

POTENSI ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DIATOM *Amphora* sp.***Antioxidant Potential of the Methanol Diatom Extract of *Amphora* sp.*****Ach. Khumaidi^{1*}, Astik Umiyah², Abdul Muqsith¹, Abdul Wafi¹**¹Program Studi Budidaya Perikanan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ibrahimy²Program Studi Kebidanan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ibrahimy* Korespondensi email: ach.khumaidi@gmail.com**ABSTRACT**

Diatoms are a type of microalgae with a quite strong potential in the health sector as antioxidants, anticancer, and antivirals. But until now in Indonesia is still very rarely carried out research on the antioxidant potential of diatoms. The purpose of this study was to determine the antioxidant potential of *Amphora* sp. extracted with methanol. The method used in the extraction process is maceration, with a ratio of sample and methanol 1: 3 (300 g: 900 ml). The evaporation process compacted maserate resulting from maceration, then analyzed the total chlorophyll content, total flavonoids, and total phenols. *Amphora* sp. extraction results showed good potential with 7.08 ppm chlorophyll content, total flavonoids 6,299 ppm, and total phenol 7,085 ppm, and IC₅₀ DPPH values of 3332.5 ppm. The IC₅₀ value of the extract of *Amphora* sp. still classified as very weak antioxidant activity, but in general the extract of *Amphora* sp. has other bioactive potentials such as chlorophyll, flavonoids, and total phenol which can be used as material for further studies for the development of natural medicinal ingredients from *Amphora* sp.

Key words: *antioxidant, diatome, DPPH, macaration, methanol.*

ABSTRAK

Diatom merupakan salah satu jenis mikroalga dengan potensi yang cukup kuat di bidang kesehatan sebagai antioksidan, antikanker, dan antivirus. Namun hingga saat ini di Indonesia masih sangat jarang dilakukan penelitian tentang potensi antioksidan dari diatom. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antioksidan *Amphora* sp. diekstraksi dengan methanol. Metode yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah maserasi, dengan perbandingan sampel dan metanol 1: 3 (300 g: 900 ml). Proses penguapan memadatkan maserat hasil maserasi, kemudian dianalisis kandungan klorofil total, total flavonoid, dan total fenol. *Amphora* sp. hasil ekstraksi menunjukkan kandungan klorofil 7,08 ppm, total flavonoid 6,299 ppm, dan total fenol 7,085 ppm, serta nilai IC₅₀ DPPH sebesar 3332,5 ppm. Nilai IC₅₀ dari ekstrak *Amphora* sp. masih tergolong aktivitas antioksidan sangat lemah, namun secara umum ekstrak *Amphora* sp. memiliki potensi bioaktif lain seperti klorofil, flavonoid, dan total fenol yang dapat dijadikan sebagai bahan kajian selanjutnya untuk pengembangan bahan obat alami dari *Amphora* sp.

Kata Kunci: *antioksidan, diatom, DPPH, maserasi, metanol.*

PENDAHULUAN

Mikroalga termasuk salah satu organisme penghasil senyawa bioaktif yang sangat penting dengan berbagai macam peran, seperti antioksidan, antikanker, dan antivirus. Selain senyawa bioaktif, mikroalga juga menghasilkan protein, lipid, vitamin dan lemak esensial yang dapat digunakan sebagai sumber pangan fungsional, kesehatan dan untuk produksi bioenergi (Rajaram *et al.*, 2018; Smerilli *et al.*, 2019; Chtourou *et al.*, 2015). Aplikasi mikroalga selama ini telah banyak dimanfaatkan dalam dunia perikanan, seperti penggunaan sebagai pakan alami (Pratiwi *et al.*, 2007), imunostimulan (Ermantianingrum *et al.*, 2013; Yanuher dan Khumaidi, 2017), antivirus (Ahmadi *et al.*, 2015; Khumaidi, 2016), dan sebagai agen bioremediasi dalam lingkungan perairan tercemar (Ermantianingrum *et al.*, 2013). Salah satu jenis mikroalga potensial yang masih jarang dikaji dan teliti pemanfaatannya adalah diatom.

Diatom merupakan salah satu kelompok mikroalga yang memiliki lebih dari 100.000 spesies dan berada di hampir seluruh jenis lingkungan perairan, seperti perairan laut, danau, dan air tawar. Diatom

ditemukan memiliki berbagai manfaat, seperti bahan biofuel, pangan kesehatan, biomolekul, nanobioteknologi, dan bioremediator (Bozarth *et al.*, 2009).

Amphora sp., merupakan diatom yang keberadaanya sangat melimpah di perairan dan mudah untuk dibudidayakan. Namun, sampai saat ini pemanfaatan *Amphora* sp. di bidang perikanan masih terbatas pada penggunaan sebagai pakan alami pada budidaya Abalone (*Haliotis discus hannai*) dan Udang *Penaeus monodon* (Khatoon *et al.*, 2009). Penelitian ini mengkaji potensi *Amphora* sp. sebagai antioksidan dengan melakukan ekstraksi *Amphora* sp. dengan pelarut metanol. Pengkajian potensi antioksidan dilihat dari kandungan total klorofil, total flavonoid, total fenol, dan penghambatan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

METODE PENELITIAN

Persiapan Ekstrak *Amphora* sp.

Amphora sp. dalam bentuk tepung diperoleh dari BPBAP Situbondo. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 24 jam dengan pelarut methanol p.a (MERCK 1.06009.2500) dengan perbandingan 1:3 (300 g tepung

Amphora sp. : 900 ml metanol). Setelah 24 jam, kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 42. Filtrat dievaporasi menggunakan evaporator dengan tekanan rendah 100 mBar, suhu 40°C (Masitha *et al.*, 2019).

Uji Total Klorofil

Uji total kadar klorofil dilakukan dengan melarutkan sampel dengan perbandingan konsentrasi 1:300. Selanjutnya, pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 645 nm (A_{645}) dan 663 nm (A_{633}) dengan menggunakan spektrofotometer. Perhitungan konsentrasi dilakukan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$C \text{ (mg/L)} = 20,31 \cdot A_{645} + 8,05 \cdot A_{633}$$

Uji Total Fenol

Uji total Fenol dilakukan dengan metode Folin-ciocalteu Reagent. Sebanyak 0,5 ml ekstrak *Amphora* sp. (1:3 g/ml) dicampur dengan 5 ml Folin-ciocalteu (1:3) dalam aquades dan 4 ml larutan Na_2CO_3 1M kemudian didiamkan pada suhu ruang selama ± 15 menit. Blanko yang digunakan berupa 0,5 ml methanol, 5 ml Folin-

ciocalteu (1:3) dalam aquades dan 4 ml larutan Na_2CO_3 1M. Kemudian nilai absorbansi dihitung dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Prosedur yang sama digunakan untuk membuat kurva standar asam galat pada konsentrasi 0-250 $\mu\text{g/ml}$ dalam methanol 50%. Total phenol dihitung berdasarkan kurva standar dengan konsentrasi yang ekuivalen dengan kurva standar asam galat (ppm).

Uji Total Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan metode AlCl_3 . Sebanyak 0,5 ml ekstrak *Amphora* sp. (1:3 g/ml) dicampur dengan 1,5 ml AlCl_3 10%, 0,1 ml KCH_3COO 1M dan 2,8 ml aquades kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Blanko yang digunakan berupa 0,5 ml methanol dicampur dengan 1,5 ml AlCl_3 10%, 0,1 ml KCH_3COO 1M dan 2,8 ml aquades. Nilai absorbansi dihitung dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 415 nm. Kurva standar dibuat dengan menggunakan quercetin pada konsentrasi 12,5-100 $\mu\text{g/ml}$ dalam methanol. Total Flavonoid dihitung berdasarkan kurva

standar dengan konsentrasi yang ekuivalen dengan kurva standar quercetin (ppm).

Uji Antioksidan DPPH

Uji antioksidan dilakukan dengan metode Brand Williams. Sebanyak 1 ml DPPH 0,1 mM dalam methanol dicampur dengan 1 ml ekstrak sampel pada konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 µg/ml kemudian didiamkan selama 30 menit. Blanko yang digunakan berupa larutan methanol, sedangkan larutan kontrol menggunakan 1 ml DPPH 0,1 mM dicampur dengan 1 ml methanol. Larutan standar asam dibuat dengan menggunakan asam askorbat pada konsentrasi 1 – 100 µg/ml. Nilai absorbansi dihitung dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Tingkat inhibisi dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = a - \frac{b}{a} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan :

a : absorbansi kontrol

b : absorbansi sampel

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan kurva yang dibuat dari nilai absorbansi sampel

pada masing-masing konsentrasi dalam persamaan, $y = ax + b$, dimana y diganti dengan nilai 50 untuk mencari nilai x .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Ekstraksi dan Analisis antioksidan

Ekstrak kasar *Amphora* sp. diperoleh dengan melakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:3 (300 g *Amphora* sp. : 900 mL metanol p.a). Proses ekstraksi menghasilkan rendemen sebesar 8,3% yaitu 27,7 gr (Gambar 1). Hasil ekstraksi kemudian dilakukan analisis kandungan klorofil menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa ekstrak *Amphora* sp dengan pelarut metanol p.a mengandung Klorofil- α (4.086 ppm) dan Klorofil- β (2.999 ppm) dengan total Klorofil (7.085 ppm).



(a)

(b)

(c)

Gambar 1. Proses ekstraksi: a) bubuk *Amphora* sp., b) maserasi, c) hasil evaporasi

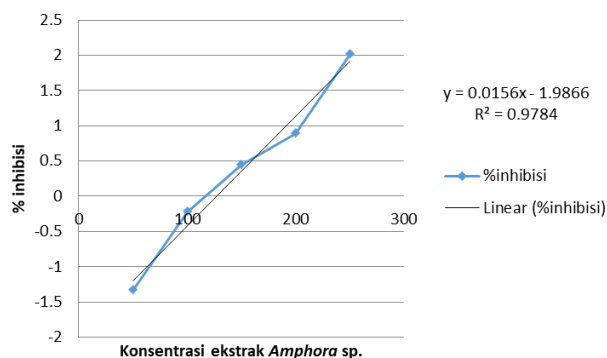
Tabel 1. Komposisi biokimia ekstrak metanol *Amphora* sp.

Komposisi Biokimia	ppm
Klorofil a	4.086
Klorofil b	2.999
Total Klorofil	7.085
Total Flavonoid	6.299
Total Fenol	8.017

Selain kandungan klorofil, potensi antioksidan ekstrak *Amphora* sp. dianalisis dengan pembersihan radikal bebas DPPH, dengan melihat nilai inhibisi 50 (IC50) menandakan konsentrasi ekstrak yang mampu membersihkan 50% radikal bebas. Nilai IC50 diperoleh 3332.5 ppm (Tabel 2) yang menunjukkan bahwa untuk menghilangkan 50% radikal bebas DPPH butuh konsentrasi sebesar 3332.5 ppm ekstrak *Amphora* sp..

Tabel 2. Aktivitas antioksidan ekstrak *Amphora* sp. dengan IC50.

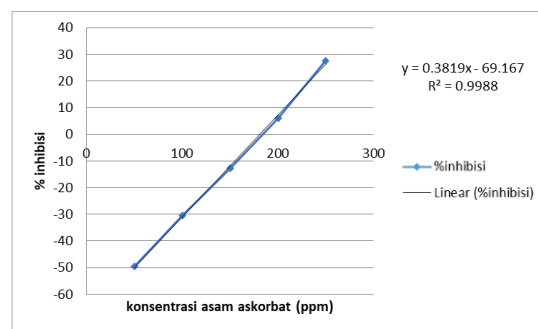
Konsentrasi ekstrak (ppm)	Absorbansi 517	%inhibisi	IC50 (ppm)
50	0.454	-1.33929	
100	0.449	-0.22321	
150	0.446	0.446429	3332.5
200	0.444	0.892857	
250	0.439	2.008929	



Gambar 2. Aktivitas antioksidan ekstrak *Amphora* sp.: % inhibisi radikal bebas DPPH.

Tabel 3. Aktivitas antioksidan kontrol (asam askorbat) dengan IC50

Konsentrasi asam askorbat (ppm)	Absorbansi 517	%inhibisi	IC50 (ppm)
50	0.808	-49.6296	
100	0.705	-30.5556	
150	0.609	-12.7778	312.03
200	0.508	5.925926	
250	0.391	27.59259	



Gambar 3. Aktivitas antioksidan asam askorbat: % inhibisi radikal bebas DPPH.

Tabel 3 memperlihatkan bahwa nilai IC₅₀ asam askorbat yaitu sebesar 312.03 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa penghambatan 50% radikal bebas akan tercapai dengan konsentrasi asam askorbat sebesar 312.03 ppm.

Pembahasan

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi memberikan dampak terhadap hasil yang diperoleh. Menurut Miazek *et al.*, (2017) selain faktor konsentrasi pelarut, jenis pelarut juga mempengaruhi hasil ekstraksi. Metanol merupakan salah satu pelarut organik polar yang efektif untuk mendapatkan senyawa bioaktif (Thouri *et al.*, 2017).

Hasil ekstraksi *Amphora* sp. dengan pelarut metanol p.a menunjukkan kandungan total klorofil yang cukup tinggi yaitu 7.08 ppm, lebih tinggi dari kandungan klorofil ekstrak mikroalga *Nannochloropsis oculata* (2.230 ppm) (Novalisa, 2015). Menurut Hsu *et al.*, (2013) klorofil merupakan senyawa antioksidan penting dari makanan. Senyawa klorofil juga dapat berperan sebagai antikanker (Block *et al.*, 1992).

Selain klorofil, senyawa flavonoid dan fenol juga memiliki fungsi dan manfaat yang sangat penting bagi kesehatan. Menurut (Dai dan Mumper, 2010) flavonoid termasuk senyawa fenolik terbesar yang memiliki aktifitas kimia dan biologis dapat berperan sebagai antioksidan serta penghambatan radikal bebas. Ekstrak etanol *Amphora* sp. memiliki kandungan total flavonoid dan total fenol yang cukup baik yaitu 6.299 ppm (flavonoid) dan 8.017 ppm (fenol).

Potensi antioksidan ekstrak metanol *Amphora* sp. diuji dengan melihat potensi inhibisi ekstrak terhadap radikal bebas DPPH. Hasil yang diperoleh menunjukkan nilai inhibisi ekstrak *Amphora* sp. sangat lemah dan kurang potensial untuk dijadikan sebagai senyawa antioksidan dengan nilai IC₅₀ 3332.5 ppm. Sedangkan senyawa yang dikatakan kuat sebagai antioksidan jika memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, antara 50-100 ppm (kuat), antara 100-150 ppm (sedang) dan 150-200 (lemah), dan sangat lemah jika nilai IC₅₀ lebih dari 200 ppm (Molyneux, 2004).

Nilai IC₅₀ pada penelitian ini juga memperlihatkan bahwa nilai aktivitas antioksidan lebih rendah dari control (asam

askorbat) yaitu 312.03 ppm. Serta lebih rendah dari jenis mikrolga lain yaitu *Chlorella* sp. yang diekstrak etanol yaitu 1236 ppm (Novalisa, 2015). Hasil penelitian ini juga memberikan hasil yang berbeda antara profil total klorofil, total flavonoid dan total fenol yang terlihat memiliki potensi sebagai antioksidan yang cukup baik, namun aktivitas antioksidan penghambatan radikal bebas DPPH sangat lemah. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi rendahnya nilai IC₅₀ dari hasil ekstraksi, seperti jenis mikroalga, metode kultur, media, proses ekstraksi, penyimpanan dan preparasi uji antioksidan DPPH (Zhang *et al.*, 2018). Namun hasil penelitian ini setidaknya memberikan gambaran kandungan senyawa antioksidan seperti total klorofil, total flavonoid, dan total fenol yang dapat dijadikan referensi untuk penelitian dan pengembangan lebih lanjut.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol *Amphora* sp. memiliki kandungan total klorofil, total fenol, dan flavonoid, serta memiliki nilai IC₅₀ 3332.5 ppm yang berpotensi sebagai antioksidan pada kategori sangat rendah.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Kemenristekdikti melalui Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) yang telah mendanai penelitian ini dengan nomor kontrak 113/SP2H/PPM/DRPM/2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, A., Zorofchian Moghadamtousi, S., Abubakar, S., and Zandi, K. 2015. Antiviral Potential of Algae Polysaccharides Isolated from Marine Sources: A Review. *BioMed Research International*, 2015:1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/825203>
- Block, G., Patterson, B., and Subar, A. 1992. Fruit Vegetables, and Cancer Prevention: A Review of the Epidemiological Evidence. *Nutrition and Cancer*. 18(1): 1-29. doi:10.1080/01635589209514201
- Bozarth, A., Maier, U., and Zauner, S. 2009. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82:195–201. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1804-8>
- Chtourou, H., Dahmen, I., and Jebali, A. 2015. Characterization of *Amphora* sp., a newly isolated diatom wild strain, potentially usable for biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1379-6>

- Dai, J., and Mumper, R.J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15:7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Ermantianingrum, A., Sari, R., dan Prayitno, S. B. 2013. Potensi *Chlorella* sp. sebagai Imunostimulan untuk Pencegahan Penyakit Bercak Putih (White Spot Syndrome Virus) pada Udang Windu (*Penaeus monodon*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 1(1):206–221.
- Hsu, C., Chao, P., Hu, S., and Yang, C. 2013. The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins. *Food and Nutrition Sciences*. August:1–8.
- Khatoun, H., Banerjee, S., Yusoff, F. M., and Shariff, M. 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic Amphora, Navicula and Cymbella grown on substrate as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. *Aquaculture Nutrition*. 15(2):186–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00582.x>
- Khumaidi, A. 2016. Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata* Sebagai Alternatif Antivirus Viral Nervous Necrotic (VNN) pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 7(1):45–50. Retrieved from <http://www.samakia.aperiki.ac.id/index.php/JSAPI/article/view/11>
- Masitha, A., Yanuhar, U., Maizar, A., Hertika, S., Sciences, M., and Sciences, M. 2019. In-vivo test of *Chlorella vulgaris* extract as heat shock protein induction of Cantang Grouper (*Ephinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) infected by viral nervous necrosis. *Journal of Fisheries and Marine Research*. 3(1):22-31
- Miazek, K., Kratky, L., Sulc, R., Jirout, T., Aguedo, M., Richel, A., and Goffin, D. 2017. Effect of Organic Solvents on Microalgae Growth, Metabolism and Industrial Bioproduct Extraction: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(1429). <https://doi.org/10.3390/ijms18071429>
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, 26(2), 211-219.
- Novalisa, D. 2015. *Pemanfaatan Klorofil Mikroalga Laut Nannochloropsis Oculata Secara In Vivo Pada Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis)*. Skripsi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Pratiwi, N. T. M., Adiwilaga, E. M., Widigdo, B., dan Soedharma, D. 2007. Produktivitas Diatom Perifitik yang Ditumbuhkan pada tipe Substrat Berbeda Sebagai Alternatif Penyediaan Pakan Alami Udang. *Jurnal Biologi Indonesia*, 4(3):177–191.
- Rajaram, M. G., Nagaraj, S., Manjunath, M., Boopathy, A. B., Kurinjimalar, C., Rengasamy, R., and Li, J. Y. 2018. Biofuel and biochemical analysis of *amphora coffeaeformis* RR03, a novel marine diatom, cultivated in an open

- raceway pond. *Energies*. 11(6):1–12. <https://doi.org/10.3390/en11061341>
- Smerilli, A., Balzano, S., Maselli, M., Blasio, M., Orefice, I., Galasso, C., and Brunet, C. 2019. Antioxidant and Photoprotection Networking in the Coastal Diatom *Skeletonema marinoi*. *Antioxidants*, 8(6), 154. <https://doi.org/10.3390/antiox8060154>
- Thouri, A., Chahdoura, H., Arem, A. El, Hichri, A. O., Hassin, R. Ben, and Achour, L. 2017. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17(248):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1751-y>
- Yanuhar, U., and Khumaidi, A. 2017. The application of pigment-protein fraction from *Nannochloropsis oculata* on β -actin response of *Cromileptes altivelis* infected with viral nervous necrosis. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 16(1):22–32. <https://doi.org/10.19027/jai.16.1.22-32>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., and Ye, W. C. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*. 13(1):1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>