

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **1. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli 2013 – Januari 2014.

##### **2. Tempat Penelitian**

Uji skrining fitokimia dan analisis aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu Universitas Muhammadiyah Riau dan Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Dalam penelitian ini digunakan VARIAN spektrofotometer UV-Vis, timbangan, neraca analitik, inkubator, blender Philips, BUCHI R-3 *rotary vacuum evaporator*, kaki tiga, kawat kasa, spiritus, penangas air, mikro pipet, pipet tetes, pengaduk, spatula, kompor, wadah untuk mengukus sampel, dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

##### **2. Bahan**

Bahan utama yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah sampel buah api-api (*Avicennia alba* Blume) yang diperoleh dari Kawasan pesisir pantai Desa Air Putih Bengkalis. Bahan lain yang digunakan adalah abu

gosok, larutan abu sekam 30% (b/v), etanol, kloroform, air suling, kertas saring, serbuk Mg, HCl pekat, amoniak, HgCl<sub>2</sub>, KI, Asetat Anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub> 1%, DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dan antioksidan sintetis butil hidroksil toluena (BHT).

## C. Cara Kerja

### 1. Persiapan sampel

Sampel yang diteliti adalah buah api-api (*Avicennia alba* Blume) sebelum dan dengan pengolahan. Sebelum proses ekstraksi dilakukan, sampel diberikan 2 perlakuan yang berbeda yaitu :

#### a. Sampel Sebelum Pengolahan.

Masing-masing sampel buah api-api sebanyak 1500 gram dibersihkan dari pengotor, dicuci, dikupas kulitnya dan dibelah menjadi 4 bagian kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya buah api-api kering dihaluskan dengan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk buah api-api untuk sampel dengan pengolahan.

#### b. Sampel Sesudah Pengolahan.

Masing-masing sampel buah api-api sebanyak 1500 gram dibersihkan dari pengotor, dikupas kulitnya dibelah menjadi 4 bagian. Kemudian panaskan air sampai mendidih, masukan api-api sampai terendam dengan air. Masukan larutan abu gosok dan diaduk hingga rata. Kemudian tunggu hingga buah setengah matang dan tiriskan. Cuci dengan air hingga bersih kulit luarnya hingga

kelihatannya berubah dari warna aslinya.<sup>1</sup>Kemudian direndam dengan larutan abu sekam 30% (b/b)<sup>2</sup>selama sehari dan dibilas menggunakan air bersih beberapa kali hingga benar-benar bersih.

Setelah itu, sampel buah api-api dikukus selama beberapa menit. Selanjutnya, sampel buah api-api dikeringanginkan dan buah api-api dihaluskan dengan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk buah api-api yang telah diolah.

## 2. Skrining Fitokimia

### a. Pemeriksaan Flavonoid

Serbuk buah api-api sebanyak 200 mg diekstrak dengan 5 ml etanol dan dipanaskan lima menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0.2 gram serbuk Mg. Jika menghasilkan warna merah, maka buah api-api positif mengandung senyawa flavonoid.<sup>3</sup>

### b. Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Serbuk buah api-api sebanyak 50 mg ditambahkan asam asetat anhidrat sampai terendam, dibiarkan 15 menit kemudian 6 tetes larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan

---

<sup>1</sup> Nyoto Santoso, Bayu Catur Nurcahya, Ahmad Faisal Siregar, Ida Farida, *Resep Makanan Berbahan Baku Mangrove dan Pemanfaatan Nipah*, Lembaga Pengkajian dan Pemanfaatan Mangrove, ISBN 979-3667-15, 2005, hlm. 17.

<sup>2</sup> Sulistyawati, Wignyanto, Sri Kumalaningsih, "Produksi Tepung buah Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza* Lamk.) Rendah Tanin dan HCN Sebagai Bahan Pangan Alternatif", *Jurnal Teknologi Pertanian* Vol.13 No.3, 2012, hlm 10.

<sup>3</sup> Mira Marlinda, Meiske S. Sangi, Audy D. Wuntu, "Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill)", *Jurnal MIPA UNSRAT ONLINE*, Manado, 2012, hlm. 2.

terjadinya warna merah, jingga dan ungu, sedangkan steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru.<sup>4</sup>

**c. Pemeriksaan Alkaloid**

Sebanyak 4 gram serbuk buah api-api ditambahkan kloroform secukupnya, selanjutnya ditambahkan 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Kemudian larutan disaring ke dalam tabung reaksi dan filtrat ditambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Campuran dikocok dengan teratur, dibiarkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan.

Lapisan atas dipindahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 ml. Kemudian ke dalam tabung tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih menunjukkan sampel buah api-api mengandung alkaloid.<sup>5</sup>

**d. Pemeriksaan Saponin**

Sebanyak 0,5 gram serbuk buah api-api ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan adanya saponin.<sup>6</sup>

**e. Pemeriksaan Tanin**

Sebanyak 20 mg serbuk buah api-api ditambah etanol sampai sampel terendam semuanya. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes

---

<sup>4</sup> *Ibid.*, hlm. 2.

<sup>5</sup> *Ibid.*, hlm. 2.

<sup>6</sup> Lowysa Wanti Silaban, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Dari Kulit Buah Sentul (*Sandoricum Koetjape* (Burm.f.) Merr) Terhadap Beberapa Bakteri Secara *In Vitro*. Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara, Medan, 2009, hlm. 24.

larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau.<sup>7</sup>

### 3. Persiapan Ekstraksi Buah Api-api

Sampel buah api-api sebelum dan sesudah pengolahan masing-masing diekstrak menggunakan pelarut etanol 96%. Sampel sebanyak 100 gram yang telah dihancurkan, dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml yang kemudian direndam selama 6 jam sambil sekali-kali diaduk, kemudian didiamkan hingga 24 jam.

Maserat dipisahkan dan proses diulangi beberapa kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama.<sup>8</sup> Setelah itu dilanjutkan penyaringan hasil maserasi untuk memisahkan maserat dari ampas menggunakan kertas saring Whatman 42 sehingga diperoleh filtrat dan residu.

Maserat yang dihasilkan kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu  $37^\circ\text{C}$  sehingga diperoleh ekstrak kental etanol. Proses ini dilakukan pengulangan hingga pelarut sudah mulai jernih.

Berdasarkan proses ini, diperoleh ekstrak etanol buah api-api (*Avicennia Alba* Blume). Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian digunakan untuk analisis aktivitas antioksidan.

---

<sup>7</sup> Mira Marlinda, *Op.Cit.*, hlm. 2.

<sup>8</sup> Badan POM RI, *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*, Badan Pengawasan Obat dan makanan Republik Indonesia, Jakarta, 2006, hlm. 43.

#### 4. Pembuatan Larutan DPPH 40 ppm

Kristal DPPH ditimbang sebanyak 0,004 gram dengan menggunakan neraca analitik kemudian dilarutkan dalam etanol dengan menggunakan labu ukur 100 ml sehingga didapatkan larutan 40 ppm.<sup>9</sup>

#### 5. Penentuan Panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ )

Larutan blanko dibuat dengan menambahkan 1 ml etanol kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan ke dalamnya 2 ml larutan DPPH 40 ppm.<sup>10</sup> Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit,<sup>11</sup> kemudian dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-600 nm yang menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Panjang gelombang yang memberikan nilai absorbansi paling besar ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum DPPH. Dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Absorbansi dari larutan blanko diukur untuk melakukan perhitungan persen inhibisi.

#### 6. Pengukuran Absorbansi Sampel Buah Api-api dan BHT

Sebanyak 0,1 gram masing-masing ekstrak sampel yang diperoleh diencerkan dengan etanol pada labu ukur 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 1000 ppm. Dilakukan pengenceran untuk

---

<sup>9</sup> I Gusti Agung Gede Bawa, "Aktivitas Antioksidan dan Antijamur Senyawa Atsiri Bunga Cempaka Putih (*Michelia Alba*)", Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana Bukit Jimbaran, ISSN 1907-9805, Bali, 2008, hlm. 3.

<sup>10</sup> *Ibid.*, hlm. 3.

<sup>11</sup> Putri Pratiwi, Meiny Suzery, Bambang Cahyono, "Total Fenolat dan Flavonoid dari Ekstrak Daun & Fraksi Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) Jawa Tengah serta Aktivitas Antioksidannya", Jurnal Sains dan Matematika, ISSN 0854-0675, Universitas Diponegoro, Semarang, 2010, hlm. 4.

mendapatkan masing-masing konsentrasi 100, 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Antioksidan sintetik BHT digunakan sebagai pembanding dan kontrol positif, dibuat dengan cara dilarutkan dalam pelarut etanol dengan konsentrasi yang sama dengan sampel.<sup>12</sup>

Masing-masing sampel uji dan pembanding, diambil 1 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2 ml larutan DPPH. Larutan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran absorbansi masing-masing sampel dilakukan sebanyak tiga kali.

#### D. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini dengan menguji aktifitas antioksidan pada beberapa ekstrak sampel buah api-api. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah spektrofotometer UV-Vis. Data hasil percobaan disajikan dalam bentuk tabel berikut ini :

**Tabel 3. Hasil Pengukuran Absorbansi Ekstrak Etanol Buah Api-Api (*Avicennia alba* Blume) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis**

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Jumlah	Rata-Rata
		1	2	3		
Sampel Buah Api-Api Sebelum Pengolahan	100					
	200					
	400					
	600					
	800					
	1000					

<sup>12</sup> Hafiluddin, “Ekstraksi dan Pemurnian Senyawa Antioksidan dari Lintah Laut (*Dicodoris* sp.) Asal Perairan Pamekasan”, Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo, Madura, 2012, hlm. 4.

<b>Sampel Buah Api- Api Sesudah Pengolahan</b>	100					
	200					
	400					
	600					
	800					
	1000					

### E. Teknik Pengolahan Data

Aktivitas Antioksidan diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan ekstrak tersebut dihitung sebagai % inhibisi dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{Blanko}} - A_{\text{Sampel}}}{A_{\text{Blanko}}} \times 100 \%$$

$A_{\text{Blanko}}$  = Absorbansi tidak mengandung sampel

$A_{\text{Sampel}}$  = Absorbansi mengandung sampel

Laporan uji aktivitas antioksidan dengan DPPH dapat disajikan dalam nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  adalah konsentrasi antioksidan yang dibutuhkan untuk menghasilkan penghambatan radikal bebas sebesar 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktifitas antioksidan. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari persamaan linier persen penghambatan radikal DPPH terhadap beberapa konsentrasi ekstrak sampel. Persamaan regresi linier yaitu  $y = ax + b$ .



**Tabel 4. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Api-api (*Avicennia alba* Blume) dan Nilai IC<sub>50</sub>.**

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
Sampel Buah Api-Api Sebelum Pengolahan	100				
	200				
	400				
	600				
	800				
	1000				
Sampel Buah Api-Api Sesudah Pengolahan	100				
	200				
	400				
	600				
	800				
	1000				
BHT	100				
	200				
	400				
	600				
	800				
	1000				