



## Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Akar *Rhizophora stylosa* Metode ABTS dan FRAP

Danang Raharjo<sup>1\*</sup>, Tiara Ajeng Listyani<sup>2</sup>, Dwi Bagus Pambudi<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Duta Bangsa Indonesia

<sup>3</sup> Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan Indonesia

e-mail: danang\_raharjo@udb.ac.id,

Received: 11-8-2022

Revised: 25-8-2022

Accepted: 1-9-2022

### Abstract

Free radicals are reactive oxygen compounds that are known to be compounds that have free or unpaired electrons. Free radicals will look for new partners so that they will easily bind to other substances such as proteins, fats, and DNA in the body, causing cell damage and causing various degenerative diseases. To overcome the negative effects of free radicals, a substance that acts as an antioxidant is needed. *Rhizophora stylosa* or often called small mangroves by coastal communities is often used to treat various diseases including diabetes, ulcers, analgesic diarrhea, inflammation, pain and accelerate wound healing. This study aimed to investigate the levels of flavonoid compounds in the ethanolic extract of the roots of *Rhizophora stylosa* using the  $AlCl_3$  complex method and the antioxidant activity using the ABTS method (2,2 azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) against the extract. ethanol and 3 root fractions of *Rhizophora stylosa*. The research process begins with the extraction of the roots of *Rhizophora stylosa* with 96% ethanol, then the fractionation process uses the liquid-liquid partition method with a separating funnel. Determination of flavonoid levels was measured by  $AlCl_3$  complex with quercetin as a standard for comparison. Antioxidant activity was determined by ABTS and FRAP methods. From the flavonoid level test, it was found that the flavonoid content in the ethanolic extract of the roots of *Rhizophora stylosa* was  $18,803 \pm 0.198$  QE. Antioxidant activity using ABTS and FRAP methods showed that the ethyl acetate fraction had the highest antioxidant activity with values of  $18,553 \pm 1,440$  ppm and  $33,048 \pm 0.424$  mgAAE/g, respectively. Based on the table of antioxidant activity, the ethyl acetate fraction is included in the category of very strong antioxidant because it is less than 50 ppm

Keyword : *Rhizophora stylosa* root; levels of flavonoids; Antioxidant activity; ABTS; FRAP

### Abstrak

Radikal bebas merupakan senyawa oksigen reaktif yang diketahui merupakan senyawa yang memiliki elektron bebas atau tidak berpasangan. Radikal bebas akan mencari pasangan baru sehingga akan mudah berikatan dengan zat lain seperti protein, lemak, dan DNA di dalam tubuh, sehingga mengakibatkan kerusakan sel dan menimbulkan berbagai macam penyakit degeneratif. Untuk mengatasi efek negatif radikal bebas diperlukan suatu zat yang bersifat sebagai antioksidan. *Rhizophora stylosa* atau sering disebut bakau kecil oleh masyarakat pesisir sering digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit diantaranya diabetes, ulkus, diare analgetik, radang, nyeri dan mempercepat penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti kadar senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol akar *Rhizophora stylosa* dengan metode kompleks  $AlCl_3$  dan aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat) dan FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) terhadap ekstrak etanol dan 3 fraksi akar *Rhizophora stylosa*. Proses penelitian diawali dengan ekstraksi akar *Rhizophora stylosa* dengan etanol 96 %, selanjutnya proses fraksinasi menggunakan metode partisi cair-cair dengan corong pisah. Penetapan kadar flavonoid diukur dengan kompleks  $AlCl_3$  dengan kuersetin sebagai baku pembanding. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode ABTS dan FRAP. Dari pengujian kadar flavonoid didapatkan hasil kadar flavonoid dalam ekstrak etanol akar *Rhizophora stylosa* sebesar  $18.803 \pm 0.198$  QE. Aktivitas antioksidan dengan metode ABTS dan FRAP didapatkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai masing-masing  $18,553 \pm$



1,440 ppm dan  $33,048 \pm 0,424$  mgAAE/g. Berdasarkan tabel aktivitas antioksidan fraksi etil asetat termasuk dalam kategori antioksidan yang sangat kuat karena kurang dari 50 ppm

**Kata kunci :** Akar *Rhizopora stylosa*; Kadar flavonoid; Aktivitas antioksidan; ABTS; FRAP.

## 1. Pendahuluan

Radikal bebas merupakan senyawa oksigen reaktif yang diketahui merupakan senyawa yang memiliki elektron bebas atau tidak berpasangan. Sumber radikal bebas Radikal bebas dapat bersumber dari dalam (sisa metabolisme tubuh) maupun dari luar tubuh (sinar UV, polutan, dll) [1]. Radikal bebas akan mencari pasangan baru sehingga akan mudah berikatan dengan zat lain seperti protein, lemak, dan DNA di dalam tubuh, sehingga mengakibatkan kerusakan sel dan menimbulkan berbagai macam penyakit degenerative [2]. Penyakit degeneratif yang disebabkan oleh radikal bebas meliputi kanker, jantung koroner, rematik, penyakit respiratorik, katarak, liver, dan aging. Untuk mencegah hal tersebut dibutuhkan antioksidan untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredam dampak negatifnya [3].

Antioksidan adalah suatu substansi yang diperlukan oleh tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang dapat disebabkan oleh radikal bebas terhadap sel-sel normal, protein, lemak dan antioksidan mempunyai kemampuan mendonorkan elektron untuk menstabilkan radikal bebas. Antioksidan dapat diproduksi di dalam maupun luar tubuh [4]. Sumber antioksidan alami banyak berasal dari buah, sayuran, atau tanaman lain yang mengandung vitamin A, C, antosianin, senyawa fenol, dan flavonoid [2].

Indonesia kaya akan sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami, salah satunya adalah mangrove *Rhizophora stylosa*. *Rhizophora stylosa* atau sering disebut bakau kecil oleh masyarakat pesisir sering digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit diantaranya diabetes, ulkus, diare analgetik, radang, nyeri dan mempercepat penyembuhan luka [5]. *Rhizophora stylosa* memiliki kandungan kimia berupa steroid, tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, antosianida, antrokuinon, glikosida jantung dan phlobatanins [6]. Senyawa metabolit yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami adalah flavonoid. Nebula et al., 2013 melaporkan senyawa flavonoid yang telah diisolasi dari batang dan daun *Rhizophora stylosa* adalah rutin, astilbin, (-)-3,7-O-diacetyl-epicatechin, catechin, epicatechin, afzelechin, proanthocyanidin B2 dan chinconain [7]. Delapan senyawa flavonoid yang diisolasi dari batang dan daun *Rhizophora stylosa*, proanthocyanidin B2 menunjukkan aktivitas penangkapan radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) terkuat dengan nilai  $IC_{50}$  4,3 ppm, diikuti oleh epicatechin dan catechin keduanya dengan nilai  $IC_{50}$  6,5 ppm, dan cinchonain dengan  $IC_{50}$  sebesar 7,8 ppm [8].

Berdasarkan penelitian tersebut, mendorong peneliti untuk mengkaji lebih lanjut mengenai potensi antioksidan dari ekstrak etanol dan tiga fraksi akar *Rhizophora stylosa* dengan metode ABTS dan FRAP. Selain itu juga menetapkan kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol *Rhizophora stylosa*.

## 2. Metode

### Alat dan Bahan



Rotary evaporator (Buchi R14), Spektrofotometer UV/VIS (Genesys 50), Timbangan Analitik (Ohaus Px224), Serbuk akar *Rhizopora stylosa*, Quercetine (Sigma Aldrich), Etanol 96 %, Etil Asetat, N-Heksane,  $\text{AlCl}_3$  (Sigma Aldrich), ABTS (Sigma Aldrich), Vitamin C (Sigma Aldrich), Kalium persulfat (Sigma Aldrich), TCA,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (Sigma Aldrich).

#### **Ekstraksi Akar Bakau Kecil (*Rhizopora stylosa*)**

Sebanyak 500 gram serbuk kulit batang mangrove merah diekstraksi dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96 % selama 24 jam dengan beberapa kali pengadukan, kemudian saring dengan corong buchner. Ampas di remaserasi sebanyak 2 kali selama 24 jam. Maserat yang dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40 – 60OC. Ampas di remaserasi sebanyak 3 kali. Filtrat diuapkan diatas waterbath dan didapatkan ekstrak kental.

#### **Fraksinasi Ekstrak Etanol Bakau Kecil (*Rhizopora stylosa*)**

Ekstrak kental sebanyak 20 g ekstrak dilarutkan dengan aquades sebanyak 150 mL etanol, kemudian dimasukkan dalam corong pisah. Fraksinasi pertama dengan penambahan n-heksana sebanyak 150 mL kemudian digojog dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan (lapisan aquadest di bawah dan lapisan n-heksana di atas) ambil lapisan n-heksana (replikasi 3 kali). Fraksinasi selanjutnya dilakukan dengan penambahan etil asetat sebanyak 150 mL ke dalam lapisan kemudian digojog dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan (lapisan aquadest di bawah dan lapisan etil asetat di atas) ambil lapisan n-heksana (replikasi 3 kali). Fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana selanjutnya dipekatkan dengan rotary evaporator dan dipekatkan di atas water bath [9].

#### **Penetapan Kadar Flavonoid**

##### **a. Penentuan panjang gelombang maksimum**

Larutan kuersetin dengan konsentrasi 20 ppm dipipet 1,0 mL kemudian ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, dan 1 mL natrium asetat 1 M, selanjutnya diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-500 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum [10].

##### **b. Penentuan Operating Time (OT)**

Larutan kuersetin dengan konsentrasi 20 ppm dipipet 1,0 mL kemudian ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, dan 1 mL natrium asetat 1 M, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang dengan interval waktu 1 menit hingga diperoleh absorbansi stabil. Operating time (OT) tercapai pada waktu dihasilkan absorbansi yang stabil [10].

##### **c. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin**

Dibuat beberapa konsentrasi yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm. Dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin dipipet 1 mL. Kemudian ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10% dan 1 mL natrium asetat 1M. Sampel



diinkubasi selama operating time. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang maksimum [10].

**d. Penetapan Kadar Flavonoid Total**

Sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL larutan  $AlCl_3$  10% dan 1 mL natrium asetat 1 M. Sampel diinkubasi selama waktu operating time pada suhu kamar. Ukur pada panjang gelombang maksimum [10].

Kadar flavonoid dihitung menggunakan persamaan regresi linier kurva baku quersetin dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y. Hasil absorbansi dari pengukuran sampel dimasukkan ke dalam regresi linier. Absorbansi sampel sebagai y, sehingga kadar flavonoid total yang diperoleh dinyatakan sebagai jumlah mg ekuivalen quersetin (QE) pada tiap gram sampel [11].

**Pengukuran Antioksidan Metode ABTS (2,2-Azinobis 3-ethyl benzothiazoline 6- sulfonic acid)**

**a. Larutan radikal ABTS**

Larutan ABTS sebanyak 5,0 mL ditambahkan 5 mL larutan kalium persulfat, diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22-24 °C selama 12-16 jam sebelum digunakan, dihasilkan  $ABTS^+$  dengan warna biru gelap [12].

**b. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum**

Larutan radikal  $ABTS^+$  dipipet sebanyak 1,0 mL dan dicukupkan dengan buffer phospat pH 7,4 dalam labu ukur 25,0 mL. Absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 700-750 nm, ditentukan panjang gelombang saat diperoleh serapan tertinggi [12].

**c. Penentuan *Operating Time* (OT)**

Larutan vitamin C dengan konsentrasi 16 ppm, dipipet sebanyak 0,1 mL larutan ditambah 2,0 mL larutan radikal  $ABTS^+$  diukur pada panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 1 menit hingga diperoleh absorbansi stabil [13].

**d. Pengukuran Serapan Larutan Blanko  $ABTS^+$**

Larutan ABTS sebanyak 5 mL ditambahkan 5 mL larutan kalium persulfat, diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22-24°C selama 12-16 jam sebelum digunakan, dihasilkan ABTS dengan warna biru gelap. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum [13].

**e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Metode  $ABTS^+$  Vitamin C**

Sebanyak 0,1 mL larutan Vitamin C dengan konsentrasi 1, 2, 4, 8 dan 16 ppm ditambah 2 mL larutan radikal  $ABTS^+$ , larutan selanjutnya diinkubasi selama *operating time* dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum [13]

**f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Metode  $ABTS^+$  Sampel (Ekstrak etanol, Fraksi air, Etil asetat, dan n-Heksana akar *Rhizophora stylosa*)**

Sebanyak 0,1 mL larutan sampel dengan konsentrasi 5, 50, 100, 200, dan 300 ppm ditambah 2 mL larutan radikal  $ABTS^+$ , larutan selanjutnya diinkubasi selama



operating time dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran presentase aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus [13]:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}} \times 100\%$$

Nilai  $IC_{50}$  dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier antara konsentrasi versus % penghambatan. Nilai  $IC_{50}$  didapatkan dari nilai  $x$  setelah mengganti  $y = 50$

### Pengukuran Antioksidan Metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

#### a. Pembuatan Kurva Baku Vitamin C

Diambil masing-masing 1 mL larutan Vitamin C dengan konsentasi 60, 70, 80, 90 dan 100 ppm ditambah dengan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6.6) dan 1 mL  $K_3Fe(CN)_6$  1%, selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dengan suhu  $50^\circ C$ . Setelah inkubasi selanjutnya ditambahkan 1 mL TCA dan disentrifuge 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge dipipet 1 mL lapisan bagian atas kedalam tabung reaksi, dan ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL  $FeCl_3$  0,1%. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada 700 nm [14].

#### b. Pengukuran Antioksidan Sampel

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%, selanjutnya diambil 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6.6) dan 1 mL  $K_3Fe(CN)_6$  1% kemudian, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu  $50^\circ C$ . Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA lalu disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge diambil 1 mL lapisan bagian atas dan ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL  $FeCl_3$  0,1%. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada 700 nm. Sebagai blangko digunakan campuran larutan oksalat. Kapasitas antioksidan didapatkan dari persamaan regresi linier kurva baku Vitamin C antara absorbansi dan konsentrasi sehingga diperoleh persamaan linier  $y = bx + a$ . Untuk menghitung nilai aktivitas antioksidan dengan memasukkan absorbansi sampel dalam persamaan regresi linier. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/ gr ekstrak (AAE) [14].

## 3. Hasil dan Pembahasan

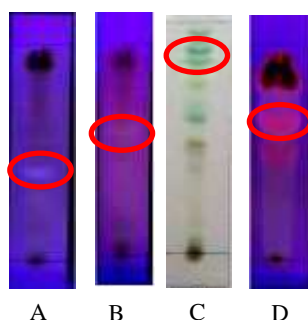
### Hasil

#### a. Skrining Fitokimia Bakau Kecil (*Rhizophora stylosa*).

Tabel 1. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Akar Bakau Kecil (*Rhizophora stylosa*).

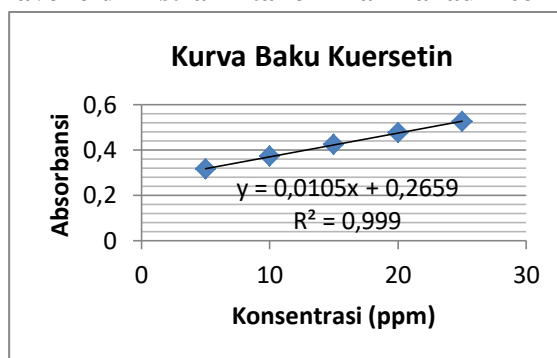
Kandungan Kimia	Pereaksi	Hasil
Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl	+
Fenolik	$FeCl_3$	+
Steroid	Lieberman burchard	+

Alkaloid	Dragendrof	+
Saponin	Uji Busa	+



Gambar 1. Hasil skrining fitokimia dengan KLT (eluen n-Heksane : Etil Asetat 7:3). A. Flavonoid (AlCl<sub>3</sub> 366 nm), B. Fenolik (FeCl<sub>3</sub> 366 nm), Steroid (Lieberman burchard, sinar tampak), Alkaloid (Dragendrof 366 nm)

**b. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Akar Bakau Kecil (*Rhizophora stylosa*).**



Gambar 2. Persaman Kurva Baku Kuersetin

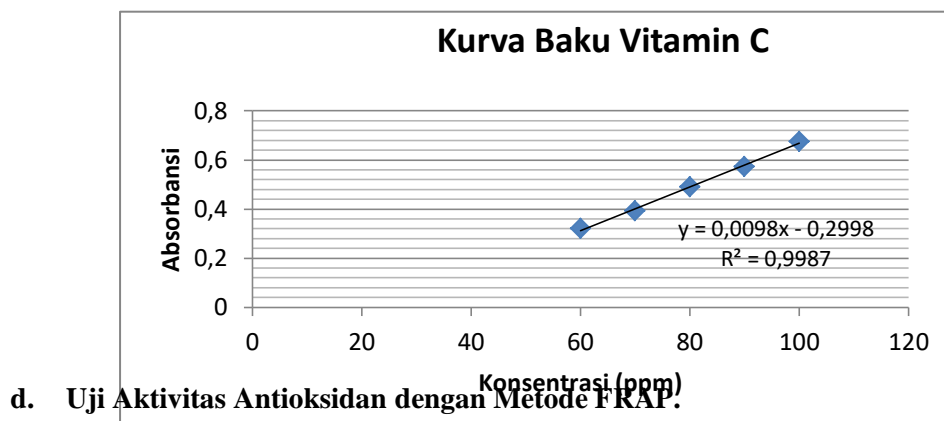
Tabel 2. Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Akar Bakau Kecil (*Rhizophora stylosa*).

Sampel	Absorbansi	Kadar Flavonoid (g/mg kuersetin) QE	Kadar Flavonoid (g/mg kuersetin) QE ± SD
Ekstrak etanol bakau kecil	0.465	18.962	
<i>(Rhizophora stylosa)</i>	0.461	18.581	18.803 ± 0.198
	0.464	18.867	

**c. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS<sup>+</sup>.**

Tabel 3. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS

Sampel	Hasil IC <sub>50</sub> (ppm)
Vitamin C	2,8 ± 2,162
Ekstrak Etanol	107,518 ± 2,862
Fraksi Etanol	52,705 ± 3,821
Fraksi Etil asetat	18,553 ± 1,440
Fraksi Heksane	110,213 ± 15,577



Gambar 4. Persaman kurva baku vitamin C

Tabel 4. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode FRAP

Sampel	Absorbansi	Aktivitas Antioksidan (mgAAE/g sampel)	$\bar{x} \pm SD$
Ekstrak Etanol	0,525	22,980	22,776 $\pm$ 0.204
	0,521	22,571	
	0,523	22,776	
Fraksi Etanol	0,486	19,000	18,354 $\pm$ 0.615
	0,479	18,286	
	0,474	17,776	
Fraksi Etil asetat	0,619	32,571	33,048 $\pm$ 0.424
	0,625	33,184	
	0,627	33,388	
Fraksi Heksane	0,336	3,694	3,796 $\pm$ 0.367
	0,334	3,490	
	0,341	4,204	

## PEMBAHASAN





Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dimana 500 gram serbuk akar bakau kecil (*Rhizopora stylosa*) direndam dengan etanol 96% sebagai pelarut. Dari proses ekstraksi didapatkan rendemen ekstrak kental sebanyak 9,05%. Skrining fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol akar *Rhizopora stylosa* digunakan 2 metode yaitu metode tabung dan KLT. Dari kedua metode skrining fitokimia yang telah dilakukan terhadap ekstrak etanol akar *Rhizopora stylosa* mengandung golongan senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, fenolik, steroid dan saponin. Dalam melakukan KLT perlu dilakukan optimasi fase gerak (eluen). Dari hasil optimasi fase gerak didapatkan campuran eluen n-Heksane : Etil Asetat 7 : 3 Hasil skrining fitokimia dapat dilihat di tabel 1 dan gambar 1.

Penetapan kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol akar *Rhizopora stylosa* dilakukan dengan metode kolorimetri. Prinsip dari metode ini adalah pembentukan kompleks asam yang stabil antara  $AlCl_3$  dengan gugus keton C-4 dan gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 pada flavon dan flavonol. Sedangkan  $AlCl_3$  membentuk ikatan yang labil dengan gugus orto dihidroksi di cincin A atau B pada flavonoid sehingga terbentuk warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV/VIS. Sebagai standar baku digunakan quersetin karena quersetin termasuk flavonoid golongan flavonol [15]. Penambahan natrium asetat untuk menstabilkan pembentukan kompleks antara  $AlCl_3$  dan flavonoid [16]. Dalam penetapan kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol bakau kecil (*Rhizopora stylosa*) perlu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum, *operating time* dan pembuatan kurva baku quersetin yang akan digunakan dalam pengujian.

Dari hasil penetapan panjang gelombang maksimum dan *operating time* didapatkan panjang gelombang maksimum sebesar 415 nm sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Das et al., 2013 dan *operating time* selama 21 menit untuk inkubasi [17]. Dalam pembuatan kurva baku quersetin dilakukan pada panjang gelombang maksimum yaitu 415 dengan waktu inkubasi selama 21 menit. Dari penentuan kurva baku quersetin didapatkan persamaan regresi linier  $y = 0.0105x + 0.2659$  dengan nilai korelasi  $R^2 = 0.999$  gambar 2.

Penentuan kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol akar bakau kecil (*Rhizopora stylosa*) dengan memasukkan absorbansi yang dihasilkan ke dalam persamaan kurva quersetin sebagai sumbu y. Dari hasil pengukuran menunjukkan ekstrak etanol akar bakau kecil (*Rhizopora stylosa*) mengandung flavonoid sebesar  $18.803 \pm 0.198$  QE. Hasil pengukuran kadar flavonoid dapat dilihat dalam tabel 2.

Penentuan aktivitas antioksidan dalam penelitian menggunakan 2 metode yaitu ABTS dan FRAP. Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS adalah peredaman radikal bebas  $ABTS^+$  sehingga warna biru dari radikal bebas  $ABTS^+$  menghilang. Radikal bebas  $ABTS^+$  terjadi dari reaksi dari garam diammonium ABTS dengan kalium persulfat yang menghasilkan warna biru [18]. Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ABTS perlu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dan *operating time* yang akan digunakan dalam pengujian. Dari hasil penentuan panjang gelombang maksimum dan *operating time* didapatkan hasil panjang gelombang maksimum 750 nm dengan *operating time* selama 6 menit. Vitamin C digunakan sebagai pembanding dikarenakan vitamin C merupakan salah satu senyawa dengan kemampuan antioksidan

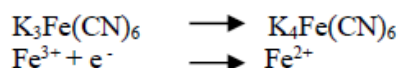




yang tinggi [14]. Selain itu Vitamin C mempunyai gugus hidroksil bebas yang dapat mengikat radikal bebas dan semakin banyak gugus hidroksi akan meningkatkan aktivitas antioksidan [19].

Dari hasil pengukuran aktivitas antioksidan terhadap pada sampel menunjukkan hasil sebagai berikut. Ekstrak etanol diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar  $107,518 \pm 2,862$  ppm, fraksi etanol (polar) diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar  $52,705 \pm 3,821$  ppm, fraksi etil asetat (semi polar) diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar  $18,553 \pm 1,440$  ppm dan fraksi heksana (non polar) diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar  $110,213 \pm 15,577$  ppm. Dari hasil pengujian menunjukkan fraksi etil asetat mempunyai nilai  $IC_{50}$  terendah yaitu  $18,553 \pm 1,440$  ppm. Sedangkan Vitamin C sebagai pembanding didapat nilai  $IC_{50}$  sebesar  $2,8 \pm 2,162$  ppm. Berdasarkan tabel kapasitas antioksidan fraksi etil asetat termasuk dalam kategori antioksidan yang sangat kuat yaitu < 50 ppm [20]. Hasil pengukuran antioksidan dapat dilihat dalam tabel 3.

Dalam pengukuran pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode FRAP berdasarkan pada kemampuan mereduksi dalam suasana asam  $Fe^{3+}$  (Kalium heksasianoferrat) yang berwarna kuning menjadi kompleks  $Fe^{2+}$  yang berwarna hijau kebiruan yang disebabkan pendonoran elektron dari senyawa antioksidan [21]. Metode ini didasarkan pada pengukuran serapan kompleks  $Fe^{2+}$  dengan spektrofotometer UV/VIS pada panjang gelombang 700 nm [22]. Penambahan TCA digunakan untuk mengendapkan kompleks kalium ferrosianida. Sedangkan  $FeCl_3$  untuk membentuk kompleks berwarna hijau sampai biru (biru berlin) [23]. Senyawa yang mempunyai untuk mereduksi dimungkinkan dapat digunakan sebagai antioksidan karena dapat mendonorkan elektron sehingga radikal bebas menjadi stabil [24]. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 3. Reaksi reduksi  $Fe^{3+}$  menjadi  $Fe^{2+}$

Dari pengukuran absorbansi Vitamin C sebagai baku pembanding didapatkan persamaan regresi linier  $y = 0,0098x - 0,2998$  dengan nilai korelasi  $R^2 = 0,9987$  dimana konsentrasi (x) dan absorbansi (y) (gambar 1). Untuk menghitung nilai aktivitas antioksidan dilakukan dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan sebagai sumbu (y) Kapasitas antoksidan dengan metode FRAP dinyatakan dengan ekuivalensi terhadap Vitamin C yang artinya berapa berapa mg Vitamin C yang setara dengan satu gram sampel (*Ascorbic Acid Equivalent / AAE*).

Hasil pengukuran absorbansi dan k aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi akar bakau kecil dapat dilihat pada tabel 4. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol, fraksi etanol, fraksi etil asetat dan fraksi heksane masing-masing sebagai berikut adalah  $22,776 \pm 0,204$ ;  $18,354 \pm 0,615$ ;  $33,048 \pm 0,424$  dan  $3,796 \pm 0,367$  mgAAE/g sampel.

#### 4. Kesimpulan

Ekstrak etanol akar bakau kecil (*Rhizophora stylosa*) memiliki kadar flavonoid sebesar  $18,803 \pm 0,198$  QE. Dari pengujian antioksidan dengan metode ABTS dan FRAP terhadap ekstrak etanol dan fraksi akar bakau kecil (*Rhizophora stylosa*) didapatkan hasil fraksi etil



asetat mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi, dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 18,553 ± 1,440 ppm pada metode ABTS dan 24.636 ± 0.128 mgAAE/g sampel dengan metode FRAP.

### Referensi

- [1] K. Khaira, "Menangkal radikal bebas dengan anti-oksidan," *Sainstek J. Sains dan Teknol.*, vol. 2, no. 2, pp. 183–187, 2016.
- [2] K. Sayuti and R. Yenrina, *Antioksidan Alami dan Sintetik*, 1st ed. Padang: Padang : APPTI, 2015.
- [3] S. Winarti, "Fungsional," *Makanan Fungsional. Yogyakarta Graha Ilmu*, 2010.
- [4] W. Hery, "Antioksidan Alami dan Radikal Bebas," *Penerbit Kanisius, Yogyakarta*, vol. 18, 2007.
- [5] M. Kainuma *et al.*, "Botany, uses, chemistry and bioactivities of mangrove plants I: Rhizophora stylosa," *ISME/GLOMIS Electron J*, vol. 13, pp. 12–17, 2015.
- [6] W. T. Wahyuni, L. K. Darusman, and N. K. Surya, "Potency of rhizophora Spp. extracts as antioxidant and inhibitor of acetylcholinesterase," *Procedia Chem.*, vol. 16, pp. 681–686, 2015.
- [7] M. Nebula, H. S. Harisankar, and N. Chandramohanakumar, "Metabolites and bioactivities of Rhizophoraceae mangroves," *Nat. Products Bioprospect.*, vol. 3, no. 5, pp. 207–232, 2013.
- [8] D. I. Miranti, H. Ichiura, and Y. Ohtani, "The Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Food Products of Rhizophora stylosa Fruit (Coffee and Tea Mangrove)," *Int. J. For. Res.*, vol. 2018, 2018.
- [9] A. H. Maravirnadita, "Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air dari Buah Belimbing Manis (Averrhoa carambola) dengan Metode DPPH," *Skripsi*, pp. 1–14, 2019.
- [10] A. Aminah, N. Tomayahu, and Z. Abidin, "PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH ALPUKAT (Persea americana Mill.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS," *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 4, no. 2, pp. 226–230, 2017, doi: 10.33096/jffi.v4i2.265.
- [11] S. Noer, R. D. Pratiwi, E. Gresinta, P. Biologi, and F. Teknik, "Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin Dan Flavonoid Sebagai Kuersetin) Pada Ekstrak Daun Inggu (Ruta angustifolia L.)," *J. Ilmu-ilmu MIPA. ISSN*, pp. 2364–2503, 2018.
- [12] W. U. Pulungan, "Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat dan



- Etanol Daun Mobe (*Artocarpus Lacucha* Buch-Ham.) dengan Metode Pemerangkapan ABTS,” 2018.
- [13] W. Ulfah, “Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan , Etil Asetat dan Etanol Daun Mobe ( *Artocarpus Lacucha* Buch-Ham .) dengan Metode Pemerangkapan ABTS,” 2018.
- [14] S. Maryam, M. Baits, and A. Nadia, “Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) menggunakan metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power),” *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 2, no. 2, pp. 115–118, 2015.
- [15] Z. Sapiun, P. Pangalo, A. K. Imran, P. S. Wicita, and R. P. A. Daud, “Determination of Total Flavonoid Levels of Ethanol Extract Sesewanua Leaf (*Clerodendrum Fragrans* Wild) With Maceration Method Using UV-Vis Spectrofotometry,” *Pharmacogn. J.*, vol. 12, no. 2, 2020.
- [16] N. Y. Lindawati and S. H. Ma’ruf, “Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) secara Spektrofotometri Visibel,” *J. Ilm. Manuntung*, vol. 6, no. 1, pp. 83–91, 2020.
- [17] S. Das, J. Das, A. Paul, A. Samadder, and A. R. Khuda-Bukhsh, “Apigenin, a bioactive flavonoid from *Lycopodium clavatum*, stimulates nucleotide excision repair genes to protect skin keratinocytes from ultraviolet B-induced reactive oxygen species and DNA damage,” *J. Acupunct. Meridian Stud.*, vol. 6, no. 5, pp. 252–262, 2013.
- [18] K. Sridhar and A. L. Charles, “In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs,” *Food Chem.*, vol. 275, pp. 41–49, 2019.
- [19] J. Kim, “Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the E vitamer fraction in rice bran,” *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 3, pp. C208–C213, 2005.
- [20] P. Molyneux, “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,” *Songklanakarinn J. sci. technol*, vol. 26, no. 2, pp. 211–219, 2004.
- [21] H.-S. Lee, N. H. Won, K. H. Kim, H. Lee, W. Jun, and K.-W. Lee, “Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebula* in vivo and in vitro,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, no. 9, pp. 1639–1644, 2005.
- [22] B. C. Panda *et al.*, “Pectic polysaccharide from the green fruits of *Momordica charantia* (Karela): structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties,” *Carbohydr. Res.*, vol. 401, pp. 24–31, 2015.



- [23] D. Raharjo and H. Haryoto, "Antioxidant Activity of Mangrove *Sonneratia caseolaris* L using the FRAP Method," 2019.
- [24] N. A. Tristanto, D. W. Budianta, and A. R. Utomo, "Pengaruh suhu penyimpanan dan proporsi teh hijau: bubuk daun kering stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap aktivitas antioksidan minuman teh hijau stevia dalam kemasan botol plastik," *J. Teknol. Pangan dan Gizi*, vol. 16, no. 1, pp. 21–28, 2017.
- [1] K. Khaira, "Menangkal radikal bebas dengan anti-oksidan," *Sainstek J. Sains dan Teknol.*, vol. 2, no. 2, pp. 183–187, 2016.
- [2] K. Sayuti and R. Yenrina, *Antioksidan Alami dan Sintetik*, 1st ed. Padang: Padang : APPTI, 2015.
- [3] S. Winarti, "Fungsional," *Makanan Fungsional. Yogyakarta Graha Ilmu*, 2010.
- [4] W. Hery, "Antioksidan Alami dan Radikal Bebas," *Penerbit Kanisius, Yogyakarta*, vol. 18, 2007.
- [5] M. Kainuma *et al.*, "Botany, uses, chemistry and bioactivities of mangrove plants I: *Rhizophora stylosa*," *ISME/GLOMIS Electron J*, vol. 13, pp. 12–17, 2015.
- [6] W. T. Wahyuni, L. K. Darusman, and N. K. Surya, "Potency of rhizopora Spp. extracts as antioxidant and inhibitor of acetylcholinesterase," *Procedia Chem.*, vol. 16, pp. 681–686, 2015.
- [7] M. Nebula, H. S. Harisankar, and N. Chandramohanakumar, "Metabolites and bioactivities of Rhizophoraceae mangroves," *Nat. Products Bioprospect.*, vol. 3, no. 5, pp. 207–232, 2013.
- [8] D. I. Miranti, H. Ichiura, and Y. Ohtani, "The Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Food Products of *Rhizophora stylosa* Fruit (Coffee and Tea Mangrove)," *Int. J. For. Res.*, vol. 2018, 2018.
- [9] A. H. Maravirnadita, "Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air dari Buah Belimbing Manis (*Averrhoa carambola*) dengan Metode DPPH," *Skripsi*, pp. 1–14, 2019.
- [10] A. Aminah, N. Tomayahu, and Z. Abidin, "PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH ALPUKAT (*Persea americana* Mill.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS," *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 4, no. 2, pp. 226–230, 2017, doi: 10.33096/jffi.v4i2.265.
- [11] S. Noer, R. D. Pratiwi, E. Gresinta, P. Biologi, and F. Teknik, "Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin Dan Flavonoid Sebagai Kuersetin) Pada



- Ekstrak Daun Inggu (*Ruta angustifolia* L.),” *J. Ilmu-ilmu MIPA. ISSN*, pp. 2364–2503, 2018.
- [12] W. U. Pulungan, “Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat dan Etanol Daun Mobe (*Artocarpus Lacucha* Buch-Ham.) dengan Metode Pemerangkapan ABTS,” 2018.
- [13] W. Ulfah, “Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan , Etil Asetat dan Etanol Daun Mobe ( *Artocarpus Lacucha* Buch-Ham .) dengan Metode Pemerangkapan ABTS,” 2018.
- [14] S. Maryam, M. Baits, and A. Nadia, “Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) menggunakan metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power),” *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 2, no. 2, pp. 115–118, 2015.
- [15] Z. Sapiun, P. Pangalo, A. K. Imran, P. S. Wicita, and R. P. A. Daud, “Determination of Total Flavonoid Levels of Ethanol Extract Sesewanua Leaf (*Clerodendrum Fragrans* Wild) With Maceration Method Using UV-Vis Spectrofotometry,” *Pharmacogn. J.*, vol. 12, no. 2, 2020.
- [16] N. Y. Lindawati and S. H. Ma’ruf, “Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) secara Spektrofotometri Visibel,” *J. Ilm. Manuntung*, vol. 6, no. 1, pp. 83–91, 2020.
- [17] S. Das, J. Das, A. Paul, A. Samadder, and A. R. Khuda-Bukhsh, “Apigenin, a bioactive flavonoid from *Lycopodium clavatum*, stimulates nucleotide excision repair genes to protect skin keratinocytes from ultraviolet B-induced reactive oxygen species and DNA damage,” *J. Acupunct. Meridian Stud.*, vol. 6, no. 5, pp. 252–262, 2013.
- [18] K. Sridhar and A. L. Charles, “In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs,” *Food Chem.*, vol. 275, pp. 41–49, 2019.
- [19] J. Kim, “Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the E vitamer fraction in rice bran,” *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 3, pp. C208–C213, 2005.
- [20] P. Molyneux, “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,” *Songklanakarinn J. sci. technol*, vol. 26, no. 2, pp. 211–219, 2004.
- [21] H.-S. Lee, N. H. Won, K. H. Kim, H. Lee, W. Jun, and K.-W. Lee, “Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebula* in vivo and in vitro,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, no. 9, pp. 1639–1644, 2005.



- [22] B. C. Panda *et al.*, “Pectic polysaccharide from the green fruits of *Momordica charantia* (Karela): structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties,” *Carbohydr. Res.*, vol. 401, pp. 24–31, 2015.
- [23] D. Raharjo and H. Haryoto, “Antioxidant Activity of Mangrove *Sonneratia caseolaris* L using the FRAP Method,” 2019.
- [24] N. A. Tristanto, D. W. Budianta, and A. R. Utomo, “Pengaruh suhu penyimpanan dan proporsi teh hijau: bubuk daun kering stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap aktivitas antioksidan minuman teh hijau stevia dalam kemasan botol plastik,” *J. Teknol. Pangan dan Gizi*, vol. 16, no. 1, pp. 21–28, 2017.
- [1] K. Khaira, “Menangkal radikal bebas dengan anti-oksidan,” *Sainstek J. Sains dan Teknol.*, vol. 2, no. 2, pp. 183–187, 2016.
- [2] K. Sayuti and R. Yenrina, *Antioksidan Alami dan Sintetik*, 1st ed. Padang: Padang : APPTI, 2015.
- [3] S. Winarti, “Fungsional,” *Makanan Fungsional. Yogyakarta Graha Ilmu*, 2010.
- [4] W. Hery, “Antioksidan Alami dan Radikal Bebas,” *Penerbit Kanisius, Yogyakarta*, vol. 18, 2007.
- [5] M. Kainuma *et al.*, “Botany, uses, chemistry and bioactivities of mangrove plants I: *Rhizophora stylosa*,” *ISME/GLOMIS Electron J*, vol. 13, pp. 12–17, 2015.
- [6] W. T. Wahyuni, L. K. Darusman, and N. K. Surya, “Potency of rhizophora Spp. extracts as antioxidant and inhibitor of acetylcholinesterase,” *Procedia Chem.*, vol. 16, pp. 681–686, 2015.
- [7] M. Nebula, H. S. Harisankar, and N. Chandramohanakumar, “Metabolites and bioactivities of Rhizophoraceae mangroves,” *Nat. Products Bioprospect.*, vol. 3, no. 5, pp. 207–232, 2013.
- [8] D. I. Miranti, H. Ichiura, and Y. Ohtani, “The Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Food Products of *Rhizophora stylosa* Fruit (Coffee and Tea Mangrove),” *Int. J. For. Res.*, vol. 2018, 2018.
- [9] A. H. Maravirnadita, “Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Air dari Buah Belimbing Manis (*Averrhoa carambola*) dengan Metode DPPH,” *Skripsi*, pp. 1–14, 2019.
- [10] A. Aminah, N. Tomayahu, and Z. Abidin, “PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH ALPUKAT (*Persea americana* Mill.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS,” *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 4, no. 2, pp. 226–230, 2017, doi: 10.33096/jffi.v4i2.265.
- [11] S. Noer, R. D. Pratiwi, E. Gresinta, P. Biologi, and F. Teknik, “Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin Dan Flavonoid Sebagai Kuersetin) Pada Ekstrak Daun Inggu (*Ruta angustifolia* L.),” *J. Ilmu-ilmu MIPA. ISSN*, pp. 2364–2503, 2018.
- [12] W. U. Pulungan, “Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat dan Etanol Daun Mobe (*Artocarpus Lacucha* Buch-Ham.) dengan Metode Pemerangkapan ABTS,” 2018.





- [13] W. Ulfah, “Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan , Etil Asetat dan Etanol Daun Mobe ( *Artocarpus Lacucha* Buch-Ham .) dengan Metode Pemerangkapan ABTS,” 2018.
- [14] S. Maryam, M. Baits, and A. Nadia, “Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) menggunakan metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power),” *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 2, no. 2, pp. 115–118, 2015.
- [15] Z. Sapiun, P. Pangalo, A. K. Imran, P. S. Wicita, and R. P. A. Daud, “Determination of Total Flavonoid Levels of Ethanol Extract Sesewanua Leaf (*Clerodendrum Fragrans* Wild) With Maceration Method Using UV-Vis Spectrofotometry,” *Pharmacogn. J.*, vol. 12, no. 2, 2020.
- [16] N. Y. Lindawati and S. H. Ma’ruf, “Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) secara Spektrofotometri Visibel,” *J. Ilm. Manuntung*, vol. 6, no. 1, pp. 83–91, 2020.
- [17] S. Das, J. Das, A. Paul, A. Samadder, and A. R. Khuda-Bukhsh, “Apigenin, a bioactive flavonoid from *Lycopodium clavatum*, stimulates nucleotide excision repair genes to protect skin keratinocytes from ultraviolet B-induced reactive oxygen species and DNA damage,” *J. Acupunct. Meridian Stud.*, vol. 6, no. 5, pp. 252–262, 2013.
- [18] K. Sridhar and A. L. Charles, “In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs,” *Food Chem.*, vol. 275, pp. 41–49, 2019.
- [19] J. Kim, “Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the E vitamers fraction in rice bran,” *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 3, pp. C208–C213, 2005.
- [20] P. Molyneux, “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,” *Songklanakarinn J. sci. technol.*, vol. 26, no. 2, pp. 211–219, 2004.
- [21] H.-S. Lee, N. H. Won, K. H. Kim, H. Lee, W. Jun, and K.-W. Lee, “Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebula* in vivo and in vitro,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, no. 9, pp. 1639–1644, 2005.
- [22] B. C. Panda *et al.*, “Pectic polysaccharide from the green fruits of *Momordica charantia* (Karela): structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties,” *Carbohydr. Res.*, vol. 401, pp. 24–31, 2015.
- [23] D. Raharjo and H. Haryoto, “Antioxidant Activity of Mangrove *Sonneratia caseolaris* L using the FRAP Method,” 2019.
- [24] N. A. Tristanto, D. W. Budianta, and A. R. Utomo, “Pengaruh suhu penyimpanan dan proporsi teh hijau: bubuk daun kering stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap aktivitas antioksidan minuman teh hijau stevia dalam kemasan botol plastik,” *J. Teknol. Pangan dan Gizi*, vol. 16, no. 1, pp. 21–28, 2017.



