

**POTENSI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN ANTIOKSIDAN EKSTRAK
ASCIDIA Didemnum sp. ASAL PERAIRAN PULAU BARRANGLOMPO**

DYAH ARINDI CORNELIA HARTOYO

H411 16 504



DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020

**POTENSI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN ANTIOKSIDAN EKSTRAK
ASCIDIA *Didemnum* sp. ASAL PERAIRAN PULAU BARRANGLOMPO**

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains pada Departemen Biologi

Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Hasanuddin

DYAH ARINDI CORNELIA HARTOYO

H411 16 504

DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020

HALAMAN PENGESAHAN

POTENSI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN ANTIOKSIDAN EKSTRAK
ASCIDIA *Didemnum* sp. ASAL PERAIRAN PULAU BARRANGLOMPO

Disusun dan diajukan oleh:

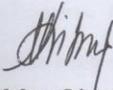
DYAH ARINDI CORNELIA HARTOYO

H411 16 504

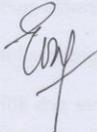
Disetujui oleh

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama


Dr. Magdalena Litaav, M.Sc

NIP. 196409291989032002


Dr. Eva Johannes, M.Si

NIP. 196102171986012001

KATA PENGANTAR

Puji Syukur Atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Potensi Aktivitas Sitotoksik dan Antioksidan Ekstrak *Ascidia Didemnum* sp. Asal Perairan Pulau Barranglompo”** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Tak ada gading tak yang retak. Penulis menyadari, karena keterbatasan ilmu dan pengetahuan yang dimiliki, sehingga masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Untuk itu demi sempurnanya skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran yang berupa kritik dan saran yang bersifat membangun.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis. Pada kesempatan ini, penulis menghanturkan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua, Ayahanda Eddy Hartoyo dan Ibunda Ariani Batara yang telah melahirkan, membesarkan, mendidik dan mengiringi setiap langkah penulis serta limpahan doa, kasih sayang serta dukungan moral dan materi yang telah diberikan tanpa henti kepada penulis.

Kepada Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Eva Johannes, M,Si selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terimakasih atas bimbingan dan arahnya berupa kritik dan saran yang membangun

dan memotivasi yang telah diberikan selama penulis melaksanakan proposal, penelitian, hingga ke tahap penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena telah meluangkan waktu untuk terus memberi bimbingan dan arahan demi arahan yang sangat membantu hingga selesainya skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi. Kepada bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si. selaku Wakil Dekan 3 yang banyak membantu mahasiswa dalam kegiatan organisasi kampus.
2. Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin terima kasih atas ilmu, masukan serta saran kepada penulis.
3. Ibu Dr. Andi Masniawati, M.Si dan Ibu Dr. Zohra Hasyim, M.Si selaku penguji sidang sarjana terima kasih atas segala saran dan ilmunya. Kepada seluruh dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Kepada staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
4. Kepada kakNenis Sardiani, S.Si dan kak Andi Akbar, S.Si yang telah banyak membantu, membimbing, dan memberi arahan penulis dalam mengerjakan penelitian baik berupa ilmu, kritik, saran yang sangat berharga bagi penulis.

Terimakasih untuk kesabaran serta kebaikan hatinya selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

5. Kepada kak Dennis Lorens, ST, MT yang sudah membantu dalam berbagai hal selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini. Terima kasih selalu mengingatkan dan mendorong penulis hingga selesainya skripsi ini.
6. Kepada kak Vinny Indriany, S.Si, Apt dan kak dr. Dopang Batara yang tidak henti-hentinya mengingatkan penulis untuk menyelesaikan skripsi tepat waktu. Terima kasih untuk setiap doa, saran dan motivasi yang telah diberikan.
7. Kepada sahabat 3000 Ribka Laurina, Suci Amalia, Fera Yuniar, Fiqha Septia, Joice Batara, Fitrianti, dan Elby Lebang terima kasih selalu menemani baik dalam suka maupun duka, mendukung dan mendoakan serta memotivasi penulis untuk menyelesaikan skripsi.
8. Kepada XL Future Leaders Batch 7 Makassar Area, terima kasih untuk semangat dan dukungan yang tidak henti diberikan kepada penulis selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
9. Kepada teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2016, terima kasih atas pengalaman organisasi yang tercipta, kebersamaan, canda tawa, suka duka, dukungan, motivasi, serta bantuan yang tidak dapat penulis jabarkan satu persatu

Makassar, Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	4
I.3 Manfaat Penelitian	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6

II.1 Ascidia	6
II.2 Potensi Senyawa Bioaktif Ascidia	9
II.3 <i>Didemnum</i> sp.	11
II.4 Ekstraksi	13
II.5 Radikal Bebas	18
II.6 Antioksidan	21
II.7 Uji Toksisitas <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	25
II.8 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	30
BAB III METODE PENELITIAN	34
III.1 Metode Sampling	34
III.2 Metode Ekstraksi	34
III.3 Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	35
III.3.1 Penyiapan Larva <i>Artemia salina</i> Leach	35
III.3.2 Penyiapan Larutan Uji	35
III.3.3 Uji Toksisitas	35
III.4 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	36
III.5 Analisis Data	37

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	38
IV.1 Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	38
IV.2 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	48
V.1 Kesimpulan	48
V.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	54

ABSTRAK

Penelitian ini tentang Potensi Aktivitas Sitotoksik dan Antioksidan Ekstrak *Ascidia Didemnum* sp. asal Perairan Pulau Barranglompo, telah dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar pada bulan Maret 2020 hingga Mei 2020. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksik dan antioksidan ekstrak *Ascidia Didemnum* sp. dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dan 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm untuk BSLT dan 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, 1600 ppm dan 3200 ppm untuk DPPH dan dilakukan 3 kali replikasi. Analisis data untuk metode BSLT dilakukan ditentukan dengan melihat besarnya nilai LC₅₀ yang dapat mematikan *Artemia salina* Leach hingga 50% dan dilakukan perhitungan statistik dengan analisis probit, sedangkan untuk metode DPPH analisis data dilakukan dengan penentuan nilai IC₅₀ dimana konsentrasi sampel dan persen inhibisinya pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Ascidia Didemnum* sp. memiliki efek toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC₅₀ sebesar 109,3201 µg/mL dan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat rendah dengan nilai IC₅₀ sebesar 3754.4838 µg/mL.

Kata Kunci: Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH), *Ascidia Didemnum* sp. IC₅₀.

ABSTRACT

This research on the Potential of Cytotoxic Activity and Antioxidant of Extract *Ascidia Didemnum* sp. origin from Barranglompo Island, it has been conducted at the Laboratory of Environmental and Marine Sciences, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Hasanuddin University, Makassar from March 2020 to May 2020. This research aims to examine the cytotoxic and antioxidant activity of *Ascidia Didemnum* sp. using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) and 1,1-Diphenyl-2-Pikrilhidrazil (DPPH) methods. This research was conducted using 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm for BSLT dan 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, 1600 ppm, 3200 ppm for DPPH and 3 times replicated. Data analysis for BSLT method was determined by value of LC₅₀, of *Artemia salina* Leach and statistical calculations with probit analysis, while for DPPH method data analysis aims done by determining IC₅₀ values where the concentration of the sample and percent inhibition on the x-axis and y in the linear regression equation. Based on the results of research, that it can be concluded that the extract of *Ascidia Didemnum* sp. has a toxicity effect on larvae of *Artemia salina* Leach shrimp with a LC₅₀ value of 109.3201 µg / mL and has very low antioxidant activity with an IC₅₀ value of 3754.4838 µg / mL.

Keyword: Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH), *Ascidia Didemnum* sp. IC₅₀.

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Radikal bebas adalah suatu atom yang mempunyai elektron tidak berpasangan. Elektron inilah yang menyebabkan radikal bebas sangat reaktif dan kemudian akan mengambil elektron dari senyawa lain seperti protein, lipid, karbohidrat dan DNA untuk menetralkan diri. Radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dan menyerang sel-sel yang sehat akan menyebabkan sel-sel tersebut kehilangan fungsi dan strukturnya. Akumulasi dari kerusakan tersebut berkontribusi terhadap beberapa penyakit (Liochev, 2013).

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA di samping penyebab lain seperti virus. Bila kerusakan tidak terlalu parah, masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Namun, bila sudah menyebabkan rantai DNA terputus diberbagai tempat, kerusakan ini tidak dapat diperbaiki lagi sehingga pembelahan sel akan terganggu. Bahkan terjadi perubahan abnormal yang mengenai gen tertentu dalam tubuh yang dapat menimbulkan penyakit kanker (Khaira, 2010).

Efek negatif radikal bebas terhadap tubuh dapat dicegah dengan senyawa yang disebut antioksidan. Antioksidan memiliki kemampuan untuk memberikan elektron, mengikat dan mengakhiri reaksi berantai radikal bebas (Halliwell, 2012). Penyakit degeneratif merupakan salah satu masalah kesehatan yang serius dan menjadi penyebab kematian tertinggi di Indonesia. Namun Indonesia sebagai negara berkembang mempunyai keterbatasan dalam penanggulangan masalah kesehatan.

Antioksidan adalah zat yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya proses oksidasi. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Manfaat antioksidan bagi kesehatan dan kecantikan, misalnya untuk mencegah penyakit kanker dan tumor, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain (Tamat et al. 2007).

Senyawa antioksidan yang ada akan menyerahkan satu atau lebih elektron yang dimiliki kepada radikal bebas sehingga dapat menghentikan kerusakan-kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Di dalam tubuh terdapat mekanisme antioksidan secara endogenik. Tetapi bila jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih sehingga dibutuhkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh atau endogenik (Pratiwi, 2006).

Senyawa antioksidan dapat berupa senyawa alami maupun senyawa sintetik, pada saat ini senyawa antioksidan sintetik sudah mulai ditinggalkan karena memiliki sifat karsinogenik dan antioksidan yang berasal dari alam mulai memegang peranan penting. Senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan alam banyak ditemukan pada berbagai jenis biota laut (Lisdawati dan Broto 2006).

Antioksidan sintetik seperti BHA (*butylated hidroxy aniline*) dan BHT (*butylated hidroxy toluen*) telah diketahui memiliki efek samping yang besar antara lain menyebabkan kerusakan hati (Kikuzaki, Hisamoto, Hirose dkk, 2002). Di sisi lain, alam juga menyediakan sumber antioksidan yang efektif dan relatif aman seperti flavonoid, vitamin C, beta karoten dan lain-lain. Hal tersebut mendorong semakin banyak dilakukan eksplorasi bahan alam sebagai sumber antioksidan (Jackie dan Dika, 2014).

Akhir akhir ini penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat baik untuk makanan maupun pengobatan. Penggunaan sebagai obat semakin berkembang seiring dengan makin bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif (Boer, 2000).

Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan menyebabkan keadaan stres oksidatif yang mengakibatkan kerusakan sel, jaringan hingga organ tubuh. Langkah tepat untuk mengurangi stres oksidatif adalah dengan mengurangi paparan radikal bebas dan mengoptimalkan pertahanan tubuh melalui aktivitas antioksidan (Khaira, 2010).

Perubahan pola hidup pada masyarakat dapat menimbulkan stres oksidatif. Stres oksidatif berperan penting dalam patofisiologi terjadinya proses menua dan berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes melitus dan komplikasinya serta aterosklerosis yang mendasari penyakit jantung, pembuluh darah dan stroke. Antioksidan sangat diperlukan oleh tubuh untuk mengatasi dan mencegah stres oksidatif (Suparto, dkk, 2015).

Sebagai negara yang memiliki keanekaragaman jenis biota laut yang tinggi, hal ini memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut sebagai sumber pengobatan. Akan tetapi, pemanfaatan potensi ini belum optimal.

Potensi antioksidan alami harus dikembangkan dengan tujuan untuk memperoleh antioksidan yang lebih aman untuk dikonsumsi. Salah satu sumber daya laut yang berpotensi sebagai penghasil antioksidan alami adalah ascidia *Didemnum* sp. Jenis tersebut termasuk kedalam Subfilum Tunicata, Kelas Ascidiacea, Familia Didemnidae. Habitat *Didemnum* sp. tersebar di seluruh perairan Indo-Pasifik termasuk

juga di Indonesia dan dapat ditemukan pada kedalaman 1-20 meter (Allen dan Steene, 2002; Cohen, 2005). Hasil penelitian Edawati (2012) menunjukkan bahwa alkaloid Lamellarin yang diisolasi dari ascidia *Didemnum obscurum* merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Dalam penelitiannya, Edawati menggunakan metode DPPH. Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil.

Dari penelusuran pustaka diketahui bahwa belum ada penelitian mengenai uji sitotoksik dan antioksidan yang terdapat di Kepulauan Spermonde termasuk Pulau Barrang Lompo sehingga dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat diketahui aktivitas sitotoksik dan antioksidan dari ascidia *Didemnum* sp. Pada penelitian ini uji aktivitas sitotoksik dan antioksidan dilakukan terhadap sampel ascidia *Didemnum* sp. yang diambil dari Pulau Barranglompo, Sulawesi Selatan.

I. 2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas sitotoksik dan antioksidan ekstrak ascidia *Didemnum* sp. dengan metode BSLT dan DPPH.

I.3 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi sebagai berikut:

1. Menambah data bahan alam laut yang memiliki potensi sebagai antioksidan.
2. Mendorong penemuan antioksidan baru khususnya dari bahan alam laut.
3. Menjadi bahan rujukan pada penelitian tahap selanjutnya.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Maret – Mei 2020 di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II. 1 Ascidia

Laut Indonesia merupakan pusat keragaman terumbu karang dunia dan kaya akan sumber produk alami dengan struktur dan aktivitas biologis yang unik. Kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh organisme laut menarik perhatian para peneliti, karena senyawa-senyawa yang ada pada organisme tersebut memiliki struktur kimia yang unik dan aktifitas farmakologis yang sangat menarik (Sumilat, 2017).

Invertebrata laut dikenal karena senyawa bioaktifnya yang sangat bermanfaat. Salah satunya yang terdapat pada tunikata dimana memiliki potensi pada metabolit sekundernya seperti alkaloid, flavanoid, dan steroid yang terkandung dalam sel darah atau jaringan tunikata termasuk halocyamines pada *Halocynthia roretzi*, lamellarin pada *Didemnum chartaceum* dan ferreascidin pada *Pyura* sp. Metabolit sekunder yang dihasilkan tersebut telah digunakan oleh manusia sebagai zat bioaktif yang digunakan untuk antitumor, antikanker, antibakteri dan anti jamur (Litaay, 2013).

Ascidia merupakan sebutan umum untuk spesies-spesies yang termasuk ke dalam Kelas Ascidiacea. Organisme tersebut termasuk ke dalam Filum Chordata bersama 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).

Ascidian merupakan hewan yang umumnya hidup sesil dan merupakan vertebrata air dengan penyebaran yang luas. Ascidian terdapat hampir di seluruh laut di dunia. Namun, umumnya terdapat di perairan litoral pada zona intertidal hingga subtidal, menempel pada karang, cangkang moluska, lambung kapal atau pada dasar pasir dan lumpur (Suwingyo dan Sugiarti, 2005).

Kelompok *Ascidia* ditemukan lebih melimpah dan beragam pada habitat dengan perairan yang relatif terlindung dari cemaran bahan-bahan organik. Kehadiran *Ascidia* juga dibatasi oleh salinitas perairan yang berubah-ubah (fluktuasi) atau berkurang dari kadar normal air laut (30-32%), namun beberapa jenis dapat bertahan dan ditemukan dalam jumlah yang melimpah dan berkoloni (Abrar, 2005; Abrar dan Manuputty, 2008).

Litaay (2014) menemukan ada 33 spesies tunikata di terumbu karang wilayah perairan Kepulauan Baranglombo. Namun penelitian ini menunjukkan lebih banyak spesies tunikata yang ditemukan di Samalona dibandingkan dengan yang tercatat untuk pulau-pulau lain. Terdapat 7 spesies di Pulau Lae-Lae, 9 spesies di Pulau Tulang Batang dan 10 spesies di Pulau Badi. Tunikata kelas *Ascidacea* adalah yang paling beragam karena 700 spesies telah dicatat dalam Perairan Australia, sementara *Thaliacea* memiliki lebih sedikit dari 100 spesies di seluruh dunia dan *Appendicularia* adalah sekitar 60 spesies yang dikenal di seluruh dunia (Kott, 2005).

Koloni *Ascidia* mempunyai bentuk yang bervariasi yaitu bentuk beraturan dan tidak beraturan, ada yang berbentuk seperti piringan datar atau lembaran, ada juga

yang bertangkai atau langsung menempel pada substrat, kendi atau tabung, bahkan ada yang bentuknya menyerupai daun. Tubuh *Ascidia* diselubungi oleh selaput fibrosa. Selaput fibrosa tersebut mempunyai struktur menyerupai selulosa dan berbentuk seperti jeli, membran yang lunak, atau seperti daun dimana spons dan *Ascidia* lain dapat hidup di atasnya. Selaput fibrosa yang ada pada *Ascidia* mengandung pigmen yang memberikan warna pada individu *Ascidia*. Pigmen tersebut diperoleh dari hasil simbiosis dengan alga yang hidup pada selaput *Ascidia*. (Allen dan Steene, 2002).

Ascidia merupakan biota hermafrodit yang dapat menghasilkan sel telur dan sperma dalam satu individu yang sama. Semua jenis *Ascidia* melepaskan spermanya langsung di dalam perairan. Beberapa sel telur dilepaskan dan mengalami pembuahan secara eksternal. Setelah sel telur dibuahi akhirnya berkembang di perairan terbuka menjadi *tadpole* yang merupakan bentuk larva dari *Ascidia*. Larva tersebut mengalami tahap *free swimming* dengan adanya *notochord* dan *neural tube*. Selain itu, ada juga sel telur yang dibuahi secara internal dan dierami sampai mereka menjadi larva *tadpole*, kemudian dilepaskan. Dalam hitungan jam, larva yang dilepaskan akan berubah bentuk menjadi *Ascidia* yang mendiami dasar perairan dan dengan cepat akan kehilangan *notochord* dan *neural tube* (Colin dan Arneson, 1995 dalam Abrar, 2005).

Tunikata atau dikenal juga sebagai *Ascidian* merupakan avertebrata air dengan penyebaran yang luas, kebanyakan hidup sesil dan terdapat hampir di seluruh laut di dunia. Pada umumnya hewan ini terdapat di perairan litoral pada zona intertidal hingga subtidal, menempel pada karang, cangkang moluska, lambung kapal

atau pada dasar pasir dan lumpur (Suwignyo dkk, 2005), serta merupakan penyaring air alami, tahan terhadap bermacam-macam polutan dan dapat menyaring bakteri, demikian pula logam berat dari air yang berbahaya bagi ekosistem terumbu (Tahir dkk, 2016).

Biota laut ini belum banyak dikaji secara intensif, namun mempunyai potensi yang cukup besar di perairan Indonesia, yang habitatnya umum dijumpai di perairan terumbu karang (Abrar, 2004). McClintock dan Baker (2001) dalam Tahir (2016), mengemukakan bahwa hewan ini merupakan biota bentik yang bersimbiosis dengan mikroba yang memiliki kemampuan untuk mengeluarkan metabolit sekunder pada proses metabolismenya sebagai pertahanan diri. Senyawa bioaktif yang dikeluarkan oleh mikroba ini dapat berfungsi. sebagai antifouling, antikanker, antitumor, dan antivirus. Penemuan antibiotik yang bersifat sebagai antimikroba telah banyak dilakukan.

Di alam khususnya di daerah perairan, *Ascidia* juga dimanfaatkan manusia untuk menyaring bahan pencemar dari perairan, seperti logam berat dan bakteri. Kemampuan berbagai jenis *Ascidia* untuk menyerap vanadium dan logam berat lainnya dari air laut merupakan salah satu keanehan fisiologi yang membedakan golongan *Ascidia* tersebut dari sebagian besar hewan lainnya yang ada di perairan (Abrar, 2005).

Ascidia hidup secara sesil atau menempel sehingga *Ascidia* bersimbiosis dengan bakteri yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri. *Ascidia* dapat berasosiasi dengan mikroba fotosintetik dan mempunyai potensi-potensi molekular yang besar. Dimana kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan dari bakteri

simbion tersebut merupakan salah satu bahan substansi bioaktif yang sangat berguna sebagai pertahanan diri organisme simbiotiknya, dalam hal ini tunikata (Murniasih, 2005).

II.2 Potensi Senyawa Bioaktif Ascidia

Penelitian-penelitian terdahulu mengenai bahan alam dari vertebrata 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 Ascidia mulai banyak diujikan untuk dijadikan obat. Salah satu senyawa aktif Ascidia adalah dari *Trididemnum solidum* yang menunjukkan toksisitas tinggi terhadap sel tumor. Senyawa halosiamin A yang memiliki sifat antibiotik pernah diisolasi dari Ascidia *Halocynthia roretzi* (Murugan dan Ramasamy, 2003; Sivaperumal *et al*, 2010).

Kelas Ascidia merupakan satu-satunya kelas dari Chordata yang mewakili produk bahan alami yang menunjukkan adanya metabolisme asam amino yang dominan (McClintock dan Baker 2001 dalam Abrar 2005). Ascidia telah banyak menarik perhatian sebagai salah satu sumber zat antikanker, antivirus, dan antitumor.

Sebagai contohnya di Thailand telah ditemukan alkaloid (ectinascidin) yang berasal dari *Ecteinascidia thurstoni* yang bersifat sitotoksik untuk sel kanker payudara, paru-paru, dan jaringan nasofaring. Di Karibia, anggota Famili Didemnidae, yaitu *Trididemnum solidum* diketahui memiliki senyawa didemnim-B yang bersifat antivirus dan antitumor (Sadeli, 2016).

Hasil penelitian Malla *et al* (2004) menunjukkan bahwa alkaloid lamellarin yang diisolasi dari ascidian *Didemnum obscurum* dari India merupakan senyawa yang sangat berpotensi sebagai antioksidan. Abou - Donia *et al* (2008) juga pernah meneliti *Didemnum molle* yang dikoleksi dari perairan Manado, dimana penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa keenamid A dan mollamida B dari ekstrak *Ascidia* tersebut memiliki potensi antikanker.

Selain itu, *Ascidia* juga mempunyai senyawa kimia untuk perlindungan dari radiasi UV. Sejumlah metabolit pun berasal dari *Ascidia* seperti seri *Didemnidae* berupa isolasi alkaloid dari *Didemnum conchyliatum*, ekstrak dari *Ascidia Ecteinascidia turbinata* yang berisi alkaloid biologis aktif ecteinascidin, alkaloid tambjamine dari jenis *Sigillina signifera*, *Didemnim depsipeptide* dari jenis *Trididemnum solidum*, dan alkaloid polyandrocarpine dari jenis *Polyandrocarpa sp.* (Mc Clintock dan Baker dalam Manupputty, 2004).

Adapula metabolit ascidian yang berpotensi sebagai antifouling yaitu alkaloid eudistomin dari jenis *Eudistoma olivaceum*, dan pelindung UV serta antioksidan berupa asam amino seperti mycosporine (Mc Clintock dan Baker dalam Manupputty, 2004).

Tabel 1. Jenis *Ascidia* yang ditemukan di Indonesia dan memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam bidang farmakologis

No.	Jenis	Pemanfaatan
1.	<i>Lissoclinum patella</i>	Hasil ekstrak terdiri dari <i>Ulit-hyacyclamide</i> , <i>Patellamides</i> , <i>Ascidicyclamides</i> , dan <i>Lissoclamides</i> untuk pengobatan kanker dan leukemia

2.	<i>Lissoclinum bistratum</i>	Ekstrak berupa polyether dengan dua fungsi <i>Carboxamide</i> , dalam bentuk bubuk Lyophilized merupakan toksik untuk investigasi paralisis mulut juga racun pada udang tingkat rendah <i>Artemia salina</i>
3.	Hampir semua jenis	Bioindikator kondisi perairan, sehingga sering digunakan sebagai biota uji Bioassay

Sumber: Abrar, 2005.

II.3 *Didemnum* sp.

Habitat *Didemnum* sp. tersebar di seluruh perairan Indo-Pasifik termasuk Indonesia dan dapat ditemukan pada kedalaman 1-20 meter. *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 3-10cm. *Didemnum* sp. sering ditemukan hidup berkoloni pada berbagai permukaan substrat seperti terumbu, pasir, hingga logam pada dermaga atau kapal (Allen dan Steene, 2002).



Gambar 1. Koloni *Didemnum* sp.
Sumber: media.unpad.ac.id

Berikut merupakan klasifikasi dari *Didemnum* sp. (Manniot et al, 1991):

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Subfilum : Tunicata
Kelas : Ascidiaceae
Famili : Didemnidae
Genus : *Didemnum*
Species : *Didemnum* sp.

Lapisan luar dari tubuh *Didemnum* sp. terdiri atas lapisan tembus pandang dan tebal. Lapisan ini sebagian besar terdiri atas bahan tunicin. Pembungkus tubuh tampak seperti lapisan lunak yang disebut mantel. Mantel yang merupakan dinding tubuh terdiri atas jaringan ectoderm dan jaringan ikat yang membungkus berkas fiber (Hakim, 2013).

Koloni *Didemnum* sp. terdiri atas 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 tubuh *Didemnum* sp. Koloni *Didemnum* sp. dapat tumbuh menjadi koloni yang lebih besar ketika individu-individu didalamnya bereproduksi secara seksual maupun aseksual (Cohen, 2005; Boyer, 2006).

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. ampu melakukan pergeseran terutama jika terjadi reproduksi aseksual (fragmentasi untuk membentuk zooid-zooid yang baru) sehingga koloni *Didemnum* sp. ada yang bertambah besar.

Pertahanan kimia yang dilakukan oleh *Didemnum* sp. ini adalah dengan menghasilkan metabolit sekunder dan mendistribusikannya ke seluruh tubuh (Stoner 1992). Pertahanan fisik yang mudah diamati yang dilakukan spesies ini adalah dengan mengeluarkan lendir ketika individu merasa terancam predator, dimana predator *Didemnum* sp. secara umum adalah ikan, bintang laut, gastropoda, cacing pipih, dan kepiting (Olson, 1983).

II.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama (Mukhriani, 2014).

Secara umum, metode yang digunakan dalam ekstraksi terbagi atas dua, yaitu ekstraksi cara panas dan ekstraksi cara dingin.

1. Ekstraksi Cara Panas

Ekstraksi cara panas dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain soxhletasi, refluks, digesti, infusa, dan dekok. Soxhletasi adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus, sehingga terjadi ekstraksi secara kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Parameter Standar, 2000).

Metode ekstraksi *soxhlet* adalah metode ekstraksi dengan prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Hal itu menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan itu kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping *soxhlet* maka akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang itulah yang menghasilkan ekstrak yang baik (Departemen Kesehatan RI, 2006).

Kelebihan dari metode *soxhletasi* adalah sampel yang ada terekstraksi dengan sempurna, proses ekstraksi lebih cepat dan pelarut yang digunakan sedikit. Sedangkan kelemahan dari metode *soxhletasi* adalah sampel yang digunakan harus sampel yang tahan panas atau tidak dapat digunakan pada sampel yang tidak tahan panas karena sampel yang tidak tahan panas akan teroksidasi atau tereduksi ketika proses *sokletasi* berlangsung (Afifah, 2012).

Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relative konstan dengan adanya pendinginan balik. Ekstraksi refluks digunakan untuk mengekstraksi bahan-bahan yang tahan terhadap pemanasan (Edawati, 2012).

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak

dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam (Departemen Kesehatan RI, 2006).

Prinsip dari metode refluks adalah pelarut volatil yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang tadinya dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung. Sedangkan aliran gas N₂ diberikan agar tidak ada uap air atau gas oksigen yang masuk terutama pada senyawa organologam untuk sintesis senyawa anorganik karena sifatnya reaktif (Edawati, 2012).

Keuntungan dari metode refluks adalah digunakan untuk mengekstraksi sampel-sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung sedangkan kerugiannya adalah membutuhkan volume total pelarut yang besar dan sejumlah manipulasi dari operator (Edawati, 2012).

Digesti merupakan cara ekstraksi dengan menggunakan pemanasan pada suhu 40-50°C. Cara maserasi ini hanya cocok dipergunakan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan. Keuntungan dari metode digesti adalah kekentalan pelarut berkurang sehingga dapat mengakibatkan berkurangnya lapisan-lapisan batas, daya melarutkan cairan akan meningkat sehingga pemanasan tersebut mempunyai pengaruh yang sama dengan pengadukan, dan koefisien difusi berbanding lurus dengan suhu absolute dan berbanding terbalik dengan kekentalan sehingga kenaikan suhu akan berpengaruh pada kecepatan difusi (Arniaty, 2012).

Infusa adalah metode ekstraksi yang dalam prosesnya menggunakan pelarut air pada suhu penangas air dimana bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih dengan suhu yang terukur antara 96-98°C selama waktu tertentu yaitu 15-20 menit (Parameter Standar, 2000) sedangkan dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan suhu sampai titik didih air, yaitu pada suhu 90-100oC selama 30 menit (Departemen Kesehatan RI, 2006).

2. Ekstraksi Cara Dingin

Ekstraksi cara dingin dapat dilakukan dengan metode maserasi dan perkolasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Prosedurnya dilakukan dengan merendam simplisia dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup. Pengadukan dilakukan dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Kelemahan dari maserasi adalah prosesnya membutuhkan waktu yang cukup lama. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut yang dapat berpotensi hilangnya metabolit. Beberapa senyawa juga tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut pada suhu kamar yaitu 27°C. Ekstraksi secara maserasi dilakukan pada suhu kamar, sehingga tidak menyebabkan degradasi metabolit yang tidak tahan panas (Departemen Kesehatan RI, 2006).

Pada perkolasi, simplisia direndam dalam pelarut pada sebuah alat perkolator. Perkolasi cukup sesuai baik u tuk ekstraksi pendahuluan maupun dalam jumlah besar. Seperti pada maserasi, untuk mengekstrak secara menyeluruh dilakukan dengan penambahan pelarut yang baru dan semua ekstrak yang ada dikumpulkan (Parameter Standar, 2000).

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang paling cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Afifah, 2012). Ekstrak berdasarkan sifatnya dapat dibagi menjadi:

1. Ekstrak encer, sediaan yang masih dapat dituang
2. Ekstrak kental, sediaan yang tidak dapat dituang dan memiliki kadar air sampai 30%
3. Ekstrak kering, sediaan yang berbentuk serbuk, dibuat dari ekstrak tumbuhan yang diperoleh dari penguapan bahan pelarut
4. Ekstrak cair, mengandung simplisia nabati yang mengandung etanol

Farmakope Indonesia menetapkan bahwa sebagai cairan penyari yang aman digunakan adalah air, etanol, etanol-air atau eter. Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria berikut (Afifah, 2012):

1. Selektivitas
2. Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
3. Ekonomis
4. Ramah lingkungan
5. Keamanan

Keuntungan penggunaan etanol sebagai pelarut adalah mempunyai titik didih yang rendah sehingga lebih mudah menguap, oleh karena itu, jumlah etanol yang tertinggal di dalam ekstrak sangat sedikit. Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih selektif, mikrobia sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun,

netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinon, flavonoid, steroid, damar dan klorofil, dengan demikian zat pengganggu yang terlarut hanya sedikit (Kementrian Kesehatan RI, 2010).

Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Keuntungan lain dari etanol mampu mengendapkan albumin dan menghambat kerja enzim. Etanol (70%) sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengganggu hanya skala kecil yang turun kedalam cairan pengestraksi (Kementrian Kesehatan RI, 2010).

II.5 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 disekelilingnya. Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari pasangan elektron. Sebagai dampak dari kerja radikal bebas tersebut, akan terbentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya (Winarsi, 2007).

Radikal bebas memiliki dua sifat yaitu reaktifitasnya yang tinggi karena akan cenderung menarik elektron dan senyawa yang lainnya dan memiliki kemampuan untuj mengubah suatu molekul, atom, atau senyawa untuk menjadi suatu radikal baru (Morello dkk, 2002).

Mekanisme 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).

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA disamping penyebab lain seperti virus. Bila kerusakan tidak terlalu parah, masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Namun, bila sudah menyebabkan rantai DNA terputus di berbagai tempat, kerusakan ini tidak dapat diperbaiki lagi sehingga pembelahan sel akan terganggu. Bahkan terjadi perubahan abnormal yang mengenai gen tertentu dalam tubuh yang dapat menimbulkan penyakit kanker (Suryo, 2008).

Komponen terpenting membran sel mengandung asam lemak tak jenuh ganda yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas. Kalau ini terserang struktur dan fungsi membran akan berubah yang dalam keadaan ekstrem akhirnya mematikan sel-sel pada jaringan tubuh. Pada sel kulit radikal bebas akan merusak senyawa lemak pada membran sel sehingga kulit kehilangan ketegangannya dan muncullah keriput. Terjadinya kerusakan protein akibat serangan radikal bebas ini termasuk oksidasi protein yang mengakibatkan kerusakan jaringan tempat protein itu berada. Contohnya kerusakan protein pada lensa mata yang mengakibatkan katarak (Silalahi, 2006).

Alif (2010) menambahkan radikal bebas merupakan pemicu perusakan saraf dan otak. Selain itu radikal bebas juga terlibat dalam peradangan, pengapuran tulang, gangguan pencernaan, gangguan fungsi hati, meningkatkan kadar *low density*

lipoprotein (LDL) yang kemudian menjadi penyebab penimbunan kolesterol pada dinding pembuluh darah sehingga timbullah aterosklerosis atau lebih dikenal dengan penyakit jantung koroner.

Sumber radikal bebas ada yang bersifat internal yaitu dari dalam tubuh dan ada yang bersifat eksternal yaitu dari luar tubuh (Khaira, 2010):

1. Radikal Bebas Internal

Radikal bebas internal berasal dari oksigen yang kita hirup. Oksigen yang biasa kita hirup merupakan penopang utama kehidupan karena menghasilkan banyak energi namun hasil samping dari reaksi pembentukan energi akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Metabolik aerobik yang merupakan proses penting dalam kehidupan organisme selalu diikuti oleh terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas terbentuk saat proses sintesis energi oleh mitokondria atau proses detoksifikasi yang melibatkan enzim sitokrom di hati. Seperti diketahui proses metabolisme terjadi karena teroksidasinya zat-zat makanan yang dikonversi menjadi senyawa pengikat energi (adenosin triphospat) dengan bantuan oksigen. Dalam proses oksidasi itu terbentuk juga radikal bebas (ROS) yaitu anion superoksida dan hidroksil radikal.

2. Radikal Bebas Eksternal

Sumber radikal bebas eksternal dapat berasal dari polusi udara, alkohol, rokok, radiasi sinar ultra violet obat-obatan tertentu seperti anestesi, pestisida, sinar X dan kemoterapi.

Radikal bebas juga dihasilkan dari proses pengolahan makanan yang berlebihan. Beberapa cara pengolahan makanan yang akrab dengan kehidupan sehari-

hari adalah menggoreng, membakar atau memanggang. Proses pengolahan makanan dengan cara menggoreng, membakar atau memanggang dengan suhu yang terlalu tinggi, terutama pada makanan hewani berkadar protein dan lemak tinggi sebaiknya tidak sering dilakukan karena akan menimbulkan dampak terbentuknya radikal bebas.

Minyak goreng yang dipakai berkali-kali sampai berwarna coklat kehitaman dan berbau tengik, dapat menjadi penyebab timbulnya radikal bebas pada makanan yang digoreng. Minyak goreng yang sudah rusak tersebut tidak layak dipakai lagi karena dapat melepaskan senyawa peroksida dan epoksida yang bersifat karsinogenik. Zat pengawet makanan seperti formal dehid atau formalin pada bakso atau tahu, zat warna tekstil seperti methanyl yellow pada kerupuk, serta rhodamin pada sirup, ternyata juga dapat merangsang terbentuknya radikal bebas.

II.6 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif adalah radikal bebas, senyawa ini terbentuk di dalam tubuh dan dipicu oleh bermacam-macam faktor (Winarsi, 2007).

Sadikin (2001) berpendapat bahwa serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai, yang kemudian menghasilkan senyawa radikal baru. Dampak reaktivitas senyawa radikal bebas dimulai dari kerusakan sel atau jaringan, penyakit autoimun, penyakit degeneratif, hingga kanker. Oleh karena itu tubuh memerlukan substansi penting, yakni antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas

dengan cara meredam dampak negatif senyawa radikal bebas tersebut (Edawati, 2012).

Supaya radikal bebas tidak merajalela, tubuh secara spontan akan memproduksi zat antioksidan. Antioksidan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil sehingga dapat melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas oksigen reaktif (Khairana, 2010).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer disebut juga antioksidan endogenus atau enzimatis. Salah satu 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 (Edawati, 2012).

Antioksidan sekunder disebut juga sebagai antioksidan eksogenus atau nonenzimatis. Antioksidan kelompok ini juga disebut sebagai 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 flavanoid (Winarsi, 2007).

Jika disuatu tempat terjadi reaksi oksidasi dimana reaksi tersebut menghasilkan hasil samping berupa radikal bebas maka tanpa adanya kehadiran antioksidan radikal bebas ini akan menyerang molekul-molekul lain disekitarnya. Hasil reaksi ini akan dapat menghasilkan radikal bebas yang lain yang siap menyerang molekul yang lainnya lagi. Akhirnya akan terbentuk reaksi berantai yang sangat membahayakan (Indigomarie, 2009).

Antioksidan cenderung bereaksi dengan radikal bebas terlebih dahulu dibandingkan dengan molekul lain karena antioksidan bersifat sangat mudah teroksidasi atau bersifat reduktor kuat dibanding dengan molekul yang lain. Jadi keefektifan antioksidan bergantung dari seberapa kuat daya oksidasinya dibanding dengan molekul lain. Semakin mudah teroksidasi maka semakin efektif antioksidan tersebut (Khairana, 2010).

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

Antioksidan bisa dengan mudah kita dapatkan dari makanan karena berbagai antioksidan telah terdapat secara alamiah terutama dalam sayur-sayuran, buah-buahan dan rempah. Berikut adalah beberapa tanaman yang potensial mengandung antioksidan alami yang berada disekitar kita (Hermani, 2006):

Tabel 2. Tanaman yang mengandung antioksidan alami

No.	Tanaman	Jenis yang Berpotensi Antioksidan
1.	Sayur-sayuran	Brokoli, Kubis, Wortel, Lobak, Tomat, Bayam, Cabe, Buncis, Pare, Jagung, Kangkung, Mentimun
2.	Buah-buahan	Anggur, Alpukat, Jeruk, Kiwi, Semangka, Markisa, Apel, Belimbing, Pepaya, Kelapa
3.	Rempah	Jahe, Temulawak, Kunyit, Kencur, Bangle, Lada, Cengkeh, Pala, Asam Jawa
4.	Tanaman lain	Teh, Ubi Jalar, Kedelai, Kentang, Temulawak

Sumber: Hermani, 2006.

Dari tabel 2 diketahui bahwa banyak sekali tumbuhan yang kita konsumsi tiap harinya mengandung antioksidan. Senyawa antioksidan tersebut tersebar pada berbagai bagian tumbuhan seperti akar, batang, kulit, ranting, daun, bunga, buah dan biji. Antioksidan alami ini berfungsi sebagai reduktor, penekan oksigen singlet, pemerangkap radikal bebas dan sebagai pengkhelat logam. Secara kimiawi antioksidan alami yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan ini terutama berasal dari golongan senyawa turunan fenol seperti flavanoid, turunan senyawa asam hidroksamat, kumarin, tokoferol dan asam organim (Hermani, 2006).

Aktivitas antioksidan dari berbagai tanaman diperkirakan mempunyai kekuatan sedang hingga tinggi. Beberapa ekstrak tanaman yang telah diketahui mempunyai aktivitas antioksidan tinggi antara lain dari golongan rempah rempah seperti ekstrak cengkeh, jahe, temulawak, kayu manis, dan pala. Kemudian ekstrak cabe dan daun teh juga mempunyai aktivitas antioksidan tinggi. Khusus untuk rempah-rempah, aktivitas antioksidan rempah-rempah kering umumnya lebih aktif daripada rempah-rempah segar (Khairana, 2010).

Sebenarnya radikal bebas juga memiliki arti penting bagi kesehatan dan fungsi tubuh yang normal dalam memerangi peradangan, membunuh bakteri dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah dan organ-organ yang ada didalam tubuh kita. Namun bila yang dihasilkan melebihi dari batas kemampuan proteksi antioksidan seluler maka radikal bebas akan berbalik menyerang sel itu sendiri (Sauriasari, 2006).

Ketidakeimbangan antara radikal bebas dan antioksidan menyebabkan keadaan stres oksidatif yang mengakibatkan kerusakan sel, jaringan hingga organ tubuh. Stres oksidatif adalah keadaan dimana jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralsirnya. Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan kerusakan yang lebih banyak (Edawati,2012). Literatur medis membuktikan bahwa stres oksidatif adalah penyebab utama penuaan dini dan timbulnya penyakit kronis seperti kanker, penyakit jantung dan lain-lain. Langkah yang tepat untuk mengurangi dan mencegah stres oksidatif adalah dengan mengurangi paparan radikal bebas baik secara langsung maupun tidak langsung dan mengoptimalkan pertahanan tubuh melalui asupan antioksidan yang cukup.

II. 7 Uji Toksisitas dan Uji Aktivitas Antioksidan

II. 7.1 Uji Toksisitas *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Toksisitas ialah efek berbahaya dari suatu bahan obat pada organ target. Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dan keberbahayaan zat yang akan diuji. Adapun sumber zat toksik dapat berasal dari bahan alam maupun sintetik. Toksisitas diukur dengan mengamati kematian hewan percobaan. Kematian dari

hewan percobaan dianggap sebagai respon yang terjadi dari pengaruh senyawa yang diuji, sehingga hubungan dari respon dengan menggunakan kematian sebagai jawaban toksis adalah titik awal untuk mempelajari toksisitas (Irma, 2017).

Toksisitas diidentifikasi sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan. Toksisitas merupakan suatu sifat relatif dari zat kimia dan sejauh menyangkut diri manusia secara langsung maupun tidak langsung. Toksisitas selalu menunjukkan ke suatu efek berbahaya atau mekanisme biologi tertentu. Toksisitas merupakan istilah relatif yang biasa dipergunakan dalam membandingkan suatu zat kimia lebih toksik dari zat kimia lainnya. Perbandingan antara zat kimia seperti itu sangat tidak informatif, kecuali jika pernyataan itu melibatkan informasi tentang mekanisme biologi yang sedang dipermasalahkan dan juga dalam kondisi bagaimana zat kimia tersebut berbahaya. Karena itu, pendekatan toksikologi adalah dari segi tentang berbagai efek zat kimia atas berbagai sistem biologi dengan penekanan pada sistem mekanisme efek berbahaya zat kimia itu dan kondisi dimana efek berbahaya itu terjadi. Kematian merupakan salah satu diantara beberapa kriteria toksisitas. Salah satu caranya ialah menggunakan senyawa dengan dosis maksimal, kemudian kematian hewan uji dicatat. Angka kematian hewan uji dihitung sebagai harga median *Lethal Dose* atau median *Lethal Concentration* (Irma, 2017).

Uji toksisitas pada hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah efek toksikan (respon) terhadap hewan uji. Respon tersebut dapat dilihat hanya berupa immobilisasi ke dalam tiap tabung berisi konsentrasi toksikan yang berbeda dimasukkan 10 ekor hewan uji, disertai dengan tabung kontrol. Immobilisasi ini

dianggap sebagai kematian untuk hewan uji seperti *Artemia salina* Leach yang diperoleh dengan ekstrapolasi kurva (Soemirat, 2005).

Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi-fungsi senyawa-senyawa yang terkandung dalam selnya yang dapat menghambat daya makan larva. Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh sebab itu, apabila senyawa-senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka alat pencernaan larva akan terganggu. Di samping itu, senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva sehingga akan mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa dan tidak mampu mengenali makanannya akibatnya larva akan mati kelaparan (Millati, 2016).

Uji toksisitas dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dimaksudkan untuk menentukan potensial suatu senyawa sebagai racun dengan mengetahui tingkat toksisitas dari suatu ekstrak (Hendri, dkk, 2018). Fajarningsih *et al* (2006) menyebutkan bahwa uji toksisitas dengan metode BSLT dapat dilakukan dengan cepat, murah dan mudah, sehingga banyak digunakan sebagai tahapan awal dalam penapisan ekstrak bahan aktif.

Uji *Brine Shrimp Lethality Test* dilakukan untuk mengamati tingkat kematian larva *Artemia salina* Leach yang disebabkan oleh ekstrak metabolit sekunder, tingkat kematian atau mortalitas selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis probit untuk menentukan konsentrasi IC50 (*lethal concentration*) 50%, yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian populasi larva *Artemia salina* Leach sebesar 50% dari populasi total. Senyawa yang mempunyai IC₅₀ lebih kecil dari 1000 ppm dikatakan memiliki potensi bioaktivitas (Meyer *et al* 1982 dalam Hanif 2012).

Uji mortalitas larva *Artemia salina* Leach merupakan salah satu metode uji bioaktif pada penelitian senyawa bahan alam. Penggunaan larva udang untuk kepentingan studi bioaktivitas sudah dilakukan sejak tahun 1956 dan sejak saat itu telah banyak dilakukan pada studi lingkungan, toksisitas, dan penapisan senyawa bioaktif. Uji ini merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa. Adapun penerapan untuk sistem bioaktivitas dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach tersebut, antara lain untuk mengetahui residu pestisida, anestetik lokal, senyawa turunan morpin, mikotoksin, karsinogenitas suatu senyawa dan polutan untuk air laut serta sebagai alternatif metode yang murah untuk uji sitotoksitas (Edawati, 2012).

Suatu metode uji hayati yang tepat dan murah untuk skrining dalam menentukan toksisitas suatu ekstrak bahan alam dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach. Uji dengan organisme ini sesuai untuk aktifitas farmakologi dalam ekstrak bahan alam yang bersifat toksik (Irma, 2017).

Keunggulan penggunaan *Artemia salina* Leach untuk uji BSLT ini ialah sifatnya yang peka terhadap bahan uji, waktu siklus hidup yang lebih cepat, mudah dibiakkan dan harganya yang murah. Sifat peka *Artemia salina* kemungkinan disebabkan oleh keadaan membran kulitnya yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Mudjiman, 2003).

Kandungan kimia yang terdapat dalam tubuh *Artemia salina* Leach adalah protein dan asam lemak yang tinggi. Nilai nutrisi *Artemia* dewasa mempunyai

keunggulan, yaitu kandungan proteinnya meningkat dari rata-rata 47% pada nauplius menjadi 60% pada *Artemia* dewasa yang telah dikeringkan (Gebo, 2000).

Artemia salina Leach ditemukan hampir pada seluruh tempat di permukaan perairan yang memiliki kisaran salinitas 10-20 g/L, hal inilah yang menyebabkannya mudah dibiakkan. Telur *Artemia salina* terlihat seperti partikel-partikel kecil berwarna coklat dengan diameter kira-kira 0,20 mm. Partikel-partikel tersebut akan naik ke permukaan dan akhirnya tersapu ke darat oleh angin ketika terjadi penguapan air pada musim-musim tertentu di wilayah perairan yang memiliki kadar garam tinggi. Telur-telur tersebut dapat dikumpulkan dan dipisahkan dari pasir dan kotoran lainnya dengan cara pengayakan. Telur-telur tersebut memiliki resistensi yang tinggi terhadap kondisi ekstrim dan dapat disimpan dalam waktu yang lama, jika telur-telur tersebut berada dalam keadaan bebas air (Wahyuni, 2006).

Perkembangan *Artemia salina* Leach yaitu jenis biseksual dan jenis partenogenik. Keduanya dapat terjadi ovovivipar dan avipar. Pada ovovivipar keluar induknya sudah berupa anak yang namanya nauplius, sedangkan pada avipar anak keluar dari induknya berupa telur, bercangkang tebal yang dinamakan sistole. Perkembangbiakan jenis biseksual harus melalui proses perkawinan antara induk jantan dan induk betina. Pada jenis partenogenesis tidak ada perkawinan karena memang tidak pernah ada jantannya. Jadi, betina akan beranak dengan sendirinya tanpa perkawinan (Irma, 2017).

Uji *Brine Shrimp Lethality Test* dengan menggunakan *Artemia salina* Leach dilakukan dengan menetas telur-telur tersebut dalam air laut yang dibantu dengan aerasi. Telur *Artemia salina* Leach akan menetas sempurna menjadi larva

dalam waktu 24jam. *Artemia Salina* Leach yang baik digunakan untuk uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) ialah yang berumur 48 jam sebab apabila lebih dari 48 jam dikhawatirkan kematian *Artemia salina* Leach bukannya disebabkan toksisitas ekstrak bahan alam melainkan oleh terbatasnya persediaan makanan (Wahyuni 2006).

Uji toksisitas larva *Artemia salina* Leach (*Brine Shrimp Lethality Test*) sering dianalogkan dengan kemampuan suatu bahan obat yang memiliki efek antikanker. Metode ini disarankan untuk digunakan pada skrining senyawa bioaktif bahan alam karena menunjukkan adanya korelasi dengan metode sitotoksik in vitro lainnya (Carballo, et al., 2002).

Penelitian dengan larva *Artemia salina* Leach dalam uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) telah digunakan oleh Pusat Kanker Purdue, Universitas Purdue di Lafayette, Amerika Serikat untuk senyawa aktif bahan alam termasuk tanaman dan mahluk hidup lainnya secara umum dan tidak spesifik untuk zat anti kanker. Namun demikian hubungan yang signifikan dari sampel yang bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach ternyata juga mempunyai aktifitas sitotoksik. Berdasarkan hal tersebut maka larva *Artemia salina* Leach dapat digunakan untuk uji sitotoksik (Irma, 2017).

II. 7. 2 Uji Aktivitas Antioksidan

Reaksi oksidasi berlebihan yang terjadi di dalam tubuh dapat memicu terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas merupakan suatu senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan, sehingga tidak stabil. Untuk mencapai kestabilan, elektron tidak berpasangan akan mencari pasangan elektron di sekitarnya. Radikal bebas dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lipid, DNA, dan dapat memicu

penyakit degeneratif (Uppu dkk, 2010). Senyawa antioksidan dapat meredam radikal bebas dan menghambat reaksi oksidatif, sehingga kerusakan sel akibat radikal bebas dapat dicegah (Ou Huang dkk, 2002).

Packer (1999) menyatakan bahwa aktifitas antioksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya menangkap radikal bebas. Radikal bebas yang biasa digunakan sebagai model dalam mengukur daya penangkapan radikal bebas yaitu DPPH yang merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan. Jika disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik akan stabil selama bertahun-tahun (Amelia, 2011).

Salah satu metode yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl) 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 absorpsi (Molyneux, 2004).

Metode DPPH merupakan metode yang paling sering digunakan untuk penyaringan aktivitas antioksidan dari berbagai bahan alam. Metode peredaman radikal bebas DPPH didasarkan pada reduksi dari radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambat radikal bebas (Shivaprasad, 2005). Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimalnya, yang sebanding terhadap konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan ke

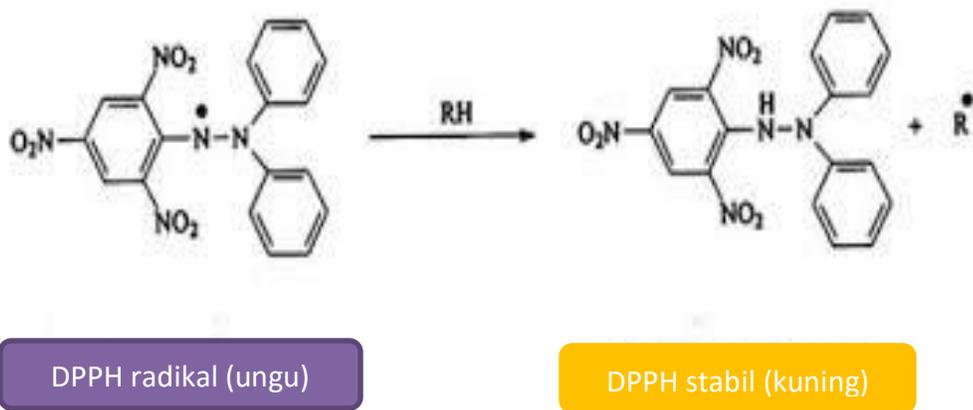
laruatan reagen DPPH. Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai konsentrasi efektif IC₅₀ atau *inhibition concentration* (Amelia, 2011).

Metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl) memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi 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 *et al*, 2009).

Metode DPPH merupakan metode yang cepat, sederhana, dan tidak membutuhkan biaya yang tinggi dalam menentukan kemampuan antioksidan menggunakan radikal bebas 1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl. Metode ini sering digunakan untuk menguji senyawa yang berperan sebagai free radical scavengers atau donor hidrogen dan mengevaluasi aktivitas antioksidannya, serta mengkuantifikasi jumlah kompleks radikal antioksidan yang terbentuk. Metode 1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl atau DPPH dapat digunakan untuk sampel yang berupa padatan maupun cairan (Prakash dkk, 2001).

DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Santosa, 2012).

Gugus kromofor dan auksokrom pada radikal bebas DPPH memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm sehingga menimbulkan warna ungu. Warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning seiring penambahan antioksidan yaitu saat elektron tunggal pada DPPH berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan. Hasil dekolorisasi oleh antioksidan setara dengan jumlah elektron yang tertangkap. Mekanisme penangkapan radikal ditunjukkan pada reaksi di bawah ini:



Gambar 2. Reaksi penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan
 Sumber: Dehpour dkk, 2009.

Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan memberikan warna ungu dan menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hydrogen (Prakash, 2001).

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 IC₅₀ (*inhibition concentration*). IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50% (Molyneux, 2004).

Aktivitas antioksidan dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas. Nilai ini diperoleh dengan rumus sebagai berikut (Molyneux, 2004):

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

Absorbansi blanko yang digunakan yaitu absorbansi DPPH dengan etanol pro analisa. Berdasarkan rumus tersebut, semakin tinggi tingkat diskolorisasi (absorbansi semakin kecil) maka semakin tinggi nilai aktivitas penangkapan radikal bebas (Molyneux, 2004).

Aktivitas antioksidan pada metode DPPH dinyatakan dengan IC₅₀ dimana IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan. IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin besar nilai IC₅₀ menunjukkan semakin rendah aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC₅₀ yang bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika nilai IC₅₀ bernilai 151-200 ppm (Cahyani, 2017).

BAB III

METODE PENELITIAN

III. 1 Metode Sampling

Ascidia Didemnum sp. dikoleksi secara bebas dari perairan Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan pada kedalaman 2-5 meter dengan cara *snorkeling*. Sampel *Ascidia Didemnum* sp. diletakkan dalam kantung *zipp-lock* di bawah air. Sampel *Ascidia Didemnum* sp. yang diperoleh direndam dengan etanol dalam botol sampel dari kaca. Tahap selanjutnya *Ascidia Didemnum* sp. dideterminasi di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan, Departmen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

III. 2 Metode Ekstraksi

Pertama-tama sampel *Ascidia Didemnum* sp. dikeringkan selama 6 hari dengan paparan cahaya matahari secara tidak langsung. Selanjutnya sampel ditimbang dan dihaluskan menggunakan mesin penggiling untuk laboratorium (*laboratory blender*). Sampel *Ascidia Didemnum* sp. ditimbang seberat 26,61 gram sebagai massa kering. Sampel yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam botol kaca dan dicampur dengan etanol sebanyak 79,83 mL dan diaduk hingga homogen dengan menggunakan batang pengaduk. Sampel *Ascidia Didemnum* sp. selanjutnya disimpan pada tempat yang gelap dan tidak terkena cahaya matahari.

Proses maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dimana sampel *Ascidia Didemnum* sp. diaduk menggunakan batang pengaduk dan disaring dengan bantuan kertas saring lalu dipindahkan ke botol yang baru. Maserasi dan penyaringan

dilakukan berulang-ulang sampai filtrat dari berwarna menjadi tidak berwarna. Kemudian filtrat dievaporasi untuk menguapkan etanol menggunakan *rotary evaporator* 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 rendaman yang dihasilkan dan diperoleh 2,8122 gram untuk berat sampel *Ascidia Didemnum* sp. yang telah dievaporasi.

III. 3 Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

III. 3. 1 Penyiapan Larva *Artemia salina* Leach

Sebelum menetasakan larva *Artemia salina* Leach dilakukan aerasi pada air laut terlebih dahulu selama 1 jam. Kista *Artemia salina* Leach direndam dengan NaOCL 2% untuk melunakkan cangkang selama 5 menit. Penetasan dilakukan dengan menggunakan toples kaca dengan merendam 1 gram kista *Artemia salina* Leach dalam air laut sebanyak 500 mL dan diberi penerangan dengan lampu listrik serta diaerasi selama 24 jam.

III. 3. 2 Penyiapan Larutan Uji

Konsentrasi awal sebesar 5000 ppm sebagai larutan induk dengan melarutkan 0,05 gram ekstrak ke dalam 10 mL air laut. Larutan tersebut selanjutnya dilakukan pengenceran sehingga mendapatkan konsentrasi 1000, 100, 10, dan 1. Larutan yang digunakan sebagai kontrol dilakukan tanpa penambahan ekstrak.

III. 3. 3 Uji Toksisitas

Disiapkan tabung vial dengan ukuran 10 mL kemudian larutan uji masing-masing dipipet diambil dari konsentrasi induk. Selanjutnya ditambahkan air laut dan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach yang telah berumur 2 hari hingga volumenya mencapai 5 mL. Setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan dan dibandingkan dengan kontrol. Pengujian ini dilakukan selama 24 jam kemudian dilihat jumlah mortalitas larva *Artemia salina* Leach.

III. 4 Uji Antioksidan

Pengujian antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH atau 1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl yang dilawali dengan pembuatan larutan DPPH dengan cara menimbang DPPH sebanyak 15,775 mg dan dilarutkan dalam 100 mL metanol untuk mendapatkan 0,4 mM. Proses pembuatan larutan DPPH dilakukan pada kondisi suhu yang rendah dan terlindungi dari sinar matahari.

Pembuatan larutan sampel dibuat dengan larutan induk 5000 ppm dengan cara menimbang ekstrak etanol *Ascidia Didemnum* sp. sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan etanol absolut sambil diaduk dan dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 5 mL. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, 1600 ppm, 3200 ppm.

Pengujian metode DPPH dilakukan dengan memipet 1 ml DPPH menggunakan mikropipet. Divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C pada ruangan gelap. Analisis pengujian antioksidan dengan metode DPPH dilakukan dengan melihat perubahan warna pada sampel setelah di inkubasi bersama DPPH. Jika semua

elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel ekstrak *Ascidia Didemnum* sp. maka akan terjadi perubahan warna sampel yang dimulai dari warna ungu tua hingga menunjukkan warna kuning terang. Kemudian sampel diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm.

III. 5 Analisis Data

Pada uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) uji toksisitas sampel ditentukan dengan melihat besarnya nilai dari IC₅₀ yang dapat mematikan *Artemia salina* Leach sampai 50% dan dilakukan perhitungan statistik dengan analisa probit (*probability unit*). Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan persen kematian dengan rumus:

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva hidup}} \times 100\%$$

Apabila pada kontrol terdapat larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{uji-kontrol}}{\text{kontrol}} \times 100\%$$

Setelah mengetahui % mortalitas larva *Artemia salina* Leach, kemudian dicari nilai probit melalui tabel probit dan diregresikan secara linier dengan rumus:

$$Y = a - bX$$

dimana Y adalah nilai probit, a adalah konsentrasi regresi, b adalah *slope* atau kemiringan regresi dan X adalah logaritma konsentrasi uji.

Pada uji 1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl (DPPH) analisis data dilakukan penentuan nilai IC₅₀ dimana konsentrasi sampel dan persen inhibisinya masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Pengolahan data

persamaan regresi linear menggunakan program Microsoft Excel. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel dinyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC₅₀.