

3. Ekstraksi dengan metode maserasi.....	12
4. Pemekatan.....	14
D. Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).....	14
III. METODE PENELITIAN	16
A. Waktu dan Tempat.....	16
B. Alat dan Bahan.....	16
C. Prosedur Penelitian	17
1. Pengambilan dan Preparasi Sampel	18
2. Uji Fitokimia	19
3. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).....	19
D. Analisis Data	20
IV. HASIL	22
A. Rendemen Ekstrak Kasar Daun <i>Rhizophora mucronata</i>	22
B. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Daun <i>R. mucronata</i>	22
C. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun <i>Rhizophora mucronata</i>	23
V. PEMBAHASAN	24
A. Rendemen Ekstrak Kasar Daun <i>Rhizophora mucronata</i>	24
B. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder.....	26
C. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun <i>Rhizophora mucronata</i>	27
VI. SIMPULAN DAN SARAN	31
A. Simpulan	31
B. Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Sifat fisikokimia dari beberapa pelarut yang umum digunakan dalam ekstraksi bahan aktif	14
2. Sifat antioksidan berdasarkan nilai IC_{50}	15
3. Pereaksi dan karakteristik senyawa metabolit sekunder dengan uji fitokimia.....	19
4. Sifat antioksidan berdasarkan nilai IC_{50}	20
5. Rendemen ekstrak kasar daun <i>Rhizophora mucronata</i> pada tingkat semaian, pancang, dan pohon	22
6. Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak kasar daun <i>Rhizophora mucronata</i> pada tingkat semaian, pancang, dan pohon	22
7. Indikator aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun <i>Rhizophora mucronata</i> pada tingkat semaian, pancang, dan pohon	23

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Mangrove <i>Rhizophora mucronata</i>	4
2. Peta Lokasi Pengambilan Daun <i>Rhizophora mucronata</i> di Kawasan Hutan Mangrove Lantebung, Kelurahan Bira, Kecamatan Tamalanrea, Makassar	16
3. Skema Kerja Penelitian	17

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Perhitungan rendemen ekstrak kasar daun <i>R. mucronata</i>	43
2. Hasil uji One-way ANOVA dan Tukey rendemen ekstrak kasar daun <i>Rhizophora mucronata</i>	44
3. Data hasil uji antioksidan dan perhitungan nilai IC ₅₀ ekstrak daun <i>Rhizophora mucronata</i>	46
4. Kurva regresi konsentrasi ekstrak dengan persentase inhibisi DPPH dan perhitungan nilai IC ₅₀ ekstrak kasar daun <i>Rhizophora mucronata</i>	48
5. Hasil uji One-way ANOVA dan Tukey's HSD Antioksidan ekstrak kasar daun <i>Rhizophora mucronata</i>	53
6. Dokumentasi Pengambilan dan Preparasi Sampel.....	55
7. Dokumentasi Ekstraksi sampel.....	56
8. Dokumentasi Analisis antioksidan	58
9. Dokumentasi Pengujian fitokimia.....	59
10. Glosarium.....	61

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Radikal bebas merupakan senyawa dengan reaktivitas yang tinggi dan berperan sebagai salah satu penyebab kerusakan sel yang berdampak pada penyakit degeneratif, seperti diabetes melitus, aterosklerosis, jantung koroner hingga kanker (Winarsi, 2007). Radikal bebas dapat ditemukan secara alami dalam tubuh sebagai produk sampingan metabolisme sel, dan dapat juga terakumulasi akibat radiasi, polusi, logam berat, zat-zat kimiawi dalam makanan, dan obat-obatan tertentu yang berhasil berpenetrasi ke dalam tubuh (Adwas *et al.*, 2019; Werdhasari, 2014). Radikal bebas dalam tubuh akan segera melakukan interaksi-interaksi baik itu bergabung dengan sesama radikal bebas atau mengambil elektron molekul lainnya sehingga menimbulkan reaksi berantai (Winarsi, 2007). Kondisi tersebut akan terus berlangsung hingga dilakukan upaya-upaya untuk meredam reaktivitas radikal bebas, yaitu menghentikan paparan dari sumber radikal bebas dan memanfaatkan potensi senyawa antioksidan (Khaira, 2010).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam radikal bebas dengan cara menghambat pembentukan radikal bebas, memutus rantai radikal bebas, dan memperbaiki sel yang rusak (Winarsi, 2007). Meskipun tubuh makhluk hidup memproduksi enzim tertentu sebagai antioksidan (Werdhasari, 2014), tetapi asupan antioksidan eksternal masih diperlukan sebab antioksidan yang disintesis dalam tubuh tidak cukup untuk mencegah dan mengatasi tekanan oksidatif (Thatoi *et al.*, 2014). Asupan antioksidan dari luar tubuh didapatkan dari makanan (baik makanan nabati maupun hewani), namun pengolahan makanan yang kurang baik dapat merusak kandungan antioksidan di dalam makanan (Al-juhaimi *et al.*, 2018; AlFaris *et al.*, 2022; Kalija *et al.*, 2020; Podungge *et al.*, 2018).

Dewasa ini, biota laut telah banyak diolah menjadi produk yang dapat dikonsumsi baik sebagai makanan sehari-hari maupun suplemen kesehatan. Ketertarikan untuk mengeksplor sumber daya laut ini adalah konsekuensi dari kemajuan ilmu pengetahuan khususnya bioteknologi yang menemukan senyawa-senyawa baru dalam biota laut (Carté, 1996). Berbagai penelitian mengemukakan lingkungan laut yang ekstrem memicu diproduksinya senyawa metabolit sekunder yang lebih besar pada biota laut daripada biota terestrial (Munro *et al.*, 1999). Metabolit sekunder sendiri dapat diartikan sebagai senyawa yang diproduksi makhluk hidup sebagai respon terhadap tekanan lingkungan yang ekstrem, sehingga semakin tinggi tekanan yang dialaminya maka produksi metabolit sekunder akan semakin tinggi pula (Ashraf *et al.*, 2018). Kehadiran senyawa inilah yang berfungsi sebagai antibakteri pada lamun (Setyoningrum *et al.*,

2020), antitumor pada ascidian dan spons (Fajarningsih *et al.*, 2013), antiproliferasi pada alga (Moreau *et al.*, 2006), antioksidan pada mangrove (Suganthy & Devi, 2015), dan berbagai bioaktivitas pada mikroba di laut (Paul *et al.*, 2021).

Mangrove telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat pesisir sebagai produk non-kayu, seperti racun ikan, sumber makanan, dan obat tradisional. Fenomena tersebut mendorong ilmuwan untuk meneliti potensi kefarmasian mangrove dalam mengobati diabetes, asma, maag, luka, dan kanker (Darmadi *et al.*, 2021; Okla *et al.*, 2021; Sachithanandam *et al.*, 2019). Dari penelitian-penelitian tersebut, diketahui bahwa aktivitas biologis pada mangrove seperti antioksidan dan antimikroba berhubungan dengan metabolit sekunder yang dikandungnya (Bourgaud *et al.*, 2001). Sebagai organisme yang hidup di daerah pertemuan daratan dan lautan, mangrove akan menerima tekanan lingkungan yang dinamis bukan hanya dari lautan, tetapi juga dari daratan. Tekanan-tekanan ini yang memungkinkan mangrove mengembangkan beberapa cara adaptasi, salah satunya dengan memproduksi metabolit sekunder (Bandaranayake, 2002; Buhmann & Papenbrock, 2013). Metabolit sekunder yang ditemukan dalam mangrove antara lain, yaitu flavonoid, alkaloid, terpenoid, karetonoid, tanin, saponin (Suganthy & Devi, 2015).

Salah satu mangrove yang memiliki senyawa metabolit sekunder dengan keragaman yang tinggi adalah *Rhizophora mucronata* (Suganthy & Devi, 2015). *R. mucronata* memiliki senyawa metabolit sekunder dengan kemampuan antifungi (Rastegar & Gozari, 2016), antibakteri (Nurdiani *et al.*, 2012), antivirus (Premanathan *et al.*, 1999), antidiabetes (Hardoko *et al.*, 2016), antidiare (Puspitasari *et al.*, 2012), antiinflamasi (Kumari *et al.*, 2015), antikanker (Diastuti & Suwandri, 2009), dan antioksidan (Kasitowati *et al.*, 2017; Suganthy & Devi, 2015; Supriatna *et al.*, 2019).

Pada dasarnya, penelitian terkait aktivitas antioksidan pada *R. mucronata* bukanlah hal yang baru. Penelitian sebelumnya telah banyak mengkaji aktivitas antioksidan pada seluruh organ dari *R. mucronata* menggunakan pelarut yang berbeda. Seperti yang dilaporkan Kasitowati *et al.* (2017), Ridlo *et al.* (2017) dan Suganthy & Devi (2015), daun *R. mucronata* yang diekstrak menggunakan metanol memiliki IC₅₀ terkecil dengan aktivitas daya hambat tergolong sedang hingga sangat kuat. Bagian lain dari *R. mucronata* yang juga memiliki daya hambat sangat kuat adalah akar dan buah (Podungge *et al.*, 2015; Ravikumar & Gnanadesigan, 2012). Menurut Supriatna *et al.* (2019), kulit batang *R. mucronata* juga memiliki potensi antioksidan dengan daya hambat lebih besar pada tegakan pancang daripada pohon.

Mengacu pada penelitian-penelitian tersebut, *R. mucronata* diasumsikan memiliki potensi yang besar sebagai antioksidan alami menggantikan antioksidan sintesis yang memiliki efek samping karsinogenik. Organ mangrove yang dianggap paling sesuai

untuk diproduksi sebagai antioksidan dalam skala komersial adalah daun. Hal ini berdasarkan pertimbangan bahwa daun memiliki peran yang krusial dalam pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan. Sebagai organ utama tempat berlangsungnya metabolisme seperti fotosintesis, daun mengakumulasi karbohidrat yang selanjutnya digunakan untuk respirasi, pertumbuhan, dan pembentukan senyawa metabolit sekunder (Kozłowski & Pallardy, 1997). Selain itu, daun juga lebih mudah dipanen dan produksinya tidak dibatasi musim sehingga jumlahnya lebih melimpah dari organ lainnya (Hardinsyah *et al.*, 2019; Kozłowski & Pallardy, 1997). Untuk mewujudkan daun sebagai produk antioksidan tanpa melakukan eksploitasi berlebihan, diperlukan pengetahuan tentang tingkat pertumbuhan optimal bagi mangrove untuk menghasilkan daun dengan kualitas metabolit sekunder terbaik.

Tingkat pertumbuhan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas dan kuantitas senyawa antioksidan pada tumbuhan. Seiring dengan berjalannya siklus hidup tumbuhan, produksi metabolit sekunder mengalami peningkatan dengan puncak produksi diamati pada fase generatif (Chen *et al.*, 2012; Manurung *et al.*, 2017). Dalam penelitian yang dilakukan Manurung *et al.* (2017) diketahui bahwa pada tingkat pertumbuhan yang berbeda, tumbuhan memproduksi metabolit sekunder dengan jenis dan jumlah yang variatif. Ditambah lagi, Petropoulos *et al.* (2018) dan Ghasemzadeh *et al.* (2016) menemukan konsentrasi metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan berbeda secara signifikan pada tumbuhan dengan tingkat pertumbuhan yang berbeda.

Meskipun penelitian tentang pengaruh faktor pertumbuhan terhadap komposisi dan kualitas senyawa kimia dalam tumbuhan telah banyak dilaporkan, hingga saat ini penelitian terkait aktivitas antioksidan *R. mucronata* pada tingkat pertumbuhan yang berbeda masih terbatas sebab sebagian besar studi hanya berfokus pada skrining senyawa kimia dan jenis bioaktivitas pada setiap organ menggunakan pelarut yang berbeda. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kemampuan antioksidan pada daun semaian, pancang, dan pohon *R. mucronata*.

B. Tujuan dan Kegunaan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun *Rhizophora mucronata* pada tingkat pertumbuhan yang berbeda
2. Menganalisis perbedaan kemampuan aktivitas antioksidan ekstrak daun *Rhizophora mucronata* berdasarkan tingkat pertumbuhannya

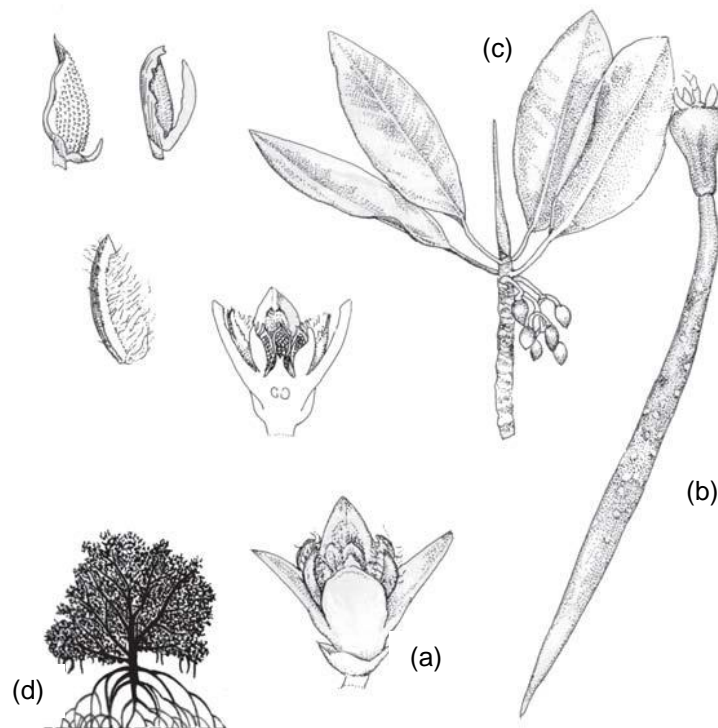
Hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi awal untuk penelitian selanjutnya dan industri farmasi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Bioekologi *Rhizophora mucronata*

Rhizophora mucronata adalah salah satu jenis mangrove yang umumnya ditemukan di pesisir daerah tropis dan subtropis yang masih dipengaruhi oleh pasang surut. Pertumbuhannya optimal pada kondisi tanah yang mengandung humus lebih tinggi (Noor *et al.*, 2006). Sebagai organisme *sessile* yang hidup di lingkungan dengan tekanan tinggi, mangrove telah mengembangkan berbagai mekanisme adaptasi, salah satunya adalah dengan memproduksi senyawa metabolit sekunder (Buchanan *et al.*, 2015).

1. Morfologi dan Klasifikasi *Rhizophora mucronata*



Gambar 1. Mangrove *Rhizophora mucronata* (a) bunga; (b) buah; (c) daun; (d) pohon (Noor *et al.*, 2006)

Rhizophora mucronata atau yang biasa dikenal dengan sebutan bakau hitam (Orwa *et al.*, 2009) atau bakau merah (Noor *et al.*, 2006) dapat mencapai tinggi 27 m (jarang melebihi 30 m) dengan diameter batang hingga 70 cm. Jenis mangrove ini memiliki karakteristik kulit kayu yang berwarna gelap hingga hitam dan memiliki celah horizontal. Bentuk daunnya elips melebar hingga bulat memanjang dengan ujung yang meruncing. Pada mahkota bunga ditemukan rambut-rambut halus yang tidak ditemukan pada jenis *Rhizophora apiculata*. Buahnya berwarna hijau kecoklatan dan berbentuk

lonjong/panjang hingga berbentuk telur, berukuran 5-7 cm. Memiliki bunga yang gagang kepalanya menyerupai cagak dan terdiri atas 4 kelopak dan 8 benang sari (Noor *et al.*, 2006). Pohon yang berumur lebih muda memiliki kulit batang berwarna kelabu yang secara berangsur-angsur berubah menjadi gelap (hitam) disertai adanya retakan-retakan. Sistem perakarannya berupa akar tunjang yang pada bagian pangkalnya melebar seperti papan. Perakaran yang khas tersebut menjadi salah satu karakteristik yang membantu dalam proses identifikasi *R. mucronata* di lapangan (Idrus *et al.*, 2014).

Klasifikasi dari *Rhizophora mucronata* berdasarkan Plantamor (2021):

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionata

Division: Spermatophyta

Subdivision: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Rosidae

Order: Myrtales

Family: Rhizophoraceae

Genus: *Rhizophora*

Species: *R. mucronata*

2. Reproduksi *Rhizophora mucronata*

Masa reproduksi *R. mucronata* terdiri dari beberapa fase, yaitu praanthesis (*preanthesis*), anthesis (*anthesis*), dan pascaanthesis (*post-anthesis*). Fase praanthesis ditandai dengan munculnya tunas reproduksi yang selanjutnya berkembang menjadi kuncup bunga. Fase ini berlangsung selama kurang lebih 5 bulan. Fase anthesis terdiri dari pematangan, pematangan, dan penyerbukan bunga yang berlangsung selama 2 bulan. Penyerbukan menandai berakhirnya fase ini dan dimulainya fase pascaanthesis. Fase pascaanthesis membutuhkan waktu yang lebih lama, yaitu 8-9 bulan. Fase ini dimulai dengan proses pembuahan yang menghasilkan buah berbentuk lonjong/panjang hingga berbentuk telur berukuran 5-7 cm. Dari dalam buah tersebut, muncul hipokotil berbentuk silindris yang terus berkembang hingga tingkat kematangan tertentu. Hipokotil dikatakan matang jika muncul kotiledon berwarna kekuningan dengan ukuran 4-5 cm pada pangkal hipokotil (Baskorowati *et al.*, 2018). Hipokotil, yang secara umum disebut propagul, akan mengapung secara horizontal sebelum berubah arah menjadi vertikal. Perubahan orientasi propagul tersebut tidak hanya dipengaruhi oleh kondisi perairan, tetapi juga massa, volume, dan densitas propagul (Tonné *et al.*, 2017).

Propagul *R. mucronata* memiliki densitas yang lebih kecil dari densitas air laut sehingga menyebabkan ia mengapung secara horizontal di permukaan laut. Seiring

dengan waktu, propagul akan mengalami kenaikan densitas yang disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya masuknya air melalui lentisel. Hal ini menyebabkan propagul mengapung secara vertikal dengan posisi plumula berada di bagian atas dan radikula berada di bagian bawah (Tonné *et al.*, 2017). Setelah berhasil tertancap di dasar perairan, propagul mulai mengembangkan struktur pengakaran pada hari ke 10-40. Propagul yang telah tenggelam selama berhari-hari tetapi belum tertancap pada substrat, memiliki kecenderungan untuk kembali mengapung secara horizontal (Rabinowitz, 1978). Menurut Costa *et al.* (2016) teknik reproduksi yang dilakukan mangrove, perkecambahan terjadi saat buah masih menempel pada pohon (reproduksi vivipar), akan dapat meningkatkan peluang benih bertahan hidup di lingkungan yang biasanya justru menghambat perkecambahan benih, seperti lingkungan yang relatif asin dan berlumpur dengan tingkat oksigen yang rendah.

3. Parameter terkait dengan produksi metabolit sekunder pada mangrove

Produksi metabolit sekunder pada mangrove distimulasi oleh tekanan yang dialaminya. Tekanan tersebut merupakan bagian dari proses interaksi mangrove dengan lingkungannya yang dinamis. Semakin tinggi tingkat stres yang dialami mangrove maka semakin tinggi pula kuantitas metabolit sekunder yang diproduksi (Buchanan *et al.*, 2015). Faktor lingkungan yang menjadi bentuk tekanan lingkungan yang dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada mangrove, seperti salinitas, suhu, predasi, pasang surut, dan sedimentasi.

a. Salinitas

Sebagai tumbuhan yang dapat beradaptasi terhadap lingkungan dengan salinitas tinggi (*salt-tolerant plant*), mangrove melakukan beragam adaptasi yang ditunjukkan dengan kekhasan pada struktur daun hingga akarnya. Meskipun begitu, pertumbuhan optimal mangrove tercapai di lingkungan dengan salinitas rendah. Hal ini karena mangrove bukan tumbuhan yang membutuhkan garam untuk tumbuh (*salt demand*) dan salinitas yang ekstrem justru dapat menghambat pertumbuhannya (Hutahean *et al.*, 1999). Menurut Basyuni *et al.* (2018) pertumbuhan optimal *R. mucronata* diamati pada kondisi perairan dengan salinitas 30 ppt. Selain itu, peningkatan konsentrasi salinitas berbanding lurus dengan peningkatan terpenoid dalam mangrove (Basyuni *et al.*, 2012).

b. Suhu

Suhu yang dapat mendukung optimalisasi fotosintesis pada tumbuhan mangrove adalah 28-32°C dan jika suhu mencapai 38-40°C maka proses fotosintesis akan terhenti (Gilman *et al.*, 2008). Untuk melindungi mangrove dari tekanan suhu yang tinggi atau

dari intensitas cahaya matahari yang berlebih, mangrove memproduksi senyawa metabolit sekunder seperti terpenoid dan flavonoid (Buchanan *et al.*, 2015).

c. Predasi

Kepiting merupakan predator utama yang menyebabkan mortalitas tinggi pada semaian mangrove. Untuk merespon kegiatan pemangsa dari hewan herbivora seperti kepiting, mangrove memproduksi senyawa metabolit sekunder yang memiliki kemampuan *antifeedant*. Respon yang sama juga diberikan kepada serangga yang menyebabkan kerusakan pada daun mangrove (Buchanan *et al.*, 2015). Menurut Menezes & Peixoto (2009) mangrove dari genus *Rhizophora* memiliki tingkat resistensi yang paling kuat terhadap serangga karena akumulasi tanin pada daunnya.

d. Pasang surut

Pasang surut merupakan salah satu faktor abiotik yang dapat menjelaskan adanya zonasi pada hutan mangrove. Di Indonesia, areal yang digenangi oleh pasang sedang didominasi oleh *Rhizophora* sp. (Noor *et al.*, 2006). Dengan tingkat penggenangan 3-9 jam, semaian *Rhizophora mucronata* mencapai respon pertumbuhan terbaik (Hoppe-Speer *et al.*, 2011). Penggenangan yang terlalu lama dapat mengganggu pembukaan stomata sehingga menghambat proses fotosintesis, selain dapat menyebabkan kondisi anoksia (Kusmana & Septiarie, 2014).

e. Sedimentasi

Sedimentasi pada kawasan mangrove dipengaruhi oleh kecepatan aliran air yang dibangkitkan oleh pasang surut. Aliran tersebut dipecah oleh akar mangrove sehingga kecepatan aliran akan semakin berkurang dari arah laut ke darat. Arus yang kuat akan mengendapkan konsentrasi sedimen yang lebih banyak dengan ukuran partikel yang lebih besar, sedangkan arus yang lemah akan mengendapkan sedimen dengan konsentrasi yang lebih rendah dengan butiran yang lebih kecil (Safitri *et al.*, 2017). Sedimentasi seringkali dihubungkan dengan kandungan unsur hara. Substrat yang berukuran kecil dan bertekstur halus dapat menahan air lebih banyak dan menyerap lebih banyak unsur hara (Mahmud *et al.*, 2014). Di sisi lain, substrat yang lebih halus memiliki waktu penjuanan yang lebih lama sebagai konsekuensi dari tingginya permeabilitas pada substrat halus. Menurut Ellison (1998) sedimentasi yang berlebihan dapat mengurangi suplai oksigen pada bagian akar mangrove.

4. Tingkat Pertumbuhan Mangrove

Tinggi tanaman merupakan parameter yang sering diamati, baik sebagai indikator pertumbuhan maupun untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang ditetapkan, karena merupakan ukuran pertumbuhan yang paling mudah terlihat (Sitompul & Guritno, 1995 *dalam* Rusdiana *et al.*, 2015). Pertumbuhan mangrove dapat dibedakan menjadi empat tingkatan, yaitu semai, pancang, tiang, dan pohon (Bismark, 2011). Namun, pada beberapa referensi, tingkatan tiang telah digabungkan ke dalam tingkatan pohon (Ghufirona *et al.*, 2015; Hidayatullah & Pujiono, 2014; Seran, 2019). Kriteria masing-masing tingkat pertumbuhan tersebut adalah (Ghufirona *et al.*, 2015; Hidayatullah & Pujiono, 2014; Seran, 2019):

1. Semai (*seedling*): semua permudaan (anakan) mulai dari fase kecambah sampai anakan yang tingginya tidak lebih dari 1,5 m
2. Pancang (*sapling*): semua semai yang telah tumbuh mencapai atau melebihi 1,5 m dengan diameter kurang dari 10 cm
3. Pohon (*tree*) dengan batasan semua tumbuhan dengan diameter ≥ 10 cm.

B. Metabolit Sekunder

Senyawa metabolit pada tumbuhan dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yaitu metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer digunakan tumbuhan untuk tumbuh dan berkembang, misalnya asam amino, karbohidrat, dan lemak, sedangkan metabolit sekunder berperan dalam interaksi antara tumbuhan dengan lingkungan (Buchanan *et al.*, 2015). Metabolit sekunder dapat melindungi tumbuhan menghadapi tekanan biotik (mikroorganisme, nematoda, serangga, herbivora) maupun abiotik (temperatur dan kelembaban yang ekstrem, akumulasi logam berat) (Pagare *et al.*, 2015).

Rhizophora mucronata dilaporkan memproduksi metabolit sekunder yang tersebar di setiap organnya, seperti akar, batang, daun, buah hingga bunga. *R. mucronata* memiliki kemampuan antidiabetes (Hardoko *et al.*, 2016), antidiare (Puspitasari *et al.*, 2012), antikanker (Diastuti & Suwandri, 2009), antiinflamasi (Kumari *et al.*, 2015), antifungi (Rastegar & Gozari, 2016), antivirus (Premanathan *et al.*, 1999), antibakteri (Nurdiani *et al.*, 2012), dan antioksidan (Kasitowati *et al.*, 2017).

Antioksidan diperlukan untuk mencegah stres oksidatif. Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh (Werdhasari, 2014). Antioksidan bekerja dengan menghambat pembentukan radikal bebas, memutus rantai radikal bebas, dan memperbaiki sel yang rusak (Winarsi, 2007). Meskipun makhluk hidup menghasilkan

enzim tertentu sebagai antioksidan (Werdhasari, 2014), tetapi asupan antioksidan eksternal masih diperlukan sebab antioksidan yang disintesis dalam tubuh tidak cukup untuk mencegah dan mengatasi tekanan oksidatif (Thatoi *et al.*, 2014). Oleh karena itu, eksplorasi antioksidan alami dari tumbuhan seperti mangrove sangat dibutuhkan. Beberapa bentuk senyawa metabolit sekunder yang memiliki kemampuan antioksidan adalah alkaloid, flavonoid, terpenoid, fenol, dan saponin.

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan metabolit sekunder yang memiliki atom nitrogen. Konsentrasi alkaloid yang tinggi ditemukan di jaringan yang tersusun atas sel-sel aktif seperti kloroplast dan mitokondria (daun) dan jaringan meristem (kambium, akar, dan ujung batang). Alkaloid bersifat toksik bagi serangga dan dapat berfungsi sebagai *antifeedant*. Alkaloid menghambat aktivitas makan serangga secara permanen maupun sementara dengan menyebabkan bau dan rasa yang tidak disukai oleh serangga (Buchanan *et al.*, 2015).

2. Flavonoid

Senyawa dari golongan polifenol dengan potensi antioksidan ini produksinya distimulasi oleh cahaya, sehingga senyawa ini terkonsentrasi pada lapisan epidermis daun dan kulit buah. Flavonoid dapat melindungi tumbuhan dari paparan sinar ultra violet, sehingga konsentrasi flavonoid pada tumbuhan sangat tergantung pada intensitas cahaya. Selain itu, senyawa ini juga dapat memberikan rasa dan warna pada sayur dan buah (Blomhoff, 2010; Takahashi *et al.*, 1991).

3. Terpenoid

Golongan ini merupakan metabolit sekunder dengan senyawa turunan paling banyak, sekitar 30.000 senyawa turunan. Kata terpenoid berasal dari kata "terpentin" yang dalam bahasa Jerman berarti getah pohon pinus, karena beberapa senyawa turunan terpenoid pertama kali diisolasi dari getah pohon pinus (Buchanan *et al.*, 2015). Terpenoid dapat ditemukan di semua organ tumbuhan. Senyawa ini memiliki peran yang signifikan dalam proses pertumbuhan, metabolisme, dan ekologi, seperti mengatasi patogen dan herbivora, menghambat germinasi dan pertumbuhan dari tumbuhan lain, menarik hewan yang dapat membantu proses polinasi, atau mengatasi tekanan suhu dan stres oksidatif dengan cara mengikat oksigen reaktif (Buchanan *et al.*, 2015; Harborne, 1988).

4. Fenol

Fenol merupakan golongan senyawa yang umum ditemukan pada semua organ tumbuhan berpembuluh. Senyawa ini bersifat hidrofilik karena ikatan hidroxyl yang dimilikinya cenderung berikatan dengan karbohidrat (Buchanan *et al.*, 2015). Salah satu senyawa dari golongan fenol adalah tanin. Pada daun, senyawa ini diproduksi oleh vakuola dan berperan dalam melindungi tumbuhan dari mikroorganisme dan pemangsa serta melindungi dari sinar UV (Buchanan *et al.*, 2015; Harborne, 1988). Senyawa ini menempati urutan keempat sebagai senyawa yang paling banyak diproduksi oleh tumbuhan berpembuluh setelah selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Lin *et al.*, 2006).

5. Saponin

Saponin merupakan triterpene dalam bentuk glikosida dan berperan utama dalam mekanisme pertahanan tumbuhan dari serangan fungi dan bakteri (Buchanan *et al.*, 2015). Saponin dapat ditemukan di semua organ tumbuhan, dan serangan fungi akan mempengaruhi kuantitas senyawa ini. Pada daun, senyawa ini sebagian besar terakumulasi di dalam jaringan palisade dan lebih sedikit di jaringan spons dan epidermis (Faizal & Geelen, 2013).

C. Metode Ekstraksi

Di dalam suatu bahan alam (*natural product*), terkandung senyawa aktif yang sifatnya dapat larut atau tidak dapat larut dalam pelarut cair. Teknik yang digunakan untuk memisahkan kedua senyawa tersebut ialah dengan ekstraksi. Ekstraksi sendiri dapat diartikan sebagai suatu proses penarikan senyawa aktif dari suatu jaringan hewan atau tumbuhan menggunakan pelarut tertentu dalam suatu prosedur yang telah terstandarisasi (Handa *et al.*, 2008; Depkes, 2000). Beberapa metode ekstraksi yang biasa digunakan adalah maserasi, perkolasi, soxhlet, refluks, destilasi uap, dan sonikasi (Mukhriani, 2014). Menurut Sarker *et al.* (2006) proses ekstraksi bahan alam meliputi beberapa langkah.

1. Pengambilan Sampel

Semua bagian tumbuhan, baik yang tumbuh di atas maupun di bawah permukaan tanah, dapat dijadikan sebagai sampel penelitian selama bagian tersebut masih mengandung senyawa target. Selain itu, spesimen yang digunakan juga harus bebas dari tanda-tanda kontaminasi mikroorganisme (fungi, bakteri, dan virus) untuk menghindari adanya perubahan pada profil metabolit sekunder. Koleksi spesimen juga

dapat tergantung pada faktor seperti umur tanaman dan kondisi lingkungan (suhu, curah hujan, intensitas cahaya, karakteristik tanah, dan altitude) (Sarker *et al.*, 2006).

2. Pengerinan dan Perajangan

Simplisia khususnya simplisia nabati adalah tumbuhan utuh, bagian tumbuhan, dan/atau eksudat tumbuhan yang telah melalui proses pasca panen dan preparasi sederhana menjadi bentuk produk kefarmasian yang siap dipakai atau siap diproses selanjutnya (Depkes, 2000). Salah satu kegiatan pasca panen yang paling penting dalam preparasi simplisia adalah pengerinan. Pengerinan berfungsi untuk menghilangkan kadar air dalam sampel segar sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan meminimalisir reaksi biokimia yang dapat mempengaruhi kualitas ekstrak. Pengerinan juga dapat mereduksi ukuran berat dan volume sampel sehingga memudahkan dalam penyimpanan dan transportasi sampel (Saifullah *et al.*, 2019).

Hilangnya kadar air secara signifikan pada sampel membuat struktur mikrofisik sampel menjadi lebih renggang yang artinya pelarut dapat lebih mudah berpenetrasi ke dalam sampel sehingga jumlah ekstrak yang dihasilkan lebih banyak. Akan tetapi, pengerinan dapat pula mempengaruhi senyawa fitokimia dan nutrisi di dalam sampel yang termasuk senyawa termosensitif (Saifullah *et al.*, 2019). Pengerinan menggunakan suhu yang tinggi dapat memperpendek durasi pengerinan, tetapi kualitas ekstrak menjadi lebih buruk jika dibandingkan ekstrak yang melalui pengerinan dalam jangka waktu panjang menggunakan suhu yang lebih rendah (Iwansyah *et al.*, 2020; Samosir *et al.*, 2018).

Berbagai penelitian membuktikan perbedaan metode pengerinan dapat berdampak terhadap kandungan senyawa aktif dari ekstrak herbal tertentu. Diantara berbagai macam metode pengerinan yang ada, metode kering angin (*shade drying*) lebih banyak digunakan dalam penyiapan simplisia. Metode ini mengeringkan sampel dengan cara diangin-anginkan di suatu tempat dengan sirkulasi udara yang baik dan terhindar dari cahaya matahari langsung (Handa *et al.*, 2008).

Pengerinan menggunakan oven dengan suhu yang stabil dan terukur lebih banyak digunakan untuk mengeringkan sampel yang melimpah (Handa *et al.*, 2008). Menurut Winangsih *et al.* (2013) pengerinan menggunakan oven memiliki keunggulan dari segi kualitas produk dibandingkan dengan metode kering angin dan sinar matahari langsung. Terlepas dari nilai ekonomis yang ditawarkan, pengerinan dengan sinar matahari langsung dapat merusak senyawa kimia akibat paparan sinar ultra violet, sedangkan metode kering angin dianggap kurang efisien sebab membutuhkan waktu yang relatif lama dalam pengerinan simplisia.

Pada penelitian yang menguji sifat antioksidan pada daun lemon, diketahui pengeringan menggunakan metode *freeze drying* ($1185,15 \pm 16,35$ mM TE/g dw) menempati urutan pertama dengan aktivitas antioksidan tertinggi. Metode lain yang berada di urutan kedua adalah pengeringan menggunakan oven ($963,56 \pm 53,18$ mM TE/g dw) kemudian diikuti oleh metode pengeringan menggunakan *vacuum* ($898,39 \pm 105,15$ mM TE/g dw), *microwave* ($890,41 \pm 31,14$ mM TE/g dw), *shade drying* ($878,9 \pm 60,63$ mM TE/g dw), dan *sun drying* ($819,31 \pm 63,04$ mM TE/g dw) (Saifullah *et al.*, 2019). Selain itu, Iwansyah *et al.* (2020) menyatakan metode pengeringan menggunakan oven pada suhu 45°C merupakan pengeringan dan suhu terbaik untuk *Moringa oleifera*. Di sisi lain, penelitian Samosir *et al.* (2018) yang meneliti aktivitas antioksidan dengan 5 perlakuan pengeringan membuktikan metode pengeringan tidak berpengaruh nyata terhadap nilai antioksidan, total fenol, dan total tanin daun pedada, tetapi berpengaruh nyata terhadap kadar air dan rendemennya. Metode pengeringan dengan oven suhu 50°C selama 6 jam 50 menit memberikan hasil terbaik dengan kemampuan inhibisi radikal bebas sebesar 76,94% mengalahkan metode pengeringan menggunakan matahari langsung selama 4 jam 25 menit (71,48%) dan metode kering angin selama 144 jam (73,93%).

Setelah melalui proses pengeringan, sampel selanjutnya dirajang/dihancurkan menjadi serbuk dengan derajat partikel yang dikehendaki, biasanya berukuran 30-40 *mesh* (Handa *et al.*, 2008). Proses perajangan ini berguna untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi dengan memperluas area permukaan sampel yang akan melakukan kontak langsung dengan pelarut. Akan tetapi, derajat partikel sebaiknya tidak terlalu halus karena akan menyulitkan pelarut untuk berpentiasi ke dalam sampel. Selain itu, perajangan sampel menjadi sangat halus dapat merusak senyawa aktif sebab semakin halus sampel maka semakin banyak panas yang dihasilkan oleh alat perajang (*blender*) (Sarker *et al.*, 2006). Ditambah lagi, sampel yang terlalu halus membutuhkan peralatan filtrasi yang lebih canggih secara teknologi (Depkes, 2000).

Menurut Sarker *et al.* (2006), jika penelitian membutuhkan sampel segar untuk dianalisis, maka disarankan untuk segera mengekstrak sampel dengan pelarut organik yang mampu mendeaktivasi aktivitas enzim pada sampel. Alternatif lain yang dapat dilakukan yaitu menyimpan sampel dalam *cool box* atau diawetkan menggunakan alkohol.

3. Ekstraksi dengan metode maserasi

Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu

(Mukhriani, 2014). Jika senyawa target merupakan senyawa yang termolabil, maka ekstraksi cara dingin seperti maserasi paling umum digunakan (Handa *et al.*, 2008).

Maserasi adalah proses perendaman simplisia menggunakan pelarut tertentu dalam wadah tertutup dengan atau tanpa pengadukan. Pengadukan (secara konstan ataupun berkala) dalam maserasi bertujuan untuk meningkatkan efisiensi difusi molekul dan memastikan pelarut melakukan kontak dengan partikel secara merata (Handa *et al.*, 2008). Jika konsentrasi antara senyawa dalam pelarut dan konsentrasi dalam sel tanaman mencapai keseimbangan maka proses maserasi dapat dihentikan (Sarker *et al.*, 2006) atau dapat juga melakukan remaserasi dengan cara mengganti pelarut dengan pelarut baru dengan jenis dan volume yang sama agar senyawa aktif yang masih ada pada *marc* (sisa atau bahan yang tidak larut dalam ekstraksi) bisa diekstrak kembali (Handa *et al.*, 2008).

Keberhasilan maserasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu jenis pelarut, volume pelarut, dan durasi maserasi (Sarker *et al.*, 2006; Yulianingtyas & Kusmartono, 2016). Pelarut yang dipilih harus memenuhi syarat, seperti memiliki toksisitas rendah, tidak mudah terbakar, tidak korosif, tidak mudah meledak, titik didih rendah, reaktivitas rendah, viskositas rendah, dan harga terjangkau (Handa *et al.*, 2008). Selain itu, pemilihan pelarut juga harus mengikuti prinsip "*like dissolves like*", artinya suatu pelarut akan melarutkan senyawa dengan karakteristik kimia yang sama. Dengan demikian, pelarut polar (seperti ethanol, metanol, air) cenderung akan melarutkan senyawa polar (flavonoid glycoside, tannin, alkaloid). Pelarut semipolar (seperti etil asetat dan dichloromethane) akan melarutkan senyawa semipolar (alkaloids, flavonoid), sedangkan pelarut non-polar (seperti n-hexane dan chloroform) akan melarutkan senyawa polar (alkaloid, asam lemak, pigmen, sterol, terpenoid, alkaloid, kumarin) (Sarker *et al.*, 2006).

Secara umum pelarut yang sering digunakan dalam maserasi adalah pelarut organik (Tabel 1) karena mampu meningkatkan permeabilitas dinding sel tanaman, mencegah pertumbuhan mikroorganisme, dan lebih mudah menguap daripada air. Volume pelarut dan waktu maserasi dapat mempengaruhi kuantitas senyawa kimia. Semakin besar volume pelarut yang ditambahkan dan semakin lama waktu maserasi, maka flavonoid terekstrak yang didapatkan semakin banyak. Setelah tercapai kondisi optimum, hasil ekstraksi flavonoid cenderung menurun (Yulianingtyas & Kusmartono, 2016)

Kerugian utama dari metode maserasi adalah menggunakan banyak waktu, banyak pelarut, dan kemungkinan besar 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).

Tabel 1. Sifat fisikokimia dari beberapa pelarut yang umum digunakan dalam ekstraksi bahan aktif (Sarker *et al.*, 2006)

Pelarut	Indeks Polaritas	Titik didih (°C)	Viskositas (cPoise)	Kelarutan dalam air (% w/w)
n-Hexane	0,0	69	0,33	0,001
Dichloromethane	3,1	41	0,44	1,6
n-Butanol	3,9	118	2,98	7,81
Iso-propanol	3,9	82	2,30	100
n-propanol	4,0	92	2,27	100
Chloroform	4,1	61	0,57	0,815
Ethyl acetate	4,4	77	0,45	8,7
Acetone	5,1	56	0,32	100
Metanol	5,1	65	0,60	100
Ethanol	5,2	78	1,20	100
Air	9,0	100	1,00	100

4. Pemekatan

Terlepas dari metode ekstraksi yang digunakan, maserat yang didapatkan harus disaring untuk memisahkannya dari *marc* (sisa, ampas, atau bahan yang tidak larut dalam pelarut). Setelah itu, maserat/*miscella* kemudian dipekatkan dalam *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C untuk menghindari dekomposisi senyawa termolabil (Sarker *et al.*, 2006). Pemekatan dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kental yang sudah bebas dari pelarut (Depkes, 2000).

D. Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Seperti namanya, metode ini merupakan metode uji antioksidan menggunakan senyawa DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Senyawa DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil karena sifat delokalisasi dari elektron bebas dari keseluruhan molekul sehingga molekul-molekul DPPH tidak mengalami dimerisasi. Sifat delokalisasi elektron inilah yang memberikan warna ungu tua pada senyawa DPPH. Ketika larutan DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat memberikan atom hidrogen, senyawa DPPH akan tereduksi menjadi senyawa antiradikal, yaitu 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin dan warna larutan campuran pun akan berubah menjadi kuning (Molyneux, 2004).

Metode uji antioksidan menggunakan DPPH ini cocok digunakan untuk melakukan skrining aktivitas antioksidan karena metode ini mudah, cepat, dan sensitif. Hasil uji penghambatan radikal bebas DPPH ini dinyatakan dalam persentase inhibisi dan nilai konsentrasi minimum bahan untuk menghambat 50% radikal bebas (IC₅₀). Nilai IC₅₀ menyatakan konsentrasi terkecil dari senyawa antioksidan yang mampu menghambat 50% senyawa radikal bebas. Semakin kecil nilai IC₅₀ suatu bahan, maka semakin kuat pula aktivitas antioksidannya (Molyneux, 2004). Berikut ini merupakan sifat aktivitas antioksidan yang dikategorikan berdasarkan nilai IC₅₀:

Tabel 2. Sifat antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀ (Reynertson, 2007)

Nilai IC ₅₀ (µg/ml)	Sifat Antioksidan
<50	Sangat kuat
50-100	Kuat
100-200	Sedang
>200	Sangat Lemah

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Agustus-November 2021. Pengambilan sampel *Rhizophora mucronata* dilakukan di Kawasan Hutan Mangrove Lantebung, Kelurahan Bira, Kecamatan Tamalanrea, Makassar. Preparasi sampel dilakukan di Laboratorium Biologi Laut dan Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Uji fitokimia dan uji antioksidan dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Kimia Pakan, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar.



Gambar 2. Peta lokasi pengambilan daun *Rhizophora mucronata* di Kawasan Hutan Mangrove Lantebung, Kelurahan Bira, Kecamatan Tamalanrea, Makassar

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *blender* untuk menghaluskan sampel, *vacum filter* untuk menyaring sampel, *vortex* untuk menghomogenkan sampel, oven untuk mengeringkan sampel, *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan pelarut, spektrofotometer untuk mengukur absorbansi larutan sampel, toples kaca sebagai wadah untuk simplisia, batang pengaduk untuk mengaduk sampel, corong