



UNIVERSITAS INDONESIA

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN UJI TERPENOID TERHADAP EKSTRAK *ACANTHASTER*

SKRIPSI

**ABDUL RAHIM
0806327036**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN UJI TERPENOID TERHADAP EKSTRAK *ACANTHASTER*

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ABDUL RAHIM
0806327036**

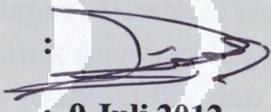
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

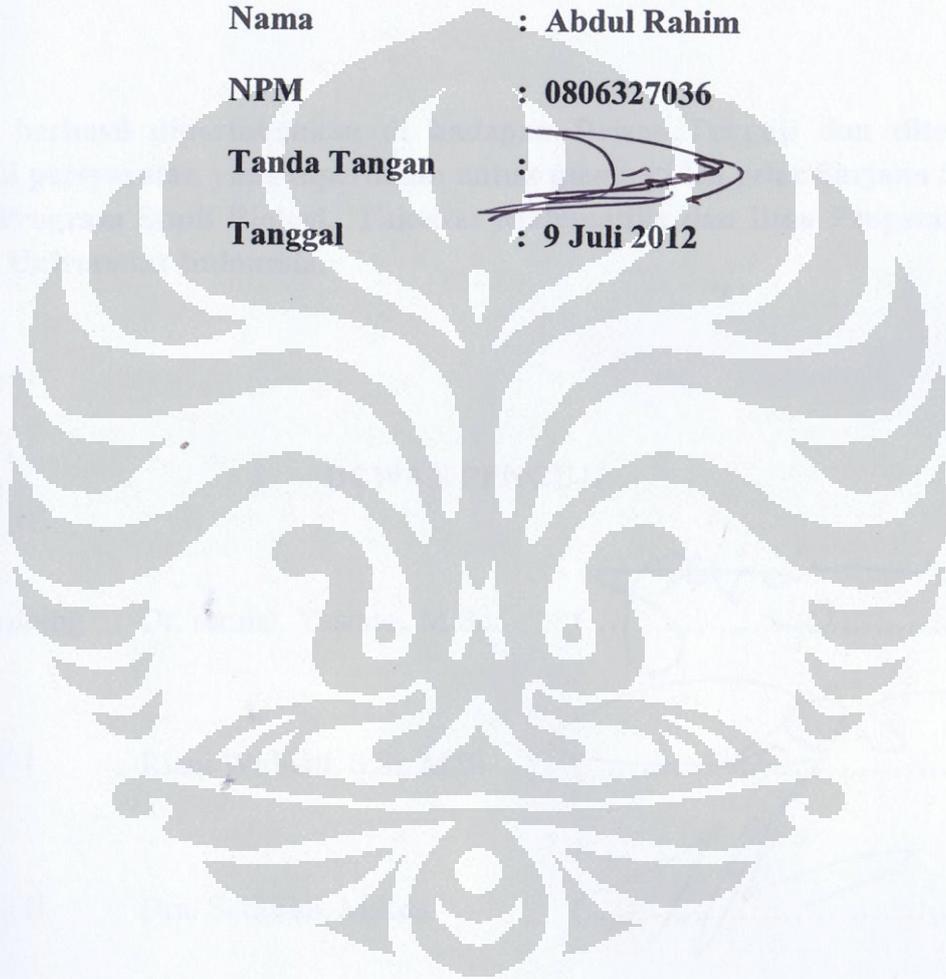
**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan benar.**

Nama : Abdul Rahim

NPM : 0806327036

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Abdul Rahim
NPM : 0806327036
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Uji Terpenoid Terhadap Ekstrak *Acanthaster*

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. rer.nat. Yasman, M.Sc. (.....)

Penguji I : Riani Widiarti, S.Si, M.Si. (.....)

Penguji II : Dra. Setiorini, M.Kes. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Penulis panjatkan puji syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya. Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Penulis sangat bahagia dapat menyelesaikan penelitian ini sebagai salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi FMIPA UI. Penulis banyak mendapat bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak dalam penyelesaian skripsi ini. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati, penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Dr.rer.nat. Yasman, M.Sc. selaku Pembimbing yang dengan tulus memberikan ilmu, bimbingan, ide, nasihat, waktu, saran, dan kritik yang sangat bermanfaat bagi Penulis. Semoga Allah SWT panjangkan usia dan selalu memberi kesehatan kepada Beliau dan keluarga sebagai balasan atas semua kebaikan dan dedikasi beliau di bidang pendidikan.
2. Dra. Setiorini, M.Kes. dan Riani Widiarti, S.Si, M.Si. selaku Penguji I dan II yang telah memberikan saran dan perbaikan yang sangat membangun demi kemajuan Penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Ariyanti Oetari, Ph. D. selaku Penasihat Akademis atas dukungan dan bimbingan yang diberikan. Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M. Biomed selaku pembimbing kerja praktik, Dr.rer.nat. Mufti P.Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Dra. Nining Betawati Prihartini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi, dan Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, yang telah memfasilitasi penyelesaian skripsi.
4. Seluruh civitas akademis dan nonakademis Departemen Biologi FMIPA UI, khususnya kepada Bapak Wisnu Wardhana dan Bapak Dadang Kusuma yang begitu ramah kepada Penulis, Mbak Asri Martini selaku koordinator seminar dan asisten Lab Genetika yang telah memfasilitasi penyelesaian penelitian, Mbak Ida, Ibu Rusmalina, dan Bapak Taryono yang selalu bersikap jenaka dan ramah kepada Penulis.
5. Kedua orang tua, kakak dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa restu, kasih sayang, dan dukungan kepada Penulis.

6. Zulfa Hanif dan Lee Yong Dae yang selalu memotivasi Penulis menyelesaikan skripsi ini. Fachrunnisa, Rusli Munzir, Achmad Fahrurrozi, Yudi Yanto, Ria Anggraeni, Nayla Kurrota Akyun, Kartika W., Delly Ramadan, Ryan, Zulfa Edawati, Sentot T.P., Fathia Nova, Abdul Jamaluddin, Aulia Jauhari Rakhman, Yuan Achda, Fitriana A., Alvin Yair Natalius, Kak Giri dan Kak Wanda, Jane Sarah Giat, Hutomo M., Anargha Setiadi, Rininta beserta teman-teman BIOSENTRIS yang telah memberikan dukungan dan kebersamaan yang sangat berkesan kepada Penulis.
7. Bapak Fahrurrozie dan Ibu Irina yang telah mengajari saya tentang mentalitas dan kedisiplinan dalam mengejar cita-cita.

Jakarta, 4 Juni 2012

Penulis

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

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

Nama : Abdul Rahim
NPM : 0806327036
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
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:

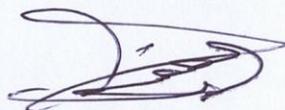
Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Uji Terpenoid Terhadap Ekstrak *Acanthaster* beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari 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 : 9 Juli 2012

Yang menyatakan


(Abdul Rahim)

ABSTRAK

Nama : Abdul Rahim
Program Studi : Biologi
Judul : Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Uji Terpenoid Terhadap Ekstrak *Acanthaster*

Pemanfaatan biota laut di bidang kesehatan salah satunya adalah sebagai sumber antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Penelitian dilakukan untuk menguji aktivitas antioksidan dan mendeteksi keberadaan senyawa terpenoid pada ekstrak kasar *Acanthaster* (Echinodermata) dan fraksi-fraksinya. Metode DPPH digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan sedangkan pelarut Libermann Burchard digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa terpenoid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar metanol *Acanthaster* mengandung terpenoid dan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan pembandingnya, *Didemnum* sp. (Ascidia) dengan nilai IC_{50} yaitu masing-masing sebesar 102,946 $\mu\text{g/ml}$ dan 118,373 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} secara berurutan 74,481 $\mu\text{g/ml}$, 100,084 $\mu\text{g/ml}$, dan 194,652 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan disebabkan oleh terpenoid, sedangkan aktivitas antioksidan fraksi air disebabkan oleh senyawa lain yang bersifat polar karena menunjukkan hasil negatif pada uji terpenoid.

Kata Kunci : *Acanthaster*, antioksidan, ekstrak kasar, DPPH, terpenoid.

xii + 43 halaman : 13 gambar; 8 tabel

Daftar Acuan : 31 (1958--2011)

ABSTRACT

Name : Abdul Rahim
Study Program : Biologi
Title : Antioxidant Activity Test Using 1.1-Diphenyl-2-Picrylhidrazil (DPPH) Method and Terpenoids Test on *Acanthaster* Extract

Many marine organism have been known as source of antioxidant that could counteract radical ions. The study was conducted to test the antioxidant activity and to detect the presence of terpenoid compounds in the *Acanthaster* (echinoderm) crude extract and its fractions. DPPH method was used to test the antioxidant activity and Liebermann Burchard reagent was used to detect the presence of terpenoid compounds. The result shown that crude extract of *Acanthaster* contained terpenoids and has stronger antioxidant activity than ascidian *Didemnum* sp. (IC₅₀ values are 102.946 µg/ml and 118.373 µg/ml, respectively). Ethyl acetate fraction, n-hexane fraction, and water fraction have strong antioxidant activities with IC₅₀ values 74.481 µg/ml, 100.084 µg/ml, dan 194.652 µg/ml, respectively. The antioxidant activities of ethyl acetate fraction and n-hexane fraction were caused by terpenoids, whereas the antioxidant activity of water fraction was caused by other polar antioxidant compounds because has negative result of terpenoid test.

Keywords : *Acanthaster*, antioxidant, crude extract, DPPH, terpenoids.

xii + 43 page : 13 pictures; 8 tables

Bibliography : 31 (1958--2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 <i>Acanthaster</i>	4
2.1.1 Biologi <i>Acanthaster</i>	4
2.1.2 Potensi Senyawaan <i>Acanthaster</i>	5
2.1.2.1 Terpenoid.....	6
2.1.2.2 Astasantin.....	7
2.2 Antioksidan.....	8
2.3 DPPH (1,1,-Difenil-2-Pikrilhidrazil).....	9
2.4 Ekstraksi.....	11
2.5 Fraksinasi.....	12
3. METODE PENELITIAN.....	13
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	13
3.2 Bahan.....	13
3.3 Alat.....	13
3.4 Cara Kerja.....	14
3.4.1 Pengambilan Sampel.....	15
3.4.2 Pembuatan Ekstrak.....	16
3.4.3 Uji Kualitatif Antioksidan.....	16
3.4.4 Uji Kuantitatif Antioksidan.....	17
3.4.4.1 Pembuatan Larutan DPPH.....	17
3.4.4.2 Pembuatan Larutan Uji dan Pembanding.....	18
3.4.4.3 Pengujian.....	18
3.4.4.4 Penghitungan Nilai IC ₅₀	19
3.4.5 Identifikasi Terpenoid dengan Pelarut Liebermann Burchard.....	20

3.4.6	Fraksinasi.....	20
3.4.7	Uji Antioksidan dan Uji Terpenoid terhadap Fraksi.....	22
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1	Pengumpulan Sampel dan Ekstraksi.....	23
4.2	Uji Kualitatif Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol <i>Acanthaster</i>	24
4.3	Uji Kuantitatif Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol <i>Acanthaster</i> dan Perbandingannya.....	25
4.4	Uji Terpenoid Ekstrak Kasar Metanol <i>Acanthaster</i>	26
4.5	Fraksinasi.....	27
4.6	Uji Kualitatif Antioksidan Fraksi.....	28
4.7	Uji Terpenoid Terhadap Fraksi.....	29
4.8	Uji Kuantitatif Antioksidan Terhadap Fraksi.....	30
4.9	Analisis Bobot Ekstrak, Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Terpenoid.....	32
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
5.1	Kesimpulan.....	35
5.2	Saran.....	35
	DAFTAR ACUAN.....	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.2.2	Struktur molekul astasantin.....	7
Gambar 2.3	Reaksi reduksi DPPH.....	10
Gambar 3.4	Tahapan kerja dalam penelitian.....	14
Gambar 3.4.1	Sampel <i>Acanthaster</i>	15
Gambar 3.4.3	Prosedur uji kualitatif antioksidan.....	17
Gambar 3.4.4.3	Prosedur uji kuantitatif antioksidan.....	19
Gambar 3.4.6	Fraksinasi.....	22
Gambar 4.1	Ekstrak kasar metanol <i>Acanthaster</i>	23
Gambar 4.2	Hasil uji kualitatif antioksidan ekstrak metanol <i>Acanthaster</i>	24
Gambar 4.4	Uji terpenoid terhadap ekstrak metanol <i>Acanthaster</i>	26
Gambar 4.5.	Hasil fraksi beserta kotak standar warna tiap fraksi.....	27
Gambar 4.6	Uji kualitatif antioksidan fraksi.....	29
Gambar 4.7	Uji terpenoid fraksi.....	30

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Bobot ekstrak kasar metanol <i>Acanthaster</i>	24
Tabel 4.3(1)	Hasil uji kuantitatif antioksidan ekstrak kasar metanol <i>Acanthaster</i>	25
Tabel 4.3(2)	Hasil uji kuantitatif antioksidan ekstrak metanol ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	26
Tabel 4.5	Hasil fraksinasi.....	28
Tabel 4.8(1)	Hasil uji antioksidan fraksi n-heksan	31
Tabel 4.8(2)	Hasil uji antioksidan fraksi etil asetat	31
Tabel 4.8(3)	Hasil uji antioksidan fraksi air	32
Tabel 4.9	Hasil uji antioksidan dan terpenoid ekstrak dan fraksi <i>Acanthaster</i>	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$	39
Lampiran 2	Pembuatan larutan seri sampel dengan berbagai konsentrasi...	39
Lampiran 3	Pembuatan larutan uji	40
Lampiran 4	Contoh perhitungan IC_{50}	41
Lampiran 5	Persamaan regresi ekstrak kasar metanol <i>Acanthaster</i>	42
Lampiran 6	Persamaan regresi ekstrak kasar metanol ascidia <i>Didemnum</i> sp.....	42
Lampiran 7	Persamaan regresi fraksi n-heksan	42
Lampiran 8	Persamaan regresi fraksi etil asetat	43
Lampiran 9	Persamaan regresi fraksi air	43

BAB 1

PENDAHULUAN

Penyakit degeneratif seperti kanker, tekanan darah tinggi, penyakit gula, dan lain sebagainya semakin banyak dan mudah ditemui di kalangan masyarakat. Pola hidup yang praktis dan instan, khususnya pada pemilihan makanan, memiliki dampak negatif bagi kesehatan. Makanan cepat saji dengan pemanasan tinggi dan pembakaran merupakan pilihan dominan yang dapat memicu terbentuknya senyawa radikal (Poumorad 2006: 1142). Selain itu, peningkatan polutan hasil pembakaran tidak sempurna kendaraan bermotor dan industri seperti CO (karbonmonoksida), oksida-oksida nitrogen dan hidrokarbon merupakan senyawa-senyawa yang rentan teroksidasi menjadi senyawa radikal. Begitu juga *global warming* atau peningkatan suhu bumi akibat penipisan lapisan ozon yang berarti radiasi sinar ultraviolet semakin intensif menyerang manusia dan menginduksi terbentuknya suatu radikal (Jain *dkk.* 2004: 5).

Fakta-fakta telah menunjukkan bahwa kecenderungan keberadaan senyawa-senyawa radikal bebas dalam tubuh semakin meluas. Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbital luarnya. Radikal bebas dapat bereaksi dengan molekul yang merupakan komponen sel tubuh dengan cara mengikat elektron molekul. Radikal bebas tersebut dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lemak bahkan DNA sel dan menginisiasi timbulnya penyakit degeneratif (Reynertson 2007: 7).

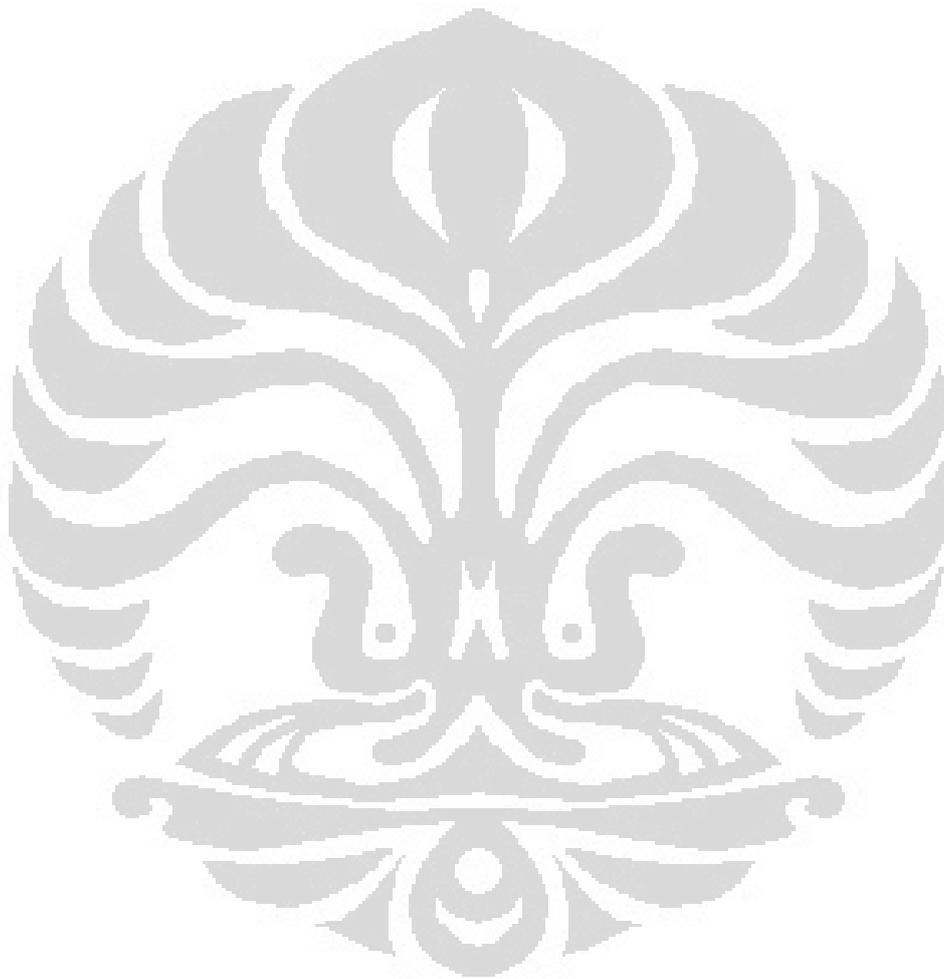
Kerja radikal bebas dapat dihambat oleh antioksidan yakni zat yang dapat memperlambat dan mencegah terjadinya oksidasi molekul. Adanya senyawa antioksidan mengurangi timbulnya penyakit kronis yang disebabkan karena kerja radikal bebas dalam tubuh seperti kanker, disfungsi otak dan inflamasi yang dapat menyebabkan kematian. Tubuh dapat menghasilkan antioksidan dari metabolisme sel tubuh namun dengan meningkatnya jumlah radikal bebas, tubuh perlu didukung oleh asupan antioksidan. Hal tersebut melatarbelakangi gencarnya dilakukan penelitian sebagai upaya menemukan sumber baru antioksidan yang dapat mengimbangi peningkatan radikal bebas di dalam tubuh. Salah satu di

antara upaya tersebut adalah mengeksplorasi dan menemukan senyawa-senyawa antioksidan seperti beta karoten, astasantin, alkaloid, dan fenol pada tumbuhan dan biota laut. Peluang peneliti Indonesia menemukan senyawa antioksidan alami sangat besar mengingat keanekaragaman hayati yang tinggi di negara mega biodiversitas tersebut. Peluang menemukan sumber antioksidan baru dari biota laut menjadi lebih besar di Indonesia mengingat luasnya perairan Indonesia yakni 7,9 juta km² atau sekitar 81% dari luas keseluruhan wilayahnya (Ginting *dkk.* 2009: 5).

Penemuan senyawa antioksidan pada biota laut salah satunya dilaporkan oleh Mamelona *dkk.* (2010: 528) yang menyebutkan teripang dan bulu babi hijau memiliki kandungan beta karoten, salah satu antioksidan yang sudah dikenal luas. Selain biota-biota tersebut, bintang laut mahkota duri, *Acanthaster*, juga memiliki potensi besar untuk dijadikan sumber antioksidan. Berdasarkan analisis kimia, *Acanthaster planci* diketahui memiliki kandungan senyawa astasantin, yakni senyawa terpenoid yang mampu meredam reaktivitas radikal bebas (Luo *dkk.* 2011: 5). Meski sudah diketahui *Acanthaster* memiliki senyawa astasantin, belum ada penelitian lebih lanjut yang menguji kemampuan ekstrak biota tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan. Pemanfaatan *Acanthaster* sebagai sumber antioksidan juga diharapkan dapat meningkatkan nilai manfaat *Acanthaster* serta sebagai upaya menanggulangi ledakan populasi *Acanthaster* yang dapat menimbulkan masalah ekologi laut yakni kematian polip karang secara masif akibat pemangsa oleh *Acanthaster* (Yusuf 2008: 18).

Upaya menemukan sumber baru antioksidan dilakukan untuk mengimbangi peningkatan radikal bebas dalam tubuh. Dengan terkandungnya astasantin pada *Acanthaster*, menjadikan biota laut tersebut berpotensi sebagai sumber baru antioksidan. Oleh karena itu, penelitian yang menguji secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui kemampuan ekstrak *Acanthaster* dan fraksi-fraksinya dalam meredam radikal bebas penting dilakukan. Bersamaan dengan itu, mendeteksi keberadaan senyawa terpenoid bersifat antioksidan seperti astasantin pada ekstrak *Acanthaster* dan fraksi-fraksinya juga harus dilakukan untuk memastikan senyawa tersebut adalah salah satu senyawa yang bertanggung jawab pada aktivitas antioksidan ekstrak *Acanthaster* dan fraksi-fraksinya.

Tujuan dilakukan penelitian adalah menguji aktivitas antioksidan menggunakan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan mendeteksi keberadaan terpenoid yang bertindak sebagai antioksidan pada ekstrak *Acanthaster* dan fraksi-fraksinya. Manfaat hasil penelitian adalah memberikan informasi mengenai kekuatan aktivitas antioksidan ekstrak *Acanthaster* dan fraksi-fraksinya sebagai upaya awal menjadikan *Acanthaster* sebagai sumber baru antioksidan.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Acanthaster*

2.1.1 Biologi *Acanthaster*

Acanthaster dilaporkan pertama kali dari contoh hewan di Indonesia oleh George Rumphius pada tahun 1705, yang 50 tahun kemudian dideskripsikan Linnaeus sebagai *Acanthaster* sp. (Moran 1990: 96, Lane 1996: 209), sehingga diperkirakan *A. planci* merupakan biota asli Indonesia. Genus terdiri atas tiga spesies yaitu *A. planci*, *A. ellisi* dan *A. berrypinnus*. *Acanthaster ellisi* merupakan *Acanthaster* pemakan karang yang populasinya sangat jarang, hanya dilaporkan di Filipina. *Acanthaster berrypinnus* adalah *Acanthaster* pemakan detritus. Ketiga spesies tersebut mempunyai genetik yang sangat mirip sehingga kadang terjadi hibrid di antara ketiganya. *Acanthaster planci* diduga berasal dari *A. berrypinnus* yang terspesialisasi memakan polip karang. Taksonomi *Acanthaster* secara lengkap dapat dilihat dalam keterangan berikut (Setyastuti 2009: 17--18):

Kerajaan : *Animalia*
Filum : *Echinodermata*
Kelas : *Asteroidea*
Ordo : *Valvatida*
Famili : *Acanthasteridae*
Marga : *Acanthaster* [Gervais 1841]

Struktur tubuh *Acanthaster* sama dengan struktur umum dari Asteroidea. Tubuh *Acanthaster* dewasa berbentuk radial simetris, dengan tubuh mirip cakram bersumbu oral dan aboral yang mempunyai lengan-lengan. Bagian oral (mulut) menghadap ke bawah sedangkan bagian aboral menghadap ke atas. Lubang madreporit berjumlah 6--13, sedangkan lubang anus berjumlah 1--6 buah. *Acanthaster* mempunyai lengan antara 8--21 buah. Duri-duri yang beracun

berukuran 2--4 cm menghiasi permukaan aboral tubuh cakram dan lengan-lengannya.

Warna tubuh *Acanthaster* dapat bervariasi antar lokasi. *Acanthaster* di perairan Thailand dan Maladewa berwarna biru keunguan sedangkan di Hawaii berwarna hijau dan merah (Moran 1990: 96). Warna tubuh *Acanthaster* di perairan Laut Jawa dan Laut Flores adalah merah dan kelabu. Ada dua macam warna *Acanthaster* di Cocos Island dan Christmas Island, Australia, yang menunjukkan tipe Samudra Pasifik dan Samudra Hindia (Hobbs & Salmond 2008: 27).

Acanthaster menyukai area yang tenang, seperti laguna dan dasar laut. *Acanthaster* menghindari perairan dangkal apalagi jika terdapat turbulensi. Larva bintang laut dapat selamat dan tumbuh secara baik di habitat dengan salinitas dan temperatur yang rendah (Niles 2003: 5). *Acanthaster* merupakan penghuni terumbu karang yang alami. Anakan *Acanthaster* yang masih kecil hidup di antara pecahan karang di dasar terumbu. Anakan *Acanthaster* memakan alga berkapur yang tumbuh pada pecahan karang tersebut. *Acanthaster* yang berukuran kecil mencari makan pada siang hari dan bersembunyi di bawah karang meja atau di celah-celah terumbu apabila ada pemangsa.

Acanthaster memangsa karang dengan cara membuat jaringan karang menjadi bubur dan menyedotnya. Kerangka karang yang mati menjadi tempat penganapan larva dan spora penghuni terumbu karang lainnya. Pemangsaan karang oleh *Acanthaster* yang dalam populasi sedikit bersifat selektif dengan preferensi pada Pocilloporidae dan Acroporidae yang tumbuh cepat dan cenderung mendominasi ruang di terumbu. Pemangsaan selektif tersebut mempunyai dampak ekologi yang positif karena memberikan bantuan kepada polip karang yang tumbuh lambat untuk tetap tinggal di terumbu tersebut (Setyastuti 2009: 4).

2.1.2 Potensi Senyawaan *Acanthaster*

Enzim yang terdapat pada *Acanthaster* dapat dijadikan agen kemoterapi yang lebih efektif daripada tamoxifen dalam pengobatan kanker payudara. Enzim

tersebut memiliki efek sitotoksik dan apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 (Mutee 2012: 1). Selain itu, ekstrak kasar larva *Acanthaster* diketahui mengandung saponin. Oleh karena itu, larva *Acanthaster* tidak disukai ikan dan terhindar dari pemangsa ikan tersebut (Lucas 2003: 1).

Penelitian terdahulu menunjukkan *Acanthaster* sp. memiliki kandungan protein sekitar 22% dari berat keringnya dengan komposisi asam amino yang mirip dengan komposisi asam amino pada ikan. Meskipun *Acanthaster* memiliki sedikit asam lemak (kurang dari 1%), asam lemak yang terkandung beragam dan tersusun atas asam lemak tak jenuh (sekitar 60% dari total asam lemak). Komposisi yang demikian menjadikan *Acanthaster* berpotensi untuk menjadi bahan pakan ternak sehingga mengurangi penggunaan ikan, minyak tepung ikan, dan karotenoid (Luo *dkk.* 2011: 5).

Luo *dkk.* (2011: 5) menambahkan, *Acanthaster* juga mengandung suatu senyawa yang penting dan menarik perhatian peneliti yaitu astasantin. Setiap gram (berat kering) *Acanthaster* mengandung 65,4--97,4 µg astasantin atau 1,5 kali lebih tinggi dibandingkan astasantin udang *Penaeus monodon*. *Acanthaster* memiliki potensi untuk menjadi sumber baru astasantin. Astasantin merupakan salah satu senyawa terpenoid golongan karotenoid yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan.

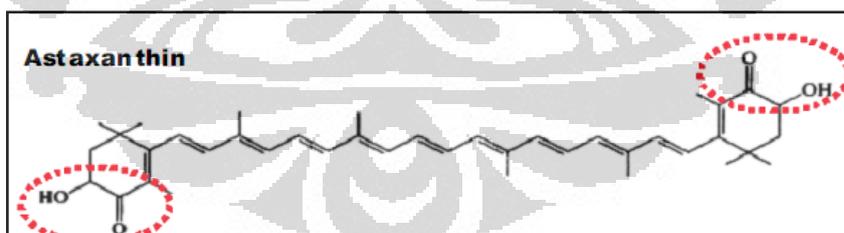
2.1.2.1 Terpenoid

Terpenoid 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 C_5 . Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpenoid dan seskuiterpenoid yang mudah menguap, diterpenoid, tetraterpenoid yang kurang menguap, triterpenoid, dan sterol yang tidak menguap. Tetraterpenoid (karotenoid) adalah pigmen larut dalam lipid. Tetraterpenoid hadir dalam bentuk hidrokarbon tak jenuh sederhana misalnya karoten dan likopen, atau dalam bentuk turunan oksigen yang dikenal sebagai santofil misalnya astasantin, zeasantin dan fukosantin (Sayeed 2007: 31).

2.1.2.2 Astasantin

Astasantin termasuk ke dalam senyawa terpenoid yang dibangun oleh delapan isopren dan terdiri dari 40 karbon (Capelli 2007: 7). Astasantin diklasifikasikan sebagai santofil yang memiliki gugus hidroksil (OH) atau keton (=O), seperti zeasantin dan santasantin. Seperti karotenoid lainnya, astasantin merupakan pigmen yang larut dalam lipid. Rantai ikatan rangkap terkonjugasi yang dimilikinya bertanggung jawab untuk fungsi antioksidan, seperti karotenoid lainnya, karena elektronnya dapat disumbangkan untuk menstabilkan muatan molekul reaktif.

Astasantin telah menarik perhatian banyak peneliti karena senyawa tersebut dapat melintasi penghalang darah di otak dan membawa antioksidan ke otak dan sistem saraf pusat, melintasi penghalang darah-retina dan membawa antioksidan dan anti-inflamasi untuk mata, membawa antioksidan dan anti-inflamasi ke semua organ dan kulit, menembus membran sel, menghilangkan radikal bebas dan menetralkan oksigen singlet (Capelli 2007: 7). Struktur molekul astasantin dan karoten dapat dilihat pada Gambar 2.1.2.2.



Gambar 2.1.2.1 Struktur molekul astasantin
[Sumber: Capelli 2007: 7.]

Astasantin ditemukan dalam mikroalga, salmon, ragi, udang, dan bulu dari beberapa burung. Astasantin memberikan warna merah daging salmon dan warna merah kerang matang. Astasantin juga dikenal sebagai komponen nutrisi alami yang dapat digunakan sebagai suplemen makanan. Suplemen ini ditujukan untuk

manusia, hewan, dan akuakultur. Produksi komersial dari astasantin berasal dari sumber alam dan sintetis (Mortensen & Skibsted 1997: 7).

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat mencegah terjadinya reaksi oksidasi senyawa lainnya baik dalam tubuh maupun untuk senyawa-senyawa lain yang mudah teroksidasi. Antioksidan dapat mencegah oksidasi sel-sel tubuh oleh radikal bebas dengan menetralkan atau memusnahkan (*scavenging*) radikal bebas (Lautan 1997: 49). Dalimartha & Soedibyo (1999: 36) menjelaskan, radikal bebas atau oksidan adalah senyawa yang mampu menarik elektron dari berbagai molekul sehingga terjadi oksidasi molekul tersebut. Tipe radikal bebas terdiri dari turunan oksigen akibat oksidasi dalam tubuh, radikal berinti karbon, serta tipe lain seperti inti hidrogen dan inti sulfur. Sumber radikal bebas ada dua yakni endogen dan eksogen. Sumber endogen berasal dari autooksidasi, oksidasi enzimatis, fagositosis, dan ion logam transisi. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang tidak stabil karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbital luarnya sehingga sangat reaktif untuk mendapatkan pasangan elektron dengan mengikat molekul lain yang merupakan komponen di dalam sel tubuh. Apabila hal tersebut terjadi secara terus menerus, dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel sehingga diperlukan antioksidan yang dapat melindungi senyawa dalam tubuh dari kerusakan akibat oksidasi.

Antioksidan digolongkan berdasarkan asal terbentuknya, fungsinya, sumbernya, sifat fisika dan kimianya. Berdasarkan asal terbentuknya, antioksidan dibedakan menjadi antioksidan intraseluler dan ekstraseluler. Berdasarkan fungsinya, antioksidan dikelompokkan menjadi tiga yakni antioksidan primer, sekunder, dan tersier. Antioksidan primer adalah antioksidan yang mencegah pembentukan senyawa radikal baru. Antioksidan sekunder adalah antioksidan yang menangkap senyawa radikal serta mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan tersier merupakan antioksidan yang memperbaiki kerusakan sel-sel jaringan yang disebabkan radikal bebas. Antioksidan berdasarkan sumbernya dibedakan menjadi antioksidan sintetis (misalnya butil hidroksi anisol) dan alami

(misalnya vitamin A, C, dan E), sedangkan menurut sifat fisika dan kimia, antioksidan dibedakan menjadi antioksidan enzimatik dan non enzimatik (Packer *dkk.* 1999: 10).

Prangdimurti (2007: 2) menambahkan, berdasarkan cara kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi antioksidan preventif dan antioksidan peredam radikal. Antioksidan preventif adalah antioksidan yang bekerja dengan cara menekan pembentukan radikal bebas. Antioksidan preventif disebut juga antioksidan sekunder. Contoh antioksidan preventif ialah katalase, glutasi peroksidase seluler dan plasma, fosfolipid hidroperoksidase yang terlibat dalam penguraian hidroperoksida dan hidrogen peroksida, pengkelat logam (contohnya transferrin, laktofen mengikat Fe, haptoglobin mengikat hemoglobin, seruloplasmin, dan albumin mengikat Cu), dan superoksida dismutase.

Antioksidan peredam radikal adalah antioksidan yang bereaksi dengan senyawa radikal untuk memutus rantai propagasi. Umumnya, antioksidan tersebut akan berubah menjadi antioksidan setelah bekerja meredam senyawa radikal. Antioksidan jenis ini disebut juga sebagai antioksidan primer. Berdasarkan sifat kelarutannya, antioksidan primer dibedakan menjadi golongan hidrofilik (vitamin C, asam urat, bilirubin) dan golongan lipofilik (ubiquinol, karotenoid, vitamin E, flavonoid) (Prangdimurti 2007: 2).

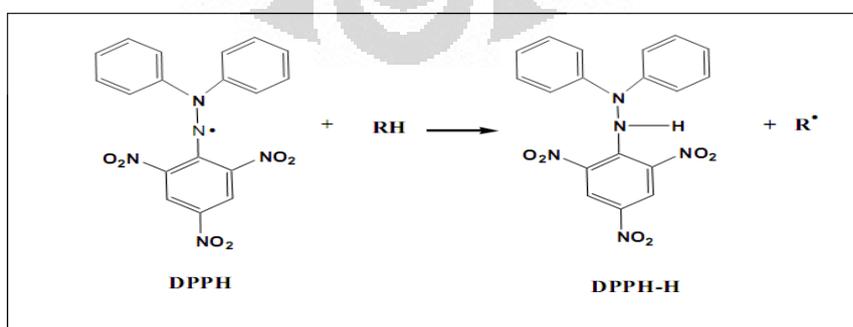
2.3 DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)

Aktivitas antioksidan dapat diukur menggunakan metode *in vitro* dan *in vivo* yakni pada prinsipnya mengukur kemampuan mendonorkan elektron atau atom hidrogen atau penerima elektron lainnya dan menguji kemampuan untuk memindahkan sumber inisiasi oksidatif, seperti inhibisi enzim, menghelat ion logam transisi, dan absorpsi radiasi UV. Metode yang umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan suatu senyawa adalah menggunakan radikal bebas 1,1 Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). Prinsip reaksi metode tersebut adalah mendonorkan atom hidrogen pada radikal DPPH yang berwarna ungu. Reaksi tersebut menghasilkan senyawa non-radikal DPP Hidrazin. Oleh karena itu, absorbansi akan berkurang menjadi kuning pucat atau warnanya hilang. DPPH

yang tersisa diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm. Metode DPPH dipilih karena beberapa alasan yaitu metode ini menguji antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal, mudah dilakukan, dan hemat biaya (Molyneux 2004: 211).

Metode DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi yang 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 menjadi tidak berwarna, yang ketika tereduksi menjadi bentuk nonradikal oleh antioksidan (Sashikumar *dkk.* 2009: 58).

Suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya untuk berikatan dengan DPPH membentuk DPPH tereduksi, ditandai dengan semakin hilangnya warna ungu (menjadi kuning pucat). 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: 219). Peredaman warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin). Reaksi reduksi DPPH dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas
[Sumber: Prakash *dkk.* 2001: 8.]

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen atau zat aktif suatu simplisia menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen-komponen aktif. Beberapa metode yang sering digunakan dalam ekstraksi bahan alam antara lain ekstraksi cara dingin dan ekstraksi cara panas.

Perbedaan utama antara ekstraksi cara dingin dengan ekstraksi cara panas adalah temperatur ekstraksi. Ekstraksi cara dingin dilakukan pada suhu kamar sedangkan ekstraksi cara panas dilakukan pada suhu tinggi yakni berkisar 40--100°C. Maserasi merupakan salah satu ekstraksi cara dingin. Maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut pada botol tertutup dalam suhu kamar. Pengadukan dilakukan sesekali ataupun secara konstan (menggunakan alat pengocok mekanik sehingga didapatkan larutan homogen). Pengadukan dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Setelah lama perendaman dirasa cukup, residu sampel (maserat) harus dipisahkan dari pelarut. Hal tersebut melibatkan proses pemisahan kasar dengan cara dekantasi, biasanya diikuti dengan tahap penyaringan. Sentrifugasi mungkin diperlukan jika serbuk terlalu halus untuk disaring. Sentrifugasi juga dapat dijadikan solusi untuk memisahkan garam dari ekstrak. Untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh, umumnya dilakukan maserasi pendahuluan, yang diikuti pemisahan dan penambahan pelarut baru (*fresh solvent*) ke maserat (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional 2000: 9).

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana, tetapi masih digunakan secara luas karena maserasi memiliki beberapa kelebihan. Maserasi tidak menyebabkan metabolit terdegradasi karena ekstraksi dilakukan pada temperatur kamar. Kelebihan lainnya, maserasi tidak membutuhkan peralatan khusus. Alat yang digunakan seperti Beaker *glass* atau botol yang mudah didapatkan. Meski demikian, maserasi juga memiliki kelemahan. Kelemahan maserasi yakni memerlukan sejumlah besar volume pelarut. Namun, kelemahan tersebut masih dapat diatasi. Pelarut yang telah digunakan untuk maserasi dapat didistilasi sehingga dapat digunakan kembali untuk keperluan lainnya (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional 2000: 10).

2.5 Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenis senyawa menjadi fraksi yang berbeda 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). Fraksinasi dapat dilakukan dengan kromatografi cair-cair. Kromatografi cair-cair adalah teknik pemisahan kromatografi yang menggunakan fase gerak cair (biasanya pelarut atau campuran pelarut) dan fase diam yang juga cair. Teknik tersebut dikenal juga sebagai ekstraksi pelarut berdasarkan kelarutan relatif dalam dua cairan yang tidak saling larut, biasanya air dan pelarut organik, dan menggunakan corong pisah.



BAB 3 METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, FMIPA UI, Depok. Pengukuran serapan DPPH dilakukan di Lab Genetika Departemen Biologi, FMIPA UI, Depok. Penelitian dilakukan selama empat bulan yaitu dari Maret hingga Juni 2012.

3.2 Bahan

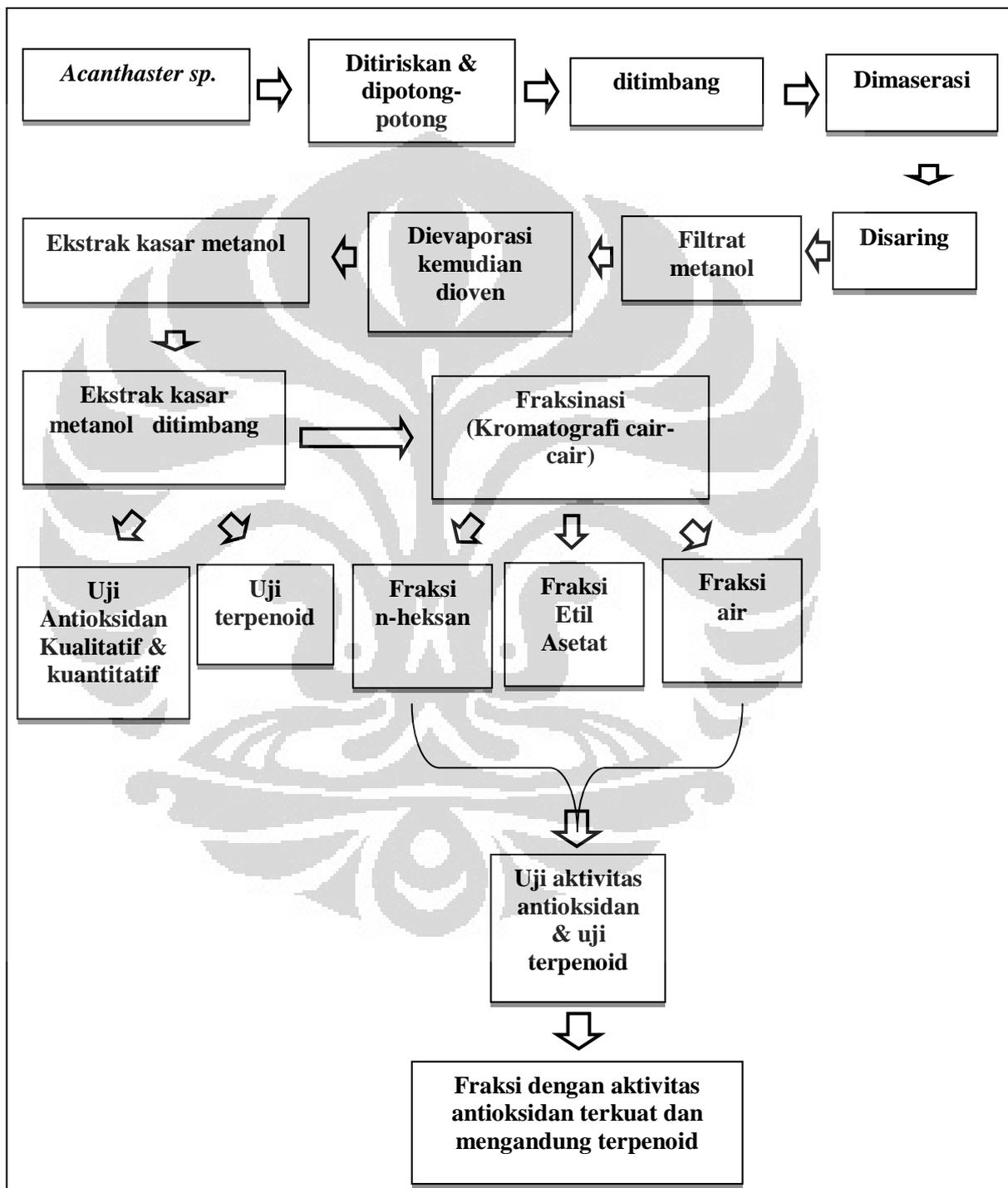
Bahan yang digunakan adalah *Acanthaster* yang dikumpulkan dari perairan Pulau Semak Daun, Pulau Panggang, dan Pulau Pramuka; metanol teknis yang telah didestilasi, bubuk DPPH, ekstrak ascidia *Didemnum* sp., pelarut Liebermann Burchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1)), pelat kromatografi lapis tipis (KLT) *gel silica* 60 F254, etil asetat p.a (Merck), n-heksan p.a (Merck), aquades.

3.3 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah baki plastik, blender [Waring], evaporator [Stuart RE300DB], oven [Precision], lemari pendingin, spektrofotometer UV-Vis [Optima], lemari asam, timbangan digital, gunting, spatula, pinset, pipet tetes, pipet volumetrik 25 ml dan 1 ml, labu ekstrak (*round flask*), corong kaca, corong pisah, botol ekstrak, kertas saring [Whatman No.1: 125], Beaker *glass*, penyemprot kaca, pensil, kertas aluminium foil, tabung reaksi [Iwaki], cawan penguap, masker, sarung tangan, kamera, kertas label, kertas tisu, standar warna [Ace Paint].

3.4 Cara Kerja

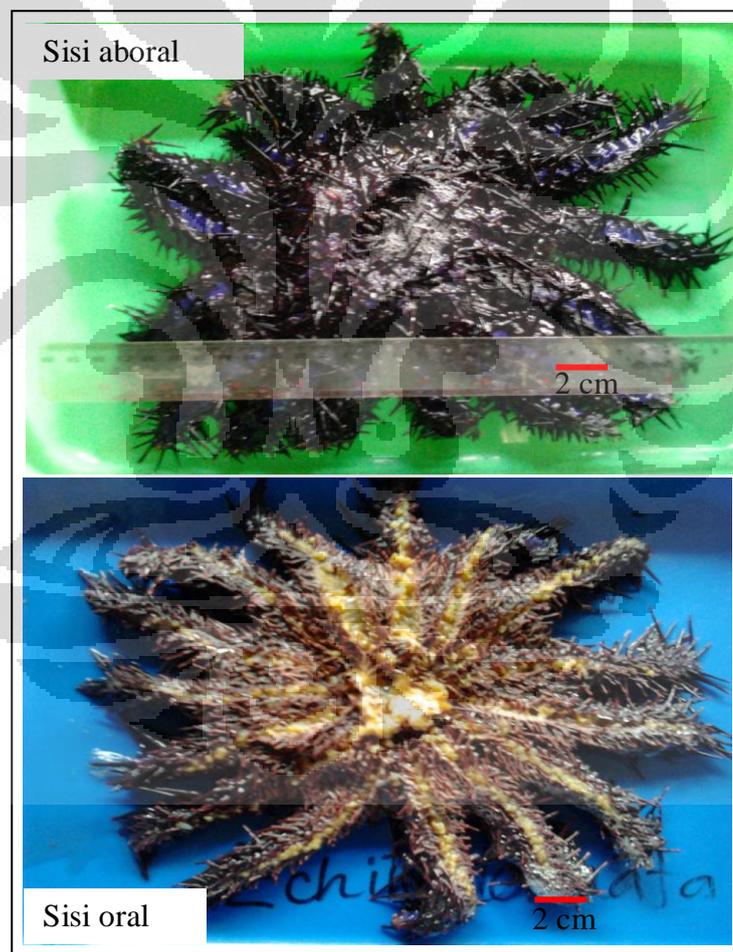
Tahapan kerja secara umum dapat dilihat pada Gambar 3.4 berikut ini:



Gambar 3.4 Tahapan kerja dalam penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

Acanthaster dikoleksi oleh petugas Taman Nasional Kepulauan Seribu, DKI Jakarta secara bebas dari perairan Pulau Semak Daun, Pulau Panggang, dan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta pada kedalaman 2--5 m dengan cara *snorkeling*. *Acanthaster* dikemas dalam kotak *styrofoam* berisi es batu kemudian dikirim ke Muara Angke. Sampel tersebut (Gambar 3.4.1) dibawa ke Lab Taksonomi Hewan Departemen Biologi FMIPA UI untuk dideterminasi dan digunakan sebagai bahan penelitian.



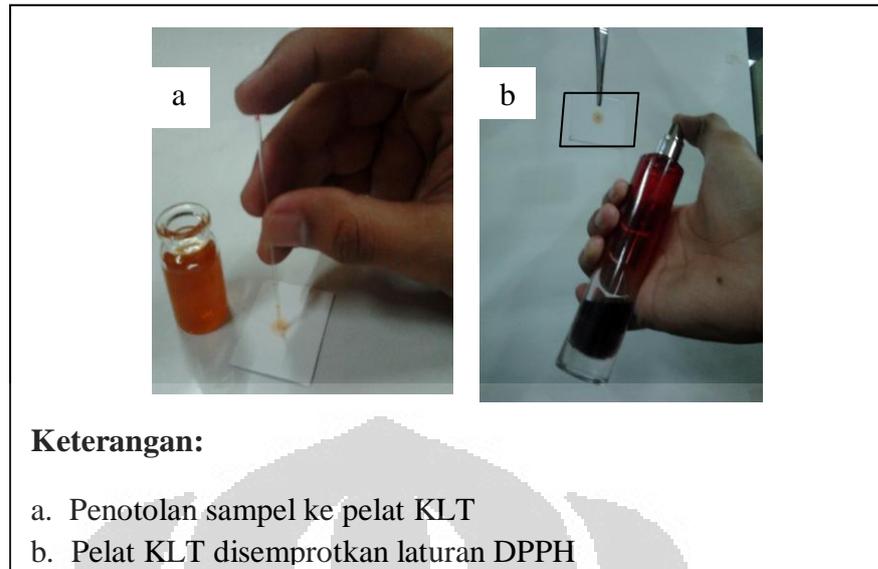
Gambar 3.4.1 Sampel *Acanthaster*
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

3.4.2 Pembuatan Ekstrak

Acanthaster ditiriskan dan dipotong menjadi potongan kecil-kecil kemudian ditimbang hingga mendapatkan massa basah. *Acanthaster* diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam sampel (yang sebelumnya dihaluskan) dengan metanol di dalam botol kaca tertutup kemudian botol kaca tersebut dikocok lalu didiamkan selama sehari semalam. Filtrat metanol disaring. Maserasi dan penyaringan tersebut dilakukan berulang-ulang sampai filtrat metanol tidak berwarna. Filtrat hasil penyaringan dipekatkan dengan cara dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C kemudian dikeringkan dalam oven yang bersuhu $\pm 40^\circ\text{C}$. Setelah kering, ekstrak ditimbang dan selanjutnya disebut sebagai ekstrak kasar metanol.

3.4.3 Uji Kualitatif Antioksidan

Ekstrak dilarutkan dalam metanol lalu dipipet menggunakan pipa kapiler kemudian ditotolkan pada pelat KLT. Penotolan dilakukan berkali-kali pada titik yang sama hingga terbentuk zona penotolan berdiameter 0,5 cm untuk mendapatkan hasil yang optimum. Larutan DPPH disemprotkan ke pelat KLT secara merata kemudian didiamkan sejenak (Gambar 3.4.3). Reaksi antara DPPH dan ekstrak pada pelat KLT diamati dan didokumentasikan. Hasil positif aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan zona penotolan yang tidak terwarnai ungu oleh larutan DPPH atau terbentuk warna kuning pucat (hampir putih) dengan latar belakang ungu.



Gambar 3.4.3.1 Prosedur uji kualitatif antioksidan *Acanthaster*
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

3.4.4 Uji Kuantitatif Antioksidan

Uji kuantitatif aktivitas antioksidan dilakukan dengan menghitung nilai IC_{50} berdasarkan metode Blois (Blois 1958: 1199). Penentuan nilai IC_{50} dilakukan dengan tahapan kerja sebagai berikut:

3.4.4.1 Pembuatan Larutan DPPH

Sejumlah 10 mg bubuk DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a hingga didapatkan konsentrasi DPPH 100 $\mu\text{g/ml}$. Larutan DPPH tersebut ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 400 nm hingga 700 nm, ditentukan panjang gelombang optimumnya yakni 517 nm (Sashikumar *dkk* 2009: 58). Tahap berikutnya adalah membuat larutan blanko. Larutan blanko yang digunakan adalah 1 ml metanol p.a dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml larutan DPPH 100 $\mu\text{g/ml}$, lalu ditambahkan 1 ml metanol dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang

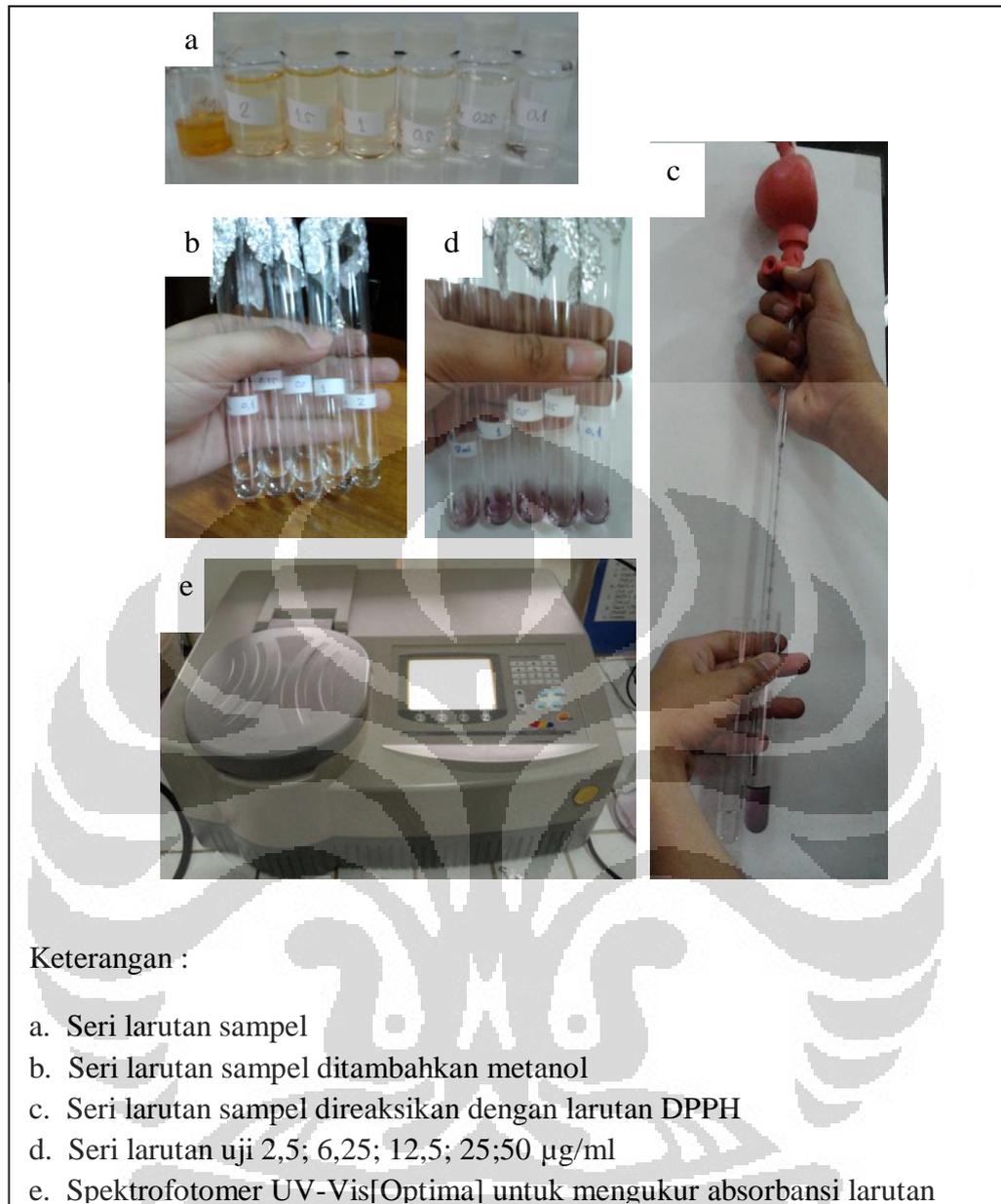
gelombang optimumnya menggunakan spektrofotometer sehingga didapatkan absorbansi blanko.

3.4.4.2 Pembuatan Larutan Uji dan Perbandingan

Larutan sampel adalah larutan ekstrak *Acanthaster*, sedangkan larutan perbandingan adalah larutan ekstrak *Ascidia Didemnum* sp. *Ascidia Didemnum* sp. dijadikan perbandingan dalam penelitian karena biota laut tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} kurang dari 200 $\mu\text{g/ml}$ yakni 105,1029 $\mu\text{g/ml}$ (Edawati 2011: 31). Pembuatan larutan uji dimulai dengan melarutkan 10 mg ekstrak dalam 10 ml metanol hingga didapatkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$. Larutan tersebut dijadikan sebagai larutan induk. Larutan seri 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, dan 200 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dari larutan induk yang dipipet masing-masing secara berurutan 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml dan dimasukkan ke dalam botol vial kemudian masing-masing dicukupkan volumenya dengan metanol p.a hingga 10 ml. Pembuatan larutan perbandingan dilakukan dengan prosedur yang sama dengan pembuatan larutan uji.

3.4.4.3 Pengujian

Larutan seri 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, dan 200 $\mu\text{g/ml}$ masing-masing secara berurutan dipipet 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 ml DPPH 100 $\mu\text{g/ml}$ lalu ditambahkan 1 ml metanol hingga didapatkan seri larutan uji 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$, dan 50 $\mu\text{g/ml}$. Seri larutan uji dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang optimumnya menggunakan spektrofotometer sehingga didapatkan absorbansi DPPH sisa pada setiap konsentrasinya. Prosedur uji kuantitatif antioksidan dapat dilihat pada Gambar 3.4.4.3.



Gambar 3.4.4.3 Prosedur uji kuantitatif antioksidan sampel *Acanthaster*
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

3.4.4.4 Penghitungan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dengan rumus :

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

Setelah didapatkan persentasi inhibisi (y) dari masing-masing konsentrasi (x), titik-titik (x,y) diplot pada bidang koordinat kemudian ditentukan persamaan $y = mx + c$ dengan perhitungan secara regresi linear dimana m dan c adalah konstanta, x adalah konsentrasi sampel ($\mu\text{g/ml}$), dan y adalah persentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration 50* (IC_{50}) yaitu konsentrasi sampel (x) yang dapat meredam 50% radikal DPPH ($y = 50$). Jadi, nilai IC_{50} sama dengan nilai x saat nilai $y = 50$.

3.4.5 Identifikasi Terpenoid dengan Pelarut Lieberman Burchard

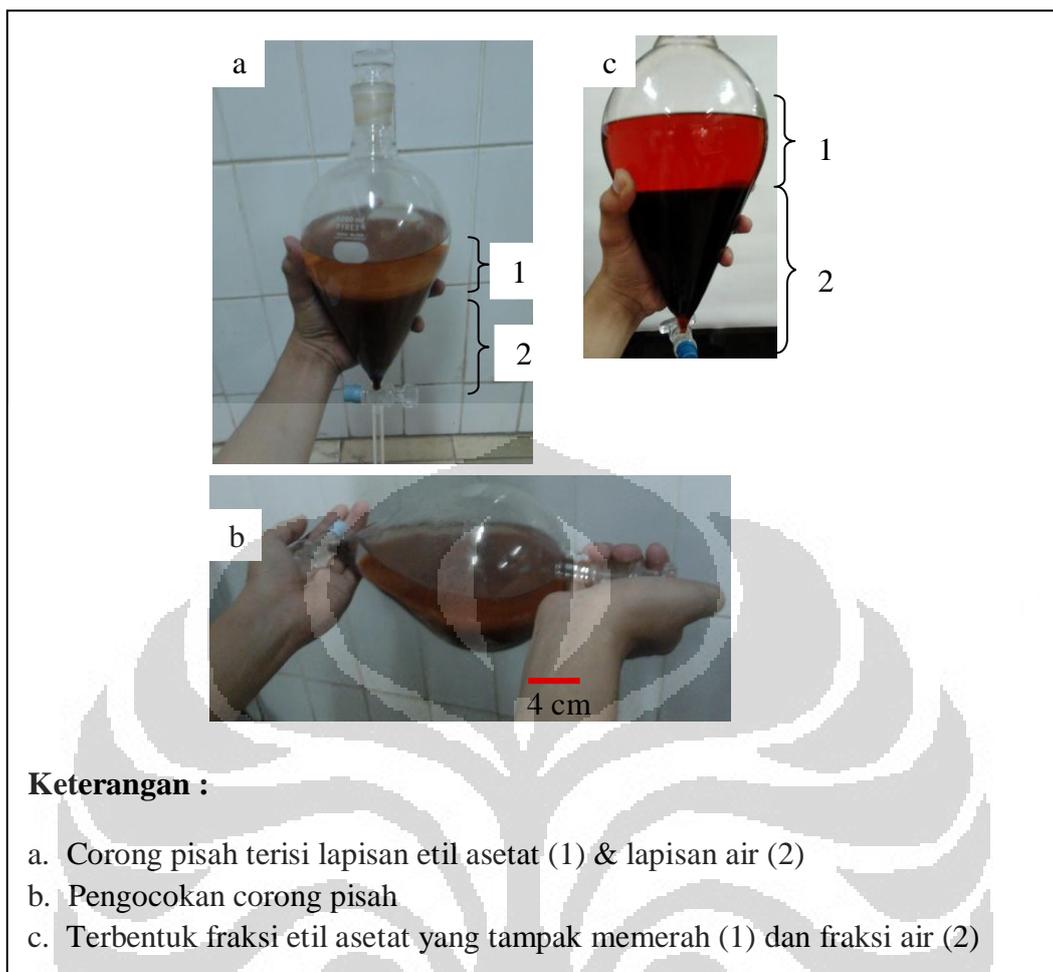
Astasantin yang diduga senyawa aktif yang menimbulkan aktivitas antioksidan pada sampel dideteksi keberadaannya dengan uji terpenoid. Uji terpenoid pada penelitian ini dilakukan menggunakan pelarut Lieberman Burchard (Sayeed 2007: 26). Pelarut Lieberman Burchard dibuat dengan mencampurkan asam asetat anhidrat (glasial) dan asam sulfat dengan perbandingan 2:1. Sedikit ekstrak ditempatkan ke cawan penguap kemudian diletakkan di lemari asam dan ditetaskan pelarut Lieberman Burchard. Hasil positif uji terpenoid ditunjukkan apabila warna ekstrak berubah menjadi merah atau hijau atau violet setelah direaksikan pelarut Lieberman Burchard.

3.4.6 Fraksinasi

Ekstrak metanol *Acanthaster* dilarutkan dalam air 400 ml dan dihomogenkan di dalam *round flask* kemudian dituang ke corong pisah. N-heksan 400 ml ditambahkan ke corong pisah kemudian dikocok hingga terbentuk emulsi kedua pelarut lalu didiamkan hingga terbentuk dua fraksi yang dapat diketahui dari perbedaan warna keduanya yaitu fraksi air pada bagian bawah dan fraksi n-

heksan pada bagian atasnya. Klep yang terdapat di bagian bawah corong pisah dibuka hingga semua air keluar dari corong pisah dan ditampung dalam *round flask*. Fraksi n-heksan yang masih berada di corong pisah dituang ke *round flask* lainnya. Fraksi air yang telah ditampung dalam *round flask* dituang ke corong pisah lalu ditambahkan n-heksan yang baru. Pengocokan dan proses yang sama dengan sebelumnya dilakukan. Proses tersebut dilakukan hingga fraksi n-heksan yang terbentuk di corong pisah tidak berwarna. Fraksi n-heksan yang telah didapatkan kemudian diuapkan menggunakan evaporator selanjutnya dimasukkan ke oven hingga kering.

Fraksi air yang diperoleh dituangkan ke corong pisah kemudian ditambahkan 400 ml etil asetat. Corong pisah dikocok lalu diamkan hingga terbentuk dua fraksi yaitu fraksi air pada bagian bawah corong pisah dan fraksi etil asetat pada bagian atasnya (Gambar 3.4.6.1). Klep dibuka hingga fraksi air keluar dari corong pisah kemudian ditampung dalam *round flask* dan fraksi etil asetat dituang ke *round flask* lain. Fraksi air yang telah ditampung dalam *round flask* dituang ke corong pisah lalu ditambahkan etil asetat yang baru kemudian dilakukan pengocokan dan proses yang sama dengan sebelumnya. Proses tersebut dilakukan hingga fraksi etil asetat yang terbentuk di corong pisah tidak berwarna. Fraksi etil asetat dan air yang telah didapatkan kemudian masing-masing diuapkan menggunakan evaporator dan selanjutnya dimasukkan ke oven hingga kering.



Gambar 3.4.6.1 Fraksinasi
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

3.4.7 Uji Antioksidan dan Uji Terpenoid terhadap Fraksi

Uji antioksidan dan uji terpenoid terhadap fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dilakukan untuk mengetahui fraksi teraktif yang mengandung terpenoid di antara ketiganya. Fraksi teraktif adalah fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} terkecil. Uji kualitatif antioksidan dilakukan dengan prosedur yang sama dengan prosedur pada sub bab 3.4.3, uji antioksidan kuantitatif dengan prosedur yang sama dengan prosedur pada sub bab 3.4.4, dan uji terpenoid dilakukan dengan prosedur yang sama dengan prosedur pada sub bab 3.4.5.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengumpulan Sampel dan Ekstraksi

Acanthaster yang digunakan dalam penelitian berjumlah sembilan individu. Total massa basah *Acanthaster* yang didapat sebanyak 2.001,2 g. Tiap individu berdiameter 25--30 cm dengan 14--16 lengan berwarna biru yang ditutupi duri berwarna merah keunguan atau jingga pada bagian aboral dan memiliki *tube feet* berwarna kuning pada bagian oral (Gambar 3.4.1).

Ekstraksi dengan maserasi pada penelitian dilakukan tiga kali. Filtrat yang didapatkan berwarna merah [Ace Paint (F16): *red rust*] pada perendaman pertama lalu menjadi jingga [Ace Paint (F19): *juice orange*] pada perendaman kedua hingga akhirnya tidak berwarna. Filtrat diuapkan sehingga didapatkan 77 g ekstrak kasar metanol (Gambar 4.1) yang berwarna jingga [Ace Paint (F19): *juice orange*] dan berbau amis. Ekstrak kasar metanol tersebut setara dengan 3,85% massa basah *Acanthaster* (Tabel 4.1).



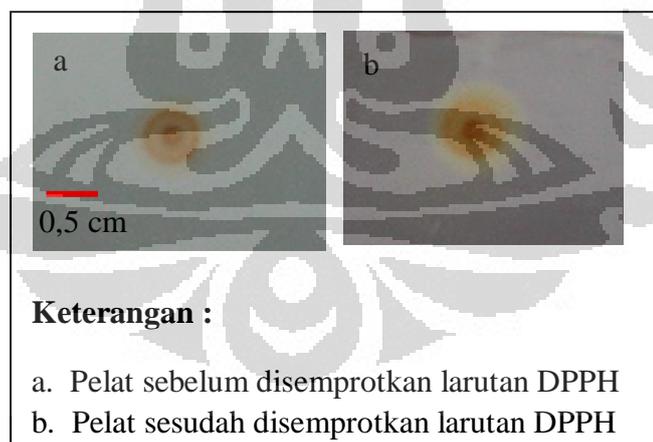
Gambar 4.1 Ekstrak kering metanol *Acanthaster*
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.1 Bobot ekstrak kasar metanol *Acanthaster*

Bobot basah sampel	Bobot ekstrak	Persentase ekstrak dalam bobot basah	Warna
2.001,2 gram	77 gram	3,85%	<i>Juice Orange</i> (F19)

4.2 Uji Kualitatif Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol *Acanthaster*

Pada uji kualitatif antioksidan, ekstrak dilarutkan dalam metanol lalu dipipet menggunakan pipa kapiler kemudian ditotolkan hingga membentuk zona berdiameter 0,5 cm di pelat KLT *gel silica* 60 F254. Larutan DPPH yang mempunyai komposisi 10 mg dalam 100 ml metanol disemprotkan ke pelat KLT. Hampir semua bagian pelat KLT terwarnai ungu oleh larutan DPPH kecuali pada zona totolan ekstrak yang berwarna kuning pucat (Gambar 4.2). Hal tersebut menunjukkan ekstrak kasar metanol memiliki senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan



Gambar 4.2 Hasil uji kualitatif antioksidan ekstrak metanol *Acanthaster*

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.3 Uji Kuantitatif Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol *Acanthaster* dan Pembedingnya

Uji kuantitatif terhadap ekstrak kasar metanol dapat dilakukan setelah uji kualitatif antioksidan menunjukkan hasil positif. Uji kuantitatif dilakukan dengan menghitung persentase inhibisi seri larutan uji. Nilai IC_{50} dipakai untuk mengetahui konsentrasi larutan uji yang dapat menginhibisi 50% aktivitas radikal bebas. Nilai IC_{50} ekstrak metanol yang diperoleh yakni 102,946 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 4.3(1)). Prosedur tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.4.4.3. Proses yang sama dilakukan terhadap pembeding yakni ekstrak ascidia *Didemnum* sp. dan didapatkan nilai IC_{50} 118,373 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 4.3(2)). Nilai IC_{50} ekstrak metanol lebih kecil dari nilai IC_{50} pembeding. Hal tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan ekstrak metanol *Acanthaster* lebih baik dari *Didemnum* sp. meski keduanya termasuk antioksidan yang kuat (memiliki nilai $IC_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$).

Tabel 4.3(1) Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar metanol *Acanthaster*

Konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan blanko	Serapan sampel	Persentase inhibisi (%)	Pers. regresi	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
10	2,5	1,055	1,042	1,232	y = 0,4407x + 4,6318	102,946
25	6,25		0,94	10,900		
50	12,5		0,927	12,133		
100	25		0,885	16,114		
150	37,5		0,854	19,052		
200	50		0,767	27,298		

Tabel 4.3(2) Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar metanol ascidia *Didemnum* sp.

Konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan blanko	Serapan sampel	Persentase inhibisi (%)	Pers. regresi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
10	2,5	0,770	0,535	30,51948	y= 0,1568x + 31,439	118,373
25	6,25		0,513	33,37662		
50	12,5		0,509	33,8961		
100	25		0,498	35,32468		
150	37,5		0,481	37,53247		

4.4 Uji Terpenoid Ekstrak Kasar Metanol *Acanthaster*

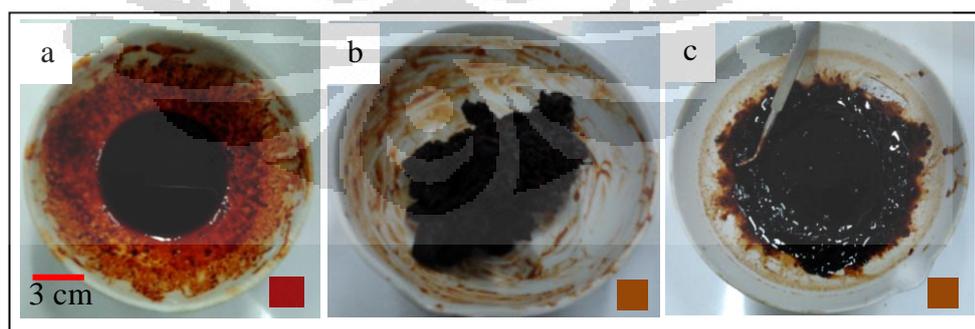
Uji terpenoid ekstrak kasar metanol *Acanthaster* menunjukkan hasil positif. Ekstrak kasar berubah warna menjadi hijau setelah ditetaskan pelarut Lieberman Burchard (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Uji terpenoid terhadap ekstrak metanol *Acanthaster*
[Sumber: Dokumentasi pribadi]

4.5 Fraksinasi

Ekstrak kasar metanol masih mengandung banyak senyawa baik polar maupun non polar. Metanol dapat melarutkan berbagai senyawa dan memiliki daya ekstraksi dengan rentang kepolaran yang cukup luas (Edawati 2011: 20). Oleh karena itu, fraksinasi, suatu proses pemisahan senyawa berdasarkan kepolaran pelarut, penting dilakukan untuk memisahkan senyawa polar dan non polar yang terdapat dalam ekstrak metanol. Hal tersebut bertujuan mempersempit lingkup analisis. Fraksinasi yang dilakukan menggunakan pelarut polar, semi polar, dan non polar, yakni air, etil asetat, dan n-heksan. Sebanyak 70 g ekstrak kasar metanol dilarutkan dalam 400 ml air kemudian dikocok setelah ditambahkan sejumlah n-heksan dan etil asetat. Fraksinasi tersebut membutuhkan 4 x 400 ml heksan dan 3 x 400 ml etil asetat. Hasil fraksinasi yang didapatkan berupa 25 g fraksi air; 4 g fraksi etil asetat; dan 18,3 g fraksi n-heksan (Tabel 4.5). Ketiga fraksi memiliki warna yang berbeda. Fraksi etil asetat berwujud seperti minyak dan berwarna kemerahan [Ace Paint (F16): *red rust*], fraksi n-heksan berwujud padat berwarna jingga keemasan [Ace Paint (F22): *thai gold*], sedangkan fraksi air berwujud padat dan lengket serta berwarna kecokelatan [Ace Paint (C24-7): *lenox brown*] (Gambar 4.5).



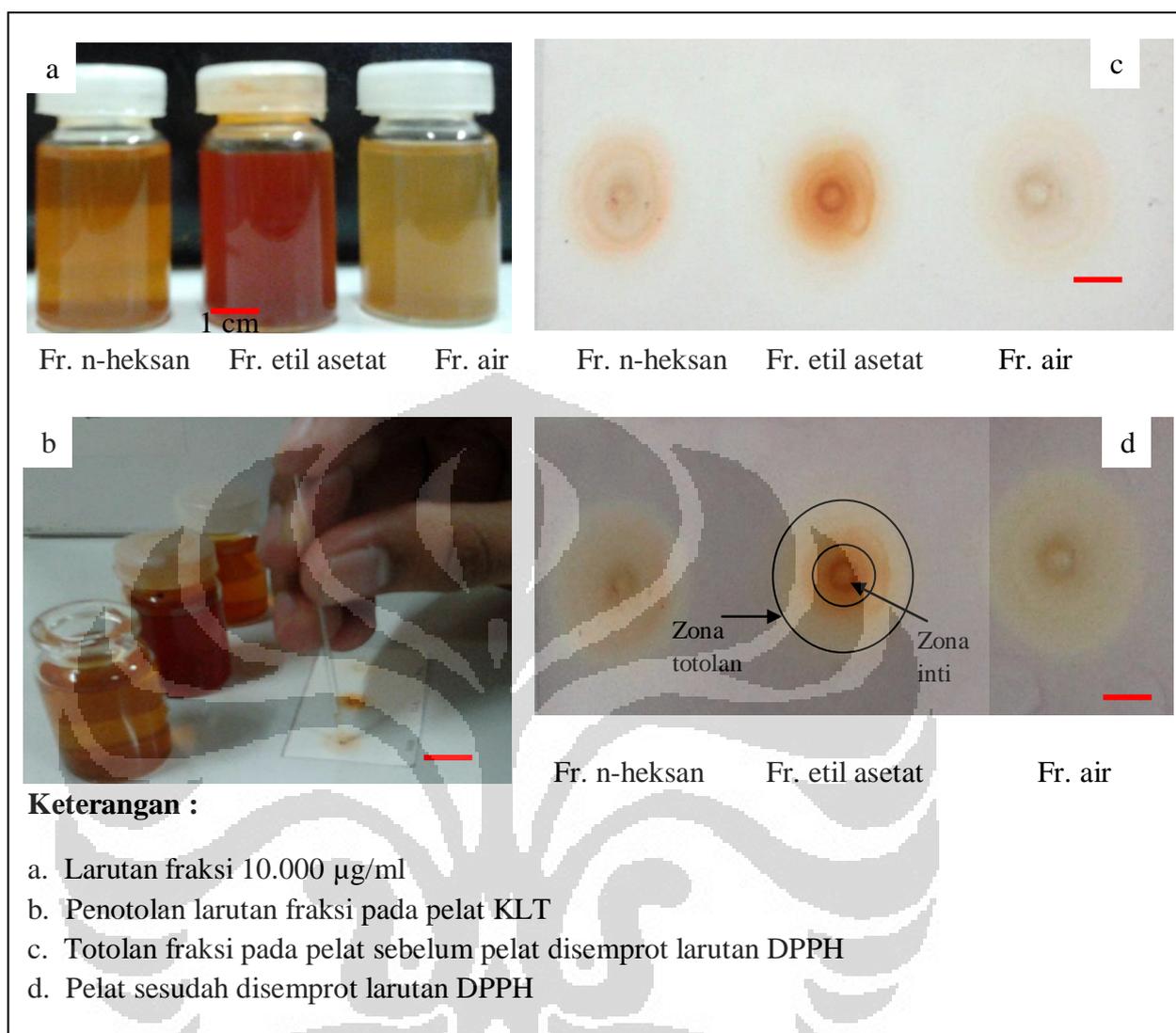
Gambar 4.5 Hasil fraksi beserta kotak standar warna tiap fraksi [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.5 Hasil fraksinasi

Hasil fraksi	Bobot ekstrak metanol	Bobot fraksi	Persentase bobot	Warna
Heksan	70 gram	18,3 gram	26,143%	Thai Gold (F22)
Etil asetat		4,2 gram	6%	Red rust (F16)
Air		31,5 gram	45%	Lenox brown (C24-7)

4.6 Uji Kualitatif Antioksidan Fraksi

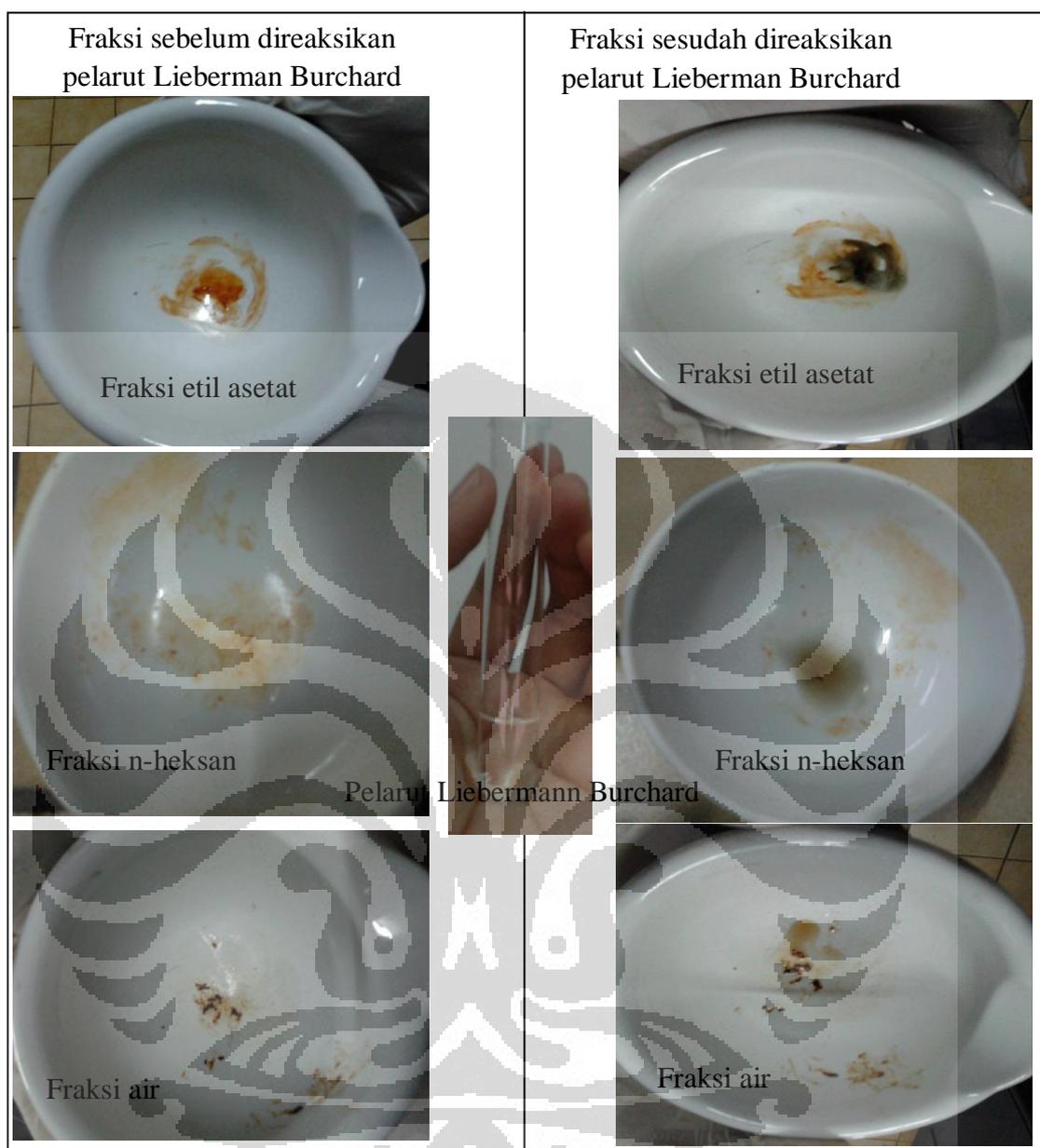
Identifikasi aktivitas antioksidan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air diawali dengan melarutkan 0,1 g fraksi dalam 10 ml metanol sehingga didapatkan konsentrasi 10.000 µg/ml (Gambar 4.6). Tiap larutan fraksi diteteskan ke pelat KLT secara sejajar kemudian disemprotkan larutan DPPH secara merata pada pelat. Pelat terwarnai ungu, sedangkan ketiga zona totolan fraksi menjadi berwarna kuning pucat dengan zona inti totolan yang bervariasi kepekatan warnanya (Gambar 4.6). Hal tersebut menunjukkan ketiga fraksi memiliki aktivitas antioksidan dengan kemampuan yang berbeda-beda. Fraksi etil asetat memiliki zona inti totolan yang memiliki warna paling pekat. Hal tersebut dapat diartikan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling kuat pada uji kualitatif.



Gambar 4.6 Uji kualitatif antioksidan terhadap fraksi
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.7 Uji Terpenoid terhadap Fraksi

Uji terpenoid dilakukan terhadap ketiga fraksi dengan meneteskan pelarut Liebermann Burcard ke ekstrak yang dioleskan di cawan penguap. Fraksi etil asetat dan n-heksan berubah warna menjadi hijau kehitaman (pekat) sedangkan fraksi air nyaris tidak berubah warna (Gambar 4.7). Hal tersebut menunjukkan hanya fraksi air yang tidak mengandung terpenoid.



Gambar 4.7 Uji terpenoid menggunakan pelarut Liebermann Burchard
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.8 Uji Kuantitatif Antioksidan terhadap Fraksi

Uji kuantitatif antioksidan terhadap fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dilakukan dengan menghitung nilai IC_{50} ketiganya. Nilai IC_{50} ketiga fraksi dapat diketahui setelah mereaksikan seri larutan fraksi dengan larutan DPPH dan metanol lalu mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis

kemudian membuat persamaan regresi konsentrasi larutan uji dan persentase inhibisi. Nilai IC₅₀ n-heksan, etil asetat, dan air yang diperoleh secara berurutan yaitu 100,084 µg/ml; 74,481 µg/ml; dan 194,652 µg/ml (Tabel 4.8(1), Tabel 4.8(2), 4.8(3)). Nilai IC₅₀ ketiga fraksi yang kurang dari 200 µg/ml, menunjukkan ketiganya termasuk antioksidan yang kuat.

Tabel 4.8(1) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi n-heksan *Acanthaster*

Konsentrasi fraksi (µg/ml)	Konsentrasi uji (µg/ml)	Serapan blanko	Serapan sampel	Persentase inhibisi (%)	Pers regresi	IC ₅₀ (µg/ml)
10	2,5	0,803	0,797	0,747	y= 0,4665x + 3,3614	100,084
25	6,25		0,735	8,468		
50	12,5		0,71	11,581		
100	25		0,691	13,948		
150	37,5		0,622	22,540		
200	50		0,600	25,280		

Tabel 4.8(2) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat *Acanthaster*

Konsentrasi fraksi (µg/ml)	Konsentrasi uji (µg/ml)	Serapan blanko	Serapan sampel	Persentase inhibisi (%)	Pers regresi	IC ₅₀ (µg/ml)
10	2,5	1,055	0,983	6,825	y= 0,54x + 9,7801	74,481
25	6,25		0,966	8,436		
50	12,5		0,804	23,791		
100	25		0,754	28,531		
150	37,5		0,732	30,616		
200	50		0,710	32,701		

Tabel 4.8(3) Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi air *Acanthaster*

Konsentrasi fraksi ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan blanko	Serapan sampel	Persentase inhibisi (%)	Pers regresi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
10	2,5	0,803	0,801	0,249066	y= 0,2568x + 0,1696	194,652
25	6,25		0,795	0,996264		
50	12,5		0,786	2,117061		
100	25		0,719	10,46077		
150	37,5		0,717	10,70984		
200	50		0,716	10,83437		

4.9 Analisis Bobot Ekstrak, Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Terpenoid

Bobot ekstrak kasar *Acanthaster* yang didapat yakni 3,85% dari bobot basah sampel mendekati nilai persentase ekstrak ascidia *Didemnum* sp. yang dipakai sebagai pembanding pada penelitian yaitu 4% (Edawati 2011: 45). Persentase tersebut termasuk dalam kisaran persentase ekstrak biota laut pada umumnya yakni 1,5--15% (Schupp 2000: 71). Ascidia *Didemnum* sp. dijadikan pembanding pada penelitian karena ascidia adalah biota laut dan aktivitas antioksidannya telah diteliti sebelumnya. Ekstrak kasar *Acanthaster* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat daripada pembandingnya yaitu ascidia *Didemnum* sp. Artinya, *Acanthaster* lebih berpotensi dijadikan sumber antioksidan daripada ascidia *Didemnum* sp. Namun, aktivitas antioksidan *Acanthaster* dengan nilai IC₅₀ 102,946 $\mu\text{g/ml}$ masih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan spons *Callyspongia* sp. yang diteliti oleh Hanani, Mun'im, dan Sekarini Endang pada tahun 2005 yakni dengan nilai IC₅₀ sebesar 41,21 $\mu\text{g/ml}$ (Edawati 2011: 31). Meski aktivitas antioksidan *Acanthaster* lebih rendah daripada *Callyspongia*, pemilihan *Acanthaster* sebagai sumber antioksidan tetap menjadi keputusan yang tepat mengingat pemanfaatan *Acanthaster* dapat meningkatkan nilai manfaat bagi *Acanthaster* dan dapat mengurangi kematian polip karang secara masif akibat pemangsaan oleh *Acanthaster*. Artinya, secara

ekologis, pemanfaatan *Acanthaster* sebagai sumber antioksidan dapat mendatangkan keuntungan bagi kelestarian ekosistem terumbu karang.

Total bobot fraksi yang didapat adalah 54 gram dengan fraksi air sebagai fraksi dengan bobot terbanyak yakni 31 gram. *Acanthaster* memiliki senyawa seperti protein (21% berat kering), ion Ca (24% berat kering), P (mg/g berat kering), dan molekul pelembab (*moisture*) (68%) (Luo *dkk.* 2011: 2). Senyawa tersebut yang bersifat polar diduga masuk ke fraksi air sehingga bobotnya paling banyak di antara fraksi lainnya.

Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif maupun kuantitatif menunjukkan fraksi etil asetat dan n-heksan memiliki aktivitas antioksidan terkuat bahkan jika dibandingkan dengan aktivitas antioksidan ekstrak kasar metanol. Kedua fraksi juga terbukti mengandung terpenoid setelah direaksikan pelarut Liebermann Burchard. Hal tersebut menandakan senyawa terpenoid masuk ke dalam pelarut etil asetat dan pelarut n-heksan saat fraksinasi dan menimbulkan aktivitas antioksidan saat disemprotkan larutan DPPH.

Senyawa terpenoid merupakan senyawa non polar yang bersifat hidrofobik dan masih dapat larut di alkohol (Sayeed 2007: 24). Senyawa terpenoid yang memiliki aktivitas antioksidan adalah terpenoid tidak jenuh, memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, sehingga dapat mendonorkan atom hidrogen (Capelli 2007: 7). Contoh senyawa terpenoid yang memiliki aktivitas antioksidan adalah astasantin, yakni pigmen merah alami pada salmon, alga, udang, dan juga ditemukan pada *Acanthaster*. Secara kepolaran, astasantin, memiliki keunikan yakni dapat larut di senyawa semipolar seperti etil asetat karena gugus OH yang dimilikinya (Capelli 2007: 7 & Luo *dkk.* 2011: 6). Oleh karena itu, tidak mengherankan jika fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan terkuat karena diduga banyak astasantin terdapat di fraksi tersebut.

Profil senyawaan fraksi n-heksan dan etil asetat yang memiliki aktivitas antioksidan dengan $IC_{50} \pm 100 \mu\text{g/ml}$ dan sama-sama mengandung terpenoid mengisyaratkan kedua fraksi tidak berbeda secara signifikan sehingga kedua fraksi dapat digabung menjadi satu. Hal tersebut juga mengisyaratkan pemisahan senyawaan dengan fraksinasi memberikan hasil yang tidak maksimal. Fraksinasi

hanya dapat membagi menjadi dua fraksi yakni fraksi non polar (fraksi etil asetat digabung dengan fraksi n-heksan) dan fraksi polar yakni fraksi air.

Fraksi air memiliki profil senyawaan yang berbeda. Uji terpenoid menunjukkan hasil negatif setelah mengamati fraksi air yang tidak berubah warna saat direaksikan dengan pelarut Lieberman Burchard (Gambar 4.7). Namun, uji kualitatif dan kuantitatif antioksidan menunjukkan fraksi air tetap memiliki aktivitas antioksidan bahkan masih tergolong sebagai antioksidan yang kuat (Tabel 4.9). Analisis hasil uji tersebut memunculkan kemungkinan bahwa ada senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan selain terpenoid, meski pengujian terhadap senyawa lain tersebut tidak dilakukan pada penelitian. Senyawa yang bersifat antioksidan dan larut di air adalah fenol, flavonoid, dan alkaloid (Ghasemi 2008: 2; Sayeed 2007: 15).

Tabel 4.9 Uji antioksidan dan uji terpenoid ekstrak dan fraksi *Acanthaster*

Sampel <i>Acanthaster</i>	Uji kualitatif antioksidan	Nilai IC ₅₀ (µg/ml)	Uji terpenoid
Ekstrak kasar	+	102,946	+
Fraksi n-heksan	+	100.084	+
Fraksi etil asetat	+	74,481	+
Fraksi air	+	194.652	-

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak metanol *Acanthaster* mengandung terpenoid dan senyawa polar yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.
2. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan terkuat.
3. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan disebabkan oleh terpenoid, sedangkan aktivitas antioksidan fraksi air disebabkan oleh senyawa polar yang terkandung di dalamnya.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan senyawa lebih lanjut untuk memperoleh senyawa yang murni sehingga dapat dibuktikan bahwa terpenoid yang terkandung adalah astasantin atau derivatnya.
2. Pemisahan senyawa sebaiknya dilakukan menggunakan metode selain kromatografi cair-cair, misalnya kromatografi kolom vakum, agar didapatkan fraksi yang lebih banyak lagi.
3. Perlu dilakukan uji senyawa lainnya untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat di fraksi air.

DAFTAR ACUAN

- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Biochemistry* **181**: 1199--1200.
- Capelli, B. & G. Cysewski. 2007. Natural astaxanthin: kingdom of the carotenoid. *Nature* **78**: 7.
- Dalimartha, S. & M. Soediby. 1999. *Awet muda dengan tumbuhan obat dan diet suplemen*. Trubus Agriwidya, Jakarta: v + 80 hlm.
- Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. 2000. *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta: x + 91 hlm.
- Edawati, Zulfa. 2011. *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 Sarjana S1 Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia, Depok: vii + 63 hlm.
- Ghasemi, K. 2008. *Antioxidant activity, phenol, an flavonoid contents of citrus*. University of Agricultural Science, Iran: 12 hlm.
- Ginting, M., A.M. Satria & R. Khalil. 2007. *Perairan Nusantara*. Universitas Diponegoro: iii + 56 hlm.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode fitokimia*. Terj. dari *Biochemistry Methode*, oleh Padmawinata & I. Soediro. ITB, Bandung: 30 hlm.
- Hobbs, J.P.A. & J.K. Salmond. 2008. Cohabitation of Indian and Pacific Ocean species at Christmas and Cocos (Keeling) Islands. *Coral Reefs* **27**(9):933--940.
- Jain, K. 2004, Effect of UV-B radiation on antioxidant enzymes and its modulation by benzoquinone and α -tocopherol in cucumber cotyledons, *Current Science* **87**(2): 2--15.
- Lane, D. J. W. 1996. A crown of thorns outbreak in the eastern Indonesian Archipelago. *Coral Reefs* **15**: 209--210.
- Lautan, J. 1997. Radikal bebas pada eritrosit dan leukosit. *Cermin Dunia Kedokteran* **9**(116): 49--52.

- Lucas, J.S. 2003. *Saponins in eggs and larvae of Acanthaster planci (L.)(Asteroidea) as chemical defences against planktivorous fish*. James Cook University, Queensland: 10 hlm.
- Luo, P., Chaoqun, J. Jun, C. Ren & X. Jiang. 2011. Chemical constituent analysis of the crown of thorns starfish *Acanthaster planci* and potential utilization value of the starfish as feed ingredient for animal. *African Journal of Biotechnology* **10**(62): 1--7.
- Mamelona, J., É. Pelletier, K. Girard-Lalancette, J. Légault, S. Karboune & S. Kermasha. 2011. Antioxidants in digestive tracts and gonads of green urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**: 179-183.
- 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.
- Moran, P.J. 1990. *Acanthaster planci* (L.): biographical data. *Coral Reefs* **9**:95--96.
- Mortensen, A. & L.H. Skibsted. 1997. Importance of carotenoid structure in radical scavenging reactions. *Journal Agriculture Food Chemistry* **45** (8): 2970--2985.
- Mutee . 2007. *Metode evaluasi antioksidan secara in vitro dan in vivo*. Fakultas Teknologi Pertanian ITB, Bogor: v + 53 hlm.
- Niles, C.J. 2003. *Acanthaster plancii*. *Coral Reefs* **5**:4--19.
- Packer, L.M., T. Hiramatsu & Yoshikawa. 1999. *Antioxidant food supplement in human health*, Academic Press: v + 14 hlm.
- Poumorad, F., Hosseinimehr & Shahabimajd. 2006. Antioxidant activity phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *African Journal Of Biotechnology* **1**: 1142--1145.
- Prakash, A., Rigelhof & F. Miller. 2001. Antioxidant Activity. *Medalliaon Laboratories Analytical Progress* **10**(2): 8.
- Prangdimurti, Endang. 2007. *Metode evaluasi antioksidan secara in vitro dan in vivo*. Fakultas Teknologi Pertanian ITB, Bogor: v + 53 hlm.

- Rohdiana, D. 2001. Aktivitas daya tangkap radikal polifenol dalam daun teh, *Majalah Jurnal Indonesia* **12**(1):53--58.
- Reynertson, K.A. 2007. Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible myrtaceae fruit. University of New York, New York: ix + 79 hlm.
- Sashikumar, J. M., Maheshu & Jayadev. 2009. In vitro antioxidant activity of metanolic extracts of berberis tinctoria lesch. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* **3**(2): 53--58.
- Sayed, A. 2007. *Introduction of plant constituents and their tests* . New Delhi University, New Delhi: 40 hlm.
- Schupp, P. 2000. *Structure elucidation, biological activity and ecology of secondary metabolites from Micronesian marine invertebrates*. Disertasi Pasca-Sarjana S3 Bayerischen Julius-Maximilians-Universitat, Wurzburg: viii + 202 hlm.
- Setyastuti, A. 2009. Biologi dan ekologi bintang laut mahkota duri. *Jurnal Oseana* **34**(4): 17--24.
- Yusuf, S.2008. *Fenomena ledakan populasi acantahster planci dan pola pemangsaan pada karang keras di Pulau Kapoposang, Sulawesi Selatan*.*Simposium Terumbu Karang Nasional*. Jakarta: 25 hlm.

Lampiran 1

Pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/ml

Ekstrak metanol ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol

$$\text{Larutan induk} = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1.000 = 1.000 \text{ µg/ml}$$

Lampiran 2

Pembuatan seri larutan sampel dengan berbagai konsentrasi

Larutan induk dipipet sebanyak 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml kemudian masing-masing dicukupkan volumenya menjadi 10 ml dengan ditambahkan metanol

$$\text{Konsentrasi 1} = \frac{0,1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1.000 = 10 \text{ µg/ml}$$

$$\text{Konsentrasi 2} = \frac{0,25 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1.000 = 25 \text{ µg/ml}$$

$$\text{Konsentrasi 3} = \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1.000 = 50 \text{ µg/ml}$$

$$\text{Konsentrasi 4} = \frac{1,0 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1.000 = 100 \text{ µg/ml}$$

$$\text{Konsentrasi 5} = \frac{1,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1.000 = 150 \text{ µg/ml}$$

$$\text{Konsentrasi 6} = \frac{2,0 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1.000 = 200 \text{ µg/ml}$$

Lampiran 3
Pembuatan seri larutan uji

Seri larutan ekstrak dipipet 1,0 ml kemudian ditambahkan 2,0 ml metanol lalu direaksikan dengan 1,0 ml larutan DPPH

$$\text{Larutan uji 1} = \frac{10 \mu\text{g/ml}}{4} = 2,5 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Larutan uji 2} = \frac{25 \mu\text{g/ml}}{4} = 6,25 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Larutan uji 3} = \frac{50 \mu\text{g/ml}}{4} = 12,5 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Larutan uji 4} = \frac{100 \mu\text{g/ml}}{4} = 25 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Larutan uji 5} = \frac{150 \mu\text{g/ml}}{4} = 37,5 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Larutan uji 6} = \frac{200 \mu\text{g/ml}}{4} = 50 \mu\text{g/ml}$$

Lampiran 4

Contoh perhitungan IC₅₀ ekstrak kasar metanol

1. Persentase inhibisi (%)

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Inhibisi larutan uji 1} = \frac{1,055 - 1,042}{1,055} \times 100\% = 1,232$$

$$\% \text{ Inhibisi larutan uji 2} = \frac{1,055 - 0,940}{1,055} \times 100\% = 10,900$$

$$\% \text{ Inhibisi larutan uji 3} = \frac{1,055 - 0,927}{1,055} \times 100\% = 12,133$$

$$\% \text{ Inhibisi larutan uji 4} = \frac{1,055 - 0,885}{1,055} \times 100\% = 16,114$$

$$\% \text{ Inhibisi larutan uji 5} = \frac{1,055 - 0,854}{1,055} \times 100\% = 19,052$$

$$\% \text{ Inhibisi larutan uji 6} = \frac{1,055 - 0,767}{1,055} \times 100\% = 27,298$$

2. Nilai IC₅₀

Persamaan regresi $y = mx + c$

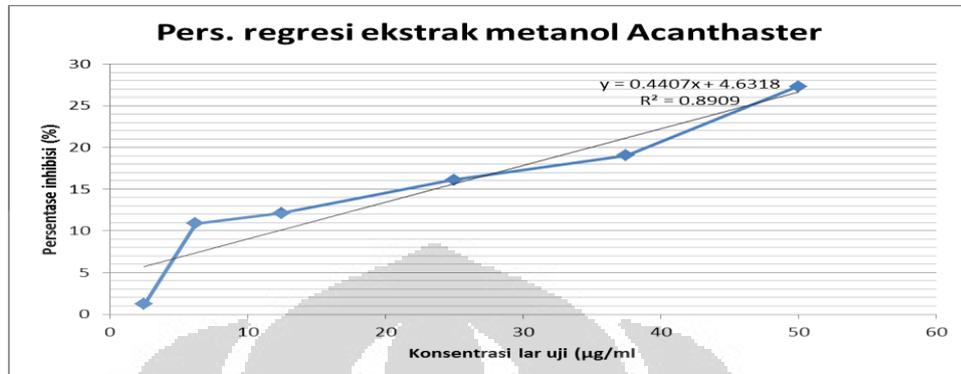
$$IC_{50} = \frac{50 - c}{m}$$

Persamaan regresi ekstrak Metanol $y = 0,4407x + 4,6318$

$$IC_{50} = \frac{50 - 4,6318}{0,4407} = 102,946 \mu\text{g/ml}$$

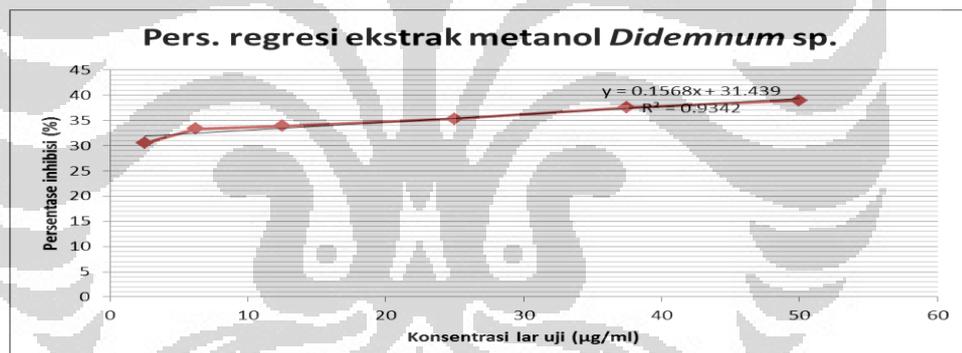
Lampiran 5

Persamaan regresi ekstrak kasar metanol *Acanthaster*



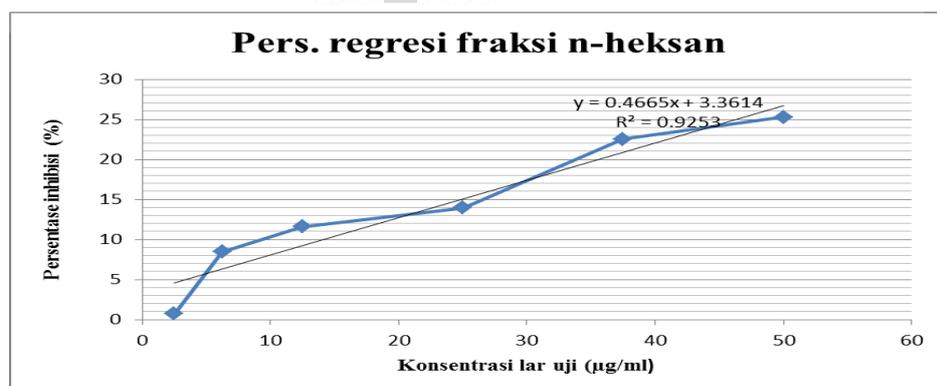
Lampiran 6

Persamaan regresi ekstrak kasar metanol ascidia *Didemnum* sp.

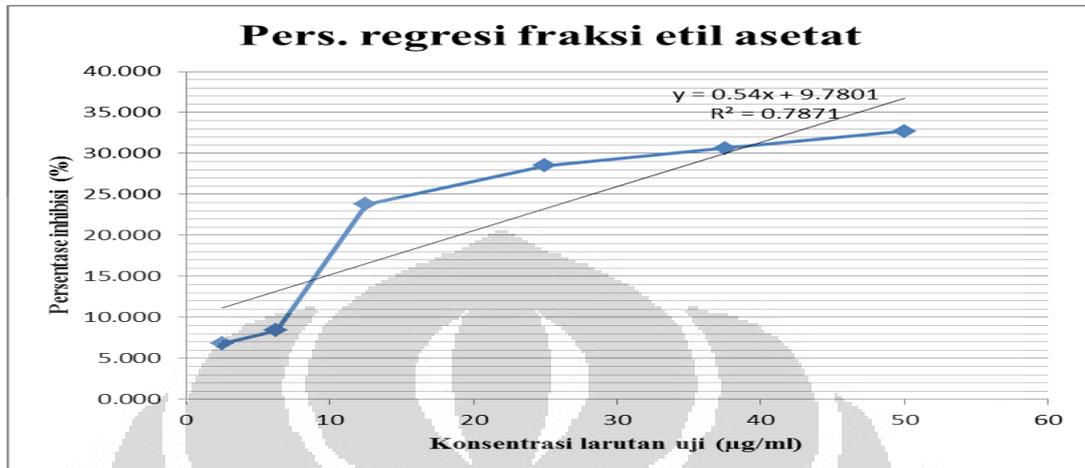


Lampiran 7

Persamaan regresi fraksi n-heksan *Acanthaster*



Lampiran 8

Persamaan regresi fraksi etil asetat *Acanthaster*

Lampiran 9

Persamaan regresi fraksi air *Acanthaster*