bersifat sangat tidak polar (Azis, *et al.* 2014).

2.4.2 Etil Asetat

Etil asetat adalah senyawa organik yang merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil, tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat sering digunakan sebagai pelarut ekstraksi karena etil asetat dapat menyaring senyawa-senyawa yang dapat memberikan aktivitas antibakteri diantaranya flavonoid pilohidroksi dan fenol yang lain (Mulyati, 2009).

Etil asetat adalah cairan jernih, tak berwarna, berbau khas yang digunakan sebagai pelarut tinta, perekat dan resin dibandingkan dengan etanol, etil asetat memiliki koefisien distribusi yang lebih tinggi dibanding etanol termasuk kelarutannya dalam gasoline. Etil asetat memiliki sifat fisika, diantaranya berwujud cairan bening, memiliki berat molekul 88,105 gr/mol, densitas 0,897 gr/ml, titik leleh sebesar $-83,6^{\circ}\text{C}$, titik didih sebesar $77,1^{\circ}\text{C}$ dan titik nyala -4°C (Azura, *et al.* 2015).

2.4.3 Etanol

Etanol disebut juga etil alkohol yang di pasaran lebih dikenal sebagai alkohol merupakan senyawa organik dengan rumus kimia C_2H_5OH . Dalam kondisi kamar, etanol berwujud cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna. Etanol memiliki massa molekul relative sebesar 46,07 g/mol, titik leleh sebesar $-114,3\text{ }^{\circ}C$, titik didih sebesar $78,32\text{ }^{\circ}C$, densitas pada $20\text{ }^{\circ}C$ sebesar $0,7893\text{ g/cm}^3$, kelarutan dalam air $20\text{ }^{\circ}C$ sangat larut, viskositas pada $20\text{ }^{\circ}C$ sebesar 1,17 cP dan kalor spesifik pada $20\text{ }^{\circ}C$ sebesar $0,579\text{ kal/g}^{\circ}C$ (Munawaroh dan Handayani, 2010).

Etanol merupakan pelarut yang dapat digunakan dalam mengekstraksi bahan kering, daun – daunan, batang, dan akar. Pelarut etanol memiliki polaritas yang tinggi sehingga dapat menghasilkan persen *yield* lebih banyak dibandingkan menggunakan pelarut lainnya. Etanol juga mempunyai titik didih yang rendah dan cenderung aman, tidak beracun dan tidak berbahaya. Pelarut etanol memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus $-OH$ yang bersifat polar dan gugus CH_2CH_3 yang bersifat non polar, sifat non polar inilah yang membuat etanol mampu mengekstrak kandungan minyak atsiri, dan *alkaloid* di dalam daun salam India secara optimal (Azis, *et al.* 2014).

2.5 Uji Fitokimia

Fitokimia merupakan ilmu pengetahuan yang menguraikan aspek kimia suatu tanaman. Kajian fitokimia meliputi uraian yang mencakup aneka ragam senyawa organik yang dibentuk dan disimpan oleh organisme, yaitu struktur kimianya, biosintesisnya, perubahan serta metabolismenya, penyebarannya secara alamiah dan fungsi biologisnya, isolasi dan perbandingan komposisi senyawa kimia dari bermacam-macam jenis tanaman (Putranti, 2013).

Uji fitokimia merupakan suatu pemeriksaan golongan senyawa kimia yang terdapat dalam suatu simplisia tumbuhan. Uji tersebut dapat digunakan untuk membuktikan ada tidaknya senyawa kimia tertentu dalam tumbuhan untuk dapat dikaitkan dengan aktivitas biologinya sehingga dapat membantu langkah-langkah fitofarmakologi (Artini, *et al.* 2003). Hasil analisis dapat memberikan petunjuk jenis golongan metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, fenolik, steroid dan triterpenoid (Astuti, *et al.* 2013).

2.6 Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan uji toksisitas untuk keamanan bahan pangan. Uji BSLT digunakan sebagai uji permulaan untuk mengetahui aktivitas dari suatu zat atau senyawa yang terkandung dalam suatu ekstrak atau suatu isolat murni. Uji tersebut merupakan metode alternatif menggantikan penelitian yang menggunakan hewan besar (Podungge, *et al.* 2015).

Penerapan uji BSLT untuk sistem bioaktivitas dengan menggunakan larva udang tersebut, antara lain untuk mengetahui residu pestisida, anestetik lokal, senyawa turunan morpin, mikotoksin, karsinogenik suatu senyawa dan polutan untuk air laut serta sebagai alternatif metode yang murah untuk uji toksisitas.

Senyawa aktif yang dimiliki daya bioaktivitas tinggi diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration 50%* (LC₅₀) (Prawirodiharjo, 2014).

2.7 Uji Total Fenol

Pengujian aktivitas total fenol merupakan dasar dilakukan pengujian aktivitas antioksidan, karena diketahui bahwa senyawa fenolik berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Pengukuran total antioksidan bahan pangan asal tanaman dapat dilakukan dengan mengukur kadar total fenolik

menggunakan reagen *Folin-ciocalteau*. Hal ini karena sebagian besar antioksidan dalam bahan asal tanaman merupakan senyawa polifenol. Pengujian total fenol bertujuan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel, sehingga diduga bila kandungan senyawa fenolik di dalam sampel tinggi maka aktivitas antioksidannya akan tinggi. Analisis ini menggunakan kurva standar yang dipersiapkan dengan menggunakan asam galat (Djapiala, *et al.* 2013).

Metode *Folin-Ciocalteu* menurut Rorong (2015) ditentukan berdasarkan kemampuan senyawa fenolik dalam ekstrak sampel yang dapat bereaksi dengan asam fosfomolibdat-fosfotungstat dalam reagen *Folin-Ciocalteu* yang berwarna kuning akan mengalami perubahan warna menjadi warna biru. Kandungan total fenol pada suatu ekstrak dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* (GAE). GAE merupakan acuan umum untuk mengukur sejumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan karena asam galat merupakan senyawa fenolik yang banyak ditemukan pada tanaman. Penggunaan asam galat sebagai larutan standard dikarenakan senyawa asam galat mempunyai gugus hidroksil dan ikatan rangkap yang terkonjugasi pada masing-masing cincin benzene yang menyebabkan senyawa ini sangat efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan reagen *Folin Ciocalteu*, sehingga reaksi yang terjadi lebih sensitif dan intensif.

2.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Radikal bebas yang biasa digunakan sebagai model dalam mengukur daya aktivitas antioksidan adalah *1,1-difenil-2-pikrihidazil* (DPPH). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan dan bila disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik dan stabil selama bertahun-tahun (Tristantini, *et al.* 2016). Selain metode DPPH, macam-macam uji aktivitas antioksidan diantaranya, metode *reducing power*, metode uji kapasitas

serapan radikal bebas (ORAC), metode tiosianat, aktivitas penghambatan radikal superoksida dan aktivitas penghambatan radikal hidroksil (Ikhlas, 2013). Metode DPPH sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan antaranya sederhana, mudah, cepat, peka, serta memerlukan sedikit sampel. Larutan DPPH yang awalnya berwarna ungu setelah bereaksi dengan antioksidan alami akan membentuk warna kuning. Semakin tinggi kandungan antioksidan maka warna ungu pada larutan DPPH akan semakin berkurang dan membentuk warna kuning (Purwaningsih, 2012).

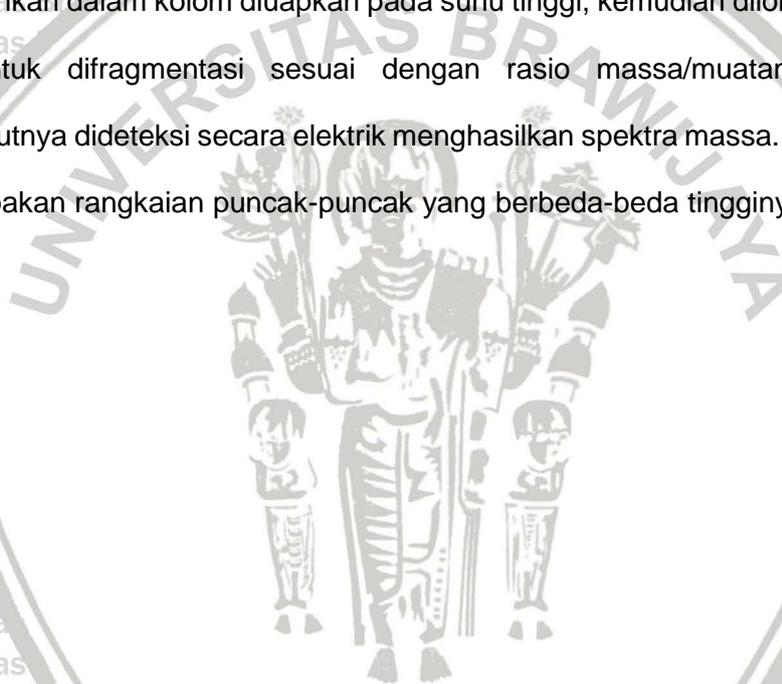
Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometer. Senyawa DPPH dalam metanol berwarna ungu tua terdeteksi pada panjang gelombang sinar tampak sekitar 515-517 nm. Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai IC_{50} (Inhibitor Concentration). IC_{50} merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm ($IC_{50} < 50$ ppm), kuat ($50 \text{ ppm} < IC_{50} < 100$ ppm), sedang ($100 \text{ ppm} < IC_{50} < 150$ ppm), lemah ($150 \text{ ppm} < IC_{50} < 200$ ppm), dan sangat lemah ($IC_{50} > 200$ ppm) (Putranti, 2013).

2.9 *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)*

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) adalah suatu teknik analisis kimia yang mempunyai kemampuan pemisahan yang sangat bagus karena mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi karena teknik ini menggunakan kombinasi tandem kromatografi cair dan spektroskopi massa. LC-MS sangat umum digunakan dalam studi farmakokinetika terutama dalam hal pengembangan obat. Disamping itu, LC-MS juga dapat digunakan untuk

dereplikasi bahan alam, skrining bioafinitas, skrining *in vivo*, stabilitas metabolit, identifikasi metabolit, identifikasi kemurnian suatu obat, identifikasi degradant, kualitas kontrol dan kuantitatif bioanalisis suatu obat (Khairan, *et al.* 2009).

LC-MS merupakan perpaduan HPLC dengan MS (LC-MS). Analisa dengan metode LC-MS menggunakan fasa gerak atau pelarut untuk membawa sampel melalui kolom yang berisi padatan pendukung yang dilapisi cairan sebagai fasa diam. Analit selanjutnya dipartisi di antara fasa gerak dan fasa diam sehingga terjadi pemisahan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Sampel yang telah dipisahkan dalam kolom diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa. Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Hermiastuti, 2013).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* yang diperoleh dari Pantai Sendang Biru Kawasan Clungup Mangrove Conservation, Malang, Jawa Timur. Daun yang digunakan rata-rata memiliki panjang 17,5 cm dan lebar 5 cm (Dia, *et al.* 2005). Bentuk daun menjorong, ujung melancip, pangkal menirus, permukaan atas halus, permukaan bawah kasar, tepi mengutuh, pertulangan daun menyirip, jumlah cabang tulang daun 38-54, derajat kemiringan cabang tulang daun 45° - 62° (Irawan, *et al.* 2013).

Bahan yang digunakan dalam penelitian uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* antara lain, daun mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*, kantong kresek, etanol, etil asetat, n-heksan, H_2SO_4 2 N, pereaksi Meyer, aquades, NaCl 10%, $FeCl_3$ 1%, larutan garam gelatin, metanol 95%, serbuk Mg, HCl 2 N, HCl 98%, kloroform, dan asam asetat anhidrat, air laut, kertas karbon, air, tisu, kertas saring dan kertas label. Pada pengujian total fenol menggunakan bahan diantaranya aquades, larutan Folin Ciocelteau, Na_2CO_3 7%, *plastic wrap*, kertas saring, aluminium foil dan asam galat. Untuk pengujian aktivitas antioksidan menggunakan bahan antara lain methanol, DPPH, aluminium foil, dan asam askorbat.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat-alat untuk ekstraksi sampel yang terdiri atas timbangan digital merk Acis, *rotary evaporator*, sonikator merk Branson 3510, gelas ukur, Erlenmeyer merk Iwaki Pyrex, beaker glass, botol kaca, spatula, oven merk Redline Binder dan corong. Alat untuk uji fitokimia yaitu

tabung reaksi, rak tabung reaksi 10 ml merk Iwaki Pyrex, beaker glass 100 ml, pipet tetes, pipet volume 1 ml, gelas ukur 100 ml, spatula, bola hisap dan timbangan digital. Pada pengujian total fenol menggunakan alat gelas ukur, labu ukur 100 ml, pipet volume 0,1 ml, timbangan analitik, spatula, botol vial dan spektrofotometer UV-Vis. Pada pengujian aktivitas antioksidan menggunakan alat gelas ukur, beaker glass, pipet serologis, pipet volume, mikro pipet, pipet tetes, spatula, serta instrument LC-MS untuk uji pendugaan senyawa bioaktif pada sampel ekstrak yang memiliki aktivitas toksik dan antioksidan.

3.2 Metode Penelitian

Metode eksperimen digunakan untuk penelitian ilmiah dimana peneliti memanipulasi dan mengontrol satu atau lebih variabel bebas dan melakukan pengamatan terhadap variabel-variabel terikat untuk menemukan variasi yang muncul bersamaan dengan manipulasi terhadap variabel bebas tersebut. Variabel yang dimanipulasi disebut variabel bebas dan variabel yang akan dilihat pengaruhnya disebut variabel terikat. Eksperimen bertujuan untuk meneliti kemungkinan sebab akibat dengan mengenakan satu atau lebih kondisi perlakuan pada satu atau lebih kelompok eksperimen dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan (Setyanto, 2015).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang bersifat laboratoris. Penelitian dilakukan secara sengaja dengan cara memberikan perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna membangkitkan sesuatu kejadian atau keadaan yang akan diteliti untuk diketahui bagaimana akibatnya (Jaedun, 2011).

3.2.1 Variabel Penelitian

Variabel merupakan gejala yang dapat diukur menurut objektivitas, reabilitas dan validalitas ilmiah. Dilihat dari peran dan posisinya, variabel dibagi atas variabel bebas dan terikat. Variabel bebas merupakan variabel penjelas, penentu dan penduga, sedangkan variabel terikat adalah variabel konsekuensi atau akibat (Suryana, 2010).

Variabel bebas dari penelitian ini terdiri dari 2 variabel, yaitu jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi sonikasi yang berbeda. Pelarut ekstraksi yang berbeda dengan pola ekstraksi bertingkat yaitu dari pelarut non polar (n-heksan), pelarut semi polar (etil asetat) dan pelarut polar (etanol). Sedangkan lama waktu ekstraksi sonikasi yaitu dari 15 menit, 25 menit dan 35 menit (Modifikasi Wahyuni dan Widjanarko, 2015) yang dilakukan pada penelitian pendahuluan untuk mendapatkan perlakuan lama waktu ekstraksi sonikasi yang terbaik. Perbedaan konsentrasi larutan ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini tidak termasuk dalam perlakuan karena hasil paparan masing-masing konsentrasi untuk tiap pelarut diakumulasikan menjadi satu menghasilkan persentase nilai IC_{50} .

Variabel terikat pada penelitian pendahuluan terdiri dari rendemen, kadar air, fitokimia dan uji toksisitas, sedangkan variabel terikat dari penelitian utama terdiri dari nilai total fenol dengan menggunakan metode *follinciocalteu* (Ratnayani, *et al.* 2012), nilai IC_{50} yang diperoleh dari pengujian aktivitas antioksidan sampel dengan metode DPPH (Patra, *et al.* 2009) dan pengujian LC-MS (Lisdawati, *et al.* 2007).

3.2.2 Parameter Uji

Parameter uji pada penelitian ini adalah parameter uji kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh dari hasil perhitungan nilai IC_{50} dari masing-masing ekstrak. Pada IC_{50} merupakan konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu

menyebabkan 50% aktivitas DPPH (Simorangkir, *et al.* 2013). Pada penelitian ini dilakukan juga pengujian nilai rendemen, fitokimia, kadar air, uji toksisitas pada penelitian pendahuluan untuk memperoleh perlakuan lama waktu ekstraksi terbaik. Selain itu dilakukan juga pengujian total fenol untuk mendukung dalam menentukan aktivitas antioksidan dan uji LC-MS untuk pendugaan senyawa yang berperan sebagai antioksidan.

3.3 Penelitian Pendahuluan

Rancangan penelitian pendahuluan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap faktorial (RAL faktorial). Rancangan acak lengkap faktorial digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen. Data kemudian diolah menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf 5% dan 1%. Apabila nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka dapat dilakukan uji lanjut, diantaranya dengan uji Tukey (Sastrosupadi, 2000).

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui hasil uji rendemen, kadar air, fitokimia dan toksisitas dari ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang diekstrak dengan metode sonikasi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut yang berbeda kepolarannya, yaitu dimulai dari pelarut non polar (n-heksan), semi polar (etil asetat) dan polar (etanol) dengan lama waktu yang berbeda, yaitu 15 menit, 25 menit dan 35 menit. Menurut Harborne (1987), secara umum ekstraksi dilakukan berturut-turut mulai dari pelarut non polar, lalu kepolarannya menengah kemudian pelarut polar. Pada ekstraksi simplisia awal dengan pelarut non polar dimaksudkan karena pelarut non polar dapat menghidrolisis dan menarik senyawa terutama lemak (lipida) yang terdapat dalam serbuk saat ekstraksi, dengan adanya pemecahan lemak tersebut akan memudahkan dalam mengekstrak senyawa target. Sampel yang digunakan

adalah tepung daun. Pengujian terdiri dari 9 perlakuan dan setiap perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan. Hasil uji ekstrak dari setiap perlakuan melalui beberapa pengujian, diantaranya uji rendemen, uji kadar air, uji fitokimia dan uji toksisitas.

Rancangan percobaan pendahuluan digunakan untuk mendapatkan perlakuan lama waktu ekstraksi terbaik dari setiap uji yang dilakukan, diantaranya uji rendemen, uji kadar air, uji fitokimia dan uji toksisitas. Kemudian dilanjutkan ke tahap penelitian utama yang meliputi uji total fenol, uji aktivitas antioksidan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari setiap perlakuan (perbedaan jenis pelarut) yang kemudian dilanjutkan dengan uji LC-MS pada ekstrak dengan perlakuan terbaik yang menunjukkan nilai IC₅₀ terendah (perlakuan terbaik dari jenis pelarut yang berbeda) untuk mengetahui senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Adapun rancangan penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Percobaan Penelitian pendahuluan

Sampel	Perlakuan		Ulangan			Total	Rata-rata
	Waktu	Pelarut	1	2	3		
Tepung daun	A	A	Aa ₁	Aa ₂	Aa ₃		
		B	Ab ₁	Ab ₂	Ab ₃		
		C	Ac ₁	Ac ₂	Ac ₃		
	B	A	Ba ₁	Ba ₂	Ba ₃		
		B	Bb ₁	Bb ₂	Bb ₃		
		C	Bc ₁	Bc ₂	Bc ₃		
	C	A	Ca ₁	Ca ₂	Ca ₃		
		B	Cb ₁	Cb ₂	Cb ₃		
		C	Cc ₁	Cc ₂	Cc ₃		

Keterangan :

- A : Lama ekstraksi 15 menit
- B : Lama ekstraksi 25 menit
- C : Lama ekstraksi 35 menit
- a : Ekstraksi dengan pelarut n-heksan
- b : Ekstraksi dengan pelarut etil asetat
- c : Ekstraksi dengan pelarut etanol

1.1.1. Prosedur Penelitian Pendahuluan

– Preparasi Bahan Baku (Modifikasi Awaludin, et al. 2011)

Preparasi bahan baku meliputi pencucian daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan air mengalir. Kemudian dilakukan pengecilan ukuran. Setelah itu dilanjutkan dengan proses pengeringan dengan oven suhu 45-50°C selama ± 10 jam hingga kandungan air bahan sekitar 15%. Menurut Winangsih, et al. (2013), pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C memiliki kadar air paling rendah jika dibandingkan dengan pengeringan sinar matahari langsung dan kering angin.

Semakin rendah kandungan kadar air bahan maka semakin tinggi rendemen zat lain yang terekstrak. Pengeringan harus dilakukan dalam keadaan terawasi untuk mencegah terjadinya perubahan kimia yang terlalu banyak (Harborne, 1987).

Setelah proses pengeringan dilanjutkan penghalusan sampel kering menggunakan mesin giling merk Honda kemudian diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh agar menjadi bentuk tepung. Menurut Maulida dan Guntarti (2015), ukuran partikel yang tersaring oleh 60 mesh merupakan ukuran partikel kecil. Hal ini dapat membuat serbuk simplisia memiliki permukaan untuk kontak dengan pelarut lebih luas dan akan memaksimalkan kesempatan pelarut untuk mengekstraksi senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia. Skema kerja preparasi daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 1.

– Ekstraksi Sampel (Modifikasi Sani, et al. 2014)

Proses ekstraksi daun *Bruguiera gymnorrhiza* menggunakan metode sonikasi. Ekstraksi ini menjadi salah satu alternative karena membutuhkan waktu yang relative cepat. Pelarut yang digunakan pada ekstraksi ini dari pelarut non polar hingga ke pelarut polar yaitu, n-heksan, etil asetat dan etanol dilakukan secara bertingkat. Penggunaan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda bertujuan untuk menarik kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam

sampel sesuai dengan sifat kepolarannya. Pelarut yang biasanya digunakan yaitu n-heksan (nonpolar), etil asetat (semi polar) dan etanol (polar). Syarat pelarut yang digunakan dalam ekstraksi, diantaranya pelarut organik, memiliki sifat selektif, titik didihnya rendah sehingga mudah diuapkan, memiliki titik didih yang seragam dan harga yang murah serta tidak mudah terbakar (Munawaroh dan Handayani, 2010).

Perbandingan pelarut dalam ekstraksi yang digunakan yaitu 1:4 (b/v). Berat sampel yang akan diekstrak sebesar 200 gram, maka membutuhkan pelarut ekstraksi sebesar 800 ml. Perbandingan sampel dan pelarut harus sesuai, pelarut yang digunakan volumenya cukup untuk merendam sampel selama proses ekstraksi sehingga proses pengeluaran senyawa dalam sampel bisa berjalan secara optimal (Winata dan Yuanianta, 2015). Sedangkan perlakuan lama waktu ekstraksi yang digunakan yaitu 15, 25 dan 35 menit dengan menggunakan suhu 20-25°C pada frekuensi sebesar 42 KHz (Modifikasi Wahyuni dan Widjanarko, 2015). Menurut Utami, *et al.* (2009), frekuensi 42 KHz digunakan karena dapat menghancurkan sel daun sehingga mempercepat proses perpindahan massa senyawa bioaktif dari dalam sel ke pelarut. Pada gelombang tersebut tergolong ke dalam intensitas yang rendah sehingga tidak merusak bahan. Ditambahkan oleh Sitrorus, *et al.* (2011), frekuensi gelombang ultrasonik terbagi menjadi 3 bagian, yaitu frekuensi rendah (20 - 100 KHz), frekuensi sedang (100 KHz - 2 MHz) dan frekuensi tinggi (2 MHz – 10 MHz).

Hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan corong *bouchner* hingga didapatkan filtratnya. Residu yang dihasilkan diekstrak kembali secara bertingkat dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacum evaporator* sampai pelarut dalam filtrat habis dan didapatkan ekstrak kasar. Setelah itu dilakukan pengoptimalan ekstrak dengan penyemprotan gas nitrogen untuk menghilangkan sisa pelarut. Skema

kerja ekstraksi sonikasi sampel tepung daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 2.

— Perhitungan Rendemen

Perhitungan rendemen menunjukkan jumlah ekstrak sampel yang diperoleh dari setiap gram sampel yang diekstrak (% b/b) (Yulia, 2007). Nilai rendemen didapatkan dengan menghitung persen dari berat awal sampel dibagi dengan berat akhir sampel. Pada penelitian ini, berat awal sampel merupakan berat tepung daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang sudah ditimbang sebesar 200 gram, sedangkan berat akhir merupakan berat ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang diperoleh. Rendemen dari ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dari masing-masing perlakuan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat akhir (g)}}{\text{Berat awal (g)}} \times 100\%$$

— Uji Kadar Air (Sumardi, et al. 1992)

Kadar air merupakan jumlah air bebas yang terkandung dalam bahan yang masih dapat dipisahkan dengan cara fisis seperti penguapan dan destilasi (Sumardi, et al. 1992). Analisa kadar air ini menggunakan metode *thermogravimetri* dengan cara menguapkan air yang ada dalam bahan pangan dengan jalan pemanasan kemudian menimbang bahan sampai berat konstan yang berarti semua air sudah diuapkan (Sulthoniyah, et al. 2013). Pengujian dilakukan minimal duplo (dua kali). Perhitungan pengujian kadar air dapat dilihat dibawah ini:

$$\% \text{ kadar air} = \frac{(A+B)-C}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat botol timbang kosong, dinyatakan dalam g.

B = berat sampel awal, dinyatakan dalam g.

C = berat botol timbang dan sampel kering/akhir, dinyatakan dalam g

– Uji Fitokimia

Tahap selanjutnya dari penelitian ini yaitu uji fitokimia. Menurut Artini, *et al.* (2013), uji fitokimia penting dilakukan untuk mengetahui komponen bioaktif yang terkandung dalam suatu sampel tumbuhan yang sedang diteliti. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, steroid dan triterpenoid, serta saponin.

- **Uji Alkaloid (Harborne, 1987)**

Senyawa alkaloid pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* masing-masing perlakuan menggunakan prinsip mereaksikan ekstrak sampel dengan HCl dan pereaksi Meyer. Hasil positif uji alkaloid pada pereaksi Meyer apabila terdapat endapan putih. Skema uji alkaloid pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 3.

- **Uji Flavonoid (Harborne, 1987)**

Uji flavonoid pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* masing-masing perlakuan menggunakan pereaksi serbuk Mg dan HCl. Hasil uji sampel positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna kuning sampai jingga. Skema uji flavonoid pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 4.

- **Uji Tanin (Agustino, *et al.* 2014)**

Uji tanin pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* masing-masing perlakuan diambil sampel sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl₃ 1%. Adanya senyawa tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru, hijau, merah, ungu atau hitam. Skema uji tanin pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 5.

- **Uji Steroid dan Triterpenoid (Sangi, et al. 2008)**

Uji steroid dan triterpenoid pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada masing-masing perlakuan menggunakan pereaksi asetat anhidrat dan asam sulfat. Hasil positif mengandung triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga atau ungu, sedangkan positif mengandung steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru dan jika warna berubah menjadi hijau kebiruan maka positif sterol. Skema uji steroid dan triterpenoid pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 6.

- **Uji Saponin (Harborne, 1987)**

Pengujian saponin dilakukan dengan menggunakan metode Forth yaitu melihat ada atau tidaknya busa yang terbentuk dengan mereaksikan sampel dengan akuades. Hasil positif mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil dan tidak hilang saat ditambahkan satu tetes HCl. Skema uji saponin ekstrak kasar daun mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 7.

- **Uji Toksisitas *Brine Shrimp Lethallity Test* (BSLT) (Muaja, et al. 2013)**

- **Penyiapan Larva *Artemia salina* Leach.**

Uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethallity Test* (BSLT). Langkah awal dalam uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethallity Test* (BSLT) yaitu penetasan larva *Artemia salina* Leach. Telur *Artemia salina* Leach diambil 1 gram untuk ditetaskan. Telur didapatkan dari Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan Universitas Brawijaya Malang. Telur direndam dalam air laut buatan yang sudah diaerasi ditetaskan selama 48 jam. Telur *Artemia salina* Leach tersebut akan menetas menjadi *nauplii* yang berumur 48 jam dan siap digunakan sebagai hewan uji. Karena larva *Artemia* pada umur tersebut

memiliki kepekaan yang tinggi disebabkan dinding selnya masih lunak. Untuk menimbulkan efek toksik hanya diperlukan konsentrasi rendah dan waktu percobaan yang diperlukan lebih singkat (Purwantini, *et al.* 2002). Ditambahkan oleh Yuliani, *et al.* (2016), larva *Artemia salina* Leach. pada umur 48 jam merupakan tahap *nauplii*, dimana pada tahap tersebut selnya sangat mirip dengan sel manusia sehingga digunakan sebagai hewan uji. Skema kerja penetasan telur *Artemia salina* Leach. dapat dilihat pada Lampiran 8.

- **Penentuan Konsentrasi Larutan Ekstrak dan Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza***

Penentuan konsentrasi larutan uji yang digunakan dimulai dari pembuatan larutan induk pada konsentrasi 2000 ppm yang dibuat dari melarutkan 40 mg ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* masing-masing perlakuan dalam 20 ml air laut. Larutan induk tersebut kemudian di encerkan kembali hingga menjadi konsentrasi 1000, 500, 100, 50, 25, dan 12,5 ppm serta 0 ppm tanpa tambahan ekstrak sampel yang digunakan sebagai kontrol. Perhitungan untuk konsentrasi larutan uji dapat dilihat pada Lampiran 15. Uji toksisitas dilakukan dengan memasukkan 5 ml larutan masing-masing ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang sudah diencerkan pada tiap konsentrasinya ke dalam botol vial.

Setelah itu, dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach. kedalam masing-masing botol vial yang sudah berisi larutan dan diamati setelah 24 jam jumlah larva *Artemia salina* Leach. yang mati. Skema uji toksisitas dapat dilihat pada Gambar

16.

3.4 Penelitian Utama

3.4.1 Prosedur Penelitian Utama

Penelitian utama adalah menguji hasil ekstrak dengan perlakuan lama waktu ekstraksi dengan metode sonikasi terbaik dari penelitian pendahuluan

menggunakan rangkaian uji, diantaranya uji total fenol, uji aktivitas antioksidan dan uji LC-MS. Penelitian utama digunakan untuk menentukan perlakuan terbaik dari jenis pelarut yang berbeda dengan melalui tahapan pengujian yaitu uji total fenol, uji aktivitas antioksidan dan didapatkan perlakuan jenis pelarut terbaik yang kemudian dilanjutkan pada uji LC-MS untuk mengetahui senyawa yang berperan sebagai antioksidan ada ekstrak. Rancangan yang digunakan pada penelitian utama yaitu RAL sederhana dengan 3 perlakuan dan setiap perlakuan dilakukan 6 kali ulangan. Data kemudian diolah menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf 5%. Apabila nilai Fhitung > dari Ftabel maka dapat dilakukan uji lanjut menggunakan BNT (Beda Nyata Terkecil). Rancangan percobaan penelitian utama dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan Percobaan Penelitian Utama

Sampel Uji	Pelarut	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
Ekstrak	a	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆
	b	b ₁	b ₂	b ₃	b ₄	b ₅	b ₆
	c	c ₁	e ₂	e ₃	e ₄	e ₅	e ₆

Keterangan :

- a : Pelarut n – Heksan
- b : Pelarut Etil Asetat
- c : Pelarut Etanol

— **Pengujian Total Fenol (Ratnayani, et al. 2012)**

• **Pembuatan Kurva Standard Asam Galat**

Pengujian total fenol dilakukan dengan menggunakan metode Folin Cioceltea. Kandungan fenolik total pada suatu ekstrak dinyatakan dalam ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE). GAE merupakan acuan umum untuk mengukur sejumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan karena asam galat merupakan senyawa fenolik yang banyak ditemukan pada tanaman (Samin, et al. 2014). Penggunaan kurva standar asam galat pada



penelitian ini untuk menganalisis total fenol pada sampel ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Larutan induk asam galat dibuat dengan cara melarutkan 0,01 gram asam galat dengan aquades dalam labu ukur 100 ml hingga mencapai tanda batas. Larutan asam galat kemudian diambil beberapa ml sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan. Larutan asam galat dari masing-masing konsentrasi direaksikan dengan reagen folin dan ditambahkan larutan Na_2CO_3 . Kemudian diinkubasi selama 60 menit, setelah itu diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm.

Hasil absorbansi dialurkan dengan konsentrasi sehingga didapatkan kurva standar dengan persamaan regresi $y = bx + a$ dengan koefisien determinasi. Kurva baku asam galat ditetapkan dengan menggunakan persamaan regresi linier, yang menyatakan hubungan antara konsentrasi asam galat dinyatakan sebagai x dan absorbansi asam galat dengan pereaksi *Folin Ciocalteu* dinyatakan sebagai y (Huliselan, *et al.* 2015). Sedangkan R^2 merupakan koefisien determinasi yang didapatkan dari persamaan regresi. Menurut Firmansyah (2015), koefisien determinasi merupakan angka yang nilainya berkisar antar 0 sampai 1 yang menunjukkan seberapa dekat nilai perkiraan untuk analisis regresi yang mewakili data yang sebenarnya. Skema kerja pembuatan kurva standar asam galat dapat dilihat pada Lampiran 10.

- **Penentuan Total Senyawa Fenol Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza***

Pada pengujian total fenol sampel ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada masing-masing pelarut ditimbang untuk dilarutkan dengan pelarut metanol. Setelah itu dilakukan penyaringan dan diambil 0,5 ml untuk direaksikan dengan reagen folin. Lalu ditambahkan larutan Na_2CO_3 dan larutan tersebut didiamkan selama 60 menit dalam ruang gelap. Kemudian dilakukan

pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 760 menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi senyawa fenolat dalam sampel dapat ditentukan dengan mengkalibrasi absorbansi sampel pada kurva standar asam galat yang telah dibuat. Skema kerja pengujian total fenol ekstrak kulit batang *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 11. Total senyawa fenol dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Total fenol} = \frac{C \times V \times FP}{W}$$

Keterangan:

C = konsentrasi (mgGAE/L)

V = volume (ml)

FP = faktor pengencer

W = bobot sampel (g)

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (Patra, et al. 2009)

• Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). Metode ini digunakan untuk mengetahui potensi senyawa aktivitas antioksidan dalam ekstrak berdasarkan prinsip adanya kemampuan menangkap ion hydrogen dari radikal bebas (DPPH). Pada uji aktivitas antioksidan menggunakan asam askorbat (vitamin C) sebagai kontrol positif. Hal ini dikarenakan asam askorbat merupakan antioksidan yang biasa dikonsumsi sehari-hari. Tujuan pengujian asam askorbat pada penelitian ini adalah sebagai pembandingan dari nilai aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Konsentrasi yang

digunakan pada uji aktivitas antioksidan asam askorbat yaitu 2; 4; 8; 16 dan 32 ppm. Larutan induk sampel sebesar 1000 ppm diambil 10 μ L, 20 μ L, 40 μ L, 80 μ L dan 160 μ L untuk menghasilkan konsentrasi tersebut. Perhitungan konsentrasi larutan uji aktivitas antioksidan asam askorbat dapat dilihat pada Lampiran 16.

Setelah itu diambil 1 ml dan ditambahkan larutan DPPH 0,1 mM. Kemudian diinkubasi selama 60 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang

517 nm. Skema kerja uji aktivitas antioksidan asam askorbat dapat dilihat pada Lampiran 12.

- **Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza***

Pada pengujian aktivitas antioksidan, sampel ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang digunakan dilarutkan dalam pelarut metanol untuk membuat larutan induk sampel sebesar 1000 ppm. Larutan induk tersebut kemudian diencerkan dengan cara dipipet sebanyak 62,5 μL , 125 μL , 250 μL , 500 μL , 1000 μL dan dimasukkan kedalam botol vial untuk mendapatkan konsentrasi diantaranya 0; 12,5; 25; 50; 100 dan 200 ppm kedalam botol vial. Perhitungan konsentrasi larutan uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 16. Setelah itu masing-masing larutan sampel pada tiap sampel diambil 1 ml dan ditambahkan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM sebanyak 2 ml. Untuk mendapatkan larutan DPPH 0,1 mM ditambahkan dengan pelarut metanol. Kemudian dihomogenkan dengan cara sedikit menggoyangkannya dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit.

Absorbansi sampel dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Skema kerja pengujian antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 13. Setelah didapatkan nilai absorbansinya kemudian dilakukan perhitungan presentase peredamannya menggunakan persamaan berikut:

$$(\%) \text{Peredaman} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan :

A₀ : absorbansi kontrol (metanol + DPPH) tanpa ekstrak

A₁ : absorbansi sampel uji (Ekstrak + DPPH).

2.4.1.3 Identifikasi Senyawa Bioaktif Menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrophometry*) (Modifikasi Lisdawati, et al. 2007)

Analisis *liquid chromatograph mass spectrofotometry* (LC-MS) adalah metode yang digunakan untuk mengetahui senyawa dalam suatu bahan melalui berat molekulnya. Kelebihan dari metode ini adalah lebih sensitif dan selektif jika dibandingkan dengan menggunakan metode deteksi sinar UV biasa. Sampel ekstrak etanol dilakukan preparasi terlebih dahulu sebelum diuji LC-MS. Preparasi dilakukan dengan melarutkan sampel sebanyak 0,5 μL dalam pelarut air dan aseton nitril yang berfungsi sebagai fase gerak. Kemudian disaring menggunakan pompa vacum dan dilakukan degassing selama ± 30 menit untuk menghilangkan gas-gas terlarut. Setelah itu sampel diambil 0,2 μL dimasukkan kedalam LC-MS dengan laju fase gerak 0,2 ml/menit pada suhu 50°C. Dilakukan pemisahan dengan UV detector sehingga berat molekul terdeteksi dan didapatkan *spectramass*. Dianalisa dengan *software Masslynx* kemudian dilakukan pencarian senyawa dengan *database chemspider* dan *massbank*. Skema analisis senyawa bioaktif menggunakan LC-MS dapat dilihat pada Lampiran 14.

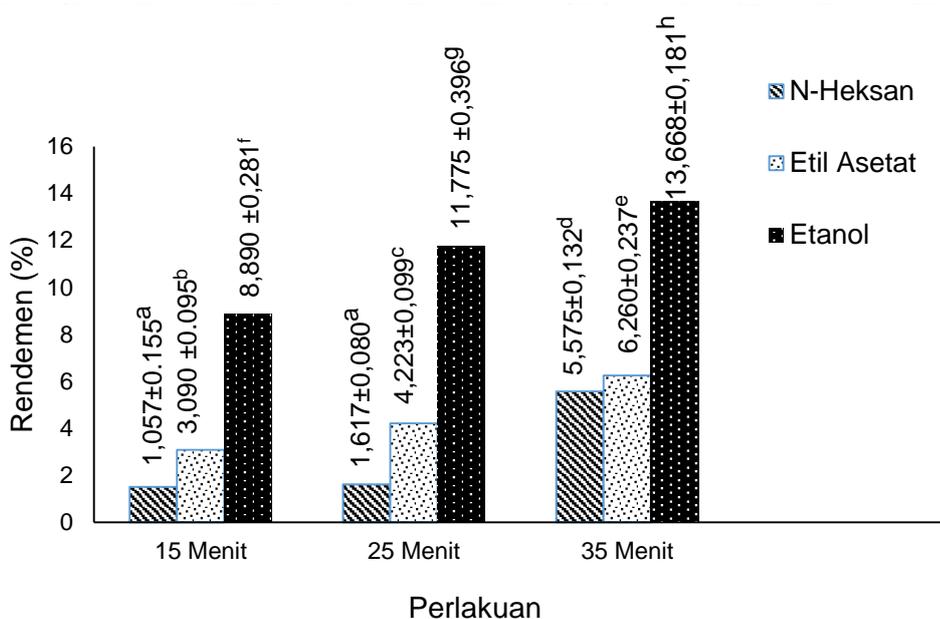
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Pendahuluan

4.1.1 Rendemen Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Rendemen ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* didapatkan dengan menghitung persentase perbandingan antara berat akhir (berat ekstrak yang dihasilkan) dengan berat awal (berat tepung daun *Bruguiera gymnorrhiza*). Berat awal sampel merupakan berat sampel tepung daun *Bruguiera gymnorrhiza* masing-masing memiliki berat 200 gram. Berat akhir sampel merupakan berat ekstrak setelah dilakukan optimalisasi dengan hidrogen. Nilai rendemen yang didapatkan dari masing-masing perlakuan kemudian dilakukan analisis. Data hasil perhitungan rendemen ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 17.

Nilai rendemen yang didapatkan dianalisis dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan menggunakan rancangan percobaan rancangan acak lengkap faktorial (RAL faktorial). Berdasarkan uji ANOVA pada taraf kepercayaan 95% didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel}$, hal ini menunjukkan perlakuan perbedaan jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata. Apabila hasil yang didapatkan berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji Tukey. Nilai rendemen ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Nilai Rendemen Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Berdasarkan hasil uji lanjut tukey, didapatkan perbedaan pada setiap interaksi perlakuan yang ditunjukkan dengan adanya notasi yang berbeda. Pada Gambar 8, menunjukkan perlakuan lama waktu ekstraksi yang berbeda dengan menggunakan pelarut yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap nilai rendemen ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Akan tetapi pada ekstrak n-heksan 15 menit dengan n-heksan 25 menit berpengaruh namun tidak nyata.

Berdasarkan gambar tersebut, didapatkan pada perlakuan lama waktu ekstraksi 15 menit nilai rendemen tertinggi terdapat pada ekstrak etanol sebesar $8,890 \pm 0,281\%$, sedangkan terendah pada ekstrak n-heksan yaitu sebesar $1,057 \pm 0,155\%$. Pada perlakuan lama waktu ekstraksi 25 menit nilai rendemen tertinggi terdapat pada ekstrak etanol yang sebesar $11,775 \pm 0,396\%$, sedangkan terendah terdapat pada ekstrak n-heksan sebesar $1,617 \pm 0,080\%$. Begitu juga pada perlakuan lama waktu ekstraksi 35 menit ekstrak etanol memiliki nilai rendemen tertinggi sebesar $13,668 \pm 0,181\%$, sedangkan terendah terdapat pada ekstrak n-heksan sebesar $5,575 \pm 0,132\%$.

Apabila dilihat berdasarkan interaksi antara perlakuan lama waktu ekstraksi dan pelarut dari gambar tersebut, semakin lama waktu ekstraksi menunjukkan nilai rendemen yang semakin meningkat, baik pada ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol. Hal ini disebabkan karena semakin lama waktu ekstraksi maka semakin besar kontak pelarut dengan bahan sehingga senyawa yang terekstrak semakin banyak. Sejalan dengan Handayani, *et al.* (2013), semakin lamanya waktu ekstraksi maka kesempatan bahan untuk kontak dengan pelarut semakin besar sehingga hasilnya juga akan bertambah sampai titik jenuh larutan. Berdasarkan hal tersebut, hasil analisa rendemen berdasarkan faktor lama ekstraksi menunjukkan nilai rerata rendemen dengan penambahan lama waktu ekstraksi maka rendemennya meningkat.

Ekstrak etanol memiliki nilai rendemen tertinggi dari semua perlakuan lama waktu ekstraksi. Hal ini membuktikan bahwa senyawa yang terkandung dalam daun *Bruguiera gymnorhiza* sebagian besar bersifat polar. Pelarut etanol yang bersifat polar memiliki kepolaran yang sama dengan sebagian besar senyawa dalam daun *Bruguiera gymnorhiza*. Menurut Sani, *et al.* (2014), pelarut Etanol 70% dapat melarutkan senyawa fitokimia lebih maksimal karena etanol 70% masih mengandung air yang cukup banyak (30%) yang membantu proses ekstraksi sehingga sebagian senyawa tersebut ada yang dapat tertarik dalam etanol dan ada pula yang tertarik dalam air. Asam amino, gula, beberapa senyawa fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, dan glikosida flavonoid serta klorofil terlarut dalam pelarut polar sehingga senyawa yang terekstrak dengan pelarut etanol 70% ini cukup banyak dan menghasilkan rendemen yang tinggi.

Pada kedua perlakuan lama waktu ekstraksi dan pelarut yang berbeda didapatkan nilai rendemen tertinggi pada ekstrak, n-heksan, etil asetat dan etanol etanol dengan lama waktu ekstraksi 35 menit berturut-turut sebesar $5,575 \pm 0,132\%$,

6,260±0,237% dan 13,668±0,181%. Nilai rendemen ini lebih besar jika dibandingkan dengan Dia, *et al.* (2015), nilai rendemen pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada pelrut n-heksan, etil asetat dan etanol dengan metode ekstraksi maserasi berturut-turut sebesar 2.85%, 5.97% dan 12.85%. Nilai rendemen pada metode ekstraksi sonikasi penelitian ini lebih tinggi dikarenakan pada metode ekstraksi sonikasi terjadi kavitasi akibat adanya perlakuan gelombang ultrasonik untuk memecah dinding sel bahan. Kavitasi adalah proses pembentukan gelembung-gelembung mikro (*microbubbles*) karena meningkatnya tekanan pada saat ekstraksi sebagai akibat dari adanya gelombang ultrasonik. Gelembung-gelembung ini tidak stabil sehingga mudah pecah ketika gelembung tersebut mencapai volume yang tidak cukup lagi menyerap energi. Pecahnya gelembung-gelembung ini melibatkan energi yang besar dan menghasilkan efek panas yang membantu kontak antara pelarut dan bahan dalam ekstraksi sehingga hasil ekstraksi lebih maksimal (Sani, *et al.* 2014).

4.1.2 Kadar Air Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Penentuan kadar air ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* menggunakan metode pemanasan dengan oven. Sampel ditimbang masing-masing sebesar 1 gram kemudian ditempatkan kedalam wadah yang sebelumnya sudah ditimbang sehingga diketahui beratnya. Dihitung persentase penurunan berat kadar air sebelum dan sesudah pengovenan. Perhitungan kadar air ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 18.

Nilai kadar air yang didapatkan dianalisis dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan menggunakan rancangan percobaan rancangan acak lengkap faktorial (RAL faktorial). Berdasarkan uji ANOVA pada taraf kepercayaan 95% didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel}$, hal ini menunjukkan perlakuan perbedaan jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata. Kemudian

dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Tukey. Nilai kadar air ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai Kadar Air Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*.

Perlakuan			Kadar air (%)
Waktu Ekstraksi	Pelarut		
15 menit	N-Heksan		9,84±0,20 ^c
	Etil Asetat		8,64±0,44 ^b
	Etanol		15,80±0,20 ^e
25 menit	N-Heksan		5,63±0,19 ^a
	Etil Asetat		10,35±0,05 ^c
	Etanol		17,53±0,26 ^f
35 menit	N-Heksan		6,09±0,07 ^a
	Etil Asetat		6,39±0,38 ^a
	Etanol		13,46±0,14 ^d

Berdasarkan hasil uji lanjut tukey, didapatkan perbedaan pada setiap interaksi perlakuan yang ditunjukkan dengan adanya notasi yang berbeda. Pada Tabel 3, menunjukkan kadar air ekstrak n-heksan 15 menit berpengaruh namun tidak nyata dengan ekstrak etil asetat 25 menit. Begitu juga pada ekstrak n-heksan 25 menit yang berpengaruh namun tidak nyata dengan ekstrak n-heksan 35 menit dan ekstrak etil asetat 35 menit. Sedangkan pada ekstrak etil asetat 15 menit berpengaruh nyata dengan ekstrak lainnya. Hal ini sama dengan ekstrak 15 etanol menit, ekstrak etanol 25 menit dan ekstrak etanol 35 menit yang juga berpengaruh nyata dengan perlakuan lainnya.

Nilai kadar air pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan lama waktu ekstraksi sonikasi 15 menit didapatkan nilai kadar air tertinggi pada ekstrak etanol sebesar 15,80±0,20%, sedangkan kadar air terendah didapatkan pada ekstrak etil asetat sebesar 8,64±0,44%. Pada ekstrak dengan lama waktu 25 menit juga didapatkan kadar air tertinggi pada ekstrak etanol dengan nilai 17,53±0,26% dan terendah pada ekstrak n-heksan 5,63±0,19%. Begitu juga pada ekstrak dengan lama waktu ekstraksi 35 menit didapatkan nilai tertinggi pada ekstrak etanol sebesar 13,46±0,14% dan terendah pada ekstrak n-heksan sebesar

6,09±0,77%. Pelarut etanol memiliki kandungan air yang tertinggi karena dapat melarutkan senyawa-senyawa dalam tepung daun saat proses ekstraksi termasuk golongan senyawa yang larut air, sehingga kadar air dalam ekstrak etanol cenderung tinggi.

Berdasarkan gambar tersebut, dilihat dari kedua perlakuan pelarut dan lama waktu ekstraksi menunjukkan peningkatan kadar air ekstrak jika dibandingkan kadar air pada sampel tepung daun *Bruguiera gymnorhiza* yaitu sebesar 2,75±0,14%. Kenaikan kadar air pada ekstrak tersebut dimungkinkan terjadi karena penggunaan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol dengan menggunakan pelarut teknis. Pelarut teknis memiliki konsentrasi kadar kemurnian kurang lebih 96% sehingga sisa 4% tersebut berupa air. Air dalam pelarut teknis tersebut dapat mempengaruhi kadar air ekstrak dengan menyumbang air sehingga kadar air pada ekstrak menjadi meningkat.

Kadar air terendah dari kombinasi kedua perlakuan terdapat pada ekstrak n-heksan dengan lama waktu ekstraksi 25 menit sebesar 5,63±0,19%, sedangkan kadar air tertinggi didapatkan pada ekstrak etanol dengan lama waktu ekstraksi 25 menit sebesar 17,530,26%. Ekstrak pada penelitian ini tergolong kedalam ekstrak kental. Menurut Irsyad (2013), Ada beberapa jenis ekstrak, yakni ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering. Ekstrak cair jika hasil ekstraksi masih bisa dituang, biasanya kadar air lebih dari 30%. Ekstrak kental jika melebihi kadar air antara 5-30% sedangkan ekstrak kering jika mengandung kadar air kurang dari 5%. Kadar air dalam ekstrak atau produk berhubungan dengan daya tahan ekstrak atau produk tersebut. Menurut Pardede, *et al.* (2013), produk dengan kadar air tinggi akan dapat menjadi media bagi mikroorganisme, sehingga produk dengan kadar air yang rendah relatif lebih stabil dalam penyimpanan jangka panjang jika dibandingkan dengan ekstrak atau produk yang memiliki kadar air yang tinggi.

4.1.3 Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Uji fitokimia digunakan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada suatu ekstrak. Pada penelitian ini dilakukan secara kualitatif dengan membandingkan kekuatan berdasarkan kepekatan warna dari setiap perlakuan. Hasil uji fitokimia ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*.

Jenis Uji	Pelarut	Perlakuan			Literatur Pemanding (Dia, et al. 2015)
		15 menit	25 menit	35 menit	
Alkaloid	N-heksan	-	-	-	-
	Etil asetat	-	-	-	-
	Etanol	-	++	-	-
Flavonoid	N-heksan	+	+	+	+
	Etil asetat	+	++	+	+++
	Etanol	++	+++	++	+++
Tanin	N-heksan	+	+	+	-
	Etil asetat	+	+	+	+
	Etanol	+	++	+	+
Triterpenoid	N-heksan	-	-	-	+
	Etil asetat	-	-	-	+
	Etanol	++	+++	++	+
Steroid	N-heksan	+	+	+	+
	Etil asetat	+	++	+	++
	Etanol	-	++	-	++
Saponin	N-heksan	-	-	-	+
	Etil asetat	-	-	-	+
	Etanol	+	+	+	+

Keterangan : (-) = tidak terdeteksi; (+) = positif lemah; (++) = positif kuat (pekat); (+++) = positif sangat kuat (sangat pekat)

Berdasarkan Tabel 4. apabila dilihat dari interaksi kedua perlakuan menunjukkan pada lama waktu ekstraksi 25 menit terjadi peningkatan kepekatan warna terutama pada pelarut etil asetat dan etanol jika dibandingkan dengan lama waktu ekstraksi 15 dan 35 menit. Hal ini dikarenakan pada lama waktu ekstraksi 25 menit merupakan waktu ekstraksi yang optimal untuk pelarut menarik senyawa metabolit sekunder dalam sampel. Sedangkan pada lama waktu ekstraksi 35 menit

sebagian besar mengalami penurunan karena proses ekstraksi sonikasi yang menggunakan pelarut dan pemanasan yang terlalu lama membuat senyawa metabolit tersebut menguap dan rusak akibat paparan panas yang terlalu lama.

Menurut Yuliantari, *et al.* (2017), waktu ekstraksi yang lama serta melampaui batas waktu optimum dapat menyebabkan hilangnya senyawa-senyawa pada larutan

karena penguapan, begitu juga sebaliknya jika waktu ekstraksi terlalu singkat akan menyebabkan tidak semua senyawa metabolit sekunder terekstraksi dari bahan dan menghasilkan rendahnya senyawa yang diperoleh. Diperkuat oleh Fitoni, *et al.* (2013), hampir semua senyawa terutama senyawa fenol mengalami kerusakan akibat suhu pemanasan 85°C dengan lama pemanasan lebih dari 5 menit.

Hasil uji fitokimia senyawa alkaloid dari kedua perlakuan perbedaan lama waktu ekstraksi dan pelarut menunjukkan positif terdeteksi adanya alkaloid hanya pada ekstrak etanol 25 menit. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih saat direaksikan dengan reagen Mayer. Menurut Arundhina, *et al.* (2014), endapan putih berasal dari reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam pereaksi-pereaksi. Alkaloid pada umumnya ditemukan pada pelarut non polar. Akan tetapi, pada penelitian ini alkaloid teridentifikasi pada ekstrak etanol yang merupakan pelarut polar, sehingga alkaloid yang terkandung dalam ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* bersifat polar. Menurut Handayani (2013), ditemukan juga senyawa alkaloid pada ekstrak kasar daun mangrove api-api pada pelarut polar. Alkaloid yang tergolong kedalam kelompok pseudoalkaloid dan protoalkaloid dapat larut dalam air yang merupakan senyawa polar. Hal ini menunjukkan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* tidak mengandung alkaloid yang sesungguhnya yang bersifat racun, akan tetapi hanya mengandung protoalkaloid dan pseudoalkaloid.

Senyawa alkaloid hanya teridentifikasi pada ekstrak etanol dengan perlakuan lama waktu ekstraksi 25 menit. Senyawa alkaloid yang ditemukan ini sifatnya polar, namun pada lama waktu ekstraksi 15 menit dan 35 menit senyawa ini tidak teridentifikasi. Hal ini diduga senyawa alkaloid baru bisa terekstrak pada lama waktu ekstraksi 25 menit. Akan tetapi, pada lama waktu ekstraksi 35 menit senyawa ini mengalami penurunan dikarenakan senyawa alkaloid yang mudah menguap yang diakibatkan proses ekstraksi sonikasi dengan menggunakan panas dan gelombang ultrasonik. Hal ini dikuatkan oleh Widodo (2007), seperti pada senyawa alkaloid yang merupakan senyawa mudah menguap. Dimungkinkan terjadi penguapan senyawa alkaloid karena suhu yang digunakan saat ekstraksi dan lama waktu yang lebih lama.

Pada penelitian ini teridentifikasi senyawa alkaloid pada ekstrak etanol 25 menit. Jika dibandingkan dengan penelitian Dia, *et al.* (2015), tidak teridentifikasi senyawa alkaloid pada semua ekstrak. Hal ini diduga karena metode ekstraksi sonikasi menggunakan gelombang ultrasonik yang mengakibatkan kavitasi untuk membantu dalam membuka membran sel sehingga memudahkan dalam mengekstrak senyawa yang ada dalam sampel, seperti senyawa alkaloid.

Hasil uji fitokimia ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* selanjutnya menunjukkan positif terdapat senyawa flavonoid pada semua perlakuan. Flavonoid diketahui sebagai senyawa khas yang terdapat pada tumbuhan hijau. Adanya kandungan senyawa flavonoid didapatkan dengan mereaksikan serbuk magnesium dan ditetesi HCl yang kemudian terjadi perubahan warna. Menurut Arundhina, *et al.* (2014), terbentuknya flavonoid karena adanya pemutusan ikatan glikosida melalui reduksi ikatan menggunakan serbuk Mg dan HCl pekat.

Flavonoid yang sudah bebas, kemudian ditarik oleh amil alkohol, sehingga amil alkohol yang mulanya tidak berwarna menjadi berwarna pada akhir reaksi.

Flavonoid merupakan senyawa non polar yang dapat larut pada pelarut polar seperti etanol. Akan tetapi, flavonoid juga ditemukan pada ekstrak n-heksan yang sifatnya non polar. Selain itu senyawa flavonoid yang memiliki ikatan dengan gugus gula sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, aseton, dan lain sebagainya. Menurut Astarina, *et al.* (2013), aglikon yang bersifat kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon serta flavonol cenderung lebih mudah larut dalam pelarut organik yang kurang polar seperti n-heksan dan etil asetat yang bersifat semi polar. Senyawa flavonoid pada penelitian ini teridentifikasi pada semua perlakuan.

Senyawa flavonoid yang teridentifikasi pada ekstrak n-heksan tidak mengalami perbedaan, akan tetapi pada ekstrak etil asetat dan etanol mengalami perbedaan kepekatan pada lama waktu ekstraksi 15, 25 dan 35 menit. Pada lama waktu ekstraksi 25 menit terjadi peningkatan kepekatan pada ekstrak etil asetat dan etanol, namun pada lama waktu ekstraksi 35 menit keduanya mengalami penurunan. Hal ini diduga senyawa flavonoid yang mengalami kerusakan akibat terkena paparan panas dan udara yang terlalu lama. Hal ini diperkuat oleh Rahayu, *et al.* (2015), senyawa flavonoid mudah teroksidasi pada suhu yang tinggi. Struktur flavonoid yang merupakan senyawa fenol memiliki ikatan glikosida yang akan rusak atau putus pada suhu tinggi. Selain itu, terdapatnya oksigen akan menguraikan senyawa flavonoid.

Apabila dibandingkan dengan penelitian Dia, *et al.* (2015), senyawa flavonoid yang teridentifikasi menunjukkan kekuatan yang lebih pekat, baik pada pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol. Hal ini diduga karena metode maserasi yang dilakukan selama 24 jam dapat memaksimalkan kontak pelarut dengan bahan. Selain itu metode ini tanpa menggunakan perlakuan panas yang tidak

merusak suatu senyawa, sehingga senyawa flavonoid yang terekstrak lebih banyak jika dibandingkan dengan metode ekstraksi sonikasi.

Hasil uji fitokimia menunjukkan positif terdapat senyawa tanin pada semua perlakuan yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman setelah ditambahkan FeCl_3 . Daun banyak mengandung senyawa fenolik, terutama dalam bentuk tanin. Pada penelitian ini tanin teridentifikasi pada pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol yang bersifat polar, semi polar dan non polar karena tanin bersifat semi polar. Menurut Septiana dan Asnani (2012), tanin bersifat semi polar sehingga kemungkinan kurang terekstrak oleh pelarut non polar (heksana) maupun pelarut yang polar (air). Ditambahkan oleh Prabowo, *et al.* (2014), pada senyawa tanin terdapat banyak gugus OH sehingga menyebabkan sifatnya polar maka senyawa tanin dapat larut dalam pelarut polar.

Apabila dilihat dari perlakuan perbedaan lama waktu ekstraksi, pada ekstrak n-heksan dan etil asetat memiliki hasil yang hampir semuanya sama dengan indikator warna yang menunjukkan positif lemah. Akan tetapi, pada ekstrak etanol terjadi peningkatan tingkat kepekatan pada lama waktu ekstraksi 25 menit. Akan tetapi terjadi penurunan kepekatan warna pada lama waktu ekstraksi 35 menit. Hal ini diduga senyawa tanin tergolong senyawa fenol dapat mengalami kerusakan apabila mendapatkan paparan panas secara terus-menerus dalam jangka waktu yang lama. Menurut Ditambahkan oleh Sukardi, *et al.* (2007), kandungan tanin mengalami peningkatan pada saat ekstraksi hingga mencapai titik optimalnya. Seiring dengan semakin lamanya waktu ekstraksi kandungan senyawa tanin akan menurun yang disebabkan senyawa tanin yang rusak akibat proses pemanasan secara terus-menerus pada saat ekstraksi.

Pada penelitian ini, senyawa tanin terdeteksi pada semua perlakuan. Jika dibandingkan dengan penelitian Dia, *et al.* (2015), senyawa tanin terdeteksi pada

ekstrak etil asetat dan etanol, namun tidak teridentifikasi pada ekstrak n-heksan.

Hal ini diduga metode ekstraksi sonikasi menggunakan gelombang ultrasonik yang membantu dalam memaksimalkan ekstraksi senyawa tanin dengan cara membuka membran sel pada bahan sehingga memudahkan senyawa tanin dapat terekstrak.

Hasil uji fitokimia menunjukkan positif terdapat senyawa triterpenoid hanya pada pelarut etanol. Terdapatnya senyawa triterpenoid ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi merah bata setelah ditetesi H_2SO_4 , sedangkan adanya senyawa steroid terdeteksi pada pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol 25 menit ditandai dengan adanya perubahan warna biru menjadi hijau kebiruan. Menurut Gafur, *et al.* (2014), adanya kandungan senyawa steroid pada fraksi n-heksan dan etil asetat serta etanol pada lama waktu ekstraksi 25 menit yang ditandai dengan adanya perubahan warna coklat dan terbentuk cincin hijau steroid. Steroid tergolong kedalam senyawa triterpenoid yang merupakan salah satu jenis lemak sehingga dapat larut hanya pada pelarut non polar ataupun semi polar. Akan tetapi senyawa steroid juga terdeteksi pada pelarut etanol yang bersifat polar. Pada senyawa triterpenoid terdeteksi hanya pada pelarut etanol yang sifatnya polar. Hal ini dikarenakan terdapat beberapa senyawa triterpenoid memiliki struktur siklik yang berupa alkohol yang memiliki gugus OH dan dapat terikat dengan gugus gula sehingga akan tertarik oleh pelarut yang bersifat semi polar ataupun pelarut polar (Astarina, *et al.* 2013).

Senyawa steroid yang terdeteksi pada pelarut n-heksan dan etil asetat dengan perlakuan lama waktu ekstraksi 15, 25 dan 35 menit menunjukkan tingkat kepekatan warna yang berbeda. Pada pelarut n-heksan dan etil asetat terjadi peningkatan kepekatan warna pada lama waktu ekstraksi 25 menit. Akan tetapi terjadi penurunan kepekatan warna pada perlakuan lama waktu ekstraksi 35 menit. Hal ini diduga karena senyawa steroid dan triterpenoid yang tidak tahan

panas, mengalami kerusakan pada saat proses ekstraksi yang menggunakan paparan panas dengan waktu yang cukup lama. Menurut Maslukhah, *et al.* (2016), semakin lama waktu ekstraksi akan menyebabkan berkurangnya kontak pelarut dengan bahan yang telah berada dititik jenuh dan menyebabkan terjadinya kerusakan senyawa sehingga akan menurunkan tingkat kepekatan warna pada suatu senyawa.

Apabila dibandingkan dengan penelitian Dia, *et al.* (2015), senyawa triterpenoid teridentifikasi pada semua ekstrak yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol, sedangkan pada penelitian ini hanya terdeteksi pada ekstrak etanol. Begitu juga pada senyawa steroid yang teridentifikasi pada semua ekstrak yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol, sedangkan pada penelitian ini teridentifikasi pada n-heksan, etil asetat dan etanol 25 menit. Hal ini diduga karena metode ekstraksi maserasi dapat memaksimalkan kontak pelarut dengan bahan yang dilakukan selama 24 jam tanpa menggunakan panas sehingga merusak senyawa. Maka dari itu, senyawa ini dapat terekstraksi secara maksimal.

Hasil uji fitokimia menunjukkan positif mengandung senyawa saponin pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza* yang hanya terdapat pada ekstrak etanol. Menurut Prabowo, *et al.* (2014), saponin merupakan jenis glikosida yang umumnya banyak ditemukan pada tumbuhan, memiliki karakteristik berupa buih, mudah larut dalam pelarut polar dan tidak larut dalam pelarut non polar. Adanya kandungan senyawa saponin diindikasikan terdapatnya busa setelah ditambahkan aquades kemudian dikocok secara vertikal. Ditambahkan oleh Arundhina, *et al.* (2014), busa tersebut dihasilkan dari senyawa yang memiliki gugus polar dan non-polar bersifat aktif permukaan, sehingga saat dikocok dengan air, saponin dapat membentuk misel. Pada struktur misel gugus polar menghadap ke luar, sedangkan gugus non-polarnya menghadap ke dalam, keadaan inilah yang tampak seperti

busa. Pada ekstrak etanol dengan perlakuan lama waktu 15, 25 dan 35 menit terdeteksi adanya busa sedikit sehingga yang tergolong kedalam tingkat lemah. Menurut Dewi (2015), tingkat kekuatan senyawa saponin dipengaruhi oleh proses pemanasan, perendaman dan perebusan.

Jika dibandingkan dengan penelitian Dia, *et al.* (2015), senyawa saponin yang teridentifikasi pada semua perlakuan yaitu pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol, sedangkan pada penelitian ini hanya teridentifikasi pada ekstrak etanol. Hal ini diduga karena metode senyawa maserasi membuat kontak pelarut dengan bahan selama 24 jam tanpa menggunakan panas yang dapat merusak suatu senyawa sehingga ekstraksi lebih maksimal. Maka dari itu, senyawa saponin dapat terekstrak hampir pada semua pelarut jika dibandingkan dengan metode ekstraksi sonikasi.

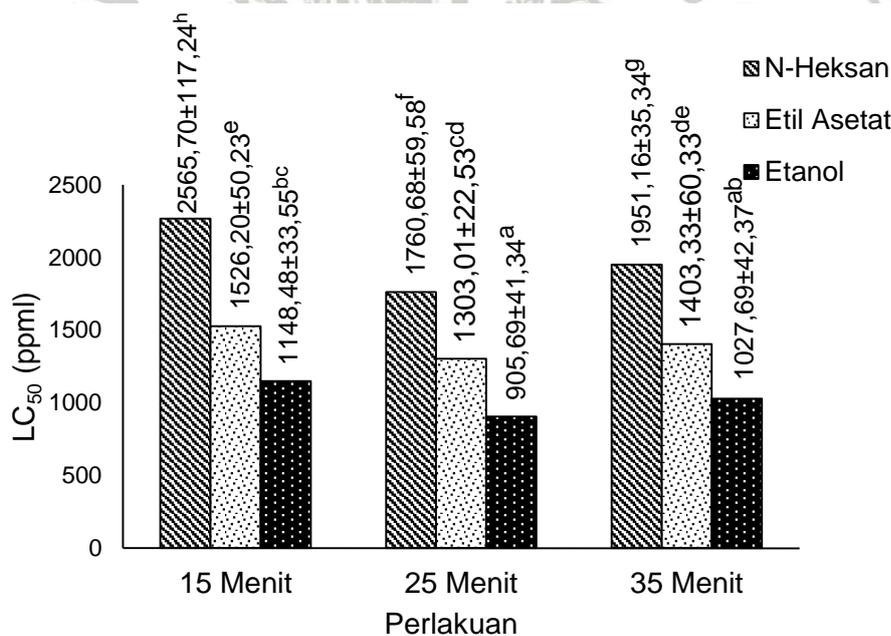
Berdasarkan Tabel 4, pada perlakuan pelarut berbeda didapatkan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* banyak terdeteksi pada pelarut etanol daripada pelarut n-heksan dan etil asetat. Selain itu, pelarut etanol juga memiliki tingkat kepekatan warna yang lebih pekat jika dibandingkan dengan pelarut lainnya. Hal ini dikarenakan pelarut etanol yang bersifat polar dapat melarutkan sebagian besar senyawa metabolit yang ada pada sampel. Menurut Susanti (2009), etanol mempunyai dua gugus hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat nonpolar. Adanya kedua gugus tersebut dapat menarik senyawa-senyawa yang ada dalam suatu sampel dengan tingkat kepolaran yang berbeda.

4.4 Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Uji toksisitas Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza* dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Data yang didapatkan dari hasil pengamatan berdasarkan tingkat kematian larva *Artemia salina* Leach.

pada masing-masing perlakuan setelah 24 jam. Data tersebut dihitung dengan memasukkan kedalam persamaan regresinya sehingga didapatkan nilai LC₅₀. Nilai LC₅₀ yang didapatkan kemudian dianalisis. Data perhitungan hasil uji toksisitas ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 19.

Nilai LC₅₀ dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan menggunakan rancangan acak lengkap factorial pada taraf kepercayaan 95%. Hasil ANOVA menunjukkan nilai Fhitung > Ftabel, dapat dikatakan perbedaan pelarut dan lama waktu ekstraksi memberikan pengaruh nyata. Setelah didapatkan hasil yang menunjukkan pengaruh nyata kemudian dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Tukey*. Nilai LC₅₀ ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Nilai LC₅₀ Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Pada hasil uji lanjut *tukey*, didapatkan ekstrak etanol 15 menit dengan ekstrak etil asetat 25 menit, ekstrak etil asetat 25 menit dengan ekstrak etil asetat 35 menit, ekstrak etil asetat 35 menit dengan ekstrak etil asetat 25 menit dan ekstrak etanol 35 menit dengan ekstrak etanol 25 menit menunjukkan berbeda

namun tidak nyata. Pada perlakuan lainnya menunjukkan berbeda nyata. Nilai LC_{50} pada waktu ekstraksi 15 menit, ekstrak n-heksan memiliki nilai tertinggi yaitu $2265.70 \pm 117,24$ ppm dan terendah pada ekstrak etanol sebesar $1148.48 \pm 33,55$ ppm. Sedangkan pada lama waktu ekstraksi 25 menit didapatkan nilai tertinggi pada ekstrak n-heksan sebesar $1760.68 \pm 59,58$ ppm dan ekstrak etanol memiliki nilai LC_{50} terendah sebesar $905.69 \pm 41,34$ ppm. Begitu juga pada lama waktu ekstraksi 35 menit didapatkan ekstrak n-heksan memiliki nilai LC_{50} yang tertinggi yaitu sebesar $1951.16 \pm 35,34$ ppm dan etanol memiliki nilai LC_{50} yang terendah sebesar $1027.69 \pm 42,37$ ppm. Berdasarkan hasil tersebut didapatkan bahwa perbedaan pelarut yang digunakan mempengaruhi nilai LC_{50} yang dihasilkan.

Sedangkan jika dilihat dari interaksi perlakuan perbedaan pelarut dan lama waktu ekstraksi menunjukkan pada lama waktu ekstraksi 25 menit memiliki nilai LC_{50} yang terendah sedangkan tertinggi pada lama waktu ekstraksi 15 menit baik pada pelarut n-heksan, etil asetat maupun etanol. Hal ini diduga pada lama waktu ekstraksi 25 menit memberikan waktu yang optimal untuk pelarut dalam ekstraksi daun *Bruguiera gymnorhiza*. Jika dilihat dari hasil uji fitkokimia pada lama waktu ekstraksi 25 menit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang banyak jika dibandingkan dengan 15 menit dan 25 menit. Senyawa metabolit tersebut diduga dapat membunuh larva *Artemia salina* Leach.

Apabila dilihat dari kedua perlakuan tersebut didapatkan nilai LC_{50} terendah terdapat pada ekstrak etanol dengan lama waktu ekstraksi 25 menit yaitu sebesar $905.69 \pm 41,34$ ppm. jika dibandingkan dengan hasil penelitian Budiyanto (2015), nilai LC_{50} ekstrak methanol daun *Bruguiera gymnorhiza* sebesar 1372.52 ppm. Begitupun dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Hamdi (2016), ekstrak kasar methanol daun Lindur menunjukkan nilai LC_{50} yang tidak toksik yaitu sebesar 1950.14 ppm. Nilai LC_{50} ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorhiza* pada

penelitian ini lebih kecil dibandingkan dengan nilai LC₅₀ penelitian sebelumnya.

Akan tetapi, jika dilihat dari hasil nilai LC₅₀ yang didapatkan pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorhiza* dapat dikatakan tidak aktif atau tidak toksik karena memiliki nilai LC₅₀ > 1000 ppm, hanya ekstrak etanol dengan lama waktu ekstraksi 25 menit yang memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm. Tingkat toksik LC₅₀ dapat dibagi menjadi berbagai tingkatan, 0-250 ppm menandakan senyawa tersebut sangat Toksik, 250-500 ppm bersifat Toksik, 500-750 ppm bersifat toksik sedang dan 750-1000 ppm bersifat tidak toksik (Aras, 2013). Ditambahkan oleh Anwar, *et al.* (2014), suatu ekstrak memiliki potensi sebagai antibakteri apabila memiliki nilai LC₅₀ sebesar 30-200 ppm.

Ekstrak etanol memiliki nilai yang LC₅₀ tinggi karena mampu menarik senyawa metabolit sekunder dalam daun *Bruguiera gymnorhiza* diantaranya alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid, steroid dan saponin yang diduga memiliki sifat toksik. Mekanisme kematian larva *Artemia salina* Leach. berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, tanin dan saponin yang menghambat daya makan larva (antifedant). Senyawa tersebut bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu.

Senyawa ini akan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan akibatnya larva mati kelaparan (Vitalia, *et al.* 2016).

Menurut Ginting, *et al.* (2014), kandungan senyawa flavonoida yang terkandung dalam suatu bahan dapat mengandung glikosida sehingga senyawa ini masih berperan menyumbang aktivitas sitotoksik. Dalam hal ini senyawa flavonoid diduga yang menyumbang keaktifan dalam menghambat pertumbuhan larva *Artemia salina* Leach. dengan cara merusak struktur dinding sel, menghambat

kerja enzim, menghambat fungsi membran sel, dan atau menghambat sintesis protein dan asam nukleat. Selain itu ditambahkan oleh Budiyanto (2015), senyawa steroid dan saponin dapat membunuh larva *Artemia salina* Leach. dengan merusak organ perasa sehingga menghentikan asupan makanannya. Sedangkan saponin menurut Vitalia, *et al.* (2016), mengandung glikosida dalam tanaman yang sifatnya menyerupai sabun dan dapat larut dalam air yang dapat menurunkan aktivitas enzim pencernaan dan penyerapan makanan.

4.2 Penelitian Utama

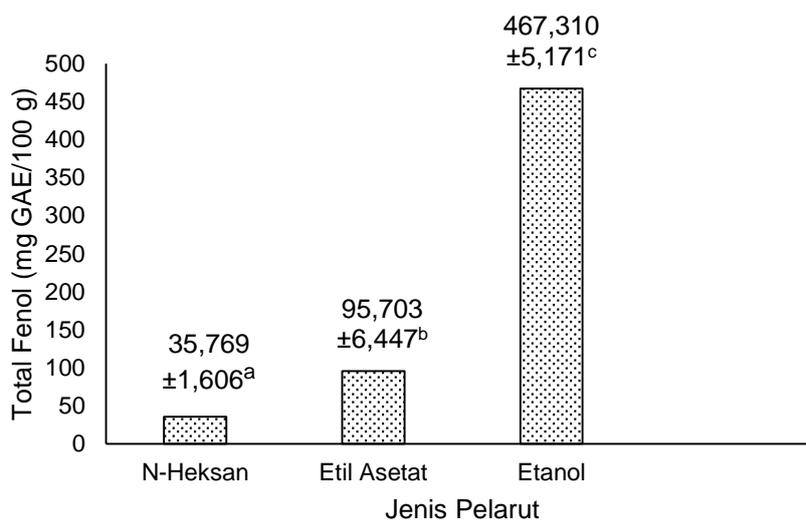
4.2.1 Uji Total Fenol Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Perlakuan terbaik ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan lama waktu ekstraksi 25 menit, dilakukan uji lanjut menggunakan pengujian total fenol. Uji kandungan total fenol pada penelitian ini menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Hasil pengukuran absorbansi pada setiap ekstrak dimasukkan kedalam persamaan regresi asam galat. Persamaan regresi kurva standard asam galat didapatkan dari hasil perhitungan standard asam galat, yaitu $y = 0,0958x + 0.1808$ dengan koefisien determinasi (R^2) = 0,9813. Kemudian dihitung menghitung kadar konsentrasi fenol dan total fenol dengan menggunakan rumus perhitungan total fenol. Kandungan fenolik total pada suatu ekstrak dinyatakan dalam ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE). GAE merupakan acuan umum untuk mengukur sejumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan (Samin, *et al.* 2014). Perhitungan nilai total fenol ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 21.

Nilai total fenol yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan menggunakan rancangan acak lengkap pada taraf kepercayaan 95%. Hasil yang didapatkan berdasarkan uji ANOVA nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka dari perlakuan perbedaan pelarut memberikan pengaruh

nyata terhadap nilai total fenol ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza*.

Kemudian dilakukan uji lanjut menggunakan uji BNT (beda nyata terkecil) untuk mengetahui pengaruh perbedaan dari setiap perlakuan. Nilai total fenol ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Nilai Total Fenol Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Pada hasil uji lanjut BNT, didapatkan perbedaan pada setiap kombinasi perlakuan yang ditunjukkan dengan adanya notasi yang berbeda. Berdasarkan Gambar 10, menunjukkan perlakuan perbedaan pelarut yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol dengan metode ekstraksi sonikasi berbeda dan berpengaruh nyata.

Kandungan total fenol tertinggi terdapat pada ekstrak etanol sebesar 467,310±5,171 mg GAE/100 g, sedangkan total fenol terendah terdapat pada ekstrak n-heksan sebesar 35,768±1,606 mg GAE/100 g. Pada ekstrak etanol didapatkan nilai total fenol yang tertinggi jika dibandingkan dengan ekstrak lainnya, hal ini disebabkan karena ekstrak etanol mengandung banyak senyawa-senyawa metabolit sekunder yang tergolong kedalam senyawa fenol. Menurut Ukieyanna (2012), perbedaan tingkat kepolaran pelarut menentukan struktur kimia senyawa fenolik yang terekstrak. Senyawa fenolik yang mempunyai gugus fungsi hidroksil

yang banyak atau dalam kondisi bebas (aglikon) akan menghasilkan kandungan fenolik total yang tinggi.

Apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Haq, *et al.* (2011), total fenol pada ekstrak methanol daun lindur dengan menggunakan metode maserasi sebesar 178.73 mg GAE/100 g, maka total fenol dengan menggunakan metode ekstraksi sonikasi lebih tinggi. Penggunaan pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda dapat mempengaruhi nilai total fenol pada suatu sampel. Kelarutan senyawa fenolik bergantung pada pelarut yang digunakan. Komponen polifenol memiliki spektrum yang luas dengan sifat kelarutan yang berbeda-beda. Hal inilah yang menyebabkan sulitnya prosedur ekstraksi yang cocok untuk mengekstrak fenolik pada tanaman (Samin, *et al.* 2014).

Tingginya total fenol pada ekstrak etanol menandakan senyawa fenol pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* banyak larut dalam pelarut polar. Hal ini sesuai dengan Kasminah (2016), senyawa fenol cenderung larut dalam pelarut polar. Komponen fenol larut air pada umumnya dapat diekstrak dengan etanol, methanol, air, dan aseton. Etanol mempunyai polaritas yang mendekati polaritas fenol pada tanaman sehingga dapat digunakan sebagai pelarut pada ekstraksi. Selain itu etanol merupakan pelarut alkohol yang paling aman diantara yang lain karena diperoleh dari sumber biologis dengan proses fermentasi dan termasuk dalam kategori GRAS (*Generally recognized as safe*).

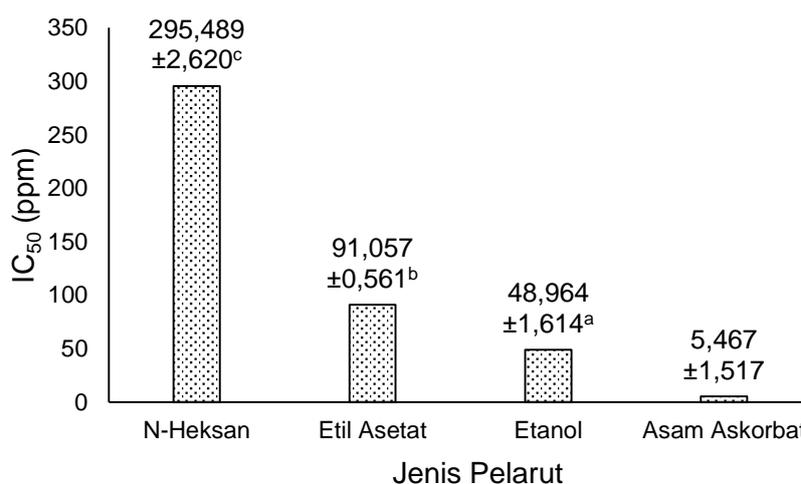
4.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil).

Data hasil absorbansi yang didapatkan dari absorbansi menggunakan spektrofotometr UV-Visible dengan panjang gelombang 517 nm kemudian dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier untuk mendapatkan nilai IC₅₀. Nilai

IC₅₀ yang didapatkan kemudian dilakukan analisis. Data perhitungan uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Lampiran 22.

Analisis nilai IC₅₀ dilakukan dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan menggunakan rancangan percobaan rancangan acak lengkap (RAL) pada taraf kepercayaan 95%. Berdasarkan hasil analisis uji ANOVA didapatkan hasil nilai Fhitung > Ftabel, hal ini menunjukkan perlakuan perbedaan pelarut memberikan pengaruh nyata terhadap nilai IC₅₀ pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Apabila hasil uji menunjukkan pengaruh yang nyata, maka diperlukan uji lanjut dengan menggunakan uji BNT (beda nyata terkecil). Nilai IC₅₀ ekstrak kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 24. Nilai IC₅₀ Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Pada hasil uji lanjut BNT, didapatkan perbedaan pada setiap kombinasi perlakuan yang ditunjukkan dengan adanya notasi yang berbeda. Berdasarkan Gambar 24, nilai IC₅₀ pada setiap perlakuan pelarut yang berbeda menunjukkan pengaruh yang nyata. Nilai IC₅₀ tertinggi dihasilkan pada ekstrak n-heksan sebesar 295,489±2,620 ppm, sedangkan nilai LC₅₀ terendah didapatkan pada ekstrak etanol dengan nilai IC₅₀ sebesar 48,108±1,614 ppm. Nilai IC₅₀ yang semakin

rendah menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada ekstrak tersebut semakin kuat. Nilai IC_{50} yang terendah terdapat pada ekstrak etanol sehingga ekstrak tersebut yang memiliki aktivitas antioksidan yang terbaik jika dibandingkan dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. Hal ini dapat terjadi karena ekstrak etanol mengandung lebih banyak senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit yang terdapat pada ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan, sehingga dengan banyaknya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan membuat nilai IC_{50} semakin rendah. Menurut Nurjanah, *et al.* (2015), senyawa-senyawa yang biasanya memiliki aktivitas antioksidan adalah golongan senyawa fenolik yang memiliki golongan hidroksil tersubstitusi dalam posisi ortho menjadi $-OH$ dan $-OR$ seperti senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid menurut Ridho (2013) merupakan senyawa perduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena dapat menstabilkan radikal elektron kepada senyawa radikal bebas, dimana $R\cdot$ merupakan senyawa radikal bebas, $FI-OH$ merupakan senyawa flavonoid sedangkan $FI-OH\cdot$ merupakan radikal flavonoid. Sedangkan ekstrak n-heksan memiliki nilai IC_{50} yang cukup tinggi menurut Nurjanah, *et al.* (2015), dapat disebabkan pelarut n-heksan yang dapat menarik komponen non-polar seperti halnya minyak esensial, lemak dan lilin yang tidak berpotensi memiliki aktivitas antioksidan.

Pada penelitian ini juga menggunakan asam askorbat (vitamin C) untuk diuji aktivitas antioksidannya sebagai pembandingan. Penggunaan asam askorbat sebagai pembandingan dikarenakan asam askorbat merupakan salah satu antioksidan yang biasa digunakan oleh masyarakat. Pada pengujian asam aktivitas antioksidan asam askorbat dilakukan pada konsentrasi 2, 4, 8, 16 dan 32 ppm. Nilai IC_{50} yang didapatkan dari asam askorbat sebesar $5,467 \pm 1,517$ ppm.

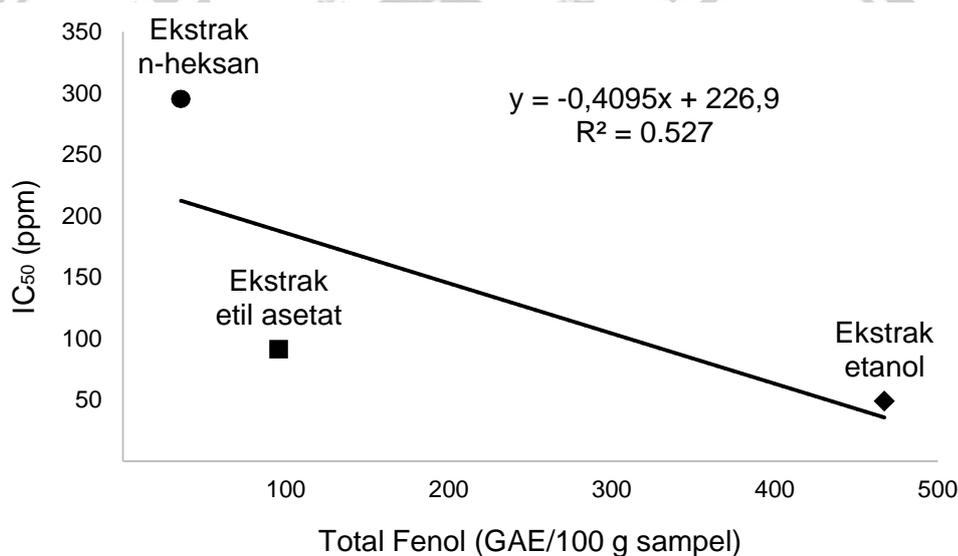
Ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorrhiza* memiliki nilai IC_{50} terbaik sebesar $48.108 \pm 1,61$ ppm, jika dibandingkan dengan kontrol positif pada penelitian ini yaitu asam askorbat sebesar $34,720 \pm 1,517$ ppm, maka IC_{50} asam askorbat jauh lebih rendah dari pada ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Apabila dibandingkan dengan Dia, *et al.* (2015), ekstrak tepung daun Lindur yang diekstraksi menggunakan metode maserasi menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 34.2723 ppm, ekstrak etanol pada penelitian ini dengan metode ekstraksi sonikasi lebih lemah jika dibandingkan dengan metode maserasi. Hal ini disebabkan penggunaan metode ekstraksi yang berbeda membuat nilai IC_{50} yang dihasilkan juga berbeda. Pada metode ekstraksi maserasi dilakukan selama 24 jam membuat kontak pelarut dan sampel lebih lama. Hal ini juga dapat membuat penetrasi pelarut dalam mengekstrak senyawa yang ada pada sampel tersebut lebih maksimal. Sedangkan pada metode sonikasi diperlukan waktu yang singkat sehingga penetrasi pelarut dalam mengekstrak sampel kurang maksimal. Akan tetapi, jika dilihat dari tingkatan kekuatan aktivitas antioksidannya, ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorrhiza* tergolong sangat kuat. Sebuah senyawa dapat diklasifikasikan sebagai antioksidan sangat kuat ketika nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat 50-100 ppm, sedang jika nilai IC_{50} 100-150 ppm dan lemah ketika nilai IC_{50} diantara 150-200 ppm (Nurjanah, *et al.* 2015).

4.2.3 Hubungan Total Fenol dengan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Fenol merupakan senyawa alami terkandung dalam tumbuhan yang memiliki kemampuan aktivitas antioksidan. Senyawa fenol dapat menghambat adanya radikal bebas. Menurut Firdiyani, *et al.* (2015), senyawa metabolit sekunder yang dikenal sebagai sumber radical scavenger adalah golongan senyawa fenol, misalnya flavonol, flavonon, flavon, fenil propanoid, antakuinon,

atau lignin, senyawa-senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid. Maka dari itu, terdapatnya keterkaitan hubungan antara senyawa fenol dan aktivitas antioksidan, sehingga dalam pengujian aktivitas antioksidan suatu ekstrak diperlukan juga pengujian total fenol dalam ekstrak tersebut.

Hubungan antara aktivitas antioksidan dan total fenol dalam ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan nilai total fenol yang dinyatakan dalam mgGAE/100 g sampel, sedangkan aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀ dalam satuan ppm didapatkan hubungan yang berbanding lurus. Kurva hubungan total fenol dengan nilai aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Kurva Hubungan Nilai Total Fenol dengan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Berdasarkan Gambar 12. Diketahui hubungan total fenol (mgGAE/100 g) dengan aktivitas antioksidan (IC₅₀) pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* berbanding lurus. Semakin tinggi nilai total fenol maka aktivitas antioksidannya juga semakin kuat yang ditunjukkan semakin rendahnya nilai IC₅₀.

Pada ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* penelitian ini, nilai total fenol

tertinggi terdapat pada ekstrak etanol sebesar $467,310 \pm 5,171$ GAE/100 gram sampel yang juga memiliki nilai aktivitas antioksidan yang tertinggi ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar $48,964 \pm 1,614$ ppm. Sedangkan nilai total fenol terendah terdapat pada ekstrak n-heksan sebesar $35,769 \pm 1,606$ GAE/100 gram sampel yang juga memiliki nilai aktivitas antioksidan terendah ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar $295,489 \pm 2,620$ ppm.

Perbedaan tingkat kepolaran pelarut menentukan struktur kimia senyawa fenolik yang terekstrak. Semakin tinggi nilai total fenol maka kandungan senyawa fenol dalam sampel tersebut semakin banyak sehingga aktivitas antioksidannya semakin kuat. Menurut Ukieyanna (2012), total fenolik sangat tergantung pada struktur kimianya. Senyawa fenolik yang mempunyai gugus fungsi hidroksil dalam jumlah banyak atau dalam kondisi bebas (dalam bentuk aglikon) akan menghasilkan kandungan total fenolik yang tinggi. Sifat pelarut polar mampu menarik senyawa fenolik dalam jumlah yang banyak. Hal ini dikarenakan senyawa fenolik yang bersifat polar dapat larut dalam pelarut polar memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.

Tidak semua tingginya total fenol pada suatu ekstrak menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat. Menurut Ukieyanna (2012), kandungan fenol dari setiap ekstrak tidak selalu bersumber pada golongan senyawanya. Beberapa senyawa metabolit sekunder baik pada senyawa metabolit primer yang dihasilkan oleh tumbuhan dapat menjadi senyawa antioksidan ataupun senyawa pengganggu aktivitas antioksidan. Beberapa jenis fenolik dapat memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda tergantung pada strukturnya. Selain itu menurut Ridho (2013), adanya senyawa fenol yang terekstrak masih tidak murni. Seperti senyawa flavonoid yang juga tergolong senyawa fenol. Senyawa flavonoid yang masih dalam bentuk ekstrak tidak murni kemungkinan masih berikatan dengan gugus

glikosida. Gugus glikosida yang berikatan dengan flavonoid dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Hal ini dikarenakan aktivitas antioksidan akan meningkat dengan bertambahnya gugus hidroksil dan akan menurun dengan adanya gugus glikosida.

4.2.4 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS)

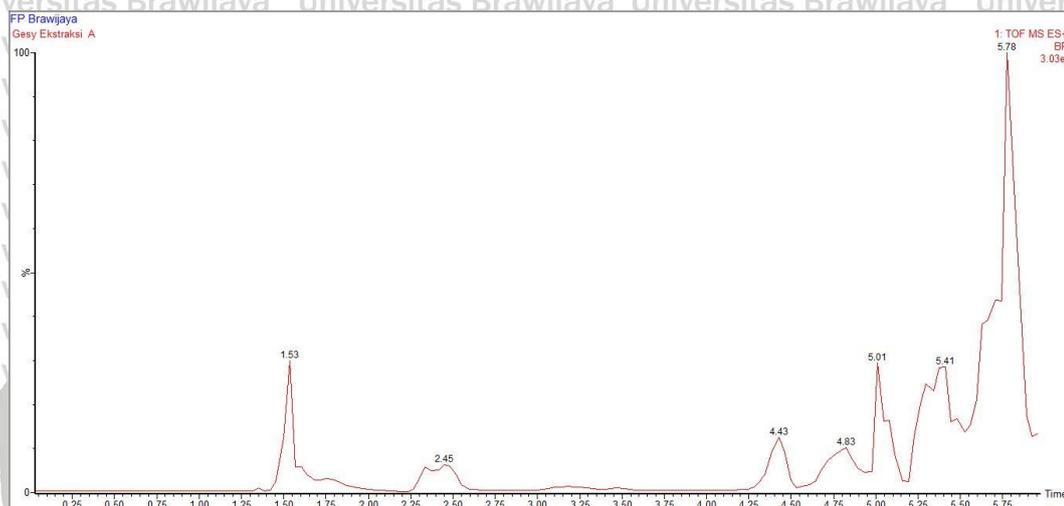
Ekstrak kasar Daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang terbaik yaitu ekstrak etanol yang memiliki aktivitas antioksidan terkuat dilakukan pengujian lanjut dengan menggunakan uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS). Pengujian *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS) berfungsi untuk menduga senyawa yang berperan dalam ekstrak tersebut. Identifikasi senyawa dilakukan melalui berat molekul pada senyawa tersebut sehingga didapatkan senyawa yang spesifik.

Liquid Chromatograph Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan suatu teknik analisis kimia yang memiliki kemampuan pemisahan yang sangat baik karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi. Hal ini dikarenakan penggunaan teknik kombinasi tandem kromatografi cair dan spektroskopi massa.

Pada analisis LC-MS pola ionisasi spektroskopi massanya menggunakan pola ionisasi ESI (*Electrospray Ionization*). Pada ESI-MS, fragmentasi jarang terjadi, namun quassimolecular ion, seperti $[M+H]^+$ sering terjadi (Khairan, *et al.* 2009).

Interpretasi hasil dari uji LC-MS dilakukan dengan menggunakan software *masslynx* yang akan memunculkan data dalam bentuk kromatogram (spectra mass), kemudian data yang didapatkan dalam bentuk berat molekul dan rumus kimia senyawa. Kromatogram pada LC-MS diketahui normal apabila eritromisin-A standar diambil pada RT 5,56-6,20 menit, yaitu pada waktu eritromisin-A mengalami degradasi, maka spektogramnya-massanya menunjukkan adanya

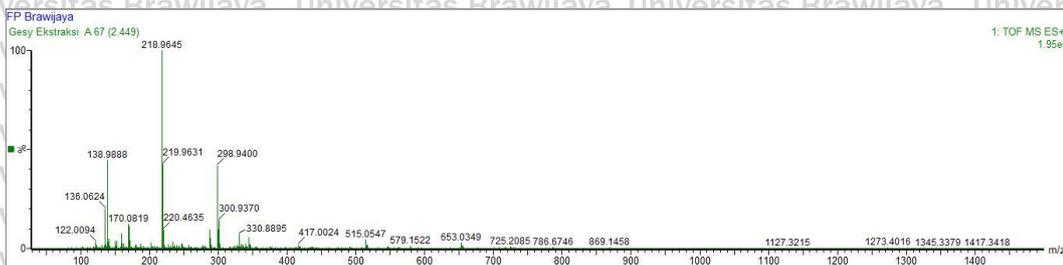
fragmentasi ion. Setelah itu dilakukan pencarian nama senyawa menggunakan database pada aplikasi chemspider dan massbank untuk mengetahui senyawa yang didapatkan. Hasil identifikasi senyawa bioaktif ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorhiza* dapat dilihat pada Lampiran 23. Kromatogram ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorhiza* dapat dilihat pada Gambar 13.



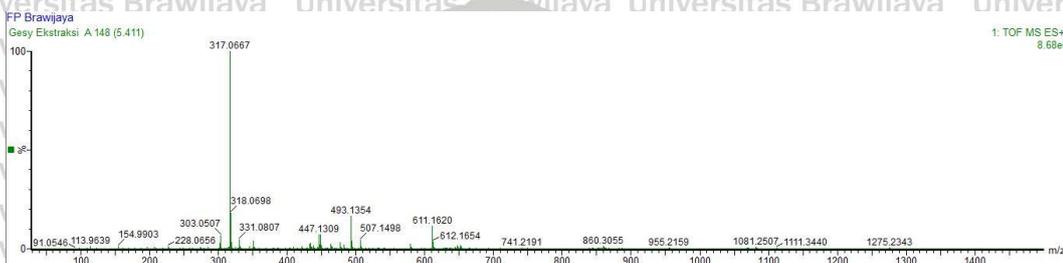
Gambar 13. Kromatogram Ekstrak Etanol Daun *Bruguiera gymnorhiza*

Berdasarkan hasil kromatogram pada Gambar 13. dapat diketahui senyawa yang berhasil teridentifikasi pada ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorhiza* pada menit ke 1,53; 2,45; 4,43; 4,83; 5,01; 5,41 dan 5,78. Senyawa yang teridentifikasi pada waktu tersebut sebagian besar terdapat pada puncak retensi waktu pada kromatogram. Namun pada waktu retensi menit ke 1,53; 4,43 dan 4,83 terdeteksi senyawa *3,6-diazol[1,2,4]triazol[4,3-b]pyridazine* dengan nomor massa 203,05, *naphtylamine* dengan nomor massa 144,08 dan *swertiajaponin* dengan nomor massa 463,12. Ketiga senyawa tersebut bukan termasuk senyawa yang dicari. Puncak yang dihasilkan pada masing-masing waktu retensi ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorhiza* dapat dilihat pada Gambar 14.

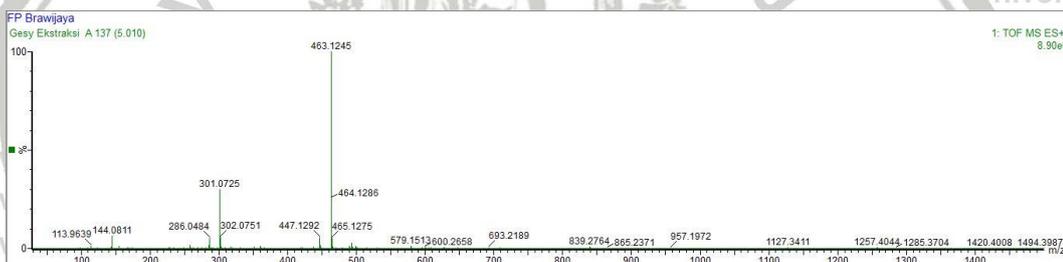
a) Rt 2,45



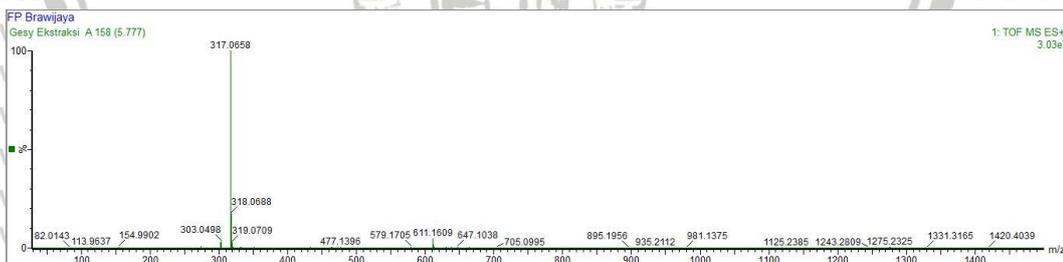
b) Rt 4,41



c) Rt 5,01



d) Rt 5,78



Gambar 14. a) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 2,45; b) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 4,41; c) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 5,01; c) Spektrum Massa pada Waktu Retensi 5,78.

Berdasarkan Gambar 14. ditemukan beberapa senyawa pada titik retensi waktu tertentu. Senyawa-senyawa tersebut diduga memiliki aktivitas antioksidan.

Berikut adalah dugaan senyawa yang bersifat antioksidan pada ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Tabel 5.



Tabel 5. Dugaan Senyawa yang Bersifat Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Perlakuan	Waktu Retensi	Massa Senyawa	Dugaan Senyawa	Rumus Molekul
Ekstrak	2,45	578,14	<i>Procyanidin</i>	$C_{30}H_{26}C_{12}$
	5,01	462,12	<i>Scoparin</i>	$C_{22}H_{22}O_{11}$
Etanol Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	5,41	317,07	<i>Isohamnetin</i>	$C_{16}H_{12}O_7$
	5,78	610,15	<i>Rutin</i>	$C_{27}H_{30}C_{16}$
	5,78	302,04	<i>Quarsetin</i>	$C_{15}H_{10}O_7$
	5,78	316,06	<i>Rhamnetin</i>	$C_{16}H_{12}O_7$

Senyawa bioaktif yang teridentifikasi pada ekstrak etanol daun *Bruguiera gymnorrhiza* diantaranya adalah *procyandin*, *scoparin*, *rutin*, *quarsetin* dan *rhamnetin*. Senyawa-senyawa tersebut diduga memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Sebagian besar senyawa yang didapatkan tersebut tergolong kedalam senyawa fenol yang larut dalam pelarut polar yaitu etanol.

Procyanidin tergolong kedalam senyawa tanin. *Procyanidin* adalah senyawa tanin yang terkondensasi menjadi produk polimerasi flavan-3-ols dan flavan 3,4-diol atau campuran dua polimer yang disebut sebagai flavans (Ismarani, 2012). *Procyanidin* menurut Wood, *et al.* (2001) lebih dikenal *Procydin* terdiri dari senyawa campuran golongan catechin, epicatechin dan golongan derivat lainnya yang sebagian besar memiliki ikatan ester O-gallat. *Procyanidin* memiliki jenis A dan *Procyanidin B* yang juga bersifat sebagai antioksidan. *Procyanidin A* memiliki kekuatan aktivitas antioksidan yang lebih baik jika dibandingkan dengan *Procyanidin B*.

Scoparin merupakan senyawa yang termasuk kedalam flavonoid. Senyawa ini banyak ditemukan pada tumbuhan. *Scoparin* tergolong kedalam flavonoid jenis flavon C-glikosida yang terikat pada gugus gula. Senyawa ini memiliki kemampuan sebagai aktivitas antioksidan (Gattuso, *et al.* 2007). Selain itu menurut Venkatalakshmi, *et al.* (2016), *scoparin* pada tumbuhan katapa memiliki kemampuan sebagai antikanker.



Rutin termasuk kedalam jenis flavonoid alami yang terdapat pada tumbuhan. *Rutin* merupakan senyawa flavonoid yang termasuk kedalam golongan flavonol OH-3 terdistribusi dengan OH pada posisi atom C nomor 5', 7', 4', 5' (Wijono, 2003). Menurut Sabrina, *et al.* (2013), *rutin* menjadi salah satu senyawa terbesar dalam golongan flavonoid selain *quarcetin*, sehingga biasanya *rutin* digunakan sebagai standard penetapan total flavonoid pada suatu ekstrak.

Quarcetin termasuk kedalam golongan flavonoid. *Quarcetin* adalah golongan flavonoid jenis flavonol yang banyak ditemukan dalam bunga maupun daun tumbuhan, namun hanya sedikit sekali yang ditemukan pada bagian tanaman yang berada dibawah permukaan tanah (Koirewoa, *et al.* 2012). *Quarcetin* Menurut Redha (2010), diketahui memiliki sifat sebagai antioksidan. *Quarcetin* sebagai antioksidan dapat melindungi LDL dari oksidasi.

Rhamnetin tergolong kedalam flavonoid. *Rhamnetin* dapat diperoleh dari pemurnian senyawa flavonoid. *Rhamnetin* merupakan senyawa aglikom flavonoid yang ditemukan paling besar dalam kandungan tumbuhan segar. Apabila dibandingkan dengan *luteolin* maka *rhamnetin* memiliki jumlah yang lebih banyak walaupun sama-sama tergolong senyawa flavonoid (Saddiqe, *et al.* 2011). Selain itu menurut Touil, *et al.* (2009), *rhamnetin* memiliki kemampuan sebagai sitotoksik pada sel kanker.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

- Jenis pelarut dengan metode sonikasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan pelarut yang tepat yaitu etanol sebesar $48,964 \pm 1,614$ ppm.
- Lama waktu ekstraksi dengan metode sonikasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan lama waktu ekstraksi yang tepat yaitu 25 menit.
- Interaksi jenis pelarut dan lama waktu ekstraksi dengan metode sonikasi menghasilkan aktivitas antioksidan paling kuat yaitu pelarut etanol dengan lama waktu ekstraksi 25 menit sebesar $48,964 \pm 1,614$ ppm. Senyawa yang teridentifikasi diduga memiliki aktivitas antioksidan yaitu *procyanidin*, *scoparin*, *isohamnetin*, *rutin*, *quarcetin* dan *rhamnetin*.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian ini diperlukan penelitian lebih lanjut seperti pengujian senyawa metabolit sekunder dan pemurnian senyawa untuk mendapatkan senyawa murni yang berperan sebagai antioksidan sehingga dapat diaplikasikan menjadi sebuah produk seperti suplemen.

DAFTAR PUSTAKA

Agustino, W.E.S., S.R.D Ariani., Ashadi, B. Mulyani, dan C.P. Rahmawati. 2014. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus Murr.*) Varietas Petruk. *J. Hasil Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia*. **6**: 271-280.

Allen, J.A., dan N.C. Duke. 2006. *Bruguiera gymnorrhiza* (Large-Leafed Mangrove). Species Profile for Pasific Island Agroforestry. *Traditional Tree Initiative*:1-15.

Anwar, S., E. Yulianti, A. Hakim, A.G. Fasya, B. Fauziah, dan R. Mutiah. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Akuades (Suhu Kamar) dan Akuades Panas (70°C) Daun Kelor (*Moringa oleifera Lamk.*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *J. Pangan dan Agroindustri*. **3**(1): 84-92.

Aras, T.R. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Teripang *Holothuria scabra* Terhadap *Artemia salina*. Skripsi. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Universitas Hasanuddin. Makassar. 39 hlm.

Arifianti, L., R.D. Oktarina, dan I. Kusumawati. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon Stamineus* Benth. *J. Planta Husada*. **2**(1).

Artini, P.E.U.D., K.W. Astuti, dan N.K. Warditiani. 2003. Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). Jurusan Farmasi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Udayana. Denpasar.

Arundhina, E., C.J. Soegihardjo, dan B.B.R. Sidharta. 2014. Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Alamanda (*Allamanda cathartica* L.) Sebagai Antijamur Terhadap *Candida albicans* dan *Pityrosporum ovale* Secara Invitro. Fakultas Teknobiologi Atmajaya. Yogyakarta.

Astarina, N.W.G., K.W. Astuti, dan N.K. Warditiani. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Broxb.). Jurusan Farmasi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Udayana. Denpasar.

Astuti, J., Rudiyanasyah, dan Gusrizal. 2013. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Tumbuhan Paku Uban (*Nephrolepis biserrata* (Sw) Schott). *J. Kimia Khatulistiwa*. **2**(2): 118-122.

Awaludin, A P., M Firdaus, dan R Nurdiani. 2011. Penapisan Fitokimia dan Antibakteri Ekstrak Metanol Mangrove (*Excoecaria agallocha*) dari Muara Sungai Porong. *Berk Penel Hayati*. (17): 69–72.

Azis, T., S. Febrizky, dan A.D. Mario. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Persen Yieldalkaloiddari Daun Salam India (*Murraya Koenigii*). Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Sriwijaya. Palembang.

- Azura, S.L.N., R. Sutri, dan Iriany. 2015. Pembuatan Etil Asetat dari Hasil Hidrolisis, Fermentasi Dan Esterifikasi Kulit Pisang Raja (*Musa Paradisiaca* L.). *J. Teknik Kimia Universitas Sumatera Utara*. **4**(1).
- Budiyanto, M.S.A. 2015. Potensi Antioksidan, Inhibitor Tirosinase, dan Nilai Toksisitas dari Beberapa Spesies Tanaman Mangrove di Indonesia. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 37 hlm.
- Dewi, L.K. 2015. Analisis Kadar Saponin dan Total Bakteri Asam Laktat pada Yogurt Ganyong (*Canna edulis*) Sinbiotik Substitusi Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.). Skripsi. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Dia, S.P.S., Nurjanah, dan A.M. Jacob. 2015. Komposisi Kimia dan Aktivitas Antioksidan Akar, Kulit Batang dan Daun Lindur. *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **18**(1).
- Djapiala, F.Y., Lita., A.D.Y. Montolalu, dan F. Mentang. 2013. Kandungan Total Fenol dalam Rumput Laut *Caulerpa racemorsa* yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Djoronga, M.I., D. Pandiangan., F.E.K. Kandou, dan A.M. Tangapo. 2014. Penapisan Alkaloid pada Tumbuhan Paku dari Halmahera Utara. *J. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi Online*. **3**(2): 102-107.
- Firmansyah, S.B. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Rumput Laut (*Sargassum duplicatum* J.Agardh) Serta Potensinya Sebagai Alternatif Pengawet Alami pada Telur Asin. Skripsi. Fakultas Ilmu Tarbiyah dan Keguruan. Universitas Islam Negeri Walisongo. Semarang. 94 hlm.
- Firdiyani, F., T.W. Agustini, dan W.F. Ma'rif. 2015. Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antioksidan Alami *Spirulina platensis* Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **18**(1): 28-37.
- Fitoni, C.N., M.T. Asri, dan M.T. Hidayat. 2013. Pengaruh Pemanasan Filtrat Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*) Terhadap Pertumbuhan Koloni Bakteri *Coliform* Secara *In Vitro*. *J. Universitas Negeri Surabaya*. **2**(3): 217-221.
- Gafur, M.A., I. Isa, dan N. Bialangi. 2014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Jamblang (*Syzygium cumini*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Gorontalo. Gorontalo.
- Gatusso, F., D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi, dan C. Caristi. 2007. Flavonoid Composition of Citrus Juices. *J. Molecule*. **12**: 1641-1673.
- Ginting, M.K. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat dalam Urin Sebagai Biomarker

- Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok. 82 hlm.
- Hamdi, A. 2017. Pengaruh Perbedaan Suhu Pengeringan dan Konsentrasi Ekstrak Kasar Daun Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) Terhadap Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. 80 hlm.
- Handayani, S. 2013. Kandungan Flavonoid Kulit Batang dan Daun Pohon Api-Api (*Acicennia marina* (Forks.) Vierh.) Sebagai Senyawa Aktif Antioksidan. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 51 hlm.
- Handayani, H., F.H. Sriherfyna, dan Yunianta. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi). *J. Pangan dan Agroindustri*. 4(1): 262-272.
- Haq, M., W. Sani, A.B.M.S. Hossain, T.M. Taha, dan K.M. Monneruzzaman. 2011. Total Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bruguiera Gymnorrhiza*. *J. of Medicinal Plants Research*. 5(17): 4112-4118.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia Edisi Ke Dua. ITB. Bandung. 354 hlm.
- Hargono, D. 2003. Beberapa Hasil Penelitian yang Mendukung Manfaat Tumbuhan Jambu Biji (*Psidium guajava*). Fakultas Farmasi. Universitas Pancasila. Jakarta.
- Hermiastuti, M. 2013. Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*). Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember. Jember. 59 Hlm.
- Huliselan, Y.M., M.R.J. Runtuwene, dan D.S. Wewengkang. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat dan N-Heksan dari Daun Sesewanua (*Clerodendron squamatum* Vahl.). *J. Ilmiah Farmasi*. 4(3): 2302-2493.
- Ikhlas, N. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Kemangi (*Ocimum americanum* Linn) dengan Metode DPPH (2,2-Difenin-1-Pikrilhidrazil). Skripsi. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatulloh. Jakarta. 62 Hlm.
- Irawan, B., S. Muadz, dan A. Rosadi. 2013. Karakterisasi dan Kekerabatan Tumbuhan Mangrove *Rhizophoraceae* Berdasarkan Morfologi, Anatomi dan Struktur Luar Serbuk Sari. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Pangeran Diponegoro. Bandung.
- Irsyad, M. 2013. Standardisasi Ekstrak Etanol Tanaman Katumpangan Air (*Peperomia pellucida* L. Kunth). Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. 97 hlm.

- Ismarani. 2012. Potensi Senyawa Tanin Dalam Menunjang Produksi Ramah Lingkungan. *J. Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*. **3**(2): 46-55.
- Jacob, A.M., P. Suptijah, dan Zahidah. 2013. Komposisi Kimia, Komponen Bioaktif dan Aktivitas Antioksidan Buah Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*). *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **16**(1).
- Jaedun, A. 2011. Metodologi Penelitian Eksperimen. Makalah. Fakultas Teknik. Universitas Negeri Yogyakarta: 13.
- Kasminah. 2016. Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Halymenia durvillaei* dengan Pelarut Non Polar, Semi Polar dan Polar. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya. 49 hlm.
- Khairan, U.A., Jenie, dan R.S. Sudibyo. 2009. Fragmentation Studies of A6,7-Anhydroeritromisin-A by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LCMS). *J. Indonesian Chemical* **9**(3): 491-499.
- Khanifah, U., M. Luthfi, dan Bambang Susilo. 2015. Karakterisasi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dengan Metode Ekstraksi *Non-Thermal* Berbantuan Ultrasonik (Kajian Perbandingan Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi). *J. Bioproses Komoditas Tropis*. **3**(1): 73-79.
- Koirewoa, Y.A., Fatimah, dan W.I. Wiyono. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Liem, A.F., E. Holle, I.Y. Gemnafle, dan S. Wakum. 2013. Isolasi Senyawa Saponin dari Mangrove Tanjung (*Bruguiera gymnorrhiza*) dan Pemanfaatannya Sebagai Pestisida Nabati pada Larva Nyamuk. *J. Biologi Papua*. **5**(1): 29-36.
- Lisdawati, V., Sumali, dan W. L. B. S. Kardono. 2007. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Lignan dan Asam Lemak dari Ekstrak Daging Buah *Phaleria macrocarpa*. *Buletin Penelitian Kesehatan*. **35**(3): 115-124.
- Malangngi, L.P., M.S. Sangi, dan J.J.E. Paendong. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.). *J. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi Online*. **1**(1): 5-10.
- Maslulkah, Y.L., T.D. Widyaningsih, E. Waziroh, N. Wijayanti, dan F.H. Shriherfyana. 2016. Faktor Pengaruh Ekstraksi Cincau Hitam (*Mesona palutris* BL.) Skala Pilot Plant. *J. Pangan dan Agroindustri*. **4**(1): 245-252.
- Maulida, R., dan A Guntarti. 2015. Pengaruh Ukuran Partikel Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Terhadap Rendemen Ekstrak dan Kandungan Total Antosianin. *J. Pharmacia* **5**(1): 9-16.
- Muaja, A., Harry, S., dan Mas, R. J. 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia*

- bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *J. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam* **2**(2): 115-118.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *J. Kesehatan*. **7**(2): 361-367.
- Mulyati, E.S. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Ceremai (*Phyllanthus Acidus* (L.) Skeels) Terhadap *Staphylococcus Aureus* dan *Escherichia Coli* dan Bioautografinya. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. 22 hlm.
- Munawaroh, S., dan P.A. Handayani. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana. *J. Kompetensi Teknik*. **2**(1).
- Nurchayanti, O. 2014. Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Daun Baru Laut (*Thespesia populnea* (L.) Soland Ex Correa) pada Mus musculus Terinfeksi *Plasmodium berghei* dan Karakterisasi Hasil Isolasinya. Skripsi. Program Studi Pendidikan Kimia. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Bengkulu. Bengkulu. 35 hlm.
- Nurjanah, N., A.M. Jacoeb., T. Hidayat, dan A. Shylina. 2015. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Lindur Stem Bark (*Bruguiera gymnorhiza*). *J. International of Plant Science and Ecology*. **1**(5): 182-189.
- Oktaviani, D., Y. Mulyani, dan E. Rochima. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Jeroan Teripang *Holothuira atra* dari Perairan Pulau Biawak Kabupaten Indramayu. *J. Perikanan Kelautan*. **6**(2): 1-6.
- Pambudi, A., Syaefudin., N. Noriko., R. Swandri, dan P.R. Azura. 2014. Identifikasi Bioaktif Golongan Flavonoid Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.). *J. Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*. **2**(3).
- Pardede, A., D. Ratnawati, dan A.H.P. Martono. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Pektin dari kulit Kemiri (*Alleurites Mollusca* Willd). *Media Sains*. **5**(1): 1-6.
- Patra, K P., A D Mohapatra., S K Rath., N K Dhal, dan H Thatoi. 2009. Screening of Antioxidant and Antifiral Activity of Leaf Extracts of *Excoecaria agallocha* L. *J. International of Integrative Biology*. **7**(1): 9-15.
- Podunge, F., S. Purwaningsih, dan T. Nurhayati. 2015. Karakteristik Buah Bakau Hitam Sebagai Sediaan Ekstrak Sumber Antioksidan. *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **18**(2): 140-149.
- Prabowo, Y., H. Irawan, dan A. Pratomo. 2014. Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder yang Terdapat pada Daun Mangrove *Xylocarpus granatum* dengan Pelarut Yang Berbeda. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Universitas Maritim Raja Ali Haji. Tanjung Pinang.

- Prawirodihardjo, E. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% dan Ekstrak Air Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*). Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta. 70 hlm.
- Purwaningsih, S. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komposisi Kimia Keong Matah Merah (*Cerithidea obtuse*). *J. Ilmu Kelautan*. **17**(1): 39-48.
- Purwantini, I., E.P. Setyowati, dan T. Hertiani. 2002. Uji Toksisitas Ekstrak Metanol: Buah, Biji, Daun Makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.) Terhadap *Artemia saline* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Aktif. *Majalah Farmasi Indonesia*. **13**(2): 101-106.
- Puspitasari, D. 2015. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder pada Ekstrak Getah Mangrove *Excoecaria Agallocha* pada Pelarut N-Hexane. *J. online*. 1-5.
- Putranti, R.I. 2013. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum Duplicatum* Dan *Turbinaria Ornata* dari Jepara. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Putri, I.J., Fauziyah, dan Elfita. 2013. Aktivitas Antioksidan Daun dan Biji Buah Nipah (*Nypa fruticans*) Asal Pesisir Banyuasin Sumatera Selatan dengan Metode DPPH. *J. Maspari*. **5**(1): 16-21.
- Rahayu, S., N. Kurniasih, dan V. Amalia. 2015. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Limbah Kulit Bawang Merah Sebagai Antioksidan Alami. *J. Al Kimiya*. **2**(1): 1-8.
- Rastuti, U., A. Mardiyah, dan S.N. Handayani. 2012. Uji Fitokimia Kulit Buah *Bruguiera gymnorrhiza*. Pendidikan Kimia. Fakultas Keguruan dan ilmu Pendidikan. Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Ratnayani K., A.A.I.A.L. Mayun, dan N.P.S.P. Indah. 2012. Kadar Total Senyawa Fenolat pada Madu Randu dan Madu Kelengkeng Serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas dengan Metode DPPH (*Difenilpikril Hidrazil*). *J. Kimia*. **6**(2): 163-168.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *J. Belian*. **9**(2): 196-202.
- Ridho, E.A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (*Cayratia trifolia*) Dengan Metode DPPH (*2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil*). Fakultas Kedokteran. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Rorong, J.A. 2015. Analisis Fenolik Jerami Padi (*Oriza sativa*) pada Berbagai Pelarut Sebagai Biosensitizer untuk Fotoreduksi Besi. *J. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Online*. **4**(2): 169-174.
- Sabrina, Y. Anggraeni, B. Puspitasari, dan L.B.S. Kardono. 2013. Solubility Enhancement of Ethyl Acetate Fraction of The *Artocarpus altilis*

(Parkinson) Fosberg Leaves with Addition of β -Cyclodextrin-HPMC by Using Kneading Methode. *J. Valensi*. **3(2)**: 51-60.

Saddiqe, Z., I. Naeem, A. Maimoona, A.V. Patel, dan C. Helliio. Assay of Flavonoid Aglycones with HPLC In Four Species of Genus *Hypericum*. *J. of Medicine Plants Research*. **5(9)**: 1526-1530.

Samin, A.A., N. Bialang, dan Y.K. Salimi. 2014. Penentuan Kandungan Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan dari Rambut Jagung (*Zea mays* L.) yang Tumbuh Di Daerah Gorontalo. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Gorontalo. Gorontalo.

Sangi, M., M R J Runtuwene., H E I Simbala, dan V M A Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem Prog*. **1(1)**: 47-53.

Sani, R.N., F.C. Nisa, R.D. Andriani, dan J.M. Maligan. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *J. Pangan dan Agroindustri*. **2(2)**:121-126.

Santoni, A., H. Nurdin, Y. Manjang, dan S.A. Achmad. 2010. Isolasi dan Elusidasi Struktur Triterpenoid Kulit Batang *Surian Toona Sinensis* dan Uji Terhadap Hama *Crosidolomia Pavonana*. *J. Riset Kimia*. **3(2)**.

Sari, S.K., D.H. Wardhani, dan A. Prasetyaningrum. 2012. Pengujian Kandungan Total Fenol *Kappahycus alvarezzi* dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik dengan Variasi Suhu dan Waktu. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi ke 3, Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim, Semarang: A40-A44.

Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.

Septiana, A.T., dan A. Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *J. AGROINTEK*. **6(1)**: 22-28.

_____. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum duplicatum*. *J. Teknologi Pertanian*. **14(2)**: 79-86.

Setyanto, A E. 2015. Memperkenalkan Kembali Metode Eksperimen dalam Kajian Komunikasi. *J. Ilmu Komputer*. **3(1)**: 37-48.

Simorangkir, M., Ribu, S., dan Tonel, B. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksana, Etil Asetat dan Etanol dari Buah Ranti Hitam (*Solanum blumei*) Ness Ex Blume dengan Metode Peredaman DPPH. *J. Kimia*. 170-173.

Sitorus, B., V. Suendo, dan F. Hidayat. 2011. Sintesis Polimer Konduktif Sebagai Bahan Baku untuk Perangkat Penyimpanan Energi Listrik. *J. Elkha*. **3(1)**.

Sudirman, S., Nurjanah, dan A.M. Jacoeb. 2014. Proximate Compositions, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity from Large-Leafed

- Mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*) Fruit. *J. International Food and Research*. **21**(6): 2387-2391.
- Sukardi, A.R. Mulyanto, dan W. Safera. 2007. Optimasi Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Tanin pada Bubuk Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium folium*) Serta Biaya Produksinya. *J. Teknolohi Pertanian*. **8**(2): 88-94.
- Sulthoniyah, S.T.M., T.D. Sulistiyati, dan E. Suprayitno. 2013. Pengaruh Pengukusan Terhadap Kandungan Gizi dan Organoleptik Abon Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*). *J. THPi Student*. **1**(1): 33-45.
- Sumardi, J.A. 1992. Pengantar Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suryana. 2010. Metodologi Penelitian Model Praktis Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. Buku Ajar Perkuliahan. Universitas Pendidikan Indonesia. 58 hlm.
- Susanti, A. 2009. Inhibisi Ekstrak Air dan Etanol Daun Asam Jawa dan Rimpang Kunci Papet Terhadap Lipase Pankreas Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Tengo, N.A., N. Bialangi, dan N. Suleman. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid dari Daun Alpukat (*Persea americana* Mill). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Gorontalo. Gorontalo.
- Tristantini, D., A. Ismawati, B.T. Pradana, dan J.G. Jonathan. 2016. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L). Program Studi Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Indonesia. Depok.
- Touil, Y.S., A. Fellous, D. Scherman dan G.G. Chabot. 2009. Flavonoid-Induced Morphological Modification of Endothelial Cells Through Microtubule Stabilization. Universite Paris Descaries. Paris.
- Ukheyanna, E. 2012. Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Tumbuhan Suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Utami, R.D., K.M. Yuliawati dan L. Syafnir. 2015. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan Daun Sukun (*Artocarpus Altilis* (Parkinson) Fosberg). *Prosiding Penelitian Sivitas Spessia Unisba*. 2460-6472.
- Utami, T. S., R. Arbiati, H. Hermansyah, dan A. Reza. 2009. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpung (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji Anova.

- Utari, S.P.S.D. 2016. Potensi Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) dari Mangrove Sebagai Antioksidan dan Inhibitor A-Glukosidase. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Venkatalakshmi, P., V. Vadiel dan P. Brindha. 2016. Identification of Flavonoid In Different Parts of *Terminalia cattapa* L. Using LC-ESI-MS/MS and Inverstigation Of Their Anticancer Effect In EAC Cell Line Model. *J. of Pharamaceutical Sciences and Research*. **8**(4): 176-183.
- Vitalia, N., A. Najib, dan A.R. Ahmad. 2016. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *J. Fitofarmaka Indonesia*. **3**(1): 124-129.
- Wahyuni, D.T. dan S.B. Widjanarko. 2015. Pengaruh Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi Terhadap Ekstrak Karotenoid Labu Kuning dengan Metode Gelombang Ultrasonik. *J. Pangan dan Agroindustri* **3**(2): 390-401.
- Widodo, N. 2007. Isolasi Dan Karakteristik Senyawa Alkaloid yang Terkandung dalam Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). Tugas Akhir. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Wijono, S.H.S. 2003. Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid pada Daun Katu (*Sauropus androgynous* (L.) Merr). *Makara Sains*. **7**(2): 51-64.
- Winangsih, E Prihastanti dan S Parman. 2013. Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. **21**(1): 19-25.
- Winata, E. W dan Yunianta. 2015. Ekstraksi Antosianin Buah Murbei (*Morus alba* L) Metode Ultrasonic Bath (Kajian Waktu dan Rasio Bahan : Pelarut). *J. Pangan dan Agroindustri*. **3**(2): 777-778.
- Wood, J.E., S.T. Senthilmohan dan A.V. Paskin. 2001. Antioxydant Activity Of Procyanidin-Containing Plant Extracts at Different pHs. *J. Food Chemistry*. **77**: 155-161.
- Yulia O. 2007. Pengujian Kapasitas Antioksidan Ekstrak Polar, Nonpolar, Fraksi Protein dan Nonprotein Kacang Komak (*Lablab purpureus* (L.) Sweet). Skripsi. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor. 74 halaman.
- Yuliani H., N. Sofiyanti, dan Fitmawati. 2016. Uji Toksisitas Tanaman Obat Anti Urolithiasis (*Stronbilanthes crispus*) Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Yuliantari, N.W.A., J.B. Tarigan, dan H. Sitohang. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus* (L)Merr.). *J. Biologi Sumatera*. **3**(1): 7-10.