

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA
ANTIOKSIDAN ALKALOID DARI SPONGA
PERAIRAN TELUK KUPANG,
NUSA TENGGARA TIMUR**

(Skripsi)

Oleh

Peni Ahmadi



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2010**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA
ANTIOKSIDAN ALKALOID DARI SPONGA
PERAIRAN TELUK KUPANG,
NUSA TENGGARA TIMUR**

Oleh

Peni Ahmadi

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
Sarjana Sains

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2010**

ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ANTIOKSIDAN ALKALOID DARI SPONGA PERAIRAN TELUK KUPANG, NUSA TENGGARA TIMUR

Oleh

Peni Ahmadi

Telah dilakukan skrining senyawa antioksidan pada lima ekstrak metanol sponsa yang diperoleh dari perairan Teluk Kupang, secara berturut-turut diperoleh persen inhibisi A01 4,3%, A08 6,85, K70 7,4%, C21 22,7% dan K72 25,25%. Analisis selanjutnya dipilih sponsa C21. Setelah melalui beberapa tahapan kromatografi, diperoleh isolat PN10*. Karakterisasi isolat PN10* menggunakan pereaksi spesifik Dragendorff dan ninhidrin pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT), menunjukkan bahwa senyawa PN10* merupakan senyawa alkaloid tersier. Analisis lebih lanjut, dilakukan karakterisasi dengan menggunakan FTIR-ATR, hasil analisis menunjukkan bahwa senyawa alkaloid yang diperoleh merupakan golongan amina siklik ditunjukkan dengan adanya serapan vibrasi ulur di daerah $1465,64\text{ cm}^{-1}$ dan menunjukkan adanya serapan untuk C=N- di daerah $1326,62\text{ cm}^{-1}$, selain itu juga memiliki gugus hidroksi di tunjukkan dengan adanya serapan vibrasi ulur O-H pada $3367,32\text{ cm}^{-1}$ dan ikatan rangkap tak terkonjugasi (C=C) di tunjukan adanya serapan vibrasi $1653,37\text{ cm}^{-1}$. Selanjutnya, secara kuantitatif, PN10* dan vitamin C direaksikan dengan 0,1 mM DPPH dan diperoleh persen inhibisi maksimum PN10* 25 ppm, yaitu sebesar 65,69 % sedangkan pada vitamin C (asam askorbat), persen inhibisi maksimumnya 50 ppm, sebesar 70,17%. Kemudian dari hasil karakterisasi sponsa C21 berdasarkan morfologinya menunjukkan bahwa sponsa C21 merupakan sponsa Demospongia, *Aaptos* sp.

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI
SENYAWA ANTIOKSIDAN ALKALOID
DARI SPONGA PERAIRAN TELUK
KUPANG, NUSA TENGGARA TIMUR**

Nama Mahasiswa : *Peni Ahmadi*

No. Pokok Mahasiswa : **0517011048**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Andi Setiawan, Ph.D.
NIP. 195809221988111001

Nurul Utami, M.Sc.
NIP. 196204121989032002

2. Ketua Jurusan Kimia

Andi Setiawan, Ph.D.
NIP. 195809221988111001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Andi Setiawan, Ph.D.

Sekretaris : Nurul Utami, M.Sc.

**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Tati Suhartati, M.S.**

2. Dekan Fakultas MIPA

**Dr. Sutyarso, M.Biomed
NIP. 195704241987031001**

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 5 November 2010

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Gayabaru II, Lampung Tengah pada hari Kamis 05 Mei 1988 buah kasih dari Ayah Amir Ahmadi dan Ibu Suhansih sebagai anak ke tiga dari tiga bersaudara.

Penulis telah menyelesaikan pendidikan taman kanak-kanak pada tahun 1993 di TK Pertiwi Gaya Baru II, selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang menengah pertama di SMP Negeri 1 Seputih Surabaya dan lulus pada tahun 2002. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang menengah atas di SMA Negeri 1 Kotagajah dan selesai pada tahun 2005. Ditahun yang sama, penulis diterima di perguruan tinggi Universitas Lampung, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Jurusan Kimia melalui jalur SPMB.

Selama menjadi mahasiswa Universitas Lampung, penulis pernah menjadi asisten Agroindustri program studi Analisis Kimia D3 FMIPA Unila pada tahun 2007 dan 2008. Pada tahun 2008, penulis menjadi asisten kimia medik untuk program studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Unila. Selain itu, penulis juga aktif dalam organisasi kemahasiswaan Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) sebagai anggota Biro Usaha Mandiri (BUM) periode 2006-2008.

PERSEMBAHAN

Dengan kerendahan hati dan mengharap
ridho Allah,
Ku persembahkan karya kecil ini kepada :

Seluruh orang yang aku sayangi
ayah dan ibu ku yang senantiasa menyayangi,
mencintai dan mendoakan aku.

Kakak-kakak ku dan keponakan ku, kalian adalah
motivasiku dan inspirasiku.

Keluarga kecil ku di *LPO & Biomass*
sungguh kalian mengajarku
mengerti akan arti hidup.

*Jika Cinta Menganggapmu Berharga
Maka Cinta Akan Menemukanmu*

Aku hanya hidup hari ini....

Jadi aku harus lakukan yang terbaik di hari ini....

*Selama jantungku masih berdetak,..
tak sewajarnya aku menyerah.....*

Hanya kepada Tuhanku....

tempat aku meminta dan berkeluh kesah....

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis haturkan kepada Sang Penguasa Hidup atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul :

"ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ANTIOKSIDAN ALKALOID DARI SPONGA PERAIRAN TELUK KUPANG NUSA TENGGARA TIMUR"

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih yang tulus kepada :

1. Bapak Andi Setiawan, Ph.D. sebagai pembimbing I dan Kepala Jurusan Kimia atas segala didikan, arahan, saran dan bimbingannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Ibu Nurul Utami, M.Sc. sebagai pembimbing II atas arahan, saran dan bimbingannya selama penulisan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Tati Suhartati, M.Si. sebagai penguji atas arahan, saran dan bimbingannya selama penulisan skripsi ini.
4. Ayah dan Ibu (kalianlah hidupku), mas Yoga, mba Iin dan ayuk Sanah tercinta atas kasih sayang, support, doa, dukungan dan didikannya yang telah diberikan kepada penulis, serta si mungil keponakanku yang menjadi inspirasiku.

5. Paman, ka Dani, ayuk Laida atas saran, masukkan, didikan, dan atas keluarga kecil kita yang sangat mengagumkan.
6. Rekan-rekan biomass (ka randi, eko dan reni) atas bantuan dan kerjasamanya.
7. Tika_yem, Linda_yem dan Depuy atas doa, dukungan, semangat, persahabatan kita dan masa-masa bersama saat kuliah dan penelitian, semoga kekal selamanya.
8. Adi, Oby, Rifky dan Ole atas keluarga kecil kita, kalian adalah adik-adik terbaikku yang aku sayangi, kalian selalu menghiburku, kita untuk selamanya.
9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kesalahan dan kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga Allah SWT memberikan rahmat dan hidayah-Nya untuk kita semua. Amin.

Bandar Lampung, 5 November 2010
Penulis

Peni Ahmadi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Penelitian	1
B. Tujuan Penelitian	4
C. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Potensi Indonesia.....	5
B. Sponga	7
C. Senyawa Antioksidan Alkaloid	13
D. Senyawa Antioksidan dan radikal bebas	14
E. Penapisan Senyawa Antioksidan	20
F. Ekstraksi dan Isolasi senyawa Bioaktif.....	22
G. Karakterisasi senyawa bioaktif.....	26
III. METODOLOGI PENELITIAN	29
A. Waktu dan Tempat Penelitian	29

B.	Alat dan Bahan	29
	Alat-alat	29
	Bahan-bahan	29
C.	Metode penelitian	30
	1. Sampling	30
	2. Karakterisasi Spikula	30
	3. Ekstraksi alkaloid	30
	4. Penapisan Senyawa Antioksidan.....	31
	A. Uji awal antioksidan	31
	B. Uji alkaloid	31
	5. Kromatografi Kolom Gravitasi landaian.....	32
	6. Uji Kualitatif antioksidan terhadap Vit. C	32
	7. Karakterisasi senyawa dengan spektroskopi.....	33
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	34
	A. Pengambilan Sampel Sponga	34
	B. Penapisan senyawa alkaloid antioksidan.....	37
	C. Ekstraksi alkaloid	39
	D. Isolasi senyawa alkaloid antioksidan	40
	E. Karakterisasi struktur alkaloid antioksidan	42
	F. Uji kuantitatif aktivitas antioksidan	50
	G. Identifikasi sponga berdasarkan fisiologinya.....	53
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	56

A. Kesimpulan	56
B. Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagian Organ Sponga	7
2. Senyawa alkaloid dari sponga perairan Indonesia	12
3. Struktur senyawa N,N'-di-2-butyl-1,4-fenilenediamin	18
4. Mekanisme reaksi vitamin C sebagai antioksidan	19
5. Struktur kimia <i>quercetin</i> dan <i>xanthohumol</i>	19
6. Struktur kimia antioksidan alkaloid	20
7. Reaksi radikal DPPH	21
8. Senyawa identifikasi dengan KLT	25
9. Eksitasi elektron.....	27
10. Sponga perairan Kupang	34
11. KLT ekstrak MeOH sponga C21	39
12. KLT fraksi PA3.....	40
13. KLT fraksi-fraksi PA3	41
14. KLT fraksi PN10*.....	42
15. Spektrum IR senyawa PN10*	43
16. Struktur senyawa parsial 2 dan 18	44
17. KLT alkaloid PN10*	46
18. Struktur parsial 2 dan 15	47

19. Struktur parsial 19	49
20. <i>Microplatereader</i> PN10*	51
21. Bentuk sponga C21	54
22. Spikula sponga C21	54
23. Spikula literatur	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Lokasi pengambilan sampel di Kupang	35
2. Spesifikasi 5 sampel sponga	36
3. % inhibisi 5 sampel sponga.....	37
4. Fraksi-fraksi PA3	41
5. Absorbansi dan % inhibisi PN10* dan Vit C.....	52

I. Pendahuluan

A. Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai negara kepulauan yang terletak di Kawasan Tropis dengan jumlah pulau ± 17.508 . Secara geografis, Indonesia terletak di antara dua benua yaitu Benua Asia dan Australia, serta diapit oleh Samudra Hindia dan Samudra Pasifik (Bengen, 2001). Letak geografis yang strategis ini memungkinkan Indonesia memiliki potensi sumber daya laut yang beraneka ragam. Dari seluruh jumlah terumbu karang Asia, 51% di antaranya dimiliki oleh Indonesia, dan jumlah ini merupakan 18% jumlah terumbu karang di dunia. Wilayah Timur Indonesia sendiri diketahui memiliki 480 jenis karang batu (*hard coral*) yang sudah berhasil diidentifikasi dan merupakan 60% karang batu di dunia yang diketahui jenisnya. Indonesia juga diketahui memiliki sponsa dengan keanekaragaman hayati yang tinggi di mana ada lebih dari 1500 jenis sponsa telah teridentifikasi (Harsono, 2001).

Salah satu wilayah Indonesia bagian Timur yang belum banyak dimanfaatkan yaitu Kupang, ibukota Propinsi Nusa Tenggara Timur. Propinsi berkepulauan ini memiliki luas daerah dengan luas daratan $\pm 47.349 \text{ km}^2$ dan perairan $\pm 199.526 \text{ km}^2$, yang tersebar di 566 pulau. Kondisi geografis ini membuat Propinsi Nusa Tenggara Timur memiliki potensi sumber daya alam yang

cukup melimpah terutama sumber daya lautnya jika ditinjau dari luas perairannya, dan salah satu potensi Kupang adalah sponsa (Temu *et al.*, 1999). Namun potensi ini belum dimanfaatkan secara optimal. Sampai saat ini, pemanfaatan potensi yang ada hanya sebatas untuk pemenuhan pangan masyarakat, transportasi, dan pariwisata yang dalam pemanfaatannya cenderung merusak lingkungan. Oleh sebab itu sebelum terjadi kerusakan yang lebih parah, perlu upaya yang berkaitan dengan peningkatan potensi yang ada termasuk pengkajian terhadap biota lautnya, salah satunya adalah sponsa. Hal ini dikarenakan sponsa telah diketahui memiliki potensi sebagai penghasil senyawa bioaktif yang relevan untuk pengembangan biomedik.

Berbagai senyawa bioaktif telah diisolasi dari sponsa perairan Indonesia, contohnya senyawa agosterol, suatu MDR(*Multi Drug Resistance*) modulator, berhasil diisolasi dari *Spongia* sp di perairan Lombok (Aoki *et al.*, 1998).

Senyawa *lembehynes*, senyawa neuritogenik yang diisolasi dari sponsa *Haliclona* sp yang hidup di perairan Teluk Lembeh (Izumi *et al.*, 2006).

Selain itu, senyawa Aaptamine yang diisolasi dari *Aptos suberitoide* yang hidup di perairan Carita, Jawa Barat, memiliki aktivitas sebagai pengaktivasi promotor p21 (Aoki *et al.*, 2006). Kemudian Watanabe *et al.* (2007)

mempelajari hubungan antara struktur dan aktivitas senyawa Cortistatin A dengan analog-analognya yaitu cortistastin E, F, G, dan H terhadap sifat antiproliferatif, hasilnya adalah cortistatin A memiliki aktivitas lebih tinggi dibanding analog-analognya. Kajian lebih lanjut dilakukan oleh, Aoki *et al.*, untuk mempelajari hubungan sifat antiproliferatif dengan senyawa cortistatin A dan analog lainnya, *Cortistatins J, K, L*. Hasil kajian tersebut

menunjukkan senyawa cortistatin J memiliki aktivitas antiproliferatif lebih besar dibandingkan senyawa asalnya dan analog lainnya.

Arah pengembangan riset senyawa bioaktif akhir-akhir ini adalah mencari obat-obat yang bekerja selektif dan efektif untuk mengatasi penyakit pada manusia. Sebagai contoh pada tahun 2009 Arai *et al.* berhasil mengisolasi senyawa haliklonasiklamina yang memiliki aktivitas sebagai antidorman pada mycobacterial dari sponga *Haliclona* sp. dari perairan Flores. Kemudian Hanani dkk. (2005) membuktikan adanya sifat antioksidan pada ekstrak metanol dari sponga *Callispongia* sp yang hidup dari Kepulauan Seribu. Ekstrak metanol dari sponga *Lotrochota* sp. yang dari Laut Cina juga diketahui memiliki sifat antioksidan (Liua *et al.*, 2008). Namun kedua peneliti ini masih sebatas identifikasi terhadap aktivitas sebagai antioksidan dan belum menemukan sisi aktif senyawa yang berperan sebagai antioksidan.

Jumlah radikal bebas yang semakin meningkat akibat meningkatnya aktivitas manusia menyebabkan antioksidan yang diproduksi oleh tubuh tidak mencukupi untuk menghambat serangan radikal bebas dari lingkungan. Hal ini dapat menyebabkan meningkatnya penderita penyakit degeneratif, misal jantung koroner (Butterfield *et al.*, 2007). Upaya yang telah dilakukan hanya sebatas pada pemanfaatan senyawa antioksidan sebagai pelindung kulit dan juga kosmetik. Dengan demikian, kajian lebih lanjut mengenai senyawa antioksidan sebagai obat untuk mengatasi penyakit-penyakit degeneratif juga sangat diperlukan. Salah satu upaya awal perlu dilakukan isolasi dan identifikasi struktur senyawa antioksidan yang diisolasi dari sponga.

Umumnya senyawa antioksidan merupakan golongan flavonoid, fenolik, dan terpenoid. Namun, tidak menutup kemungkinan senyawa antioksidan berasal dari golongan alkaloid, karena beberapa senyawa alkaloid juga memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan memiliki gugus-gugus fungsi yang dapat bereaksi dengan radikal bebas, serta sisi-sisi aktif yang lebih selektif dan reaktif dibandingkan flavonoid dan terpenoid (Grube *et al.*, 2007).

Mempertimbangkan uraian di atas di mana jumlah senyawa radikal bebas yang semakin meningkat seiring dengan meningkatnya aktivitas manusia dapat menyebabkan penyakit serius pada manusia, maka diperlukan upaya mendapatkan senyawa antioksidan untuk melindungi manusia dari serangan radikal-radikal bebas tersebut. Penelitian ini akan dilakukan upaya untuk mengisolasi, mengkarakterisasi dan penapisan senyawa antioksidan dari lima jenis sponsa yang diperoleh dari perairan Kupang, Nusa Tenggara Timur.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh senyawa antioksidan khususnya golongan alkaloid dari sponsa perairan Kupang, Nusa Tenggara Timur dan mengidentifikasi serta mengkarakterisasi strukturnya.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah senyawa yang dihasilkan dapat digunakan untuk pengembangan senyawa antioksidan yang tidak hanya ditujukan untuk mengatasi penyakit degeneratif manusia, tetapi sebagai bahan dasar untuk membuat senyawa antioksidan yang digunakan dalam sektor industri pangan, kosmetik dan kesehatan.

II. Tinjauan Pustaka

A. Potensi Indonesia

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia dengan jumlah pulau 17.508 dengan panjang pantai lebih dari 81.000 km dan luas laut sekitar 5,8 juta km² yang terdiri dari 3,1 juta km² perairan Nusantara dan 2,7 juta km² perairan Zona Ekonomi Eksklusif. Bentangan wilayah pesisir dan lautan yang luas serta didukung oleh ekosistem pesisir seperti bakau, terumbu karang (*coral reefs*) dan padang lamun (*sea grass beds*) membuat Indonesia juga dikenal sebagai negara dengan kekayaan keanekaragaman hayati (*biodiversity*) laut terbesar di dunia (Dahuri dkk., 1996).

Untuk ekosistem terumbu karang, *World Resource Institute* (WRI) (2002) memperkirakan bahwa luas terumbu karang di Indonesia adalah sekitar 51.000 km². Angka ini belum mencakup terumbu karang di wilayah terpencil yang belum dipetakan atau yang berada di perairan agak dalam (*inland waters*). Jika perkiraan ini akurat maka 51% terumbu karang di Asia Tenggara atau 18% terumbu karang di dunia berada di perairan Indonesia. Lebih dari 480 jenis karang batu (*hard coral*) telah didata di wilayah timur Indonesia dan merupakan 60% dari jenis karang batu di dunia yang telah berhasil dideskripsikan. Keanekaragaman tertinggi ikan karang di dunia juga

ditemukan di Indonesia dengan lebih dari 1.650 jenis hanya untuk wilayah Indonesia bagian timur .

Namun demikian pemanfaatan potensi sumberdaya laut Indonesia yang begitu beranekaragam masih belum optimal. Hingga saat ini, eksplorasi potensi sumber daya laut hanya sebatas untuk pemenuhan kebutuhan pangan, transportasi, pariwisata dan budidaya. Pemanfaatan potensi sumber daya laut di sektor pangan masih terbatas pada budiya rumput laut, mutiara dan udang. Sedangkan di sektor industri seperti industri kimia, farmasi dan kosmetik masih sangat terbatas, oleh sebab itu perlu dilakukan observasi lanjut mengenai potensi biota laut untuk dimanfaatkan dalam dunia kimia, ataupun farmasi.

Perairan Kupang Propinsi Nusa Tenggara Timur

Salah satu kepulauan yang belum banyak dimanfaatkan yaitu Nusa Tenggara, dan salah satu daerahnya adalah Kupang. Kupang merupakan salah satu kabupaten dengan ekosistem kepulauan. Wilayah ini terdiri dari 27 pulau di mana diantaranya masih terdapat 8 pulau yang belum memiliki nama.

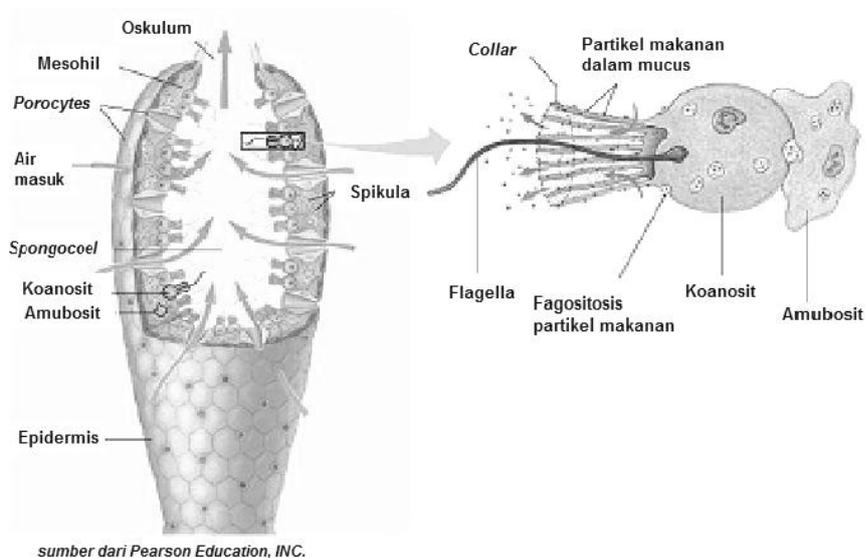
Kawasan pesisir dan laut Kabupaten Kupang mempunyai potensi sumberdaya alam yang sangat kaya seperti hutan bakau padang lamun, rumput laut, berbagai jenis terumbu karang, perikanan dan biota laut lainnya (Temu *et al.*, 1999).

Kondisi geografis NTT sebagai propinsi berkepulauan dengan luas wilayah daratan 47.349 km² dan luas perairan 199.526 km² yang tersebar di 566 pulau membuktikan bahwa Provinsi NTT masih memiliki banyak potensi

sumberdaya alam yang belum dikelola secara optimal, dan salah satunya yaitu sponsa. Telah banyak dilaporkan bahwa sponsa sangat potensial sebagai penghasil produk alami laut dalam bidang farmasi (Faulkner, 2000).

B. Sponga

Sponga adalah biota multiseluler primitif yang bersifat *filter feeder* - menghisap air dan bahan-bahan lain di sekelilingnya melalui pori-pori kemudian dialirkan ke seluruh bagian tubuhnya melalui kanal dan dikeluarkan melalui pori-pori yang terbuka (*ostula/osculum*). Sponga diperkirakan telah ada sejak jaman paleozoik sekitar 1,6 milyar tahun yang lalu (Vacelet, 2008).



Gambar 1. Bagian organ sponsa

Sponga termasuk hewan laut dalam filum porifera (Barnes, 1980) yang berarti memiliki pori-pori dan saluran. Melalui pori-pori dan saluran-saluran inilah

air diserap oleh sel khusus yang dinamakan sel leher, yang umumnya menyerupai cambuk yang dinamakan koanosit.

Cambuk koanosit dari sponsa bergerak terus menerus dan mengakibatkan air masuk ke dalam sistem salurannya. Koanosit juga mencernakan partikel makanan, baik di luar maupun di dalam sel leher. Sisa makanan yang tidak tercerna dibuang keluar melalui sel leher. Makanan yang telah dicerna dipindahkan dari satu sel ke sel lain kemudian diedarkan melalui saluran tertentu oleh sel-sel amuba yang tersebar di dalam lapisan tengah sponsa (McConnaughey, 1970). Makanan sponsa ada dalam bentuk partikel organik renik hidup atau tidak, seperti bakteri dan mikroalga (Proksch *et al.*, 2002).

Sponsa hidup menempel pada karang atau batuan, hidup di laut hingga kedalaman sekitar 8000 meter. Sponsa merupakan makanan bagi beberapa jenis moluska, bintang laut, kura-kura, dan beberapa ikan tropis. Sebagian besar sponsa ($\pm 50\%$) bersifat toksik terhadap ikan, sehingga ikan bukan merupakan predator utama bagi sponsa. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam sponsa tidak hanya untuk melindungi diri dari predator tetapi juga untuk melindungi permukaan sponsa agar selalu bersih dari larva dan tumbuhan lain yang menghambat proses makan sponsa (Bell and Barne, 2005)

Karakteristik dari ekologi suatu jenis sponsa dapat memungkinkan ditemukannya senyawa yang unik dan menarik dari sponsa. Salah satu karakteristik berdasarkan pada habitatnya, yang dikategorikan menjadi:

- a. Habitat terbuka. Pada habitat ini berada pada air tenang di mana sponsa tumbuh di antara alga, koral, dan organisme lunak halus lainnya, yang tidak terlindung dari cahaya matahari, ikan dan predator lain. Sponsa pada habitat ini memiliki perlindungan (senyawa beracun, pigmen, dan spikula) terhadap serangan sinar UV seperti yang ditemukan pada *cyanobacteria* yang dapat menyerap sinar UV (pigmen) yang jarang dimiliki oleh organisme lain dan radiasi di sekitar air laut . Untuk melindungi dari serangan kompetitor dan predator, sponsa menggunakan spikula dan senyawa beracun yang dihasilkan oleh sponsa tersebut. Senyawa beracun yang dihasilkan tersebut dapat juga digunakan untuk melindungi diri dari radiasi.
- b. Habitat perairan dalam. Di habitat ini, sponsa tumbuh di antara koral dan organisme *sessile* keras lainnya, tetapi tidak mendapatkan sinar matahari dan terhindar dari jangkauan predator. Untuk pertahanan diri dari serangan kompetitor seperti koral dan sponsa lain, sponsa mengeluarkan senyawa beracun atau senyawa antipredator. Belum ada literatur yang menyebutkan secara jelas baik kualitatif ataupun kuantitatif apakah senyawa yang terkandung dalam sponsa untuk spesies yang sama dan yang hidup di perairan dalam menghasilkan senyawa beracun lebih banyak atau lebih sedikit dibandingkan sponsa yang tumbuh di habitat lain.
- c. Habitat yang tersembunyi. Pada habitat ini biasanya ada di dalam gua, di bawah bebatuan, terhindar dari jangkauan sinar matahari dan terlindung

dari kompetitor dan predator lain. Sponga yang hidup di habitat ini hanya memiliki sedikit senyawa racun.

Aktivitas senyawa bioaktif dari sponga

Sponga kaya akan senyawa sitotoksik yang jumlahnya melebihi biota laut lainnya maupun biota darat. Dalam suatu proses penapisan masal senyawa sitotoksik dari bahan alami baik dari sumber yang berasal dari daratan maupun dari laut oleh NCI (*National Cancer Institute*) Amerika, ternyata >10% dari semua jenis sponga yang diobservasi bersifat aktif. Namun Senyawa dari sponga yang aktif terhadap sel kanker manusia secara *in vitro* tak selalu bersifat aktif secara *in vivo* terhadap model pada tikus. Senyawa bahan alam dari sponga juga dapat digunakan sebagai struktur induk dalam sintesis untuk pengembangan bahan obat baru atau dapat juga digunakan sebagai alat untuk analisis mekanisme hubungan antara struktur dan bioaktivitasnya (Proksch, 1999).

Senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dari sponga antara lain golongan steroid, terpenoid, flavonoid, dan alkaloid. Namun dari golongan senyawa tersebut, alkaloid merupakan golongan senyawa yang memiliki kemampuan farmakologik lebih besar dibandingkan dengan golongan lain (Grube *et al.*, 2007). Beberapa contoh senyawa alkaloid dari sponga yang hidup di perairan Indonesia antara lain :

Manadomanzamines A (1) and B (2) (Peng *et al.*, 2003) merupakan senyawa yang diisolasi dari sponga *Acanthostrongylophora* sp yang hidup di perairan Manado, Indonesia dan memiliki aktivitas kuat terhadap serangan

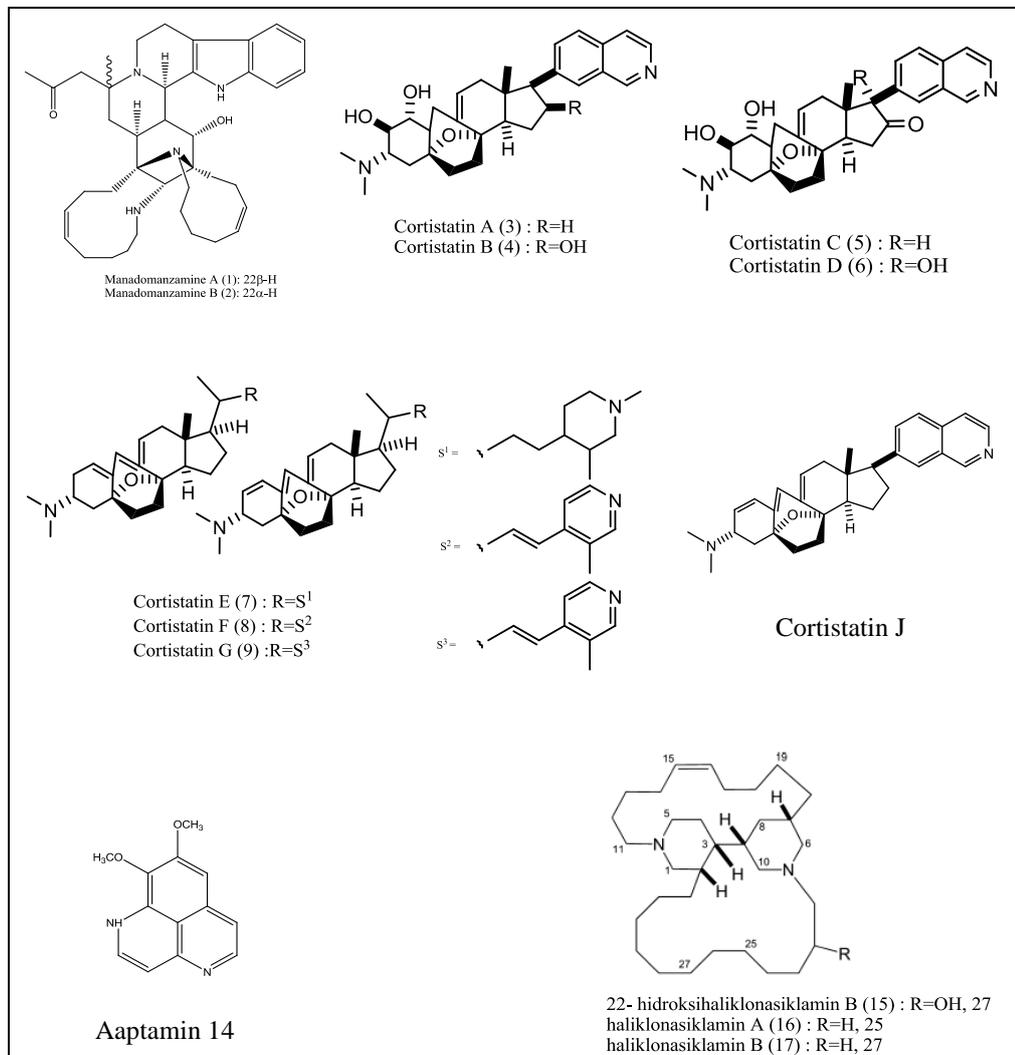
Mycobacterium tuberculosis (Mtb). Selain itu senyawa ini juga sebagai penghambat serangan *human immunodeficiency virus* (HIV-1) dan *Acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) yang disebabkan oleh infeksi jamur.

Cortistatins A, B, C, and D (Aoki *et al.*, 2005) berasal dari sponga *Corticium simplex* yang hidup di perairan Biak. Senyawa cortistatins A (3), B (4), C (5), dan D (6), menunjukkan aktivitas dan selektif sebagai antiproliferatif terhadap HUVEC. Pada tahun 2007 Watanabe *et al.*, membuat struktur analog dengan 3, yaitu cortistatin E (7), F (8), G (9) dan H (10). Hasilnya 3 bersifat lebih tinggi aktivitasnya dibandingkan dengan yang lain. Kemudian Aoki *et al.*, (2007) melakukan analog struktur dengan 3, yaitu cortistatin J (11), K (12) dan L (13). Hasilnya senyawa 11 memiliki aktivitas sebagai antiproliferatif terhadap sel *human umbilical vein endothelial* (HUVECs) lebih tinggi aktivitasnya dibandingkan dengan 3.

Aaptamin (Calcul *et al.*, 2003) diisolasi dari sponga *Aaptos aaptos* yang hidup di perairan Anyer. Kemudian Aoki *et al.* (2006) berhasil mengisolasi senyawa yang sama dari sponga laut *Aaptos suberitoides* yang diperoleh di perairan Carita, Jawa Barat dan memiliki aktivitas sebagai aktivator promotor P 21.

Haliklonasiklamin suatu Alkaloid Tetrasiklik Alkilpiperidin, senyawa 22-hidroksihaliklonasiklamin B (15), dan haliklonasiklamin A (16) and B (17), telah diisolasi dari sponga laut *Haliclona* sp. sebagai antidorman pada *mycobacterial*. Senyawa 16 dan 17 menunjukkan aktivitas kuat sebagai *antimycobacterial* terhadap *Mycobacterium smegmatis* dan *M. bovis* Bacille

de Calmette et Guérin (BCG). Gugus 22-hidroksi dalam struktur **15** diketahui memiliki aktivitas yang lemah sebagai antimikobakterial terhadap *Mycobacterium bacilli* dengan dosis 12.5—50 µg/mL (Arai *et al.*, 2009).



Gambar 2. Senyawa alkaloid yang telah berhasil diisolasi dari sponsa yang hidup di perairan Indonesia.

Potensi sponsa sebagai antioksidan

Sebagai salah satu upaya untuk mengoptimalkan pemanfaatan bahan alam laut Indonesia terutama sponsa, dilakukan penelitian awal terhadap empat jenis sponsa dari Kepulauan Seribu yang berpotensi sebagai senyawa antioksidan

yaitu *Callyspongia* sp, *Geliodes fibulata*, *Agelas* sp dan *Oceanapia* sp (Hanani dkk., 2005). Tujuannya adalah menguji aktivitas antioksidan dan mengidentifikasi senyawa berkhasiat sebagai antioksidan. Hasil dari percobaan pendahuluan tersebut diperoleh informasi bahwa sponga *Callyspongia* sp. mempunyai aktivitas antioksidan yang terkuat dibandingkan tiga sponga lainnya.

C. Senyawa Antioksidan golongan alkaloid

Alkaloid yang berarti "seperti alkali" (alkali=basa, oid=seperti). merupakan suatu kelas senyawa yang mengandung nitrogen dan memiliki struktur cincin yang kompleks dan memiliki aktivitas farmakologik (Meissner, 1983).

Alkaloid memiliki peran spesifik dalam organisme yang memproduksinya. Dalam sponga, senyawa alkaloid berperan sebagai pelindung dari predator dan untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungannya sehingga sponga mampu bertahan hidup (Sa´nchez *et al.*, 2006).

Senyawa Metabolit sekunder, termasuk alkaloid, pada suatu organisme tidak hanya memiliki satu fungsi tetapi biasanya multifungsi. Banyak kasus yang telah terjadi, alkaloid tunggal dapat menghambat lebih dari satu proses biologis. Sponga merupakan suatu biota laut yang tumbuh ribuan tahun yang lalu, selama proses evolusi, alkaloid dapat dimodifikasi sehingga memiliki keaktifan lebih dari satu atau lebih dari sebelumnya, membuat senyawa-senyawa alkaloid tersebut dapat berinteraksi dengan beberapa molekul target.

Adapun sifat fisik dari alkaloid tidak berwarna namun ada beberapa yang berwarna, umumnya berbentuk kristal namun ada beberapa yang berbentuk minyak, tidak larut dalam air, tetapi larut dalam beberapa pelarut organik seperti kloroform dan eter, berasa pahit, dan umumnya bersifat aktif optik (Aoki *et al.*, 2000; Arai *et al.*, 2009).

D. Senyawa Antioksidan dan Radikal Bebas

Radikal-radikal bebas

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan dan memiliki sifat sangat tidak stabil serta sangat reaktif, selain itu dapat merusak jaringan. Dalam tubuh, radikal bebas dapat terbentuk dari proses biokimia, seperti proses oksidasi, metabolisme sel, olahraga berlebihan dan peradangan (Butterfield and Stadtman, 1997; Pham-Huy, 2008). Senyawa radikal bebas berperan penting dalam kesehatan manusia, adanya radikal bebas yang berlebihan merupakan sumber berbagai penyakit, seperti pengerasan pembuluh darah, jantung koroner, stroke, kanker, tak terkecuali penuaan dini.

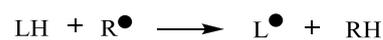
Salah satu radikal bebas adalah spesies oksigen reaktif antara lain superoksida ($\bullet\text{O}_2$), hidroksil ($\bullet\text{OH}$), peroksil ($\text{ROO}\bullet$), oksida nitrit ($\text{NO}\bullet$), dan lipid peroksida ($\text{LOO}\bullet$).

Salah satu senyawa yang mudah untuk dioksidasi adalah lipid. Proses oksidasi lipid dapat terjadi dalam tiga cara:

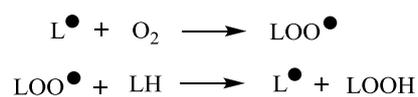
1. Reaksi radikal bebas nonenzimatik yang dimediasi oleh reaksi samping. Dalam hal ini radikal bebas sebagai inisiator, dan merusak suatu ikatan. Dalam cara ini terjadi beberapa tahap, yaitu inisiasi, propagasi, pencabangan dan terminasi
2. Reaksi nonenzimatik, dan tidak dipengaruhi oleh radikal hasil dari fotooksidasi.
3. Reaksi enzimatik, yang termasuk dalam reaksi ini yaitu reaksi lipoksigenase pada berbagai substrat.

Sumber radikal bebas, baik endogenus maupun eksogenus terjadi melalui tahapan reaksi. Proses pertama pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir (terminasi), yaitu pemusnahan atau pengubahan menjadi radikal bebas stabil dan tak reaktif.

1. Tahap inisiasi. Dalam tahap ini proses inisiasi dapat terjadi akibat proses eksternal seperti pemanasan, cahaya atau radiasi ionisasi.

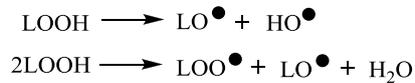


2. Tahap propagasi. Dalam proses inisiasi lipid, dihasilkan radikal alil yang sangat reaktif terhadap oksigen, sehingga dapat membentuk radikal lipid peroksil (LOO^\bullet).

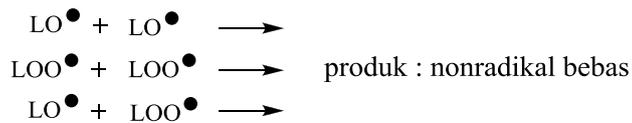


3. Tahap pencabangan, radikal peroksi merupakan pembawa radikal yang selanjutnya mengoksidasi lipid yang menghasilkan hidroksi peroksida (LOOH), yang selanjutnya dipecah menjadi senyawa lain, termasuk

alkohol, aldehid, bentuk alkil, keton dan hidrokarbon dan termasuk radikal alkoksil (LO•)



4. Tahap terminasi, dalam tahap ini terjadi kombinasi radikal bebas hingga menghasilkan produk non-radikal bebas.



Sedangkan sumber eksogenus radikal bebas yakni berasal dari luar sistem tubuh, diantaranya sinar UV. Sinar UV B merangsang melanosit memproduksi melanin berlebihan dalam kulit, yang tidak hanya membuat kulit lebih gelap, melainkan juga berbintik hitam. Sinar UV A merusak kulit dengan menembus lapisan basal yang menimbulkan kerutan (Antolovich *et al.*, 2001).

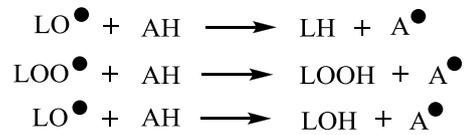
Antioksidan sebagai penangkal radikal bebas

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang bekerja menghambat reaksi oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Tetapi mengenai radikal bebas yang berkaitan dengan penyakit, akan lebih sesuai jika antioksidan didefinisikan sebagai senyawa-senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas.

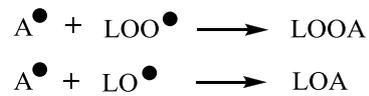
Antioksidan dibedakan menjadi antioksidan primer dan antioksidan sekunder.

Pada antioksidan primer, AH, dapat menghambat tahap inisiasi pada reaksi

radikal lipid atau menghambat tahap propogasi pada reaksi radikal peroksil atau alkoksil:



Antioksidan radikal bebas selanjutnya memungkinkan reaksi propagasi dengan membentuk senyawa peroksi antioksidan :



Energi aktifasi reaksi tersebut meningkat seiring meningkatnya energi pemutusan ikatan A-H dan L-H. Dengan demikian, efisiensi senyawa antioksidan meningkat seiring dengan menurunnya kekuatan ikatan A-H (Antolovich *et al.*, 2001).

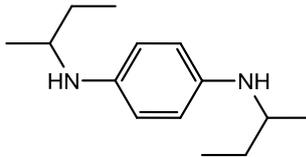
Senyawa-senyawa antioksidan

Antioksidan terbagi menjadi antioksidan enzim dan vitamin. Antioksidan enzim meliputi superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase (GSH.Prx). Antioksidan vitamin lebih populer sebagai antioksidan dibandingkan enzim. Antioksidan vitamin mencakup α tokoferol (vitamin E), β karoten dan asam askorbat (vitamin C).

Di samping penggolongan antioksidan di atas, ada pula senyawa lain yang dapat menggantikan vitamin E, yaitu flavonoid. Hal ini dikemukakan oleh *Department of Environmental and Molecular Toxicology, Oregon State University*. Aktivitas antioksidan flavonoid tergantung pada [struktur molekulnya](#) terutama gugus prenil $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2^-$.

Contoh Struktur senyawa antioksidan

N,N'-di-2-butyl-1,4-fenilenadamina, merupakan senyawa amina aromatik yang digunakan dalam bidang industri sebagai antioksidan, misalnya untuk mencegah degradasi pada minyak turbin.

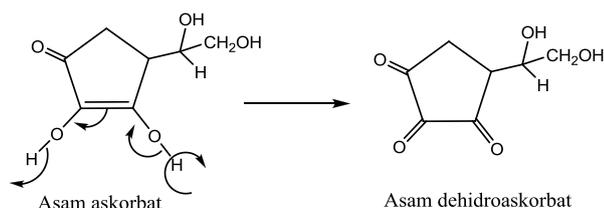


Gambar 3. Struktur senyawa N,N'-di-2-butyl-1,4-fenilenadamina

Karakteristik senyawa antioksidan

Dari beberapa struktur senyawa antioksidan yang telah diketahui, senyawa antioksidan memiliki karakteristik ikatan rangkap terkonjugasi, adanya atom H yang dapat didonorkan kepada radikal bebas, dan selain itu senyawa yang memiliki pasangan elektron bebas juga memungkinkan sebagai salah satu karakteristik senyawa antioksidan.

Pada vitamin C, yang berperan dalam reaksi radikal bebas adalah adanya gugus enol pada struktur asam askorbat. Asam askorbat bertindak sebagai antioksidan yang dengan cara memberikan elektronnya, dengan demikian asam askorbat menjadi asam dehidroaskorbat dimana strukturnya lebih stabil dalam bentuk asam dehidroaskornat. Berikut mekanisme asam askorbat menjadi asam dehidroaskorbat (Kesic *et al.*, 2009) :

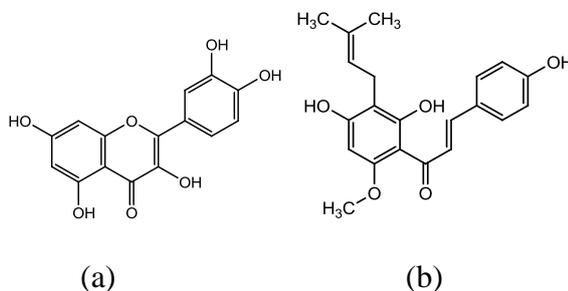


Gambar 4. Mekanisme reaksi vitamin C sebagai antioksidan

Kebutuhan manusia akan senyawa antioksidan

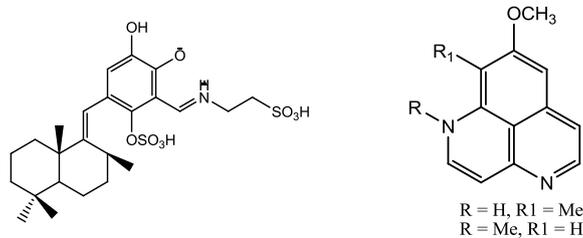
Proses oksidasi sangat berperan penting dalam tubuh manusia dan juga dalam makanan. Adanya proses oksidasi dapat menghasilkan radikal bebas dan juga spesies oksigen yang reaktif. Dalam tubuh, adanya radikal bebas dapat mempengaruhi dalam proses ketahanan sel. Dalam sektor makanan, proses oksidasi dapat menyebabkan kebusukan, dengan adanya senyawa antioksidan proses kebusukan dapat dihambat.

Senyawa antioksidan banyak berasal dari golongan flavonoid di antaranya : *Quercetin* yang merupakan suatu flavonol, yang terdapat dalam sayuran, kulit buah dan kuning telur. Selain itu, *Xanthohumol* senyawa flavonoid hasil sintesis yang merupakan hasil prenilasi dari calkon. Struktur *Quercetin* dan *Xanthohumol* terdapat pada Gambar 5.



Gambar 5. (a) Struktur molekul *Quercetin*, (b) struktur kimia *Xanthohumol*

Ada beberapa senyawa antioksidan yang berasal dari kelas alkaloid namun hanya sedikit yang telah diketahui, salah satu contoh struktur senyawa antioksidan alkaloid yaitu terdapat pada Gambar 6.



Gambar 6. Contoh struktur kimia antioksidan alkaloid

Antioksidan alkaloid tersebut diteliti oleh Grube *et al.*, 2007. Grube melakukan uji DPPH yang diukur pada panjang gelombang 517 nm. Dari hasil analisis yang diperoleh, antioksidan alkaloid memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan antioksidan yang memiliki struktur termasuk ke dalam golongan flavonoid. Oleh karena minimnya penelitian mengenai antioksidan alkaloid yang memungkinkan memiliki aktivitas tinggi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa antioksidan alkaloid.

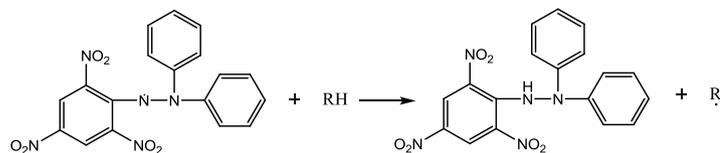
E. Penapisan senyawa antioksidan

Penapisan dan aplikasi

Penapisan (*screening*) merupakan tahapan awal dalam analisis sampel dalam jumlah besar untuk memperoleh data mengenai senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas tertentu. Metode penapisan sangat sederhana, cepat dan ekonomis dalam menganalisis suatu sample dalam jumlah yang banyak hanya dalam waktu yang singkat. Sebagai contoh, untuk menpenapisan sponga 24 jenis dalam satu kali ukur dengan menggunakan *microplatereader*. Metode ini

ekuivalen dengan data sampling statistik. Penapisan dapat mendeteksi kondisi senyawa pada dosis tertentu, oleh karenanya teknik penapisan sangat efektif untuk digunakan dalam investigasi suatu senyawa bioaktif. Namun dalam analisisnya metode penapisan juga memiliki kekurangan, yaitu tidak dilakukan secara langsung terhadap senyawa tertentu, atau dengan kata lain komponen target masih bercampur dengan komponen-komponen lain yang terdapat dalam satu sampel.

Uji senyawa kimia untuk menentukan adanya potensi aktivitas antioksidan berdasarkan ekstrak kasar, hal ini berdasarkan metode yang digunakan oleh Takao *et al.* pada tahun 1994. Pendeteksian adanya aktivitas sebagai antioksidan berdasarkan reaksi penangkapan radikal bebas dengan DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Setelah DPPH direduksi oleh hidrogen donor, warna ungu berubah menjadi kuning.



Gambar 7. Reaksi radikal DPPH

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dalam larutan methanol. Radikal DPPH memiliki absorbansi maksimum pada 520 nm (Molyneux, 2004). Absorbansi DPPH pada panjang gelombang sekitar 515 sampai 520 nm (Bandoniene *et al.*, 2002, Pavlov *et al.*, 2002). Metode DPPH merupakan metode yang sangat sederhana dan metode yang konvensional untuk senyawa

polar untuk skrining berbagai sampel yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Koleva *et al.*, 2001).

Keunggulan dari metode DPPH sangat menarik untuk digunakan untuk menguji sponga sebagai sumber antioksidan alami dan untuk menyeleksi beberapa sponga yang memiliki aktivitas sebagai sumber antioksidan yang paling berpotensi.

F. Isolasi senyawa bioaktif

Salah satu teknik isolasi yang sering digunakan yaitu ekstraksi. Ekstraksi berkaitan dengan distribusi suatu zat terlarut di antara dua fasa yang tidak saling bercampur. Teknik ekstraksi sangat berguna untuk memisahkan komponen dari komponen-komponen lain baik untuk zat organik maupun zat anorganik.

Dalam proses ekstraksi dapat diketahui koefisien distribusi atau koefisien partisinya. Koefisien distribusi merupakan konstanta kesetimbangan yang dihubungkan dengan kelarutan relatif suatu zat terlarut dalam dua pelarut (Svehla, 1985).

$$K_D = \frac{C_1}{C_2}$$

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pemilihan pelarut adalah titik didih, densitas, viskositas, *flammabilitas* dan toksisitas (Haslego, 2004).

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi senyawa antioksidan

Salah satu contoh isolasi senyawa alkaloid dari sponga yang melalui tahapan ekstraksi telah dilakukan oleh Aoki *et al.*, (2006) mengekstrak sponga *Biemna fortis* dengan menggunakan metanol. Selain itu Arai *et al.*, (2009) juga mengekstrak sampel sponga *Haliclona* sp. dengan menggunakan metanol. Dengan demikian digunakan pelarut metanol dengan harapan seluruh alkaloid akan terlarut di dalam fasa metanol.

Selain dengan teknik ekstraksi, teknik kromatografi juga merupakan salah satu teknik isolasi yang sering digunakan. Tswett (1906) menyatakan bahwa kromatografi merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan komponen sampel. Berdasarkan IUPAC (1993) kromatografi merupakan suatu metode fisik yang digunakan untuk memisahkan suatu komponen dari campuran berdasarkan perbedaan distribusi komponen di dalam fase gerak dan fase diam.

Tahapan kromatografi dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya yaitu adsorpsi misalnya oleh silika gel, partisi misalnya C₁₈, penukar ion misalnya diaion, dan berat molekul misalnya sephadex. Teknik kromatografi dibedakan menjadi padat-cair, padat-gas, cair-cair, cair-gas. Salah satu metode kromatografi padat-cair yang sering digunakan adalah kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

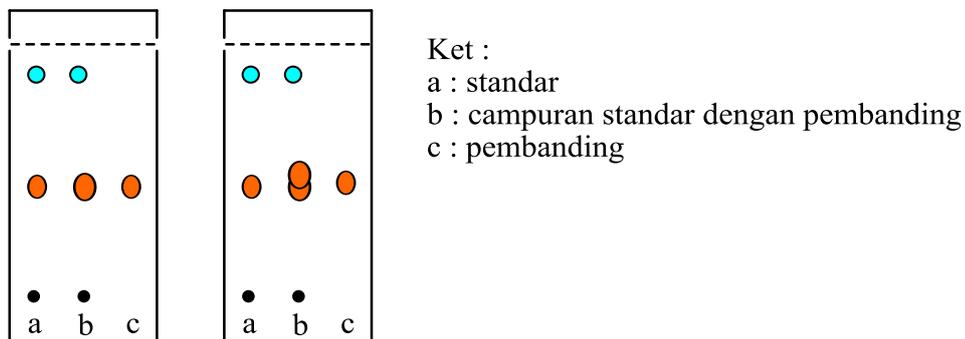
Metode KLT digunakan untuk memilih komposisi eluen yang memberikan pola pemisahan senyawa yang paling baik. Hasil dari KLT mengarahkan dilakukannya fraksinasi untuk memisahkan alkaloid dari campurannya yang terkandung dalam sampel.

Metode KLT digunakan untuk mengidentifikasi suatu komponen dalam suatu senyawa, selain itu juga dapat digunakan dalam teknik preparatif yaitu mengisolasi senyawa organik dalam jumlah yang sedikit. Plat KLT yang digunakan untuk tujuan preparatif memiliki ukuran tebal 5mm sedangkan plat KLT yang digunakan untuk analisis kualitatif memiliki tebal 2 mm. Kapasitas KLT bila dibandingkan dengan kromatografi kolom yaitu 1:50, dengan demikian KLT kurang efisien jika digunakan untuk memisahkan komponen dari campuran dalam jumlah yang cukup banyak.

Karena jarak elusi suatu substansi relatif terhadap jarak elusi pelarut, tergantung pada struktur molekul substansi. Hubungan antara jarak elusi sampel dan jarak pelarut yang terelusi dapat dinyatakan dengan R_f (*Retention factor*).

$$R_f = \frac{\text{Jarak Substansi yang terelusi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Identifikasi Senyawa dengan Membandingkan Harga R_f



Gambar 8. Senyawa yang diidentifikasi dengan menggunakan KLT, dikatakan baik bila memiliki R_f 0,5.

Kromatografi Kolom Gravitasi

Dasar dari kromatografi kolom gravitasi sama dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Adsorben yang paling sering digunakan yaitu *silica gel* and alumina dimana keduanya juga digunakan sebagai fase diam dalam KLT (plat KLT). Sampel dilarutkan dalam sedikit pelarut kemudian dituangkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit dengan menggunakan pipet tetes agar merata pada permukaan fase diam. Berdasarkan gaya gravitasi, pelarut mengalir turun dalam kolom dan memenuhi adsorben, prinsip ini berbeda dengan KLT, dalam KLT berdasarkan pada sifat kapilaritas dari adsorben sehingga pelarut dapat merambat naik memenuhi adsorben.

Beberapa faktor yang mempengaruhi efisiensi dari pemisahan suatu kromatografi antara lain adsorben dan eluen. Dalam pemisahannya adsorben harus menunjukkan selektivitas maksimum untuk memisahkan suatu sampel sehingga elusi akan menunjukkan perbedaan R_f (Sherma, 2003).

G. Karakterisasi senyawa bioaktif

Karakterisasi senyawa bioaktif dapat dianalisis dengan teknik spektroskopi.

Spektroskopi merupakan ilmu yang mempelajari tentang interaksi antara energi cahaya dan materi. Spektroskopi yang sering digunakan untuk analisis struktur senyawa bahan alam yaitu UV-Vis, IR, RMI dan spektro massa.

Spektrofotometer UV-Vis membantu menganalisis adanya ikatan rangkap terkonjugasi dalam struktur bioaktif. Spektrofotometer inframerah membantu menentukan gugus-gugus fungsi yang terkandung dalam suatu senyawa.

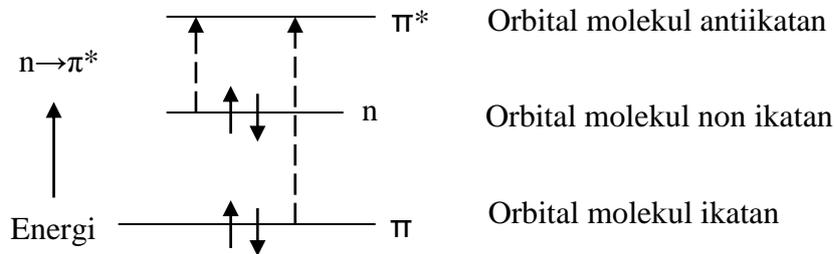
1. UV-Vis

Microplatereader merupakan alat yang digunakan untuk menganalisis senyawa reaktif dan juga digunakan untuk menganalisa aktivitas bakteri dan virus, dimana sampel diletakkan ke plate (Soesatyo et al., 2007).

Dengan demikian *microplatereader* ini sangat membantu dalam analisis radikal bebas, selain prosesnya dapat dilakukan secara cepat, selain itu ruang sampel analisis tertutup, sehingga kemungkinan sampel terkontaminasi oleh udara luar sangat sedikit.

Spektrum elektromagnetik untuk daerah ultraviolet dan daerah nampak diasosiasikan dengan energi kinetik, energi tersebut diabsorpsi oleh elektron sehingga akan mempengaruhi tingkatan energi dari elektron yang terdapat dalam orbital molekul, yaitu elektron tersebut akan dipromosikan ke tingkat orbital molekul yang lebih tinggi. Proses eksitasi akan terjadi apabila energi yang dibutuhkan terpenuhi untuk terjadinya eksitasi, energi yang cukup diperoleh dari radiasi sinar UV.

Sedangkan radiasi inframerah tidak memiliki energi yang cukup untuk mengeksitasi elektron dalam molekul.



Gambar 9. Eksitasi elektron

Karakteristik Senyawa diukur dengan spektrofotometer UV-Vis

Pada dasarnya senyawa yang dapat dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu senyawa yang memiliki gugus kromofor antara lain adanya ikatan rangkap yang terkonjugasi dan gugus hidroksil (-OH). Adanya ikatan rangkap terkonjugasi dalam senyawa alkaloid ditandai dengan adanya serapan di daerah sekitar 180 - 380 nm tergantung dari jumlah ikatan rangkap yang terkonjugasi (Yim *et al.*, 2004).

2. Fourier Transformer Infra Red-Attenuated Total Reflectance

Prinsip dasar pengukuran dengan menggunakan spektroskopi inframerah yaitu apabila suatu sampel menyerap radiasi elektromagnetik di daerah inframerah ($7,8 \times 10^{-5}$ sampai 3×10^{-2} cm) akan mengakibatkan terjadinya vibrasi ikatan kovalen yang terdapat dalam struktur suatu molekul sampel. Hasil pengukuran akan diperoleh spektrum inframerah berupa data grafik antara persen transmisi (%T) dengan bilangan gelombang (cm^{-1}). Spektrum inframerah tersebut terbentuk oleh adanya absorpsi

radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sama dengan vibrasi spesifik dari ikatan kimia dari suatu molekul.

Pada umumnya spektrum IR dibedakan menjadi tiga daerah. Daerah bilangan gelombang tinggi antara $4000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ($2\text{-}7,7\text{ }\mu\text{m}$) yang disebut *daerah gugus fungsi* karakteristik frekuensi tarik untuk gugus fungsi penting seperti C=O, OH, dan NH termasuk dalam daerah ini. Daerah frekuensi menengah, yakni antara $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ($7\text{-}11\text{ }\mu\text{m}$) yang diketahui sebagai daerah *fingerprint*, yang mengabsorpsi secara lengkap dan umumnya kombinasi dari interaksi vibrasi, setiap molekul memberikan *fingerprint* yang unik. Daerah antara $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ($11\text{-}15\text{ }\mu\text{m}$) menunjukkan klasifikasi umum dari molekul yang terbentuk dari absorbansi contohnya cincin benzen tersubstitusi. Adanya absorbansi pada *daerah bilangan gelombang rendah* dapat memberikan data yang baik akan adanya senyawa aromatik. Selain itu adanya intensitas absorbansi di daerah frekuensi rendah juga menunjukkan adanya karakteristik senyawa dimer karboksilat, amina, atau amida (Coates *et al.*, 2000)

III. Metodologi Penelitian

A. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2010 sampai Agustus 2010 di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung. Untuk karakterisasi struktur menggunakan Spektrofotometri infra merah (IR) dilakukan di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : peralatan laboratorium yang sering digunakan, corong pisah, satu set alat kromatografi kolom dengan adsorben silica gel 60 (0.063-0,200 mm) dan sephadex LH 20, satu set perlengkapan Kromatografi Lapis Tipis KLT dengan plat alumunium silica gel 60F₂₅₄ (Merck), mikroskop Zeiss A10, desikator, neraca analitik Weigen Hauser, mesin pemutar vakum BUCHI rotavapor R210.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : sponga perairan Kupang NTT, metanol, pereaksi *Dragendorf*, serium, asam sulfat, akuades, natrium klorida, asam nitrat pekat.

C. Metode kerja

1. Pengambilan sampel

Sampel sponsa diperoleh dengan menggunakan teknik *scuba dive* di perairan Teluk Kupang NTT pada tanggal 8 Agustus 2009 sampai 15 Agustus 2009.

2. Karakterisasi Spikula

Sponsa yang berpotensi sebagai antioksidan paling tinggi dari perairan Kupang, Nusa Tenggara Timur, kemudian diiris kecil $\pm 0,5 \text{ cm}^3$, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan asam nitrat pekat secukupnya. Campuran ini kemudian dipanaskan di atas pengaduk magnetik hingga terlarut sempurna, kemudian ditambahkan akuades dan diamkan selama dua jam agar spikula mengendap atau jika tidak mengendap dilakukan *centrifuge* pada 6000 rpm selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dicuci sebanyak 2 – 3 kali dengan alkohol absolut sebanyak 1mL untuk menghilangkan asam nitrat. Endapan diamati di bawah mikroskop Zeiss A10 dengan perbesaran 400x untuk mengetahui bentuk spikulanya (Bell and Barne, 2007).

3. Ekstraksi Alkaloid

Lima jenis sponsa yang telah diperoleh diiris kecil-kecil dan dikering anginkan, kemudian di rendam dengan metanol teknis (Aoki *et al.*, 2005), lalu disaring untuk memisahkan filtrat dengan residu sponsa. Filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan mesin pemutar vakum BUCHI R210 pada temperatur 40°C sehingga diperoleh ekstrak kasar sponsa.

Kemudian ekstrak kasar yang diperoleh dipartisi dengan menggunakan DCM. Selanjutnya fraksi DCM dan fraksi MeOH dikeringkan.

4. Penapisan senyawa antioksidan golongan alkaloid

A. Uji awal antioksidan (Takao *et al.*, 1994; Akhanovna *et al.*, 2008)

Ekstrak kasar metanol, kemudian ditotolkan pada plat KLT (silika gel) dengan menggunakan pipet kapiler, kemudian dielusi dengan DCM:MeOH (9:1). Plat KLT hasil elusi disemprot dengan larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Adanya perubahan warna bercak pada plat KLT menjadi tak berwarna (berwarna putih seperti warna plat) menunjukkan adanya senyawa antioksidan. Larutan DPPH dapat dibuat dengan melarutkan DPPH 1,3 mg dalam metanol sebanyak 2,5 mL, sehingga diperoleh konsentrasi DPPH 1,27 mM.

B. Uji alkaloid antioksidan

Ekstrak kasar yang positif terhadap aktivitas sebagai antioksidan dianalisis kandungan alkaloidnya dengan metode KLT dengan menggunakan komposisi eluen yang sesuai dengan metode di atas yang memberikan pemisahan paling baik. uji alkaloid menggunakan pereaksi *Dragendorf*, pereaksi ninhidrin, dan serum sulfat. Sponga yang memberikan uji positif paling tinggi aktifitasnya terhadap antioksidan dan alkaloid kemudian dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom.

5. **Kromatografi Kolom Gravitasi landaian**

Fraksi yang menunjukkan positif sebagai antioksidan alkaloid dimurnikan dengan kromatografi kolom dengan metode elusi gradien dengan silika gel sebagai fasa diam. Kemudian fraksi yang diperoleh diuji dengan metode KLT dengan reaksi pewarna DPPH untuk memonitoring senyawa antioksidan golongan alkaloid. Fraksi yang memberikan hasil positif sebagai antioksidan selanjutnya dimurnikan kembali dengan kromatografi kolom dengan menggunakan eluen metanol dan absorben silika gel sebagai fasa diam. Kemudian fraksi yang diperoleh diuji KLT dengan reaksi pewarna DPPH untuk memastikan senyawa target. Isolat yang dihasilkan selanjutnya dilakukan analisis spektroskopi (modifikasi metode dari Kgatele, 2007 dan Suganya *et al.*, 2007, *DPPH radical Scavanging, TLC*).

6. **Uji Kualitatif Antioksidan berbanding dengan Vitamin C**

Isolat sponga yang telah diperoleh, divariasikan konsentrasinya, selanjutnya masing-masing konsentrasi diambil 100 μ L dan dimasukkan ke dalam *plate wells* dan ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 100 μ L disetiap *wells* sehingga konsentrasi akhir DPPH dalam larutan adalah 0,2 mM. Perlakuan yang sama terhadap kontrol, kontrol positif digunakan vitamin C dan kontrol negatif digunakan metanol. Kemudian diukur dengan menggunakan *microplatereader* pada panjang gelombang 492 nm. DPPH 0,2 mM dibuat dengan melarutkan DPPH sebanyak 0,4 mg ke dalam 5 mL metanol (modifikasi dari metode Marxen, 2007).

7. Karakterisasi Senyawa dengan spektroskopi

Senyawa alkaloid murni dikarakterisasi dengan menggunakan metode fisika dan kimia. Secara fisika gugus fungsi diidentifikasi dengan menggunakan metode spektrofotometri infra merah dengan memperhatikan karakteristik serapan senyawa alkaloid, yaitu serapan N tersier di daerah $2000-2300\text{ cm}^{-1}$, N sekunder di daerah $1500-1900\text{ cm}^{-1}$ dan N primer di daerah $800-1300\text{ cm}^{-1}$. Sedangkan teknik kimia dilakukan dengan mereaksikan senyawa PN10* dengan *Dragendorf* dan ninhidrin.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengambilan sample sponge

Sampel sponge diambil secara acak dengan menggunakan teknik *scuba dive* pada kedalaman 3-31 meter di Perairan Kupang. Pada kedalaman tersebut, sponge yang tumbuh masih mendapatkan cahaya matahari, hal ini dikarenakan perairannya yang jernih, sehingga cahaya matahari masih dapat menembus hingga kedalaman 31 meter. Dengan demikian sponge-sponge yang diperoleh termasuk ke dalam habitat terbuka sehingga memungkinkan metabolisme hidupnya dapat tergolong normal.

Dari hasil pengambilan sampel sponge di perairan Teluk Kupang seperti terlihat pada Gambar 10. diperoleh sampel sebanyak 84 sampel biota laut.



a



b

Gambar 10. Jenis sponge a). C21 b). K72

Secara rinci pengambilan sampel di bagi pada sembilan lokasi pengambilan sampel yang berbeda, seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Lokasi pengambilan sampel di Kupang

No.	Nama Lokasi	Koordinat	Jumlah sampel	Kedalaman (meter)
1	Tabulolon	S 10°18'52.3"- T 123°28'39.7"	20	10-15
2	Polair	S 10°13'07.4"- T 123°20'36.2"	11	24
3	300m barat Tabulolon	S 10°13'48.5"- T 123°26'01.5"	19	8-25
4	300m timur Tabulolon	S 10°08'45.5"- T 123°29'18"	13	3,3-31
5	Dekat Buluinan	S 10°08'56.6"- T 123°23'11.8"	7	25
6	Dekat Hansini	S 10°10'16.0"- T 123°30'30.7"	6	27
7	Dekat Polair	S 10°13'10.9"- T 123°30'18.6"	3	30,1
8	1km barat Tabulolon	S 10°13'16.0"- T 123°29'47.7"	4	30,5
9	Dekat Hansisi	S 10°12'21.8"- T 123°30'30.3"	1	30,6

Dari data tersebut menunjukkan bahwa keanekaragaman sponsa (dari jumlah tersebut, setelah dilakukan identifikasi menunjukkan empat diantaranya adalah tunikata) di Kupang paling banyak berturut-turut ditemukan di Tabulolon pada kedalaman berkisar antara 10-15 meter yaitu sebanyak 20 jenis sponsa, 300m barat Tabulolon pada kedalaman 8-25 meter yaitu 19 jenis sponsa, 300m timur Tabulolon pada kedalaman 3,3-31 meter sebanyak 13 jenis sponsa, Polair pada kedalaman 24 meter sebanyak 11 jenis sponsa, dekat buluinan pada kedalaman 25 meter sebanyak 7 jenis sponsa, 1km barat Tabulolon pada kedalaman 30,5 meter sebanyak 4 jenis sponsa, dekat Polair pada kedalaman

30,1 meter sebanyak 3 jenis sponga, dan dekat Hansisi pada kedalaman 30,6 meter sebanyak 1 sponga.

Perbedaan keanekaragaman sponga di daerah perairan Kupang dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain kedalaman, sinar matahari dan arus (Bell *et al.*, 2005). Jika dilihat dari data tersebut, jenis sponga terbanyak diperoleh di Tabulolon pada kedalaman 10-15 meter, di mana sponga masih mendapatkan cahaya matahari sehingga dapat ditemukan berbagai sponga di sana, dan paling sedikit sponga ditemukan di daerah dekat Hansisi yaitu pada kedalaman 30,6 meter dengan kondisi dasar berlumpur dimana pada kedalaman tersebut hanya memperoleh sedikit cahaya. Dengan demikian semakin dalam suatu perairan maka semakin sedikit cahaya yang dapat menembus sehingga berakibat pada semakin sedikitnya keragaman sponga yang dapat tumbuh. Pada kondisi tersebut hanya jenis sponga tertentu saja yang memiliki kemampuan tumbuh pada daerah yang kurang cahaya matahari.

Dari beberapa sampel sponga tersebut dipilih 5 jenis sponga (A01, A08, C21, K70, dan K72) untuk dilakukan uji awal DPPH, dengan pertimbangan antara lain jumlah sampel yang memadai, ketersediaan data sebelumnya serta keunikan sponga. Spesifikasi ke lima jenis sponga tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Spesifikasi sampel A01, A08, C21, K70, dan K72

No.	Kode Sampel	Kedalaman (meter)	Lokasi	Spesies
1	A01	10-15,9	Tabulolon	<i>Stylissa carteri</i>
2	A08	10-15,9	Tabulolon	<i>Leucetta sp.</i>
3	C21	24,6	Polair	<i>Aaptos sp.*</i>
4	K70	28	Hansini	Blm teridentifikasi
5	K72	28	Hansini	<i>Ianthella basta</i>

B. Penapisan senyawa alkaloid antioksidan

Untuk mengetahui potensi antioksidan pada senyawa yang terkandung dalam sponsa yang telah diperoleh dari perairan Kupang, maka perlu dilakukan uji pendahuluan. Penapisan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH *microplate reader*, yaitu metode cepat dalam analisis sampel dengan kapasitas 96 wells untuk satu kali pengoperasian. Pada tahap awal dalam kajian ini digunakan 5 jenis sampel sponsa. Dari hasil analisis dengan *microplate reader* ini, diperoleh data persen (%) inhibisi dari kelima sampel sponsa seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. %inhibisi lima sampel sponsa

No.	Kode Sampel	% Inhibisi
1	A01	4,3
2	A08	6,8
3	C21	22,7
4	K70	7,4
5	K72	25,6

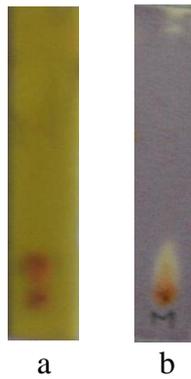
Dari hasil uji tersebut diperoleh informasi bahwa ekstrak sponsa dengan kode sampel A01, A08, C21, K70, dan K72, semuanya berpotensi sebagai antioksidan, dengan persen inhibisi yang bervariasi berturut-turut yaitu 4,3%; 6,8%; 22,7%; 7,4%; dan 25,6%. Dari kelima jenis sponsa, sponsa K72 memiliki persen inhibisi paling besar (25,6%).

Perbedaan persen inhibisi masing-masing ekstrak sponsa ini dapat disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam masing-masing sponsa (Setiawan, 2006). Sebagaimana telah dilaporkan bahwa senyawa utama yang berperan dalam reaksi radikal bebas umumnya dari golongan flavonoid (polifenol) (Grube *et al.*, 2007), dan

terpenoid (Topcu *et al.*, 2007). Namun, seiring berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknik *bioassay* dapat diperoleh senyawa antioksidan alkaloid yang berhasil diisolasi dari tanaman (Shaheen *et al.*, 2005) dan alkaloid yang diisolasi dari alga (Maiza-Benabdesselam *et al.*, 2007) serta penelitian yang terbaru menyatakan adanya senyawa alkaloid aromatik yang berhasil diisolasi dari sponsa *Aaptos aaptos* (Utkina, 2009).

Untuk kajian lebih lanjut, analisis dan isolasi selanjutnya dipilih sponsa C21, dengan pertimbangan morfologi, sponsa C21 mirip dengan sponsa *Aaptos sp.* yang telah diketahui mengandung senyawa bioaktif alkaloid dengan aktivitas sebagai promotor p21 (Aoki *et al.*, 2006). Selain itu, ketersediaan sponsa C21 sangat melimpah bila dibandingkan dengan sponsa K72 yang relatif sangat sedikit. Ditinjau dari aspek aktivitas, ekstrak sponsa C21 memperlihatkan nilai persen inhibisi yang relatif tidak jauh berbeda dibanding dengan ekstrak K72.

Dari hasil uji awal yang telah dilakukan, selanjutnya dilakukan analisis KLT pada ekstrak kasar C21 dengan pereaksi warna DPPH dan *Dragendorf* untuk mengetahui apakah senyawa yang bertindak sebagai antioksidan merupakan senyawa target (alkaloid), dan juga untuk mengetahui posisi senyawa target berada. Indikasi positif dalam analisis KLT adanya senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan ditandai dengan adanya perubahan warna ungu menjadi putih. Untuk analisis senyawa alkaloid indikasi positif ditandai dengan penampakan bercak warna orange setelah disemprotkan pereaksi warna *Dragendorf*. Hasil analisis KLT sponsa C21 dengan menggunakan pereaksi warna DPPH dan *Dragendorf* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Kromatogram hasil KLT dari ekstrak metanol sponge C21 yang dielusi dengan DCM:MeOH 9:1 dengan (a.) direaksikan dengan *Dragendorff*, (b.) direaksikan dengan DPPH.

Berdasarkan hasil analisis KLT tersebut dengan menggunakan eluen DCM : MeOH (9:1) dan direaksikan dengan pereaksi warna *Dragendorff* (Gambar 11.a) muncul warna orange yang menunjukkan bahwa sponge C21 mengandung senyawa alkaloid dengan nilai Rf 0,1-0,3 dan pada Rf yang sama juga bereaksi positif dengan pereaksi DPPH (Gambar 11.b). Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa alkaloid pada ekstrak sponge C21 berpotensi memiliki aktivitas sebagai antioksidan.

C. Ekstraksi Alkaloid

Pada kajian ini, sponge C21 sebanyak 1,3 kg diekstraksi dengan teknik maserasi dengan pelarut metanol sebanyak 5 L dan menghasilkan ekstrak kasar berwarna coklat tua kemerahan sebanyak 125 gram.

Dari beberapa hasil kajian mengenai senyawa alkaloid sebelumnya, teknik ekstraksi digunakan metode maserasi, pelarut yang umumnya digunakan dalam maserasi sponge yaitu metanol (Aoki *et al.*, 2006; Arai *et al.*, 2009; Suna *et al.*, 2009). Pemilihan pelarut metanol untuk mengekstrak sponge

karena target senyawa adalah senyawa polar, dan selain itu bila dibandingkan dengan pelarut polar lainnya yang biasa digunakan dalam ekstraksi alkaloid, seperti etanol dan aseton, metanol tidak terlalu banyak melarutkan senyawa non polar, dengan demikian penggunaan metanol sebagai pelarut dalam maserasi merupakan salah satu teknik ekstraksi yang selektif.

D. Isolasi Senyawa Alkaloid Antioksidan Sponga C21

Untuk mendapatkan komponen aktif dari ekstrak kasar, ekstrak MeOH difraksinasi menggunakan teknik kolom kromatografi gravitasi. Kondisi yang dipilih untuk melakukan tahapan fraksinasi menggunakan fasa diam silica gel 60 (0,063-0,200 mm) *gradien elution* DCM:MeOH. Dari fraksinasi tersebut didapat 5 fraksi (PA1, PA2, PA3, PA4, dan PA5). Selanjutnya masing-masing fraksi dilakukan uji alkaloid dengan pereaksi *Dragendorf*. Berdasarkan noda pada plat KLT yang terbentuk setelah direaksikan dengan pereaksi *Dragendorf* dan serum pada Rf 0,3 terhadap kelima fraksi tersebut, komponen alkaloid terbanyak ada pada fraksi PA3. Hasil KLT PA3 dapat dilihat pada Gambar 12. berikut.



Gambar 12. Kromatogram hasil KLT fraksi PA2, PA3, PA4 dan PA5

Fraksi ini dimurnikan lebih lanjut menggunakan kolom kromatografi dengan menggunakan kondisi yang sama dengan kolom kromatografi sebelumnya.

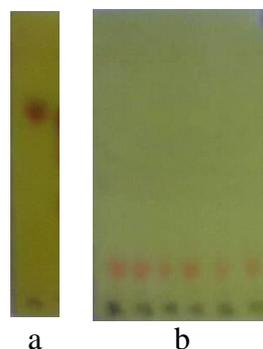
Hasil fraksinasi menggunakan kolom kromatografi ini di peroleh fraksi sebanyak 16 fraksi seperti terlihat pada tabel berikut :

Tabel 4. Fraksi-fraksi dari PA3

No.	Kode Fraksi	Eluen	Alkaloid
1	PN 1	DCM:MeOH 20:1	-
2	PN 2	DCM:MeOH 20:1	+
3	PN 3	DCM:MeOH 20:1	-
4	PN 4	DCM:MeOH 20:1	-
5	PN 5	DCM:MeOH 20:1	-
6	PN 6	DCM:MeOH 15:1	-
7	PN 7	DCM:MeOH 15:1	-
8	PN 8	DCM:MeOH 15:1	-
9	PN 9	DCM:MeOH 15:1	+
10	PN 10	DCM:MeOH 9:1	+
11	PN 11	DCM:MeOH 9:1	+
12	PN 12	DCM:MeOH 9:1	+
13	PN 13	DCM:MeOH 5:1	+
14	PN 14	DCM:MeOH 5:1	+
15	PN 15	DCM:MeOH 2:1	-
16	PN 16	DCM:MeOH 2:1	-

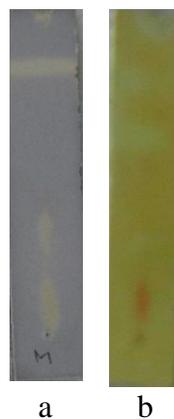
Hasil analisis KLT fraksi-fraksi PA3 yang positif terhadap pereaksi

Dragendorf seperti terlihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Kromatogram hasil KLT fraksi-fraksi PA3 menggunakan Silika gel dengan fase gerak DCM: MeOH (9:1) (a.) fraksi PN2. (b.) fraksi PN9, PN10, PN11, PN12, PN13 dan PN14.

Fraksi PN2 positif alkaloid ditunjukkan pada Rf 0,7 namun tidak bereaksi positif dengan DPPH, fraksi PN9, PN10, PN11, PN12 bercak yang menunjukkan positif terhadap DPPH. Selanjutnya PN 10, PN11, PN12, PN13 dan PN14 digabungkan dengan kode PN10*. Kemudian PN10* dilakukan analisis KLT ulang terhadap *Dragendorf* dan DPPH. Hasil analisis KLT menggunakan pereaksi *Dragendorf* dan DPPH dapat dilihat pada Gambar 14.



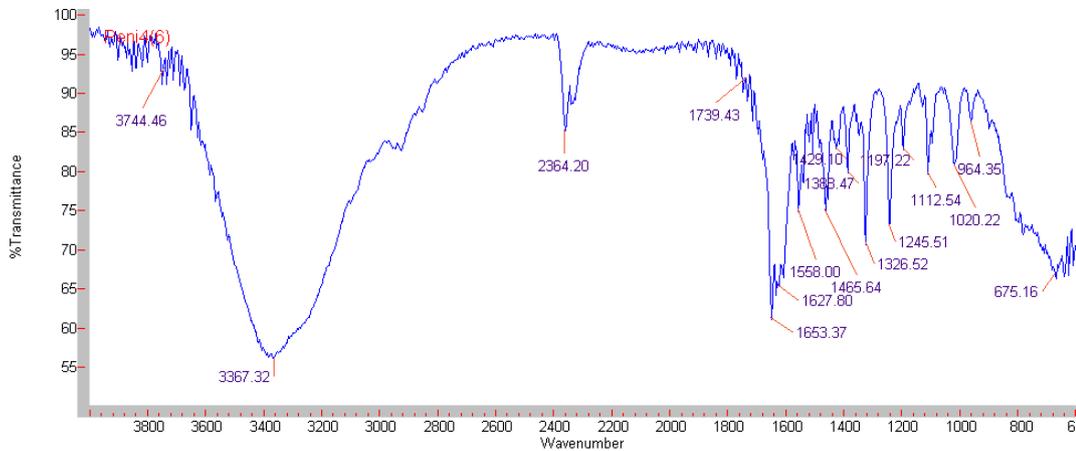
Gambar 14. Kromatogram hasil KLT fraksi PN10* a. KLT DPPH fraksi DCM C21. b. KLT *Dragendorf* fraksi DCM C21

Lebih lanjut dari data KLT di atas, pelebaran bercak putih pada KLT Gambar 11. mengindikasikan bahwa kontribusi sifat aktivitas juga dipengaruhi oleh komponen lain (*impurity*).

E. Karakterisasi Struktur Alkaloid Antioksidan dengan FTIR-ATR

Alkaloid merupakan senyawa yang atom utamanya adalah atom N dengan struktur yang kompleks dan banyak memiliki aktivitas farmakologi. Alkaloid dapat diklasifikasikan dalam beberapa golongan, yaitu : alkaloid non heterosiklik seperti hordinine dan alkaloid heterosiklik, yaitu : pirolidin, pirolizidin, piridin, piperidin, quinolin, isoquinolin, aporpin, nor lupinen,

indol. Hasil analisis senyawa alkaloid antioksidan dari PN10* dapat dilihat pada Gambar 15.

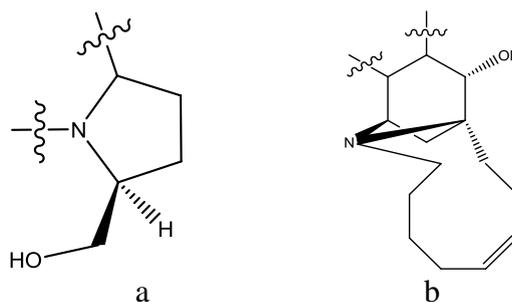


Gambar 15. Spektrum IR senyawa PN10*

Data spektrum IR pada Gambar 15. menunjukkan adanya karakteristik serapan pada daerah 3800 cm^{-1} sampai 600 cm^{-1} . Berdasarkan data spektrum IR yang diperoleh, karakteristik serapan dari senyawa menunjukkan bahwa senyawa PN10* bukan merupakan senyawa aromatik, hal ini dikarenakan pada spektrum tidak menunjukkan adanya serapan *overtone* pada daerah $2000\text{--}1667\text{ cm}^{-1}$ sebagai karakteristik ikatan $\text{C}=\text{C}$ terkonjugasi. Selain itu, senyawa yang diperoleh juga bukan merupakan senyawa dengan rantai panjang (alifatik), hal ini diindikasikan dengan tidak adanya serapan yang tajam pada daerah 2940 dan 2875 cm^{-1} dari vibrasi ulur dari C-H metilen. Dengan demikian kemungkinan senyawa yang diperoleh merupakan suatu senyawa siklik dengan substitusi yang kompleks, hal ini terlihat dari karakteristik serapan yang nampak di daerah $1442\text{--}1468\text{ cm}^{-1}$ untuk vibrasi tekuk C-H serta daerah $2990\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ untuk vibrasi ulur C-H.

Analisis gugus fungsi yang terdapat pada senyawa PN10*, pertama kali dilakukan dengan mengamati di daerah 4000-1300 cm^{-1} . Pada daerah di atas 3000 cm^{-1} senyawa PN10* menunjukkan adanya serapan, tepatnya pada bilangan gelombang 3367,32 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya vibrasi ulur O-H. Sebagai konfirmasi, serapan pada vibrasi ulur O-H pada senyawa *Polycitorol A* (**18**) (Gambar 16a.) yaitu pada 3384 cm^{-1} (Issa *et al.*, 2005), selain itu juga pada senyawa **1** dan **2** (Gambar 16b.) yaitu pada 3372 cm^{-1} dan 3387 cm^{-1} (Peng *et al.*, 2003). Seperti terlihat pada spektrum IR, yaitu puncak tunggal dengan bentuk serapan melebar menunjukkan adanya gugus hidroksi namun serapannya tidak selebar hidroksi pada asam karboksilat.

Kemungkinan yang didapat bahwa senyawa alkaloid antioksidan mengandung gugus -OH baik dalam fenol, enol, atau hanya gugus OH. Namun, tidak adanya senyawa aromatik dalam senyawa ini, jadi tidak memungkinkan untuk fenol, sehingga kemungkinan hanya enol atau gugus samping OH.



Gambar 16. Struktur parsial dari (a) *Polycitorol A* (**18**) (b) *Manadomanzamines A* dan *B* (**1 & 2**)

Nilai bilangan gelombang untuk OH pada senyawa PN10* berbeda dengan senyawa **18** dan **2**, yaitu bilangan gelombang pada senyawa **18** dan **2** lebih tinggi bila dibandingkan dengan bilangan gelombang PN10*. Perbedaan ini

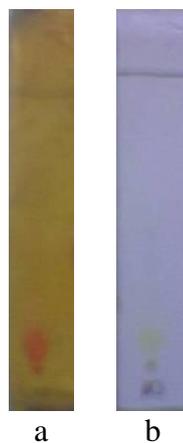
dapat diakibatkan oleh adanya interaksi dengan atom disekitarnya, jika dilihat dari bilangan gelombangnya yang lebih kecil dibandingkan dengan senyawa **18** dan **2**, senyawa PN10* lebih besar interaksi gugus OH yang terjadi dengan atom lain disekitarnya. Hal ini dikarenakan semakin besar interaksi, semakin kecil vibrasi yang terjadi, sehingga nilai bilangan yang dihasilkan pun lebih kecil (Silverstein *et al.*, 2005).

Di sisi lain, serapan didaerah 3000-3400 cm^{-1} juga menunjukkan adanya serapan dari vibrasi N-H primer maupun sekunder. Kemungkinan yang ada yaitu adanya serapan N-H yang tertutup oleh serapan dari vibrasi O-H atau kemungkinan lain yaitu bahwa senyawa PN 10* memang tidak mengandung serapan N-H.

Serapan untuk vibrasi ulur N-H primer muncul dua puncak pada daerah 3368 cm^{-1} untuk serapan vibrasi tekuk N-H dan pada daerah 3291 cm^{-1} untuk serapan simetri N-H. Senyawa PN10* menunjukkan adanya serapan di daerah 1627,8 cm^{-1} menunjukkan adanya serapan untuk N-H tekuk, dan juga pada daerah 1112,54 cm^{-1} untuk vibrasi ulur C-N.

Serapan untuk N sekunder muncul pada daerah 3350 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi ulur C-H, berbentuk satu puncak dengan intensitas lemah. Senyawa PN10* menunjukkan adanya serapan untuk vibrasi tekuk N-H pada daerah 1558 cm^{-1} , selain itu juga menunjukkan adanya serapan untuk vibrasi N-H wag pada daerah 675,16 cm^{-1} dengan intensitas serapan medium.

Untuk membuktikan kemungkinan tersebut, dapat dilakukan uji konvensional, yaitu dengan analisis KLT menggunakan pereaksi warna ninhidrin, reaksi positif ditandai dengan perubahan warna bercak menjadi warna ungu kemerahan. Perubahan warna ini diakibatkan oleh ninhidrin yang bereaksi dengan H dari N-H. Hasil analisis KLT ninhidrin dapat dilihat pada Gambar 17. berikut.



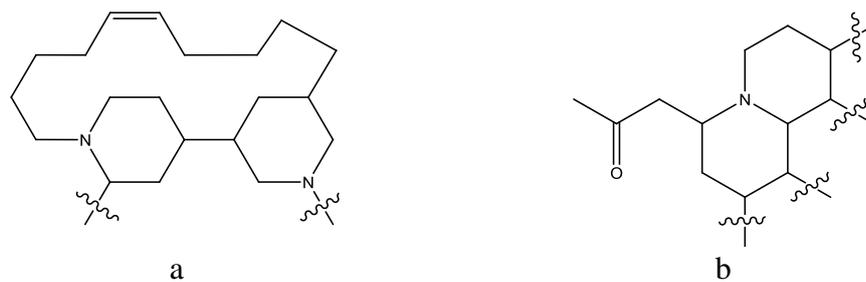
Gambar 17. Kromatogram hasil KLT alkaloid PN10* a) dengan *Dragendorf* b) dengan Ninhidrin

Namun berdasarkan analisis ninhidrin tersebut (Gambar 17b.), PN 10* tidak bereaksi positif. Data tersebut menunjukkan bahwa senyawa PN 10* tidak mengandung ikatan N-H. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa alkaloid yang diperoleh adalah alkaloid dengan N yang tidak mengikat H, baik sekunder maupun primer.

Berdasarkan hasil KLT tersebut menunjukkan bahwa senyawa PN10* bereaksi positif dengan *Dragendorf* (Gambar 17a.), hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa PN10* merupakan alkaloid dimana atom N tidak mengikat atom H. Hal ini sesuai dengan tahapan isolasi PN10* yang

bereaksi positif dengan *Dragendorf*. Data KLT tersebut didukung oleh spektrum IR yang diperoleh, senyawa PN10* menunjukkan adanya serapan di daerah 1326,52 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi ikatan C=N- dan 1020 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi ulur C-N dan untuk N tersier atau kuartener tidak menunjukkan adanya serapan di daerah lebih dari 3000 cm^{-1} .

Analisis tersebut memungkinkan senyawa PN10* adalah amina tersier baik siklik maupun alifatik. Namun adanya serapan di daerah 1465,64 cm^{-1} menunjukkan adanya serapan untuk C-N siklik, pita serapan serupa juga ditunjukkan oleh senyawa *22-Hydroxyhaliclonaclamine* (**15**) (Gambar 18a.) yaitu pada serapan 1462 cm^{-1} (Arai *et al.*, 2009), dan juga oleh senyawa *Manadomanzamines A dan B* (**2**) (gambar 18b.) yaitu pada 1460 cm^{-1} (Peng *et al.*, 2003). Perbedaan nilai bilangan gelombang antara senyawa PN10* dengan **2** dan **15** dapat dipengaruhi oleh adanya perbedaan substituen yang terikat pada atom N.



Gambar 18. Struktur parsial dari (a.) *22-Hydroxyhaliclonaclamine* (**15**) (b) *Manadomanzamines A dan B* (**1 & 2**)

Pada senyawa **15** nilai bilangannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa **2**, hal ini dikarenakan substituen pada senyawa **2** pada atom N jauh lebih kompleks bila dibandingkan dengan senyawa **15**, sehingga interaksi

antar atom pada struktur **1** dan **2** lebih banyak sehingga memungkinkan vibrasi yang dihasilkan antar molekul dalam ikatan semakin kecil, sehingga berakibat pada menurunnya nilai bilangan gelombang untuk vibrasi C-N siklik.

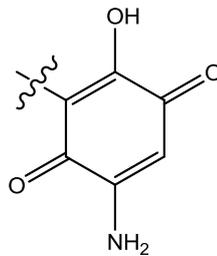
Dengan membandingkan nilai bilangan gelombang dari vibrasi C-N pada senyawa PN10* dengan senyawa **2** dan **15**, memungkinkan struktur dari senyawa PN10* memiliki gugus substituen yang lebih sederhana bila dibandingkan dengan senyawa **15**. Adanya substituen yang sederhana akan memperkecil peluang interaksi antar atom dalam molekul, sehingga mengakibatkan vibrasi ikatannya semakin besar dan berakibat pada besarnya nilai bilangan gelombang vibrasi C-N pada senyawa PN10*. Jadi kesimpulan yang diperoleh adalah kemungkinan senyawa PN 10* merupakan alkaloid siklik dengan atom N tersier atau kuartener.

Analisis selanjutnya dilakukan masih pada daerah gugus fungsi pada daerah bilangan gelombang 3000-1300 cm^{-1} . Adanya pita serapan pada bilangan gelombang 1653,37 cm^{-1} , yang merupakan serapan karakteristik dari vibrasi ulur C=C tak berkonjugasi. Serapan pada daerah tersebut sama dengan serapan yang diberikan oleh C=C pada struktur **15** (Gambar 18a.) (Arai *et al.*, 2009). Pada senyawa **15** ada 2 ikatan rangkap tak terkonjugasi yang tidak dipengaruhi oleh gugus fungsi lain yang terikat langsung pada C ikatan rangkap.

Berdasarkan konfirmasi dari senyawa **15**, menunjukkan bahwa senyawa PN10* bukanlah enol atau adanya OH yang terikat pada C ikatan rangkap,

sehingga pada senyawa PN 10* kemungkinannya adalah gugus OH sebagai substituen dimana posisinya tidak berdekatan dengan gugus fungsi lain.

Analisis selanjutnya dilakukan pada daerah frekuensi menengah, yaitu pada daerah 1300-900 cm^{-1} . Pada spektrum menunjukkan adanya pita serapan yang muncul pada bilangan gelombang 1245,51 cm^{-1} dihasilkan oleh serapan vibrasi ulur C-O, serapan vibrasi yang hampir sama juga ditemukan pada senyawa *dysideamine* (**19**) (Gambar 19), yaitu pada 1215 cm^{-1} (Suna *et al.*, 2009).



Gambar 19. Struktur parsial senyawa *dysideamine* (**19**)

Serapan C-O yang memungkinkan yaitu pada atom C yang mengikat gugus OH. Nilai bilangan gelombang senyawa **19** lebih kecil bila dibandingkan dengan senyawa PN10*. Perbedaan nilai bilangan gelombang antara PN10* dengan senyawa **19** dapat dipengaruhi oleh gugus fungsi di sekitar C-O. Pada senyawa **19**, atom C yang mengikat OH berikatan rangkap dengan atom C sebelahnyanya dan juga terikat pada atom C karbonil, sehingga atom H pada OH dapat melakukan interaksi dengan O pada CO karbonil. Adanya interaksi antar atom dalam molekul mengakibatkan vibrasi yang terjadi semakin kecil, dengan demikian berakibat pada semakin kecilnya nilai bilangan gelombang C-O pada senyawa **19**. Dengan membandingkan uraian tersebut, maka dapat

disimpulkan bahwa interaksi antar atom pada senyawa PN10* relatif lebih sederhana.

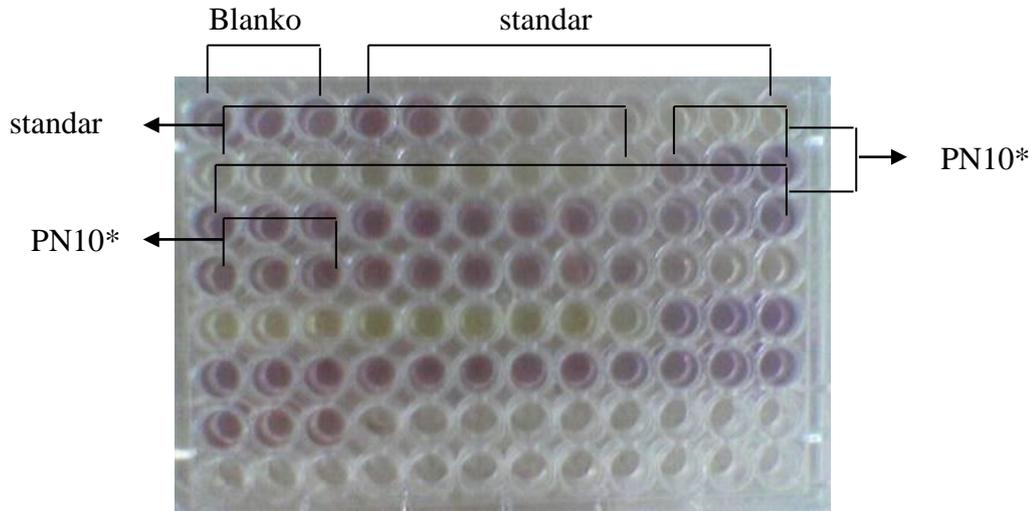
Secara keseluruhan, berdasarkan analisis spektrum IR yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa senyawa PN10* merupakan senyawa amina siklik, memiliki gugus OH yang terikat pada C, dimana atom C tersebut tidak berikatan dengan gugus fungsi lain. Namun gugus OH memungkinkan memiliki interaksi dengan atom lain didekatnya. Selain itu senyawa PN10* memiliki ikatan rangkap tak terkonjugasi, dimana di sekitar ikatan C=C tidak dipengaruhi oleh gugus fungsi lain.

F. Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan

Analisis kualitatif aktivitas antioksidan suatu sampel dapat dilakukan dengan beberapa pendekatan, salah satunya dengan metode DPPH *microplatereader*. Teknik ini sangat cocok untuk analisis senyawa yang reaktif karena selain dalam satu kali kerja, alat mampu menganalisis sampel sebanyak 96 sampel juga sedikitnya kontak langsung dengan udara secara langsung. Hal ini sesuai untuk dengan senyawa PN10* dengan DPPH yang bersifat sangat reaktif. Pada penelitian ini, sampel diukur pada panjang gelombang 492 nm. Hasil analisis dengan *microplatereader* dapat dilihat pada Gambar 20. dan perhitungan terlampir pada Lampiran 1.

Pada gambar 20 menunjukkan adanya warna ungu (warna dasar larutan DPPH) dan warna kuning. Warna kuning menunjukkan bahwa sampel yang diuji bereaksi positif dengan DPPH. Warna kuning tersebut diakibatkan oleh

adanya transfer elektron oleh senyawa PN10* kepada senyawa DPPH, sedangkan warna ungu menunjukkan bahwa DPPH masih berbentuk radikal dan belum ternetralkan oleh PN10*.



Gambar 20. Uji antioksidan senyawa PN10* dengan DPPH *Microplatereader*

DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil dalam larutan metanol yang bertindak sebagai *acceptor* (penerima) elektron dan senyawa antioksidan merupakan donor elektron.

Pada penelitian ini, larutan standar antioksidan yang dipilih yaitu vitamin C, hal ini mempertimbangkan vitamin C memiliki ikatan rangkap yang juga dimiliki oleh senyawa PN10*. Berdasarkan analisis, diperoleh absorbansi dan % inhibisi PN10* pada berbagai variasi konsentrasi serta absorbansi dan % inhibisi Vitamin C (asam askorbat), seperti tertulis pada Tabel 5.

Berdasarkan Tabel 6, dapat dilihat bahwa vitamin C dan senyawa PN10* memiliki pola absorbansi dan % inhibisi yang berbeda, pada vitamin C pada 5 ppm sampai 25 ppm memiliki % inhibisi yang terus meningkat, yaitu pada 5

ppm memiliki % inhibisi yang lebih tinggi yaitu sekitar 33,41%, 10 ppm sebesar 63,19%, 25 ppm sebesar 69,66%. Sedang % inhibisi maksimum ada pada konsentrasi 50 ppm yaitu sebesar 70,17 ppm, sedangkan konsentrasi lebih dari 50 ppm menunjukkan % inhibisi yang semakin menurun.

Tabel 5. Absorbansi dan % inhibisi PN10* dan Vitamin C

No.	Konsentrasi (ppm)	Standard Vit.C	% inhibisi Vit.C	Absorbansi PN 10*	% inhibisi PN10*
1	5	0,3913	33,41	0,5316	9,52
2	10	0,2163	63,19	0,3746	36,25
3	25	0,1783	69,66	0,2016	65,69
4	50	0,1753	70,17	0,2223	62,16
5	100	0,221	62,39	0,2416	58,87

Bila dibandingkan dengan pola % inhibisi vitamin C, PN10* juga menunjukkan pola yang sama, pada konsentrasi kurang dari 25 ppm % inhibisinya terus meningkat, dan % inhibisi maksimum ada pada konsentrasi 25 ppm yaitu sebesar 65,69%, sedangkan konsentrasi lebih dari 25 ppm menunjukkan % inhibisi yang semakin menurun.

Perbedaan % inhibisi antara vitamin C dan PN10* dapat diakibatkan oleh kemampuan masing-masing senyawa dalam memberikan elektronnya kepada DPPH, semakin banyak elektron yang diberikan kepada DPPH maka mengakibatkan penurunan nilai absorbansinya yang berarti meningkatnya % inhibisi. Dengan demikian PN10* lebih stabil bila dibandingkan dengan vitamin C. Hal ini terbukti dari nilai % inhibisi vitamin C pada konsentrasi mulai dari 10 ppm hingga 100 ppm menunjukkan nilai yang relatif sama, sedangkan pada PN10* nilai % inhibisinya menunjukkan relatif sama pada konsentrasi lebih dari 25 ppm. Hal tersebut kemungkinan terjadi karena reaksi

yang terjadi adalah reaksi terbatas dimana jumlah antioksidannya lebih banyak bila dibandingkan dengan jumlah radikal DPPH, sehingga mengakibatkan donor elektron menjadi berlebih, sehingga penambahan konsentrasi senyawa PN10* tidak mempengaruhi nilai % inhibisi.

Dalam kajian ini, diperoleh senyawa antioksidan yang cukup berbeda yaitu selain dipengaruhi oleh adanya gugus hidroksil dan ikatan rangkap, juga dipengaruhi oleh adanya amina tersier siklik. Sebagai saran, untuk mengetahui mekanisme kerja senyawa alkaloid antioksidan ini, perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk mengetahui struktur senyawa PN10* secara jelas dan lengkap.

G. Identifikasi Sponga berdasarkan fisiologinya

Sampel sponga diidentifikasi berdasarkan bentuk morfologinya, yaitu berdasarkan warna, tekstur, bentuk spikula, dan ukuran sponga. Warna dan tekstur sponga dapat diamati secara konvensional, yaitu dengan cara melihat ciri-ciri fisiknya dan membandingkan langsung dengan literatur yang sudah ada.

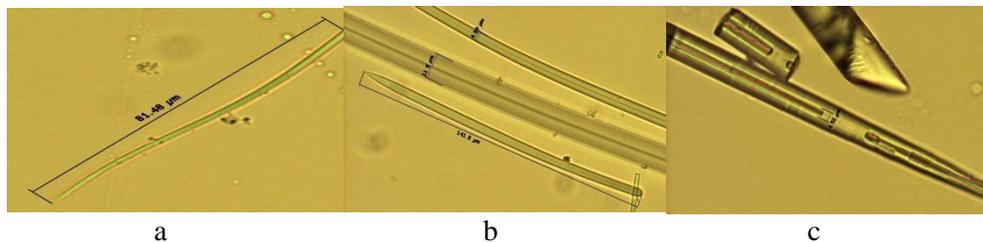
Analisis spikula sponga C21 dilakukan dengan merendam dengan asam nitrat pekat, hal ini bertujuan untuk melarutkan senyawa-senyawa lain yang dapat mengganggu analisis spikula (pengotor), karena spikula yang berbahan silika tak larut dalam asam nitrat. Setelah direndam dalam asam nitrat, selanjutnya dicuci dengan air yang bertujuan untuk melarutkan senyawa-senyawa lain yang dapat mengganggu pengamatan dalam analisis spikula. Selanjutnya

dicuci dengan alkohol untuk melarutkan senyawa-senyawa yang tak larut air, sehingga diharapkan dapat membantu dalam analisis spikula karena tidak ada pengotor.



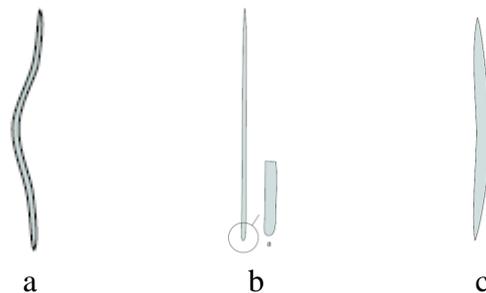
Gambar 21. Bentuk sponsa C21 a. Nampak utuh dari luar. b. Nampak bagian dalam berwarna kuning.

Sedangkan bentuk spikula dan ukuran dari sponsa dapat diamati dengan menggunakan mikroskop Zeiss A 10 dengan perbesaran 400x (Bell and Barne, 2005). Metoda pengamatan spikula ini sebelumnya juga telah dilakukan oleh Ackers pada tahun 2007, namun pada masa itu mikroskop yang digunakan masih terbatas, sehingga belum didapat bentuk spikula dengan bagian tubuh yang berbentuk kanal atau adanya saluran pada sisi tubuh spikula secara jelas seperti pada Gambar 22c.



Gambar 22. Gambar spikula sponsa C21

Dari hasil pengamatan bentuk spikula sponge C21, menunjukkan bahwa spikula pada Gambar 22a. identik dengan spikula jenis *toxa* yang memiliki karakteristik bentuk yang berkelok dan memiliki ukuran panjang 55-85 μm , seperti ditunjukkan pada Gambar 23a. Selain itu pada Gambar 22b. identik dengan spikula jenis *smooth styles*, bentuk spikula ini apabila ukurannya masih pendek bentuknya sangat lurus, biasanya ukuran dari spikula jenis ini yang ukurannya pendek berkisar antara 155-254 x 4-7 μm , dan untuk ukuran panjang berkisar antara 600-1060 x 6-12 μm dan lebih memiliki bentuk yang lebih lentur bila dibandingkan dengan yang pendek, gambar jenis spikula *smooth styles* dapat dilihat pada Gambar 23b. Pada Gambar 22c. masih belum dapat dipastikan bentuk spikulanya.



Gambar 23. a. Bentuk spikula *toxa* berdasarkan literatur, b. Bentuk spikula *smooth styles* berdasarkan literatur, dan c. Bentuk spikula *long thin oxea* berdasarkan literatur.

Dari analisis morfologi sponge C21 yaitu berbentuk bulat seperti bola, bagian luar berwarna hitam, sedangkan bagian dalam berwarna kuning, tumbuh pada kedalaman 1-20 meter dan masih mendapatkan sinar matahari yang termasuk dalam habitat terbuka (Bell and Barne, 2005) serta memiliki bentuk spikula *toxa*, *smooth styles* dan *long thin oxea* memiliki kesamaan fisik dengan sponge jenis *Aaptos* sp.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa :

1. Dari kelima jenis sponsa yang diperoleh dan dilakukan uji awal sebagai antioksidan, ternyata semuanya berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif sebagai antioksidan, secara berturut-turut persen inhibisinya yaitu : A01 4,3%, A08 6,8%, K70 7,4%, C21 22,7% dan K72 25,6%.
2. Analisis FTIR-ATR menunjukkan bahwa senyawa alkaloid tersebut mengandung gugus amina tersier siklik, gugus hidroksi, dan adanya ikatan rangkap, yang kesemuanya berperan dalam proses reaksi radikal bebas.
3. Berdasarkan uji secara kuantitatifnya, % inhibisi PN10* terhadap 0,1 mM DPPH pada 5 ppm sampai 25 ppm meningkat, % inhibisi PN10* maksimum pada 25 ppm yaitu pada 65,69, dan konsentrasi lebih dari 25ppm menunjukkan % inhibisi yang cenderung menurun.
4. Tidak ada peningkatan % inhibisi setelah % inhibisi maksimum ada pada konsentrasi 25 ppm hal ini dikarenakan PN10* tepat bereaksi dengan 0,1 mM DPPH .
5. Berdasarkan hasil analisis spikula, menunjukkan bahwa sponsa C21 merupakan sponsa *Aaptos* sp.

B. Saran

Berdasarkan dari hasil data penelitian, penulis menyarankan bahwa :

1. Dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap senyawa alkaloid yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan tersebut dengan menggunakan HPLC preparatif.
2. Dilakukan analisis $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ serta spektrofotometer masa agar dapat ditentukan strukturnya.
3. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penyebab menurunnya % inhibisi PN10* dan Vitamin C pada konsentrasi lebih dari 50 ppm.
4. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme kerja senyawa PN10* sebagai antioksidan.

Daftar Pustaka

- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., and Robards, K. **2001**. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. **127**. p. 183–198.
- Aoki, S., Yoshioka, Y., Miyamoto, Y., Higuchi, K., Setiawan, A., Murakami, N., Chen, Z., Sumizawa, T., Akiyama, S., Kobayashi, M. **1998**. Agosterol A, a Novel Polyhydroxylated Sterol Acetate Reversing Multidrug Resistance from a Marine Sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Lett.* **39**. p. 6303-6306.
- Aoki, S., Matsui, K., Tanaka, K., Satari, R., and Kobayashi, M. **2000**. Lembeyhne A, a Novel Neuritogenic Polyacetylene, from a Marine Sponge of *Haliclona* sp. *Tetrahedron*. **56**. p. 9945-9948.
- Aoki, S., Watanabe, Y., Sanagawa, M., Setiawan, A., Kotoku, N., and Kobayashi, M. **2005**. Cortistatins A, B, C, and D, Anti-angiogenic Steroidal Alkaloids, from the Marine Sponge *Corticium simplex*. *J. Am. Chem. Soc.* **128**. p.3148-3149.
- Aoki, S., Kong, D., Suna, H., Sowa, Y., Sakai, T., Setiawan, A., and Kobayashi, M. **2006**. Aaptamine, a Spongean Alkaloid, Activates p21 promotor in a p53-independent Manner. *BBRC*. **342**. p. 101-106.
- Aoki, S., Watanabe, Y., Tanabe, D., Setiawan, A., Arai, M., and Kobayashi, M. **2007**. Cortistatin J, K, L. Novel abeo-9(9-10(-androstane-type Steroidal Alkaloid) With Isoquinoline Unit From Marine Sponge *corticium simplex*. *Tetrahedron Lett.* **48**. p. 485-4488.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., and Robards, K. **2001**. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. **127**. p. 183–198.
- Arai, M., Ishida S., Setiawan, A., and Kobayashi, M. **2009**. Haliclonacyclamines, Tetracyclic Alkylpiperidine Alkaloids, as Anti-dormant Mycobacterial Substances from a Marine Sponge of *Haliclona* sp. *Chem.Pharm. Bull.* **57**. p. 1136-1138.
- Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P.R., and Gruzdiene, D. **2002**. Detection and Activity Evaluation of Radical Scavenging Compounds by Using DPPH Free Radical and online HPLC-DPPH Methods. *Eur. Res. Tech.* **214**. p.143–147.

- Barnes, R.M. **1980**. Motion and Time Study Design and Measurement. John Wiley & Sons. New York. p. 592.
- Bell, J.J., and Barne, D.K.A. **2005**. Effect of Disturbance on Assemblages: an example using Porifera. *Biol. Bull.* **205**. p.144-159.
- Bengen, D.G. **2001**. Makalah Pengenalan dan pengelolaan ekosistem mangrove. Pusat kajian Sumberdaya Pesisir & Lautan IPB. Bogor.
- Butterfield, D. A., and Stadtman, E. R. **1997**. *Protein Oxidation Processes In Aging Brain. Adv. Cell Aging Gerontol.* **2**. p.161–191.
- Butterfield, DA., Reed, T., Newman, S.F., and Sultana, R. **2007**. Roles of Amyloid β -peptide-associated Oxidative Stress and Brain Protein Modifications in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Free Radical Biol. Med.* **48**. p.658-677.
- Calcul, L., Longeon, A., Mourabit, A.A., Guyot, M., Bourguet-Kondracki, M.L. **2003**. Novel Alkaloids of the Aaptamine Class from an Indonesian Marine Sponge of the Genus Xestospongia. *Cheminform.* **34**. p.79-83.
- Coates, D., Heckelman, J., and Wilson, B. **2007**. Determinants of Interest Group Formation. *Springer.* **133**(3). p.377-391.
- Dahuri, R., Rais, J., Ginting, S.P., dan Sitepu, M.J. **1996**. Pengelolaan sumberdaya wilayah pesisir dan lautan secara terpadu. PT. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Faulkner, D.J. **2000**. Marine Natural Products. *Natural Product Report.* **17**. p.7-55.
- Grube, A., Assman, M., Lichte, E., Sasse, F., Pawlik, J.R., and Ko'ck, M. **2007**. Bioactive Metabolites from the Caribbean Sponge *Aka coralliphagum*. *J. Nat. Prod.* **70**. p.504-509.
- Hanani, E., Mun'im, A., dan Sekarini, R. **2005**. Identifikasi senyawa Antioksidan dalam Spons Callyspongia sp dari Kepulauan Seribu. *Majalah Kefarmasian.* **2**. hal.127-133.
- Harsono, B. **2001**. Makalah Menuju Penyempurnaan Hukum Tanah Nasional : dalam Hubungannya dengan TAP MPR RI IX/MPR/2001. Universitas Trisakti. Jakarta.
- Haslego, C. **2004**. *Optimize Liquid-Liquid Extraction.*
<http://www.cheresources.com/extraction.html>. Dibuka 31 Mei 2009. 09.17 WIB.
- Izumi, M., Yogosawa, S., Aoki, S., Watanabe, H., kamiyama, J., Takahara, Y., Sowa, Y., Kobayashi, M., Hosoi, H., Sugimoto, T., And Sakai, T. **2006**. A

novel Synthetic Drug, LB-18, Closely Related to lembehyne-A Derived from a Marine Sponge, Induces Caspase-Independent Cell Death to Human Neuroblastoma Cells. *Int. J. Onc.* **29** (169-173).

IUPAC. 1993. Nomenclature For Chromatography. *Pure &Appl. Chem.***65** . p.819-872.

Kesic, A., Mazalovic, M., Crnkic, A., Catovic, B., and Dragosevic, G. **2009**. The Influence of L-Ascorbic Acid Content on Total Antioxidant Activity of Bee-Honey. *Eur. J. Sci. Res.* **32**(1).p.95-101.

Kgatle, D.T. **2007**. Isolation and Characterization of Antioxidant Compound from Combretum Apiculatum (Sond.) subsp apiculatum Leaf Extract. University Van Petroria. Pretoria.

Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., and Evstatieva, L.N. **2001**. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem. Analysis.* **13**.p.8–17.

Liua, Y., Jia, H., Donga, J., Zhanga, S., Leec, K.J., and Matthew, S., **2008**. Antioxidant Alkaloid from the South China Sea Marine Sponge *Iotrochota* sp. *Journal Naturforsch.* **63c**. p.636-638.

Maiza-Benabdesselam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, S., Chapeleur, Y., Max, H., and Laurain-Mattar, D. **2007**. Antioxidant Activities of Alkaloid Extracts Of Two Algerian Species of *Fumaria* : *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. *Rec.Nat. Prod.* **1**. p.28-35.

Marxen, K., **2007**. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused By Methanolic Extract of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrofotometric Measurements. *Full research Paper.* **7**.p.2080-2095.

McConnaughey, B.H. **1970**. Introduction to Marine Biology, C.V. Mosby Company, Tokyo, Japan. p.190-192.

Meissner, N., Kaiser, H., Weigel, and J. Schechter. **1983**. Realistic Pseudoscalar-Vector Lagrangian. Static and Dynamical Baryon Properties. *Phys. Rev.* **40** p.262 .

Molyneux, P. **2004**. The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (Dpph) For Estimating Antioxidant Activity. *J. Sci. Tech.* **26**. p.211–219.

Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., and Ilieva, M. **2002**. Biosynthesis and Radical Scavenging Activity of Betalains During the Cultivation of Red Beet (*Beta vulgaris*) Hairy Root Cultures. *Journal Naturforsch.* **57c**. p.640–644.

- Peng, J., Hu, J., Kazi, A.B., Li, Z., Avery, M., Peraud, O., Hill, R.T., Franzblau, S.G., Zhang, F., Schinazi, R.F., Wirtz, S.W., Tharnish, P., Kelly, M., Wahyuono, S., and Hamann, M.T. **2003**. Manadomanzamines A and B: A Novel Alkaloid Ring System with Potent Activity against Mycobacteria and HIV-1. *J. Am. Chem. Soc.* **125**. p.13382-13386.
- Pham-Huy, L.A., He, H., and Pham-Huy, C. **2008**. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Bio. Sci.* **4**. p.89-96.
- Proksch, P. **1999**. *Pharmacologically Active Natural Product from Marine Invertebrates and Associated Microorganisms*. In: S. Soemodihardjo, R. R. Satari, and S. Saono (Eds.). Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia 1998. Jakarta 14-15 Oktober 1998. p.33-40.
- Proksch, P., Edrada, R., and Ebel, R. **2002**. Drugs from the Sea: Current Status and Microbiological Implications. *J. App. Microbiol. Biotech.* **59**. p125-134.
- Sánchez, C., Méndez, C., and Salas, J. A. **2006**. *Nat. Prod. Rep.* **23**. p.1007–1045.
- Setiawan, A. 2006. Bioaktivitas Jaspamide Terhadap Sel KB dan L1210. Prosiding. Lembaga Penelitian. Universitas Lampung. hal.484-489.
- Shaheen, F., Ahmad, M., Khan, M.H.T., Jalil, S., Ejaz, A., Sultankhodjaev, M.N., Arfan, M., Choudhary, M.I., and Atta-ur-Rahman. **2005**. Alkaloids of Aconitum Laeve and Their Anti-inflammatory, Antioxidant and Tyrosinase Inhibition Activities. *Phytochemistry*. **66**. p.935–940.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., and Kiemle, D.J. **2005**. Spectrometric Identification of Organic Compound. 7th edition. John Wiley & Son. New York. p.72-123.
- Sherma, J. **2003**. Basic TLC Techniques, Materials, and Apparatus. Marcell Dekker Inc. New York. p.1-146.
- Soesatyo, B., dan Pinandito, M. 2007. Standard Filter untuk Kalibrasi Microplate Reader. *Jurnal Standardisasi*. **9**. p.43-48.
- Suganya, T., Ikegami, F., and Okonogi, S. **2007**. Antioxidant Active Principles Isolated from *Psidium guajava* Grown in Thailand. *Scientia Pharmaceutica*. **75**. p.179-193.
- Suna, H., Arai, M., Tsubotani, Y., Hayashi, A., Setiawan, A., and Kobayashi, M. **2009**. Dysideamine, a new sesquiterpene aminoquinone, protects hippocampal neuronal cells against iodoacetic acid-induced cell death. *The J. Bioorg. Med. Chem.* **1**. p.3968–3972.

- Svehla, G. **1985**. Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro Jilid 1. Edisi kelima. Alih bahasa oleh A. H Pudjaatmaka. Penerbit Kalman Media Pustaka. Jakarta. hal.139-140.
- Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., and Sakata, K. **1994**. A Simple Screening method for Antioxidant and isolation of several antioxidant produce by marine bacteria from Fish and Shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**. p.1780-1783.
- Temu, E.A., Minjas J.N., Shiff, C.J., and Majala A. **1999**. Bed Bug Control by Permethrin-Impregnated Bednets in Tanzania. *Med. Vet. Ent.* **13**. p.452-459.
- Topçu, G., Ertaş, A., Kolak, U., Öztürk, M., and Ulubelen, A. **2007**. Antioxidant Activity Tests on Novel Triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. *ARKIVOC.* **7**. p.195-208.
- Utkina, N.K. **2009**. Antioxidant Activity of aromatic Alkaloids from the Marine Sponges *Aaptos aaptos* and *Hyrtilos* SP. *Chem. Nat. Comp.* **45**(6).
p.849-853.
- Tswett, M. 2006. Invention of Chromatography. *Ber. Dtsch. Botan. Ges.*, **24**. p.316–323.
- Vacelet, J. **2008**. A New Genus Of Carnivorous Sponges (Porifera : poecilosclerida, cladorhizidae) from the deep N-E Pacific, and Remarks on the Genus *Neocladia* Zootaxa. *Nature Precedings.* **1**. p.57-65.
- Watanabe, Y., Aoki, S., Tanabe, D., Setiawan, A., and Kobayashi, M. **2007**. Cortistatins E, F, G, and H, Four Novel Steroidal Alkaloids from Marine Sponge *Corticium Simplex*. *Tetrahedron.* **63**. p.4074–4079.
- Yim, S.K., Yun, S.J., and Yun, C.H., **2004**. A Continuous Spectrophotometric Assay for NADPH-cytochrome P450 Reductase Activity Using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl. *J. Biochem. Mol. Biol.* **27**. p.629-633.

Lampiran

Lampiran I

Perhitungan :

$$\begin{aligned}\text{Blanko} &= \frac{0,586 + 0,656 + 0,521}{3} \\ &= 0,5876\end{aligned}$$

No	Sampel	N1	N2	N3	NR
1	Std 5	0,313	0,413	0,448	0,3913
2	Std 10	0,22	0,198	0,231	0,2163
3	Std 25	0,172	0,184	0,179	0,1783
4	Std 50	0,194	0,17	0,162	0,1753
5	Std 100	0,183	0,209	0,271	0,2210
6	PA10* 5	0,509	0,718	1,21	0,8123
7	PA10* 10	0,683	0,539	0,586	0,6027
8	PA10* 25	0,595	0,576	0,585	0,5853
9	PA10* 50	0,599	0,659	0,613	0,6237
10	PA10* 100	0,708	0,591	1,11	0,8030

$$\begin{aligned}\text{Std 5 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,3913}{0,5876} \times 100\% \\ &= 33,4 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Std 10 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,2163}{0,5876} \times 100\% \\ &= 63,19 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Std 25 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,1783}{0,5876} \times 100\% \\ &= 69,66 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Std 50 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,1753}{0,5876} \times 100\% \\ &= 70,17 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Std 100 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,2210}{0,5876} \times 100\% \\ &= 62,39 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{C21 5 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,8123}{0,5876} \times 100\% \\ &= 9,52 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{C21 10 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,6027}{0,5876} \times 100\% \\ &= 36,25 \%\end{aligned}$$

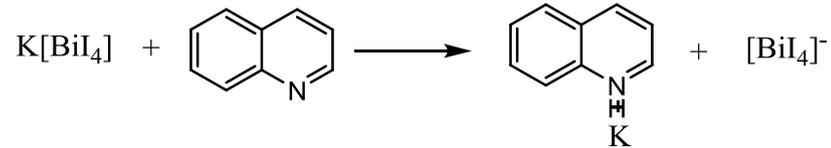
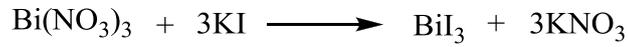
$$\begin{aligned}\text{C21 25 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,5853}{0,5876} \times 100\% \\ &= 65,69 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{C21 50 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,6237}{0,5876} \times 100\% \\ &= 62,16 \%\end{aligned}$$

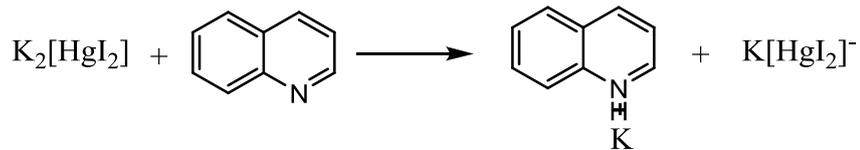
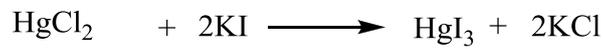
$$\begin{aligned}\text{C21 100 ppm} &= \frac{0,5876 - 0,8030}{0,5876} \times 100\% \\ &= 58,87 \%\end{aligned}$$

Lampiran II

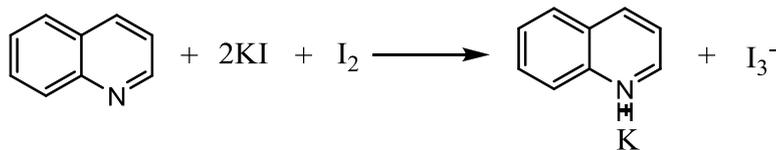
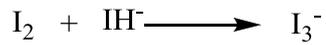
Reaksi Dragendorff dengan alkaloid :



Reaksi Mayer dengan alkaloid :



Reaksi Wagner dengan alkaloid :



Reaksi Ninhidrin dengan gugus amin :

