

BAB IV

ANALISIS DAN PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) dengan Nomor: B-440//II.6.2/IR.01.02/2/2024 menunjukkan bahwa sampel termasuk dalam golongan keluarga *Rhizophoraceae* dengan spesies *Rhizophora stylosa* Griff. dan nama lokal bakau merah (hasil dapat dilihat pada **Lampiran A**).

4.2 Pembuatan Simplisia Daun Mangrove (*R. stylosa*)

Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Mangrove (*R. stylosa*). Daun Mangrove yang digunakan merupakan daun yang berwarna hijau cerah, besar, tidak ada cacat dan tidak layu. Sampel diambil dari Kawasan Ekowisata Mangrove Jakarta sebanyak 1,5 kg yang sebelumnya telah disortasi basah untuk memisahkan kotoran yang masih menempel pada sampel dan memisahkan sampel yang tidak memenuhi kriteria. Selanjutnya, sampel dicuci dengan air bersih yang mengalir, lalu dirajang untuk memperkecil ukuran daun, ditiriskan dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C. Sampel yang telah kering lalu disortasi kering, ditimbang, dan diperoleh berat sampel kering daun Mangrove sebanyak 422 gram. Simplisia kering yang diperoleh lalu dihaluskan menggunakan grinder dan diperoleh berat serbuk sebanyak 397 gram. Tujuan penghalusan simplisia adalah untuk memperbesar

luas permukaan sampel sehingga memudahkan proses penarikan senyawa kimia yang terkandung dalam sampel pada saat dilakukannya ekstraksi (Aponno *et al.*, 2014).

4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Mangrove (*R. stylosa*)

Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan serbuk simplisia daun Mangrove (*R. stylosa*) sebanyak 250 gram yang direndam dalam pelarut etanol 96% dengan pengulangan sebanyak 5 kali menghasilkan ekstrak kental sebanyak 44,36 gram. Berat ekstrak kental yang didapat kemudian dihitung % rendemen ekstrak dengan perhitungan yang dapat dilihat pada **Lampiran B**. Rendemen ekstrak yang diperoleh dapat dikategorikan baik apabila memiliki hasil >10% (Voigt, 1994). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) yang dihasilkan termasuk kategori baik karena hasil rendemen >10% (hasil dapat dilihat pada **Tabel 4.1**). Nilai rendemen dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti metode ekstraksi, pelarut, dan waktu ekstraksi yang dilakukan. Semakin besar nilai rendemen, maka semakin efektif ekstrak yang dapat dimanfaatkan dan semakin banyak komponen senyawa yang tertarik (Harborne *et al.*, 1987). Gambar hasil ekstraksi dapat dilihat pada **Lampiran B**.

Ekstrak yang didapatkan dilakukan pengujian kadar air untuk mengetahui jumlah air dalam ekstrak yang dapat menjadi media pertumbuhan bakteri dan jamur sehingga merusak senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan dapat menurunkan aktivitas biologi ekstrak selama penyimpanan. Kadar air dipengaruhi oleh lamanya waktu pengeringan simplisia karena semakin kering simplisia, maka

semakin kecil kadar airnya. Pengujian kadar air dilakukan dengan menggunakan alat yang disebut *moisture analyzer*. *Moisture analyzer* bekerja dengan menimbang sampel sebanyak 1 gram, lalu sampel dipanaskan dengan lampu halogen selama beberapa menit. Hasil uji kadar air ekstrak sebesar 7,92% yang memenuhi syarat air yang terkandung yakni <10% (Voigt, 1994). Hasil ekstraksi daun Mangrove (*R. stylosa*) dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Hasil Uji Ekstraksi Daun Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.)

Sampel	Bobot	Bobot	Rendemen	Kadar
	Simplisia (g)	Ekstrak (g)	Ekstrak (%)	Air (%)
Daun Mangrove (<i>R. stylosa</i>)	250 g	44,36 g	17,744%	7,92%

4.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman. Berdasarkan skrining fitokimia pada simplisia daun Mangrove (*R. stylosa*) diketahui bahwa simplisia mengandung metabolit sekunder yaitu alkaloid dan tanin, sedangkan ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) diketahui bahwa ekstrak daun Mangrove (*R. stylosa*) mengandung metabolit sekunder yang meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenol, dan steroid. Gambar hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada **Lampiran C**.

Senyawa yang terkandung di dalam ekstrak teridentifikasi karena senyawa metabolit sekunder berada dalam bentuk ikatan glikosida yang terikat pada gugus gula sehingga cenderung bersifat polar dan lebih mudah diekstrak dalam pelarut yang bersifat polar pula. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2 Hasil Skrining Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Etanol 96% Daun Mangrove
(*Rhizophora stylosa* Griff.)

Senyawa Metabolit	Simplisia	Ekstrak
Alkaloid	+	+
Flavonoid	-	+
Saponin	-	+
Tanin	+	+
Fenol	-	+
Steroid	-	+
Triterpenoid	-	-

Keterangan:

(+) teridentifikasi positif

(-) teridentifikasi negatif

Skrining fitokimia merupakan metode yang mampu menganalisis secara kualitatif kandungan senyawa yang terkandung dalam tanaman. Skrining senyawa alkaloid memerlukan asam klorida karena alkaloid merupakan senyawa yang memiliki atom nitrogen dan bersifat basa, sehingga perlu mengekstraknya dengan larutan yang bersifat asam (Julianto, 2019). Selain itu, skrining senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan dua pereaksi yaitu Mayer dan Dragendorff. Hasil positif yang diperoleh dari penambahan reagen Mayer adalah terbentuknya endapan putih hingga kekuningan, karena adanya interaksi dari senyawa alkaloid dengan ion tetraiodomercurat (II) sehingga membentuk senyawa kompleks dan endapan. Hal ini juga disebabkan oleh ion merkuri yang merupakan ion logam berat sehingga mampu mengendapkan senyawa alkaloid yang bersifat basa (Armayanti *et al.*, 2023). Selain itu, hasil positif yang diperoleh dari penambahan reagen Dragendorff adalah membentuk endapan merah bata/jingga kecoklatan, karena adanya interaksi antara senyawa alkaloid dengan ion tetraiodobismutat (III) (Sangi *et al.*, 2012).

Skrining senyawa flavonoid menunjukkan warna merah jingga, karena senyawa flavonoid akan tereduksi setelah penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat (Harborne *et al.*, 1987). Tujuan penambahan HCl pekat adalah menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya yaitu O-glikosil. Senyawa O-glikosil akan digantikan oleh H⁺ dari asam karena sifatnya yang elektrofili (Ikalinus *et al.*, 2015). Hasil skrining senyawa tanin yang menghasilkan hijau kehitaman setelah penambahan reagen FeCl₃ 1%. Perubahan warna disebabkan reaksi penambahan FeCl₃ dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Penambahan FeCl₃ yang menyebabkan perubahan warna menunjukkan adanya tanin terkondensasi (Sangi *et al.*, 2008).

Skrining senyawa saponin dapat dilakukan dengan menggunakan aquadest. Berdasarkan hasil uji saponin pada ekstrak, positif saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang terbentuk selama ± 15 menit. Hal ini disebabkan karena adanya komponen ikatan glikosida yang terkandung dalam saponin menyebabkan senyawa saponin bersifat polar. Selain itu, terbentuknya busa juga disebabkan oleh senyawa saponin yang mengandung sebagian senyawa yang bersifat hidrofilik dan senyawa hidrofobik sebagai surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Proses pengocokkan larutan ketika pengujian menyebabkan gugus yang bersifat hidrofil akan berikatan dengan air, sedangkan gugus hidrofobik akan berikatan dengan udara sehingga membentuk busa (Armayanti *et al.*, 2023).

Skrining senyawa fenol dapat dilakukan dengan menggunakan FeCl₃. Berdasarkan hasil uji fenol pada ekstrak, positif fenol ditunjukkan dengan

terbentuknya endapan berwarna hijau kehitaman. Hal ini disebabkan karena FeCl_3 bereaksi dengan gugus OH aromatik.

Skrining senyawa steroid dan triterpenoid dapat dilakukan dengan penambahan reagen Lieberman-Burchard yang mengandung asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 pekat. Jika terbentuk warna merah atau ungu, maka ekstrak positif mengandung triterpenoid, sedangkan jika membentuk warna hijau maka positif mengandung steroid. Tujuan penambahan asam asetat anhidrat adalah untuk membentuk turunan asetil, sedangkan penambahan asam sulfat pekat bertujuan untuk menghidrolisis air yang akan bereaksi dengan turunan asetil yang membentuk larutan warna. Penyebab adanya perubahan warna pada larutan karena senyawa steroid teroksidasi melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Sulistyarini *et al.*, 2019). Sedangkan uji senyawa triterpenoid diperoleh bahwa ekstrak tidak mengandung senyawa triterpenoid karena tidak terjadi perubahan warna pada sampel.

Hasil skrining fitokimia tersebut dilakukan perbandingan dengan penelitian sebelumnya yang meneliti kandungan fitokimia *R. stylosa* dengan pelarut dan bagian tanaman yang berbeda. Pada uji skrining fitokimia ekstrak n-heksana daun Mangrove (*R. stylosa*) juga ditemukan metabolit sekunder yang meliputi steroid dan triterpenoid, sedangkan ekstrak etil asetat daun dan akar Mangrove (*R. stylosa*) mengandung flavonoid, tanin, steroid, dan triterpenoid (Hanapi *et al.*, 2019). Dapat disimpulkan bahwa skrining fitokimia ekstrak etanol 96% lebih banyak menarik senyawa fitokimia dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-Heksana. Hal ini disebabkan karena etanol 96% merupakan pelarut yang dapat

menarik senyawa fitokimia yang bersifat polar, semi polar, dan non polar (Yolanda Simamora *et al.*, 2021).

4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan salah satunya menggunakan metode DPPH, karena metode DPPH merupakan metode yang sederhana, mudah dilakukan, cepat, peka, dan sampel yang digunakan lebih sedikit (Molyneux, 2004). Metode DPPH dilakukan dengan menggunakan senyawa radikal bebas DPPH (*2,2-difenil-1-pikrahidrazil*). Senyawa DPPH berperan sebagai pereaksi untuk menguji suatu sampel yang diduga memiliki aktivitas antioksidan.

Pada pengujian aktivitas antioksidan dapat dilihat dengan terjadinya penurunan absorbansi sampel. Penurunan tersebut merupakan hasil dari reaksi senyawa DPPH dengan sampel uji yang diharapkan pada pengujian aktivitas antioksidan, semakin tinggi konsentrasi sampel yang dipakai, maka absorbansi sampel menjadi semakin kecil. Hal tersebut dapat diamati dengan terjadinya perubahan warna pada senyawa DPPH yang berwarna ungu. Perubahan warna ungu yang dimiliki DPPH menjadi warna kuning terjadi apabila sampel memiliki aktivitas antioksidan. Semakin tinggi aktivitas antioksidannya, maka sampel yang diberi senyawa DPPH akan semakin kuning. Perubahan warna ini juga terkait dengan energi yang dimiliki oleh radikal bebas DPPH. Dalam bentuk radikal, DPPH cenderung tidak stabil atau reaktif mencari pasangan elektronnya. Namun, dengan adanya pasangan elektron, DPPH menjadi lebih stabil (energinya rendah) (Martiningsih *et al.*, 2016).

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dimulai dengan melakukan optimasi metode yang terdiri dari penentuan panjang gelombang maksimum dan penentuan *operating time*. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan membuat konsentrasi 50 ppm larutan DPPH dari larutan induk DPPH 100 ppm, dan diukur panjang gelombang maksimumnya menggunakan rentang 400-800 nm. Sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum dengan absorbansi mendekati 1. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 518 nm dengan nilai rata-rata absorbansi sebesar 0,957 (hasil dapat dilihat pada **Lampiran E**). Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Molyneux (2004) bahwa DPPH dapat memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm. Selanjutnya, dilakukan *operating time* untuk menentukan waktu yang tepat yang menunjukkan reaksi antara larutan uji dan larutan DPPH telah sempurna. Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan DPPH 50 ppm, dimana sebanyak 0,75 mL larutan DPPH 50 ppm dimasukkan ke dalam tube 1 mL dan ditambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 0,25 mL yang diukur pada panjang gelombang maksimum 518 nm tiap 5 menit selama 60 menit. Hasil *operating time* yang menunjukkan larutan uji dengan larutan DPPH telah bereaksi sempurna terjadi selama 45 menit dengan nilai rata-rata absorbansi sebesar 0,904 (hasil dapat dilihat pada **Lampiran E**).

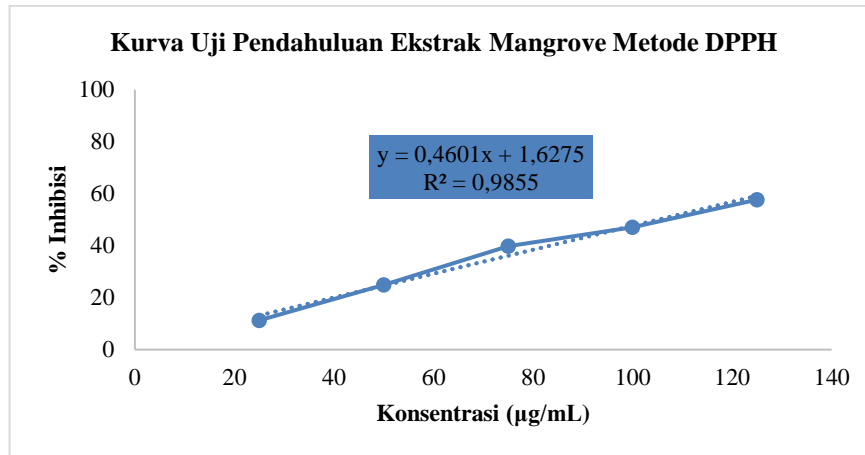
Pembanding yang digunakan dalam uji aktivitas antioksidan adalah vitamin C (asam askorbat). Vitamin C dipilih karena merupakan antioksidan sekunder yang dapat menghambat reaksi oksidasi pada radikal bebas dan berperan sebagai substansi untuk memberikan elektron pada radikal bebas sehingga dapat

menghambat kerusakan sel. Selain itu, vitamin C merupakan antioksidan alami yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dibandingkan pembanding lain (Lung & Destiani, 2017).

Pengukuran aktivitas antioksidan vitamin C dilakukan dengan cara membuat beberapa seri konsentrasi dari larutan induk vitamin C 20 ppm. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 4 ppm, 8 ppm, 12 ppm, 16 ppm, dan 20 ppm, dimana sebanyak 0,25 mL masing-masing seri konsentrasi larutan vitamin C dimasukkan ke dalam tube 1 mL, dan pada masing-masing seri konsentrasi ditambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 0,75 mL. Campuran tersebut divortex dan diinkubasi selama 45 menit. Kemudian campuran tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 518 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dirata-rata dan dihitung % inhibisinya pada masing-masing konsentrasi.

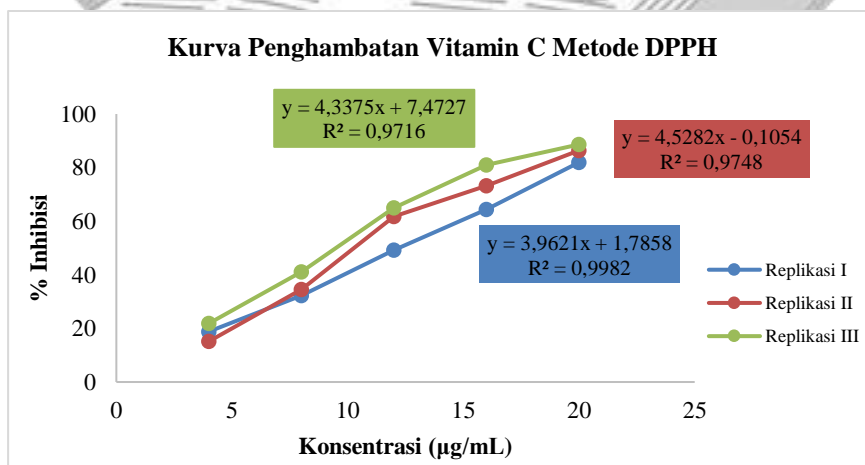
Pada pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) dibuat beberapa seri konsentrasi dari larutan induk ekstrak 250 ppm. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm, dimana sebanyak 0,25 mL masing-masing seri konsentrasi larutan ekstrak dimasukkan ke dalam tube 1 mL, dan pada masing-masing seri konsentrasi ditambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 0,75 mL. Campuran tersebut divortex dan diinkubasi selama 45 menit. Masing-masing seri konsentrasi tersebut diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 518 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dirata-rata dan dihitung % inhibisinya pada masing-masing konsentrasi. Pada penelitian ini analisis data diperoleh dengan

membuat regresi linear menggunakan aplikasi Microsoft Excel 2019 untuk mendapatkan kurva hubungan konsentrasi dan % inhibisi.

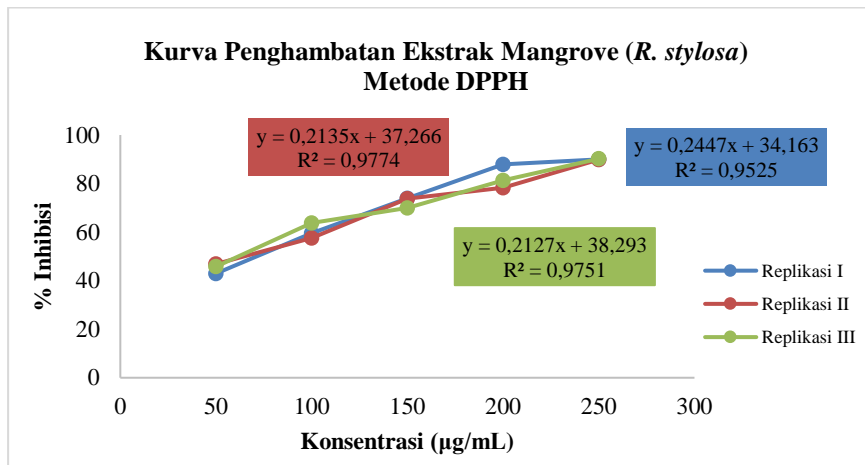


Gambar 4.1 Kurva Uji Pendahuluan Ekstrak Mangrove Metode DPPH

Berdasarkan **Gambar 4.1**, hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa pengujian aktivitas antioksidan ekstrak Mangrove dengan metode DPPH menggunakan konsentrasi tertinggi yang sama dengan metode ABTS yaitu ≤ 100 ppm belum mampu menghambat radikal DPPH sebanyak 50%. Oleh karena itu, pengujian aktivitas antioksidan ekstrak Mangrove dilakukan dengan menggunakan konsentrasi yang lebih besar yaitu 50 ppm – 250 ppm (hasil dapat dilihat pada **Gambar 4.3**).



Gambar 4.2 Kurva Penghambatan Vitamin C Metode DPPH



Gambar 4.3 Kurva Penghambatan Ekstrak Mangrove (*R. stylosa*) Metode DPPH

Pada **Gambar 4.2** dan **Gambar 4.3**, diperoleh kurva hubungan konsentrasi dan % inhibisi yang digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linear dan menghitung nilai IC_{50} . Pada persamaan reaksi tersebut nilai y merupakan nilai 50, lalu nilai x adalah nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} tersebut merupakan konsentrasi dimana sampel dapat menangkap radikal bebas sebanyak 50%. Hasil persamaan regresi linear dan nilai IC_{50} pada vitamin C dan ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4.3 Hasil Persamaan Regresi Linear dan Nilai IC_{50} Vitamin C dan Ekstrak Metode DPPH

Replikasi	Vitamin C		Ekstrak Mangrove	
	Persamaan Regresi	IC_{50} (ppm)	Persamaan Regresi	IC_{50} (ppm)
1	$y = 3,9621x + 1,7858$ $R^2 = 0,9982$	12,33	$y = 0,2447x + 34,163$ $R^2 = 0,9525$	67,82
2	$y = 4,5282x - 0,1054$ $R^2 = 0,9748$	10,08	$y = 0,2135x + 37,266$ $R^2 = 0,9774$	59,64
3	$y = 4,3375x + 7,4727$ $R^2 = 0,9716$	9,80	$y = 0,2127x + 38,293$ $R^2 = 0,9751$	55,04

Hasil persamaan regresi linier yang tertera di atas memiliki nilai b yang positif. Hal ini menunjukkan bahwa kurva penghambatan sampel merupakan kurva peningkatan (Mardawati *et al.*, 2008). Dalam persamaan regresi linier pada kurva di atas juga terdapat nilai koefisien determinasi (R^2) yang menunjukkan seberapa besar variabel terikat (Y) dapat dijelaskan oleh variabel bebas. Syarat nilai R^2 yaitu antara 0-1 setara dengan 10-100% (Sudariana & Yoedani, 2022). Nilai R^2 vitamin C pada replikasi 1, 2, dan 3 memiliki rata-rata sebesar 0,9815 yang artinya variabel bebas memiliki pengaruh besar sebesar 98,15% terhadap variabel terikat, dan 1,85% lainnya dipengaruhi oleh faktor lain di luar variabel bebas. Sedangkan, nilai R^2 ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) pada replikasi 1, 2, dan 3 memiliki rata-rata sebesar 0,9683 yang artinya variabel bebas memiliki pengaruh sebesar 96,83% terhadap variabel terikat, dan 3,17% lainnya dipengaruhi oleh faktor lain di luar variabel bebas. Dengan demikian, nilai R^2 yang dimiliki oleh vitamin C dan ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) adalah mendekati 1. Sehingga dapat dikatakan bahwa model regresi semakin baik dan telah memenuhi syarat linieritas.

Tabel 4.4 Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan Ekstrak Metode DPPH

Replikasi	Vitamin C		Ekstrak Mangrove	
	IC ₅₀	AAI	IC ₅₀	AAI
1	12,3311	4,8657	67,8196	0,9947
2	10,0785	5,9532	59,6440	1,0060
3	9,8046	6,1196	55,0400	1,0901
Rata-Rata	10,7380±1,386	5,6462±0,681	60,8345±6,472	1,0303±0,052
Kategori	Sangat kuat*	Sangat kuat**	Kuat*	Kuat**

Keterangan:

(*) Kategori Nilai IC₅₀ (Awe *et al.*, 2013)

(**) Kategori Nilai AAI (Sochor *et al.*, 2010)

Pada **Tabel 4.4**, dapat dilihat hasil pengujian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel vitamin C maupun ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*), maka semakin tinggi persentase inhibisinya. Hal ini disebabkan pada sampel yang semakin banyak, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga meningkatkan penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh sampel sebagai zat antioksidan.

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak Mangrove (*R. stylosa*) menggunakan metode DPPH memberikan nilai rata-rata IC_{50} sebesar 60,83 ppm. IC_{50} adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat jika bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika bernilai 150-200 ppm (Awe *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Mangrove (*R. stylosa*) memiliki antioksidan kuat dan aktivitasnya tidak lebih besar jika dibandingkan dengan vitamin C sebagai pembanding dengan nilai rata-rata IC_{50} sebesar 10,74 ppm (antioksidan sangat kuat).

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang mengatakan bahwa daun Mangrove jenis *Rhizophora stylosa* Griff. memiliki aktivitas antioksidan kategori kuat (Willian *et al.*, 2020). Hasil yang diperoleh dari penelitian ini dengan penelitian sebelumnya memiliki perbedaan pada perbandingan antara sampel ekstrak dan radikal DPPH yang

digunakan. Berdasarkan penelitian oleh Hanapi *et al* (2019), ekstrak *R. stylosa* berpotensi sangat kuat dengan perbandingan sampel ekstrak yang lebih besar daripada radikal DPPH yaitu 3:1. Sedangkan pada penelitian ini, perbandingan antara sampel ekstrak dan radikal yaitu 1:3. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan perbandingan sampel ekstrak yang lebih kecil daripada radikal DPPH membuktikan bahwa sampel ekstrak *R. stylosa* bernilai kuat dalam meredam radikal DPPH.

4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS dimulai dengan melakukan optimasi metode yang terdiri dari penentuan panjang gelombang maksimum dan penentuan *operating time*. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengamati absorbansi larutan radikal kation ABTS yang telah diinkubasi selama 16 jam pada panjang gelombang 700-750 nm (Mutiananda, 2023). Hasil panjang gelombang maksimum adalah 736 nm dengan rata-rata absorbansi sebesar 1,057 yang kemudian digunakan sebagai kontrol negatif (hasil dapat dilihat pada **Lampiran G**). Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan kation ABTS, dimana sebanyak 0,75 mL larutan kation ABTS dimasukkan ke dalam tube 1 mL dan ditambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 0,25 mL yang diukur pada panjang gelombang maksimum 736 nm tiap 5 menit selama 60 menit. Hasil *operating time* yang menunjukkan larutan uji dengan larutan kation ABTS telah bereaksi sempurna

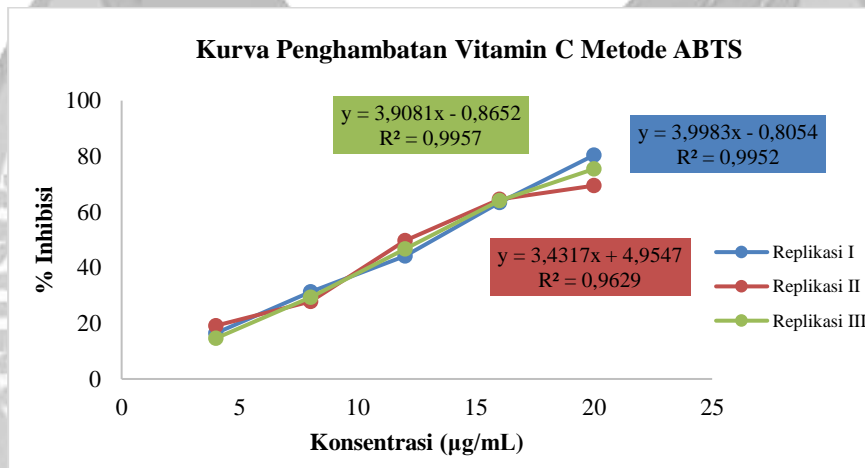
terjadi selama 45 menit dengan nilai rata-rata absorbansi sebesar 1,087 (hasil dapat dilihat pada **Lampiran G**).

Pembanding yang digunakan dalam uji aktivitas antioksidan adalah vitamin C (asam askorbat). Vitamin C dipilih karena merupakan antioksidan sekunder yang dapat menghambat reaksi oksidasi pada radikal bebas dan berperan sebagai substansi untuk memberikan elektron pada radikal bebas sehingga dapat menghambat kerusakan sel. Selain itu, vitamin C merupakan antioksidan alami yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dibandingkan pembanding lain (Lung & Destiani, 2017).

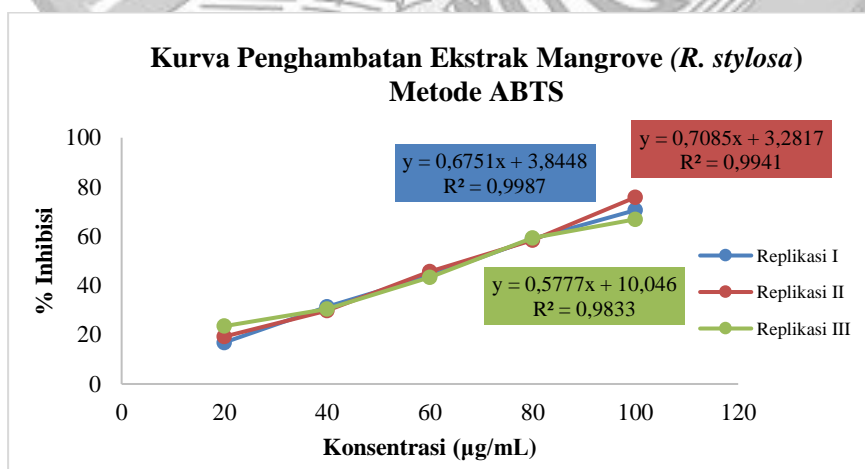
Pengukuran aktivitas antioksidan vitamin C dilakukan dengan cara membuat beberapa seri konsentrasi yang lebih kecil dari larutan induk vitamin C 20 ppm. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 4 ppm, 8 ppm, 12 ppm, 16 ppm, dan 20 ppm, dimana sebanyak 0,25 mL masing-masing seri konsentrasi larutan vitamin C dimasukkan ke dalam tube 1 mL, dan pada masing-masing seri konsentrasi ditambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 0,75 mL. Campuran tersebut divortex dan diinkubasi selama 45 menit. Kemudian campuran tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 736 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dirata-rata dan dihitung % inhibisinya pada masing-masing konsentrasi.

Pada pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) dibuat beberapa seri konsentrasi dari larutan induk ekstrak 100 ppm. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm, dimana sebanyak 0,25 mL masing-masing seri konsentrasi larutan ekstrak

dimasukkan ke dalam tube 1 mL, dan pada masing-masing seri konsentrasi ditambahkan etanol *pro analysis* sebanyak 0,75 mL. Campuran tersebut divortex dan diinkubasi selama 45 menit. Masing-masing seri konsentrasi tersebut diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 736 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dirata-rata dan dihitung % inhibisinya pada masing-masing konsentrasi. Pada penelitian ini analisis data diperoleh dengan membuat regresi linear menggunakan aplikasi Microsoft Excel 2019 untuk mendapatkan kurva hubungan konsentrasi dan % inhibisi.



Gambar 4.4 Kurva Penghambatan Vitamin C Metode ABTS



Gambar 4.5 Kurva Penghambatan Ekstrak Mangrove (*R. stylosa*) Metode ABTS

Pada **Gambar 4.3** dan **Gambar 4.4**, diperoleh kurva hubungan konsentrasi dan % inhibisi yang digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linear dan menghitung nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ tersebut merupakan konsentrasi dimana sampel dapat menangkap radikal bebas sebanyak 50%. Grafik presentase penghambatan pada vitamin C dan ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5 Hasil Persamaan Regresi Linear dan Nilai IC₅₀ Vitamin C dan Ekstrak Metode ABTS

Replikasi	Vitamin C		Ekstrak Mangrove	
	Persamaan Regresi	IC ₅₀ (ppm)	Persamaan Regresi	IC ₅₀ (ppm)
1	y = 3,9983x - 0,8054 R ² = 0,9952	12,30	y = 0,6751x + 3,8448 R ² = 0,9987	68,37
2	y = 3,4317x + 4,9547 R ² = 0,9629	13,13	y = 0,7085x + 3,2817 R ² = 0,9941	65,94
3	y = 3,9081x - 0,8652 R ² = 0,9957	12,57	y = 0,5777x + 10,046 R ² = 0,9833	69,16

Hasil persamaan regresi linier yang tertera di atas memiliki nilai b yang positif. Hal ini menunjukkan bahwa kurva penghambatan sampel merupakan kurva peningkatan (Mardawati *et al.*, 2008). Dalam persamaan regresi linier pada kurva di atas juga terdapat nilai koefisien determinasi (R²) yang menunjukkan seberapa besar variabel terikat (Y) dapat dijelaskan oleh variabel bebas. Syarat nilai R² yaitu antara 0-1 setara dengan 10-100% (Sudariana & Yoedani, 2022). Nilai R² vitamin C pada replikasi 1, 2, dan 3 memiliki rata-rata sebesar 0,9846 yang artinya variabel bebas memiliki pengaruh besar sebesar 98,46% terhadap variabel terikat, dan 1,54% lainnya dipengaruhi oleh faktor lain di luar variabel bebas. Sedangkan, nilai R² ekstrak ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) pada replikasi 1, 2, dan 3 memiliki rata-rata sebesar 0,9920 yang artinya

variabel bebas memiliki pengaruh sebesar 99,20% terhadap variabel terikat, dan 0,80% lainnya dipengaruhi oleh faktor lain di luar variabel bebas. Dengan demikian, nilai R^2 yang dimiliki oleh vitamin C dan ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*) adalah mendekati 1. Sehingga dapat dikatakan bahwa model regresi semakin baik dan telah memenuhi syarat linieritas.

Tabel 4.6 Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C Metode ABTS

Replikasi	Vitamin C		Ekstrak Mangrove	
	IC ₅₀ (ppm)	AAI	IC ₅₀ (ppm)	AAI
1	12,3039	4,8765	68,3679	0,8776
2	13,1258	4,5712	65,9397	0,9099
3	12,5726	4,7723	69,1605	0,8675
Rata-Rata	12,6674±0,419	4,7400±0,155	67,8227±1,68	0,8850±0,022
Kategori	Sangat kuat*	Sangat kuat**	Kuat*	Sedang**

Keterangan:

(*) Kategori Nilai IC₅₀ (Awe *et al.*, 2013)

(**) Kategori Nilai AAI (Sochor *et al.*, 2010)

Pada **Tabel 4.6**, hasil pengujian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel vitamin C maupun ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*R. stylosa*), maka semakin tinggi persentase inhibisinya. Hal ini disebabkan pada sampel yang semakin banyak, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga meningkatkan penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh sampel sebagai zat antioksidan.

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak Mangrove (*R. stylosa*) menggunakan metode ABTS memberikan nilai rata-rata IC₅₀ sebesar 67,8227 ppm. IC₅₀ adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀, maka semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan

sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat jika bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika bernilai 150-200 ppm (Awe *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Mangrove (*R. stylosa*) memiliki antioksidan kuat dan aktivitasnya tidak lebih besar jika dibandingkan dengan vitamin C sebagai pembanding dengan nilai rata-rata IC_{50} sebesar 12,6674 ppm (antioksidan sangat kuat).

4.7 Perbandingan Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Perbandingan hasil uji aktivitas antioksidan antara metode DPPH dan ABTS dilakukan dengan menggunakan *Independent T-test*. *Independent T-test* digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan dari kedua metode tersebut. Sebelum melakukan uji *Independent T-test*, data yang diperoleh secara statistik dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan SPSS yakni uji *Shapiro-Wilk*, dan uji homogenitas data menggunakan uji *Levene*. Berdasarkan **Gambar 4.6** dan **Gambar 4.7**, hasil uji normalitas menunjukkan nilai *p-value* dari semua sampel memiliki nilai signifikansi $> 0,05$ yang artinya data tersebut terdistribusi normal.

Tests of Normality							
Metode Uji	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Vitamin C	DPPH	.350	3	.	.830	3	.189
	ABTS	.256	3	.	.962	3	.623

Gambar 4.6 Hasil Uji Normalitas Vitamin C

Tests of Normality							
	Metode Uji	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstrak Mangrove	DPPH	.240	3	.	.975	3	.694
	ABTS	.293	3	.	.922	3	.458

Gambar 4.7 Hasil Uji Normalitas Ekstrak Mangrove

Selanjutnya hasil uji homogenitas menggunakan *Levene's Test* menunjukkan nilai *p-value* dari semua sampel memiliki nilai signifikansi $> 0,05$ yang artinya data tersebut homogen atau data berasal dari varian yang sama. Hasil uji homogenitas dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

Levene's Test for Equality of Variances			
		F	Sig.
Vitamin C	Equal variances assumed	6.458	.064
	Equal variances not assumed		

Gambar 4.8 Hasil Uji Homogenitas Vitamin C

Levene's Test for Equality of Variances			
		F	Sig.
Ekstrak Mangrove	Equal variances assumed	3.535	.133
	Equal variances not assumed		

Gambar 4.9 Hasil Uji Homogenitas Ekstrak Mangrove

Berdasarkan **Tabel 4.7**, diketahui jumlah data vitamin C untuk metode DPPH dan ABTS adalah sama yaitu 3 sampel. Nilai rata-rata atau Mean vitamin C untuk metode DPPH adalah sebesar 10,74, sementara metode ABTS adalah

sebesar 12,67. Pada **Tabel 4.8**, diketahui jumlah data ekstrak Mangrove untuk metode DPPH dan ABTS adalah sama yaitu 3 sampel. Nilai rata-rata atau Mean ekstrak Mangrove untuk metode DPPH adalah sebesar 60,83, sedangkan untuk metode ABTS adalah sebesar 67,82. Dengan demikian secara deskriptif statistik dapat disimpulkan ada perbedaan rata-rata nilai IC_{50} antara metode DPPH dan ABTS.

Tabel 4.7 *Output Group Statistic* Perbandingan Nilai IC_{50} Vitamin C Metode DPPH dan ABTS

Group Statistic				
Metode Antioksidan	N	Mean	StDev	SE Mean
DPPH	3	10,74	0,42	0,24
ABTS	3	12,67	1,39	0,80

Tabel 4.8 *Output Group Statistic* Perbandingan Nilai IC_{50} Ekstrak Etanol 96% Daun Mangrove (*R. stylosa*) Metode DPPH dan ABTS

Group Statistic				
Metode Antioksidan	N	Mean	StDev	SE Mean
DPPH	3	60,83	6,47	3,74
ABTS	3	67,82	1,68	0,97

Selanjutnya untuk membuktikan apakah perbedaan tersebut berarti signifikan (nyata) atau tidak, dilakukan uji *Independent T-test* dengan hasil sebagai berikut.

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	6.458	.064	2.307	4	.082	1.92937	.83620	-.39230	4.25103
Equal variances not assumed			2.307	2.362	.128	1.92937	.83620	-1.18802	5.04675

Gambar 4.10 Hasil Uji *Independent T-test* Vitamin C

Berdasarkan **Gambar 4.9** diketahui nilai Sig. (2-tailed) > 0,05 dan nilai t-hitung sebesar 2,307 sedangkan t-tabel sebesar 2,776 yang artinya nilai t-hitung <

t-tabel, sehingga dapat disimpulkan bahwa H₀ diterima dan H_a ditolak. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan (nyata) antara rata-rata nilai IC₅₀ vitamin C metode DPPH dan metode ABTS.

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				95% Confidence Interval of the Difference		
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Equal variances assumed	3.535	.133	1.810	4	.145	6.98817	3.86044	-3.73012	17.70645
Equal variances not assumed			1.810	2.268	.197	6.98817	3.86044	-7.87744	21.85378

Gambar 4.11 Hasil Uji *Independent T-test* Ekstrak Mangrove

Berdasarkan *output* di atas diketahui nilai Sig. (2-tailed) > 0,05 dan nilai t-hitung sebesar 1,810 sedangkan t-tabel sebesar 2,776 yang artinya nilai t-hitung < t-tabel, sehingga dapat disimpulkan bahwa H₀ diterima dan H_a ditolak. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan (nyata) antara rata-rata nilai IC₅₀ ekstrak Mangrove metode DPPH dan metode ABTS.

Hasil uji statistik kedua metode tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan (nyata). Metode DPPH dan ABTS merupakan metode analisa aktivitas antioksidan dengan mekanisme kerja yang sama, yaitu mereduksi radikal bebas dan mengurangi senyawa aktif redoks. Namun, terdapat perbedaan yang signifikan dari kedua metode tersebut berdasarkan sifat fisik yang dimiliki kedua senyawa radikal. DPPH merupakan senyawa radikal yang bersifat basa, sedangkan radikal kation ABTS merupakan radikal yang bersifat asam. Sehingga, radikal DPPH akan menjadi netral jika bereaksi dengan senyawa antioksidan yang bersifat asam, sedangkan radikal kation ABTS akan bereaksi dengan senyawa antioksidan basa dan menghasilkan senyawa yang netral.

Hasil yang diperoleh pada metode DPPH baik vitamin C maupun ekstrak Mangrove memiliki nilai IC_{50} yang lebih rendah daripada metode ABTS. Hal ini dikarenakan kandungan senyawa antioksidan yang terdapat dalam sampel cenderung menunjukkan aktivitas peredaman radikal DPPH yang tinggi. Hal ini dapat dikaitkan dengan analisa kualitatif yang telah dilakukan bahwa di dalam ekstrak Mangrove (*R. stylosa*) terkandung senyawa yang dapat berperan sebagai antioksidan, seperti flavonoid.

Flavonoid termasuk senyawa golongan polifenol yang bersifat polar karena memiliki gugus hidroksil, sehingga dapat ditarik dengan menggunakan pelarut etanol. Flavonoid dioksidasi oleh radikal menghasilkan radikal yang lebih stabil dan tidak reaktif. Flavonoid bekerja menangkap superoksida, sedangkan flavonoid lainnya dapat menangkap turunan radikal oksigen yang sangat reaktif disebut peroksinitrit. Salah satu turunan flavonoid yakni senyawa rutin juga memiliki kemampuan sebagai penangkap radikal yang kuat. Kemampuannya dalam menangkap radikal dapat dikarenakan aktivitasnya sebagai inhibitor pada enzim xantin oksidase. Dengan menangkap radikal, flavonoid dapat menghambat oksidasi LDL secara *in vitro* sebagai pencegahan aterosklerosis (Arifin & Ibrahim, 2018). Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Kainuma *et al* (2015) bahwa ekstrak *R. stylosa* memiliki senyawa katekin dan rutin.