

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SPONS *Stylissa* sp. DENGAN
MENGUNAKAN METODE DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST OF SPONGE *Stylissa* sp. USING THE DPPH
METHOD (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)**

Samuel I. M. Sibarani¹⁾, Adithya Yudistira¹⁾, Deby A. Mpila¹⁾

¹⁾ Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

*samuelcbrave01@gmail.com

ABSTRACT

Habitat of sponge Stylissa sp., were under the sea and these sponges contain active compounds, which are more active than the compounds produced by terrestrial plants. Antioxidants are inhibitors of oxidation reactions due to the free radicals, which can cause weak damage to unsaturated cells, cell wall membranes, blood vessels, DNA bases, and lipid tissue, that causing disease. The study was conducted to determine the antioxidant activity of ethanol extracts of sponge Stylissa sp., which is located on the Bangka Island, Likupang District, North Minahasa Regency. Sponge Stylissa sp., was extracted by maceration with using ethanol. Testing of antioxidant activity was carried out by the DPPH method measured by a UV-Vis spectrophotometer. The results of the study showed that ethanol extracts of sponge Stylissa sp., has antioxidant activity in each concentration and the highest at a concentration of 100 mg / L. The conclusion is a ethanol extract of sponge Stylissa sp. have high antioxidant activity with a concentration of 25 mg/L (77,40%), concentration of 50 mg/L (85,63%), concentration of 75 mg/L (88,66%), and concentration 100 mg/L (88,96%).

Key words: *Stylissa* sp. Sponge, Antioxidant, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

ABSTRAK

Habitat dari spons *Stylissa* sp. terdapat di bawah laut dan spons ini mengandung senyawa aktif yang persentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat. Antioksidan adalah zat penghambat reaksi oksidasi akibat radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan lemah tak jenuh, membran dinding sel, pembuluh darah, basa DNA, dan jaringan lipid sehingga menimbulkan penyakit. Penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol biota laut spons *Stylissa* sp. yang terdapat di pulau Bangka, Kecamatan Likupang, Kabupaten Minahasa Utara. Spons *Stylissa* sp. ini diekstrak dengan metode maserasi menggunakan etanol. Pengujian aktivitas antioksidan ini dilakukan dengan metode DPPH yang diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. memiliki aktivitas antioksidan disetiap konsentrasi dan yang tertinggi pada konsentrasi 100 mg/L. Kesimpulan yang didapat bahwa ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dengan konsentrasi 25 mg/L (77,40%), konsentrasi 50 mg/L (85,63%), konsentrasi 75 mg/L (88,66%), dan konsentrasi 100 mg/L (88,96%).

Kata Kunci : Spons *Stylissa* sp., Antioksidan, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

PENDAHULUAN

Sebagai negara kepulauan, Indonesia memiliki sumber daya alam hayati laut yang besar. Salah satu sumber daya alam tersebut yaitu ekosistem terumbu karang. Ekosistem terumbu karang bisa hidup lebih dari 300 spesies karang, lebih dari 200 spesies ikan dan ratusan spesies moluska, krustasea, spons, alga, lamun dan biota lainnya. Spons merupakan salah satu komponen penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif sebagai antibakteri, antikanker dan antijamur yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang persentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Suparno, 2005).

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat digunakan untuk melindungi komponen biologi seperti lipida, protein, vitamin dan DNA melalui perlambatan kerusakan, ketengikan atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi (Suryanto, 2012). Antioksidan diketahui dapat menghambat kerja radikal bebas. Sebagai salah satu upaya untuk mengoptimalkan pemanfaatan bahan alam laut Indonesia, dilakukan penelitian dengan tujuan awal menguji aktivitas antioksidan dan mengidentifikasi senyawa berkhasiat sebagai antioksidan (Hanani *et al.*, 2005).

Akhir-akhir ini penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat baik untuk makanan maupun pengobatan. Penggunaan sebagai obat makin berkembang seiring dengan makin bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit jantung dan kanker (Boer, 2000). Radikal bebas adalah adalah suatu molekul yang relatif tidak stabil dengan atom yang pada orbit terluarnya memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Robins, 2007).

Penelitian sebelumnya tentang uji aktivitas antioksidan beberapa spons laut dari kepulauan Seribu, Jakarta. Metode uji antioksidan yang digunakan adalah metode peredaman radikal bebas DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Metode ini memerlukan sedikit sampel, sederhana, mudah, cepat, dan peka untuk mengevaluasi antioksidan dari senyawa bahan alam (Hanani *et al.*, 2005). Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, peneliti menganggap bahwa penelitian tentang “Uji aktivitas antioksidan pada spons *Stylissa* sp. dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*)” perlu dilakukan.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 – Juli 2020 di laboratorium penelitian lanjutann (Farmakognosi, Laboratorium Fitokimia dan laboratorium Analisis Farmasi) Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi.

Bentuk Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium untuk menguji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dari ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. yang diperoleh dari pulau Bangka.

Alat dan Bahan

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, labu ukur 10 mL, erlenmeyer 200 mL, cawan petri, wadah botol, spatula, gelas arloji, timbangan digital, spektrofotometer UV-Vis, *aluminium foil*, corong, mikro pipet, tabung reaksi, *vacuum*.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu kertas saring, etanol 96%, DPPH, spons *Stylissa* sp. dan serbuk Vitamin C p.a sebagai pembanding.

Prosedur Penelitian Pengambilan Sampel

Sampel diambil di pulau Bangka, Kecamatan Likupang, Kabupaten Minahasa Utara menggunakan alat bantu (masker dan snorkel). Sebelum diambil sampel difoto menggunakan kamera bawah laut, kemudian diambil dan dimasukkan kedalam kantong plastik jepit yang sudah disiapkan kemudian disimpan dalam kotak pendingin setelah itu dibawa ke Laboratorium Farmakognosi Program Studi Farmasi Universitas Sam Ratulangi.

Preparasi Sampel

Spons *Stylissa* sp. yang sudah diambil, dicuci kembali dan dipotong-potong kecil, kemudian dimasukkan kedalam wadah botol, sampel, yang didalam botol diisi dengan etanol 96% sebanyak 200 mL.

Ekstraksi

Spons *Stylissa* sp. sebanyak 80 g dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 200 mL dengan 3 kali pengulangan selama 72 jam. Sampel kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat. Hasil yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan oven sehingga menghasilkan ekstrak kental dari sampel. Ekstrak kental yang didapatkan disaring kembali dengan cara dilarutkan ke dalam etanol sebanyak 25 mL kemudian dimasukkan kedalam oven pemanas untuk mendapatkan ekstrak kasar dari sampel spons *Stylissa* sp. penyaringan ini dilakukan untuk menghilangkan sisa garam pada ekstrak kental.

Pembuatan Larutan Stok 100 mL

Sebanyak 100 mg ekstrak spons *Stylissa* sp. dilarutkan dalam 100 mL etanol 96% dengan masing-masing konsentrasi 25, 50, 75, dan 100 mg/L. Rumus yang dipakai, yaitu:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Hasil yang didapatkan dari hasil V_1 dipipet dan ditambahkan etanol 96% hingga

mencapai tanda batas 10 mL, kemudian di pindahkan kedalam tabung reaksi dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil untuk digunakan pada perlakuan berikutnya.

Pembuatan Larutan DPPH

DPPH ditimbang Sebanyak 4 mg dan dilarutkan dalam etanol 96% 100 mL, dan buat larutan stok DPPH sesuai konsentrasi yang sama dengan konsentrasi pada larutan stok sebelumnya yaitu 25, 50, 75, 100 mg/L. masing-masing konsentrasi ditambahkan etanol sampai tanda batas 10 mL. larutan yang dibuat untuk uji aktivitas antioksidan yaitu ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. dipipet sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi dengan masing-masing konsentrasi 25, 50, 75, dan 100 mg/L dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH kedalam masing-masing konsentrasi dan divortex selama 5 detik sebanyak 3 kali pengulangan.

Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C p.a ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 10 mL, kemudian buat larutan stok untuk konsentrasi 25, 50, 75, dan 100 mg/L dengan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas 10 mL pada masing-masing larutan sebanyak 3 kali pengulangan. Sampel vitamin C p.a dipipet sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi dengan masing-masing konsentrasi 25, 50, 75, dan 100 mg/L dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH kedalam masing-masing konsentrasi dan divortex selama 5 detik sebanyak 3 kali pengulangan. Diuji pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm.

Pengujian Larutan Kontrol DPPH dan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Larutan kontrol DPPH diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm sebagai absorbansi kontrol dalam pengujian ini. Sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Untuk mengetahui aktivitas dari

penangkal radikal bebas tersebut, diuji pada spektrofotometer. Berubahnya warna ungu menjadi warna kuning menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas. Diukur absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm setelah diinkubasi selama 30 menit berubahnya warna menjadi kuning menunjukkan bahwa, masing-masing konsentrasi menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas diuji dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm. Kemudian diamati perbandingannya dengan vitamin C p.a sebagai standar. Aktivitas penangkapan radikal bebas (persen inhibisi) dihitung sebagai persentase berkurangnya warna

DPPH dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = 1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas dari penangkal radikal bebas, diuji pada spektrofotometer UV-Vis. Data persentase inhibisi ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. dan Vitamin C (p.a) sebagai pembanding disajikan pada tabel 1 berikut:

Tabel 1. Hasil pengujian perbandingan ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. dengan vitamin C (p.a).

KONSENTRASI Ekstrak dan Vitamin C		PENGULANGAN			RATA - RATA
		I	II	III	
25 mg/L	Ekstrak	79.20%	77.40%	75.60%	77.40%
	Vit. C	86.30%	86.40%	83.60%	85.43%
50 mg/L	Ekstrak	85.80%	85.70%	85.40%	85.63%
	Vit. C	86.80%	87.30%	86.90%	86.90%
75 mg/L	Ekstrak	88.10%	89.00%	88.90%	88.66%
	Vit. C	87.70%	86.20%	86.60%	86.83%
100 mg/L	Ekstrak	88.90%	89.40%	88.60%	88.96%
	Vit. C	86.60%	86.40%	87.00%	86.66%

Substansi bioaktif terutama yang terdapat pada biota laut yang tidak bertulang belakang (avertebrata) seperti spons, koral dan tunikata. Biota tersebut mengandung senyawa aktif yang lebih banyak dibandingkan alga dan tumbuhan darat. Substansi kimia yang disekresikan karang lunak sebagai senyawa metabolit sekunder. Menarik untuk dikaji pemanfaatannya sebagai sumber bahan obat-obatan alami. Senyawa bioktif yang terdapat pada *Stylissa* sp. sangat dipengaruhi oleh mikroba simbiotiknya, maka variasi dari senyawa bioaktif sangat tinggi (Apri, 2014).

Uji aktivitas ini menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) karena metode ini adalah metode yang paling sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam sehingga digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor electron (Molyneux, 2004). Pada uji DPPH digunakan panjang gelombang 517 nm, larutan DPPH tersebut diukur pada panjang gelombang 400 sampai 600 nm dan hasil yang didapat adalah 0,815.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons *Stylissa* sp. dimana sampel ini diekstraksikan dengan menggunakan metode maserasi. metode ini juga digunakan untuk mengekstrak zat aktif yang mudah larut dalam cairan pengekstrak, tidak mengandung dalam pengekstrak serta tidak mengandung benzoin. Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana. Metode ekstraksi pada sampel *Stylissa* sp. menggunakan maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan melalui perendaman serbuk bahan alam dalam larutan pengekstrak. Sedangkan pelarut yang digunakan untuk sampel tersebut adalah etanol 96% karena pelarut ini hampir bisa melarutkan semua senyawa organik, baik polar atau pun non polar. Konsentrasi yang digunakan untuk spons

Stylissa sp. adalah 25, 50, 75, dan 100 mg/L. masing-masing dari konsentrasi tersebut dicampurkan dengan larutan DPPH kemudian divortex dan diinkubasi selama 30 menit pada tempat yang gelap. Kemudian setelah sampel diinkubasi masing-masing dari ekstrak dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm pada setiap konsentrasi dilakukan sebanyak 3 kali.

Hasil penelitian didapat bahwa pada tabel 1 menunjukkan nilai persentase inhibisi pada ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. yang memiliki aktivitas antioksidan radikal bebas dan ekstrak tersebut mengalami peningkatan dari konsentrasi rendah 25 mg/L dengan nilai 77,40% sampai pada konsentrasi yang tinggi 100 mg/L mendapatkan nilai rata-rata 88,96%, ini menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki kadar antioksidan yang tinggi. Menurut Molyneux (2004) nilai standard kadar antioksidan adalah 50%. Untuk hasil pengujian perbandingannya digunakan Vitamin C (p.a) dan hasil aktivitas antioksidan pada Vitamin C (p.a) ada yang lebih tinggi dari ekstrak etanol spons *stylissa* sp. dan ada yang juga lebih rendah dari ekstrak etanol spons *Stylissa* sp.

Vitamin C (p.a) digunakan sebagai pembanding kontrol positif karena berfungsi sebagai antioksidan sekunder yaitu menangkap radikal bebas, mencegah terjadinya reaksi berantai, aktivitas antioksidannya sangat tinggi, dan mudah diperoleh. Vitamin C ini mempunyai gugus hidroksi bebas yang bertindak sebagai penangkap radikal bebas. Hasil penelitian diatas menunjukkan sama dengan pernyataan Green (2004) bahwa nilai tingkat inhibisi akan meningkat seiring meningkatnya konsentrasi sampel dikarenakan semakin banyak senyawa antioksidan pada sampel yang dapat menangkal radikal bebas.

Sampel ini memiliki kadar antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan sampel yang berada di pulau lembeh karena sampel yang berada di pulau

Bangka memiliki kadar antioksidan rata-rata pada konsentrasi 25 mg/L (77,40%), konsentrasi 50 mg/L (85,63%), konsentrasi 75 mg/L (88,66%), dan konsentrasi 100 mg/L (88,96%) sedangkan sampel yang berada di pulau Lembeh memiliki kadar antioksidan yaitu pada konsentrasi 25 mg/L (65,90%), konsentrasi 50 mg/L (66,30%), konsentrasi 75 mg/L (69,30%), dan konsentrasi 100 mg/L (70,26%) (Ikhrar, 2019).

Menurut Gozcelioglu dan Konuklugil (2012) kadar yang terdapat pada *Stylissa* sp. memiliki potensi bioaktif yang sangat besar, dimana kandungan bioaktif tersebut dikelompokkan dalam kelompok besar yaitu antinflamatory, antitumor, antivirus, antimalara dan antibiotik. Spesies ini memiliki senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, steroid dan terpenoid, dimana berguna untuk menghalangi predator bersaing untuk ruang dengan organisme spesies lain, untuk komunikasi dan untuk perlindungan terhadap infeksi.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh yaitu ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. memiliki aktivitas antioksidan pada setiap konsentrasi 25 mg/L (77,40%), konsentrasi 50 mg/L (85,63%), konsentrasi 75 mg/L (88,66%), konsentrasi 100 mg/L (88,96%) dan aktivitas tertinggi terdapat pada konsentrasi 100 mg/L.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol spons *Stylissa* sp. dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 100 mg/L dan pada pengujiannya memakai metode FRAP, RP, dan FC lalu bandingkan dengan hasil penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Apri, R. 2014. Kandungan Senyawa Bioaktif *Sinularia* sp. *Lobophytum* sp. dari Perairan Pulau Pongkok Bangka Selatan. [Thesis]. Sekolah Pascasarjana Istitut Pertanian Bogor.
- Boer, Y. 2000. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq). *Jurnal Matematika dan IPA*. **1(1)**: 26-33.
- Green, R.J. 2004. *Antioxidant Activity Of Peanut Plant Tissues*. North caroline state university departemen of food science, Raleigh.
- Gozcelioglu, B dan Konuklugil, B. 2012. Qualitative Detection of Some Secondary Metabolites from Three Turkish Marine Sponges, *Fabard J. Pharm. Sci*. **37**: 73-78.
- Hanani, E, Mui'im A, Sekarini, R, dan Wiryowidagdo, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callispongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Ilmi Kefarmasian*. **2(3)**: 127-133.
- Ikhrar, S. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan *Stylissa* sp. dengan Metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). *Pharmacoon Jurnal*. **8(4)**: 210-211.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radikal *diphenyl picrylhydrazyl* (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science of Technology*. **26(2)**: 211-219.
- Robins. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Vol 1, Edisi 7. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Suparno. 2005. Kajian Bioaktif Spons Laut (porifera: *Demospongiae*) Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia Dalam Dibidang Farmasi. *Jurnal Perikanan Indonesia*. **24(21)**: 41-45.
- Suryanto, E. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. Putra Media Nusantara, Manado.