

IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIOKSIDAN DALAM SPONS *CALLYSPONGIA SP* DARI KEPULAUAN SERIBU

Endang Hanani, Abdul Mun'im, Ryany Sekarini
Departemen Farmasi, FMIPA-UI, Kampus UI Depok 16424

ABSTRACT

Antioxidant activity and identification of antioxidative compounds of Callyspongia sponge from Seribu Island (Kepulauan Seribu) were investigated. The sponge was extracted with acetone and the extract was concentrated using rotary vacuum evaporator. DPPH and tiocyanate methods were used to examine the antioxidant activity of the extract. The extract exhibited strong antioxidant activity in DPPH method with IC_{50} of 41.21 $\mu\text{g/ml}$. Chemical analysis indicated that the antioxidative compound in the sponge was alkaloid group.

Key words : Antioxidative activity, Callyspongia sp., Sponges, alkaloid.

PENDAHULUAN

Sampai saat ini pemanfaatan biota laut di Indonesia masih belum optimal terutama di bidang farmasi. Beberapa senyawa yang memiliki aktifitas farmakologi sudah berhasil diisolasi dari spons. Didemnin B merupakan senyawa hasil isolasi dari *Trididemnum solidum* dilaporkan mempunyai aktivitas antitumor dan antivirus. Dalam spons *Luffariella variabilis* terdapat senyawa Luffariellolida yang berkhasiat anti-inflamasi (David and Oscar, 1993). *Callyspongia sp.* merupakan salah satu jenis spons yang banyak tumbuh di perairan wilayah Indonesia. Spons ini adalah salah satu biota laut yang mengandung berbagai metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan

sebagai bahan obat (Satari, 1999). Isolat dari spons ini dilaporkan memiliki aktivitas antikanker, antimikroba dan antiparasit (Amir dan Budiyanto, 1996).

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 aktifitas radikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit jantung dan kanker (Boer, 2000). Antioksidan diketahui dapat menghambat kerja radikal bebas. Sebagai salah satu upaya untuk mengoptimalkan pemanfaatan bahan alam laut Indonesia, dilakukan penelitian dengan tujuan awal menguji aktifitas anti-

oksidan dan mengidentifikasi senyawa berkhasiat sebagai antioksidan dalam spons *Callyspongia sp.* yang berasal dari Kepulauan Seribu. Pada percobaan pendahuluan diketahui bahwa spons *Callyspongia sp.* mempunyai aktivitas antioksidan yang terkuat dibandingkan *Geliodes fibulata*, *Clatharia australiensis*, *Agelas sp* dan *Oceanapia sp* (Hanani, et al, 2005).

METODOLOGI

Bahan: Bahan uji yang digunakan adalah spons *Callyspongia sp.* yang diperoleh dari perairan Kepulauan Seribu, dan sudah dideterminasi di Lembaga Oseanologi Nasional, Jakarta.

Bahan kimia yang digunakan antara lain 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2' azobis (2-amidino-propan) dihidroklorida (AAPH), ammonium tiosianat, asam linoleat, vitamin C, BHT, larutan dapar fosfat, besi (II) klorida, pereaksi Lieberman-Buchard, Dragendorff, Mayer dan Bouchardat.

Alat: Alat-alat yang digunakan antara lain alat gelas untuk ekstraksi, KLT dan spektrofotometer UV Shimadzu 265.

Cara kerja:

Pembuatan ekstrak. Spons *Callyspongia sp.* yang dikumpulkan dari daerah Kepulauan Seribu segera direndam dalam metanol dan baru dikeluarkan waktu penelitian di-

mulai. Spons sejumlah 650 g dipotong-potong sampai halus, kemudian dimaserasi selama 6 jam dalam 800 ml aseton, sambil sekali-kali dikocok. Lapisan aseton dipisahkan, kemudian maserasi diulang 4 kali (tiap kali menggunakan 400 ml aseton) dengan cara yang sama sampai filtrat aseton tidak berwarna. Residu dimaserasi lebih lanjut menggunakan metanol 450 ml dengan cara yang sama, ulangi 3 kali, sampai lapisan metanol tidak berwarna. Filtrat yang diperoleh disatukan, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental sejumlah 90,25 g.

Uji aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan 2 cara, yaitu metode DPPH dan tiosianat.

1. Metode DPPH (Blois, 1958)

Ekstrak *Callyspongia sp.* dilarutkan dalam metanol dan dibuat dalam berbagai konsentrasi (10, 30, 50 dan 70 ppm). Masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ke dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 500 μ l larutan DPPH 1mM dalam metanol. Volume dicukupkan sampai 5,0 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya serapannya diukur pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai kontrol positif, dan untuk pembanding digunakan vitamin C (konsentrasi 2, 3, 4 dan 5 ppm) dan BHT (konsentrasi 2, 4, 6 dan 8 ppm). Nilai IC₅₀ dihitung masing-masing dihitung dengan

menggunakan rumus persamaan regresi.

2. *Metode tiosianat* (Mun'im *et al*, 2003)

Sebanyak 500 µl larutan ekstrak *Callyspongia* sp dengan konsentrasi 100 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan berturut-turut 2,5 ml larutan buffer fosfat 0,2 M (pH=7), 2,5 ml larutan asam linoleat (1,3% w/v), 1,0 ml air suling, dan 0,25 ml larutan AAPH 46,6 mM dalam etanol 40%. Selanjutnya diinkubasi dalam keadaan gelap, pada suhu 50°C. Pengambilan sampel dilakukan setiap satu jam selama 4 jam.

Larutan uji sebanyak 0,1 ml ditambah dengan 0,1 ml larutan besi (II) klorida 20mM dalam HCl 3,5%, 0,1 ml larutan ammonium tiosianat 10% dan dicukupkan volumenya dengan etanol 75% menjadi 10 ml. Homogenkan dengan vortex, setelah 3 menit serapannya diukur pada panjang gelombang 500 nm. Kemampuan aktivitas antioksidan dilihat dari rendahnya resapan yang terbentuk terhadap kontrol.

Pemeriksaan kandungan kimia menggunakan pereaksi kimia
(Anonim, 1989)

Identifikasi kandungan kimia dalam ekstrak dilakukan terhadap senyawa-senyawa:

1. *Steroid/triterpenoid*

Sebanyak 1 ml larutan ekstrak diuapkan sampai kering, kemudian

ditambah dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Warna biru-ungu yang timbul menunjukkan adanya senyawa terpenoid atau steroid.

2. *Alkaloid*

Larutan ekstrak sebanyak 3 ml ditambah dengan 1 ml HCl 2 N, dan 6 ml air suling, kemudian panaskan selama 2 menit, dinginkan kemudian disaring. Filtrat diperiksa adanya senyawa alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, Bouchardat dan Mayer.

3. *Flavonoid*

Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambah dengan sedikit serbuk seng atau magnesium dan 2 ml HCl 2N. Senyawa flavonoid akan menimbulkan warna jingga sampai merah.

4. *Antrakuinon*

Larutan ekstrak sebanyak 2 ml dipanaskan dengan 5 ml H₂SO₄ selama 1 menit. Setelah dingin dikocok dengan 10 ml bensen. Warna kuning pada lapisan bensen menunjukkan adanya senyawa antrakuinon. Identifikasi dapat diperjelas dengan menambahkan larutan natrium hidroksida 2N, akan terjadi warna merah pada lapisan air.

Pemeriksaan kandungan kimia menggunakan KLT

Pemeriksaan KLT dilakukan terhadap adanya senyawa yang memberikan hasil positif pada pemeriksaan menggunakan pereaksi kimia. Larutan pengembang yang

digunakan adalah campuran metanol-NH₄OH (200:3), dengan larutan deteksi Dragendorff dan DPPH.

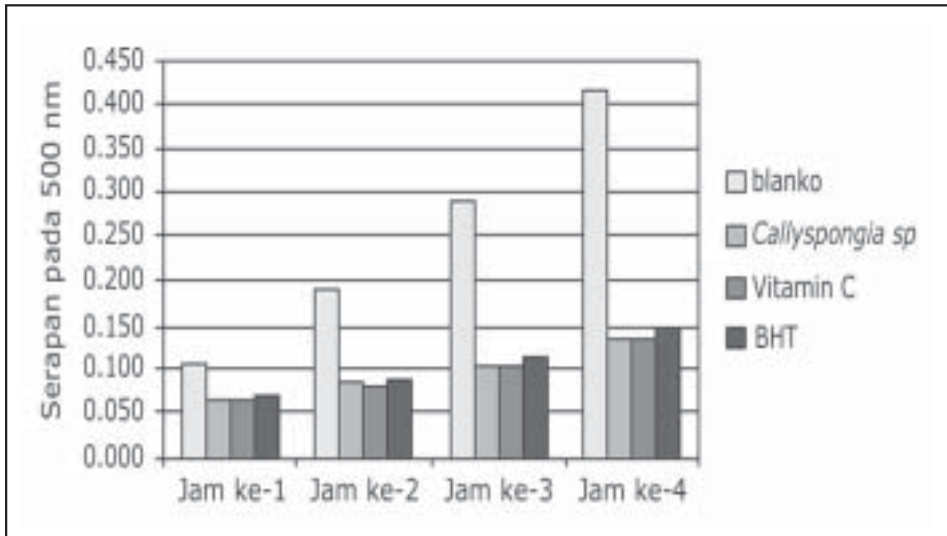
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak *Callyspongia sp.* mempunyai IC₅₀ sebesar 41,21 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mempunyai aktifitas antioksidan yang kuat, karena mempunyai IC₅₀ kurang dari 200 µg/ml (Blois, 1958). Hasil pengujian dapat dilihat pada **Tabel 1**. Apabila dibandingkan dengan aktivitas

antioksidan vitamin C dan BHT yang masing-masing mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 3,45 dan 3,81 mg/ml, aktivitas antioksidan ekstrak *Callyspongia sp.* masih lebih rendah. Tetapi pada penelitian ini yang diuji masih berupa ekstrak kasar, sehingga masih ada kemungkinan senyawa murni yang dikandung memiliki aktivitas peredaman radikal bebas lebih kuat dibandingkan ekstraknya. Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hydrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna

Tabel 1. Aktivitas antioksidan ekstrak *Callyspongia sp.*, vitamin C dan BHT menggunakan metode DPPH

Spons/pembanding	Konsentrasi (µg/ml)	Aktivitas Peredaman (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Callyspongia sp</i>	10	10,23	41,21
	30	29,30	
	50	56,69	
	70	72,14	
Vitamin C	2	24,41	3,45
	3	42,87	
	4	54,48	
	5	70,28	
BHT	2	29,63	3,81
	4	51,61	
	6	64,43	
	8	73,25	



Gambar 1. Aktivitas antioksidan ekstrak *Callyspongia sp.*, vitamin C dan BHT menggunakan metode tiosianat

DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Blois, 1958).

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak *Callyspongia sp.* menggunakan metode tiosianat menunjukkan tidak adanya perbedaan aktivitas yang bermakna (Anava searah dengan tingkat kepercayaan 95%) dengan pembandingan vitamin C dan BHT, seperti terlihat pada **Gambar 1**.

Pada metode tiosianat pengukuran aktivitas antioksidan berdasarkan daya penghambatan terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Oksidasi asam linoleat dipercepat oleh AAPH yang merupakan senyawa penginduksi pembentukan radikal bebas, yang umumnya berupa peroksida lipid. Dekomposisi AAPH menghasilkan molekul nitrogen dan dua radikal

karbon yang dapat menghasilkan produk yang stabil atau bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan radikal peroksil. Proses oksidasi lemak menghasilkan produk primer peroksida. (Mun'im, et al 2003). Bilangan peroksida dinyatakan sebagai senyawa yang mampu mengoksidasi Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} , dan selanjutnya Fe^{3+} dengan ion CNS menghasilkan warna merah yang diukur pada panjang gelombang 500 nm.

Pada pengamatan jam ke-4, kontrol negatif menunjukkan serapan sebesar 0,415, sedangkan ekstrak *Callyspongia sp.* mempunyai serapan 0,133, vitamin C dan BHT masing-masing 0,132 dan 0,146. Hal ini berarti bahwa ekstrak *Callyspongia sp.* mampu menghambat hasil oksidasi asam linoleat maupun mereduksi

Tabel 2. Hasil identifikasi golongan senyawa ekstrak *Callyspongia sp*

Pereaksi	Golongan	Hasil
1. Lieberman-Buchard	Terpenoid, steroid	-
2. Mayer	Alkaloid	+
Dragendorff	Alkaloid	+
Bouchardat	Alkaloid	+
3. Zn/ HCl	Flavonoid	-
Mg/ HCl	Flavonoid	-
4. Benzen-NaOH	Antrakinon	-
5. Molisch	Gula	-

radikal bebas. Hasil uji statistik (anava searah dengan nilai α 0,05) menunjukkan bahwa ketiga larutan yang diuji tidak memperlihatkan perbedaan aktivitas antioksidan yang bermakna.

Hasil identifikasi kimia menunjukkan bahwa ekstrak *Callyspongia sp.* mengandung senyawa alkaloid **Tabel 2.** Identifikasi lanjutan menggunakan KLT silica gel GF₂₅₄ dengan larutan pengembang campuran methanol-NH₄OH (200 : 3) memperlihatkan adanya bercak dengan Rf 0,33, yang pada pengamatan sinar UV memberikan warna kuning hijau. Bercak ini memberikan warna jingga dengan pereaksi Dragendorff, berarti bahwa bercak tersebut merupakan senyawa golongan alkaloid. Pada uji dengan pereaksi DPPH, bercak ini memberikan aktivitas peredaman radikal bebas, berarti senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dalam ekstrak *Callyspongia sp.* adalah se-

nyawa golongan alkaloid.

Penelitian lanjutan sedang dikerjakan untuk mengisolasi senyawa dan menentukan struktur kimia senyawa alkaloid tersebut.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Callyspongia sp.* mempunyai aktivitas antioksidan, dan senyawa yang berkhasiat sebagai antioksidan termasuk golongan alkaloid.

DAFTAR ACUAN

- Amir, I. Dan Budiyanto, A. 1996. Mengenal Spons Laut (Demospongiae) Secara Umum, *Oceana*, 21, (2), 15-31.
- Anonim. 1989. *Materia Medika Indonesia Jilid V*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 549-553.

- Blois, MS, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181, 1958, 1199-1200.
- Boer, Y. 2000. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq), *Jurnal Matematika dan IPA* 1, (1), 26-33.
- David HA and Oskar, RZ. *Marine Biotechnology*, vol 1, Plenum Press, New York, 1993, 12-13.
- Hanani, E, Mun'im A, Sekarini, R, dan Wiryowidagdo, S. Uji aktivitas antioksidant beberapa spons laut dari kepulauan Seribu, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, vol 5, no.1 Jan 2006 (*in Press*).
- Mun'im, A, Negishi, O and Ozawa, T. 2003. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*, *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67, (2), 410-414.
- Satari, RR, Penelitian Produk alam laut di Indonesia, arah dan prospek, Seminar Nasional Kimia Bahan Alam, Jakarta 1999, 29-37.