



UJI ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL SIPUT ONCHIDIID (*Onchidium typhae*) DENGAN METODE DPPH

Guci Intan Kemuning^a, Bambang Wijianto^a, Andhi Fahrurroji^c

^a Fakultas Kedokteran / Jurusan Farmasi, guciantankemuning@gmail.com, Universitas Tanjungpura

^b Fakultas Kedokteran / Jurusan Farmasi, bam.wijianto@gmail.com, Universitas Tanjungpura

^c Fakultas Kedokteran / Jurusan Farmasi, roji_apt@pharm.untan.ac.id, Universitas Tanjungpura

ABSTRAK

Onchidid snail (*Onchidium typhae*) is a species in the *gastropod* class that can be found in the coastal areas of Buton Island and also Madura and West Kalimantan. Onchidid snails are known to contain secondary metabolites in the form of steroids which have potential as antioxidants. This study discusses antioxidant activities in onchidid snails using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method using methanol as a solvent and also screening tests for metabolic compounds in extracts using phytochemical tests on extracts which include tests for steroids, alkaloids, and steroids. The test results showed that the onchidid snail methanol extract contained secondary metabolic compounds from the alkaloid and steroid groups which were characterized by a positive reaction. The results of the antioxidant test using the DPPH method with the comparator compound vitamin C. The study showed that the antioxidant activity of the onchidid snail methanol extract was expressed by an IC_{50} value of 92.045 which was categorized as a strong antioxidant.

Keywords: *Onchidium typhae*, DPPH, Phytochemical.

Abstrak

Siput Onchidid (*Onchidium typhae*) merupakan spesies dalam kelas *gastropoda* yang dapat ditemukan di daerah pesisir pulau Buton dan juga Madura dan Kalimantan Barat.. Siput onchidid diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder berupa steroid yang dapat berpotensi sebagai antioksidan. Penelitian ini membahas tentang uji antioksidan di dalam siput onchidid dengan metode DPPH (1,1- diphenil-2- pikrilhidrazil) dengan menggunakan pelarut methanol dan pengujian skrining senyawa metabolik ekstrak dengan uji fitokimia pada ekstrak yang meliputi uji steroid, alkaloid, dan steroid. Hasil pengujian didapat bahwa ekstrak metanol siput onchidid memiliki terdapat senyawa metabolik sekunder dari golongan alkaloid dan steroid yang ditandai dengan reaksi positif. Hasil uji antioksidan dengan metode DPPH dengan senyawa pembanding vitamin C. Penelitian menunjukkan besar aktivitas antioksidan ekstrak metanol siput onchidid yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} sebesar 92,045 yang dikategorikan antioksidan kategori kuat.

Kata Kunci: *Onchidium typhae*, DPPH, Fitokimia.

1. PENDAHULUAN

Salah satu proses penuaan disebabkan proses foto oksidasi yang meliputi pelepasan Reactive Oxygen Species (ROS) oleh kromofor yang menyerap sinar ultraviolet [1]. Peningkatan radikal bebas yang melebihi normal, menyebabkan berkurangnya antioksidan yang berfungsi untuk menetralkan reactive oxygen species (ROS). Antioksidan merupakan suatu substansi yang pada konsentrasi kecil secara signifikan mampu menghambat atau mencegah oksidasi yang dapat menimbulkan kerusakan terhadap lemak, struktur sel, dan DNA [2][3]. Siput onchidid dengan nama spesies *onchidium typhae* memiliki dalam cakupan Filum Mollusca, kelas *Gastropoda*, ordo *Systellommatophora*, famili *Onchidiidae*, dan genus *Onchidium* memiliki habitat di perairan air payau seperti wilayah brunei, kalimantan barat dan wilayah timur indo-pasifik [4]. Penelitian sebelumnya yang membahas tentang siput onchidid ini menjabarkan bahwa senyawa metabolit yang dimiliki ekstrak siput onchidid mengandung senyawa alkaloid [5]. Kandungan senyawa pada penelitian yang membahas tentang moluska jenis siput laut dengan spesies *Discodoris*. Sp juga telah menjabarkan adanya kandungan steroid yang dikandung oleh hewan jenis siput laut dengan uji aktivitas dari kandungan metabolit sekundernya [6]. Dalam sebuah karya ilmiah penelitian siput laut berdasarkan pengalaman empiris masyarakat daerah pamekasan Madura dikenal dengan nama lokal “kok-okok” mempunyai manfaat sebagai bahan pangan dan obat dalam penyembuhan penyakit borok, penyakit punggung dan dapat meningkatkan stamina. Penelitian yang dilakukan Nurjannah mehidinyatakan adanya kandungan antioksidan dengan nilai IC_{50} dalam ekstrak siput laut jenis *Discodorris*. Sp terhadap DPPH sebesar 150,92 ppm [7]. Adapun dalam

penelitian Hafilludin ekstrak siput laut jenis *Discodorris*. Sp memiliki kandungan antioksidan dengan senyawa yang berperan sebagai antioksidan adalah skualen [6] dimana ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi untuk menghindari adanya kerusakan bahan dan senyawa yang disebabkan oleh suhu tinggi sehingga memperoleh hasil ekstrak yang maksimal. Penelitian tentang aktivitas antioksidan siput laut (*Discodoris sp.*) perairan pulau Buton menjabarkan pengujian aktivitas antioksidan dengan pelarut metanol menggunakan metode DPPH dilakukan pada panjang gelombang rentang 520-560 nm [7].

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kandungan Senyawa Siput Laut

Nama spesies adalah Siput laut (*Onchidium typhae*) dengan klasifikasi Kingdom Animalia, Filum Mollusca, Kelas Gastropoda, Ordo Systellommatophora, Famili Onchidiidae, Genus *Onchidium*, Spesies *Onchidium typhae* [4].

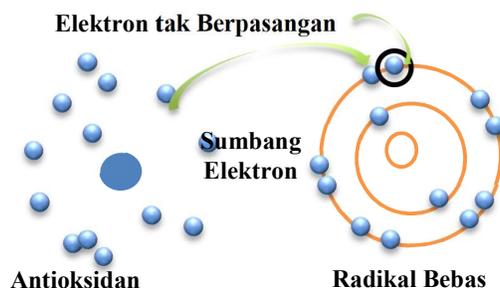


Gambar 1. Siput Laut (*Onchidium typhae*)

Biota laut ialah berbagai macam tumbuhan serta binatang yang terdapat di laut. Indonesia adalah negara yang mempunyai daerah bahari yang lebih luas dibandingkan dengan luas daratannya. Berdasarkan pengalaman nyata siput laut telah sejak lama dipergunakan oleh masyarakat Indonesia khususnya di masyarakat yang tinggal di wilayah pantai. Menurut masyarakat siput laut dipergunakan untuk bahan pangan, maupun obat untuk menyembuhkan penyakit borok, dan dapat dipergunakan sebagai jamu untuk mengobati penyakit punggung dan menambah stamina [8]. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada uji khasiat serbuk kering siput laut pada objek penelitian kelinci New Zealand White dengan kurun waktu 12 minggu siput laut dapat menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, dan menambah HDL. Dalam disertasi ini disebutkan bahwa siput laut berpotensi selain sebagai antioksidan juga berpotensi sebagai anti kolesterol [7]. Siput laut diketahui berpotensi sebagai sumber protein, lemak dan mineral. Hasil rendemen ekstrak kasar terbesar pada ekstrak etanol 5,08% (daging) dan 6,97% (jeroan) dengan senyawa kimia yang ditemukan yaitu : alkaloid, steroid, saponin, molisch dan ninhidrin. Kandungan dengan aktivitas antioksidan (IC₅₀) tertinggi pada daging yang diekstraksi dengan etanol yaitu 150,92 ppm dan senyawa yang dianggap memiliki aktivitas antioksidan yaitu skualen [6].

2.2. Mekanisme kerja Antioksidan

Mekanisme kerja antioksidan dengan cara menghambat lipid, dan akhirnya radikal bebas akan berubah ke bentuk yang lebih stabil dan tidak perlu mengganggu senyawa lain [9]. Dikutip berdasarkan penelitian. Mekanisme antioksidan dapat terjadi meliputi : 1) Pemutusan produksi radikal bebas, 2) Detensi radikal bebas, 3) Konversi radikal bebas yang reaktif menjadi kurang reaktif, 4) Pemberhentian produksi metabolit sekunder toksik serta mediator inflamasi, 5) Pemberhentian perpanjangan rantai yang berasal dari proses oksidasi, 6) Perbaikan yang dilakukan kepada molekul yang rusak, dan 7) inisiasi dan menambah sistem pertahanan tubuh dengan antioksidan endogen [10].

Gambar 2. Tampilan Homepage *Design Expert* 11.0

2.3. Uraian Uji DPPH (1,1- diphenil-2-pikrilhidrazil)

Metode pengujian aktivitas antioksidan yang paling banyak digunakan yaitu metode DPPH dimana senyawa DPPH merupakan senyawa yang stabil di suhu kamar. Tahapan yang terjadi yaitu DPPH berperan sebagai radikal bebas dimana senyawa direndam dengan antioksidan dan membentuk senyawa 1,1 difenil-2-pikril hidrazin [10]. Elektron yang tidak berpasangan dalam suatu senyawa DPPH dapat memberikan absorpsi yang kuat dengan panjang gelombang $\lambda = 517 \text{ nm}$ yang ditandai dengan terbentuknya warna ungu dan jika senyawa DPPH direaksikan dengan suatu antioksidan dan akan memberikan warna kuning dan sifat senyawanya stabil. Warna kuning yang dihasilkan pada saat direaksikan dengan antioksidan terjadi karena antioksidan memberikan satu elektronnya pada senyawa DPPH dan intensitasnya dapat diukur dengan spektrofotometri [11]. Reaksi tersebut dapat dijelaskan pada gambar berikut; Secara umum untuk mengukur parameter yang dipakai dalam menunjukkan aktivitas antioksidan dengan menggunakan harga konsentrasi koefisien atau Efficient Concentration (EC_{50}) atau Inhibitory Concentration (IC_{50}). Untuk mengukur daya antioksidan diantaranya dengan melihat nilai yang menggambarkan besaran konsentrasi dari ekstrak uji yang berpotensi menangkap radikal bebas 50% (IC_{50}) dengan menggunakan persamaan garis regresi linear yang dapat menggambarkan hubungan antara aktivitas penangkap radikal bebas rata-rata (Y) dan konsentrasi senyawa sampel (X) [12]. Antioksidan dapat dihitung aktivitasnya dalam penangkapan radikal DPPH dengan perhitungan rumus sebagai berikut :

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

Absorbansi Blangko

Analisis data selanjutnya yaitu dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear dengan menggunakan rumus $Y = a + bX$ dimana hasil akhir yang didapat dapat diproses dalam mendapatkan nilai IC_{50} [13]. Senyawa DPPH selain memberikan keuntungan dalam hal kestabilan pada saat penyimpanannya dimana sangat stabil dan dapat disimpan dengan jangka waktu yang lama, senyawa DPPH juga sangat mudah diamati perubahannya [14].

2.4. Ekstaksi

2.4.1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi merupakan teknik pemisahan senyawa target dan zat sampingannya dimana ekstraksi dilakukan berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut antara dua pelarut atau lebih yang saling bercampur. Secara umum zat terlarut yang di ekstrak tidak larut atau sedikit larut dengan suatu pelarut namun mudah larut di dalam pelarut yang lain. Metode ekstraksi secara umum dibedakan berdasarkan ada tidaknya dari suatu tahapan proses pemanasan. Ekstraksi dingin yang tidak melalui proses pemanasan terbagi menjadi maserasi, dan perkolasi sedangkan ekstraksi panas diantaranya yaitu reflux, soxhlet, dan infusa [15].

2.4.2. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana dimana adanya proses perendaman serbuk simplisia dalam cairan penyari. Maserasi dapat dilakukan secara berulang sehingga adanya keseimbangan konsentrasi antara bagian luar sel dan bagian dalam sel. Adanya cairan penyari yang akan menembus sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif dimana zat aktif tersebut akan terlarut dikarenakan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, maka larutan dengan kepekatannya yang lebih

besar akan terdesak ke luar sel sehingga terjadi pemisahan senyawa target (26). Penelitian sebelumnya dengan simplisia siput laut dilakukan maserasi 1x24 jam dalam suhu ruang kemudian dilakukan penyaringan, dan dihasilkan filtrate siput laut dan melalui proses evaporasi hingga menjadi ekstrak kental metanol siput laut [6].

3. METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat gelas, ayakan, batang pengaduk, cawan evaporator, *hot plate (Lab Companion)*, kertas saring, kompor, mortar, neraca analitik (*Ohaus Pioneer*), oven (*Modena*), pipet tetes, rotary evaporator (*Buchi R-100*), spektrofotometri UV-Vis, stamper, viskometer Brookfield (*Ametek*).

3.1.2. Bahan

Beberapa formulabahan yang digunakan : Daging siput laut utuh, DPPH, HCl pekat, magnesium, metanol

3.2. Populasi Sampel

Metode simplex lattice design yang digunakan untuk optimasi formula pada berbagai jumlah komposisi Siput laut (*Onchidium typhae*) diperoleh di daerah perairan yang ada di wilayah Kalimantan Barat.. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daging utuh yang diduga memiliki aktivitas antioksidan.

3.3. Teknik Pengelolaan Sampel

3.3.1. Pengelolaan Serbuk Siput Laut

Sampel siput laut dicuci hingga beberapa kali pencucian hingga lendir pada permukaan luar siput laut hilang, kemudian sampel dimasukkan dalam air mendidih selama 15 menit. Langkah selanjutnya siput laut dipisahkan antara daging dan jeroannya kemudian dagingnya dicuci kembali untuk diproses lebih lanjut. Daging siput laut kemudian diletakkan dalam wadah yang lebar dibawah sinar matahari langsung pada siang hari, dan dimasukkan ke dalam oven pada saat malam hari di suhu 60-70°C hingga kadar air dalam daging siput laut berkurang. Kemudian siput laut kering di blender hingga menjadi serbuk simplisia yang siap di ekstraksi.

3.3.2. Pembuatan Ekstrak Metanol Siput Laut

Serbuk yang telah diproses kemudian ditimbang dan diekstraksi dengan metode maserasi, dilakukan dengan proses perendaman sampel dengan metanol sebanyak 100 mL kemudian ditutup dan disimpan di dalam gelas kaca selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Ekstrak difiltrat menggunakan corong butchner dan dipisahkan ampasnya kemudian dilakukan langkah maserasi hingga cairan penyari tak berwarna. Hasil ekstraksi dievaporasi dengan suhu 70°C dengan kecepatan 70 rpm kemudian diuapkan.

3.4. Skrining Senyawa Metabolit Ekstrak

3.4.1. Uji Steroid

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 2 mL sampel siput laut yang telah diekstaksi dengan pelarut metanol. Kemudian ekstrak ditetesi dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil menunjukkan hasil yang positif menandung terpenoid jika campuran membentuk endapan minyak berwarna warna hijau [16].

3.4.2. Uji Alkaloid

Uji flavonoid menggunakan 2 jenis pelarut yaitu perakis meyer dan dragendroff. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 2 mL sampel siput laut yang telah diekstaksi dengan pelarut metanol. Kemudian ekstrak ditetesi dengan 5 tetes pereaksi draendroff, hasil positif bila menghasilkan jingga. Uji kedua dengan penambahan 2 mL ekstrak siput laut dengan HCl peka dan 5 tetes peaksi meyer, hasil menunjukkan hasil yang positif menandung alkaloid jika campuran membentuk endapan putih [17].

3.4.3. Uji Flavonoid

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 2 mL sampel siput laut yang telah diekstaksi dengan pelarut metanol. Dipanaskan selama kurang lebih 5 menit dan selanjutnya ditambahkan 0,1 gram logam Mg dan 5 tetes HCl pekat Hasil menunjukkan hasil yang positif menandung flavonoid jika campuran membentuk kuning jingga sampai merah [18].

3.5. Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

3.5.1. Preparasi variasi larutan uji ekstrak

Dibuat larutan induk ekstrak siput laut 500 ppm kemudian larutan diencerkan menjadi 200 ppm dan dibuat seri konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125, 150 ppm [17].

3.5.2. Pembuatan larutan DPPH 50 ppm

Pembuatan larutan DPPH 39,4 ppm ($M_r \text{ DPPH}=394,32$) dilakukan dengan melarutkan sebanyak 3,94 mg DPPH, dilarutkan dengan metanol 100 mL ditambahkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 39,4 ppm. Serapan larutan diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum larutan DPPH 39,4 ppm [19].

3.5.3. Penetapan panjang gelombang maksimum

Tiga buah labu ukur 10 mL di preparasi dan ditambahkan dengan DPPH sebanyak 0,5; 1,0; dan 1,5 mL, kemudian ditambah dengan metanol hingga tanda batas, sehingga dapat diperoleh konsentrasi larutan DPPH sebesar 0,020; 0,040; dan 0,060 mM. Dilakukan 3 kali replikasi,, kemudian larutan diukur pada panjang gelombang 400-600 nm [18].

3.5.4. Penetapan ekstrak sampel uji IC_{50}

Tahap ketiga yaitu larutan sampel yang telah di filtrat sebanyak 3 mL ditamahkan dengan larutan DPPH dengan perbandingan 1:1, selanjutnya campuran larutan diinkubasi selama 30 menit di dalam botol kaca gelap, kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri UV/Visible dengan panjang gelombang maksimum DPPH. Formula krim dengan persen peredaman radikal bebas DPPH terbesar digunakan untuk mencari nilai IC_{50} [18].

3.5.5. Pengukuran absorbansi larutan uji dan pembanding

Dibuat larutan induk ekstrak siput laut 500 ppm kemudian larutan diencerkan menjadi 200 ppm dan dibuat seri konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125, 150 ppm dengan menggunakan rumus pengenceran. Pada vitamin C (pembanding) dibuat larutan induk vitamin C sebesar 20 ppm, lalu diencerkan menjadi 5 ppm. Seri konsentrasi Seri Konsentrasi (ppm) dibuat pada dibuat dari 5 ppm menjadi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Dilakukan 3 kali replikasi untuk seri konsentrasi. Sampel masing-masing dipipet sebanyak 4 ml mL ditambahkan 4 mL DPPH kemudian diinkubasi dalam ruang tertutup pada suhu 37°C selama 30 menit. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap kontrol negatif, kontrol positif dan blanko. Larutan dibaca serapannya dengan menggunakan spektrofotometri UV/Vis pada panjang gelombang maksimum. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali [20].

3.5.6. Estimasi aktivitas antioksidan dan pembuatan kurva baku

Berdasarkan prosedur diatas untuk krim ekstrak siput laut dan vitamin C kemudian dihitung nilai %IC. Nilai absorbansi larutan uji dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear kurva baku dengan sumbu x konsentrasi larutan baku, sedangkan sumbu y adalah absorbansi sehingga diperoleh konsentrasi enzim yang kemudian di konversi menjadi persen kadar peredaman. Peredaman terhadap DPPH (%IC) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut, Data aktivitas tersebut selanjutnya dianalisis dan dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan linear dengan sumbu x merupakan konsentrasi larutan uji dan pembanding, sedangkan sumbu y adalah %IC [20].

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Uji Fitokimia

4.1.1 Uji Steroid

Uji steroid dilakukan dengan menggunakan bahan pereaksi HCL pekat dan H₂SO₄ pekat, tahap pertama disiapkan 2 mL sampel siput onchidid kemudian diteteskan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Pada penelitian ini menunjukkan hasil positif steroid, dapat dilihat pada gambar dibawah adanya cincin biru kehijauan yang menandakan adanya kandungan steroid dalam ekstrak siput onchidid [21] . Pada uji fitokimia menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard terjadi adanya perubahan warna hijau kebiruan yang disebabkan adanya reaksi oksidasi pada golongan steroid yang membentuk 39 ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentaenelik). Sedangkan pada penelitian sebelumnya dengan objek penelitian siput onchidid (*Onchididum typhae*) menunjukkan hasil kandungan senyawa metabolit steroid yang bernilai negatif hal ini dikarenakan preparasi sampel berbeda dengan penelitian ini, dimana pada penelitian ini jeroan siput Onchidid dibersihkan terlebih dahulu sebelum dilakukan pencucian dan perendaman dengan air panas [22]. Tahapan lain yang berbeda pada proses preparasi sampel yaitu pada penelitian sebelumnya siput onchidid mengalami proses perebusan dengan nyala api selama 15 menit yang mana bertujuan untuk menghilangkan lendir bukan dengan perendaman seperti pada penelitian ini, hal ini menunjukkan bahwa peningkatan suhu pada ekstrak

perlu diperhatikan karena pada suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada sampel yang sedang di proses [22][23]. Hal ini terbukti pada penelitian ini dengan proses preparasi sampel dimana untuk menghilangkan lendir siput onchidid hanya dengan perendaman saja tanpa proses perebusan, secara kualitatif menghasilkan uji positif pada kandungan senyawa steroid.

4.1.2 Uji Alkaloid

Dua jenis pereaksi digunakan dalam uji alkaloid yaitu pereaksi meyer dan dragendorff. Pembuatan pereaksi meyer dengan menggunakan bahan 1,358 g HgCl₂ + 60 mL akuades sebagai campuran pertama dan larutan 5 g KI + 10 mL akuades sebagai campuran kedua. Dicampurkan kedua campuran hingga menjadi satu larutan pereaksi meyer. Pembuatan pereaksi dragendorff yang terdiri dari 2 campuran, campuran pertama yaitu dengan cara menimbang 8 g KI kemudian dilarutkan dalam 20 mL air suling, sedangkan campuran lain 0,85 40 g bismut sub nitrat dilarutkan dalam 10 mL asam asetat glasial dan 40 mL air suling. Kedua larutan dicampurkan hingga menjadi satu larutan pereaksi dragendorff. Pereaksi dragendorff dan meyer disimpan pada botol vial kaca gelap tujuannya untuk menghindari kerusakan zat akibat sinar uv dari matahari. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 2 mL sampel ekstrak metanol siput onchidid kemudian ekstrak diteteskan dengan 5 tetes pereaksi dragendorff. Hasil penelitian menunjukkan adanya kandungan alkaloid ditandai dengan adanya perubahan warna jingga. Uji alkaloid dengan pereaksi meyer dengan penambahan 2 mL ekstrak metanol siput onchidid dengan HCl pekat dan 5 tetes pereaksi meyer, hasil penelitian menunjukkan hasil yang positif mengandung alkaloid karena pada saat pencampuran membentuk endapan putih. Proses pembentukan endapan putih pada pereaksi meyer ini terjadi karena nitrogen pada senyawa alkaloid yang akan membentuk ikatan ion logam K⁺ dari kalium tetraiodomerkurat (II) yang nantinya akan membentuk endapan putih [21].

4.1.3 Uji Flavonoid

Pengujian uji fitokimia kandungan flavonoid dengan menggunakan bahan pereaksi yaitu logam Mg dan HCl pekat. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 2 mL sampel ekstrak metanol siput laut kemudian dipanaskan selama kurang lebih 5 menit dan selanjutnya ditambahkan 0,1 gram logam Mg dan 5 tetes HCl pekat Hasil penelitian menunjukkan hasil negatif mengandung flavonoid karena tidak menunjukkan perubahan jingga sampai merah [21]. Pada penelitian yang dihasilkan tidak adanya perubahan warna merah atau jingga dimana reaksi ini dapat terjadi pada saat penambahan HCl pekat yang menghidrolisis flavonoid menjadi senyawa aglikonnya, yaitu menghidrolisis O-glikosil dimana glikosil akan tergantikan oleh H⁺ dari senyawa HCl karena sifat elektrofiliknya. Proses resukdi Mg dan Cl inilah yang akan menyebabkan senyawa kompleks berwarna merah atau jingga pada senyawa flavonoid [19].

4.2 Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

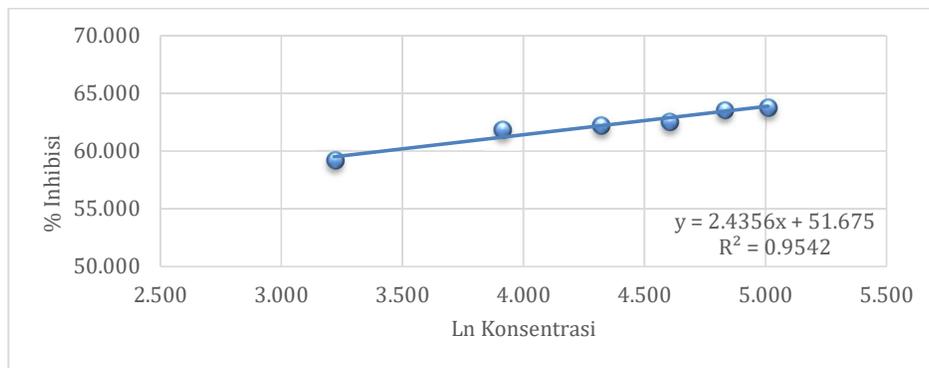
Senyawa DPPH (1,1- diphenil-2-pikrilhidrazil) merupakan senyawa radikal bebas yang dapat bereaksi dengan antioksidan dan akan membentuk senyawa 1,1 difenil-2- pikril hidrazin, adanya senyawa DPPH yang merupakan electron berpasangan dalam suatu senyawa DPPH dapat memberikan absorbs panjang gelombang dalam besaran $\lambda = 517$ nm. Adanya reaksi antara DPPH dengan pelarut ditunjukkan dengan warna ungu dan akan beraksi menjadi warna kuning jika beraksi dengan senyawa yang mengandung antioksidan [10]. Beberapa keuntungan metode DPPH antara lain yaitu stabil dalam penyimpanan yang dapat disimpan dalam waktu yang lama juga metode DPPH dapat dengan mudah diamati perubahannya [14]. Senyawa antioksidan akan mendorong satu elektronnya pada radikal bebas yang tidak stabil sehingga radikal bebas ini akan di netralkan dan tidak lagi mengganggu jalur metabolisme pada tubuh. Aktivitas antioksidan sendiri dapat diketahui berdasarkan nilai IC₅₀, semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidannya akan semakin besar Perhitungan nilai IC₅₀ ditentukan dengan persamaan regresi linier dengan persamaan $y = bx + a$, dengan hubungan konsentrasi sampel (x) terhadap rata-rata persen inhibisi (y) [24]. Persen inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus [25] :

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Abs.DPPH} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs.DPPH}} \times 100\%$$

Persamaan tersebut dapat menyatakan nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus[26] :

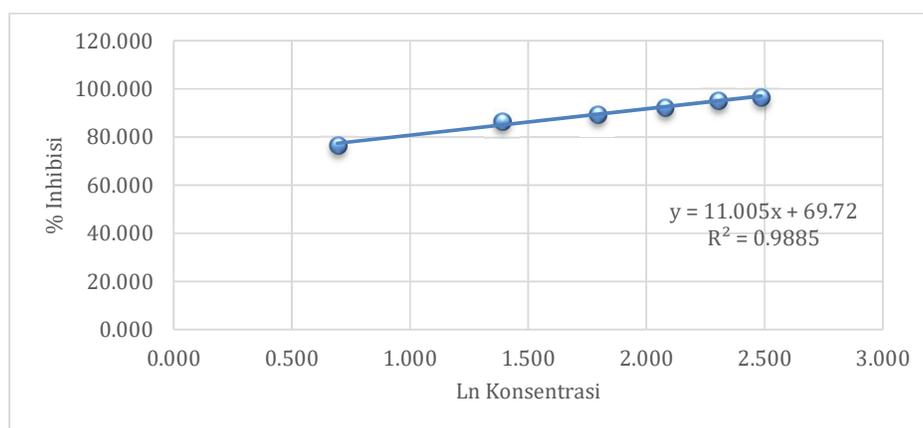
$$IC_{50} = \frac{(50 - a)}{b} \times 100\%$$

Pada pengujian senyawa antioksidan pada ekstrak Dibuat larutan induk ekstrak siput laut 500 ppm kemudian larutan diencerkan menjadi 200 ppm dan dibuat seri konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125, 150 ppm dengan menggunakan rumus pengenceran dan selanjutnya diujikan dengan menggunakan instrument spektrofotometri UV/Vis. Tahap awal yaitu pengukuran panjang gelombang dan absorbansi DPPH dimana nilai absorbansi DPPH untuk ekstrak lintah laut adalah 1.024 dan panjang gelombang yang terdeteksi yaitu 515,70 nm. DPPH diambil 3 mL kemudian direaksikan dengan ekstrak sebanyak 3 mL dengan perbandingan 1:1. Aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} yaitu besaran yang dibutuhkan untuk mneghambat 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} pada ekstrak lintah laut dinyatakan pada tabel 10. Hubungan antara konsentrasi ekstrak lintah laut dengan persentase inhibisi diperoleh, diperoleh nilai IC_{50} yaitu 92,045.



Gambar 18. Grafik Regresi Linier Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Siput Laut Metode DPPH

Setelah uji yang dilakukan kepada ekstrak kemudian dilakukan pula vitamin C sebagai kontrol positif. Dibuat larutan induk vitamin C sebesar 20 ppm, lalu diencerkan menjadi 5 ppm. Seri konsentrasi Seri Konsentrasi (ppm) dibuat pada dibuat dari 5 ppm menjadi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Dilakukan 3 kali replikasi untuk seri konsentrasi. Nilai absorbansi DPPH untuk vitamin C adalah 1.024 dan panjang gelombang yang terdeteksi yaitu 515,80 nm. DPPH diambil 3 mL kemudian direaksikan dengan vitamin C sebanyak 3 mL dengan perbandingan 1:1. Aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} yaitu besaran yang dibutuhkan untuk mneghambat 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} pada vitamin C dinyatakan pada tabel 11. Hubungan antara konsentrasi vitamin C dengan persentase inhibisi diperoleh, diperoleh nilai IC_{50} yaitu 55,930.



Gambar 19. Grafik Regresi Linier Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C Metode DPPH

Uji korelasi bertujuan untuk menyatakan tingkat hubungan antara dua atau lebih variabel berbeda yang digambarkan dengan ukuran koefisien korelasi. Koefisien korelasi adalah koefisien yang menggambarkan hubungan antara dua atau lebih variabel dimana besar koefisien korelasi menggambarkan hanya menggambarkan hubungan linier antar variabelnya dan menunjukkan hubungan timbal balik sehingga tidak akan menjadi masalah apabila dalam menentukan variabel bebas maupun terikat dalam sebuah penelitian [27]. Pedoman dalam memberikan penilaian kekuatan hubungan variabel terlihat pada Tabel 13 dibawah [28].

Tabel 13. Tingkat Hubungan pada Nilai Korelasi

Interval Koefisien	Tingkat Hubungan
0,00 - 0,199	Sangat Rendah
0,20 - 0,399	Rendah
0,40 - 0,599	Sedang
0,60 - 0,799	Kuat
0,80 - 1,00	Sangat Kuat

Aktivitas antioksidan dapat dibagi menjadi kategori sangat kuat, kuat, sedang, lemah, dan sangat lemah. Antioksidan kategori sangat kuat apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, antioksidan kategori kuat memiliki nilai IC_{50} berada pada kisaran 50 ppm hingga 100 ppm, antioksidan kategori sedang memiliki nilai IC_{50} berkisar antara 100 ppm hingga 150 ppm, antioksidan kategori lemah memiliki kisaran 150 ppm hingga 200 ppm dan nilai IC_{50} lebih dari 200 ppm tergolong memiliki antioksidan yang sangat lemah. Bila dibandingkan dengan IC_{50} pembanding vitamin C dengan nilai 55,930, dapat diketahui bahwa nilai IC_{50} asam askorbat atau vitamin C yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak siput onchidid, hal ini menunjukkan bahwa senyawa antioksidan yang terkandung dalam siput onchidid lebih lemah jika dibandingkan dengan vitamin C. Hasil penelitian diperoleh bahwa kedua sampel uji baik ekstrak siput onchidid maupun senyawa pembandingnya vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang baik dengan tingkat intensitas antioksidan yang berbeda yang dapat disebabkan karena jenis senyawa dan jumlah kandungan senyawa antioksidan di dalam kedua sampel uji yang berbeda dan menyebabkan perbedaan pada nilai IC_{50} .

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang didapat, dapat ditarik kesimpulan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam siput onchidid yaitu senyawa steroid dan alkaloid namun memiliki hasil yang reaktif negative pada uji fitokimia senyawa flavonoid. Pada ekstrak siput onchidid yang dilakukan pengujian kandungan antioksidannya menggunakan instrument uji metode DPPH dengan pelarut yang digunakan yaitu

methanol memiliki data IC₅₀ sebesar 92,045 dengan pembandingnya yaitu vitamin C dengan hasil IC₅₀ sebesar 55,930.

Ucapan Terima Kasih

Segala Puji Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat, bimbingan dan kasih karunia-Nya yang dilimpahkan kepada penulis, sehingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan jurnal ilmiah ini yang berjudul Optimasi Formula Krim Antioksidan Ekstrak Metanol Siput Onchidiid (*Onchidium Typhae*) Dengan Metode Simplex Lattice Design (SLD). Dengan selesainya skripsi ini, bukanlah menjadi sebuah akhir, melainkan suatu awal yang baru untuk melanjutkan pengembangan ilmu terkait formulasi produk sediaan. Tidak ada persembahan terbaik yang dapat penulis berikan selain rasa ucapan terimakasih kepada pihak yang telah banyak membantu penulis. Secara khusus, penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Dr. Bambang Wijianto, M.Sc., Apt selaku pembimbing utama dan Bapak Andhi Fahrurroji, M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu dan telah memberikan banyak rancangan, wejangan ilmu yang bermanfaat, bimbingan serta saran. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan semoga amal baik yang telah diberikan mendapatkan balasan dari Tuhan YME. Amin.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] K. A. Wahyuningsih, "Astaxanthin memberikan efek proteksi terhadap photoaging," *Damianus J. Med.*, vol. 10, no. 3, pp. 149–160, 2011.
- [2] Isnindar, Wahyuono S, and E. . Setyowati, "Isolasi dan Identifikasi Senyawa (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) dengan Metode DPPH Antioksidan Total Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.)," *Maj. Obat Tradisional*, 16(3) 157-164., vol. 16, no. 3, pp. 131–142, 2011.
- [3] Haffiludin, *Extraction and Identifcation of Bioactive Compounds of Sea Leeches (Discodoris sp.)*. 2011.
- [4] B. Dayrat and dkk, *Integrative taxonomy of the genus Onchidium Buchannan, 1800 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Onchidiidae)*. 2016.
- [5] Bambang Wijianto, "Characterization of Onchidiid slug (*Onchidium thypae*) West Kalimantan Waters as Antibacterials and Antifungal," *Borneo J. Pharm*, vol. 5, no. 1, pp. 35–41, 2022.
- [6] Haffiludin, "Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Bioaktif Lintah Laut (*Discodoris sp.*) Sebagai Antioksidan," Institut Teknologi Bogor, 2011.
- [7] L. Nurjanah, D. Hardjito, M. Monintja, D. R. Bintang, and Agungpriyono, "Aktivitas Antioksidan Lintah Laut (*Discodoris sp.*) Dari Perairan Pulau Buton Sulawesi Tenggara," *J. IPB*, vol. 1, pp. 5–6, 2009.
- [8] Hafiluddin, Nurjanah, and N. T., "Nutritional Content and Characterization of Bioactive Compounds of Marine Leeches (*Discodoris Sp.*)," *Sci. J. Fish. Mar. Aff.*, vol. 3, no. 1, p. 5, 2011.
- [9] Sirait R C, Tahjono, and Dkk, "Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Kadar MDA Serum Tikus Sprague Dawley Setelah Diberikan Paparan Asap Rokok," Yogyakarta, 2016.
- [10] Iswindari D, "Formulasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Krim Rice Bran Oil," Banten, 2014.
- [11] P. Molyneux, "The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity," *Songklanakar J. Sci. Technol*, vol. 26, no. 2, pp. 211–2189, 2004.
- [12] Harrizul rivai, Rusdi, and Ernita W, "Pengaruh Perbandingan Pelarut Etanol-Air Terhadap Kadar Senyawa Fenolat dan Daya Antioksidan Dari Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L)," *J. Sains dan Teknol. Farm.*, vol. 18, no. 1, 2013.
- [13] Ajmi s, Gani A, and Erlidwati, "Uji Aktivitas Antioksidan Daun Gulma Siam Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidral," *J. IPA dan Pembelajaran IPA*, vol. 1, no. 2, pp. 131–134, 2017.
- [14] Yuhernita and Juniarti, "Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan," *MAKARA, SAINS*, vol. 15, no. 1, pp. 48–52, 2011.
- [15] Fernanda M, *Aplikasi Pemanfaatan Daun Pepaya (Carica papaya) Sebagai Biolarvasida terhadap Larva Aedes aegypti*. Gresik: Graniti, 2019.
- [16] Septianingsih D, "Isolasi dan identifikasi komponen utama ekstrak biji buah merah (*Pandanus cocoideus lamk*)," Surakarta, 2010.
- [17] B. Elya, R. Dewi, and M. . Budiman, "Antioxidant cream of solanum lycopersicum L," *J. Pharma*, vol. 5, no. 1, 2013.

- [18] D. A. Wulandari, “Komponen Bioaktif dan Aktivitas Antioksidan Kerang Balelo (*Conomurex* sp.),” *J. Pengolah. Has. Perikan. Indones.*, vol. 24, no. 1, pp. 11–19, 2021.
- [19] G. G, *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 2017.
- [20] O. V Solichin, “Uji Efektivitas Antioksidan Krim Ekstrak Etanol Biji Pepaya (*Carica Papaya* L.) Terhadap Dpph (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazil),” *J. Mhs. Farm. Fak. Kedokt. UNTAN*, vol. 1, no. 1, pp. 2–5, 2014.
- [21] S. Keshani, A. Chuah, M. Nourouzi, and A. Russly, “Optimization of Concentration Process on Pamelo Fruit Juice Using Response Surface Methodology (RSM),” *J. Trop. Agric. Food Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 43–51, 2010.
- [22] Bolton, *Pharmaceutical Statistic*, 3rd ed. Newyork: Marcel Dekker, 1997.
- [23] W. Taurina, M. Andrie, and L. Anjeli, “The gel formulation of the aqueous phase of snakehead fish (*Channa striata*) extract with various combinations of HPMC K4M and Carbopol 934,” *Pharmaciana*, vol. 8, no. 1, p. 97, 2018.
- [24] A. Jr and Loyd V, *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6th ed. London: American Pharmacists Assosiation, 2009.
- [25] Hayatul R, “Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Sumber Buah-buahan di Indonesia,” *J. Agrotek Indones.*, vol. 2, no. 1, pp. 34 – 38, 2017.
- [26] D. Purwanto, S. Bahri, and A. Ridhay, “Uji aktivitas antioksidan ekstrak buah purnajiwa (*Kopsia arborea* Blume.) dengan berbagai pelarut,” *J Kovalen*, vol. 3, no. 24–32, 2017.
- [27] Wibowo RA, K. AA, E. T, and T. U, “Theta omega : Journal of electrical engineering , computer and information technology,” *y. J Electr Eng Comput Inf Technol*, vol. 1, no. 2, pp. 1–6, 2020.
- [28] C. Setiawan and Yosepha SY, “Pengaruh green marketing dan brand image terhadap keputusan pembelian produk the body shop Indonesia,” *J Ilm MProgress.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2020.