

**ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST SOLVENT ETHANOL, METHANOL, N-HEXANE AND  
CLOROFORM OF SPONGE *Liosina paradoxa* OBTAINED FROM THE ISLAND OF  
MANADO TUA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PELARUT ETANOL, METANOL, N-HEKSAN, DAN  
KLOROFORM SPONS *Liosina paradoxa* DIPEROLEH DARI PULAU MANADO TUA**

**Evans H.S Tatuhe<sup>1)\*</sup>, Adithya Yudistira<sup>1)</sup>, Olvie S. Datu<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

\*evanshandayani@gmail.com

**ABSTRACT**

*Antioxidants are substances that can provide endogenous protection and exogenous oxidative stress by scavenging free radicals and being able to inhibit other molecular oxidation. Sponges contain various bioactive compounds that act as antioxidants such as alkaloids, steroids/triterpenoids and flavonoids which have strong bioactivity. The purpose of this study was to determine the antioxidant activity of the marine sponge *Liosina paradoxa*. This research is extract by maceration and fractionation using DPPH method [1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl] to analyze antioxidant activity on UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 517nm. The results obtained from the sponge *Liosina paradoxa* on the island of Manado Tua have antioxidant activity with % inhibition obtained in the ethanol extract of 48.5% and the methanol fraction of 67.2%, n-hexane 51.2%, and chloroform 36.4%. which was tested at a concentration of 100 ppm.*

**Keywords:** *Lyosine paradoxa*, Antioxidant, DPPH [1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl]

**ABSTRAK**

Antioksidan adalah zat bisa memberi perlindungan endogen dan tekanan oksidatif eksogen dengan menangkap radikal bebas dan merupakan molekul mampu menghambat oksidasi molekul lain. Spons mengandung berbagai senyawa bioaktif berperan sebagai antioksidan seperti alkaloid, steroid/triterpenoid dan flavonoid yang memiliki bioaktivitas kuat. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari biota laut spons *Liosina paradoxa*. Penelitian ini yakni ekstrak dengan cara maserasi dan fraksinasi menggunakan metode DPPH [1,1-difenil-2-pikrilhidrazil] untuk menganalisis aktivitas antioksidan pada alat uji spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517nm. Hasil penelitian yang didapatkan dari spons *Liosina paradoxa* di pulau Manado Tua memiliki aktivitas antioksidan dengan % inhibisi diperoleh pada ekstrak etanol 48,5 % dan fraksi metanol sebesar 67,2%, n-heksan 51,2 %, dan kloroform 36,4 % yang di uji pada konsentrasi 100 ppm.

**Kata kunci:** *Liosina paradoxa*, Antioksidan, DPPH [1,1-difenil-2-pikrilhidrazil]

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan memiliki garis panjang pantai sekitar 81.000 km dengan perbandingan luas lautan dan daratan 7:3, hal ini menjadikan Indonesia mempunyai potensi keanekaragaman hayati laut sehingga memberi peluang dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri termasuk makanan, zat warna, kosmetik dan kesehatan (Handayani dan Dian, 2010).

Organisme laut khususnya pada invertebrate memiliki kandungan senyawa kimia terbanyak di bandingkan dengan tumbuhan laut. Contohnya invertebrate adalah spons laut atau *filum porifera*, hewan lumut atau *filum bryozoa*, softcoral atau *filum cnidaria* dan hewan bermantel *filum tunicata* (Handayani dan Dian, 2010).

Spons merupakan hewan multiseluler *filum polifera* tidak memiliki organ dan jaringan, namun pada tubuhnya memiliki pori atau disebut dengan ostia dan saluran sirkulasi air pada rongga pusat atau oskulum (Thomas *et al*, 2016).

Spons dapat mengambil 95% karbon organik terlarut dalam air melalui pori-porinya serta mengubahnya menjadi partikel tersuspensi dan bahan terlarut dapat dijadikan sebagai bahan makanan untuk hewan lain (FAO, 2017).

Antioksidan dapat didefinisikan sebagai suatu senyawa mampu menunda, memperlambat, atau menghambat reaksi oksidasi. Senyawa oksidan dapat melawan radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) terbentuk dari metabolisme dalam tubuh (Miryanti *et al*, 2011).

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul mempunyai electron tidak berpasangan. Radikal bebas merupakan factor penyebab dari sejumlah penyakit seperti kardiovaskular, neurogeneratif, dan kanker. Reaksi radikal bebas tersebut dapat terhambat dengan adanya senyawa antioksidan (Liochev, 2013).

Belakangan ini penelitian tentang antioksidan marak dilakukan untuk menemukan antioksidan alami untuk pengobatan preventif. Hal ini bisa disebabkan karena jumlah antioksidan dimiliki oleh tubuh berfungsi untuk mencegah kerusakan oksidatif itu tidak cukup serta banyak antioksidan sintetik bersifat karsinogenik (Alyaqoubi *et al*, 2015).

Berdasarkan kajian literatur ada, spons mengandung berbagai senyawa bioaktif berperan sebagai antioksidan seperti alkaloid, steroid/triterpenoid dan flavonoid memiliki bioaktivitas kuat.

Sebelumnya sudah dilakukan penelitian dengan tahapan uji ekstrak etanol pada spons laut dengan sampel di ambil berasal dari tempat berbeda dan hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol terhadap spons laut dengan menggunakan metode DPPH mempunyai aktifitas antioksidan kuat. Oleh sebab itu akan dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji antioksidan ekstrak dan fraksi khususnya pada biota laut spons *Liosina paradoxa*.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2021 sampai dengan bulan Maret 2022 di Laboratorium Farmasi Lanjut Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi, Manado. Sampel diambil dari pulau Manado Tua.

### Alat dan Bahan

#### Alat

Alat-alat digunakan dalam penelitian ini adalah *scuba diving*, sarung tangan, masker, pisau, talenan, kertas label, spidol permanen, tissue kering, *cool box*, kamera *underwater*, *zipper lock bag*, labu ukur 10 mL (*pyrex*), erlenmeyer 200 ml, wadah botol, timbangan analitik, spektrofotometer UV-Vis, aluminium foil, corong, mikro pipet, tabung reaksi, *rotary evaporator*.

#### Bahan

Bahan digunakan dalam penelitian ini yaitu kertas saring, etanol 95%, DPPH [*1,1-difenil-2 pikrilhidrazil*], ekstrak dan fraksi dari spons *Liosina paradoxa* dan pelarut kloroform, n-heksan dan methanol.

### Prosedur Penelitian

#### 1. Pengambilan Sampel

Sampel ini diambil dari pulau Manado Tua, Provinsi Sulawesi Utara menggunakan alat bantu (masker dan snorkel). Sebelum diambil sampel dipotret menggunakan kamera bawah laut, setelah diambil dimasukkan dalam kantong plastik jepit sudah disiapkan dan disimpan dalam kotak pendingin lalu dibawa ke Laboratorium Farmasi Lanjut Program Studi Farmasi Fakultas

Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

## 2. Preparasi Sampel

Spons *Liosina paradoxa* sudah diambil dicuci kembali dan dipotong-potong kecil, ditimbang dengan berat botol dan keseluruhan lalu sebanyak 1328 gr sampel dimasukkan ke dalam wadah botol, sampel di dalam botol diisi dengan etanol 95% sebanyak 200 mL.

## 3. Ekstraksi

Sampel spons *Liosina paradoxa* sebanyak 1328 g dimaserasi dengan pelarut etanol 95% sebanyak 200 mL dengan 3 kali pengulangan selama 24 jam. Sampel kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat. Hasil diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga menghasilkan ekstrak kental/ekstrak kasar dari sampel spons *Liosina paradoxa*.

## 4. Fraksinasi

Ekstrak kasar spons *Liosina paradoxa* dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan methanol 80% sebanyak 100 ml. Dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut n-heksan sebanyak 100 ml setelah itu dikocok sampai homogen. Dibiarkan sampai terbentuk lapisan metanol dan lapisan n-heksan, kemudian masing-masing lapisan ditampung dalam wadah berbeda. Lapisan n-heksan kemudian di evaporasi menggunakan rotary evaporator hingga kering, lalu ditimbang dan diperoleh fraksi n-heksan.

Selanjutnya lapisan metanol ditambahkan aquades sebanyak 100 ml kemudian dipartisi dengan pelarut kloroform dengan perbandingan 1:1 v/v dalam corong pisah, setelah itu dikocok kembali sampai homogen. Dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan metanol dan kloroform, kemudian masing-masing lapisan ditampung dalam wadah berbeda. Lapisan kloroform selanjutnya dievaporasi menggunakan rotary evaporator hingga kering lalu ditimbang berat sampel dan diperoleh fraksi kloroform. Lapisan metanol kemudian dievaporasi hingga kering, lalu ditimbang dan diperoleh fraksi metanol.

## 5. Pembuatan Larutan Ekstrak

Larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 100 ppm dengan menimbang 10 mg ekstrak etanol spons *Liosina paradoxa* kemudian dilarutkan dalam 100 ml etanol 95% dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya perlakuan sama dilakukan pada fraksi n-heksan, kloroform, dan metanol.

## 6. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 5 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam etanol 95% sebanyak 100 mL, selanjutnya larutan dibuat untuk uji aktivitas antioksidan yaitu ekstrak etanol spons *Liosina paradoxa* dipipet sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan masing-masing konsentrasi 50 ppm dan di tambahkan 2 mL larutan DPPH ke dalam masing-masing konsentrasi dan divortex selama 5 detik sebanyak 3 kali pengulangan.

## 7. Pembuatan Larutan Kontrol DPPH

Pembuatan larutan kontrol DPPH yakni dengan melarutkan 2 ml etanol 95% dengan 2 ml larutan DPPH 50 ppm dan kemudian dikocok. Larutan control di uji menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm.

## 8. Pengujian Larutan Kontrol DPPH dan Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH

Pembuatan larutan uji sampel dibuat dengan memasukkan 2 mL larutan DPPH ke dalam masing-masing larutan sampel kemudian di vortex dan di inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan yaitu 37°C sampai terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH.

Semua sampel dilakukan 3 kali pengulangan dan setelah itu diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 517 nm. Kemudian ekstrak dan fraksi dari spons *Liosina paradoxa* dengan pelarut n-heksan, kloroform dan metanol diamati sebagai standar. Aktivitas penangkapan radikal bebas % in hibisi dengan rumus:

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

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil Nilai % *inhibisi* Antioksidan

Ekstrak/Fraksi	Absorbansi Kontrol	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel (pengulangan)			Nilai Rata-Rata % <i>inhibisi</i> Antioksidan
			1	2	3	
Ekstrak etanol	0,719	100 ppm	0,388	0,380	0,344	48,5 %
Metanol	0,719	100 ppm	0,195	0,188	0,325	67,2 %
n-heksan	0,719	100 ppm	0,357	0,364	0,334	51,2 %
Kloroform	0,719	100 ppm	0,410	0,462	0,509	36,4 %

Dari hasil didapat, berdasarkan tabel 1 bahwa pada metanol, pengulangan 1, 2 dan 3 nilai % *inhibisi* didapatkan adalah paling tertinggi dengan nilai rata-rata didapat yaitu 67,2%. Metanol merupakan gugus polar lebih kuat dari pada gugus nonpolar hal ini dapat terlihat dari struktur kimia metanol mengandung gugus hidroksil (polar) dan gugus karbon (nonpolar).

Sebelum di uji menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm untuk mengetahui nilai absorbansinya, sampel metanol setelah di inkubasi selama 30 menit, untuk pengulangan 1 dan 2 terjadi perubahan warna dari ungu ke kuning. Perubahan intensitas warna terjadi berhubungan dengan berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH sebab adanya penangkapan satu elektron oleh zat antiradikal menyebabkan tidak adanya kesempatan bagi elektron tersebut beresonansi dimana perubahan ini dicatat pada spektrofotometer (Asih *et al.*, 2012).

Selanjutnya hasil pada ekstrak etanol diperoleh sebesar 48,5% sedikit lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yakni ekstrak etanol spons *Liosina paradoxa* di koleksi dari Pulau Mantahage, pada beberapa konsentrasi yakni 0,5 ppm (53,3%), 0,6 ppm (52,67%) dan konsentrasi 0,7 ppm sebesar (54,70 %). Hal ini sesuai dengan dikemukakan oleh Dewi (2014) bahwa konsentrasi digunakan juga mempengaruhi kemampuan pelarut dalam mengekstrak suatu senyawa bioaktif terdapat dalam sampel tersebut.

Pada hasil fraksi untuk pengulangan 1,2 dan 3 n-heksan diperoleh hasil sebesar 51,2% dapat dilihat bahwa semakin rendah absorbansi sampel maka semakin tinggi nilai % *inhibisi* di dapatkan. Adanya peningkatan konsentrasi berbanding lurus dengan besarnya % *inhibisi*, artinya aktivitas antioksidannya sangat lemah. Hal ini karena n-heksan merupakan pelarut bersifat non-polar sehingga pada proses fraksinasi n-heksan tidak mampu menarik senyawa-senyawa terkandung didalamnya (Miryanti, 2011).

Dilihat pada hasil ada pada pelarut kloroform, pengulangan 1,2 dan 3 hasil diperoleh hanya 41,6%. Ini berarti bahwa hanya sedikit % saja pelarut kloroform mampu untuk menarik senyawa ada didalamnya.

Pelarut juga sangat tergantung kepada kelarutan dari suatu senyawa tersebut ada dalam pelarut, sesuai dengan prinsip like dissolve like yaitu suatu senyawa akan terlarut pada pelarut dengan sifatnya sama (Prayoga, 2013). Dari ketiga pelarut digunakan, pelarut metanol mempunyai persen penghambatan paling tinggi, ini diduga karena kandungan senyawa metabolit sekunder terlarut dalam pelarut metanol mempengaruhi besarnya persen penghambatan. Dapat dikatakan bahwa semakin tinggi % *inhibisi* antioksidan dapat menunjukkan bahwa ada banyak atom hydrogen diberikan oleh senyawa aktif radikal sehingga DPPH bisa tereduksi atau terjadinya penambahan elektron.

Jadi Radikal bebas DPPH akan ditangkap oleh senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron dan mengubahnya menjadi *difenil pikrilhidrazil* (Rahayu *et al.*, 2010)

**KESIMPULAN**

Berdasarkan Hasil penelitian diperoleh, dapat disimpulkan bahwa dari spons *Liosina paradoxa* yang diperoleh dari pulau Manado Tua memiliki aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada fraksi Metanol dengan presentase 67,2% pada konsentrasi 100 ppm.

**SARAN**

Kiranya dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan beberapa konsentrasi dan juga metode lain seperti metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), ABTS (*2,2-Azinobiz 3-etyl benzothiazoline 6-sulfonic acid*) dan FIC (*Ferrous Ion Chelating*) supaya hasilnya bisa dibandingkan dengan hasil penelitian ini.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alyaqoubi, S., Abdullah, A., Muhamad, S., Norrakiah, A., Addai, Z.R & Musa, K.H *et al.* 2015. Study of antioxidant activity and physicochemical properties of coconut milk (Pati santan) in Malaysia. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **7(4)** : 967-973.
- Asih, I.A.R. Astiti & Setiawan I.M.A, *et al.* 2012. Senyawa Golongan Flavonoid pada Ekstrak Kulit Batang Bungur (*Lagerstroemia speciosa Pers*). FMIPA: Universitas Udayana
- Dewi N.W.O. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan senyawa flavonoid ekstrak etanol biji terong Belanda (*Solanum betaeum, syn*) dalam menghambat reaksi peroksidasi lemak pada plasma darah tikus wistar. *Indonesian E-Journal of applied Chemistry* **2(1)** : 7-16.
- Membri, D.K., Yudistira, A., Sumantri, S. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Spons *Liosina paradoxa* Yang Dikoleksi Dari Pulau Mantehage. *Pharmacon*, 10(2), 775– 777.
- FAO, 2017. Sponges and their role in the marine environment. <http://www.fao.org/3/a-i7775e.pdf>.
- Handayani, dan Dian. 2012. Isolasi Senyawa Sitotoksik dari Spons Laut *Petrosia sp.* *Jurnal JPB Perikanan* **7(1)**: 69–76.
- Liochev, S.I. 2013. *Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging. Free Radical Biology and Medicine*. **6** : 1-4.
- Miryanti, Y. A., Sapei, L., Budiono, K., Indra, S *et al.* 2011. *Ekstraksi antioksidan dari kulit buah manggis (Garcinia mangostana L.)*. Laporan Penelitian Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Bandung, Universitas Katolik Parahan.
- Prayoga, G. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Ekstrak Teraktif Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochinchinensis Lour*). Fakultas Farmasi : Universitas Indonesia
- Rahayu , D.S., K., Dan Enny, F *et al.* 2010. *Penentuan Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (Terminalia catappa L) dengan Metode DPPH*. FMIPA Kimia, Universitas Diponegoro.
- Thomas T, Moitinho-Silva L., Lurgi M, *et al.* 2016. Diversity, structure, and convergent evolution of the global sponge microbiom. *Nature Communications* **7 (11870)** : 1-12.