



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL ASCIDIA  
*Didemnum* sp. DARI KEPULAUAN SERIBU DENGAN METODE  
1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN IDENTIFIKASI  
GOLONGAN SENYAWA DARI FRAKSI TERAKTIF**

**SKRIPSI**

**ZULFA EDAWATI**

**0806364826**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI EKSTENSI  
DEPOK  
JANUARI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL ASCIDIA  
*Didemnum* sp. DARI KEPULAUAN SERIBU DENGAN METODE  
1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN IDENTIFIKASI  
GOLONGAN SENYAWA DARI FRAKSI TERAKTIF**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Farmasi**

**ZULFA EDAWATI  
0806364826**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI EKSTENSI  
DEPOK  
JANUARI 2012**

ii

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah karya saya sendiri, dan semua sumber  
baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya  
nyatakan dengan benar.

Nama : Zulfa Edawati

NPM : 0806364826

Tanda Tangan : 

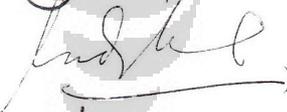
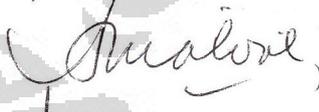
Tanggal : 20 Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Zulfa Edawati  
NPM : 0806364826  
Program Studi : Ekstensi Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Ascidia Didemnum* sp. Dari Kepulauan Seribu Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Dari Fraksi Teraktif

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Berna Elya, M.Si (  )  
Pembimbing II : Dr. rer. nat. Yasman, S.Si., M.Sc (  )  
Penguji I : Prof. Dr. Endang Hanani, Apt., M.S. (  )  
Penguji II : Dra. Azizahwati, M.S (  )  
Penguji III : Drs. Umar Mansur, M.Sc. (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 20 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahrabbi'l'amin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang karena telah memberikan nikmat iman dan nikmat ilmu sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Ibu Dr. Berna Elya, Apt., M.Si. selaku pembimbing I, serta bapak Dr. rer. nat. Yasman, S.Si, M.Sc., selaku pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, pikiran, ilmu, pengarahan, saran, kesabaran, dan perhatian untuk mengarahkan penulis selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
- (2) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, Apt., M.S., selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (3) Ibu Dra. Azizahwati, M.S., selaku ketua Program Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (4) Bapak Sutriyo S.Si.,M.Si., selaku pembimbing akademis yang telah membimbing saya selama mengikuti perkuliahan di Farmasi FMIPA UI.
- (5) Seluruh staf dan dewan pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan bimbingannya selama mengikuti perkuliahan.
- (6) Abi dan Ibu tercinta serta mas Heli, mas Fadli, mas Mulyadi, mba Fauzia, mba Vera, mba Neneng, adek Raudhah, adek Lili yang senantiasa melimpahkan kasih sayang, dukungan, harapan, semangat dan do'a.
- (7) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Semoga kebaikan mereka mendapat balasan berlipat ganda dari Allah SWT. Akhir kata, saya berharap semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis  
2012

## **HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zulfa Edawati

NPM : 0806364826

Program Studi : Ekstensi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Ascidia Didemnum* sp. Dari Kepulauan Seribu Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Dari Fraksi Teraktif”.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 20 Januari 2012

Yang menyatakan



(Zulfa Edawati)

## ABSTRAK

Nama : Zulfa Edawati  
Program Studi : Ekstensi farmasi  
Judul : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Ascidia Didemnum* sp. Dari Kepulauan Seribu dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Teraktif

Radikal bebas merupakan molekul yang relatif tidak stabil, memiliki elektron yang tidak berpasangan di orbital luarnya sehingga bersifat reaktif. Adanya radikal bebas yang berlebihan dalam tubuh manusia dapat menimbulkan suatu penyakit. Reaktivitas radikal bebas ini dapat diredam oleh senyawa antioksidan. Indonesia memiliki keanekaragaman jenis biota laut yang tinggi. Keanekaragaman ini memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut sebagai sumber pengobatan, termasuk sebagai antioksidan. Pada penelitian ini uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap sampel ascidia *Didemnum* sp. yang dikoleksi dari Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. Tujuan dari penelitian ini untuk memperoleh ekstrak dan fraksi dari ascidia *Didemnum* sp., kemudian diuji aktivitas antioksidannya serta diidentifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif. Pengujian dilakukan dengan metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). *Ascidia Didemnum* sp. diekstraksi dengan metanol, kemudian difraksinasi cair-cair dengan n-heksan, etil asetat, dan air. Fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi selanjutnya difraksinasi kembali dengan kromatografi kolom dipercepat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak metanol ascidia *Didemnum* sp. sebesar 105,1029  $\mu\text{g/ml}$ . Selanjutnya dilakukan fraksinasi cair-cair, hasil menunjukkan fraksi yang paling aktif adalah etil asetat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 90,804  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil pengujian pada fraksi hasil kromatografi kolom dipercepat memberikan nilai  $IC_{50}$  sebesar 86,3507  $\mu\text{g/ml}$  sebagai fraksi teraktif. Golongan senyawa yang terdapat pada fraksi teraktif adalah alkaloid, saponin, steroid/triterpenoid dan glikosida.

Kata Kunci : DPPH, ascidia, *Didemnum* sp., Kepulauan Seribu  
xv+62halaman : 15 gambar; 18 tabel; 5 lampiran  
Daftar Acuan : 41 ( 1958-2011)

## ABSTRACT

Name : Zulfa Edawati  
Program Study : Pharmacy extention  
Title : Antioxidant Activity Test of Ascidian *Didemnum* sp. Methanol Extracts from Kepulauan Seribu Using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) and Identification of Compounds Group of The Most Active Fraction

Free radicals are molecules that is relatively unstable, has an unpaired electron in its outer orbitals that are reactive. The presence of excessive free radicals in the human body can cause a disease. Reactivity of free radicals can be mitigated by antioxidant compounds. Indonesia has a highly various species of marine life. This diversity provides an opportunity to exploit marine biota as a source of treatment, including as an antioxidant. In this study the antioxidant activity assay performed on samples ascidia *Didemnum* sp. collected from the Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. The purpose of this study is to obtain extracts and fractions of ascidia *Didemnum* sp., that was going to be tested of its antioxidant activity and then was identified the compound of the most active fraction. Testing was performed by the method of 1,1-diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). Ascidia *Didemnum* sp. extracted with methanol, and then fractionated by liquid-liquid n-hexane, ethyl acetate, and water. Fractions which have the highest antioxidant activity of fractionated further accelerated back with chromatography column. The results showed that the  $IC_{50}$  value of ascidia methanol extract of *Didemnum* sp. at 105.1029  $\mu\text{g/mL}$ . Then performed liquid-liquid fractionation, the results indicate that the most active fraction was ethyl acetate with  $IC_{50}$  value of 90.804  $\mu\text{g/ml}$ . Test results on the fraction of accelerated column chromatography  $IC_{50}$  value of 86.3507  $\mu\text{g/ml}$  as the most active fraction. Groups of compounds contained in the most active fraction are alkaloid, saponin, steroid/triterpenoid and glycoside.

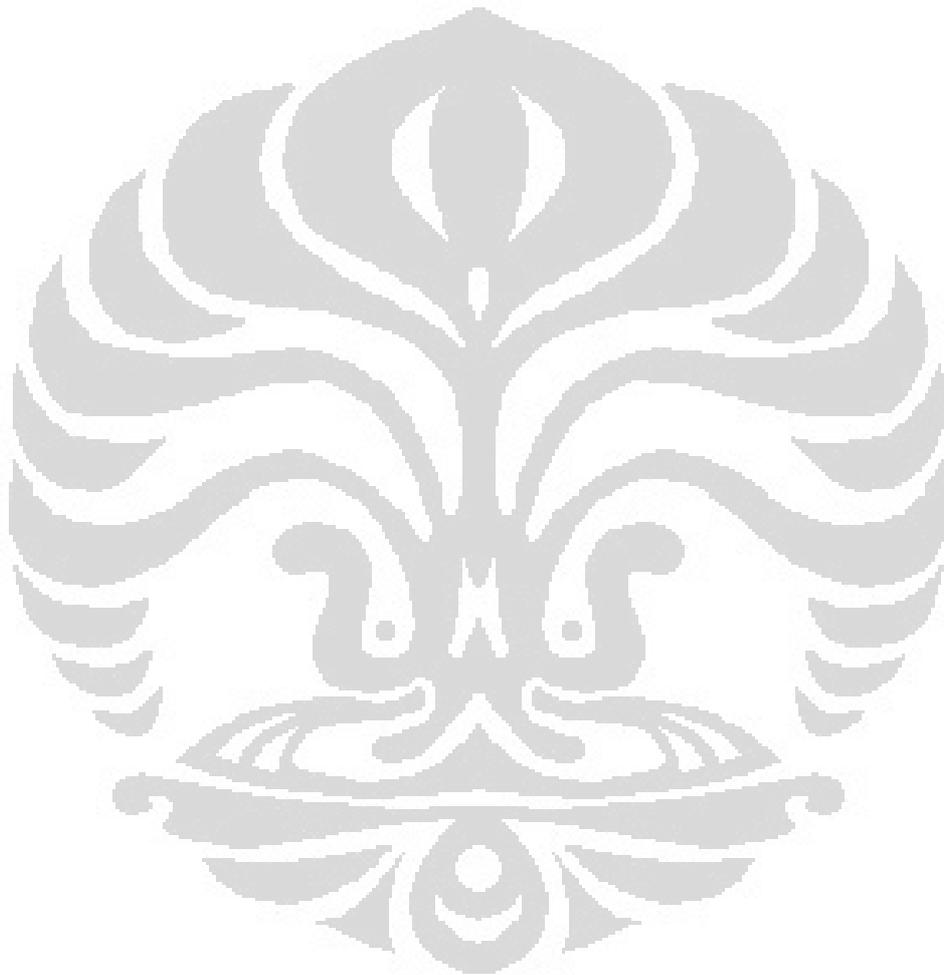
Keywords : DPPH, ascidian, *Didemnum* sp., Kepulauan Seribu  
xv+62 pages : 15 figures; 18 tables; 5 appendic  
Bibliography : 41 (1958-2011)

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	3
1.3. Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Ascidia .....	4
2.1.1 Morfologi .....	4
2.1.2 Berbagai Fungsi Senyawa Bioaktif Ascidia .....	5
2.2. <i>Didemnum</i> sp. ....	5
2.3. Ekstraksi.....	7
2.3.1 Cara Dingin.....	8
2.3.2 Cara Panas.....	9
2.4. Fraksinasi .....	10
2.5. Kromotografi.....	10
2.5.1 Kromotografi Lapis Tipis .....	10
2.5.2 Kromotografi Kolom .....	11
2.5.2.1 Kromotografi Kolom Adsorpsi .....	11
2.5.2.2 Kromotografi Kolom Partisi .....	11
2.6. Penapisan Fitokimia.....	12
2.6.1 Alkaloid.....	12
2.6.2 Terpen .....	12
2.6.3 Tanin .....	13
2.6.4 Saponin .....	13
2.6.5 Glikosida .....	13
2.6.6 Kuinon.....	14
2.6.7 Flavanoid.....	14
2.7. Radikal Bebas .....	14
2.8. Antioksidan .....	15
2.9. Uji Aktivitas Antioksidan .....	16

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
3.2. Alat.....	19
3.3. Bahan .....	19
3.3.1 Bahan Uji .....	19
3.3.2 Bahan Kimia .....	19
3.3.3 Bahan Perbandingan .....	20
3.4. Cara Kerja .....	20
3.4.1 Pengumpulan dan Penyediaan Simplicia .....	20
3.4.2 Penyiapan Larutan Pereaksi.....	20
3.4.3 Pembuatan Ekstrak.....	21
3.4.4 Fraksinasi Ekstrak .....	22
3.4.4.1 Fraksinasi dengan n-Heksan .....	22
3.4.4.2 Fraksinasi dengan Etil Asetat .....	23
3.4.4.3 Memperoleh Fraksi Air.....	22
3.4.5 Identifikasi Senyawa Antioksidan .....	23
3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH .....	23
3.4.6.1 Pembuatan Larutan DPPH.....	23
3.4.6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH...	23
3.4.6.3 Pembuatan Larutan Blanko.....	24
3.4.6.4 Persiapan Larutan Uji .....	24
3.4.6.5 Pembuatan Larutan Kuersetin sebagai Perbandingan...	24
3.4.6.6 Perhitungan Nilai IC <sub>50</sub> .....	25
3.4.7 Pemisahan Fraksi Paling Aktif dengan Kromatografi Kolom Dipercepat .....	26
3.4.8 Identifikasi Golongan Kimia dari Fraksi Teraktif .....	27
3.4.8.1 Identifikasi Alkaloid .....	27
3.4.8.2 Identifikasi Glikosida.....	27
3.4.8.3 Identifikasi Saponin.....	28
3.4.8.4 Identifikasi Flavonoid.....	28
3.4.8.5 Identifikasi Tanin.....	28
3.4.8.6 Identifikasi Antrakuinon.....	29
3.4.8.7 Identifikasi Fenol .....	29
3.4.8.7 Identifikasi Steroid/Triterpenoid .....	29
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>30</b>
4.1. Penyediaan Bahan .....	30
4.2. Pembuatan Ekstrak Metanol <i>Ascidia Didemnum</i> sp.....	30
4.3. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol <i>Ascidia Didemnum</i> sp Dengan Metode DPPH .....	31
4.4. Fraksinasi Ekstrak <i>Ascidia Didemnum</i> sp. dengan n-Heksan, Etil Asetat, dan Air .....	32
4.5. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-heksan, Etil asetat dan Air dengan Metode DPPH.....	33
4.6. Pemisahan Fraksi Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom Dipercepat .....	34
4.7. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi I-IX dengan Metode DPPH .....	35
4.8. Identifikasi Golongan Senyawa Fraksi Teraktif .....	36

<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>37</b>
5.1. Kesimpulan .....	37
5.2. Saran .....	37
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>38</b>



## DAFTAR GAMBAR

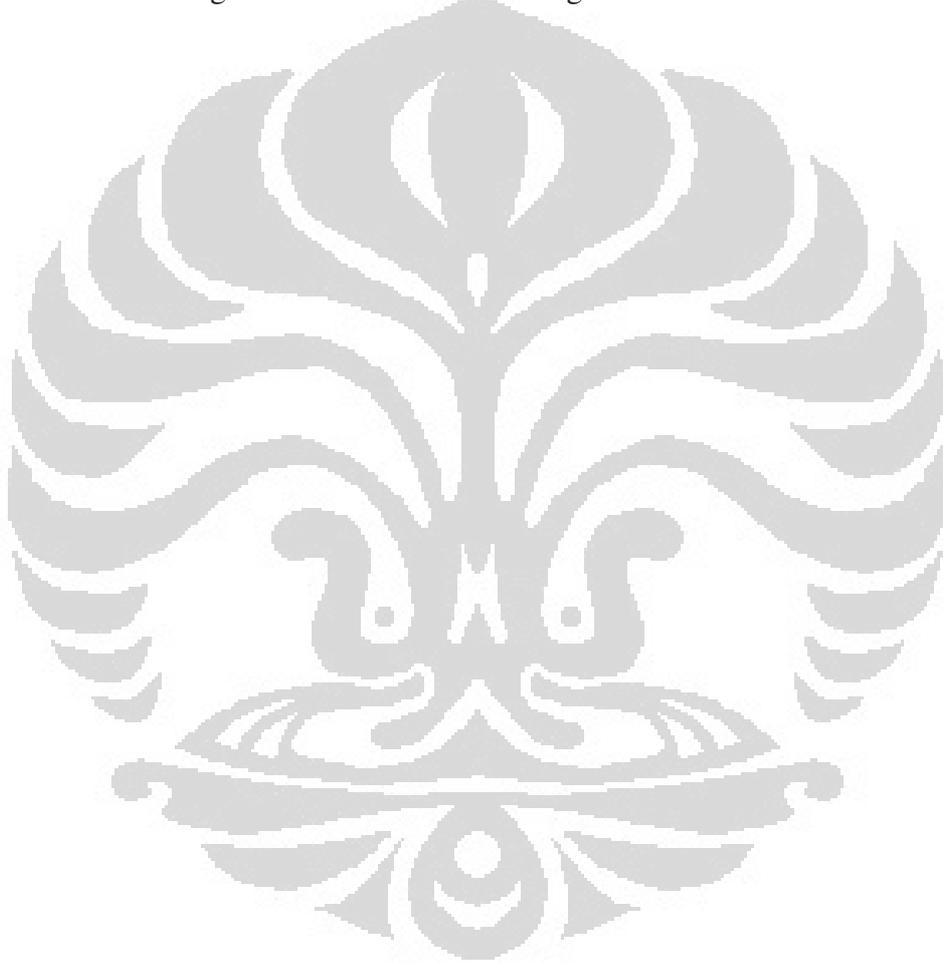
	Halaman
Gambar 2.2 Koloni Ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	7
Gambar 2.9 Reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan..	17
Gambar 3.4.2(1) Penguap putar vakum ( <i>Rotary evaporator</i> ).....	41
Gambar 3.4.2(2) Skema ekstraksi dan fraksinasi sampel ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	42
Gambar 3.4.3.3 <i>Freeze dryer</i> .....	43
Gambar 3.4.6.2(1) Spektrofotometer UV-Vis.....	44
Gambar 3.4.6.2(2) Spektrum serapan larutan DPPH .....	45
Gambar 3.4.4.4 Spektrum serapan DPPH yang ditambah sampel .....	45
Gambar 4.2 Ekstrak metanol ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	46
Gambar 4.3(1) Hasil identifikasi senyawa antioksidan ekstrak metanol.....	45
Gambar 4.3(2) Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan berupa donasi proton.....	32
Gambar 4.4(1) Ekstrak n-heksan ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	47
Gambar 4.4(2) Ekstrak etil asetat ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	47
Gambar 4.4(3) Ekstrak air ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	48
Gambar 4.5 Hasil identifikasi senyawa antioksidan ekstrak .....	48
Gambar 4.6 Bagan pemisahan fraksi etil asetat.....	49
Gambar 4.7 Hasil identifikasi senyawa antioksidan 9 fraksi .....	50

## DAFTAR TABEL

	Halaman
<b>Tabel 4.2</b>	<b>Rendeman ekstrak metanol ascidia <i>Didemnum</i> sp..... 51</b>
<b>Tabel 4.3</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol ascidia <i>Didemnum</i> sp ..... 51</b>
<b>Tabel 4.4</b>	<b>Hasil fraksinasi cair-cair ..... 51</b>
<b>Tabel 4.5(1)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan ascidia <i>Didemnum</i> sp ..... 52</b>
<b>Tabel 4.5(2)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat ascidia <i>Didemnum</i> sp..... 52</b>
<b>Tabel 4.5(3)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak air ascidia <i>Didemnum</i> sp..... 52</b>
<b>Tabel 4.6</b>	<b>Hasil fraksinasi fraksi etil asetat dari ekstrak metanol <i>Ascidia</i> <i>Didemnum</i> sp. dengan kromatografi kolom dipercepat dan penggabungan fraksi..... 53</b>
<b>Tabel 4.7(1)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi 1 ascidia <i>Didemnum</i> sp..... 55</b>
<b>Tabel 4.7(2)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi II ascidia <i>Didemnum</i> sp..... 55</b>
<b>Tabel 4.7(3)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi III ascidia <i>Didemnum</i> sp. .... 55</b>
<b>Tabel 4.7(4)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi IV ascidia <i>Didemnum</i> sp ..... 55</b>
<b>Tabel 4.7(5)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi V ascidia <i>Didemnum</i> sp..... 56</b>
<b>Tabel 4.7(6)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi VI ascidia <i>Didemnum</i> sp. .... 56</b>
<b>Tabel 4.7(7)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi VII ascidia <i>Didemnum</i> sp..... 56</b>
<b>Tabel 4.7(8)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi VIII ascidia <i>Didemnum</i> sp. .... 56</b>
<b>Tabel 4.7(9)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi IX ascidia <i>Didemnum</i> sp. .... 57</b>
<b>Tabel 4.7(10)</b>	<b>Hasil uji aktivitas antioksidan kuersetin..... 57</b>
<b>Tabel 4.8</b>	<b>Identifikasi golongan kimia fraksi teraktif ..... 57</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Hasil determinasi sampel ascidia.....	58
Lampiran 2. Perhitungan konsentrasi larutan ekstrak.....	60
Lampiran 3. Contoh perhitungan $IC_{50}$ ekstrak methanol .....	61
Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi Larutan Kuersetin.....	62
Lampiran 5. Kurva hubungan konsentrasi ekstrak dengan % inhibisi.....	63



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman jenis biota laut yang tinggi. Keanekaragaman ini memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut sebagai sumber pengobatan. Akan tetapi, pemanfaatan potensi ini dalam hal pengobatan belum optimal. Padahal menurut beberapa penelitian, organisme laut merupakan sumber senyawa obat baru yang berpotensi besar. Hal ini ditandai dengan adanya kolaborasi antara peneliti dari berbagai institusi dengan farmakolog yang menghasilkan suatu kemajuan besar dalam penemuan obat-obatan dari biota laut. Sebagai gambaran, lebih dari 10.000 senyawa bioaktif telah berhasil diisolasi dari biota laut dan sekitar 300 paten dari senyawa tersebut telah berhasil dipublikasikan selama kurun waktu 30 tahun (1969–1999) (Moosa M.K, 1999; Rasyid, 2008).

Beberapa pakar melaporkan ditemukannya beragam senyawa dengan aktivitas tertentu seperti antimikroba, antitumor, antiinflamasi, antivirus, antitoksin, antikanker, antikoagulan, antijamur, imunostimulan dan antioksidan dari biota laut seperti alga, karang, spons, dan tunikata. Contohnya antara lain bryostatin-1 (polipeptida yang diisolasi dari bryozoa *Bugula neritina*) yang memiliki khasiat sebagai antikanker dan imunostimulan, dolastatin-10 (polipeptida yang diisolasi dari moluska *Dolabella auricularia*) yang diketahui sebagai agen antitumor, dan didemnum B yang diisolasi dari tunikata *Trididemnum solidum* yang menunjukkan aktivitas sebagai antivirus, antitumor dan phyrophophylen dalam alga *Eisenia bicyclis* sebagai antioksidan (Cahyana A.H, 1991; Kijjoa dan sawangwong, 2004 ).

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

**Universitas Indonesia**

kanker (Boer, 2000). Radikal bebas merupakan molekul yang relatif tidak stabil, memiliki elektron yang tidak berpasangan di orbital luarnya sehingga bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektron dan mampu bereaksi dengan protein, lipid, atau DNA. Reaksi antara radikal bebas dan molekul tersebut dapat berujung pada timbulnya suatu penyakit. Reaktivitas radikal bebas ini dapat diredam oleh senyawa antioksidan (Sofia, 2008).

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul lain. Senyawa antioksidan ini akan menyerahkan satu atau lebih elektronnya kepada radikal bebas sehingga dapat menghentikan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Di dalam tubuh terdapat mekanisme antioksidan secara endogenik. Tetapi bila jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih maka dibutuhkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh (eksogenik) (Pratiwi *et al.*, 2006). Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan/sintetik. Antioksidan sintetik yang berkembang saat ini dikhawatirkan dapat memberi efek samping yang berbahaya bagi kesehatan manusia. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan (Rohdiana, 2001; Sunarni, 2005).

Potensi antioksidan alami harus dikembangkan untuk memperoleh antioksidan yang lebih aman dikonsumsi. Salah satu sumber daya laut yang berpotensi sebagai penghasil antioksidan alami adalah ascidia *Didemnum*. Jenis tersebut termasuk ke dalam Subfilum Tunicata, Kelas Ascidiacea, Familia Didemnidae. Habitat *Didemnum* tersebar di seluruh perairan Indo-Pasifik (termasuk Indonesia) dan dapat ditemukan pada kedalaman 1-20 m (Allen dan Steene, 2002; Cohen, 2005; Boyer, 2006). Hasil penelitian Krishnaiah *et al.* (2004) menunjukkan bahwa alkaloid Lamellarin ( lamellarin  $\gamma$  dan I ) yang diisolasi dari ascidia *Didemnum obscurum* dari India merupakan senyawa yang sangat berpotensi sebagai antioksidan. Dalam penelitiannya, Krishnaiah *et al.* (2004) menggunakan metode DPPH. Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna ungu gelap (Sashikumar, Maheshu, dan Jayadev, 2009).

Pada penelitian ini uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap sampel ascidia *Didemnum* sp. yang dikoleksi dari Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. Dari hasil penelusuran pustaka diketahui bahwa belum ada penelitian mengenai uji aktivitas antioksidan terhadap kandungan senyawa dari ascidia *Didemnum* sp. yang terdapat di Kepulauan Seribu, sehingga dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat diketahui tingkat aktivitas antioksidan dari ascidia *Didemnum* sp. tersebut, yang dilakukan baik terhadap ekstrak kasar maupun fraksi dalam pelarut tertentu.

## 1.2 Tujuan Penelitian

- a. Memperoleh ekstrak ascidia *Didemnum* sp. dan menguji aktivitas antioksidan ekstrak tersebut dengan metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil ( DPPH ).
- b. Memperoleh fraksi ascidia *Didemnum* sp. dan menguji aktivitas antioksidan fraksi tersebut dengan metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil ( DPPH ).
- c. Mengidentifikasi golongan senyawa kimia fraksi yang mempunyai aktifitas tertinggi.

## 1.3 Manfaat Penelitian

- a. Menambah data bahan alam laut yang memiliki potensi sebagai antioksidan.
- b. Menjadi bahan rujukan pada penelitian tahap selanjutnya.
- c. Mendorong penemuan antioksidan baru, khususnya dari bahan alam laut.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### 2.1 Ascidia

##### 2.1.1 Morfologi

Ascidia merupakan sebutan umum untuk spesies-spesies yang termasuk ke dalam Kelas Ascidiacea. Organisme tersebut termasuk ke dalam Filum Chordata bersama-sama dengan hewan-hewan vertebrata seperti ikan, reptil, dan mamalia. Ascidia dikelompokkan ke dalam Filum Chordata karena pada tahap larva, organisme tersebut memiliki ekor yang tersusun atas sel-sel yang membentuk struktur batang yang kuat yang juga ditemukan pada tulang belakang embrio hewan-hewan vertebrata. Ascidia juga memiliki struktur yang sama dengan insang pada ikan, yaitu faring yang berlubang-lubang (Allen dan Steene, 2002).

Ascidia hidup secara berkoloni dan menempel pada substrat seperti batu, terumbu karang, pasir dan lumpuran. Tubuh ascidia diselubungi oleh selaput fibrosa. Selaput tersebut mempunyai struktur menyerupai selulosa dan berbentuk seperti jeli, membran yang lunak, atau seperti daun. Spons dan ascidia lain dapat hidup di atasnya. Selaput tersebut mengandung pigmen yang memberikan warna pada individu ascidia. Pigmen tersebut diperoleh dari simbiosis dengan alga yang hidup pada selaput ascidia (Allen dan Steene, 2002).

Koloni ascidia mempunyai bentuk yang bervariasi yaitu bentuk beraturan dan tidak beraturan, piringan datar atau lembaran, bertangkai atau langsung menempel pada substrat, kendi atau tabung, menyerupai daun, kerucut atau spiral. Koloni tersebut dapat diselubungi secara menyeluruh oleh semacam matriks yang melekatkan individu yang satu dengan yang lain, dapat pula hanya diselubungi pada bagian dasar individu-individu yang menempel pada substrat (Allen dan Steene, 2002).

### 2.1.2 Berbagai Fungsi Senyawa Bioaktif Ascidia

Penelitian-penelitian terdahulu mengenai bahan alam dari avertebrata laut paling banyak dilakukan terhadap senyawa bioaktif ascidia, setelah senyawa bioaktif dari spons dan moluska. Ascidia merupakan bahan baku produksi lebih dari 130 macam senyawa bahan alam yang sebagian besar diketahui memiliki potensi fungsi farmakologis. Berbagai senyawa aktif dari ascidia mulai banyak diujikan untuk dijadikan obat kanker dan antibiotik. Salah satu senyawa aktif ascidia tersebut adalah didemnin B dari *Trididemnum solidum* yang menunjukkan toksisitas tinggi terhadap sel tumor. Beberapa senyawa aktif ascidia yang lain juga memiliki fungsi antimikroba, dan antivirus. Senyawa halosiamin A yang memiliki sifat antibiotik pernah diisolasi dari ascidia *Halocynthia roretzi* (Murugan dan Ramasamy, 2003; Sivaperumal *et al.*, 2010).

Hasil penelitian Krishnaiah *et al.*, (2004) menunjukkan bahwa alkaloid Lamellarin ( lamellarin  $\gamma$  dan I ) yang diisolasi dari ascidia *Didemnum obscurum* dari India merupakan senyawa yang sangat berpotensi sebagai antioksidan. Donia *et al.*, (2008) juga pernah meneliti *Didemnum molle* yang dikoleksi dari perairan Manado. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa keenamid A dan mollamida B dari ekstrak ascidia tersebut memiliki potensi antikanker.

### 2.2 *Didemnum* sp.

Taksonomi *Didemnum* sp. adalah sebagai berikut:

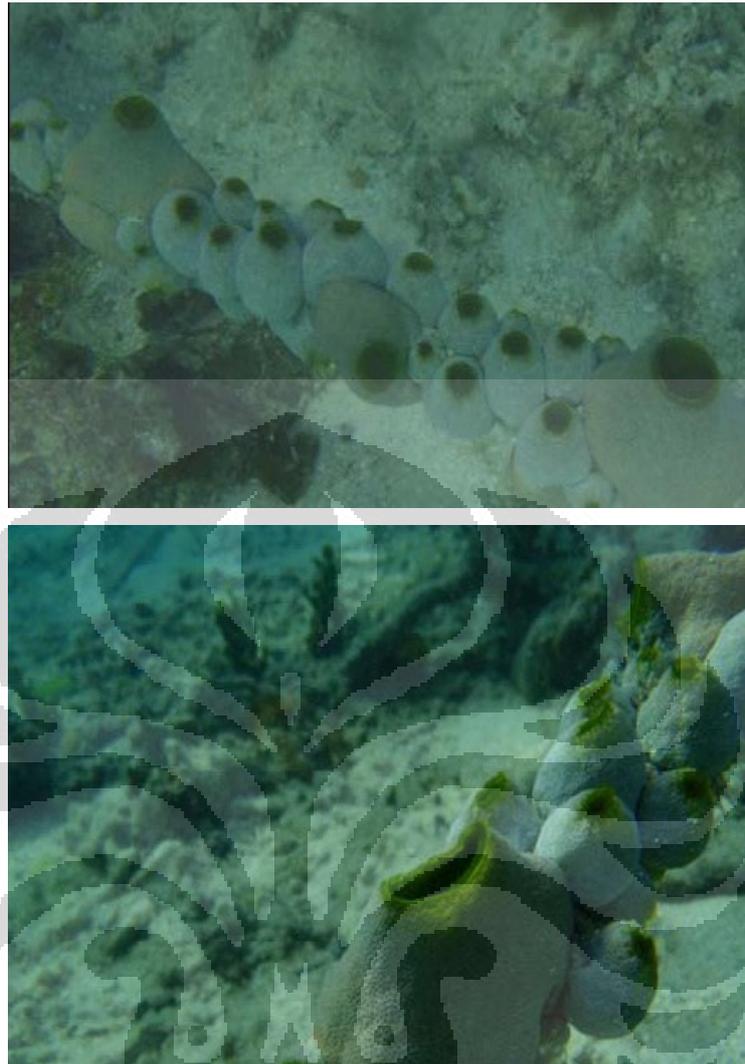
Kerajaan	: Animalia
Divisi	: Chordata
Subdivisi	: Tunicata
Kelas	: Ascidiacea
Suku	: Didemnidae
Marga	: <i>Didemnum</i>
Jenis	: <i>Didemnum</i> sp.

Habitat *Didemnum* sp. tersebar di seluruh perairan Indo-Pasifik (termasuk Indonesia) dan dapat ditemukan pada kedalaman 1--20 m. *Didemnum* sp.

memiliki bentuk seperti kendi yang terbalik dan warna bervariasi dari putih, jingga, hingga hijau terang. Spesies tersebut memiliki mulut berupa sifon oral dengan diameter 3--10 cm. *Didemnum* sp. sering ditemukan hidup berkoloni pada berbagai permukaan substrat seperti terumbu, batu, pasir, hingga logam pada dermaga atau kapal (Gambar 2.2). Koloni *Didemnum* sp. terdiri atas individu-individu yang disebut zooid. Setiap zooid memompa air laut melalui sifon oral ke seluruh tubuh untuk menyaring partikel-partikel makanan dan mengeluarkan air serta sisa metabolisme melalui sifon-sifon kecil yang terdapat di seluruh permukaan tubuhnya. *Didemnum* sp. dapat hidup pada suhu  $-5^{\circ}\text{C}$ -- $30^{\circ}\text{C}$  dengan salinitas air lebih dari 26 ppt (Allen dan Steene, 2002; Cohen, 2005; Boyer, 2006). Sifon-sifon pengeluaran *Didemnum* sp. secara umum memiliki warna hijau yang disebabkan oleh keberadaan alga *Prochloron* yang bersimbiosis dengan ascidia tersebut (Olson, 1986).

Koloni *Didemnum* sp. dapat tumbuh menjadi koloni yang lebih besar ketika individu-individu di dalamnya bereproduksi secara seksual maupun aseksual (Allen dan Steene, 2002). *Didemnum* sp. mampu melakukan migrasi di atas permukaan substrat meski hanya beberapa milimeter. *Didemnum* sp. memang merupakan individu yang sesil, namun penelitian Cowan (1981) menunjukkan bahwa masing-masing individu dalam suatu koloni *Didemnum* sp. mampu melakukan pergeseran terutama jika terjadi reproduksi aseksual (fragmentasi membentuk zooid baru), sehingga koloni yang ada bertambah besar. Cowan (1981) menyatakan bahwa hal tersebut sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya terhadap enam spesies ascidia lain yang juga termasuk dalam Familia Didemnidae.

*Didemnum* sp. mengembangkan pertahanan kimiawi dengan menghasilkan metabolit sekunder dan mendistribusikannya keseluruh tubuh (Stoner, 1990). Predator *Didemnum* sp. secara umum meliputi ikan, bintang laut, gastropoda, cacing pipih dan kepiting. Pertahanan fisik yang mudah diamati dari *Didemnum* sp. adalah lendir yang dikeluarkan ketika individu merasa terancam (Olson, 1986).



Gambar 2.2. Koloni *Ascidia Didemnum* sp.  
[Maulida, 2011]

### 2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen-komponen aktif (Harbone, 1987). Beberapa metode yang sering digunakan dalam ekstraksi bahan alam antara lain (Parameter Standar, 2000):

### 2.3.1 Cara Dingin

#### a. Maserasi

Merupakan metode yang sederhana, tetapi masih digunakan secara luas. Prosedurnya dilakukan dengan merendam bahan yang akan diekstrak (simplisia) dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Metode ini sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun untuk jumlah besar. Pengadukan sesekali ataupun secara konstan (dengan menggunakan alat pengocok mekanik untuk menjamin kehomogenan) dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Proses ekstraksi dapat dihentikan ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam simplisia. Setelah ekstraksi, residu simplisia (maserat), harus dipisahkan dari pelarut. Hal ini melibatkan proses pemisahan kasar dengan cara dekantasi, biasanya diikuti dengan tahap penyaringan. Sentrifugasi mungkin diperlukan jika serbuk terlalu halus untuk disaring. Untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh, umumnya dilakukan maserasi pendahuluan, yang diikuti pemisahan dan penambahan pelarut baru (*fresh solvent*) ke maserat. Hal ini bisa dilakukan secara periodik dengan semua filtrat dikumpulkan.

Kelemahan utama dari maserasi adalah prosesnya cukup memakan waktu yang lama, dapat berlangsung beberapa jam sampai beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan dapat berpotensi hilangnya metabolit. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut dalam temperatur kamar. Di lain pihak, dikarenakan ekstraksi dilakukan pada temperatur kamar, maserasi tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas.

#### b. Perkolasi

Pada perkolasi, simplisia direndam dalam pelarut pada sebuah alat perkolator. Perkolasi cukup sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun dalam jumlah besar. Seperti pada maserasi, untuk mengekstrak secara menyeluruh

dilakukan dengan penambahan pelarut yang baru (*fresh solvent*) dan semua ekstrak dikumpulkan.

### 2.3.2 Cara Panas

#### a. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

#### b. Refluks

Ekstraksi dengan pelarut pada temperature titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kekurangan yang utama dari metode ini adalah terdegradasinya komponen yang tidak tahan panas.

#### c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40°C-50°C.

#### d. Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperature penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih), temperatur terukur (96°C-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air.

## 2.4 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenis senyawa menjadi fraksi yang berbeda yang tergantung pada jenis simplisia. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987).

## 2.5 Kromotografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka teknik ini disebut kromatografi penyerapan (*adsorption chromatography*), sementara bila berupa zat cair, maka disebut dengan kromatografi pembagian (*partition chromatography*) (Harmita, 2006).

Jenis-jenis kromatografi yang biasa digunakan dalam pemisahan dan pemurniaan kandungan kimia bahan alam, antara lain :

### 2.5.1 Kromotografi Lapis Tipis

Kromotografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Metode ini digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat, dengan menggunakan zat penjerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca (Harmita, 2006; Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

KLT melibatkan dua fase yaitu sifat fase diam dan fase gerak atau campuran pelarut pengembang. Fase diam dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penjerap (kromatografi cair-padat) atau berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair (kromatografi cair-cair). Penjerap yang paling umum digunakan adalah silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), kiselgur (tanah diatome), dan selulosa (Gritter, Bobbit, dan Schwarting, 1985).

## 2.5.2 Kromatografi Kolom (Departemen kesehatan Republik Indonesia, 1979)

### 2.5.2.1 Kromatografi Kolom Adsorpsi

Pada kromatografi kolom adsorpsi zat penjerap (misalnya aluminium oksida yang telah diaktifkan, silika gel, kiselgur terkalsinasi, dan kiselgur kromatografi murni) dalam keadaan kering atau sebagai bubuk, dimampatkan ke dalam tabung kromatografi kaca atau kuarsa dengan ukuran tertentu dan mempunyai lubang pengalir keluar dengan ukuran tertentu. Zat yang akan diuji dilarutkan dalam sejumlah kecil pelarut kemudian dituangkan ke dalam kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penjerap. Zat berkhasiat diadsorpsi dari larutan secara sempurna oleh bahan penjerap berupa pita sempit pada puncak kolom. Dengan penambahan pelarut lebih lanjut melalui kolom, oleh dengan atau tanpa tekanan udara, masing-masing zat bergerak turun dalam kolom dengan kecepatan tertentu, sehingga terjadi pemisahan dan diperoleh kromatogram. Kecepatan bergerak zat dipengaruhi oleh sejumlah variabel, misalnya daya adsorpsi zat penjerap, ukuran partikel dan luas permukaan, sifat dan polaritas pelarut, tekanan yang digunakan dan suhu sistem kromatografi.

### 2.5.2.2 Kromatografi Kolom Partisi

Pada kromatografi partisi, zat yang dipisahkan terbagi antara dua cairan yang tidak saling bercampur. salah satu cairan, yaitu fase diam, umumnya diadsorpsikan pada penyangga padat, karena itu mempunyai area permukaan yang sangat luas terhadap pelarut yang mengalir atau fase gerak. Hal ini menyebabkan diperolehnya pemisahan yang baik yang tidak dapat dicapai dengan cara

penyarian cairan-cairan yang biasa. Kromatografi partisi dilakukan dengan cara yang serupa dengan kromatografi adsorpsi, yaitu campuran yang telah dilarutkan dalam sedikit pelarut, ditambahkan pada permukaan kolom dan eluasi dilakukan dengan pelarut yang mengalir. Selain dilarutkan dalam sedikit pelarut, penyiapan sampel juga dapat dilakukan dengan melarutkan zat uji dengan fase diam dan menambahkan sedikit zat penjerap.

## 2.6 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu simplisia. Pemeriksaan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat bagi kesehatan seperti senyawa alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon.

### 2.6.1 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, serta bereaksi dengan pereaksi alkaloid. Menurut sifatnya alkaloid umumnya berbentuk kristal padat dan sebagian kecil bersifat cair, memutar bidang polarisasi dan terasa pahit (Harborne, 1987).

### 2.6.2 Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun oleh molekul isopren  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit  $\text{C}_5$ . Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang kurang menguap dan yang tidak menguap yaitu triterpen, dan sterol. Biasanya senyawa ini diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform. Saponin dan glikosida

jantung merupakan golongan senyawa triterpen atau steroid yang terdapat dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987).

### 2.6.3 Tanin

Tanin secara kimia dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin kondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer. Tanin dapat diidentifikasi dengan menggunakan cara pengendapan menggunakan larutan gelatin 10%, campuran natrium klorida-gelatin, besi (III) klorida 3%, dan timbal (II) asetat 25% (Harborne, 1987).

### 2.6.4 Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Identifikasi dapat dilakukan dengan mengocok ekstrak dengan air hangat di dalam tabung reaksi dan akan timbul busa yang dapat bertahan lama, setelah penambahan HCl 2 N busa tidak hilang (Harborne, 1987).

### 2.6.5 Glikosida

Berdasarkan atom penghubung glikon dan aglikon, glikosida dibagi atas 4 tipe, yaitu (Farnsworth, 1966):

- a. O-glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom O, contoh : salicin.
- b. S-glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom S, contoh : sinigrin.
- c. N-glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom N, contoh : vicine.
- d. C-glikosida, jika glikon dan aglikon dihubungkan oleh atom C, contoh : aloin.

### 2.6.6 Kuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon, yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon–karbon. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dapat dipilah menjadi empat kelompok : benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama biasanya terhidroklisasi dan bersifat senyawa fenol serta mungkin terdapat *in vivo* dalam bentuk gabungan dengan gula sebagai glikosida atau dalam bentuk kuinol. Untuk memastikan adanya suatu pigmen termasuk kuinon atau bukan, reaksi warna sederhana masih tetap berguna. Reaksi yang khas ialah reduksi bolak balik yang mengubah kuinon menjadi senyawa tanpa warna, kemudian warna kembali lagi bila terjadi oksidasi oleh udara (Harborne, 1987).

### 2.6.7 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam dapat ditemukan dalam bentuk glikosida maupun aglikonnya. Flavonoid mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$  yaitu dua cincin aromatis yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon (Sastrohamidjojo, 1996).

### 2.7 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah setiap molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas memiliki reaktivitas yang sangat tinggi, hal ini ditunjukkan oleh sifatnya yang segera menarik atau menyerang elektron di sekelilingnya. Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari pasangan elektron. Sebagai dampak dari kerja radikal bebas tersebut, akan terbentuk radikal bebas baru yang berasal dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal sebelumnya.

Mekanisme reaksi radikal bebas merupakan suatu deret reaksi-reaksi bertahap. Tahapan mekanisme reaksi tersebut diawali dengan pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir (terminasi), yaitu pemusnahan atau perubahan menjadi radikal bebas stabil dan tak reaktif (Winarsi, 2007).

## 2.8 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan pembentukan oksigen reaktif atau radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil karena tidak memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbital luarnya sehingga sangat reaktif untuk mendapatkan pasangan elektron dengan mengikat sel-sel tubuh. Apabila hal tersebut terjadi secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel (Lautan, 1997).

Stres oksidatif adalah keadaan di mana jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh menetralsirkannya. Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan kerusakan yang lebih banyak. Literatur medis membuktikan bahwa stres oksidatif adalah penyebab utama penuaan dini dan timbulnya penyakit kronis seperti kanker, penyakit jantung dan lain-lain. Stres oksidatif dapat dicegah dan dikurangi dengan asupan antioksidan yang cukup dan optimal ke dalam tubuh.

Sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Senyawa-senyawa yang umumnya terkandung dalam antioksidan alami adalah fenol, flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin, flavonon), alkaloid dan tokoferol. Contoh antioksidan sintetik yaitu *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT) (Winarsi, 2007).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer disebut juga antioksidan endogenus atau enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal,

kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase. Sebagai antioksidan, enzim-enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai, kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil (Winarsi, 2007).

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau nonenzimatis. Antioksidan kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif dimana terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal, atau dirusak pembentukannya. Kerja antioksidan sekunder yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Antioksidan sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, dan flavonoid (Winarsi, 2007).

## 2.9 Uji Aktivitas Antioksidan

Beberapa metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan, antara lain :

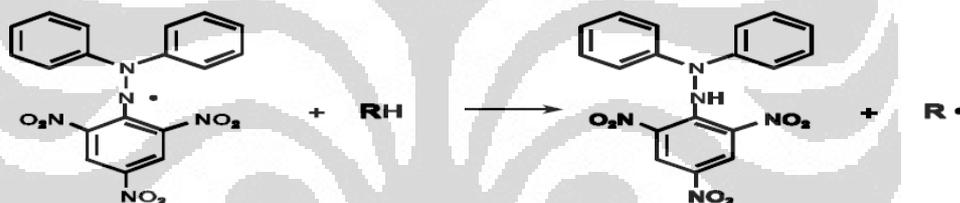
### a. Metode DPPH

Metode yang umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan suatu bahan adalah dengan menggunakan radikal bebas DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl). DPPH adalah radikal bebas yang bersifat stabil dan beraktivitas dengan cara mendelokasi elektron bebas pada suatu molekul, sehingga molekul tersebut tidak reaktif sebagaimana radikal bebas yang lain. Proses delokalisasi ini ditunjukkan dengan adanya warna ungu pekat yang dapat dikarakterisasi pada pita absorbansi (Molyneux, 2004).

Metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl) memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolerasi untuk mengukur kemampuan antioksidan yang secara langsung bereaksi dengan (meredam) radikal DPPH dengan memantau

absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer. Radikal DPPH merupakan radikal bebas dengan pusat nitrogen organik yang stabil berwarna ungu tua yang ketika tereduksi menjadi bentuk nonradikal oleh antioksidan menjadi tidak berwarna (Sashikumar, Maheshu, dan Jayadev, 2009).

Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya untuk berikatan dengan DPPH membentuk DPPH tereduksi, ditandai dengan semakin memudarnya warna ungu. Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian dengan metode DPPH adalah  $IC_{50}$  (*inhibition concentration*).  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50 % (Molyneux, 2004). Berikut reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan.



Gambar.2.9 Reaksi Penangkapan Hidrogen Oleh DPPH dari Zat Antioksidan

#### b. Metode TRAP

Pengujian TRAP atau *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter* bekerja berdasarkan pengukuran konsumsi oksigen selama reaksi oksidasi lipid terkontrol yang diinduksi oleh dekomposisi termal dari AAPH (2,2'-Azobis(2-aminidopropana)hidroklorida) untuk mengukur total aktivitas antioksidan. Hasil uji ini diekspresikan sebagai jumlah (dalam mikromol) radikal peroksil yang terperangkap oleh 1 liter plasma. Pengukuran serum TRAP berdasarkan penentuan lamanya waktu yang diperlukan oleh serum uji untuk dapat bertahan dari oksidasi buatan (Antolovich *et al.*, 2002).

### c. Metode FRAP

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) bekerja berdasarkan reduksi dari analog feroin, kompleks  $\text{Fe}^{3+}$  dari tripiridiltriazin  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$  menjadi kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$  yang berwarna biru intensif oleh antioksidan pada suasana asam. Hasil pengujian diinterpretasikan dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 593 nm dan dapat disimpulkan sebagai jumlah  $\text{Fe}^{2+}$  (dalam mikromolar) ekuivalen dengan antioksidan standar (Antolovich *et al.*, 2002).

### d. Metode Tiosianat

Aktivitas antioksidan sampel dengan metode tiosianat ditunjukkan dengan kekuatan sampel dalam menghambat peroksidasi asam linoleat. Jumlah peroksida yang terbentuk diukur secara tidak langsung dengan pembentukan kompleks ferri tiosianat yang berwarna merah (Mun'im, Azizahwati dan Trastiana, 2008)

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi dan di Laboratorium Taksonomi Hewan Departemen Biologi, FMIPA UI Depok pada bulan Agustus-November 2011.

#### 3.2. Alat

Blender (Waring), penguap putar vakum (Buchi dan Stuart), ultrasonicator (Vollrath), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), penangas air (Imperial IV), bejana KLT, freeze dryer (Scanvac), lampu ultraviolet, peralatan kromatografi kolom vakum, statif, timbangan analitik (Acculab dan Acis), pipet ependorf (Socorex) dan alat-alat gelas.

#### 3.3 Bahan

##### 3.3.1 Bahan Uji

*Ascidia Didemnum* sp. yang dikumpulkan dari Kepulauan Seribu pada bulan September 2011. Sampel dideterminasi oleh Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

##### 3.3.2 Bahan kimia

Metanol p.a (Merck), DPPH (Merck), etil asetat, n-heksan, benzen (Merck, Jerman), aseton, kloroform, asam klorida (Merck, Jerman), natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), asam sulfat (Merck, Jerman), asam asetat anhidrat (Univar, USA), serbuk seng (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman), timbal (II) asetat, serbuk asam borat (Merck, Jerman), serbuk asam oksalat (Merck,

Jerman), besi (III) klorida, natrium klorida (Mallinckrodt Chemicals, USA), gelatin (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Univar, USA).

### 3.3.3 Bahan Pembanding

Kuersetin (Sigma-Aldrich).

## 3.4. Cara Kerja

### 3.4.1 Pengumpulan dan Penyediaan Simplisia

*Ascidia Didemnum* sp. dikoleksi secara bebas dari perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta pada kedalaman 2--5 m dengan cara *snorkeling*. Sampel ascidia diletakkan dalam kantung *zip-lock* di bawah air. Sampel ascidia yang diperoleh direndam dengan metanol dalam botol sampel dari kaca. Tahap selanjutnya ascidia *Didemnum* sp. dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### 3.4.2 Penyiapan Larutan Pereaksi

Penyiapan larutan pereaksi sebagai berikut:

a. Natrium Hidroksida 2 N (DepKes, 1979)

Larutan natrium hidroksida 2 N dibuat dengan menimbang dengan seksama 80,02 g NaOH kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 L.

b. Asam Klorida 2 N (DepKes, 1979)

Larutan asam klorida 2N dibuat dengan menimbang dengan seksama 72,93 g HCl kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 L.

c. Asam Sulfat 2 N (DepKes, 1979)

Larutan Asam sulfat 2N dibuat dengan menimbang dengan seksama 98,08 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kemudian larutkan dalam akuades hingga 1 L.

d. Asam Klorida 10% (DepKes, 1979)

Larutan asam klorida 10% dibuat dengan menimbang dengan seksama 100 mg HCl kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 1 L.

e. Larutan Pereaksi Bouchardat (Depkes RI, 1995)

Larutan pereaksi Bouchardat dibuat dari campuran iodium dan kalium iodida. Sebanyak 2 g iodium P dan 4 g kalium iodida P dilarutkan dalam 100 mL aquades.

f. Larutan Pereaksi Mayer (Depkes RI, 1995)

Pereaksi Mayer dibuat dari campuran larutan raksa (II) klorida P 2,266% b/v dan kalium iodida P 50% b/v. Larutan raksa (II) klorida dibuat dengan cara 1,3596 g raksa (II) klorida P dilarutkan dalam 60 ml aquades dan larutan kalium iodida dibuat dengan cara 5 g kalium iodida P dilarutkan dalam 10 mL aquades. Kedua larutan dicampur dan dicukupkan dengan aquades hingga 100 mL.

g. Larutan Pereaksi Dragendorf (Depkes RI, 1995)

Pereaksi Dragendorf dibuat dari campuran bismuth nitrat P 40% b/v dalam asam nitrat dan kalium iodida P 54,4% b/v . Larutan bismuth nitrat dibuat dengan cara 8 g bismuth nitrat P dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat dan larutan kalium iodida dibuat dengan cara 27,2 g kalium iodida P dilarutkan dalam 50 mL aquades. Kedua larutan dicampur, dan didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan dengan aquades hingga 100 mL.

h. Larutan Pereaksi Molish (Depkes RI, 1995)

Pereaksi Molish merupakan larutan  $\alpha$ -naftol P 3% b/v dalam asam nitrat 0,5 N. Pembuatan dilakukan dengan cara 1,5 g  $\alpha$ -naftol P dilarutkan dalam 50 mL asam nitrat 0,5 N.

i. Larutan Pereaksi Brom ((DepKes RI, 1979)

Pereaksi Brom dibuat dengan cara sebanyak 9,6 mL brom P dan 30 mL kalium bromida, dilarutkan dalam 100 mL aquades.

### 3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Pertama-tama sampel ascidia *Didemnum* sp. dikeluarkan dari botol sampel menggunakan pinset kemudian ditiriskan, selanjutnya sampel dihaluskan menggunakan mesin penggiling untuk laboratorium (*laboratory blender*), sampel ascidia *Didemnum* sp. ditimbang seberat 1110 gram sebagai massa basah, kemudian sampel tersebut dibagi menjadi 4 bagian, masing-masing seberat  $\pm 250$

gram, setiap bagian dimasukkan ke dalam beaker glass ukuran 1000 mL, selanjutnya dicampurkan dengan metanol sebanyak 500 mL. Sampel yang telah dicampur metanol diaduk hingga homogen dengan bantuan *ultrasonicator* selama 1--2 jam dan dimaserasi selama tiga hari kemudian disaring. Maserasi dan penyaringan tersebut dilakukan berulang-ulang sampai filtrat dari berwarna menjadi tidak berwarna. Kemudian filtrat dievaporasi untuk menguapkan metanol menggunakan *rotary evaporator* (Gambar 3.4.3(1)) pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental yang masih dapat dituang, selanjutnya ekstrak diuapkan kembali dengan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang untuk mengetahui rendemen yang dihasilkan. Skema ekstraksi dan fraksinasi sampel ascidia *Didemnum* sp. dapat dilihat pada Gambar 3.4.3(2).

#### 3.4.4 Fraksinasi Ekstrak

##### 3.4.4.1 Fraksinasi dengan n-Heksan

Ekstrak metanol seberat 50 gram ditambahkan dalam 200 mL air dan dihomogenkan. Ekstraksi cair-cair dilakukan dengan menggunakan corong pisah dengan n-heksan pada volume yang sama dengan jumlah air sehingga terbentuk dua lapisan. Cairan dikocok perlahan, kemudian lapisan n-heksan dikumpulkan. Ekstraksi diulang hingga lapisan n-heksan tidak berwarna. Masing-masing lapisan digabungkan dan diperoleh dua gabungan lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan n-heksan. Kemudian lapisan n-heksan diuapkan dengan menggunakan penangas air, yang selanjutnya disebut sebagai fraksi n-heksan.

##### 3.4.4.2 Fraksinasi dengan Etil asetat

Terhadap lapisan air yang diperoleh pada cara (3.4.4.1) ditambahkan etil asetat yang sama jumlahnya dengan lapisan air sehingga terbentuk dua lapisan. Cairan dikocok perlahan, kemudian lapisan etil asetat dikumpulkan. Ekstraksi diulang hingga lapisan etil tidak berwarna. Masing-masing lapisan digabungkan dan diperoleh dua gabungan lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan etil asetat.

Kemudian lapisan etil asetat diuapkan dengan menggunakan penangas air, yang selanjutnya disebut sebagai fraksi etil asetat.

#### 3.4.4.3 Memperoleh Fraksi Air

Lapisan air yang diperoleh pada cara (3.4.4.2) dikentalkan dengan menggunakan *freeze dryer* (Gambar 3.4.4.3), dan selanjutnya disebut sebagai fraksi air.

#### 3.4.5 Identifikasi Senyawa Antioksidan

Sejumlah 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL pelarut yang digunakan pada ekstraksi sebelumnya, lalu ditotolkan sebanyak 20  $\mu$ L pada lempeng KLT F<sub>254</sub> dengan menggunakan pipa kapiler. Setelah totolan kering, lempeng silika disemprot dengan larutan DPPH. Lempeng dibiarkan beberapa menit kemudian diamati bercak pada lempeng. Hasil positif berupa zona kuning dengan latar belakang ungu.

#### 3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (Blois, 1958)

Pada masing-masing ekstrak diuji aktivitas antioksidan dengan metode Blois. Nilai IC<sub>50</sub> dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi.

##### 3.4.6.1 Pembuatan Larutan DPPH

Sejumlah 10 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a didapatkan konsentrasi DPPH 100  $\mu$ g/mL.

##### 3.4.6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH yang telah dibuat dengan konsentrasi 100  $\mu$ g/mL spektrum serapannya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

(Gambar 3.4.6.2) pada panjang gelombang 400 nm hingga 700 nm. Ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

#### 3.4.6.3 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah 3,0 mL metanol p.a dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1,0 mL DPPH dikocok hingga homogen. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit. dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm, kemudian dicatat serapannya.

#### 3.4.6.4 Persiapan Larutan Uji

- a. Pembuatan larutan induk (konsentrasi 1000 µg/mL)  
Sejumlah 10 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a hingga homogen.
- b. Pembuatan larutan seri (konsentrasi 25, 100, 150, dan 200 µg/mL)  
Dipipet masing-masing 0,25; 1,0; 1,5; dan 2,0 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya dengan metanol p.a hingga 10 mL.
- c. Pengujian  
Dari masing-masing larutan uji dipipet 1,0 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 mL DPPH 100 µg/mL lalu ditambahkan 2,0 mL metanol dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm, kemudian dicatat serapannya.

#### 3.4.6.5 Pembuatan Larutan Kuersetin sebagai Pembanding

- a. Pembuatan larutan induk (konsentrasi 1000 µg/mL)  
Masing-masing pembanding ditimbang 10 mg zat dan dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a hingga homogen.

b. Pembuatan larutan seri (konsentrasi 1, 2, 4, dan 5 µg/mL)

Dipipet masing-masing 0,01; 0,02; 0,04; dan 0,05 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya dengan metanol p.a hingga 10 mL.

c. Pengujian

Dari masing-masing larutan uji dipipet 1,0 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 mL DPPH 100 µg/mL lalu ditambahkan 2,0 mL metanol dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm, kemudian dicatat serapannya.

#### 3.4.6.6 Penghitungan Nilai IC<sub>50</sub>

Nilai IC<sub>50</sub> dihitung berdasarkan presentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blangko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorban Blangko}} \times 100 \%$$

Setelah didapatkan presentasi inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan  $y = a + bx$  dengan perhitungan secara regresi linear dimana  $x$  adalah konsentrasi (µg/mL) dan  $y$  adalah presentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration 50%*. (IC<sub>50</sub>) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dari nilai  $x$  setelah mengganti  $y = 50$ . Dari persamaan  $y = a + bx$  dapat dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan rumus:

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

### 3.4.7 Pemisahan Fraksi Paling Aktif dengan Kromotografi Kolom Dipercepat

Pemisahan dilakukan terhadap fraksi dengan  $IC_{50}$  terendah, yaitu fraksi etil asetat. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 H Merck sebanyak 100 g dan fase gerak yang digunakan adalah pelarut teknis terdestilasi mulai dari n-heksan 100%, campuran heksan-etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 35:65; 60:40; 35:65; 30:70; 25:75; 20:80; 15:85; 10:90; 5:95, etil asetat 100%, campuran etil asetat-metanol 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 35:65; 60:40; 35:65; 30:70; 25:75; 20:80; 15:85; 10:90; 5:95, dan metanol 100% masing-masing sebanyak 100 ml.

Preparasi sampel dilakukan dengan cara kering. Sebanyak 2,5 g fraksi etil asetat dilarutkan dalam beberapa ml etil asetat kemudian ditambahkan sedikit silika gel. Selanjutnya sampel dan silika gel diaduk sampai homogen dan pelarut dibiarkan menguap pada suhu kamar hingga diperoleh serbuk kering.

Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom, kolom dikemas dengan cara kering, silika gel dituangkan kedalam kolom berdiameter 3 cm dan panjang 15 cm sedikit demi sedikit. Selama proses pengisian, kolom diketuk-ketuk pada semua sisi secara perlahan-lahan agar diperoleh lapisan yang seragam. Ketinggian fase diam adalah kurang lebih  $\frac{3}{5}$  tinggi kolom. Kolom dihubungkan dengan pompa vakum dan vakum dijalankan beberapa saat sehingga fase diam lebih padat. Kemudian dituangkan n-heksan untuk membasahi kolom. Setelah adsorben terbasahi seluruhnya dan telah homogen, n-heksan dikeluarkan hingga permukaan pelarut tepat sedikit diatas permukaan fase diam. Selanjutnya sampel dituang sambil diratakan. Setelah itu eluen dialirkan dan masing-masing fraksi yang diperoleh ditampung.

Pada semua fraksi yang diperoleh yaitu 41 fraksi dilakukan KLT dan fraksi-fraksi yang memiliki pola kromotogram yang sama disatukan sehingga diperoleh 9 fraksi gabungan. Fraksi-fraksi yang telah disatukan tersebut, lalu dilakukan uji aktifitas antioksidan untuk mengetahui fraksi yang paling aktif.

### 3.4.8 Identifikasi Golongan Kimia dari Fraksi Teraktif

Pada fraksi teraktif yang diperoleh dilakukan pemeriksaan kandungan kimia dengan beberapa pereaksi kimia antara lain untuk pereaksi alkaloid, glikosida, saponin, flavonoid, tanin, antrakuinon, dan steroid/triterpenoid.

#### 3.4.8.1 Identifikasi Alkaloid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dengan 9 ml air suling dan 1 ml HCL 2N, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, lalu didinginkan. Selanjutnya disaring dan filtrat digunakan sebagai larutan percobaan yang akan digunakan dalam pengujian berikut :

- a. 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes Bouchardat LP. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat hitam.
- b. 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes Mayer LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning yang larut dalam metanol P.
- c. 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes Dragendorf LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga coklat.

#### 3.4.8.2 Identifikasi Glikosida (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak ditambah dengan 15 mL HCl 10%. Selanjutnya dipanaskan hingga mendidih, didinginkan kemudian disaring. Filtrat dicuci dengan 10 mL eter dilakukan sebanyak 3 kali. Kemudian filtrat dikumpulkan dan diuapkan, ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring dan diuapkan pada suhu 50 °C. Sisa ditambahkan 2 mL metanol P. Larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

- a. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya ditambahkan 5 ml asam asetat anhidrat P dan 10 tetes asam sulfat P. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna biru atau hijau.
- b. Larutan percobaan sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dengan 2 mL air dan 5 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan 2 mL

asam sulfat P dengan hati-hati. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (Reaksi Molisch).

#### 3.4.8.3 Identifikasi Saponin (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air suling panas, didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang.

#### 3.4.8.4 Identifikasi Flavonoid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995)

Sejumlah 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml etanol 96% kemudian dilakukan percobaan sebagai berikut:

- a. Sebanyak 2 ml larutan ekstrak ditambahkan 0,5 gram serbuk seng, kemudian ditambahkan 2 ml HCl 2N, didiamkan 1 menit. Setelah itu ditambahkan 10 tetes HCl pekat, dikocok perlahan, kemudian didiamkan 2-5 menit. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah intensif.
- b. Sebanyak 2 ml larutan ekstrak ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat, dikocok perlahan. Terbentuk warna merah jingga hingga merah ungu yang menunjukkan positif adanya flavonoid. Jika terjadi warna kuning jingga, menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.
- c. Sebanyak 1 ml larutan ekstrak dilarutkan dengan aseton. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk asam borat dan asam oksalat, panaskan hati-hati. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 10 ml eter. Perubahan warna diamati dengan sinar ultraviolet 366 nm. Larutan akan berfluoresensi kuning intensif yang menunjukkan positif flavonoid.

#### 3.4.8.5 Identifikasi Tanin (Farnsworth, 1966)

Sejumlah 50 mg ekstrak ditambahkan dengan 50 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak masing-masing 1 mL dikerjakan sebagai berikut :

- a. Ditambahkan 3 mL larutan gelatin 10% dan diperhatikan adanya endapan.
- b. Ditambahkan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  3% dan diperhatikan terjadinya perubahan warna menjadi hijau violet.
- c. Ditambahkan 3 mL larutan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) dan diperhatikan adanya endapan.

#### 3.4.8.6 Identifikasi Antrakuinon (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995)

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2 N, dipanaskan sebentar kemudian didinginkan. Ditambahkan 10 mL benzen P, dikocok dan didiamkan, kemudian lapisan benzen dipisahkan. Filtrat yang berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Lapisan benzene dikocok dengan 1 mL sampai 2 mL natrium hidroksida 2 N, didiamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna menunjukkan adanya antrakinon.

#### 3.4.8.7 Identifikasi Fenol (DepKes RI, 1979)

Sebanyak 20 mg ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air, diaduk, kemudian ditambahkan 2 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna violet.

Sebanyak 20 mg ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air, kemudian disaring. Ditambahkan Brom LP, hasil positif ditandai oleh terbentuknya endapan putih yang segera larut dan mengendap kembali jika ditambahkan pereaksi berlebih.

#### 3.4.8.8 Identifikasi Steroid/Triterpenoid (Farnsworth, 1966)

Sebanyak 50 mg ekstrak ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah-hijau atau violet-biru.

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Penyediaan Bahan

Hasil pengamatan saat pengambilan sampel menunjukkan bahwa sampel sebagian besar hidup di atas substrat berupa terumbu karang dan tiang beton. Sampel yang dikoleksi pada penelitian ini, yang hidup di atas substrat terumbu karang. Sampel yang berhasil dikoleksi memiliki berat basah total sebesar 1110 gram.

Hasil determinasi hewan laut yang dilakukan di Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, FMIPA UI, menunjukkan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ascidia Didemnum* sp. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 4.2 Pembuatan Ekstrak *Ascidia Didemnum* sp.

Pada penelitian ini langkah awal yang dilakukan adalah pembuatan ekstrak. Metode ekstraksi yang digunakan untuk memperoleh ekstrak adalah maserasi karena ekstraksi cara dingin ini dapat mencegah terurainya metabolit yang tidak tahan pemanasan. Lamanya waktu proses ekstraksi akan mempengaruhi jumlah kandungan senyawa yang tersari, oleh karena itu maserasi dilakukan selama tiga hari agar proses ekstraksi benar-benar berlangsung secara optimal. Ekstraksi dilakukan sebanyak tujuh kali, hingga filtrat tidak berwarna.

Massa basah sampel *Ascidia Didemnum* sp. yang digunakan pada penelitian ini adalah 1110 gram. Penguapan ekstrak menggunakan penguap putar vakum pada temperature  $\leq 40$  °C . Ini bertujuan agar senyawa yang terkandung dalam ekstrak tidak rusak karena kondisi yang dibuat vakum memungkinkan pelarut dapat menguap pada suhu rendah. Selain itu, pelarut yang menguap dapat ditampung dan digunakan kembali untuk maserasi berikutnya.

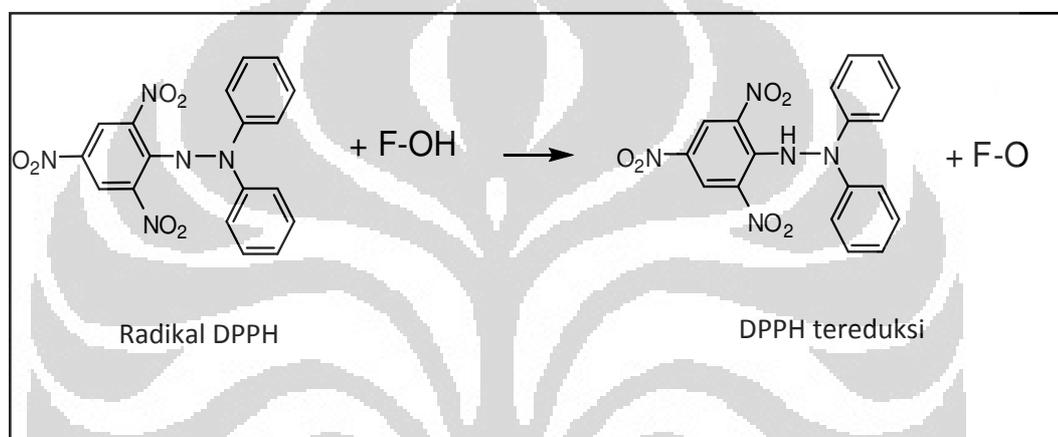
Ekstrak yang diperoleh dari hasil penguapan dengan menggunakan penguap putar vakum diuapkan kembali dengan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Dari hasil ekstraksi metanol ini, diperoleh ekstrak yang berbau amis dan berwarna hijau pekat (Gambar 4.2). Ekstrak metanol ascidia *Didemnum* sp. yang diperoleh dari 1110 g sampel adalah sebesar 50,394 gram yang setara dengan 4,72%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.2. Persentase tersebut termasuk dalam kisaran rata-rata nilai persentase ekstrak kasar ascidia secara umum. Menurut Schupp (2000: 71) persentase ekstrak ascidia berada pada kisaran 1,5--15 %. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengukuran kadar air, seharusnya dilakukan terlebih dahulu pengukuran kadar air, karena sampel yang digunakan adalah sampel basah. Untuk penelitian selanjutnya perlu diperhatikan untuk dilakukan pengukuran kadar air sehingga dapat diketahui kadar air yang terdapat dalam sampel.

#### 4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Ascidia *Didemnum* sp. dengan Metode DPPH (Blois, 1958)

Pada tahap awal dilakukan identifikasi senyawa antioksidan terhadap ekstrak metanol secara KLT. Identifikasi ini menunjukkan hasil positif, yaitu bercak berwarna kuning dengan latar belakang ungu (Gambar 4.3(1)). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap 10 mg ekstrak metanol ascidia *Didemnum* sp. Uji dilakukan dengan membuat seri konsentrasi larutan sebesar 25, 100, 150, dan 200  $\mu\text{g/ml}$ . Dari hasil pengujian diperoleh nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak metanol Ascidia *Didemnum* sp. sebesar 105,1029  $\mu\text{g/ml}$ . Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat, karena mempunyai nilai  $\text{IC}_{50}$  kurang dari 200  $\mu\text{g/ml}$  (Blois, 1958). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Hanani, Mun'im dan Sekarini (2005) terhadap ekstrak spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu yaitu diperoleh nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 41,21  $\mu\text{g/ml}$ ; aktivitas antioksidan ekstrak Ascidia *Didemnum* sp. ini masih berada dibawahnya.

Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan yaitu berupa donasi proton kepada radikal (Gambar 4.3(2)). Donasi proton menyebabkan

radikal DPPH berwarna ungu menjadi senyawa non-radikal yang akan kehilangan warna ungunya yang mana pemudaran warna ini dapat ditunjukkan dengan penurunan serapan dari DPPH pada panjang gelombang maksimumnya yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran penurunan serapan DPPH pada larutan uji dihitung terhadap serapan blanko yakni larutan DPPH dan pelarut tanpa sampel. Senyawa DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan melalui pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron (Pokorni, 2001).



Gambar 4.3(2) Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan berupa donasi proton

[Sumber: Mun'im, Azizahwati dan Trastiana, 2008]

#### 4.4 Fraksinasi Ekstrak *Ascidia Didemnum sp.* dengan n-heksan, Etil asetat, dan Air

Metanol memiliki daya mengekstraksi senyawa dengan rentang kepolaran yang cukup luas dan dapat melarutkan berbagai senyawa. Oleh karena itu, untuk mempersempit lingkup analisis, maka ekstrak metanol difraksinasi dengan pelarut non-polar sampai yang paling polar yaitu n-heksan, etil asetat, dan air.

Ekstrak metanol yang diperoleh dari ekstraksi seberat 50,394 gram, namun pada proses fraksinasi digunakan ekstrak seberat 50 gram, hal ini dikarenakan sisa ekstrak tersebut digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan dan sebagian disimpan untuk persediaan apabila suatu saat ekstrak tersebut dibutuhkan. Kemudian ekstrak ditambahkan dalam 200 ml air dan dimasukkan ke dalam corong pisah untuk diekstraksi cair-cair berturut-turut dengan n-heksan dan etil asetat. Pemisahan secara ekstraksi cair-cair ini dilakukan sampai lapisan n-heksan dan etil asetat tidak berwarna. Pada n-heksan, fraksinasi dilakukan sebanyak delapan kali sementara etil asetat sebanyak sepuluh kali. Fraksi air yang diperoleh memiliki jumlah rendeman paling besar yaitu 43,3154 g ( 86,63%), dibandingkan dengan fraksi n-heksan 1,8802 g (3,76%) dan etil asetat 3,3347 g (6,67%). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.4(1)-4.4(3) dan Tabel 4.4.

#### 4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-heksan, Etil asetat dan Air dengan Metode DPPH

Setiap ekstrak kental yang diperoleh, dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Identifikasi senyawa antioksidan setiap ekstrak menunjukkan hasil positif yaitu bercak berwarna kuning dengan latar belakang ungu (Gambar 4.5). Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan. Larutan uji dibuat dengan seri konsentrasi yang sama dengan seri konsentrasi pada pengujian ekstrak metanol, yaitu 25, 100, 150, dan 200  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil uji memperlihatkan bahwa fraksi etil asetat adalah fraksi yang paling aktif karena memberikan  $\text{IC}_{50}$  paling kecil yaitu 90,804  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan nilai  $\text{IC}_{50}$  fraksi n-heksan yaitu 109,3435  $\mu\text{g/ml}$  dan fraksi air yaitu 95,0997  $\mu\text{g/ml}$ . Dari hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat, karena mempunyai nilai  $\text{IC}_{50}$  kurang dari 200  $\mu\text{g/ml}$  (Blois, 1958). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.5(1)-4.5(3).

#### 4.6 Pemisahan Fraksi Etil Asetat dengan Kromotografi Kolom Dipercepat

Dari hasil pengujian aktivitas antioksidan, fraksi etil asetat yang memiliki aktivitas tertinggi, sehingga fraksi etil asetat yang dipilih untuk diteliti lebih lanjut. Pemisahan kandungan kimia dilakukan untuk mendapatkan fraksi yang lebih murni. Kromotografi kolom yang digunakan pada penelitian ini adalah kromotografi kolom dipercepat. Tidak seperti kolom konvensional yang menggunakan gaya gravitasi sebagai tenaga penggerak eluen, kromotografi kolom dipercepat menggunakan bantuan vakum untuk menggerakkan eluen.

Preparasi sampel menggunakan cara kering. Pengemasan kolom juga dilakukan dengan cara kering. Pengemasan kolom memegang peranan penting pada proses pemisahan. Kolom harus dapat dipastikan benar-benar mampat dan tidak ada udara yang terperangkap di dalamnya karena udara yang terperangkap dapat menyebabkan kolom tidak homogen sehingga menghasilkan pemisahan yang tidak bagus.

Fase gerak yang digunakan adalah pelarut teknis terdestilasi mulai dari n-heksan 100%, campuran heksan-etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 35:65; 60:40; 35:65; 30:70; 25:75; 20:80; 15:85; 10:90; 5:95, etil asetat 100%, campuran etil asetat-metanol 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 35:65; 60:40; 35:65; 30:70; 25:75; 20:80; 15:85; 10:90; 5:95, dan metanol 100% masing-masing sebanyak 100 ml (Tabel 4.6). Fase gerak campuran dengan berbagai perbandingan memungkinkan pemisahan senyawa pada rentang kepolaran yang bervariasi. Eluasi dilakukan dengan fase gerak yang dinaikkan kepolarannya secara gradien. Dari hasil pemisahan dengan kromotografi kolom dipercepat diperoleh 41 fraksi dengan tiap fraksi tampungan sebanyak 100 mL.

Fraksi-fraksi hasil kromotografi kolom dipercepat dieluasi dengan sistem pengembang campuran heksan-etil asetat dan etil asetat-metanol (7:3,v/v) menggunakan lempeng KLT F<sub>254</sub> untuk memperoleh fraksi gabungan. Pemilihan eluen ini didasarkan orientasi yang telah dilakukan sebelumnya.

Hasil KLT ini merupakan dasar untuk melakukan penggabungan fraksi-fraksi. Fraksi yang memiliki bercak yang sama digabungkan karena dianggap

memiliki kandungan kimia yang hampir sama. Dari 41 fraksi hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dipercepat diperoleh 9 fraksi gabungan. Fraksi 1-6 digabung menjadi fraksi I, fraksi 7 menjadi fraksi II, fraksi 8-12 digabung menjadi fraksi III, fraksi 13-17 digabung menjadi fraksi IV, fraksi 18-20 digabung menjadi fraksi V, fraksi 21-25 digabung menjadi fraksi VI, fraksi 26-28 digabung menjadi fraksi VII, fraksi 29-32 digabung menjadi fraksi VIII dan fraksi 33-41 digabung menjadi fraksi IX (Gambar 4.6). Fraksi I-IX masing-masing menghasilkan berat 170,1; 82,0; 257,6; 218,2; 270,0; 486,9; 210,0; 260,3 dan 507,9 mg. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6.

#### 4.7 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi I-IX dengan Metode DPPH

Identifikasi senyawa antioksidan terhadap fraksi I-IX menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya bercak kuning dengan latar belakang ungu setelah disemprot DPPH (Gambar 4.7). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap fraksi I-IX. Uji DPPH dari tiap fraksi memperlihatkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi dimiliki oleh fraksi VI dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 86,3507  $\mu\text{g/ml}$  kemudian diikuti oleh fraksi IX sebesar 103,5269  $\mu\text{g/ml}$ ; fraksi VIII sebesar 104,17  $\mu\text{g/ml}$ ; fraksi VII sebesar 104,8748  $\mu\text{g/ml}$ ; fraksi III 115,1258  $\mu\text{g/ml}$ ; fraksi V sebesar 117,6768  $\mu\text{g/ml}$ ; fraksi II sebesar 210,0203  $\mu\text{g/ml}$ ; fraksi IV sebesar 229,0921  $\mu\text{g/ml}$  dan fraksi I sebesar 312,0034  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7(1)-4.7(9).

Dari hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap 9 fraksi tersebut diketahui bahwa sebanyak 6 fraksi yaitu fraksi III, V, VI, VII, VIII dan IX yang memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari 200  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan 3 fraksi lainnya yaitu fraksi I, II, dan IV memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih besar dari 200  $\mu\text{g/ml}$ . Nilai  $IC_{50}$  yang besar pada fraksi I, II dan IV mungkin dikarenakan kadar senyawa antioksidan yang kecil pada fraksi tersebut.

Sebagai pembanding positif digunakan kuersetin. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa kekuatan antioksidan dari fraksi VI masih dibawah kuersetin sebagai pembanding yang menunjukkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1,6599  $\mu\text{g/ml}$ . Hal tersebut disebabkan karena kuersetin adalah zat yang sudah

murni dibandingkan dengan fraksi yang didapat. Hasil pengujian aktivitas antioksidan kuersetin selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7(10).

#### 4.8 Identifikasi Golongan Senyawa Fraksi Teraktif

Fraksi gabungan paling aktif, yaitu fraksi VI dilakukan identifikasi golongan senyawa kimia dengan berbagai pereaksi kimia. Dari hasil pemeriksaan golongan senyawa diperoleh hasil bahwa fraksi teraktif mengandung senyawa golongan alkaloid, steroid/triterpenoid, saponin dan glikosida. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Krishnaiah *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa alkaloid Lamellarin (lamellarin  $\gamma$  dan I) yang diisolasi dari ascidia *Didemnum obscurum* dari India merupakan senyawa yang sangat berpotensi sebagai antioksidan. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Hanani, Mun'im dan Sekarini (2005) terhadap ekstrak spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu juga menunjukkan bahwa senyawa yang berkhasiat sebagai antioksidan termasuk golongan alkaloid. Senyawa-senyawa yang memungkinkan mendonasikan protonnya memiliki aktivitas penangkapan radikal cukup kuat. Senyawa tersebut adalah golongan fenol, flavonoid, tanin dan alkaloid (Mun'im, Azizahwati dan Trastiana, 2008). Hasil pemeriksaan selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.8

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian terhadap ekstrak metanol *Ascidia Didemnum sp.* dapat disimpulkan sebagai berikut :

- a. Ekstrak metanol ascidia *Didemnum sp.* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 105,1029  $\mu\text{g/mL}$ .
- b. Fraksinasi ekstrak ascidia *Didemnum sp.* diperoleh fraksi etil asetat sebagai fraksi yang paling aktif dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 90,804  $\mu\text{g/mL}$ .
- c. Fraksinasi lebih lanjut dari fraksi etil asetat dengan kromatografi kolom dipercepat, diperoleh fraksi VI memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 86,3507  $\mu\text{g/mL}$ .
- d. Fraksi teraktif mengandung senyawa alkaloid, steroid/triterpenoid, saponin dan glikosida.

#### 5.2 Saran

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis dan komposisi eluen yang terbaik agar diperoleh hasil pemisahan yang bagus.
- b. Perlu dilakukan pemisahan senyawa lebih lanjut untuk memperoleh senyawa yang lebih murni.

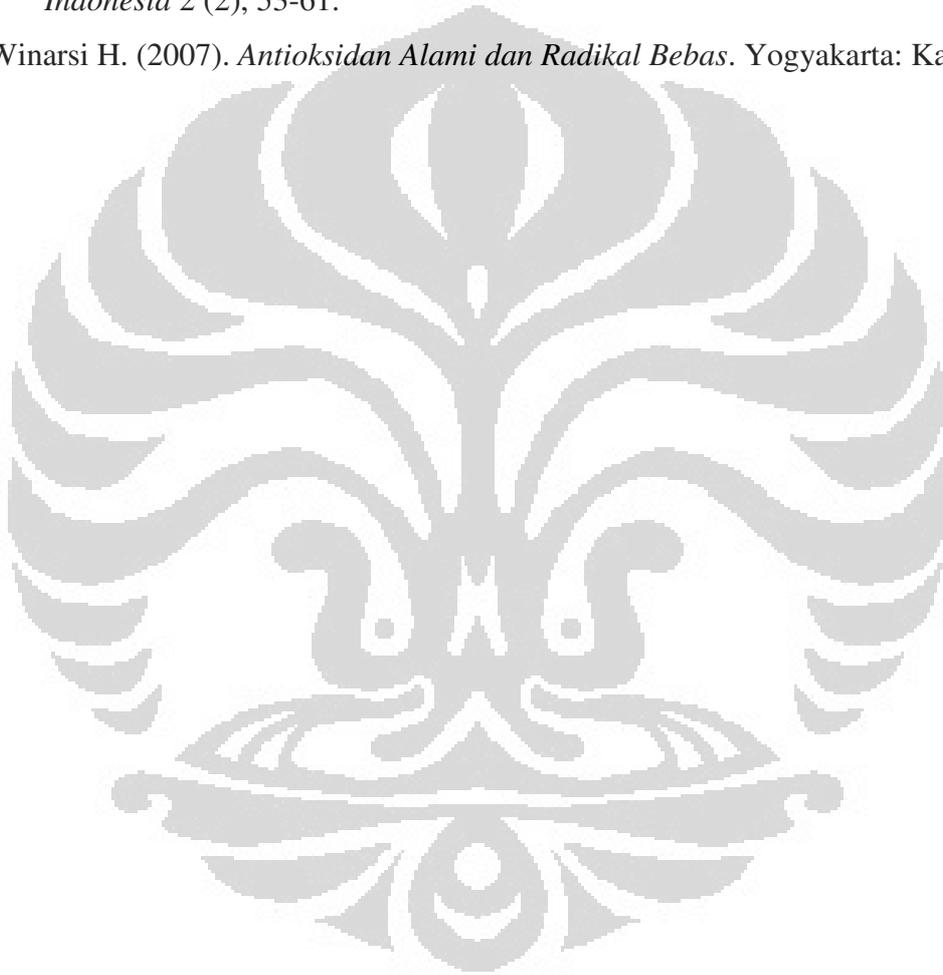
## DAFTAR ACUAN

- Allen, G. R., dan R. Steene. (2002). Indo-Pacific coral reef field guide. *Tropical Reef Research*, Singapura: v + 378 hlm.
- Antolovich et al. (2002). Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*, 127, 183-198
- Blois, MS. (1958). *Antioxidant Determinations By The Use Of A Stable Free Radical* Nature, 181, 1199- 1200.
- Boer, Y. (2000). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq), *Jurnal Matematika dan IPA I*, (1), 26-33.
- Boyer, M. (2006). Urn ascidia. 1 hlm. [http://www.seadb.net/en\\_Urn-ascidia-Didemnu\\_molle\\_265.htm](http://www.seadb.net/en_Urn-ascidia-Didemnu_molle_265.htm), 16 Agustus 2011, pk. 19.37.
- Cahyana A. H. (1991). Pyropheophytin-a as an Antioxidative Substance from The Marine Algae (*Eienia bycyclis*). *J. Biosa. Biotech. Biochem*, 56 (10), 1533-1535.
- Cohen, A. N. (2005). Guide to the exotic species of San Francisco Bay. 7 Juni: 4 hlm. [http://www.sfu.ca/bisc/bisc-842/michael/web\\_page/antifeed.htm](http://www.sfu.ca/bisc/bisc-842/michael/web_page/antifeed.htm), 16 Agustus 2011, pk. 19.40.
- Cowan, M. E. (1981). Field observations of colony movement and division of the ascidia *Didemnum molle*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6, 335--337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia* (Ed. ke-3). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Donia, M. S., et al. (2008). Mollamides b and c, cyclic hexapeptides from the Indonesian tunicate *Didemnum molle*. *J. Nat. Prod*, 71(6), 941--945.
- Farnsworth, N.R (1966). Biological and Phitochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55, 3, 226-227.

- Gritter, R. J., Bobbit, J. M., Schwarting A.E. (1985). *Pengantar kromotografi. Terj. Dari introduction to chromatography* (Padmawinata K., Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Harborne JB. (1987). *Metode fitokimia*. Edisi kedua. (Padmawinata K, Soediro I, Penerjemah). Bandung: ITB.
- Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini R. (2005). Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2 (3), 127-133.
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Jacob, R. A, and Burri. (1996). Oxidative Damage and Defense. *Food Chem*, 84, 23-28
- Kijjoa, Anake, dan Sawangwong, Pichan. (2004). Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, Vol. 2, 73 -82
- Krishnaiah, P., et al. (2004). New lamellarin alkaloids from the Indian ascidian *Didemnum obscurum* and their antioxidant properties. *J. Nat. Prod*, 67, 1168-1171.
- Lautan, J. (1997). Radikal Bebas Pada Eritrosit dan Leukosit, *Cermin Dunia Kedokteran*. (116), 49-52.
- Maulida, E. (2011). *Uji Antifeedant Ekstrak Kasar Ascidia Didemnum sp. Terhadap Ikan Karang di Perairan Pulau Pramuka Kepulauan Seribu DKI Jakarta*. Skripsi Sarjana S1 Biologi FMIPA Universitas Indonesia.
- Midleton, E., Kandaswami., Theoharis. (2000). The Effect of Plant Flavonoids on Mamalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease & Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52 (4), 711-722
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radicals diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science Technology*, 26(2), 211-219.
- Moosa M.K. (1999). *Sumber Daya Laut Nusantara : Keanekaragaman Hayati Laut dan Pelestariannya*. Pusat penelitian dan pengembangan Oseonologi. LIPI. Jakarta.

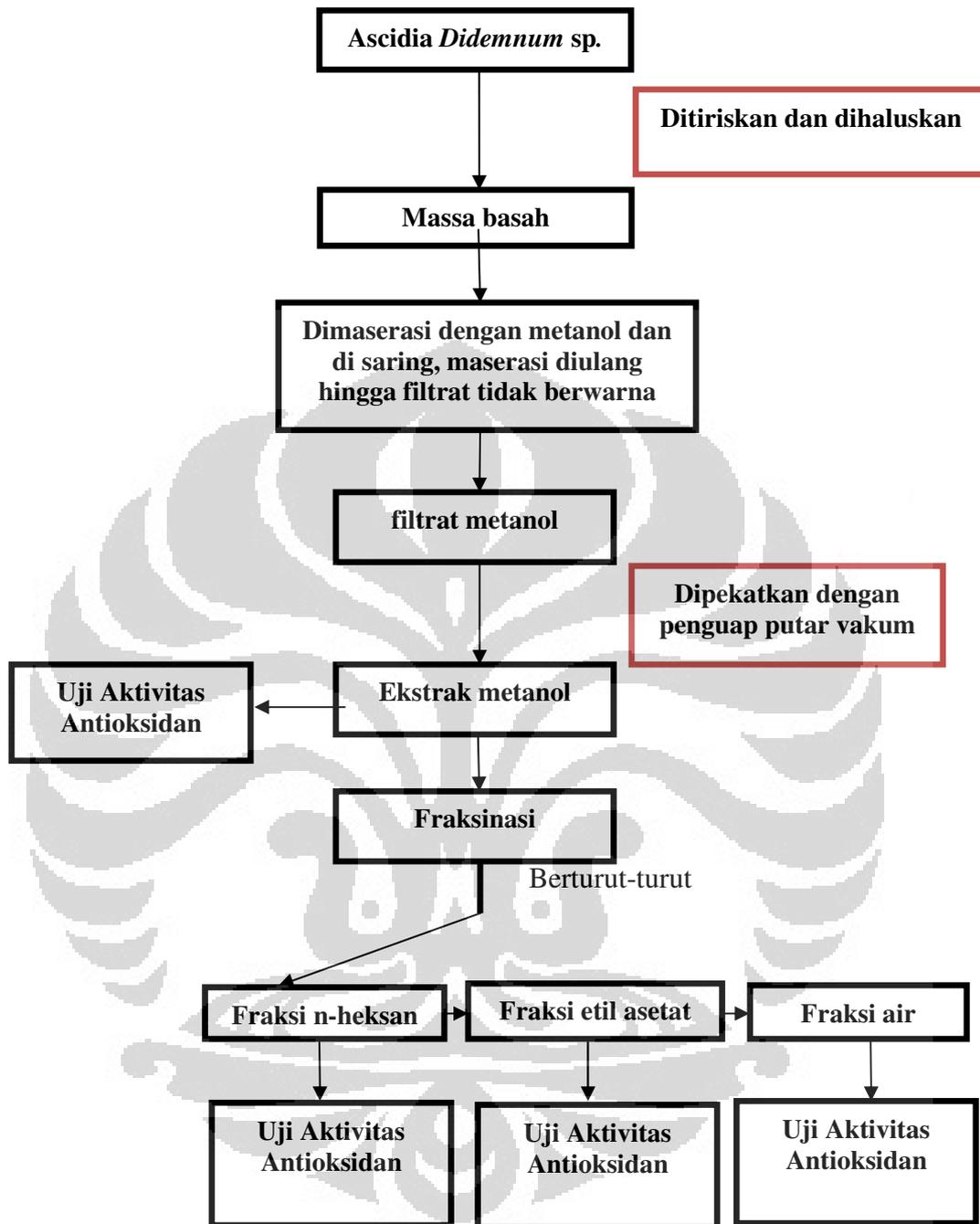
- Mun'im, A., Azizahwati, Trastiana. (2008). Aktivitas Antioksidan Cendawan Suku Pleurotaceae dan Polyporaceae dari Hutan UI. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5 (1), 36-41.
- Murugan, A. dan M. S. Ramasamy. (2003). Biofouling deterrent activity of the natural product from ascidia, *Distaplia nathensis* [Chordata]. *Indian J. Mar. Sci.* 32(2): 162--164.
- Olson, R. R. (1986). Light-enhanced growth of the ascidia *Didemnum molle/Prochloron* sp. symbiosis. *Mar. Biol.* 93, 437--442.
- Packer, L.M., Hiramatsu, T. dan Yoshikawa. (1999). *Antioxidant Food Supplement in Human Health*, Academic Press.
- Pokorni, (2001). *Antioxidant in Food; Practical Applications*, CRC Press, New York
- Pratiwi, Dewi P, Harapini M. (2006). Nilai peroksida dan aktivitas anti radikal bebas diphenyl picril hydrazil hydrate (DPPH) ekstrak methanol *Knema laurina*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 17(1), 32-36.
- Rasyid, Abdullah. (2008). *Biota Laut Sebagai sumber Obat-obatan*. Oseana, 33 (1), 11-18.
- Rohdiana, D. (2001). Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol Dalam Daun Teh, *Majalah Jurnal Indonesia*, 12(1), 53-58.
- Sasikumar, J. M., Maheshu, V., Jayadev, R. (2009). In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of *Berberis Tinctoria* Lesch. Root and Root Bark. India. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 3(2), 53-58.
- Sastrohamidjojo H. (1996). *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Schupp, P. (2000). Structure elucidation, biological activity and ecology of secondary metabolites from Micronesian marine invertebrates. Disertasi Pasca-Sarjana S3 Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg: viii + 202 hlm.
- Sivaperumal, P., G. Ananthan dan S. M. Hussain. (2010). Exploration of antibacterial effects on the crude extract of marine ascidia *Aplidium multiplicatum* against clinical isolates. *Int. J. Med. Med. Sci*, 2(12), 382--386.

- Sofia D. (2008). Antioksidan dan radikal bebas. <http://www.chem-is-try.org>, 10 September 2011, pk. 20.37.
- Stoner, D. S. (1990). Recruitment of a tropical colonial ascidia: Relative importance of pre-settlement vs. post-settlement processes. *Ecology* 71(5), 1682--1690.
- Sunarni,T. (2005). Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae, *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 (2), 53-61.
- Winarsi H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.





**Gambar 3.4.2(1) Penguap putar vakum (*Rotary evaporator*)**



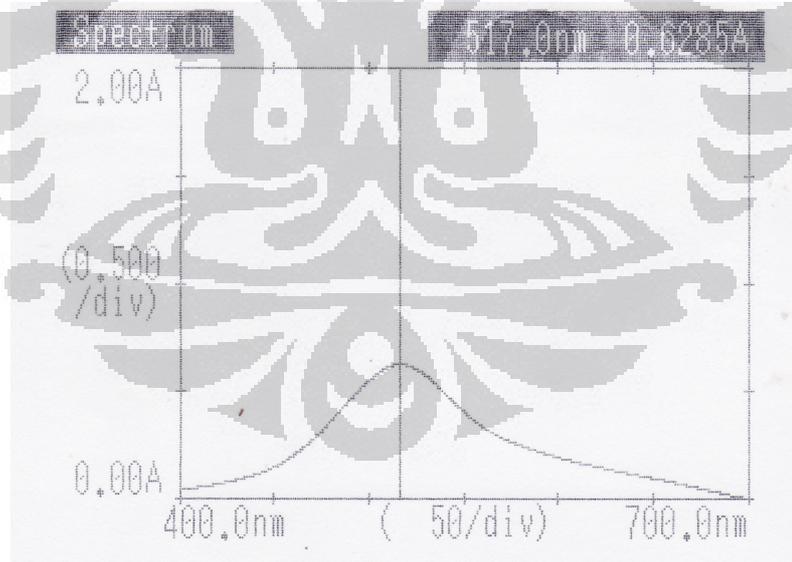
Gambar 3.4.2(2) Skema ekstraksi dan fraksinasi sampel ascidia *Didemnum sp.*



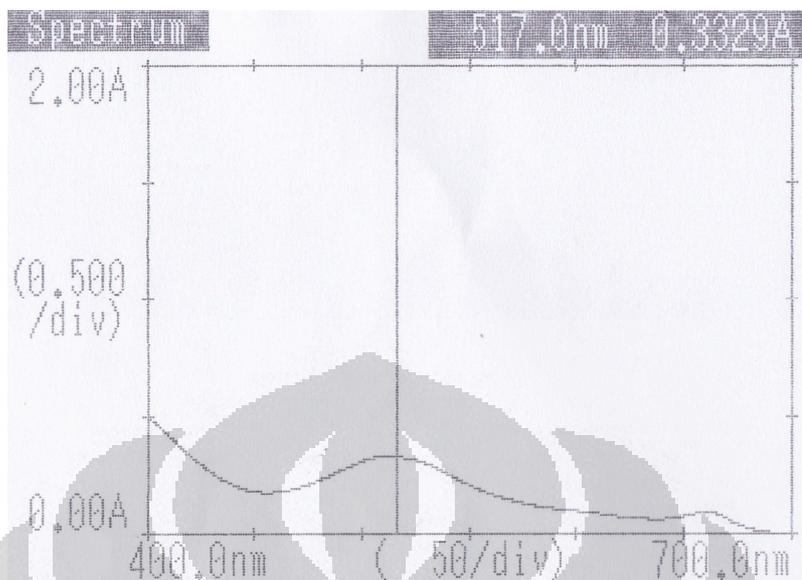
**Gambar 3.4.4.3** *Freeze dryer*



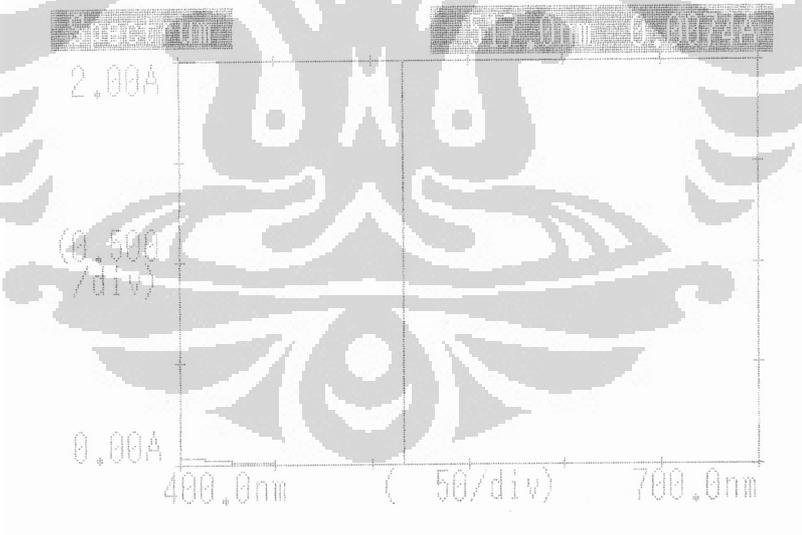
**Gambar 3.4.6.2(1) Spektrofotometer UV-Vis**



**Gambar 3.4.6.2(2) Spektrum serapan larutan DPPH**



**Gambar 3.4.6.4(1) Spektrum serapan larutan DPPH yang ditambah larutan sampel (larutan ekstrak etil asetat konsentrasi 200 ppm)**



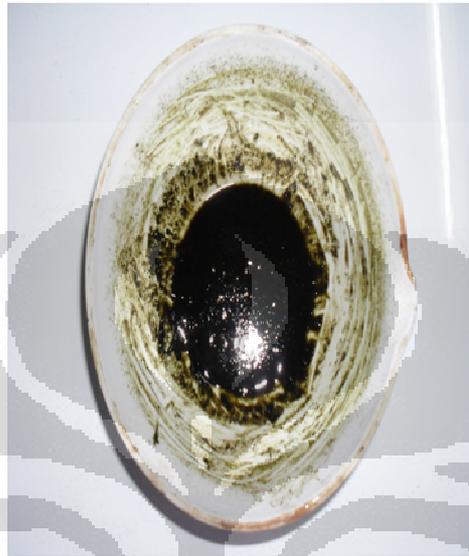
**Gambar 3.4.6.4(2) Spektrum serapan larutan DPPH yang ditambah larutan sampel (larutan ekstrak etil asetat konsentrasi 1000 ppm)**



**Gambar 4.2 Ekstrak metanol ascidia *Didemnum* sp.**



**Gambar 4.3(1) Hasil identifikasi senyawa antioksidan ekstrak metanol**



**Gambar 4.4(1) Ekstrak n-heksan ascidia *Didemnum* sp.**



**Gambar 4.4(2) Ekstrak etil asetat ascidia *Didemnum* sp.**



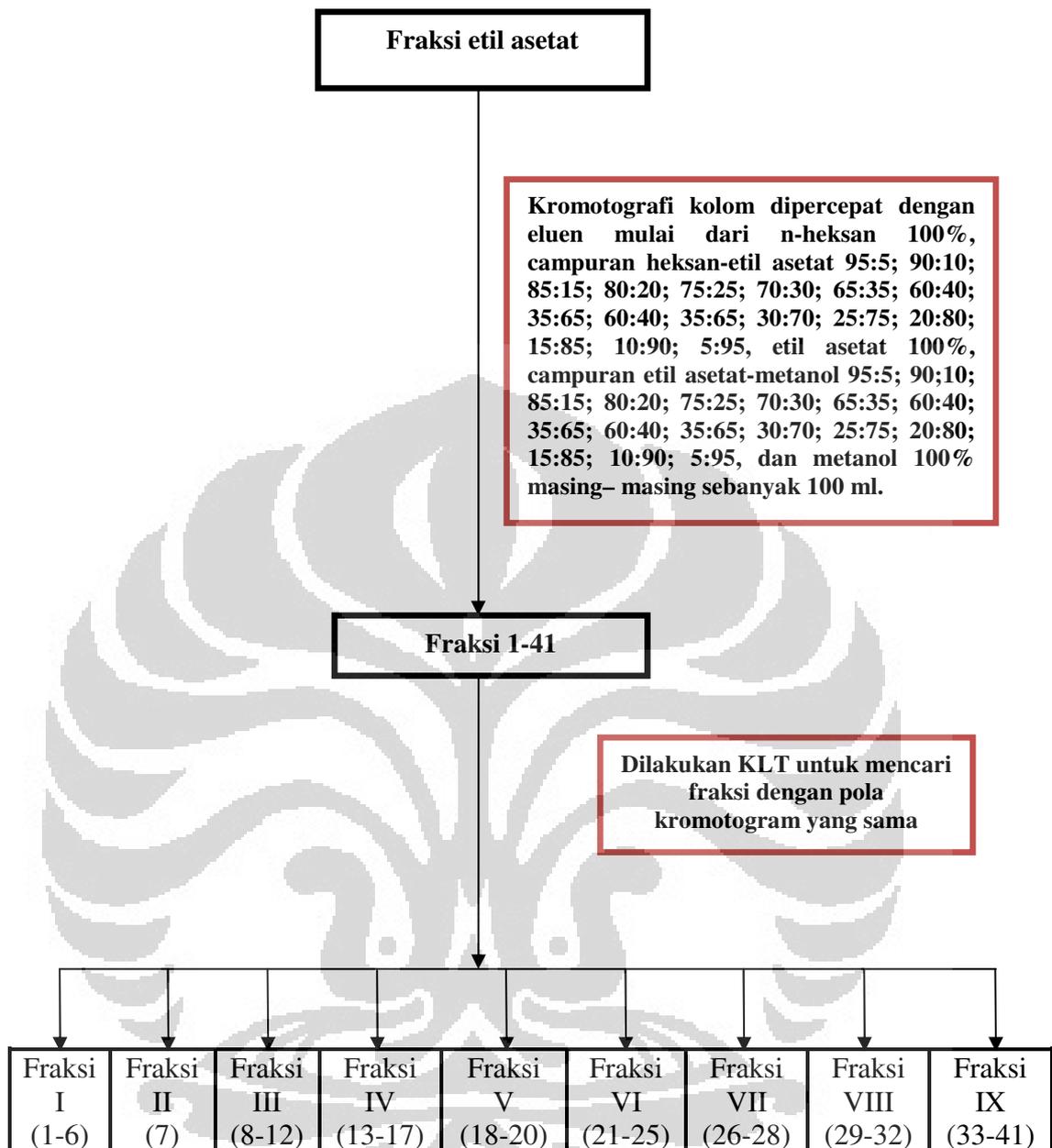
**Gambar 4.4(3) Ekstrak air ascidia *Didemnum* sp.**



Keterangan :

- 1 = Ekstrak n-heksan
- 2 = Ekstrak etil asetat
- 3 = Ekstrak air

**Gambar 4.5 Hasil identifikasi senyawa antioksidan ekstrak**



**Gambar 4.6 Bagan pemisahan fraksi etil asetat**



Keterangan :

- I = Fraksi I
- II = Fraksi II
- III = Fraksi III
- IV = Fraksi IV
- V = Fraksi V
- VI = Fraksi VI
- VII = Fraksi VII
- VIII = Fraksi VIII
- IX = Fraksi IX

**Gambar 4.7 Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan 9 fraksi**

**Tabel 4.2 Rendeman ekstrak metanol ascidia *Didemnum* sp.**

Bobot basah sampel (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendeman ekstrak (%)	Warna
1110	52,394	4,72	Hijau pekat

**Tabel 4.3 Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak (ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3670	0,2526	31,1716	$y = 29,568 + 0,1944x$	105,1029
100	25		0,2433	33,7057		
150	37,5		0,2314	36,9482		
200	50		0,2219	39,5367		

**Tabel 4.4 Hasil fraksinasi cair-cair**

Hasil fraksi	Bobot fraksi (g)	Rendeman fraksi (%)	Warna
Heksan	1,8802	3,76	Hitam kecoklatan
Etil asetat	3,3347	6,67	Coklat kehijauan
Air	43,3154	86,63	Hijau kehitaman

**Tabel 4.5(1) Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3820	0,2778	27,2774	$y = 25,682 + 0,2224x$	109,3435
100	25		0,2653	30,5497		
150	37,5		0,2495	34,6858		
200	50		0,2421	36,6230		

**Tabel 4.5(2) Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3820	0,2764	27,6439	$y = 26,409 + 0,2598x$	90,804
100	25		0,2534	33,6649		
150	37,5		0,2445	35,9947		
200	50		0,2323	39,1884		

**Tabel 4.5(3) Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak air ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3820	0,2510	34,2931	$y = 32,844 + 0,1804$	95,0997
100	25		0,2416	36,7539		
150	37,5		0,2304	39,6858		
200	50		0,2213	42,0680		

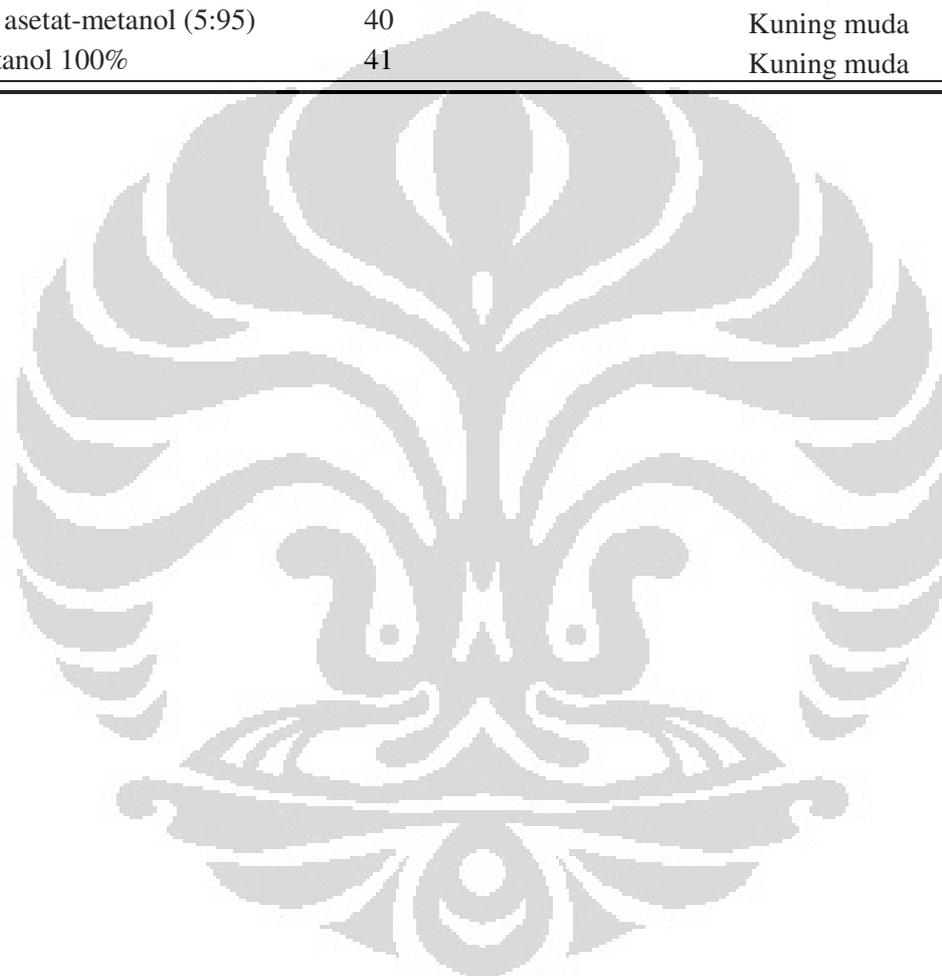
**Tabel 4.6 Hasil fraksinasi fraksi etil asetat *Ascidia Didemnum* sp. dengan kromatografi kolom dipercepat dan penggabungan fraksi**

<b>Fase Gerak</b>	<b>Fraksi ke-</b>	<b>Fraksi Hasil Penggabungan</b>	<b>Keterangan</b>
Heksan 100%	1	I	Kuning muda
Heksan-etil asetat (95:5)	2	(170,1 mg)	Kuning muda
Heksan-etil asetat (90:10)	3		Kuning muda
Heksan-etil asetat (85:15)	4		Kuning muda
Heksan-etil asetat (80:20)	5		Kuning kecoklatan
Heksan-etil asetat (75:25)	6		Kuning kecoklatan
Heksan-etil asetat (70:30)	7	II (82,0 mg)	Hitam kecoklatan, terdapat kristal putih mengkilat
Heksan-etil asetat (65:35)	8	III	Hijau kecoklatan
Heksan-etil asetat (60:40)	9	(257,6 mg)	Hijau kecoklatan
Heksan-etil asetat (55:45)	10		Hijau kecoklatan
Heksan-etil asetat (50:50)	11		Kuning kecoklatan
Heksan-etil asetat (45:55)	12		Kuning kecoklatan
Heksan-etil asetat (40:60)	13	IV	Kuning tua
Heksan-etil asetat (35:65)	14	(218,2 mg)	Kuning tua
Heksan-etil asetat (30:70)	15		Kuning tua
Heksan-etil asetat (25:75)	16		Kuning tua
Heksan-etil asetat (20:80)	17		Kuning tua
Heksan-etil asetat (15:85)	18	V	Kuning muda
Heksan-etil asetat (10:90)	19	(270,0 mg)	Kuning muda
Heksan-etil asetat (5:95)	20		Kuning muda
Etil asetat 100%	21	VI	Kuning muda
Etil asetat-metanol (95:5)	22	(486,9 mg)	Kuning muda
Etil asetat-metanol (90:10)	23		Kuning muda
Etil asetat-metanol (85:15)	24		Kuning kehijauan
Etil asetat-metanol (80:20)	25		Kuning kehijauan
Etil asetat-metanol (75:25)	26	VII	Kuning kehijauan
Etil asetat-metanol (70:30)	27	(210 mg)	Kuning kehijauan
Etil asetat-metanol (65:35)	28		Kuning kehijauan
Etil asetat-metanol (60:40)	29	VIII	Kuning tua
Etil asetat-metanol (55:45)	30	(260,3 mg)	Kuning tua
Etil asetat-metanol (50:50)	31		Kuning tua
Etil asetat-metanol (45:55)	32		Kuning tua

---

(Lanjutan)

Etil asetat-metanol (40:60)	33	IX (507,9 mg)	Kuning tua
Etil asetat-metanol (35:65)	34		Kuning tua
Etil asetat-metanol (30:70)	35		Kuning tua
Etil asetat-metanol (25:75)	36		Kuning tua
Etil asetat-metanol (20:80)	37		Kuning tua
Etil asetat-metanol (15:85)	38		Kuning muda
Etil asetat-metanol (10:90)	39		Kuning muda
Etil asetat-metanol (5:95)	40		Kuning muda
Metanol 100%	41		Kuning muda



**Tabel 4.7(1) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi I ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3724	0,3218	13,5875	$y = 12,778 + 0,1193x$	312,0034
100	25		0,3139	15,7089		
150	37,5		0,3086	17,1321		
200	50		0,3022	18,8507		

**Tabel 4.7(2) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi II ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3724	0,2975	20,1127	$y = 18,938 + 0,1479x$	210,0203
100	25		0,2901	22,0998		
150	37,5		0,2805	24,6777		
200	50		0,2740	26,4232		

**Tabel 4.7(3) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi III ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3724	0,3120	16,2191	$y = 13,862 + 0,3139x$	115,1258
100	25		0,2921	21,5628		
150	37,5		0,2810	24,5435		
200	50		0,2592	30,3974		

**Tabel 4.7(4) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi IV ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3724	0,3105	16,6219	$y = 15,934 + 0,1487x$	229,0921
100	25		0,2985	19,8442		
150	37,5		0,2906	21,9656		
200	50		0,2869	22,9591		

**Tabel 4.7(5) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi V ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,4036	0,3293	18,4093	y= 16,062 + 0,2884x	117,6768
100	25		0,3127	22,5223		
150	37,5		0,2968	26,4618		
200	50		0,2781	31,0951		

**Tabel 4.7(6) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi VI ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,4036	0,2950	26,9078	y= 25,675 + 0,2817x	86,3507
100	25		0,2691	33,3250		
150	37,5		0,2548	36,8681		
200	50		0,2460	39,0485		

**Tabel 4.7(7) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi VII ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,4036	0,3137	22,2745	y= 21,107 + 0,2755x	104,8748
100	25		0,2863	29,0634		
150	37,5		0,2775	31,2438		
200	50		0,2641	34,5639		

**Tabel 4.7(8) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi VIII ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,4036	0,2943	27,0812	y= 25,578 + 0,2359x	103,5269
100	25		0,2784	31,0208		
150	37,5		0,2614	35,2329		
200	50		0,2543	36,9920		

**Tabel 4.7(9) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi IX ascidia *Didemnum* sp.**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,4036	0,2924	27,5520	y= 26,218 + 0,2283x	104,17
100	25		0,2737	32,1853		
150	37,5		0,2640	34,5887		
200	50		0,2516	37,6610		

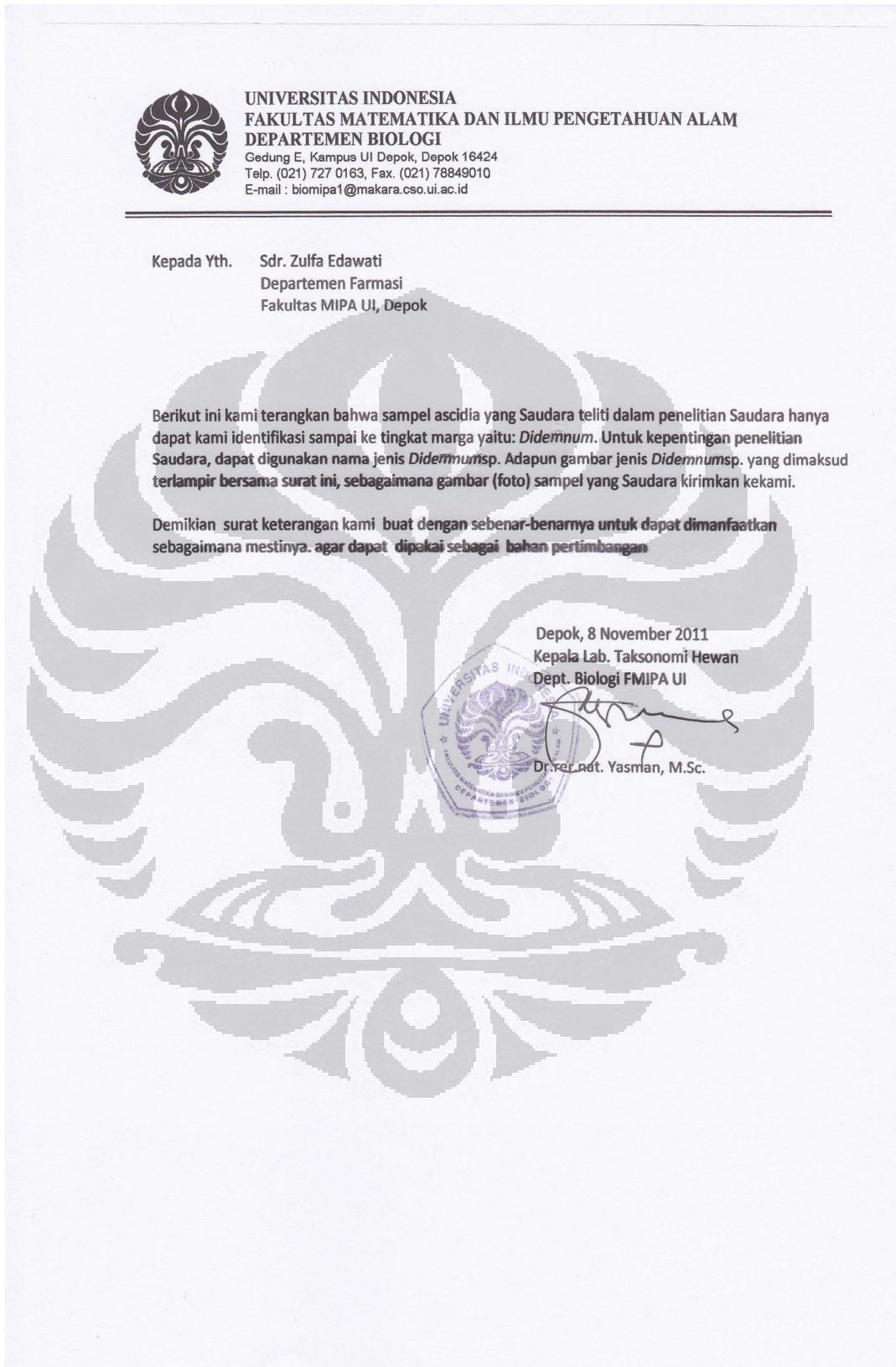
**Tabel 4.7(10) Hasil uji aktivitas antioksidan kuersetin**

Konsentrasi Ekstrak(ppm)	Konsentrasi uji (ppm)	Serapan Blanko	Serapan Sampel	Persentase Inhibisi (%)	Persamaan Regresi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
25	6,25	0,3921	0,3260	16,8579	y= 9,8151 + 24,208x	1,6599
100	25		0,3131	20,1479		
150	37,5		0,2534	35,3736		
200	50		0,2372	39,5052		

**Tabel 4.8 Identifikasi golongan kimia fraksi teraktif**

Kandungan Kimia	Pereaksi Kimia	Hasil
Alkaloid	Mayer	+
	Dragendorf	+
	Bouchardat	+
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	-
	Gelatin 10 %	-
	NaCl-gelatin	-
Flavonoid	Serbuk Zn + HCl 2N + HCL pekat P	-
	serbuk Mg + HCl pekat P	-
	Serbuk as. Borat + serbuk as. oksalat	-
Steroid/triterpenoid	Lieberman-Burchard	+
Saponin	Air panas	+
Glikosida	Molish LP	+
	Asam asetat anhidrat P + asam sulfat P	+
Antrakuinon	Benzen P + NaOH LP	-
Fenol	FeCl <sub>3</sub>	-

## Lampiran 1. Hasil determinasi sampel ascidia



(lanjutan)



Gambar sampel ascidia *Didemnum* sp. in situ



Gambar sampel ascidia *Didemnum* sp. setelah dipreservasi dalam metanol

## Lampiran 2. Perhitungan konsentrasi larutan ekstrak

### 1. Pembuatan konsentasi larutan induk

Ditimbang ekstrak metanol sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol

$$\text{Larutan induk} = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 = 1.000 \text{ ppm}$$

### 2. Pembuatan seri konsentrasi

Diencerkan menjadi 4 konsentrasi

$$\text{Konsentrasi 1} = \frac{0,25 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 25 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi 2} = \frac{1,0 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi 3} = \frac{1,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 150 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi 4} = \frac{2,0 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 200 \text{ ppm}$$

### 3. Konsentrasi larutan uji

Larutan ekstrak dipipet 1,0 mL, ditambahkan 1,0 mL DPPH, ditambahkan 2,0 mL metanol

$$\text{Larutan uji 1} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 25 \text{ ppm} = 6,25 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan uji 2} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 100 \text{ ppm} = 25 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan uji 3} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 150 \text{ ppm} = 37,5 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan uji 4} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 200 \text{ ppm} = 50 \text{ ppm}$$

Lampiran 3. Contoh perhitungan  $IC_{50}$  ekstrak metanol

## a. Persentase Inhibisi (%)

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blanko} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban Blanko}} \times 100 \%$$

$$1. \quad \% \text{ Inhibisi} = \frac{0,3670 - 0,2526}{0,3670} \times 100\% = 31,1716 \%$$

$$2. \quad \% \text{ Inhibisi} = \frac{0,3670 - 0,2433}{0,3670} \times 100 \% = 33,7057 \%$$

$$3. \quad \% \text{ Inhibisi} = \frac{0,3670 - 0,2314}{0,3670} \times 100 \% = 36,9482 \%$$

$$4. \quad \% \text{ Inhibisi} = \frac{0,3670 - 0,2219}{0,3670} \times 100\% = 39,5367 \%$$

a. Nilai  $IC_{50}$ 

Persamaan regresi  $y = a + bx$

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

$$y = 29,568 + 0,1944x$$

$$a = 29,568; b = 0,1944$$

$$IC_{50} = \frac{50 - 29,568}{0,1944} = 105,1029 \mu\text{g/ml}$$

## Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi Larutan Kuersetin

## 1. Pembuatan konsentasi larutan induk

Ditimbang ekstrak metanol sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol

$$\text{Larutan induk} = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 = 1.000 \text{ ppm}$$

## 2. Pembuatan seri konsentrasi

Diencerkan menjadi 4 konsentrasi

$$\text{Konsentrasi 1} = \frac{0,01 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi 2} = \frac{0,02 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 2 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi 3} = \frac{0,04 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 4 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi 4} = \frac{0,05 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1.000 \text{ ppm} = 5 \text{ ppm}$$

## 3. Konsentrasi larutan uji

Larutan kuersetin dipipet 1,0 mL, ditambahkan 1,0 mL DPPH, ditambahkan 2,0 mL metanol

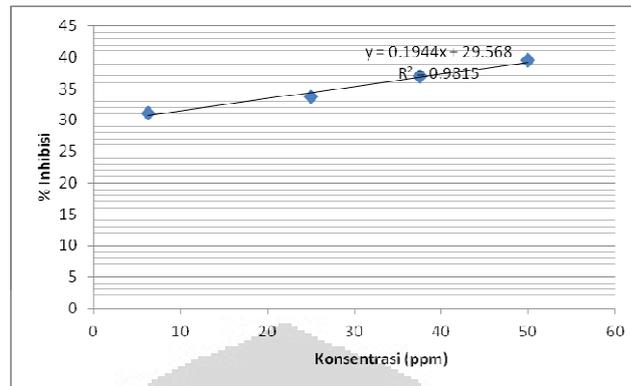
$$\text{Larutan uji 1} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 1 \text{ ppm} = 0,25 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan uji 2} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 2 \text{ ppm} = 0,5 \text{ ppm}$$

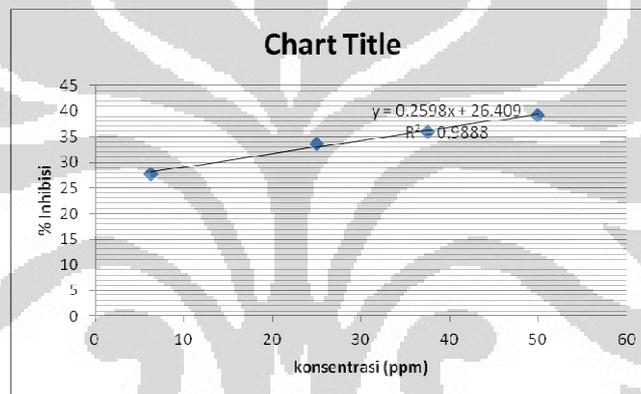
$$\text{Larutan uji 3} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 4 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$$

$$\text{Larutan uji 4} = \frac{1,0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} \times 5 \text{ ppm} = 1,25 \text{ ppm}$$

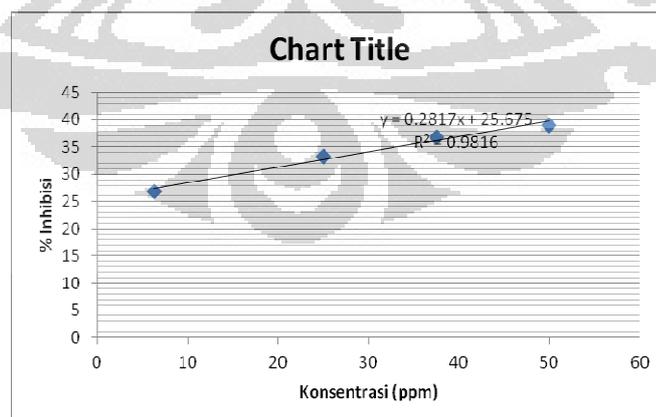
## Lampiran 5. Kurva hubungan konsentrasi ekstrak dengan % inhibisi



## Kurva hubungan konsentrasi ekstrak metanol dengan % inhibisi



## Kurva hubungan konsentrasi ekstrak etil asetat dengan % inhibisi



## Kurva hubungan konsentrasi fraksi VI dengan % inhibisi