

Isolasi Dan Karakterisasi Protein Bioaktif Dari Spons *Callyspongia Sp.* Sebagai Zat Antioksidan

Nur Indah Sari¹⁾, Ahyar Ahmad²⁾, Seniwati Dali²⁾

¹⁾Program Sarjana Universitas Hasanuddin

²⁾Jurusan Kimia Universitas Hasanuddin

ABSTRAK

Spons *Callyspongia sp.* merupakan salah satu biota laut yang banyak tersebar diperairan pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan. Spons ini menarik untuk diteliti bioaktivitas dari fraksi proteinnya. Protein tersebut diisolasi dengan menggunakan buffer Tris (hidroksimetil) amino metana. Ekstrak kasar difraksinasi dengan penambahan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20%, 20-40%, 40-60%, dan 60-80%. Pemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan. Kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry. Jumlah protein tertinggi terdapat pada fraksi 60-80% sebesar 290,4 mg. Pengujian aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dengan spektrofotometri UV-Vis diamati absorbansinya pada $\lambda = 500$ nm. Aktivitas antioksidan yang kuat terdapat pada fraksi protein 0-20% kejenuhan dengan nilai IC_{50} sebesar 61,62 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat ditunjukkan oleh fraksi protein 20-40%, 40-60%, dan 60-80% kejenuhan dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 28,76 $\mu\text{g/mL}$, 13,90 $\mu\text{g/mL}$, dan 35,66 $\mu\text{g/mL}$. Hasil dari penelitian menunjukkan masing-masing fraksi protein tersebut terdapat perbedaan aktivitas antioksidan yang mampu mencegah terjadinya proses oksidasi.

Kata kunci: *Spons Callyspongia. sp.*, Antioksidan, DPPH

PENDAHULUAN

Sebagai negara kepulauan yang besar di dunia yang memiliki wilayah laut sangat luas, Indonesia memiliki sumber daya alam laut yang besar khususnya di provinsi Sulawesi Selatan. Pemanfaatan sumber daya alam laut tidak hanya dilakukan melalui penangkapan, tetapi juga perlu dikembangkan dengan usaha budidaya. Saat ini pengembangan budidaya laut lebih banyak mengarah pada ikan-ikan yang bernilai tinggi dan tiram mutiara, sementara di perairan Indonesia masih banyak sumber daya alam laut yang masih bisa dikembangkan dan mempunyai nilai ekonomis tinggi, salah satu sumber daya alam laut tersebut adalah ekosistem terumbu karang. Ekosistem terumbu karang merupakan bagian dari ekosistem laut yang menjadi sumber kehidupan bagi beraneka ragam biota laut. Potensi biota laut sebagai sumber bahan antioksidan baru banyak diteliti dalam tahun-tahun terakhir, meskipun belum sebanyak penelitian terhadap biota darat. Sejarah evolusi yang panjang pada biota laut menyebabkan biota laut mempunyai keanekaragaman molekul yang sangat tinggi. Berbagai jenis senyawa dengan bermacam-macam bioaktivitas telah ditemukan dari biota tersebut (Fallu, 1991).

Spons merupakan biota laut yang hidup menetap di dasar perairan, yang memiliki peran yang cukup penting di dalam ekosistem terumbu karang. Selain itu spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang persentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Muniarsih dan Rachmaniar, 1998).

Spons merupakan biota yang tidak memiliki alat gerak sebagai perlindungan diri, sebagai bentuk

perlindungannya spons melakukan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa-senyawa hasil biosintetik turunan dari metabolit primer yang umumnya diproduksi oleh organisme yang berguna untuk pertahanan diri dari lingkungan maupun dari serangan organisme lain, sedangkan substansi yang dihasilkan oleh organisme melalui metabolisme dasar serta digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan organisme yang bersangkutan disebut dengan metabolit primer. Hingga saat ini, spons dikenal sebagai biota yang paling banyak menghasilkan senyawa bioaktif, seringkali dengan aktivitas bioaktif yang tinggi jika dibandingkan dengan biota laut lainnya, salah satu famili spons yang memiliki senyawa dengan bioaktivitas tinggi berasal dari Famili *Callyspongiidae* (Sorokin, 1993).

Pada penelitian ini, kami mengambil spons *Callyspongia sp.* yang merupakan salah satu genus spons yang banyak diteliti kandungan dan aktivitas senyawa bioaktifnya. Menurut Erhardt dan Moostleiner (1995) spons *Callyspongia sp.* merupakan salah satu jenis bunga karang yang paling banyak ditemukan di perairan Indonesia. Di dalam spons ini mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid 3-alkilpiridin (Voogd, dkk., 2005), akartepin yang merupakan inhibitor dari fosfatidilinositol (Fukami, dkk., 1997), meroterpenoid sulfat dan masih banyak lagi jenis senyawa bioaktif yang dapat ditemukan dalam spesies ini (Gray, dkk., 2006).

Spons ini memiliki struktur permukaan tubuh yang berpori-pori sehingga ia dimasukkan kedalam filum porifera, Kebanyakan dari spesies spons hidup di air laut, dan tidak mempunyai jaringan atau organ yang sejati. Bentuk dan ukurannya sangat bervariasi. Pola pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh keadaan substrat (Romimohtarto, 2007).

Mengingat pentingnya fungsi antioksidan bagi tubuh manusia, maka diperlukan suatu penelitian mengenai aktivitas antioksidan yang terdapat pada spons *Callyspongia sp.* Penelitian sebelumnya diketahui bahwa spons *Callyspongia sp.* mempunyai aktivitas antioksidan karena spons ini banyak mengandung senyawa alkaloid yang memiliki aktivitas antioksidan. Akan tetapi pada penelitian ini, diharapkan muncul pengetahuan dan informasi mengenai aktivitas antioksidan dari kelompok protein bioaktif dari *Callyspongia sp.* yang berasal dari pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan yang dapat digunakan sebagai zat antioksidan baru.

METODE PENELITIAN

1 Isolasi Protein Bioaktif Spons

Spons *Callyspongia sp.* dipotong-potong kecil lalu ditimbang sebanyak 500 g berat segar, dihaluskan dengan blender menggunakan 500 mL pelarut buffer A, kemudian disaring dengan kain saring. Kemudian filtrat yang di peroleh dibeku-cairkan sebanyak 2-3 kali lalu disentrifugasi pada 6000 rpm 4 °C selama 30 menit, selanjutnya supernatannya difraksinasi.

2 Fraksinasi

Ekstrak kasar sampel spons difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing : 0-20%, 20-40%, 40-60% dan 60-80%, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm dengan suhu 4 °C selama 30 menit.

3 Dialisis

Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat ditambahkan 5 mL buffer B kemudian didialisis dalam sejumlah buffer C.

Masing-masing fraksi protein tersebut dimasukkan dalam kantong selofan dengan dipastikan bahwa kantong selofan itu tidak bocor atau rusak. Selofan yang telah diisi dengan fraksi protein dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer C lalu diaduk dengan pengaduk magnetic stirrer. Dialisis terus dilakukan sampai larutan buffer C tidak berwarna lagi.

4 Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Kedalam gelas kimia dimasukkan 4 mL larutan sampel ditambahkan 5,5 mL pereaksi Lowry B, dihomogenkan lalu dibiarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar, selanjutnya ditambahkan 0,5 mL pereaksi Lowry A, dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit. Diukur absorbannya pada λ_{max} . Penentuan kadar protein dilakukan dengan cara mensubstitusikan absorbansi larutan kedalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar protein.

5 Uji Aktifitas Antioksidan

Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Fraaksi protein 0-20% kejenuhan dengan variasi konsentrasi 30 $\mu\text{g/mL}$, 35 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 45 $\mu\text{g/mL}$ dan 50 $\mu\text{g/mL}$, lalu masing-masing dimasukkan ke dalam Labu ukur 5 mL, Kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan DPPH 0,1 mM. Volume dicukupkan sampai 5 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum. Perlakuan yang sama dilakukan pada masing-masing fraksi 20-40%, 40-60%, dan 60-80%. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C sebagai control positif. Besar daya antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

1 Ekstraksi, Isolasi dan Penentuan Kadar Protein dari Spons

Biota laut (sampel) yang berupa spons *Callyspongia sp.* yang pengambilannya pada bulan Mei 2013 dilakukan di sekitar pulau Barang Lompo, Sulawesi Selatan. Sampel dibersihkan kemudian dipotong-potong kecil lalu ditimbang sebanyak 500 gr berat segar. Dihaluskan dengan blender menggunakan pelarut buffer A, dimaksudkan untuk memecahkan sel-sel sehingga protein yang terdapat dalam sel bisa larut dalam pelarut buffer. Proses pemecahan sel dibantu dengan penambahan Triton X-100 dimana secara kimia dapat membantu proses lisis sel dengan menegangkan plasma sehingga dengan gesekan fisik sedikit saja sel akan terpecah. Selanjutnya disaring dengan kain penyaring untuk memisahkan antara ampas sel/jaringan dengan filtrat, kemudian filtrat yang

diperoleh dibeku-cairkan sebanyak 2-3 kali, tujuannya agar semua sel bisa pecah dengan sempurna. Lalu disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C selama 20 menit supaya sisa pecahan sel dapat terpisah lebih sempurna, selanjutnya supernatannya difraksinasi.

Ekstrak kasar dengan volume 750 mL difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing: 0-20 % (F1), 20-40 % (F2), 40-60 % (F3), 60-80 % (F4). Hal ini bertujuan untuk memisahkan jenis protein berdasarkan tingkat kelarutan dan jumlah gugus-gugus hidrofob yang terdapat pada asam-asam amino penyusun protein. Penambahan garam amonium sulfat pada konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi pada setiap tingkat fraksi, berbeda juga jenis protein yang mengendap karena molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga terjadi penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan

protein, ini mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap.

Endapan protein F1, F2, F3, dan F4 yang dihasilkan setelah fraksinasi pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat kemudian dilarutkan dengan sejumlah buffer B yang volumenya sama tiap fraksi. Selanjutnya masing-masing suspensi fraksi protein dimasukkan ke dalam kantong selofan. Selofan yang telah terisi suspensi fraksi protein dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer C, tujuannya agar garam amonium sulfat dan garam lain yang ada dalam ekstrak bisa melewati membran selofan karena perbedaan konsentrasi pelarut yang ada di dalam dan di luar kantong selofan. Hal ini mengikuti prinsip difusi osmosis sambil diaduk dengan pengaduk magnetik stirer dimaksudkan untuk mempercepat proses pemurnian protein, dan dilakukan pada suhu rendah agar protein tidak rusak dan tetap dalam keadaan stabil.

Setelah proses pemurnian selesai, dilanjutkan dengan penentuan kadar protein spons *Callyspongia sp.* berdasarkan metode Lowry (Colowick dan Kaplan, 1957) menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai larutan standar. Dalam penentuan kadar protein ini

didasarkan pada reaksi protein dengan asam fosfotungstat-fosfomolibdat pada suasana alkalis akan memberikan warna biru yang mana intensitas dari warnanya bergantung pada pengenceran masing-masing fraksi protein. Selanjutnya kita dapat mengukur absorbannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan Lowry yang digunakan pada percobaan ini ada dua macam yaitu Lowry A dan Lowry B. Pada pembuatan pereaksi Lowry A digunakan larutan folin-clocalteus yang diencerkan dengan menggunakan aquades dengan perbandingan 1 : 1, sedangkan pada pembuatan pereaksi Lowry B yaitu campuran antara NaCO₃ dalam NaOH 0,1 N, CuSO₄.5H₂O 1%, dan Na-K-tartat 2% dengan perbandingan 100 : 1 : 1. Bahan-bahan dalam pereaksi Lowry B ini memiliki fungsi yang berbeda-beda, dimana CuSO₄ disini mereduksi fosfotungstat-fosfomolibdat, Na-K-tartat berfungsi mencegah terjadinya pengendapan kupro oksida dalam reagen Lowry B, sedangkan NaCO₃ digunakan sebagai garam yang mengkoordinasikan reaksi dalam suasana basa bersama dengan NaOH. Adapun masing-masing tingkat kejenuhan (NH₄)SO₄ pada pola distribusi protein tiap fraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Total protein pada fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan

No.	Fraksi Protein	volume setiap fraksi (mL)	Konsentrasi protein (mg/mL)	Total protein (mg)
1	Ekstrak kasar	750	27,15	20362,5
2	0-20 %	34	7,95	270,3
3	20-40 %	32	0,055	1,76
4	40-60 %	27,5	0,058	1,59
5	60-80 %	37	7,85	290,4

Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa konsentrasi protein berbeda-beda pada tiap fraksi. Perbedaan konsentrasi protein pada tiap fraksi mengindikasikan adanya perbedaan kelarutan protein dalam air. Protein yang kelarutannya kurang dalam air maka terlebih dahulu mengendap dibandingkan protein yang kelarutannya lebih tinggi dalam air. Konsentrasi protein tertinggi pada spons *callyspongia sp.* ditemukan pada fraksi 60-80% (F4) dengan total protein 290,4 mg. Dari data tersebut dapat diduga bahwa protein pada spons *Callyspongia sp.* merupakan jenis protein yang kelarutannya cukup tinggi dalam air.

2 Uji Bioaktivitas Antioksidan dari masing-masing Fraksi Protein Spons *Callyspongia sp.*

Senyawa antioksidan secara umum didefinisikan sebagai suatu senyawa yang dapat menunda,

memperlambat atau mencegah terjadinya proses oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Keberadaan senyawa antioksidan ini dalam suatu bahan dapat dideteksi dengan melakukan uji aktivitas antioksidan. Uji aktivitas antioksidan pada spons *Callyspongia sp.* dilakukan dengan metode uji DPPH.

Metode uji DPPH merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk memperkirakan efisiensi kinerja dari substansi yang berperan sebagai antioksidan (Molyneux, 2004). Senyawa DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam (Rakesh, dkk., 2010). Senyawa DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan

dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Suratmo, 2009).

Metode uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan radikal bebas DPPH dipilih karena merupakan metode yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (Hanani, dkk., 2005). Metanol dipilih sebagai pelarut karena metanol dapat melarutkan kristal DPPH (Molyneux, 2004). Metanol juga cenderung lebih murah dibanding pelarut organik yang lain (Andayani, dkk., 2008).

Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH

dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat (Andayani, dkk., 2008). Fraksi protein spons *Callyspongia sp.* dalam penelitian ini menunjukkan warna hijau. Perubahan warna yang mengindikasikan adanya reaksi peredaman radikal bebas DPPH oleh senyawa antioksidan pada larutan asam askorbat dan larutan fraksi protein *Callyspongia sp.*

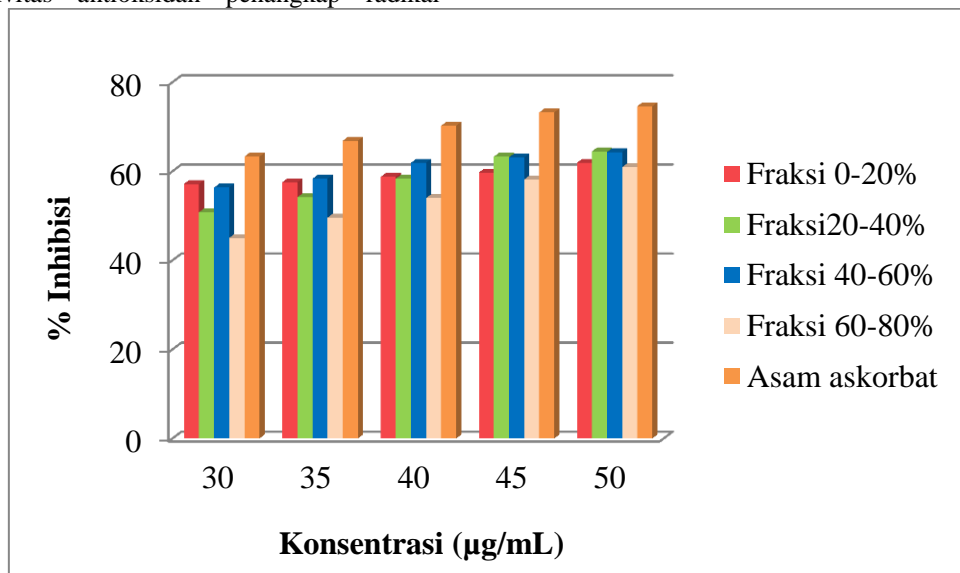
Pada penelitian ini, pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap masing-masing fraksi protein dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 500 nm dan absorbansi kontrol sebesar 0,504. Absorbansi yang diperoleh dihitung aktivitas antioksidannya. Hasil perhitungan aktivitasnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil aktivitas antioksidan fraksi 0-20% (F1), fraksi 20-40% (F2), fraksi 40-60%, fraksi 60-80% (F4) dan Asam askorbat ($\lambda=500$ nm)

No.	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas (% Inhibisi)				
		Fraksi Protein				Pembanding
		0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	Asam askorbat
1	30	57,14	50,79	56,34	45,03	63,29
2	35	57,53	54,16	58,33	49,60	66,86
3	40	58,73	58,33	61,90	53,96	70,23
4	45	59,72	63,29	63,09	58,13	73,21
5	50	61,90	64,48	64,28	60,91	74,60

Pengujian aktivitas antioksidan dari masing-masing fraksi protein menghasilkan hubungan antara konsentrasi fraksi protein yang digunakan dengan persen inhibisinya. Aktivitas antioksidan penangkap radikal

DPPH fraksi 0-20% (F1), fraksi 20-40% (F2), fraksi 40-60% (F3), fraksi 60-80% (F4) dan asam askorbat ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH fraksi 0-20% (F1), fraksi 20-40% (F2), fraksi 40-60% (F3), fraksi 60-80% (F3) dan Asam askorbat.

Persen inhibisi adalah kemampuan suatu bahan untuk menghambat aktivitas radikal bebas, yang berhubungan dengan konsentrasi suatu bahan uji. Persen inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi DPPH dengan absorbansi sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Andayani, dkk., 2008). Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah *Inhibition Concentration* (IC₅₀) yaitu

konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persen penghambatan 50% (Suratmo, 2009). Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Hasil uji aktivitas antioksidan masing-masing fraksi dan asam askorbat dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai IC₅₀ dari hasil pengujian aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH

Pembanding	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas penangkap radikal (%)	Persamaan regresi	IC ₅₀ (µg/mL)
Fraksi 0-20% (F1)	30	57,14	$y = 0,234x + 35,58$ $R^2 = 0,937$	61,62
	35	57,53		
	40	58,73		
	45	59,72		
	50	61,90		
Fraksi 20-40% (F2)	30	50,79	$y = 0,730x + 29,00$ $R^2 = 0,975$	28,76
	35	54,16		
	40	58,33		
	45	63,29		
	50	64,48		
Fraksi 40-60% (F3)	30	56,34	$y = 0,412x + 44,27$ $R^2 = 0,956$	13,90
	35	58,33		
	40	61,90		
	45	63,09		
	50	64,28		
Fraksi 60-80% (F4)	30	45,03	$y = 0,805x + 21,29$ $R^2 = 0,992$	35,66
	35	49,60		
	40	53,96		
	45	58,13		
	50	60,91		
Asam askorbat	30	63,29	$y = 0,579x + 46,46$ $R^2 = 0,978$	6,11
	35	66,86		
	40	70,23		
	45	73,21		
	50	74,60		

Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa masing-masing fraksi protein dengan pelarut metanol mempunyai IC₅₀ seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4. Untuk fraksi 0-20% (F1) mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 61,62 µg/mL, fraksi 20-40% (F2) mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 28,76 µg/mL, fraksi 40-60% (F3) mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 13,90 µg/mL, dan fraksi 60-80% (F4) mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 35,66 µg/mL, sedangkan untuk asam askorbat mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 6,11 µg/mL. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/mL, kuat apabila nilai IC₅₀ antara 50-100 µg/mL, sedang apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 100-150 µg/mL, dan lemah apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 150-200 µg/mL (Molyneux, 2004).

Hasil dari penelitian ini, terdapat satu fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena nilai IC₅₀-nya lebih dari 50 µg/mL yaitu fraksi 0-20% (F1), sedangkan tiga fraksi yaitu Fraksi 20-40% (F2), fraksi 40-60% (F3) dan fraksi 60-80% (F4) memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena nilai IC₅₀-nya kurang dari 50 µg/mL. Hal ini jauh berbeda dengan aktivitas antioksidan asam askorbat, yang aktivitas antioksidannya lebih kuat dari senyawa bioaktif antioksidan yang terdapat pada keempat fraksi spons *callyspongia sp.* ini ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ asam askorbat yang jauh lebih kecil dari IC₅₀ fraksi protein spons *callyspongia sp.*

Hal tersebut dapat terjadi karena fraksi protein spons *callyspongia sp* yang digunakan dalam penelitian ini

masih tergolong sebagai fraksi protein kasar. Fraksi protein ini masih mengandung senyawa lain yang bukan merupakan senyawa antioksidan. Senyawa lain tersebut ikut terekstrak dalam pelarut selama proses ekstraksi. Senyawa-senyawa ini dapat meningkatkan nilai rendemen fraksi protein, tetapi tidak dapat meningkatkan aktivitas antioksidan fraksi protein tersebut sedangkan untuk asam askorbat merupakan senyawa murni. Pada penelitian ini, terlihat ada sedikit perbedaan yang signifikan antara fraksi 0-20% (F1), Fraksi 20-40% (F2), fraksi 40-60% (F3) dan fraksi 60-80% (F4), masing-masing fraksi protein memiliki kekuatan penghambat yang berbeda-beda antara satu dengan yang lainnya, yang mampu mencegah terjadinya proses oksidasi.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa spons *Callyspongia sp.* mengandung senyawa bioaktif dari kelompok protein yang diisolasi dan diendapkan berdasarkan perbedaannya di dalam air, serta masing-masing fraksi protein mempunyai aktivitas antioksidan yang mampu mencegah terjadinya proses oksidasi. Aktivitas antioksidan yang sangat kuat terdapat pada fraksi 40-60% dengan nilai IC_{50} sebesar 13,90 $\mu\text{g/mL}$.

SARAN

Penelitian ini masih menggunakan fraksi protein yang masih mengandung senyawa lain yang bukan merupakan senyawa antioksidan sehingga untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemurnian lagi dan pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak murni tersebut. Penelitian ini juga hanya mengetahui kadar protein *Callyspongia sp.* yang didapat sehingga tidak diketahui jenis asam amino yang terdapat di dalamnya. Analisis asam amino diperlukan untuk mengetahui jenis-jenis asam amino yang terdapat pada *Callyspongia sp.* karena asam amino juga termasuk salah satu komponen bioaktif.

DAFTAR PUSTAKA

Adiyodi RG, 1992, *Reproductive Biology of Invertebrates, Sexual Differentiation and Behaviour*, John Wiley & Sons, New York.

Amir, I dan Budiyanto, 1996, *Mengenal Spons Laut (Demospongia) Secara Umum*, Oseana, 21 (2), 32-35.

Andayani, R., L. Yovita, & Maimunah, 2008, *Penentuan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total dan likopen pada buah Tomat (Solanum lycopersicum L.)* J. Sains dan Teknologi Farmasi, **13**(1) 31-37.

Astuti, P., 2003, *Spons Invertebrata Laut Berpotensi Sebagai Sumber Bahan Baku Obat Alam*, Oseana, **8** (26).

Daintith, J., 1994, *Kamus Lengkap Kimia*, Erlangga, Jakarta, 144.

De Voogd, N. J., Haftka, J. J. H., Hoeksema, B. W., 2005, *Evaluation Of The Ecological Of Amphitoxin In*

The Reef-Dwelling Sponge Callyspongia (Euplaccella) Biru (Haplosclerida) At South Sulawesi, Indonesia (Online), (<http://dpc.uba.uva.nl/ctz/vol74/nr01/art04>), diakses 3 Februari 2013 jam 16.45 WITA).

Erhardt, H., dan Moosleitner, H., 1995, *Meerwater Atlas Band 2*, Mergus, Jerman.

Fallu, 1991., *Abalone Farming*, Fishing News Book, Oshey Mead, Oxford Oxoeel, England.

Fukami, A., Ikeda, Y., Kondo, S., Naganawa, H., Takeuchi, T., Furuya, S., Hirabayashi, Y., Shimoike, K., Hosaka, S., 1997, *Akarterpin, A Novel Bioactive Tripenone From Marine Sponge Callyspongia Sp*, Zoology, **7** (38), 1201-1202.

Goutara, Ciptadi W, Djatmiko B, Wahab T. A., 1980, *Mempelajari Pembuatan Minyak Kelapa Dengan Cara Ekstraksi Basah Serta Pemakaian Antioksidan Pada Kelapa Santan*, Departemen Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Gordon, M. H., 1990, *The Mechanism Of Antioxidants Action In Vitro*, Elsevier Applied Science, London.

Gray, C. A., De Lira, S. P., Silva, M., Pimenta, E. F., Thienmann, O. H., Oliva, G., Hajdu, E., Andersen, J. A., Berlinck, R. G. S., 2006, *Sulfated Meroterpenoids from Brazilian Sponge Callyspongia Sp*, Org.Chem, **71** (23), 8685-8690.

Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1989, *Free Radical In Biology and Medicine*, New York, Oxford University Press.

Hamilton, R. J., 1983, *The chemistry of rancidity in food*, Applied Science Publisher, New York, 1-20

Hanani, E., Mun'im, A., dan Sekarini, R., 2005, *Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons Callyspongia sp. Dari Kepulauan Seribu*, Majalah Ilmu Kefarmasian, **3**(2), 127-133.

Harbane, J. B., 1987, *Metode Fitokimia, Insitut Teknologi Bandung*, Bandung.

Hooper, J. N. A., 2003, *Spongicide : Guide to Sponge Collection and Identification*, Queensland Museum, South Brisbane, Australia.

Ismet, Meutia, S., 2007, *Penapisan Senyawa Bioaktif Spons Aaptos Aaptos Dan Petrosia Sp. Dari Lokasi Yang Berbeda*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Kelly, M., 2001, *A Course Guide to the Sponge Taxonomy Workshop*, Departement Of Pharmacognocny Biological Field Station University Of Mississippi and NIWA, New Zealand.

Kennish, M. J., 1989, *Practical Handbook Of Marine Science*, CRC Press, Florida.

Ketaren, S., 2008, *Lemak dan Minyak Pangan*, UI Press, Jakarta.

Lehninger, AL., 1993. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*, Erlangga, Jakarta.

Molyneux, P., 2004, *The Use Of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Or Estimating*

- Antioksidan Activity*, Songklanakarin J Sci Technol **26**(2) 211-219.
- Munifah, I., Wikanta, T., dan Nursid, M., 2006, *Biota Laut Penghasil Senyawa Bioaktif Yang Potensial*, Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial-Ekonomi Kelautan dan Perikanan.
- Munro, M. H. G., Luibrand, R. T., and Blunt, J. W., 1989, The Search For Antiviral and Anticancer Compounds from Marine Organisms, in Scheuer PJ (ed), *Bioorganic Marine Chemistry*, **1**, 176-194.
- Musthafa, Z., Lawrence, GS., dan Seweang A., 2000, *Radikal Bebas Sebagai Predictor Aterosklerosis Pada Tikus Wistar Diabetes Mellitus*. Cermin Dunia Kedokteran (127) 30-31.
- Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R., 2006, *Determination Of Total Antioxidant Capacity By A New Spectrophotometric Method Based On Ce(IV) Reducing Capacity Measurement*, Talanta (24) 273- 282.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
- Rachmaniar, 2003, *Produk Alam Laut Sebagai Lead Compound Untuk Farmasi Dan Pertanian*, Dibawakan Pada Seminar Sehari Perfektif Baru Dalam Drug, Discovery, Makassar, 26 Oktober 2003.
- Rahman, R. Abd dan Ahmad Ridhay, 2004, *Penapisan Senyawa Antimikroba Dari Beberapa Jenis Bunga Karang (Porifera)*, Tesis tidak diterbitkan. Makassar, Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin.
- Rakesh, SU., Patil, PR., Salunkhe, VR., 2010, *Free Radical Scavenging Activity Of Hydroalcoholic Extracts Of Dried Flowers Of Nymphaea Stellata Willd*. International Journal of Pharma and Bio Sciences **1**(2),1-9.
- Ranney, MW., 1979, *Antioxidant Recent Development*, Noyes Data Co. Park Ridge, USA, 87-121.
- Rita, A., Tania, SU., Heri, H., Albana, AM., dan Rini, R., 2009, *Produksi Antioksidan Dari Daun Simpupur (Dillenia indica) Menggunakan Metode Ekstraksi Tekanan Tinggi Dengan Sirkulasi Pelarut*, Perhimpunan Teknik Kimia Indonesia, Bandung, 1-8.
- Romimohtarto, K., dan Juwana, S., 2007, *Biologi Laut, Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut*. Djambatan, Jakarta.
- Satari, RR, 2009, *Penelitian Produk Bahan Alam Laut Di Indonesia*, Arah dan prospek: Seminar Nasional Kimia Bahan Alam. Jakarta.
- Siagian, A. 2002., *Bahan Tambahan Makanan*, Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sudirman, S., 2011, *Aktivitas Antioksidan Dan Komponen Bioaktif Kangkung Air (Ipomoea Aquatica Forsk)*, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Suparno, 2005, *Kajian Bioaktif Spons Laut (porifera: Demospongiae) Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia Dalam Dibidang Farmasi*, Jurnal Perikanan Indonesia, **24**(21), 41-45.
- Suratmo, 2009, *Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper Crocatum) Sebagai Antioksidan*, (Online) (http://fisika.ub.ac.id/bssub/PDF%20FILES/BSS_205_1.pdf), diakses pada tanggal 12 Februari 2011 jam 17.00 WITA).
- Sorokin YI, 1993, *Coral Reef Ecology*, Berlin: Springer – Verlag, 173-182.
- Tapan, E., 2005, *Kanker, Antioksidan dan Terapi Komplementer*, Jakarta, PT Elex Media Komputindo.
- Trilaksani, W., 2003, *Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja Dan Peran Terhadap Kesehatan* Bogor, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Wang, SY., 2006, *Fruits with High Antioxidant Activity as Functional Foods*, Processing Technologies, Boca Raton: CRC Press, 371-413.
- Winarno, FG., 2008, *Kimia Pangan dan Gizi*, M-BRIO Press, Bogor.
- Winarno, FG., Fardiaz, S., dan Fardiaz, D., 1980, *Pengantar Teknologi Pangan*, PT Gramedia, Jakarta.
- Winarsi, H., 2007, *Antioksidan Alami & Radikal Bebas*, Kanisius, Yogyakarta.

