

**PENGARUH LAMA WAKTU DAN SUHU PEMBEKUAN LAMBAT
TERHADAP RENDEMEN DAN MUTU ANTIOKSIDAN
ALGA COKLAT (*Sargassum filipendula*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :
**HERLINA RIVAI
NIM. 0910830033**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

**PENGARUH LAMA WAKTU DAN SUHU PEMBEKUAN LAMBAT
TERHADAP RENDEMEN DAN MUTU ANTIOKSIDAN
ALGA COKLAT (*Sargassum filipendula*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

**Oleh :
HERLINA RIVAI
NIM. 0910830033**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2013

SKRIPSI
PENGARUH LAMA WAKTU DAN SUHU PEMBEKUAN LAMBAT TERHADAP
RENDEMEN DAN MUTU ANTIOKSIDAN
ALGA COKLAT (*Sargassum filipendula*)

Oleh :
HERLINA RIVAI
NIM. 0910830033

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 26 Juli 2013
dan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. : _____
Tanggal : _____

Menyetujui
Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Hardoko, MS)
NIP. 19620108 198802 1 001

Dosen Penguji II

(Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes)
NIP. 19611022 19 8802 2 001

Menyetujui
Dosen Pembimbing I

(Ir. Bambang Budi S., MS)
NIP. 19570119 198601 1 001

Dosen Pembimbing II

(Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP)
NIP. 19581231 198601 2 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah tertulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 27 April 2013
Mahasiswa,

Herlina Rivai
0910830033

RINGKASAN

HERLINA RIVAI. 0910830033. Pengaruh Lama Waktu dan Suhu Pembekuan Lambat Terhadap Rendemen dan Mutu Antioksidan Alga Coklat (*Sargassum filipendula*). Dibawah bimbingan **Ir. Bambang Budi Sasmito, MS** dan **Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP.**

Alga Coklat (*Sargassum filipendula*) merupakan salah satu jenis rumput laut yang sangat berlimpah di Indonesia. Tumbuhan laut ini memiliki manfaat sebagai zat antioksidan alami. Telah banyak diketahui zat antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas yang dapat menimbulkan berbagai penyakit di dalam tubuh.

Banyak penelitian yang menunjukkan antioksidan dapat diperoleh dari ekstrak rumput laut. Dari penelitian terdahulu tersebut mendorong dilakukannya penelitian untuk mengembangkan cara untuk memperoleh rendemen ekstrak rumput laut dan aktivitas antioksidan yang lebih besar, yaitu dengan cara pembekuan lambat.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan variabel bebasnya adalah lama waktu dan suhu pembekuan lambat sedangkan variabel terikatnya yaitu rendemen dan mutu antioksidan dari alga coklat (*Sargassum filipendula*). Untuk mengetahui rendemen dan mutu antioksidan alga coklat (*Sargassum filipendula*) parameter uji yang dilakukan adalah uji kadar air, fitokimia, *total polyphenol content* (TPC) dan uji aktivitas antioksidan (IC₅₀) yang dianalisis dengan *response surface methodology* (RSM) dengan bantuan *software Design Expert* ®8. Desain percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah *central composite design* (CCD) yang bertujuan untuk memperoleh hasil optimasi pada masing-masing respon yaitu rendemen, *total polyphenol content* (TPC) dan aktivitas antioksidan (IC₅₀).

Pada uji fitokimia rumput laut segar *Sargassum filipendula* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan steroid. Pada uji kadar air rumput laut yang digunakan ini memiliki kadar air sebesar 91,97% dan ekstrak kasar yang telah dibekukan lambat memiliki kadar air berkisar antara 94,50-98,72% sehingga rata-ratanya sebesar 97,48%.

Pada respon rendemen dengan desain model kuadratik diperoleh hasil optimal sebesar 8,73% (bk) yang dicapai pada titik suhu pembekuan lambat 23,34 °C selama 4,07 jam. *Total polyphenol content* (TPC) dengan desain model *mean* (rata-rata) sebesar 128,411 mg GAE/g ekstrak dengan kisaran 73,500-407,750 mg GAE/g ekstrak. Dalam menentukan mutu antioksidan ini digunakan metode uji DPPH dengan desain model yang digunakan yaitu *mean* dengan hasil IC₅₀ berkisar antara 55,573-144,070 ppm dengan rata-ratanya sebesar 120,313 ppm. Dari hasil uji antioksidan tersebut maka mutu antioksidan *Sargassum filipendula* yang diberi perlakuan pembekuan lambat termasuk antioksidan sedang karena memiliki rata-rata IC₅₀ sebesar 120,313 ppm. Jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol yang hanya memiliki IC₅₀ sebesar 167,965 ppm yang termasuk antioksidan lemah maka perlakuan pembekuan lambat disimpulkan dapat mengekstrak senyawa antioksidan pada *Sargassum filipendula* lebih besar sehingga menghasilkan mutu antioksidan yang lebih baik.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena atas karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini dengan baik. Skripsi dengan judul Pengaruh Lama Waktu dan Suhu Pembekuan Lambat terhadap Rendemen dan Mutu Antioksidan Alga Coklat (*Sargassum filipendula*) disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

Atas terselesaikan laporan skripsi ini penulis menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS dan Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP selaku Dosen Pembimbing, atas segala bimbingan, pengarahan dan masukan yang telah diberikan kepada penulis sejak penyusunan usulan Skripsi sampai dengan selesainya penyusunan laporan Skripsi.
2. Dr. Ir. Hardoko, MS dan Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes selaku dosen penguji yang telah memberikan pengarahan untuk perbaikan laporan Skripsi.
3. Keluarga Terutama Papa, Mama, Kakak dan Adik yang telah memberikan motivasi dan dukungannya kepada penulis.
4. Teman-teman seperjuangan THP 09 dan kakak-kakak tingkat yang sangat banyak memberikan masukan dan informasi yang sangat membantu penulis.
5. Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan skripsi ini, saya mengucapkan banyak terimakasih.

Penulis menyadari penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak sangat kami harapkan. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, 24 Juni 2013

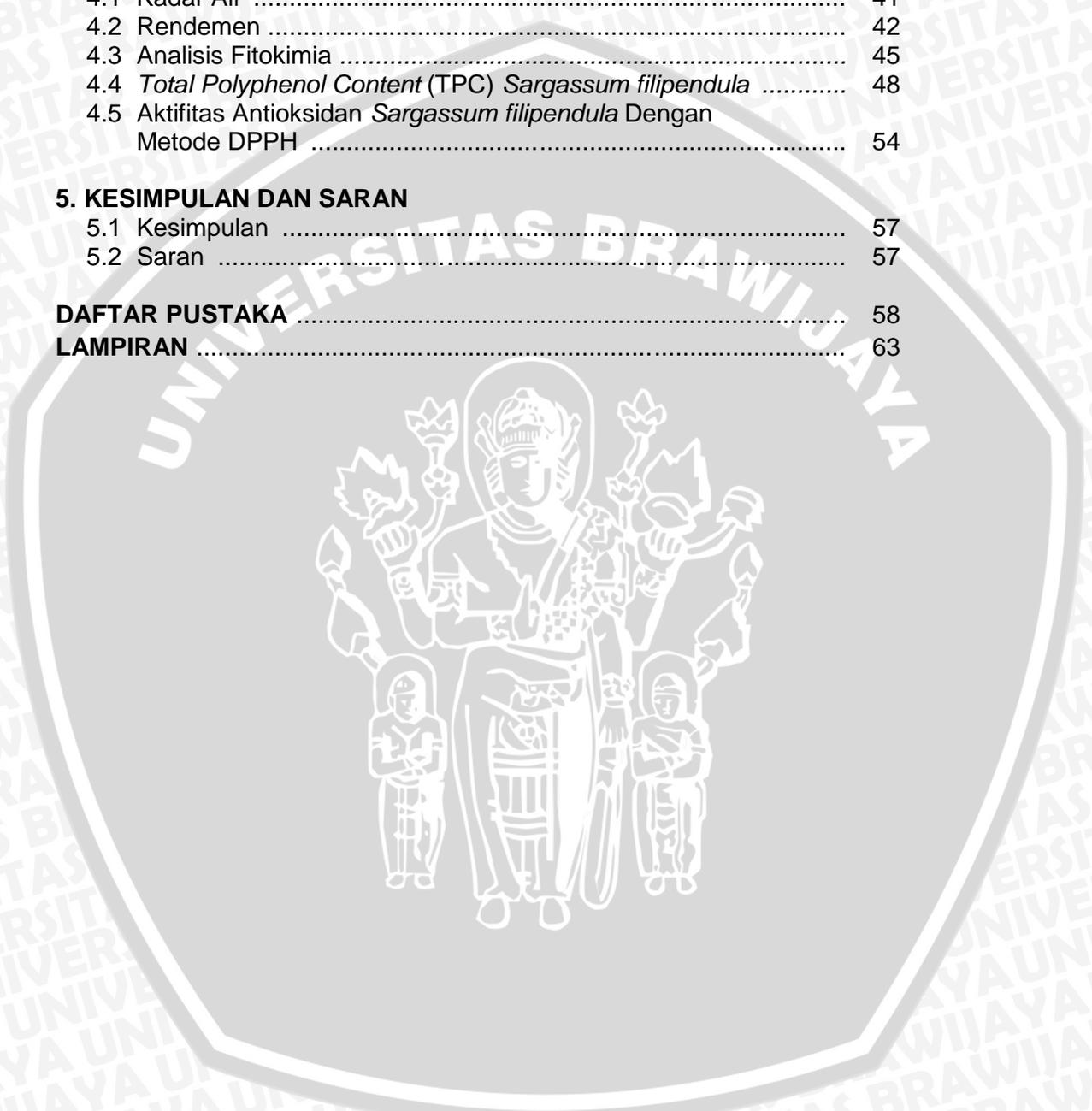
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Kegunaan Penelitian	4
1.6 Tempat dan Waktu	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Coklat (<i>Sargassum filipendula</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi <i>Sargassum filipendula</i>	7
2.2 Radikal Bebas	9
2.3 Antioksidan	10
2.3.1 Sumber Antioksidan	10
2.3.2 Fungsi Antioksidan	11
2.3.3 Mekanisme Kerja Antioksidan	12
2.4 Pembekuan Lambat	14
2.5 Ekstraksi	16
2.6 Pelarut	18
2.7 Uji Aktivitas Antioksidan	20
2.8 Analisis Fitokimia	21
2.8.1 Alkaloid	22
2.8.2 Flavonoid	23
2.8.3 Tanin	24
2.8.4 Saponin	24
2.8.5 Triterpenoid dan Steroid	25
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Alat dan Bahan Penelitian	27
3.2 Metode Penelitian	28
3.2.1 Variabel Penelitian	29
3.2.2 Parameter Uji Coba	29
3.3 Prosedur Penelitian	30
3.3.1 Preparasi <i>Sargassum filipendula</i>	30
3.3.2 Pembekuan Sampel	30
3.3.3 Ekstraksi Kasar (<i>Crude Extract</i>)	32
3.3.4 Analisis Kadar Air	34
3.3.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan	34
3.3.6 Uji <i>Total Polyphenol Content</i> (TPC)	35

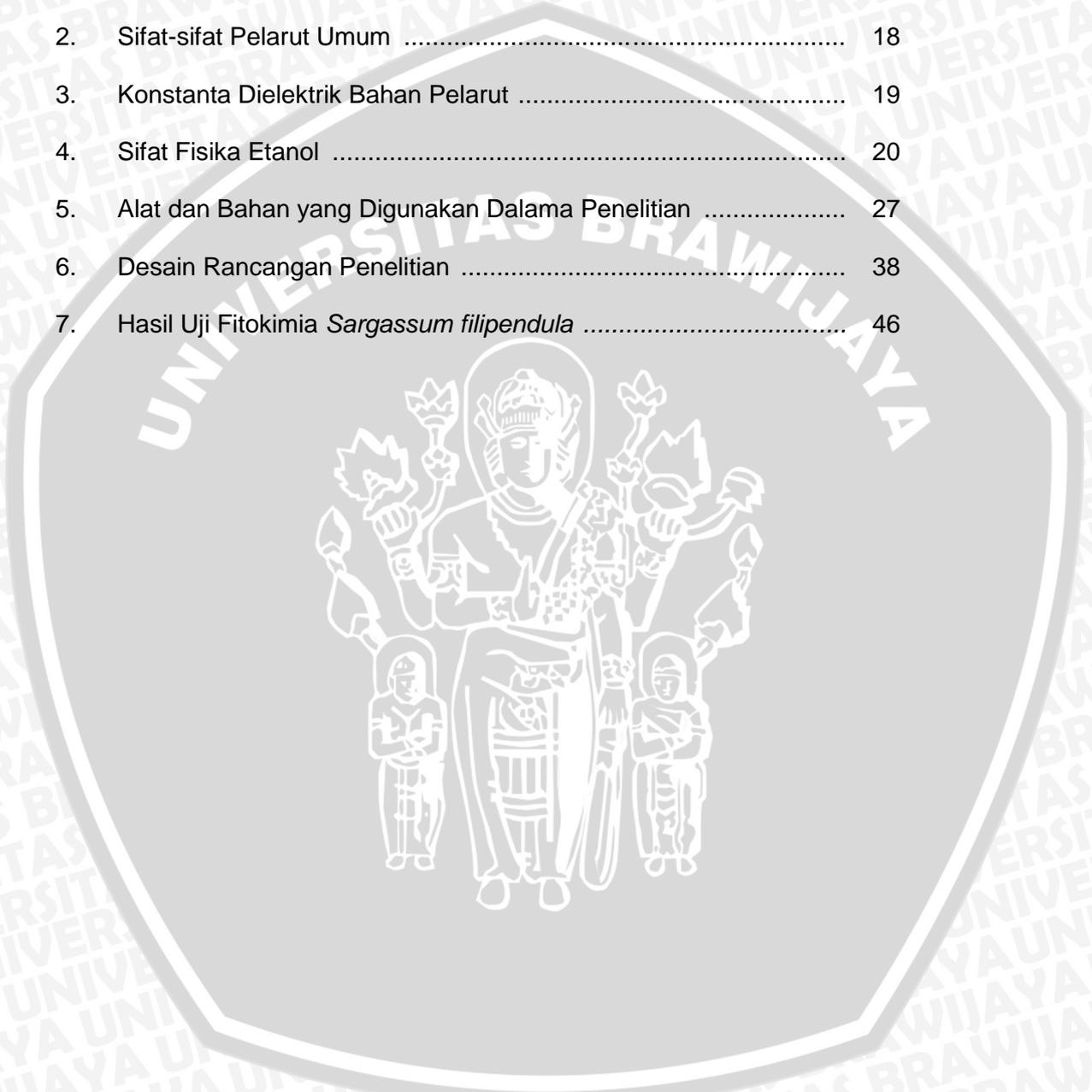


3.3.7 Uji Fitokimia	35
3.4 Rancangan Percobaan	37
3.5 Permodelan	38
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kadar Air	41
4.2 Rendemen	42
4.3 Analisis Fitokimia	45
4.4 <i>Total Polyphenol Content (TPC) Sargassum filipendula</i>	48
4.5 Aktifitas Antioksidan <i>Sargassum filipendula</i> Dengan Metode DPPH	54
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	57
5.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	63



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Kimia <i>Sargassum sp</i>	7
2. Sifat-sifat Pelarut Umum	18
3. Konstanta Dielektrik Bahan Pelarut	19
4. Sifat Fisika Etanol	20
5. Alat dan Bahan yang Digunakan Dalam Penelitian	27
6. Desain Rancangan Penelitian	38
7. Hasil Uji Fitokimia <i>Sargassum filipendula</i>	46



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Alga Coklat (<i>Sargassum filipendula</i>)	7
2. Fisiologi, Morfologi dan Daur Hidup Alga Coklat	8
3. Reaksi Umum Oksidasi Asam Lemak	13
4. Pengaruh Pembekuan pada Jaringan Tumbuhan	15
5. Mekanisme Reaksi DPPH dengan Antioksidan	21
6. Struktur Alkaloid	22
7. Struktur Dasar Flavonoid	23
8. Struktur Umum Saponin	25
9. Struktur Steroid	25
10. Skema Kerja Pembuatan Preparat Mikroskopis <i>Sargassum filipendula</i>	31
11. Skema Kerja Proses Ekstraksi Kasar <i>Sargassum filipendula</i>	33
12. Kontur Permukaan Respon Hubungan Waktu dan Suhu Pembekuan Terhadap Rendemen	43
13. Kurva Permukaan Respon Hubungan Waktu dan Suhu Pembekuan Terhadap Rendemen	44
14. Grafik Interaksi Pengaruh Waktu dan Suhu Pembekuan Terhadap Respon <i>Total Polyphenol Content</i> (TPC)	49
15. Perbedaan Sel Daun Rumput Laut <i>Sargassum filipendula</i> Segar dan Diberi Perlakuan Pembekuan Lambat Dengan Perbesaran 200 μm	52
16. Perbedaan Sel Daun Rumput Laut <i>Sargassum filipendula</i> Segar dan Diberi Perlakuan Pembekuan Lambat Dengan Perbesaran 200 μm	53
17. Grafik Interaksi Pengaruh Waktu dan Suhu Pembekuan Terhadap Respon DPPH / IC_{50}	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Hasil Pengamatan	63
2. <i>Design Summary</i> Hasil Rancangan Penelitian	64
3. <i>Analysis of Variance</i> (ANOVA) Respon Rendemen	65
4. <i>Normal Plot of Residuals</i>	66
5. <i>Models Fit Summary</i>	67
6. Persamaan Regresi Standar Asam Galat	68
7. <i>Analysis of Variance</i> (ANOVA) Respon <i>Total Polyphenol Content</i> (TPC)	69
8. <i>Analysis of Variance</i> (ANOVA) Respon DPPH / IC ₅₀	70
9. Gambar Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar (<i>Crude Extract</i>) Rumput Laut Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	71
10. Gambar Proses Pembekuan Rumput Laut <i>Sargassum filipendula</i>	72
11. Gambar Proses Ekstraksi Rumput Laut <i>Sargassum filipendula</i>	73
12. Gambar Proses Pembekuan Lambat Rumput Laut <i>Sargassum filipendula</i>	74

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan yang terdiri dari 17.508 pulau dengan panjang pantai sekitar 81.000 km dan luas laut mencapai 5,8 juta km² pantai ini merupakan wilayah yang sangat intensif dimanfaatkan untuk kegiatan manusia, seperti sebagai kawasan pusat pemerintahan, pemukiman, industri, pelabuhan, pertambangan, pertanian dan perikanan, pariwisata dan sebagainya (Triadmodjo, 1999; Yudha, 2004). Laut Indonesia juga dikenal mempunyai keanekaragaman hayati yang tinggi (*marine megadiversity*), dengan keanekaragaman makroalga lebih dari 700 jenis (Siswanto, 2008).

Diantara banyak keistimewaan dari alga yang membedakannya yaitu dari pigmennya. Meskipun hampir semua mengandung klorofil dan bersifat autotrof. Selama beberapa tahun ini alga diklasifikasikan berdasarkan pigmennya yang dipisahkan dalam empat kelompok yaitu, biru kehijauan, hijau, coklat dan merah (Wilson dan Loomis, 1952).

Dewasa ini telah banyak diketahui rumput laut mengandung senyawa bioaktif yang dapat menetralkan radikal bebas yaitu senyawa antioksidan. Banyak penelitian yang telah membuktikan hal tersebut, yang dapat menjadikan rumput laut sebagai sumber antioksidan alami yang dapat diperoleh dengan mudah. Menurut Muawwanah, *et al.* (1997), salah satu hasil metabolit sekunder dari alga laut adalah sebagai senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan salah satu bahan aditif yang dapat melindungi bahan pangan dari kerusakan oksidasi penyebab ketengikan. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi atas antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami dianggap lebih aman daripada antioksidan sintetik. Menurut Vijayabaskar dan Shiyamala (2012), sejauh ini antioksidan sintetik *butylatedhydroxytoluena* (BHT),

repository.ub.ac.id

butylatedhydroxyanysole (BHA), *propyl gallate* (PG) dan *butylatedhydroquinon* (BHQ) telah digunakan sebagai bahan tambahan makanan yang memiliki efek samping seperti kerusakan hati dan diduga dapat menjadikan mutagen dan meracuni saraf. Muawwanah, *et al.* (1997), telah membuktikan adanya senyawa bioaktif pada alga laut (*Sargassum filipendula*) yang berfungsi sebagai antioksidan.

Di dalam tubuh kita terdapat senyawa yang disebut antioksidan yaitu senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas, seperti: enzim SOD (Superoksida Dismutase), glutathione, dan katalase. Antioksidan juga dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan betakaroten serta senyawa fenolik. Bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, seperti rempah-rempah, coklat, biji-bijian, buah-buahan, sayur-sayuran seperti buah tomat, pepaya, jeruk dan sebagainya (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya (Sudirman, 2011). Swantara dan Parwata (2011), oksidan atau radikal bebas ini akan menjadi racun bagi tubuh yang selanjutnya merusak fungsi sel tubuh dan dapat mengakibatkan penyakit degeneratif. Secara alami, tubuh mempunyai benteng yang dapat mencegah serangan radikal bebas yang disebut anti radikal bebas (antioksidan). Kegunaan utama antioksidan adalah untuk menghentikan atau memutus reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat dalam tubuh.

Oleh karena banyaknya penyakit berbahaya yang dapat ditimbulkan oleh radikal bebas tersebut maka banyak pula yang mencari solusi untuk menetralkan

radikal tersebut tanpa menimbulkan penyakit baru, yaitu antioksidan alami. Banyak penelitian yang menunjukkan antioksidan dapat diperoleh dari ekstrak rumput laut. Dari penelitian terdahulu tersebut, penelitian yang akan dilakukan akan mengembangkan cara untuk memperoleh ekstrak rumput laut yang lebih besar dan aktivitas antioksidan yang lebih besar, yaitu dengan cara pembekuan lambat.

Laju pembekuan merupakan salah satu faktor kritis yang menentukan mutu produk beku yang dihasilkan. Proses pembekuan lambat akan menghasilkan kristal-kristal es dengan jumlah yang lebih sedikit tetapi dengan ukuran yang lebih besar berpeluang untuk menusuk dan merusak sel-sel jaringan pangan, sehingga menyebabkan sel kehilangan air dan keteguhan tekstur (Food Review Indonesia, 2007). Kerusakan sel tersebut yang digunakan untuk mengeluarkan senyawa bioaktif yang termasuk dalam antioksidan dari dalam sel rumput laut, sehingga rendemen yang dihasilkan lebih besar dan mutu antioksidan akan lebih baik. Dari hal tersebut, jika dilakukan pembekuan lambat dengan waktu yang lebih lama, maka dapat mengekstrak bioaktif yang terdapat dalam bahan lebih banyak sehingga rendemen akan lebih besar dengan menggunakan suhu penyimpanan yang baik untuk sayuran atau tumbuhan menurut Desrosier dan Tressler (1977), yaitu suhu -18°C . Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh lama dan suhu pembekuan lambat terhadap rendemen dan mutu antioksidan pada *Sargassum filipendula*.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas diperoleh permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana proses pembekuan lambat dapat mempengaruhi rendemen dan mutu antioksidan pada rumput laut *Sargassum filipendula*?

2. Bagaimana lama waktu dan suhu pembekuan lambat yang berbeda dapat mempengaruhi rendemen dan mutu antioksidan pada rumput laut *Sargassum filipendula*?

1.3 Tujuan Penelitian

Secara umum tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama waktu dan suhu pembekuan lambat yang berbeda dapat mempengaruhi rendemen dan mutu antioksidan pada rumput laut *Sargassum filipendula*. Sedangkan tujuan penelitian ini secara khusus yaitu untuk menentukan waktu dan suhu pembekuan lambat terbaik dalam menghasilkan rendemen dan mutu antioksidan alga coklat (*Sargassum filipendula*).

1.4 Hipotesis

Perlakuan lama waktu dan suhu yang diberikan saat pembekuan lambat pada alga coklat *Sargassum filipendula* dapat berpengaruh terhadap rendemen dan mutu antioksidannya.

1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga, serta institusi lain mengenai manfaat senyawa antioksidan pada *Sargassum filipendula* sehingga masyarakat dapat memanfaatkan *Sargassum filipendula* ini sebagai alternatif antioksidan alami yang potensial. Selain itu penelitian ini juga dapat memberikan informasi tentang pengaruh lama waktu dan suhu pembekuan lambat terhadap antioksidan pada *Sargassum filipendula*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Biologi Dasar, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2012 - Januari 2013.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat (*Sargassum filipendula*)

Alga merupakan kelompok tumbuhan berklorofil yang jaringannya tidak dapat dibedakan dari akar sejati, batang, atau daunnya. Tubuh tumbuhan alga coklat berupa talus. Istilah ini digunakan pada tumbuhan uniseluler. Alga diklasifikasikan bersama bakteri dan jamur, pada subkingdom yang tidak berkaitan dengan sistem pembuluh darah tumbuhan seperti *Thallopytes* (Wilson dan Loomis, 1952). Alga adalah organisme berklorofil, alat reproduksi pada umumnya berupa sel tunggal, meskipun ada juga alga yang alat reproduksinya tersusun dari banyak sel (Sulisetijono, 2009).

Phaeophyta disebut juga alga coklat, warna ini disebabkan xantofil yang dihasilkan melebihi karoten dan klorofil. Alga ini mempunyai pigmen fotosintetik yang terdiri atas klorofil a dan c, karoten, fukoxantin dan xantofil. Dinding sel tersusun dari selulosa, asam alginat dan mukopolisakarida sulfat. Alga ini mempunyai dua flagella yang tidak sama panjang dengan letak lateral. Anggota kelompok ini terdiri dari 200 genera dan 1500 spesies. Alga coklat ini dapat tumbuh dengan sangat cepat, misalnya *Nereocystis* sp. Dapat mencapai panjang 40 meter dalam satu musim. Kebanyakan cara perkembangbiakan alga coklat sama dengan alga hijau *Ulva* (Wasetiawan, 2010).

Komponen utama dari alga adalah karbohidrat sedangkan komponen lainnya yaitu protein, lemak, abu (sodium dan potassium) dan air 80-90 % (Manurung, 2011). Komposisi kimia *Sargassum* sp dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia *Sargassum* sp

Komposisi Kimia	Kadar (%)
Karbohidrat	19.06
Protein	5.53
Lemak	0.74
Air	11.71
Abu	34.57
Serat Kasar	28.39

Sumber: Yunizal (2004)

2.1.1 Klasifikasi *Sargassum filipendula*

Klasifikasi alga coklat *Sargassum filipendula* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Chromista
Subkingdom	: Harosa
Filum	: Ochrophyta
Subfilum	: Phaeista
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Famili	: Sargassaceae
Genus	: <i>Sargassum</i>
Spesies	: <i>Sargassum filipendula</i> C. Agardh

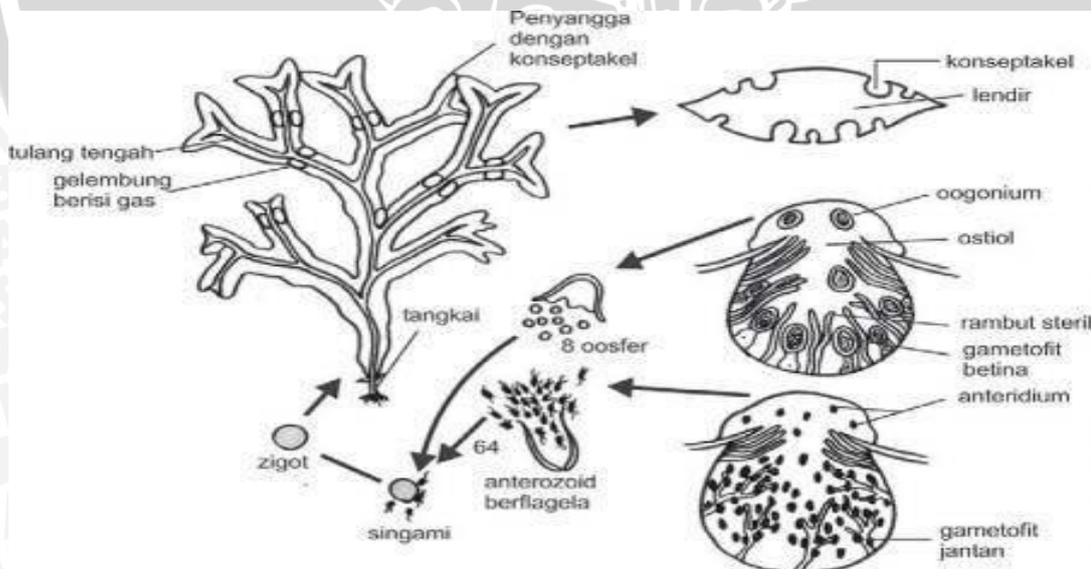
(Anonymous^a, 2012)



Gambar 1. Alga Coklat (*Sargassum filipendula*)

Kelompok alga coklat memiliki bentuk yang bervariasi dan sebagian besar jenis-jenisnya berwarna coklat atau pirang. Alga coklat biasanya dicirikan oleh 3

sifat, yaitu (1) adanya pigmen coklat, yaitu fukosantin yang menutupi warna hijau dari pigmen klorofil a dan c, (2) hasil fotosintesis terhimpun dalam bentuk laminaran dan (3) adanya flagel. *Sargassum* memiliki bentuk talus silindris atau gepeng, banyak percabangan yang menyerupai pepohonan darat, bentuk daun melebar, lonjong atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter) dan warna thalus umumnya coklat (Aryanti, 2011). Gelembung udara (*bladder*) terdapat pada bagian tubuh berbentuk seperti buah yang berwarna coklat juga. Bagian ini berguna sebagai cadangan udara untuk respirasi, jadi merupakan alat pengapung sehingga talusnya dapat terapung di perairan (Anonymous^b, 2012).. Batang utama bulat agak kasar, dan *holdfast* (bagian yang digunakan untuk melekat) berbentuk cakram., pinggir daun bergerigi jarang, berombak, dan ujung melengkung atau meruncing (Manurung, 2011). Gambar fisiologi, morfologi dan daur hidup alga coklat dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Fisiologi, Morfologi dan Daur Hidup Alga Coklat

Sumber: Anonymous^b (2012)

Sargassum biasanya dicirikan oleh tiga sifat yaitu adanya pigmen coklat yang menutupi warna hijau, hasil fotosintesis terhimpun dalam bentuk laminaran dan alginate serta adanya flagel. Pada umumnya *Sargassum* tumbuh di daerah terumbu karang (*coral reef*), terutama di daerah rataan pasir (*sand flat*). Daerah ini kering pada saat surut rendah, mempunyai dasar berpasir dan terdapat pula pada karang hidup atau mati. Pada batu-batu ini tumbuh dan melekat rumput laut coklat (Manurung, 2011).

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan di kulit terluarnya (Apriandi, 2011). Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada disekitarnya. Senyawa yang mudah teroksidasi secara umum adalah senyawa yang berikatan kovalen. Ikatan kovalen akan sangat berbahaya karena ikatan yang digunakan secara bersama-sama pada orbital terluarnya. Senyawa yang memiliki ikatan kovalen umumnya merupakan molekul-molekul besar (biomakromolekul), yaitu lipid, protein maupun DNA (Sudirman, 2011).

Setiap molekul yang berkontak langsung dengan radikal bebas mengalami penarikan elektron dan membentuk radikal bebas yang baru dalam reaksi berantai oksidatif sitotoksik. Oksigen reaktif yang sangat berpotensi dan mungkin menjadi inisiator pembentuk radikal organik adalah radikal hidroksil (Marks, *et al.* 2000).

Reaksi rantai radikal bebas meliputi tahap inisiasi, propagasi, dan terminasi. Inisiasi merupakan tahap pemutusan molekul halogen menjadi dua atom halogen. Tahap propagasi terjadi saat suatu radikal bereaksi dengan

molekul lainnya membentuk radikal yang selanjutnya dapat bereaksi seperti reaksi sebelumnya. Proses tersebut berhenti saat dua radikal berantai bergabung, sehingga rantai terterminasi atau putus karena tidak ada radikal baru yang terbentuk (Hart, *et al.* 2003).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya proses oksidasi. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan (Tamat, *et al.* 2007). Sudirman (2011), menyatakan antioksidan juga dapat menghambat atau mencegah terjadinya oksidasi pada substrat atau bahan yang dapat teroksidasi, walaupun memiliki jumlah yang sedikit dalam makanan atau tubuh jika dibandingkan dengan substrat yang akan teroksidasi. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektro (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul yang kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif.

2.3.1 Sumber Antioksidan

Berdasarkan sumber perolehannya menurut Kuncahyo dan Sunardi (2007), ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik). Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan.

Antioksidan dapat berbentuk gizi seperti vitamin E dan C, non-gizi (pigmen karoten, likopen, flavonoid, dan klorofil), dan enzim (glutation peroksidase, koenzim Q10 atau ubiquinon). Antioksidan dapat dibagi menjadi 3 golongan, yaitu antioksidan preventif (enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase), antioksidan primer (vitamin A, fenolat, flavonoid, katekin, kuersetin), dan antioksidan komplementer (vitamin C, β -karoten, retinoid) (Tamat, *et al.* 2007).

Kebanyakan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami berasal dari tumbuhan. Kingdom tumbuhan angiospermae memiliki kira-kira 250.000 sampai 300.000 spesies dan dari jumlah ini kurang lebih 400 spesies yang telah dikenal dapat menjadi bahan pangan manusia. Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman, yaitu pada kayu, kulit kayu, akar, daun buah, bunga, biji dan serbuk sari. Bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, yaitu rempah-rempah, dedaunan, teh, kakao, biji-bijian, sereal, buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan (alga laut). Bahan pangan ini mengandung jenis senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, yaitu asam-asam amino, asam askorbat, golongan flavonoid, tokoferol, karotenoid, tanin, peptida, melanoidin, produk-produk reduksi dan asam-asam organik lain (Sudirman, 2011).

Diantara beberapa contoh antioksidan sintetis yang diizinkan penggunaan untuk makanan yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butyl hidroksi toluene (BHT), propyl galat (PG), tert-butyl hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintetis untuk tujuan komersial (Apriandi, 2011)

2.3.2 Fungsi antioksidan

Fungsi utama antioksidan yaitu dapat digunakan sebagai upaya untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil

terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi. Antioksidan juga dapat menetralkan radikal bebas, seperti enzim SOD (Superoxide Dismutase), glutathione dan katalase. Antioksidan dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan betakaroten serta senyawa fenolik. Antioksidan juga pada akhirnya berfungsi untuk menetralkan atau meredakan dampak negatif dari radikal bebas (Apriandi, 2011).

Efek antioksidan terutama disebabkan oleh adanya senyawa fenolat seperti flavonoid dan asam fenolat. Pada umumnya senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus -OH dan -OR (Kuntorini, *et al.* 2011).

2.3.3 Mekanisme Kerja Antioksidan

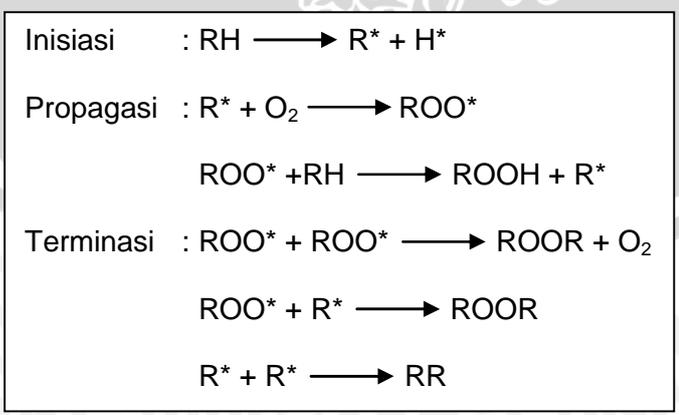
Antioksidan pada umumnya mengandung struktur inti yang sama, yaitu mengandung cincin benzena tidak jenuh disertai gugusan hidroksi atau gugusan amino. Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai radikal bebas menurut Ketaren (2008), terdiri atas empat tahap yaitu:

- 1) Pelepasan hidrogen dari antioksidan,
- 2) Pelepasan elektron dari antioksidan,
- 3) Adisi lemak (molekul teroksidasi) ke dalam cincin aromatik antioksidan,
- 4) Pembentukan senyawa kompleks antara lemak (molekul teroksidasi) dan cincin aromatik antioksidan.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi utama antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan disingkat AH yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai

antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hydrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal bebas. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal bebas ke bentuk lebih stabil (Apriandi, 2011).

Mekanisme kerja antioksidan secara umum menurut Wiratmaja (2011), adalah menghambat oksidasi lemak. Untuk mempermudah pemahaman tentang mekanisme kerja antioksidan perlu dijelaskan lebih dahulu mekanisme oksidasi lemak. Ditambahkan oleh Sudirman (2011), oksidasi lemak terdiri dari 3 tahapan utama, yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat hilangnya satu atom hydrogen. Pada tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi. Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang asam lemak baru. Pada tahap terminasi terjadi reaksi antara radikal bebas membentuk kompleks nonradikal. Adapun mekanisme kerja antioksidan tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



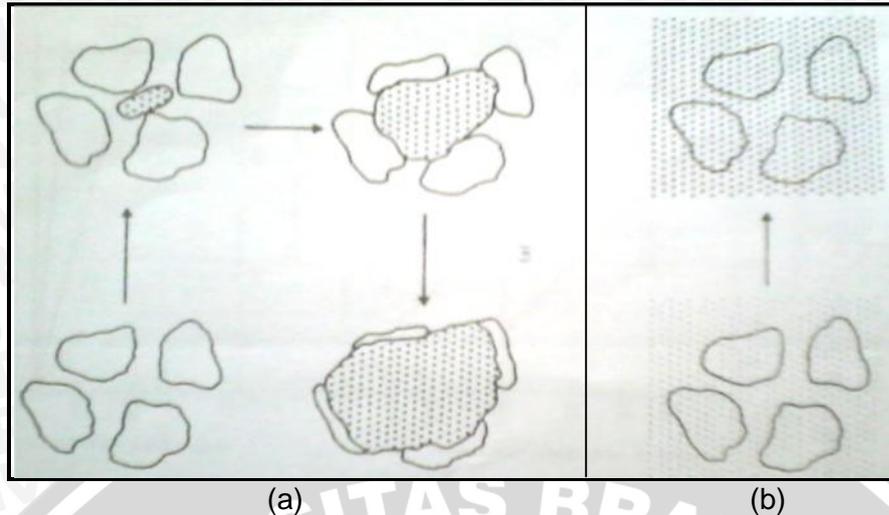
Gambar 3. Reaksi Umum Oksidasi Asam Lemak
Sumber: Sudirman (2011)

2.4 Pembekuan Lambat

Adawyah (2007), menyatakan berdasarkan cepat lambatnya waktu pembekuan, pembekuan dapat dibedakan menjadi dua yaitu :

- 1.) Pembekuan cepat (*quick freezing*), yaitu pembekuan dengan *thermal arrest time* tidak lebih dari dua jam sehingga kristal-kristal es yang dihasilkan kecil-kecil di dalam jaringan daging. Jika dicairkan kembali, kristal-kristal yang mencair diserap kembali oleh daging dan hanya sejumlah kecil yang lolos keluar sebagai drip.
- 2.) Pembekuan lambat (*slow freezing* atau *sharp freezing*), yaitu bila *thermal arrest time* lebih dari dua jam sehingga kristal-kristal es yang dihasilkan besar-besar. Kristal es ini mendesak dan merusak susunan jaringan daging. Tekstur daging ketika dicairkan menjadi kurang baik, menjadi berongga-rongga dan banyak sekali drip yang berbentuk.

Selama pembekuan lambat, kristal es tumbuh di ruang antar sel yang dapat merubah bentuk dan dapat merusak dinding sel didekatnya (Gambar 4a). Kristal es memiliki tekanan uap air lebih rendah dibandingkan di dalam sel, maka air akan bergerak keluar sel menuju kristal yang sedang tumbuh. Sel menjadi dehidrasi dan membuat kerusakan permanen oleh peningkatan konsentrasi solute dan merusak struktur sel. Pada proses *thawing*, sel tidak kembali ke bentuk awal. Bahan tersebut menjadi lunak dan material sel merembes keluar dari sel yang pecah (*drip*). Pada pembekuan cepat, terbentuk kristal es lebih kecil di ruang antar sel maupun didalam sel. Akibatnya kerusakan fisik lebih rendah dan tidak terbentuk tekanan uap air, sehingga dehidrasi menjadi rendah. Tekstur dari bahan dapat menahan pada tingkat yang lebih baik (Gambar 4b). Namun, pembekuan yang sangat cepat dapat menyebabkan tekanan pada bahan sehingga menyebabkan keretakan pada jaringan (Fellows, 2000). Pengaruh laju pembekuan pada jaringan tumbuhan terdapat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh Pembekuan pada Jaringan Tumbuhan
(a) Pembekuan Lambat dan (b) pembekuan cepat
 Sumber: Fellows (2000)

Laju pembekuan merupakan salah satu faktor kritis yang menentukan mutu produk beku yang dihasilkan. Proses pembekuan lambat akan menghasilkan Kristal-kristal es dengan jumlah yang lebih sedikit tetapi dengan ukuran yang lebih besar berpeluang untuk menusuk dan merusak sel-sel jaringan pangan, sehingga menyebabkan sel kehilangan air dan keteguhan tekstur (Food Review Indonesia, 2007).

Pembekuan lambat disebut juga dengan pembekuan tajam (*sharp freezing*). Di dalam metode ini, bahan ditempatkan dalam ruang pembekuan pada suhu antara -4°C hingga -29°C . Pembekuan membutuhkan waktu 3 hingga 72 jam di bawah kondisi yang demikian (Srilakshmi, 2005). Kemampuan jaringan bertahan hidup lebih baik pada pembekuan cepat dibandingkan dengan pembekuan lambat karena air tidak memiliki waktu untuk bermigrasi membentuk kristal besar (Vaclavik dan Christian, 2008).

Menurut Campbell, *et al.* (2003), pada suhu di bawah pembekuan, kristal es mulai terbentuk pada sebagian besar tumbuhan. Jika es terbatas hanya pada dinding sel dan ruangan antar sel, tumbuhan kemungkinan akan bertahan hidup. Namun demikian, jika es mulai terbentuk di dalam protoplas, kristal es yang

tajam itu akan merobek membran dan organel, yang dapat membunuh sel tersebut.

Kerusakan tekstur terjadi karena terbentuknya kristal-kristal es di bagian sitoplasma maupun di ruang-ruang antar sel yang dapat mengakibatkan kerusakan dinding sel (Somogyi, *et al.* 1996). Disamping kerusakan secara mekanis pada jaringan tanaman, proses ini mengakibatkan dehidrasi secara cepat dari isi sel dan suatu peningkatan konsentrasi cairan sel. Pencairan yang cepat dapat juga mempunyai pengaruh mematikan pada tanaman yang membeku karena gangguan dalam hubungan metabolisme sel dan air yang lebih jauh (Fitter dan Hay, 1991).

2.5 Ekstraksi

Metode yang umum mendasari proses ekstraksi adalah maserasi. Kata maserasi berasal dari bahasa Latin *maceratus* yang berarti melunakkan. Maserasi merupakan proses perendaman bahan yang dilakukan dengan atau tanpa pengadukan. Bahan yang akan dimaserasi bersama pelarut ditempatkan dalam wadah tertutup bertujuan untuk mencegah terjadinya penguapan. Larutan alkohol dalam jumlah yang cukup dapat ditambahkan dalam wadah apabila pelarut yang digunakan adalah air. Hal tersebut bertujuan untuk mencegah pertumbuhan mikroba (Podungge, 2012).

Menurut Suyoso (2011), dalam proses ekstraksi maserasi pelarut menembus dinding sel masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif. Senyawa aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam dan di luar sel, maka cairan hipertonis akan masuk ke cairan yang hipertonis sehingga terjadi keseimbangan. Pengadukan juga diperlukan untuk meratakan konsentrasi di luar serbuk sampel sehingga

tetap terjaga adanya perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam dan di luar sel.

Sebagai tenaga pemisah, solven harus dipilih sedemikian hingga kelarutannya terhadap salah satu komponen murninya adalah terbatas atau sama sekali tidak saling melarutkan. Karenanya, dalam proses ekstraksi akan terbentuk dua fase cairan yang saling bersinggungan dan selalu mengadakan kontak. Fase yang banyak mengandung diluen disebut fase rafinat sedangkan fase yang banyak mengandung solven dinamakan ekstrak (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Harborne (1987), mengelompokkan metode ekstraksi menjadi dua, yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus. Ekstraksi sederhana terdiri atas:

- a) Maserasi, yaitu metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan.
- b) Perkolasi, yaitu metode ekstraksi secara berkesinambungan.
- c) Reperkolasi, yaitu perkolasi dimana hasil perkolasi digunakan untuk melarutkan sampel di dalam perkulator sampai senyawa kimianya terlarut.
- d) Dialokasi, yaitu perkolasi dengan penambahan tekanan udara.

Ekstraksi khusus terdiri atas:

- a) Sokletasi, yaitu metode ekstraksi secara berkesinambungan untuk melarutkan sampel kering dengan menggunakan pelarut bervariasi.
- b) Arus balik, yaitu metode ekstraksi secara berkesinambungan dimana sampel dan pelarut saling bertemu melalui gerakan aliran yang berlawanan.
- c) Ultrasonik, yaitu metode ekstraksi dengan menggunakan alat yang menghasilkan frekuensi bunyi atau getaran antara 25-100 KHz.

2.6 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor utama yang menentukan keberhasilan dalam proses ekstraksi. Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non-polar (Vogel, 1987). Sifat pelarut umum dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat-sifat Pelarut Umum

Solvent	Rumus Kimia	Titik Didih	Konstanta Dielektrik	Massa jenis
Pelarut Non-Polar				
Heksana	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69 °C	2.0	0.655 g/ml
Benzena	C_6H_6	80 °C	2.3	0.879 g/ml
Toluena	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$	111 °C	2.4	0.867 g/ml
Dietil eter	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35 °C	4.3	0.713 g/ml
Kloroform	CHCl_3	61 °C	4.8	1.498 g/ml
Etil asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	77 °C	6.0	0.894 g/ml
Pelarut Polar Aprotik				
1,4-Dioksana	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$	101 °C	2.3	1.033 g/ml
Tetrahidrofuran (THF)	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	66 °C	7.5	0.886 g/ml
Diklorometana (DCM)	CH_2Cl_2	40 °C	9.1	1.326 g/ml
Asetona	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	56 °C	21	0.786 g/ml
Asetonitril (MeCN)	$\text{CH}_3\text{-C N}$	82 °C	37	0.786 g/ml
Dimetilformamida (DMF)	$\text{H-C(=O)N(CH}_3)_2$	153 °C	38	0.944 g/ml
Dimetil sulfoksida (DMSO)	$\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$	189 °C	47	1.092 g/ml
Pelarut Polar Protik				
Asam asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118 °C	6.2	1.049 g/ml
<i>n</i> -Butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118 °C	18	0.810 g/ml
Isopropanol (IPA)	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_3$	82 °C	18	0.785 g/ml
<i>n</i> -Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	97 °C	20	0.803 g/ml
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79 °C	30	0.789 g/ml
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65 °C	33	0.791 g/ml
Asam format	H-C(=O)OH	100 °C	58	1.21 g/ml
Air	H-O-H	100 °C	80	1.000 g/ml

Sumber : Anonymous^c (2012)

Pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi harus memenuhi syarat tertentu, yaitu tidak toksik, tidak meninggalkan residu, harganya murah, tidak korosif, aman dan tidak mudah meledak. Jenis pelarut yang digunakan dalam

proses ekstraksi akan mempengaruhi jenis bahan yang akan terekstrak. Kelarutan suatu senyawa dalam pelarut tergantung dari gugus-gugus yang terikat pada pelarut tersebut. Pelarut yang mempunyai gugus hidroksil (alkohol) dan karbonil (keton) termasuk pelarut polar, sedangkan hidrokarbon termasuk ke dalam non polar (Nurmillah, 2009). Konstanta dielektrik berbagai pelarut disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Konstanta Dielektrik Bahan Pelarut

Pelarut	Konstanta Dielektrik (D)	Tingkat kelarutan Dalam Air
Kloroform	4,806	Sedikit
Etil Asetat	6,02	Sedikit
n-Butanol	17,80	Sedikit
2-Propanol	18,30	Misibel
1-Propanol	20,10	Sedikit
Aseton	20,70	Misibel
Etanol	24,30	Misibel
Metanol	33,60	Misibel
Air	80,40	Misibel

Keterangan : Misibel = dapat bercampur dengan air dalam berbagai konsentrasi
Sumber : Sudarmadji, *et al.* (1997)

Larutan pengekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa yang diinginkan. Larutan pengekstraksi yang digunakan saat proses ekstraksi yaitu ethanol. Etanol disebut juga etil alkohol adalah jenis cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna. Etanol termasuk ke dalam alkohol rantai tunggal, dengan rumus kimia C_2H_5OH dan rumus empiris C_2H_6O . Ia merupakan isomer konstitusional dari dimetil eter. Etanol sering disingkat menjadi EtOH, dengan "Et" merupakan singkatan dari gugus etil (C_2H_5). Sifat kimia dari etanol banyak dipengaruhi dari gugus hidroksilnya (Vogel, 1987).

Etanol bersumber dari bahan baku gula sederhana, pati dan selulosa. Setelah melalui proses fermentasi dan distilasi maka dihasilkan etanol. Etanol adalah senyawa organik yang merupakan zat cair, tidak berwarna, berbau spesifik, mudah terbakar dan menguap, dapat bercampur dalam air dengan segala perbandingan. Secara garis besar penggunaan etanol adalah sebagai

pelarut untuk zat organik maupun anorganik, bahan dasar industri asam cuka, ester, spirtus, asetaldehid, antiseptik (Wiratmaja, 2011). Sifat fisika etanol dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sifat Fisika Etanol

Sifat	Jumlah
Massa molekul relative (g/mol)	46,07
Titik Beku (°C)	-114,1
Titik didih normal (°C)	78,32
Densitas pada 20°C (g/ml)	0,7893
Kelarutan dalam air (20°C)	Sangat larut
Viskositas pada 20°C (cP)	1,17
Kalor Spesifik, 20°C (kal/g°C)	0,579
Kalor pembakaran, 25°C (kal/g)	092,1
Kalor Penguapan 78,32°C (kal/g)	200,6

Sumber : Wiratmaja (2011)

2.7 Uji Aktivitas Antoksidan

Keberadaan senyawa antioksidan dalam suatu bahan dapat diketahui melalui uji aktivitas antioksidan. Terdapat berbagai metode pengukuran aktivitas antioksidan. Pada prinsipnya metode-metode tersebut digunakan untuk mengevaluasi adanya aktivitas penghambatan proses oksidasi oleh senyawa antioksidan yang terdapat dalam bahan pangan atau contoh ekstrak bahan alam (Setyaningsih, *et al.* 2004).

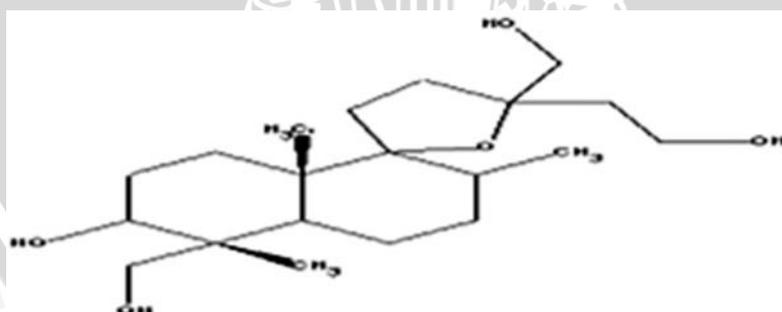
Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (1,1 *Diphenyl-2-picrylhidrazy*l). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Kuncahyo dan Sunardi, 2007). Berdasarkan Apriandi (2011), pada metode ini, larutan DPPH yang berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan senyawa antioksidan, sehingga DPPH akan

bermanfaat, yang ditunjukkan oleh ekstrak kasar bila diuji dengan sistem biologi (Apriandi, 2011).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa fitokimia terdapat pada nutrisi yang terkandung dalam buah-buahan, sayur-sayuran dan kacang-kacangan (Sudriman, 2011). Senyawa fitokimia yang umum terdapat pada tanaman yaitu golongan alkaloid, flavonoid, kuinon, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid. Pelarut nonpolar efektif mengekstrak alkaloid dan terpenoid dari suatu bahan. Pelarut semi polar mampu mengekstrak senyawa fenol, terpenoid dan alkaloid. Pelarut yang bersifat polar mampu mengekstrak senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik dan tanin (Harborne, 1987).

2.8.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa kimia tanaman metabolit sekunder yang terbentuk berdasarkan prinsip pembentukan campuran. Alkaloid terbagi menjadi tiga bagian, yaitu elemen yang mengandung N terlibat pada pembentukan alkaloid, elemen tanpa N yang ditemukan dalam molekul alkaloid dan reaksi yang terjadi untuk pengikatan khas elemen-elemen pada alkaloid (Podungge, 2012). Berikut struktur kimia dari alkaloid terdapat pada Gambar 6.



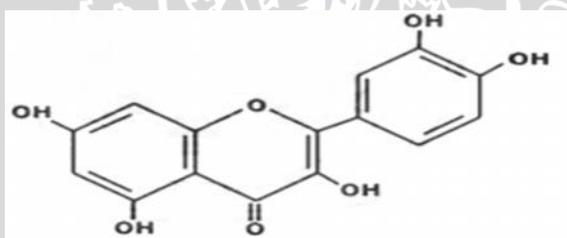
Gambar 6. Struktur Alkaloid
Sumber : Apriandi (2011)

Alkaloid merupakan golongan zat sekunder pada tumbuhan. Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen. Alkaloid biasanya tanpa warna, seringkali bersifat optis aktif,

kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotina) pada suhu kamar. Alkaloid merupakan turunan yang paling umum dari asam amino. Secara kimia, alkaloid merupakan suatu golongan heterogen. Secara fisik, alkaloid dipisahkan dari kandungan tumbuhan lainnya sebagai garamnya dan sering diisolasi sebagai kristal hidroklorida atau pikrat. Senyawa ini dapat rusak akibat proses pengeringan (Harborne, 1987).

2.8.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar, mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, terutama dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C_6 (cincin benzene tersubstitusi) yang dihubungkan oleh alifatik tiga karbon (Lumbanraja, 2009). Struktur dasar flavonoid dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur Dasar Flavonoid

Sumber : Rahayu (2012)

Flavonoid merupakan kelompok besar fitokimia yang bersifat melindungi dan banyak terdapat pada buah dan sayuran. Flavonoid sering dikenal sebagai flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. antioksidan dapat mentralkan atau menginaktifkan reaksi yang tidak stabil pada molekul yang disebut sebagai radikla bebas yang dapat menyerang sel tubuh. Flavonoid terdapat beberapa jenis dan masing-masing berperan dalam menjaga kesehatan. Senyawa-senyawa flavonoid termasuk di dalamnya adalah *resveratrol*, *anthocyanin*, *quercetin*, *hesperidin*, *tangeritin*, *kaemferol*, *myricetin* dan *apigenin*. Flavonoid adalah bagian dari senyawa fenolik yang terdapat pada pigmen tumbuh-tumbuhan. Kesehatan manusia sangat tergantung pada flavonoid sebagai

antioksidan untuk mencegah kanker. Manfaat utama flavonoid untuk melindungi struktur sel, membantu memaksimalkan manfaat vitamin C, mencegah keropos tulang, sebagai antibiotik dan anti-inflamasi (Sudirman, 2011).

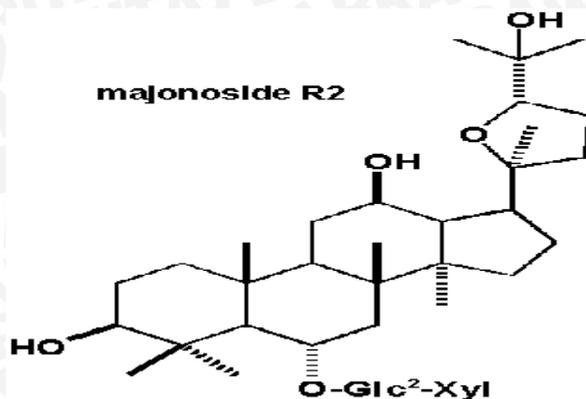
2.8.3 Tanin

Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh. Secara kimia terdapat jenis tanin yaitu tanin terkondensasi hampir terdapat semesta di dalam paku-pakuan dan *gymnospermae*, serta tersebar luas dalam *angiospermae* terutama pada tumbuhan berkayu. Tanin terhidrolisis, penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua. Tetapi kedua jenis tanin itu dijumpai bersamaan dalam tumbuhan yang sama seperti yang terjadi pada kulit dan daun ek, *Quercus*. Sebagian besar tumbuhan yang banyak bertanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya sepat. Salah satu fungsi utama tanin dalam tumbuhan ialah sebagai penolak hewan pemakan tumbuhan (Silaban, 2009).

2.8.4 Saponin

Saponin diberi nama demikian karena sifatnya menyerupai sabun (bahasa Latin "sapo" berarti sabun). Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa, jika dikocok dengan air. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba. Dikenal dua jenis saponin, yaitu glikosida triterpenoida dan glikosida struktur steroida tertentu yang mempunyai rantan samping spiroketal. Kadua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Aglikonnya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam suasana asam atau hidrolisis memakai enzim (Lumbanraja, 2009).

Senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air, saponin dapat membentuk misel. Pada struktur misel, gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus nonpolarnya menghadap ke dalam. Keadaan inilah yang tampak seperti busa (Marlinda, 2012). Struktur umum saponin terdapat pada Gambar 8.

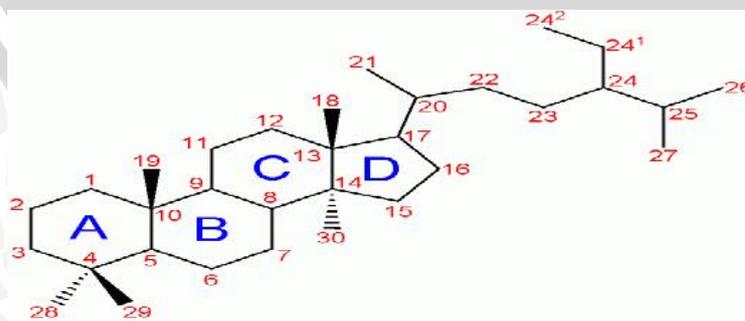


Gambar 8. Struktur Umum Saponin
Sumber : Apriandi (2011)

2.8.5 Triterpenoid dan Steroid

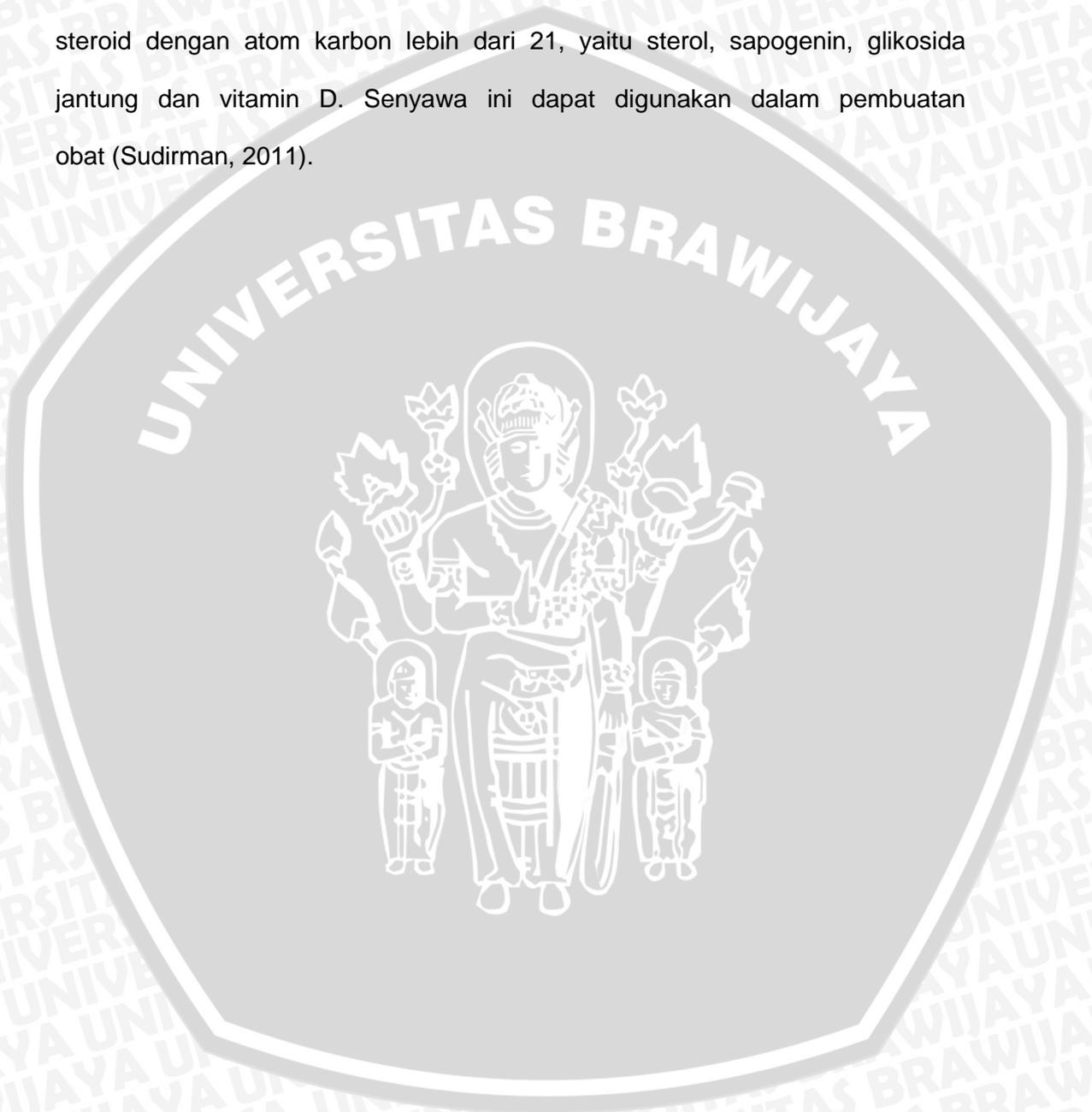
Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene. Senyawa ini berstruktur siklik, kebanyakan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat. Umumnya senyawa yang tidak berwarna, berbentuk kristal, bertitik leleh tinggi dan optis aktif. uji yang banyak digunakan adalah raksi Liebermann-Burchard (anhidrat asetat dan H₂SO₄ pekat) (Silaban, 2009).

Inti steroid sama dengan inti triterpenoid yaitu tetrasiklik. Steroid alkohol biasanya dinamakan dengan "sterol". Sterol adalah triterpena yang kerangka dasarnya cincin siklopentana perhidrofenantrena. Dahulu sterol terutama dianggap sebagai senyawa hormon kelamin (asam empedu), tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa tersebut yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan (Lumbanraja, 2009). Struktur steroid terdapat pada Gambar 9.



Gambar 9. Struktur Steroid
Sumber : Apriandi (2011)

Sterol atau steroid adalah triterpenoid yang kerangka dasarnya cincin siklopentana perhirofenantren. Senyawa fenol pada tumbuhan disebut dengan fitosterol yang umumnya terdapat pada tumbuhan tinggi adalah sitosterol, stigmasterol dan kampesterol. Senyawa ini dapat diklasifikasikan menjadi steroid dengan atom karbon lebih dari 21, yaitu sterol, sapogenin, glikosida jantung dan vitamin D. Senyawa ini dapat digunakan dalam pembuatan obat (Sudirman, 2011).



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat dan bahan pada tahap preparasi sampel, pembekuan sampel, *thawing*, ekstraksi kasar, pengujian aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa fitokimia yang disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Alat dan Bahan yang Digunakan Dalam Penelitian

Tahapan	Alat	Bahan
1. Preparasi Sampel	<i>Cool Box</i> , Blender	<i>S. filipendula</i> , Es Balok Plastik dan Air
2. Pembekuan Sampel	<i>Freezer</i> , <i>Termocouple</i> , Pipet Volume, <i>Beaker Glass</i> , Gelas Ukur, Timbangan Digital, Bak, wadah plastik dan tutupnya.	<i>S. filipendula</i> , Wadah Plastik, Etanol 10%, Aquades dan Air
3. Ekstraksi Kasar	<i>Rotary Vacuum Evaporator</i> , Botol Vial, Bola Hisap, Pipet Volume, <i>Shaker</i>	<i>S. filipendula</i> , Alumunium Foil, Etanol 96%, Kertas Saring Whatman no. 42 dan Kain Saring
4. Analisa Kadar Air	Oven, Botol Timbang Timbangan Analitik, Desikator dan <i>Crushable Tank</i>	<i>S. filipendula</i> Segar dan Ekstrak Kasar <i>S. filipendula</i>
5. Pengujian Aktivitas Antioksidan	Pipet <i>Volume</i> , Bola Hisap <i>Beaker Glass</i> , Gelas Ukur, Spektrofotometer UV-Vis, dan Botol Vial	Ekstrak Kasar, Etanol 96% dan Larutan DPPH 0,1mM
6. Uji Fitokimia	Tabung reaksi, Pipet <i>Volume</i> , Pipet tetes, <i>beaker glass</i> dan Rak Tabung Reaksi	Ekstrak Kasar, Serbuk Mg, HCl 2N, FeCl ₃ 1%, NH ₃ , Aquades, H ₂ SO ₄ , Kloroform, Amil Alkohol, Alkohol Klorhidrat, Pereaksi Meyer, Wagner dan Dragendorf
7. Uji Total Polyphenol Content (TPC)	Botol Vial Pipet Volum <i>Beaker Glass</i> Spektrofotometer Uv-Vis	Ekstrak Kasar, Reagen <i>Follin-ciocalteau</i> 50%, Na ₂ CO ₃ 5%, Etanol 96%, Aquades dan Asam Galat

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah alga coklat *S. filipendula* yang diambil langsung dari daerah budidaya rumput laut yang berada di perairan Pulau Talango, Desa Ponjuk, wilayah timur pulau Madura Kabupaten Sumenep, Jawa Timur. Bahan baku yang telah dipanen dicuci dengan air tawar untuk menghilangkan lumpur, kotoran serta pasir yang masih menempel. Menurut Fateha (2007), dilakukan pencucian dengan air tawar dan sortasi untuk menghilangkan kotoran seperti pasir, garam, tanah, batu, kulit kerang dan rumput laut lainnya sehingga benar-benar bersih dari lumpur dan kotoran yang melekat.

Bahan baku yang telah dicuci dimasukkan dalam *cool box* dan diberi es balok dan bagian luar *cool box* disegel menggunakan lakban untuk menjaga suhu rendah di dalamnya selama proses transportasi sehingga bahan baku penelitian tetap terjaga keseegarannya. Waktu pengangkutan dari tempat pemanenan ke laboratorium membutuhkan waktu selama sehari semalam. Bahan baku yang telah sampai langsung dipisahkan daun dan batangnya (Lampiran 10). Dalam penelitian ini yang digunakan adalah daunnya. Bagian tumbuhan yang memiliki aktivitas komponen bioaktif tinggi terletak pada bagian daun dan pucuknya yang masih muda (Djukri, 2005).

Daun *S. filipendula* dihancurkan menggunakan blender untuk memperoleh permukaan yang lebih kecil. Bahan baku yang berbentuk halus tersebut dapat mempermudah saat proses ekstraksi karena permukaan bahan baku yang kontak langsung dengan pelarut lebih luas (Sudirman, 2011).

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam metode penelitian adalah metode eksperimen. Menurut Fataruba (2010), metode eksperimen merupakan bagian dari metode kuantitatif dan memiliki ciri khas tersendiri terutama dengan adanya kelompok kontrol. Dalam bidang sains, penelitian-penelitian dapat menggunakan

desain eksperimen karena variabel-variabel dapat dipilih dan variabel-variabel lain yang dapat mempengaruhi proses eksperimen itu dapat dikontrol secara ketat.

Eksperimen yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pengaruh suhu dan waktu pembekuan lambat terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan yang diekstrak dari alga coklat *Sargassum filipendula*.

3.2.1 Variabel Penelitian

Menurut Surakhmad (1994), ada dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas.

Variabel bebas (variabel yang diselidiki pengaruhnya terhadap variabel terikat) adalah lama waktu dan suhu pembekuan lambat. Sedangkan yang menjadi variabel terikat (variabel yang menjadi pusat penelitian) adalah rendemen dan mutu antioksidan dari alga coklat jenis *Sargassum filipendula*.

3.2.2 Parameter Uji Coba

Parameter uji yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji fitokimia, uji kadar air, uji *total polyphenol content* (TPC), uji aktivitas antioksidan (IC_{50}). Uji kualitatif fitokimia berupa senyawa alkaloid, flavonoid, dan fenol berdasarkan metode Harborne (1987). Uji kadar air berdasarkan metode *thermogravimetri* oleh Sudarmadji, *et al.* (1997). Uji *total polyphenol content* (TPC) dilakukan menggunakan metode reagen *Follin-Ciocalteau* oleh Apostolidis dan Lee (2010). Uji aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan metode Vijayabaskar dan Shiyamala (2012), yaitu dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Preparasi Sampel

Sampel rumput laut merupakan bahan utama yang digunakan pada penelitian ini. Rumput laut tersebut adalah alga coklat *S. filipendula* segar yang diperoleh dari perairan Pulau Talango, Desa Ponjuk, Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. *S. filipendula* ini dikirim langsung dari daerah budidaya rumput laut menggunakan *coolbox* yang didinginkan dengan es balok agar rumput laut masih tetap terjaga kesegarannya. *S. filipendula* ini kemudian dicuci menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel dirumput laut. Setelah bersih *S. filipendula* dipisahkan dari batangnya dan diambil daunnya untuk diberi perlakuan. Daun *S. filipendula* dihancurkan hingga berukuran kecil menggunakan blender yang selanjutnya diuji fitokimia dan akan diberi perlakuan.

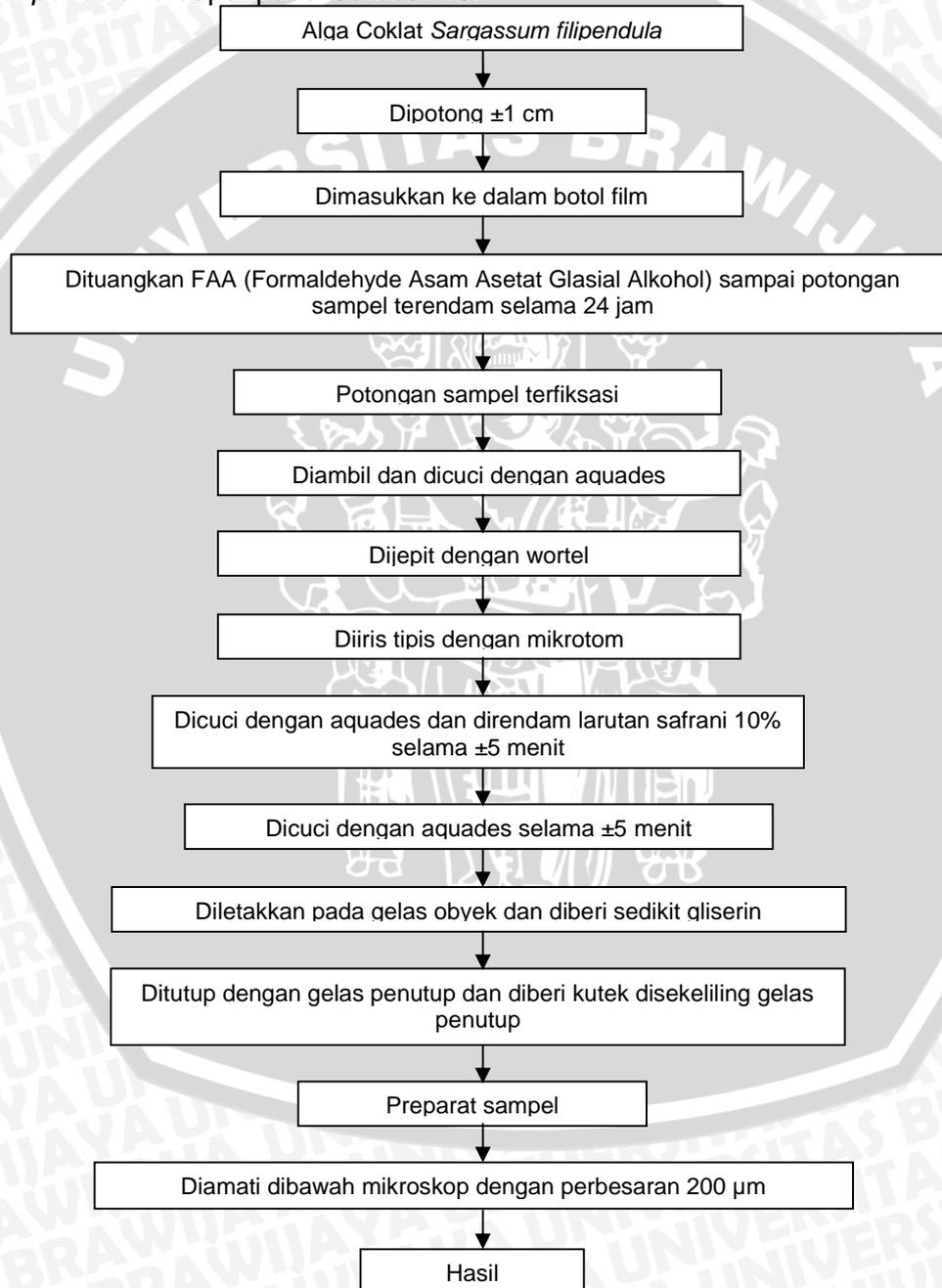
3.3.2 Pembekuan Sampel

S. filipendula berukuran kecil ditimbang dengan timbangan digital sebanyak ± 200 gram dan dimasukkan dalam wadah tabung (Lampiran 10). Ditambahkan etanol 10% sebanyak 150 ml atau sampai sampel terendam agar terjadi pembekuan lambat dan kemudian dibekukan sesuai dengan perlakuan pada Tabel 5).

Penentuan suhu pembekuan yang diberikan berdasarkan pada suhu penyimpanan produk pangan (terutama produk perikanan) dalam *cold storage* secara komersial yaitu pada suhu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, air dalam bahan pangan hampir 90% berubah menjadi es (Johnston, *et al.* 1994; Thomas, 2006).

Waktu pembekuan diamati tiap 5 menit sejak sampel diletakkan dalam *freezer* sampai waktu dari masing-masing perlakuan selesai dan dihitung laju pembekuan. Laju pembekuan ditentukan dengan konsep *thermal arrest time* (TAR) yaitu waktu yang dibutuhkan oleh titik yang paling lambat membeku pada produk untuk menurunkan suhu dari $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Heldman dan Singh,

1981). Sampel yang telah dibekukan *dithawing* pada suhu ruang dengan merendam wadah yang berisi sampel beku dalam bak yang berisi air sampai mendekati penutup wadah (Lampiran 12). Seluruh sampel dibuat preparat mikroskopis dan diamati kerusakan sel yang terjadi akibat pembekuan lambat dibawah mikroskop (Lampiran 12). Skema kerja pembuatan preparat mikroskopis *S. filipendula* terdapat pada Gambar 10.



Gambar 10. Skema Kerja Pembuatan Preparat Mikroskopis *Sargassum filipendula*

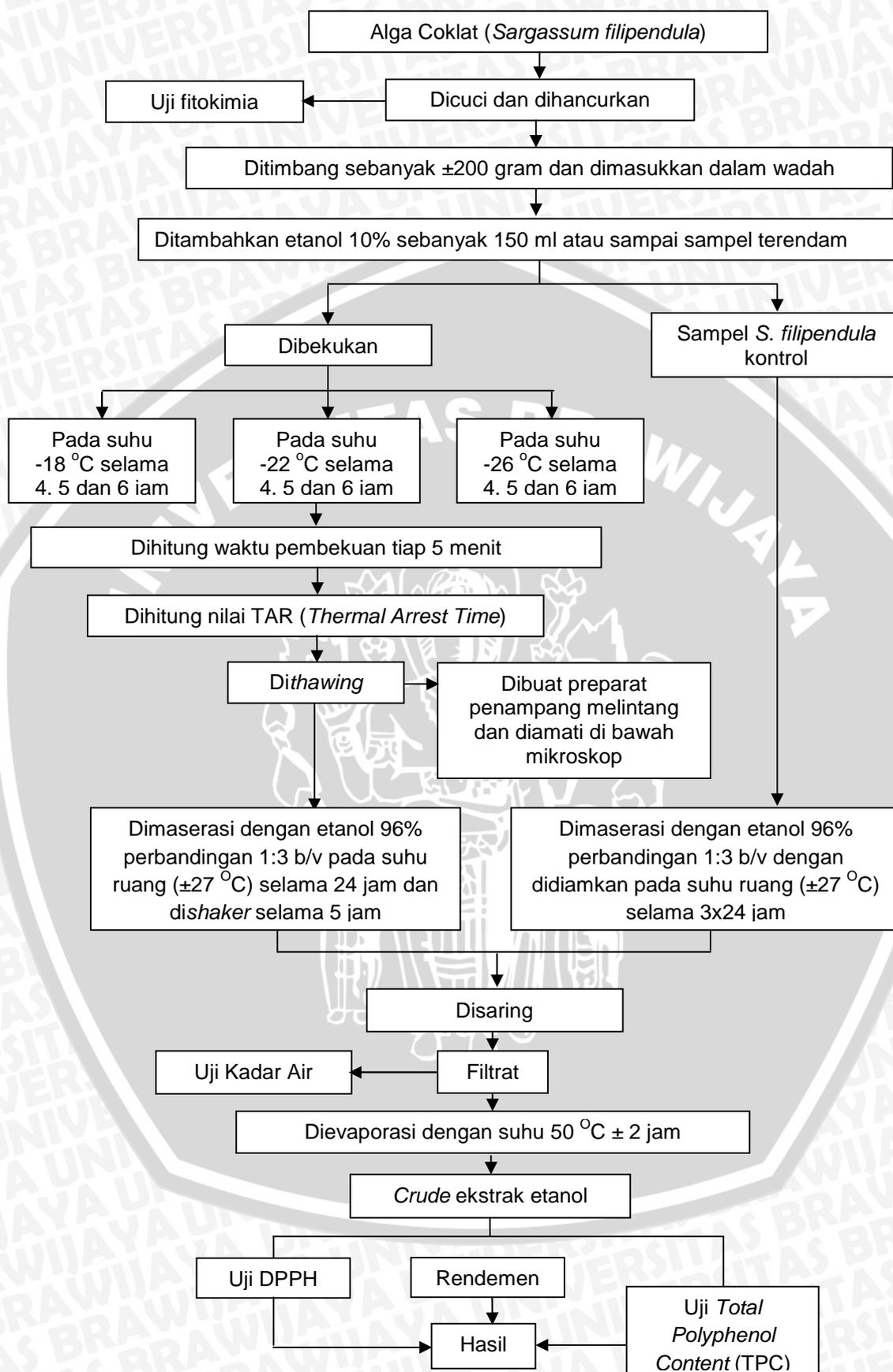
Sumber: Sulistiono (2009)

3.3.3 Ekstraksi Kasar (*Crude Extract*) (Maulana, 2012)

Sampel *S. filipendula* yang telah *thawing*, kemudian di ekstraksi berdasarkan hasil penelitian Maulana (2012), yang telah dimodifikasi. Sampel dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 24 jam didiamkan pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) (Lampiran 11), kemudian *dishaker* menggunakan *shaker* pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) selama 5 jam dengan kecepatan konstan (Lampiran 11). Menurut Suyoso (2011), proses pengadukan menggunakan *shaker* yang dilakukan dengan kecepatan konstan untuk mempercepat proses ekstraksi komponen aktif. Dalam proses ekstraksi maserasi pelarut menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif. Senyawa aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam dan di luar sel, maka cairan hipertonis akan masuk ke cairan yang hipotonis sehingga terjadi keseimbangan. Pengadukan juga diperlukan untuk meratakan konsentrasi di luar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara di dalam dan di luar sel.

Pada proses maserasi menggunakan perbandingan antara sampel dan pelarut (etanol 96%) yaitu 1:3 (b/v), kemudian sampel disaring dengan kain saring (blancu) dan dilanjutkan dengan kertas saring Whatman no. 42 (Lampiran 11). Hasil penyaringan (filtrat) di evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C selama ± 2 jam (Lampiran 11) pelarut terpisah dengan sampel sehingga diperoleh *crude extract* etanol. Skema Kerja proses ekstraksi kasar *S. filipendula* dapat dilihat pada Gambar 11. Ekstrak kasar *S. filipendula* yang diperoleh diuji kadar air, aktivitas antioksidan dan *total polyphenol content* (TPC). Sebelum dilakukan uji dihitung nilai rendemennya dengan rumus sebagai berikut menurut Apriandi (2011),

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{bobot contoh (g)}}{\text{bobot total (g)}} \times 100\%$$



Gambar 11. Skema Kerja Proses Ekstraksi Kasar *Sargassum filipendula*

Sumber: Maulana (2012)

3.3.4 Analisa Kadar Air

Uji kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah kadar air bebas sampel ekstrak etanol 96%. Uji yang dilakukan berdasarkan metode *thermogravimetri* (Sudarmadji, *et al.* 1997), yaitu dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105-110 °C selama 3 jam atau sampai diperoleh berat konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Prosedurnya yaitu sampel yang telah diketahui beratnya dimasukkan dalam botol timbang yang juga telah diukur beratnya lalu dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105 °C selama 3 jam. Ditimbang berat akhir sampel setelah dikeringkan lalu dihitung persen kadar air dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{(A+B) - C}{B} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat Botol Timbang

B = Berat Sampel

C= Berat Akhir (Berat Botol Timbang + Sampel)

3.3.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak *S.filipendula* berdasarkan metode yang digunakan oleh Vijayabaskar dan Shiyamala (2012), yang telah dimodifikasi. Ekstrak dari *Sargassum filipendula* dilarutkan dalam etanol dan dibuat dengan konsentrasi 0, 25, 50, 100 dan 200 ppm. Ekstrak dari masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 3 ml yang kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,1 mM yang disiapkan dalam larutan etanol. Setelah 10 menit, diukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Dilakukan juga pengukuran absorbansi pada blanko. Besarnya aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus:

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

Nilai konsentrasi dan hambatan ekstrak diplot masing-masing pada sumbu x dan y. Persamaan garis yang diperoleh dalam bentuk $y = b \ln(x) + a$ digunakan untuk mencari nilai IC (*inhibitor concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀ menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Suryaningrum, *et al.* 2006).

3.3.6 Uji Total Polyphenol Content (TPC)

Kandungan TPC diukur dengan spektrofotometer menggunakan metode reagen *Follin-Ciocalteu* (Apostolidis dan Lee, 2010). Ekstrak rumput laut sebanyak 1 ml dilarutkan dengan 1 ml etanol 96% dalam botol vial. Ditambahkan 5 ml aquades dan 0,5 ml reagen *Follin-Ciocalteu* 50 % (v/v) kemudian didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 ml larutan natrium karbonat (Na₂CO₃) 5% (b/v), dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dalam kondisi tanpa cahaya (gelap). Kandungan total fenol diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 725 nm. Asam galat digunakan sebagai standar dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm. Kandungan TPC diinterpretasikan sebagai milligram equivalen asam galat (mg GAE/g ekstrak).

3.3.7 Uji Fitokimia

Pengujian fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antioksidan yang terdapat pada sampel yang digunakan yaitu alga coklat *Sargassum filipendula*. Uji fitokimia yang dilakukan yaitu uji alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, tannin, dan saponin. Metode uji yang dilakukan yaitu sebagai berikut:

1. Uji Alkaloid (Marlinda, et al. 2012)

Sampel *Sargassum filipendula* segar berukuran kecil sebanyak 4 g ditambahkan kloroform secukupnya, selanjutnya ditambahkan 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Kemudian larutan disaring ke dalam tabung reaksi dan filtrat ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2N. campuran dikocok teratur dan dibiarkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipindahkan pada 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 ml. kemudian pada masing-masing tabung reaksi tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi Meyer, Wagner dan Dragendorff. Apabila terbentuk endapan menunjukkan sampel tersebut mengandung alkaloid, dengan pereaksi Meyer memberikan endapan putih, dengan pereaksi Wagner memberikan endapan berwarna coklat dan pereaksi dragendorff memberikan endapan berwarna jingga seperti pada Lampiran 9a.

2. Uji Flavonoid (Rahayu, 2006)

Sampel segar *Sargassum filipendula* sebanyak 0,5 gram ditambahkan serbuk magnesium (0,5 g), 1 ml alkohol klorhidrat (campuran HCl 37% dan etanol 96% dengan volume sama), dan amil alkohol, kemudian dikocok kuat-kuat. Terbentuknya warna merah, kuning (Lampiran 9b) dan jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya golongan flavonoid.

3. Tanin (Marlinda, et al. 2012)

Sampel *Sargassum filipendula* berukuran kecil sebanyak 20 mg ditambahkan etanol sampai sampel terendam semuanya. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan (Lampiran 9e) atau hijau.

4. Saponin

Sampel *Sargassum filipendula* berukuran kecil sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquades hingga seluruh

sampel terendam, didihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Lampiran 9c).

5. Uji Triterpenoid dan Steroid (Marlinda, et al. 2012)

Sampel *Sargassum filipendula* yang berukuran kecil sebanyak 50-100 mg ditambahkan asam asetat glasial sampai semua sampel terendam, dibiarkan selama 15 menit kemudian 6 tetes larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah, jingga atau ungu, sedangkan steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru (Lampiran 9d).

3.4 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini rancangan percobaan yang digunakan yaitu *Central Composite Design* (CCD) yang terdiri dari dua faktor yang terdapat dua taraf dari setiap faktor yang diberi kode sebagai -1 dan +1 dan dilakukan lima pengulangan pengamatan pada titik pusat dengan kode 0. Faktor yang akan dioptimasi adalah lama waktu (X_1) dan suhu (X_2) pembekuan lambat serta respon yang dianalisis yaitu rendemen (Y_1), *total polyphenol content* (Y_2) dan aktifitas antioksidan (Y_3). Penentuan titik beku dan waktu yang dapat membekukan sampel dilakukan dengan melakukan uji coba pendahuluan. Dari hasil uji coba pendahuluan diperoleh kisaran minimum dan maksimum untuk masing-masing faktor percobaan antara lain suhu pembekuan $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan waktu selama 4 sampai 6 jam, sehingga berdasarkan *Central Composite Design* (CCD) rancangan penelitian sesuai pada Tabel 6.

Analisis data dilakukan dengan menggunakan bantuan *software Design Expert DX8.0.7.1 (trial version)* dengan menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) untuk menentukan hasil optimasi pada respon.

Tabel 6. Desain Rancangan Penelitian

Std	Run	Faktor Kode		Faktor Aktual	
		X ₁	X ₂	t	T
1	7	-1	-1	4	18.00
2	10	-1	-1	4	18.00
3	20	-1	-1	4	18.00
4	3	+1	-1	6	26.00
5	14	+1	-1	6	26.00
6	21	+1	-1	6	26.00
7	16	-1	+1	4	18.00
8	18	-1	+1	4	18.00
9	19	-1	+1	4	18.00
10	5	+1	+1	6	26.00
11	12	+1	+1	6	26.00
12	9	+1	+1	6	26.00
13	6	-1.86	0	3.14	22.00
14	17	+1.86	0	6.86	22.00
15	8	0	-1.86	5	14.56
16	13	0	+1.86	5	29.44
17	2	0	0	5	22.00
18	1	0	0	5	22.00
19	11	0	0	5	22.00
20	4	0	0	5	22.00
21	15	0	0	5	22.00

Keterangan : t dan X₁ = Waktu (jam)
 T dan X₂ = Suhu (°C)
 Std = Standar

3.5 Permodelan

Berdasarkan Novianti, *et al.* (2010), pengolahan data sesuai dengan prosedur yang ada di *Design Expert DX8.0.7.1* adalah sebagai berikut:

1. Data yang dimasukkan pada CCD adalah 2 faktor yaitu faktor lama waktu (X₁) dan faktor suhu (X₂) yang masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali pada batas atas dan batas bawah sedangkan pada titik tengah dilakukan 5 pengulangan sehingga terdapat 21 perlakuan. Respon pada CCD terdapat satu respon yang dioptimasi yaitu rendemen (Y₁).
2. Pendugaan awal pada data yang berasal dari evaluasi untuk model kuadrat. Evaluasi meliputi:

- a. *Aliased models*, yang menentukan apakah model yang dipilih cukup untuk mengestimasi koefisien model yang diinginkan, jika tidak terdapat "*no aliased model*" berarti desain model sudah cukup.
 - b. *Degrees of Freedom / DF* (derajat bebas), desain yang baik mempunyai minimal DF simpangan model 3 dan DF galat murni minimal 4.
 - c. *Variance Inflation Factor (VIF)*, jika suatu koefisien bersifat orthogonal maka nilai VIF adalah 1 jika nilai VIF lebih dari 10 maka mengindikasikan adanya multikolinieritas.
 - d. *Leverage of design points*, jika nilai ini menjauhi satu maka model semakin baik.
 - e. *G-efficiency*, yang merupakan rata-rata ragam prediksi sebagai presentasi ragam prediksi maksimum, nilai yang diinginkan jika paling sedikit 50%.
 - f. *Condition number of the correlation matrix*, mengindikasikan derajat multikolinieritas dan desain bersifat ortogonal.
3. Kemudian dilakukan analisis data pada respon yang diamati. Semua model polynomial untuk respon yang dipilih dicocokkan dengan perhitungan linier, berdasarkan perhitungan statistik jika menunjukkan model nyata, maka model tersebut akan disarankan. Model yang disarankan mempunyai model $P < 0,05$ (berpengaruh nyata) dan simpangan model (*lack of fit*) mempunyai nilai lebih dari 0,1 (tidak berpengaruh nyata).
 4. Selanjutnya dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA) dengan model yang sudah terpilih. Model berpengaruh nyata jika nilai $P < 0,05$ (peluang kesalahan kurang dari 5%), sedangkan model bersifat tidak berpengaruh nyata jika nilainya lebih dari 0,1 (peluang kesalahan lebih dari 10%). Kemudian dilakukan diagnosis dengan menggunakan diagram pencar untuk mengetahui dan melihat sebaran data pada model kuadratik.

5. Langkah terakhir adalah pengoptimalan respon rendemen (Y_1) dengan batasan faktor yang sesuai pada rancangan.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kadar Air

Pada pengujian kadar air yang dilakukan pada sampel segar *Sargassum filipendula* diperoleh hasil sebesar $(91,97 \pm 1,15)\%$. Hal tersebut menunjukkan bahan baku yang digunakan pada penelitian ini masih segar, sehingga layak dijadikan sebagai sampel yang akan digunakan sebagai penelitian. Menurut Maulida (2007), komposisi kimia rumput laut bervariasi antar individu, spesies, habitat, umur panen dan kondisi lingkungan. Kandungan air rumput laut segar, sama seperti tanaman pada umumnya yaitu berkisar antara 80-90% dan setelah pengeringan dengan udara menjadi 10-20%.

Pengujian kadar air juga dilakukan pada ekstrak kasar *Sargassum filipendula* dari masing-masing perlakuan. Hal tersebut bertujuan untuk menentukan rendemen kering ekstrak etanol *Sargassum filipendula* ini. Hasil kadar air ekstrak kasar *Sargassum filipendula* berkisar antara $(94,50 \pm 1,15)\%$ dan $(98,72 \pm 0,05)\%$ dan diperoleh rata-rata kadar air sebesar $(97,49 \pm 1,15)\%$.

Dari hasil kadar air tersebut diperoleh ekstrak kasar *Sargassum filipendula* memiliki kadar air lebih tinggi dibandingkan dengan sampel segarnya. Hal tersebut diduga dipengaruhi oleh proses maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol teknis (96%). Campuran etanol dan air akan membentuk azeotrop dengan perbandingan kira-kira 89 mol% etanol dan 11 mol% air. Perbandingan ini juga dapat dinyatakan sebagai 96% volume etanol dan 4% volume air pada tekanan normal dan suhu 351 K (77,85 °C). Perbandingan etanol dan air inilah yang dinamakan etanol teknis (Anonymous^c, 2013). Dari hal tersebut menunjukkan bahwa etanol teknis (96%) mengandung air yang tidak bisa diuapkan dengan proses evaporasi, karena pada proses evaporasi hanya menggunakan suhu 50 °C sedangkan air yang mempunyai titik

didih 100 °C dapat menguap pada suhu yang mendekati 100 °C, sehingga ekstrak kasar *Sargassum filipendula* memiliki kadar air yang lebih tinggi dibandingkan sampel segarnya. Selain itu tingginya kadar air juga disebabkan oleh di dalam sel rumput laut *Sargassum filipendula* mengandung air seperti pernyataan Alim (2013), bahwa vakuola yang terdapat pada sel tumbuhan umumnya berisi air, fenol, antosianin, protein, glikosida, garam-garam organik, tanin, alkaloid, enzim, dan butir-butir pati. Sehingga ketika rumput laut *Sargassum filipendula* dibekukan lambat maka selnya akan rusak dan air serta senyawa-senyawa lain didalamnya dapat keluar. Menurut Fellows (2000), kristal es memiliki tekanan uap air lebih rendah dibandingkan di dalam sel, maka air akan bergerak keluar sel menuju kristal yang sedang tumbuh. Sel menjadi dehidrasi dan membuat kerusakan permanen oleh peningkatan konsentrasi solut dan merusak struktur sel. Pada proses *thawing* sel tidak kembali ke bentuk awal. Bahan tersebut menjadi lunak dan material sel merembes keluar dari sel yang pecah (*drip*).

4.2 Rendemen

Dari evaluasi model pada respon rendemen ini terdapat derajat bebas untuk simpangan dari model (*Lack of fit*) adalah 3 dan derajat bebas untuk galat murni adalah 12 (Lampiran 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa desain model yang dipilih sudah baik karena desain yang baik memiliki derajat bebas pada simpangan model minimal 3 dan pada galat murni minimal 4. Nilai VIF pada respon ini berkisar antara 1-1,08 (Lampiran 3) yang menunjukkan bahwa tidak terjadi multikolinieritas pada masing-masing variabel, karena multikolinieritas ada apabila nilai VIF lebih dari 10.

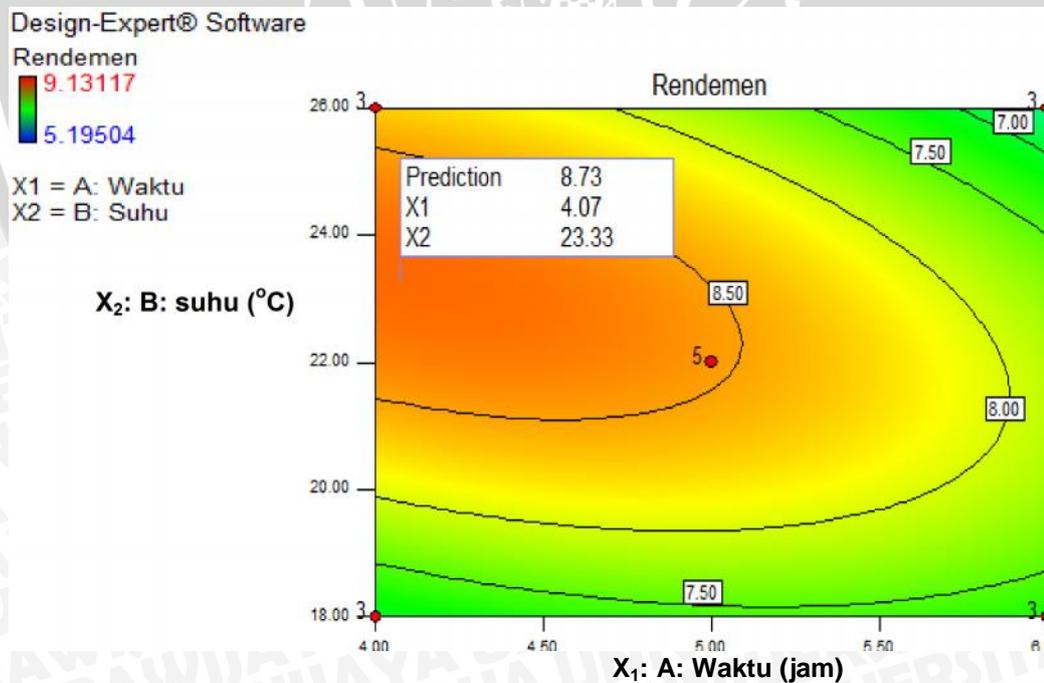
Pada uji normalitas residual yang dilakukan pada respon rendemen datanya cenderung membentuk garis lurus dan tersebar disekitar garis (Lampiran

4) yang menunjukkan bahwa respon ini memiliki data yang normal. Model kuadrat yang dipilih ini menunjukkan model yang sesuai untuk respon ini karena model tersebut disarankan (Lampiran 5).

Pada model yang terpilih menunjukkan model berpengaruh nyata terhadap respon karena $P = 0,0201$ (Signifikan) dan *lack of fit* $P = 0,5259$ (tidak signifikan) yang dapat dilihat pada Lampiran 3 dan diperoleh persamaan pada respon rendemen (Lampiran 3) yaitu:

$$y = -39,42318 + 5,11730 X_1 + 3,23426 X_2 - 0,12054 X_1 X_2 - 0,28294 X_1^2 - 0,058789 X_2^2$$

Dari persamaan tersebut desain model kuadrat menunjukkan titik optimasi faktor terhadap respon yaitu pada waktu pembekuan selama 4,07 jam dengan suhu 23,33 °C dengan rendemen yang diperoleh sebanyak $(8,73 \pm 1.06)\%$ (bk). Kontur dan kurva optimasi perolehan rendemen terdapat pada Gambar 12 dan Gambar 13.



Gambar 12. Kontur Permukaan Respon Hubungan Waktu (X_1) dan Suhu (X_2) Pembekuan Terhadap Rendemen

Design-Expert® Soft

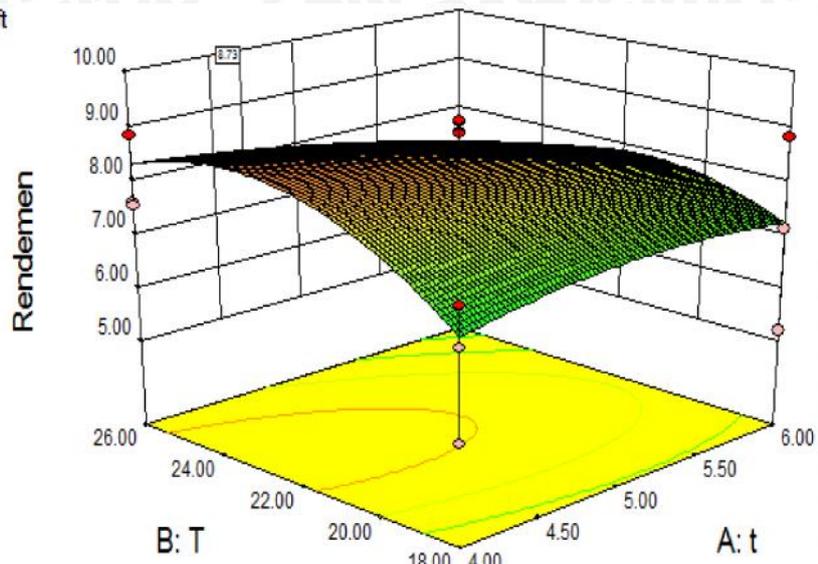
Rendemen

9.13117

5.19504

X1 = A: Waktu

X2 = B: Suhu



Gambar 13. Kurva Permukaan Respon Hubungan Waktu (X_1) dan Suhu (X_2) Pembekuan Terhadap Rendemen

Hasil optimasi rendemen tersebut menunjukkan bahwa selama 4,07 jam bioaktif dari *S. filipendula* telah dapat diekstrak maksimal sehingga memperoleh nilai rendemen optimum ($8,73 \pm 1,06$)%. Titik optimal perolehan rendemen sebanyak ($8,73 \pm 1,06$)% terjadi karena pada proses pembekuan lambat yang dilakukan pada suhu $-23,34$ °C selama 4,07 jam telah menarik komponen bioaktif rumput laut *S. filipendula* secara maksimal. Hal tersebut terjadi karena dinding selnya telah terpecah akibat dari pembekuan lambat yang dilakukan sehingga bioaktif dapat keluar bersama cairan yang keluar dari dalam sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel. Sesuai dengan pernyataan Fellows (2000), selama pembekuan lambat, kristal es tumbuh pada ruang antar sel yang dapat merubah bentuk dan dapat merusak dinding sel didekatnya. Kristal es memiliki tekanan uap air lebih rendah dibandingkan di dalam sel, maka air akan bergerak keluar sel menuju kristal yang sedang tumbuh. Sel menjadi dehidrasi dan membuat kerusakan permanen oleh peningkatan konsentrasi solut dan merusak struktur sel. Pada proses *thawing* sel tidak kembali ke bentuk awal. Bahan tersebut menjadi lunak dan material sel merembes keluar dari sel yang pecah (*drip*).

Rendemen merupakan berat bahan baku yang dapat digunakan atau dimanfaatkan dibandingkan dengan berat total bahan baku yang dinyatakan dalam persen. Nilai rendemen ini digunakan untuk mengukur nilai bioaktif yang terdapat pada bahan sampel *Sargassum filipendula*. Sampel *Sargassum filipendula* yang memiliki nilai rendemen tinggi maka semakin tinggi pula bioaktifnya tersebut, dan sebaliknya jika nilai rendemen rendah maka semakin rendah pula bioaktifnya tersebut. Bahan yang memiliki nilai rendemen tinggi akan lebih efektif digunakan jika dibandingkan dengan bahan yang memiliki nilai rendemen yang rendah.

4.3 Analisis Fitokimia

Pengujian komponen bioaktif pada *Sargassum filipendula* menggunakan metode fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya komponen bioaktif dalam sampel *Sargassum filipendula* yang berpotensi sebagai antioksidan. Analisis fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid dan steroid.

Analisis fitokimia *Sargassum filipendula* dalam hal ini perlu dilakukan, karena dengan pengujian fitokimia dapat diketahui senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman tersebut. Senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman tersebut menunjukkan bahwa adanya potensi antioksidan di dalamnya. Adapun hasil pengujian fitokimia *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Fitokimia *Sargassum filipendula*

No	Uji	Hasil (+/-)	Keterangan
1.	Alkaloid:		
	a. Mayer	+	Terbentuk endapan putih
	b. Wagner	+	Terbentuk endapan coklat
	c. Dragendorf	-	Tidak terjadi perubahan
2.	Flavonoid	+	Terbentuk warna kuning di lapisan amil alkohol
3.	Tanin	+	Terdapat warna hitam kehijauan
4.	Saponin	+	Terdapat busa selama 2-3 menit
5.	Triterpenoid	-	Hanya terbentuk warna biru
6.	Steroid	+	Terbentuk warna biru

Keterangan : (+) = mengandung senyawa fitokimia

(-) = tidak mengandung senyawa fitokimia

Hasil uji fitokimia pada Tabel 7 menunjukkan bahwa sampel segar *Sargassum filipendula* mengandung 5 senyawa bioaktif dari 6 senyawa bioaktif yang diuji dengan metode fitokimia (Marlinda, *et al.* 2012). Senyawa bioaktif tersebut antara lain senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid.

1. Alkaloid

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang dilakukan menunjukkan sampel *Sargassum filipendula* mengandung senyawa alkaloid. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya tanda positif yang ditunjukkan oleh dua dari tiga pereaksi yang digunakan untuk menguji senyawa alkaloid pada sampel, yaitu pereaksi Mayer dan Wagner sedangkan dengan pereaksi Dragendorf menunjukkan hasil yang negatif (Lampiran 9a). Hasil positif yang ditunjukkan pada pereaksi Mayer ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna putih.

Pada pereaksi Wagner ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna coklat. Menurut Sudirman (2011), endapan coklat yang terbentuk pada uji fitokimia dengan pereaksi Wagner diperkirakan adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodide menghasilkan ion I_3^- yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada ion logam K^+ akan membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap.

Pada sampel yang diberi pereaksi Dragendorff tidak terjadi perubahan sehingga menunjukkan hasil yang negatif. Perubahan warna pada uji alkaloid terdapat pada Lampiran 9a.

2. Flavonoid

Pada sampel *Sargassum filipendula* yang dilakukan uji fitokimia menunjukkan sampel tersebut mengandung senyawa flavonoid, karena terbentuk warna kuning pada lapisan amil alkohol (Lampiran 9b). perubahan warna kuning yang tersebut karena senyawa flavonoid bereaksi dengan senyawa amoniak yang ditambahkan pada sampel. Seperti halnya menurut Harborne (1987), flavonoid berupa senyawa fenol, oleh karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau amoniak.

3. Tanin

Pada hasil uji fitokimia diketahui sampel *Sargassum filipendula* mengandung senyawa tanin. Hal tersebut ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna hijau kehitaman (Lampiran 9e) setelah sampel ditambah larutan FeCl_3 1%. Menurut Marlinda, *et al.* (2012), pada penambahan larutan FeCl_3 1% diperkirakan larutan ini bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin dan membentuk warna hijau kehitaman. Pereaksi FeCl_3 dipergunakan secara luas untuk mengidentifikasi senyawa fenol termasuk tanin.

4. Saponin

Pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau memekatkan ekstrak tumbuhan merupakan bukti terpercaya akan adanya saponin (Harborne, 1987). Hal tersebut terjadi pada sampel *Sargassum filipendula* yang terbentuk busa ketika sampel tersebut setelah ditambahkan aquades dan didihkan selama 2-3 menit yang kemudian dikocok terlihat busa yang stabil (Lampiran 9c). Menurut Marlinda, *et al.* (2012), senyawa yang

membentuk gugus polar dan non polar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air, saponin dapat membentuk misel. Pada struktur misel, gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus nonpolarnya menghadap ke dalam. Keadaan tersebut yang nampak seperti busa.

5. Triterpenoid dan Steroid

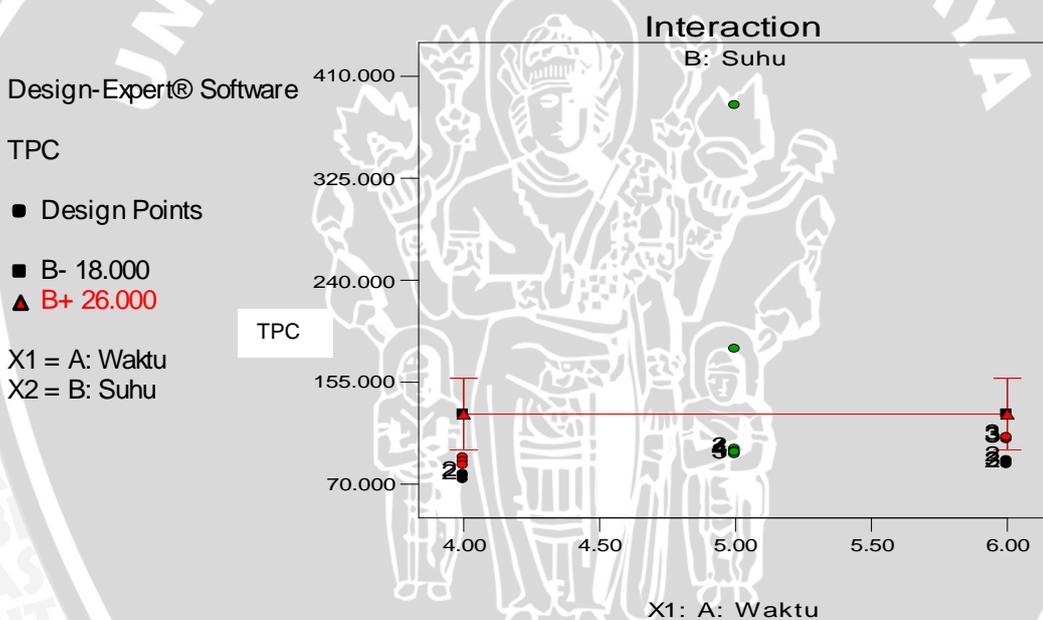
Kandungan triterpenoid dan steroid dalam tumbuhan diuji dengan menggunakan metode Liebermann-Buchard yang nantinya akan memberikan warna jingga atau ungu untuk triterpenoid dan warna biru untuk steroid (Marlinda, *et al.* 2012). Uji kandungan triterpenoid dan steroid ini berdasarkan pada adanya senyawa triterpenoid dan steroid yang membentuk warna biru akibat H_2SO_4 yang bercampur dengan pelarut asetat glasial. Hal tersebut menunjukkan sampel *Sargassum filipendula* mengandung senyawa steroid karena terbentuk warna biru dan tidak mengandung senyawa triterpenoid karena tidak terbentuk warna jingga atau ungu (Lampiran 9d).

4. 4 Total Polyphenol Content (TPC) *Sargassum filipendula*

Uji *total polyphenol content* (TPC) ini dilakukan untuk mengetahui jumlah fenol yang terdapat pada masing-masing ekstrak dengan perlakuan yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan tersebut, diperoleh hasil TPC berkisar antara 73,500-407,750 mg GAE/g ekstrak dan diperoleh rata-ratanya yaitu 128,411 mg GAE/g ekstrak. Grafik interaksi suhu dan waktu pembekuan terhadap respon TPC terdapat pada Gambar 14. Hasil analisis TPC yang diperoleh menggunakan desain model yang terpilih pada respon ini adalah model *mean* (rata-rata). Model *mean* ini menunjukkan standar deviasi terbesar yaitu 92,82 dan memiliki R^2 yang terendah yaitu 0% yang menunjukkan bahwa faktor waktu dan faktor suhu pada penelitian tentang pembekuan lambat ini tidak

memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil *total polyphenol content* (TPC). Analisis ragam (ANOVA) dari respon TPC terdapat pada Lampiran 7.

Nilai rata-rata TPC jika dibandingkan dengan sampel kontrol yang tidak diberi perlakuan atau yang tidak dibekukan lambat maka hasil TPC yang dibekukan lambat yang memiliki hasil rata-rata lebih besar yaitu 128,411 mg GAE/g ekstrak dibandingkan dengan sampel yang kontrol yang memiliki nilai TPC rata-rata sebesar 54,125 mg GAE/g ekstrak. Dari hasil tersebut maka untuk memperoleh hasil TPC yang tinggi, lebih baik sampel dibekukan lambat agar dapat memecah dinding selnya sehingga dapat mengekstrak bioaktif termasuk fenol lebih banyak.



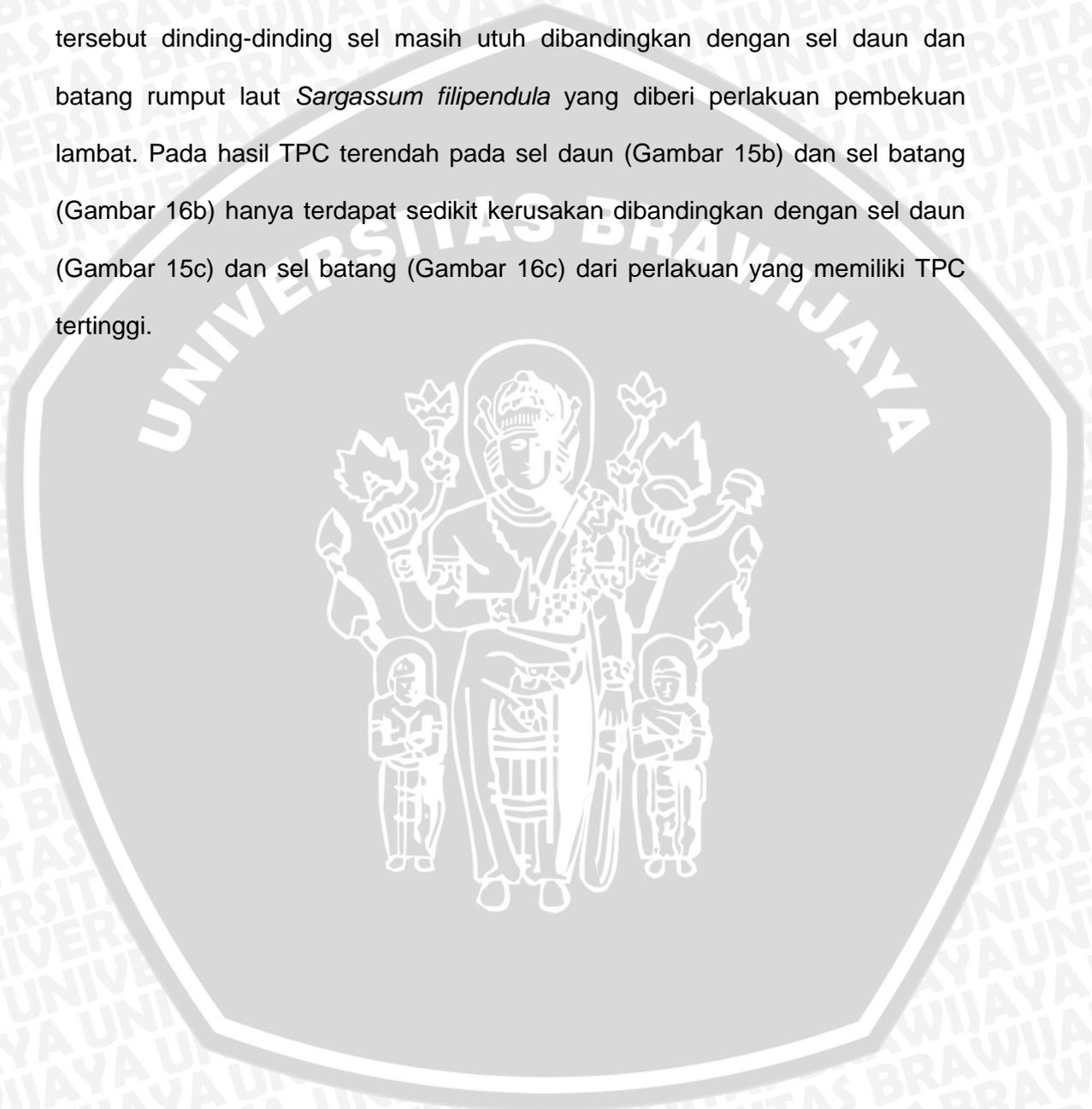
Gambar 14. Grafik Interaksi Pengaruh Waktu (X₁) dan Suhu (X₂) Pembekuan Terhadap Respon *Total Polyphenol Content* (TPC)

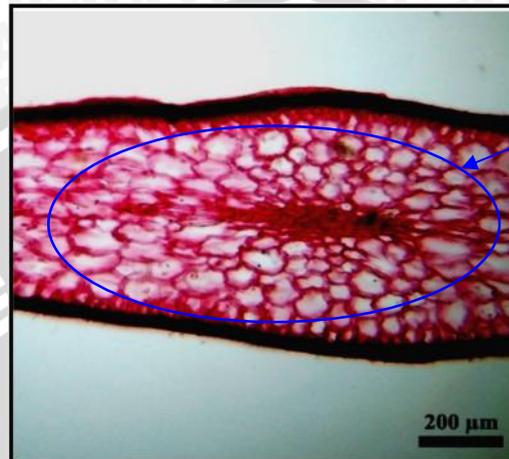
Pada respon TPC ini menggunakan desain model *mean* karena dari hasil penelitian yang diperoleh tidak memberikan perbedaan yang nyata antara masing-masing perlakuan waktu dan suhu pembekuan lambat terhadap senyawa fenol pada rumput laut *Sargassum filipendula*. Hal tersebut terlihat pada data hasil penelitian yang terdapat pada Lampiran 1 yang menunjukkan antara perlakuan tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Pembekuan lambat yang

dilakukan ini dengan waktu ± 4 jam diduga telah mampu mengekstrak seluruh fenol dari rumput sehingga pada penambahan waktu yang diberikan pada proses pembekuan lambat ini tidak memberikan perbedaan yang nyata. Hasil penelitian Nei, *et al.* (1964), menunjukkan pembekuan lambat yang dilakukan pada waktu selama 4 jam terjadi penurunan persentase kadar air yang signifikan dan pada waktu selanjutnya penurunan kadar air semakin sedikit. Hal tersebut menunjukkan kerusakan sel akibat pembekuan lambat mengakibatkan air yang terdapat di dalam sel keluar dan fenol yang terdapat didalam sel juga dapat keluar karena fenol merupakan senyawa yang mudah larut dalam air. Fenol merupakan senyawa yang berasal dari tumbuhan yang umumnya ditemukan di dalam vakuola sel yang memiliki khas berupa cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil dan memiliki sifat mudah larut dalam air (Rahayu, 2012).

Pada hasil TPC terendah yaitu 73,500 mg GAE/g ekstrak diperoleh dari perlakuan pembekuan lambat pada suhu -18°C selama 4 jam. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada perlakuan tersebut *polyphenol* belum terekstrak secara maksimal. Berdasarkan hasil foto mikroskop yang dilakukan pada sel rumput laut hanya memberikan sedikit kerusakan pada sel. Sedangkan dari hasil tertinggi, yaitu sebesar 407,750 mg GAE/g ekstrak yang diperoleh dari perlakuan pembekuan lambat pada suhu -22°C selama 6,86 jam. Kerusakan yang terjadi pada pembekuan lambat dengan suhu -22°C selama 6,86 jam semakin besar karena waktu pembekuan yang lama tersebut menjadikan TPC pada perlakuan ini lebih besar sehingga senyawa bioaktif termasuk *polyphenol*, untuk keluar dari selnya memiliki waktu yang lebih lama. Kerusakan yang terjadi pada sel daun dan batang rumput laut *Sargassum filipendula* terdapat pada Gambar 15 dan Gambar 16.

Pada Gambar 15 dan 16 terlihat perbedaan sel daun dan sel batang rumput laut *Sargassum filipendula* yang masih segar (sebelum diberi perlakuan) dengan sel yang telah dibekukan. Pada sampel segar sel daun (Gambar 15a) dan sel batang (Gambar 16a) tidak terdapat kerusakan. Terlihat pada gambar tersebut dinding-dinding sel masih utuh dibandingkan dengan sel daun dan batang rumput laut *Sargassum filipendula* yang diberi perlakuan pembekuan lambat. Pada hasil TPC terendah pada sel daun (Gambar 15b) dan sel batang (Gambar 16b) hanya terdapat sedikit kerusakan dibandingkan dengan sel daun (Gambar 15c) dan sel batang (Gambar 16c) dari perlakuan yang memiliki TPC tertinggi.





Sel Utuh

(a)



Sel Rusak



Sel Rusak

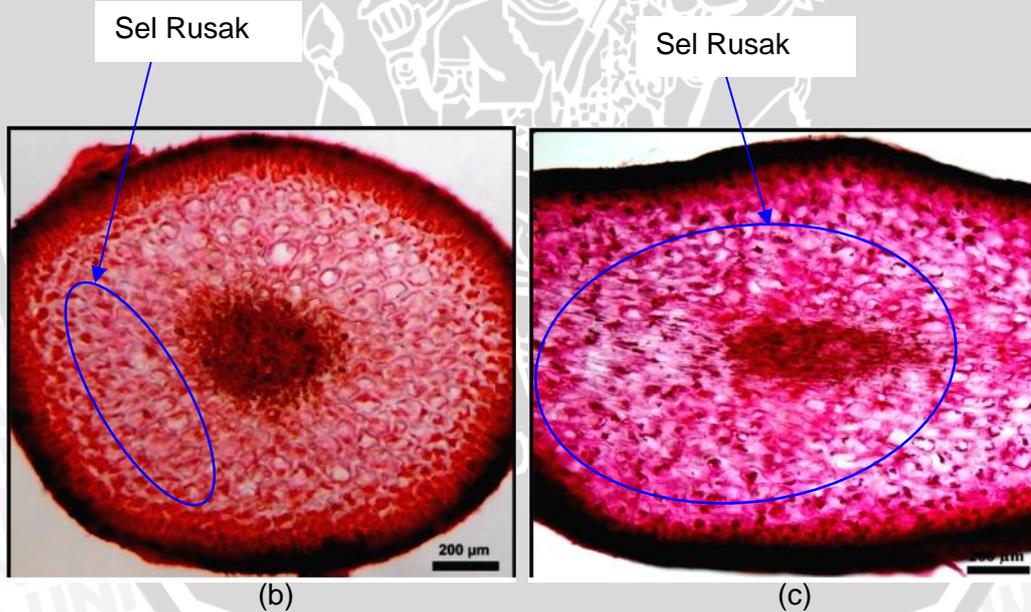
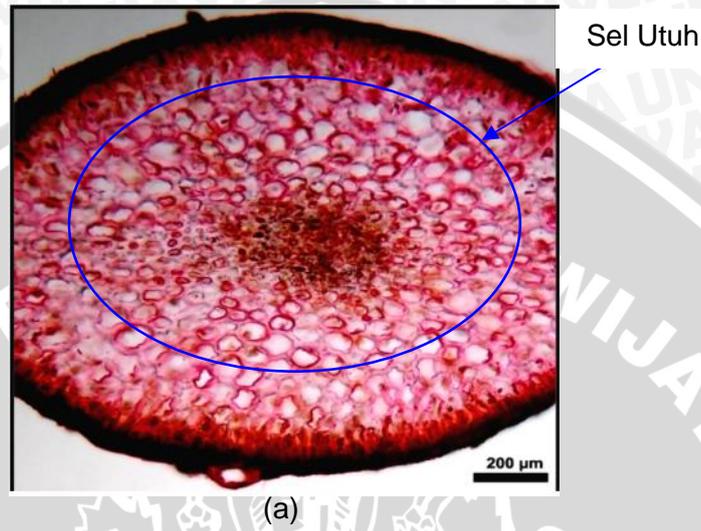
(b)

(c)

Gambar 15. Perbedaan Sel Daun *Sargassum filipendula* Segar dan Diberi Perlakuan Pembekuan Lambat dengan Perbesaran 200 μm .

(a) Segar, (b) Pembekuan Suhu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ Selama 4 Jam dan

(c) Pembekuan Suhu $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ Selama 6,86 Jam



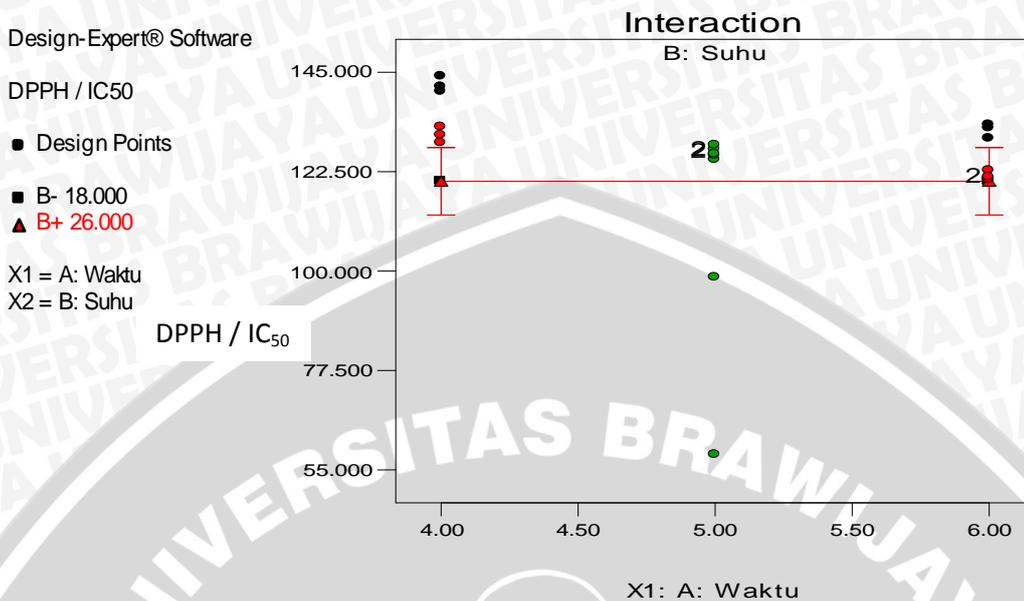
Gambar 16. Perbedaan Sel Batang *Sargassum filipendula* Segar dan Diberi Perlakuan Pembekuan Lambat dengan Perbesaran 200 μm .
 (a) Segar, (b) Pembekuan Suhu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ Selama 4 Jam dan
 (c) Pembekuan Suhu $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ Selama 6,86 Jam

4.5 Aktifitas Antioksidan *Sargassum filipendula* dengan Metode DPPH

Senyawa antioksidan yang terdapat pada bahan *Sargassum filipendula* ini dapat diketahui dengan melakukan uji aktivitas antioksidan yaitu dengan metode DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH dipilih karena menurut Apriandi (2011), metode ini sederhana, mudah, cepat, peka dan hanya memerlukan sedikit sampel.

Penggunaan DPPH sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan antioksidan yang ada pada ekstrak sampel, yaitu dapat diketahui dengan perubahan warna yang terjadi pada larutan DPPH yang awalnya berwarna ungu setelah bereaksi dengan ekstrak yang mengandung antioksidan akan berubah warna menjadi warna kuning. Ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan yang besar maka warna ungu dari larutan DPPH akan semakin berkurang dan membentuk warna kuning, sedangkan ekstrak yang aktivitas antioksidannya kecil maka hanya akan memberikan sedikit perubahan warna ungu dari larutan DPPH. Aktivitas antioksidan dapat diketahui dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan diperoleh nilai IC_{50} pada ekstrak berkisar antara 55,573-144,070 ppm dan diperoleh rata-rata yaitu sebesar 120,313 ppm. Grafik interaksi pengaruh suhu dan waktu pembekuan terhadap respon IC_{50} terdapat pada Gambar 17. Aktivitas antioksidan dari masing-masing perlakuan ini sama halnya dengan hasil dari TPC yang menunjukkan hasil yang terdapat pada Lampiran 1 terlihat bahwa tidak berbeda nyata pada masing-masing perlakuan, sehingga desain model yang digunakan pula yaitu model *mean* dengan standar deviasinya sebesar 23,72 dan R^2 sebesar 0%. Analisis ragam (ANOVA) dari respon DPPH terdapat pada Lampiran 8.



Gambar 17. Grafik Interaksi Pengaruh Waktu (X₁) dan Suhu (X₂) Pembekuan Terhadap Respon DPPH / IC₅₀

Hasil aktivitas antioksidan yang memiliki IC₅₀ terendah yaitu 55,573 ppm diperoleh dari perlakuan pembekuan lambat yang diberikan pada sampel dengan suhu pembekuan -22 °C yang dibekukan selama 6,86 jam menunjukkan perlakuan ini dapat menghasilkan antioksidan yang kuat. Sedangkan aktivitas antioksidan tertinggi yaitu 144,070 ppm diperoleh dari perlakuan pembekuan lambat pada suhu -18 °C yang dibekukan selama 4 jam yang menunjukkan pada perlakuan ini menghasilkan antioksidan sedang. Sama halnya dengan uji *total polyphenol content* (TPC) yang memiliki hasil TPC tertinggi pada suhu -22 °C yang dibekukan selama 6,86 jam dan yang terendah pada suhu -18 °C yang dibekukan selama 4 jam. Dalam hal ini menunjukkan bahwa tinggi rendahnya aktivitas antioksidan seiring dengan tinggi rendahnya TPC yang diperoleh, karena senyawa *polyphenol* merupakan senyawa yang bersifat sebagai antioksidan sehingga nilai IC₅₀ dapat dipengaruhi oleh nilai TPC. Menurut Sudirman (2011), senyawa fenol yang terdapat pada ekstrak memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan ditambahkan oleh Barus (2009), komponen

yang dikandung oleh sumber-sumber antioksidan tersebut adalah sejenis polifenol (turunan fenol yang mempunyai aktivitas antioksidan) dan bioflavonoid (kumpulan senyawa polifenol dengan antioksidan cukup tinggi), selain itu didukung pula oleh hasil penelitian Escudero, *et al.* (2008), bahwa komponen polifenol yang diisolasi dari daun *Piper aduncum* L. memiliki aktivitas antioksidan dan menurunkan kadar hidrogen peroksida secara *in-vivo*.

Hasil rata-rata pengaruh waktu dan suhu pembekuan lambat terhadap respon IC_{50} sebesar 120,313 ppm menunjukkan bahwa hasil dari pembekuan lambat ini menghasilkan aktivitas antioksidan yang tergolong sedang karena berada pada kisaran 100-150 ppm. Menurut Sudirman (2011), suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila memiliki IC_{50} kurang dari 0,05 mg/ml, kuat apabila nilai IC_{50} antara 0,05-0,10 mg/ml, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 0,10-0,15 mg/ml dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 0,15-0,20 mg/ml. Aktivitas antioksidan rumput laut *Sargassum filipendula* yang diberi perlakuan pembekuan lambat memiliki aktivitas yang lebih besar jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol yang hanya memiliki rata-rata sebesar 167,965 ppm yang tergolong antioksidan lemah.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Rumput laut coklat *Sargassum filipendula* segar memiliki kadar air sebesar $(92,00 \pm 1,15)\%$ dan ekstrak kasarnya setelah dibekukan memiliki kadar air rata-rata sebesar $(97,48 \pm 1,15)\%$.

Pembekuan lambat pengaruh waktu dan suhu pada rumput laut coklat *S. filipendula* dari model desain kuadratik yang terpilih untuk respon rendemen memiliki persamaan model yaitu:

$$y = -39,42318 + 5,11730 X_1 + 3,23426 X_2 - 0,12054 X_1 X_2 - 0,28294 X_1^2 - 0,058789 X_2^2$$

dengan titik optimal $(8,73 \pm 1,06)\%$ (bk) yang tercapai pada suhu $-23,3^\circ\text{C}$ selama 4,07 jam. Sedangkan pada respon TPC dan IC_{50} faktor suhu dan waktu pembekuan lambat tidak memberikan hasil optimal karena tidak ada perbedaan yang nyata pada respon. Pada respon TPC diperoleh hasil berkisar antara 73,500-407,750 mg GAE/g ekstrak dan rata-rata sebesar 128,411 mg GAE/g ekstrak. Pada respon IC_{50} diperoleh hasil berkisar antara 55,573-144,070 ppm dan rata-rata sebesar 120,313 ppm yang menunjukkan pembekuan lambat ini menghasilkan antioksidan yang bermutu sedang.

5.1 Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini yaitu perlunya dilakukan penelitian lanjutan berupa pemurnian ekstrak kasar dan pengujian aktivitas antioksidan terhadap ekstrak murni. identifikasi senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat pada sampel segar dan sampel setelah diberi perlakuan pembekuan lambat sehingga dapat mengetahui senyawa yang hilang dan bertambah dengan adanya pembekuan lambat tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawyah, R. 2007. **Pengolahan dan Pengawetan Ikan**. PT Bumi Aksara. Jakarta. 159 Hlm.
- Alim, T. 2013. **Vakuola**. <http://www.biologi-sel.com/2013/02/vakuola.html>
Diakses 11 Juni 2013
- Anonymous. 2012^a. **Taxonomi *Sargassum filipendula***.
http://algaebase.org/search/species/detail/?species_id=823&sk=0&from=results. Diakses 29 november 2012
- _____. 2012^b. **Fisiologi, Morfologi dan Daur Hidup Alga Coklat**.
<http://budisma.web.id/materi/sma/biologi-kelas-x/ciri-ciri-alga-coklat-phaeophyta/>. Diakses 3 Desember 2012
- _____. 2012^c. **Etanol**. <http://id.wikipedia.org/wiki/etanol>. Diakses 10 Desember 2012
- Apostolidis, E. dan C. M. Lee. 2010. ***In Vitro* Potential of *Ascophyllum nodosum* Phenolic Antioxidant-Mediated -Glucosidase and -Amylase Inhibition**. Journal of Food Science. Vol. 75, No. 3. Hlm 97-102
- Aryanti, L. 2011. **Pemanfaatan Rumput Laut *Sargassum* Sp. Sebagai Adsorben Limbah Cair Industri Rumah Tangga Perikanan**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Apriandi, A. 2011. **Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Keong Ipong-ipong (*Fasciolaria salmo*)**. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Barus, P. 2009. **Pemanfaatan Bahan Pengawet dan Antioksidan Alami Pada Industri Bahan Makanan**. Universitas Sumatera Utara. Medan. 27 hlm.
- Campbell, N. A., J. B. Reece dan L. G. Mitchell. 2003. **Biologi**. Penerjemah, Wasmen Manalu. Penerbit Erlangga. Jakarta. 472 Hlm. Hlm 399.
- Desrosier, N. W. dan D. K. Tressler. **Fundamentals of Food Freezing**. Avi Publishing Company, Inc. United State of America. Hlm 127-128
- Dewi, L. T. 1999. **Optimasi Kualitas Warna Minyak Goreng Dengan Response Surface Methodology di PT. Damai Sentosa Cooking Oil**. Fakultas Teknik, Universitas Kristen Petra. Surabaya.
- Djukri. 2005. **Pertumbuhan dan Produksi Kangkung Pada Berbagai Dosis Hara Makro dan Mikro**. *Environmental* 5 (1) : 34-37
- Escudero MR, Escudero FR, Remsberg CM, Takemoto JK, Davies NM, Yanez JA. 2008. Identification of polyphenols and antioxidant capacity of *Piper aduncum*. *The Open Bioactive Compounds Journal* 1:18-21.

- Fataruba, H. 2010. **Penelitian Eksperimen**. <http://taliabupomai.blogspot.com/2010/11/metode-penelitian-eksperimen.html>. Diakses tanggal 24 April 2012.1 Hlm.
- Fateha. 2007. **Teknik Penanganan Pascapanen Rumput Laut Coklat, *Sargassum filipendula* Sebagai Bahan Baku Alginat**. *Buletin Tek. Lit. Akuakultur*. Vol. 6, No. 1
- Fellows, P. J. 2000. **Food Processing Technology**. Woodhead Publishing Limited. USA.
- Fitter, A. H. dan R. K. M. Hay. 1991. **Fisiologi Lingkungan Tanaman (*Environmental Physiology of Plantnngq*)**. Penerjemah Andani, S. dan E. D. Purbayanti. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 421 Hal.
- Food Review Indonesia. 2007. **Teknologi Pembekuan Pangan**. Vol. II, No. 7
- Harborne. J. B. 1987. **Metode Fitokimia**. Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediso. ITB Press. Bandung.
- Hart, H., L. E. Craine, dan D. J. Hart. 2003. **Organic Chemistry (Kimia Organik)**. Terjemah oleh Achmadi S. S. Erlangga. Jakarta.
- Heldman, D. R. dan R. P. Singh. 1981. **Food Process Engineering**. The AVI Pub. Co. Inc. Westport.
- Johnston, W. A., F. J. Nicholson, A. Roger dan G. D. Stroud. 1994. **Freezing and Refrigerated Storage in Fisheries**. FAO Fisheries Technical Paper 340. Roma.
- Ketaren, S. 1986. **Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan**. UI Press. Jakarta.
- Kuncahyo, I dan Sunardi. 2007. **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhua belimbi.L*) Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picryhidrazyl (DPPH)**. Seminar Nasional Teknologi. ISSN 1977-1978.
- Kuntorini, E. M., M. D. Astuti, dan N. Milina. 2011. **Struktur Anatomi dan Kerapatan Sel Sekresi Serta Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) Asal Kecamatan Pengaron Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan**. *Bioscientiae*. Vol. 8, No. 1
- Lumbanraja, L. B. 2009. **Skrining Fitokimia dan Uji Efek Antiinflamasi Elstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Terhadap Radang Pada Tikus**. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Maulana, A. 2012. **Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Eucheuma spinosum***. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Maulida, R. 2007. **Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Caulerpa lentillifera***. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Maulida, D. dan N. Zulkarnaen. 2010. **Ekstraksi Antioksidan (Likopen) Dari Buah Tomat Dengan Menggunakan Solven Campuran, n-Heksana, Aseton dan Etanol**. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Manurung, M. 2011. **Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SFS) Dari Limbah Ekstraksi Alginat Untuk Pembuatan Bioetanol**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Marks, D., A. Marks dan C. Smith. 2000. **Basic Medical Biochemistry: a clinical approach (Biokimia Kedokteran Dasar : sebuah pendekatan klinis)**. Pendit B, Penerjemah. Jakarta : Buku Kedokteran.
- Marlinda, M., M. S. Sangi dan A. D. Wuntu. 2012. **Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitan Ekstrak etanol Biji Buah Alpokat (*Persea Americana* Mill.)**. Jurnal MIPA Unsrat Online 1 (1) 24-28
- Muawwanah, I. Setyaningsih, W. Zahiruddin, dan J. Anggadiredja. 1997. **Ekstraksi Antioksidan dari Alga Laut *Sargassum sp.* dan Efektivitasnya Dalam Menghambat Kerusakan Awal Emulsi Minyak Ikan**.
- Nei, T., H. Souzu dan N. Hanafusa. 1964. **Effect of the Rate of Cooling upon the Rate of Drying and the Residual Moisture Content of Specimens in Freezing-Drying**. Medical Section, The Institute of Low Temperature Science. Hokaido University. Jepang. Hal 7-13.
- Novianti, T., Wignyanto dan I. Nurika. 2010. **Optimasi Produksi Penghasil β -Karoten dari Kapang *Neurospora sitophila* menggunakan Metode Permukaan Respon (Kajian : Lama Fermentasi dan Konsentrasi Starter)**. Jurnal Teknik Pertanian Voluma 5, No. 2 : 64-75
- Nurmillah, O. Y. 2009. **Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.)**. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 71 Hlm.
- Podungge, F. 2012. **Kandungan Fenol, Senyawa Fitokimia, dan Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Padina australis***. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rahayu, M. D. 2012. **Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Secara *In Vitro***. Universitas Pembangunan Nasional Vetran Jakarta. Jakarta.

- Rahayu, T. 2006. **Uji Daya Inhibisi Ekstrak Kasar Flavonoid Sambiloto (*Andrographis paniculata* [burm. F] Ness) dan Temu Putih (*Curcuma zedoaria* Roscoe) Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase Secara *In Vitro***. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 34 Hlm.
- Santoso, J., N. Aryudhani dan S. H. Suseno. 2009. **Kandungan Senyawa Fenol Rumput Laut Hijau *Caulerpa racemosa* dan Aktivitas Antioksidan**. Jurnal Kelautan Nasional. Vol. 2. Hal 109-118
- Setyaningsih, S., Suparmo dan Retno I. 2004. **Pengaruh Perendaman Buah Nangka dalam Larutan Garam Kalsium Terhadap Tekstur Buah Setelah Pembekuan**. Agrosains 17 (3) : 379-387.
- Silaban, L. W. 2009. **Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Dari Kulit Buah Sentul (*Sandoricum koetjape* (Burm. f.) Merr) Terhadap Beberapa Bakteri Secara *In Vitro***. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Siswanto, S. 2008. **Keanekaragaman Hayati**. Makalah. Medan: Jurusan Biologi. Universitas Sumatera Utara.
- Somogyi, L. P., M. D. Barret, dan Y. H. Hui. 1996. **Major Processed Products**. Technomic Publishing Company. USA.
- Srilakshmi, B. 2005. **Food Science Third Edition**. New Age International Publisher. New Delhi. Hal. 334.
- Sudarmadji, S. B., Haryono dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Liberty. Yogyakarta.
- Sudirman, S. 2011. **Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kangkung Air (*Ipomoea aquatica* Forsk.)**. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 79 Hlm
- Sulisetijono. 2009. **Bahan Serahan Alga**. Malang: UIN Malang.
- Sulistiono, W. 2009. **Analisis Mikroskopis dan Vitamin Semanggi Air *Marsilea crenata* Presl. (Marsileaceae)**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Surakhmad, W. 1994. **Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar**. Tarsito. Bandung. 239 hlm.
- Suryaningrum, D., T. Wikanta, dan H. Kristiana. 2006. **Uji Aktivitas Antioksidan dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euchema cottonii***. Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan 1 (1) : 51-63.
- Suyoso, H. C. 2011. **Uji Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.)**. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.

- Tamat, S. R., T. Wikanta, dan L. S. Maulina. 2007. **Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal**. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. Vol. 5, No.1. Hal. 31-36
- Thomas, M. 2006. **Frozen Fish on Reefer Vessels and in Containers**. Thomas Miller P&I Ltd. United Kingdom.
- Triadmodjo, B. 1999. **Teknik Pantai**. Beta Offset. Yogyakarta.
- Vijayabaskar, P. dan V. Shiyamala. 2012. **Antioxidant Properties of Seaweed Polyphenol from *Tubinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848**. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* : 1-9.
- Vaclavik, V. A. dan E. W. Christian. 2008. **Essentials of Food Science** Third Edition. Springer. New York.
- Vogel, A. I. 1987. **Textbook of Practical Organic Chemistry**. Revised by Furnies B.S. 4nd Edition. New York.
- Wilson, C. L. dan W. E. Loomis. 1952. **Botany**. Holt, Rinehart and Winston, Inc. United States America.
- Wiratmaja, I. G. 2011. **Proses Fermentasi Limbah Rumput Laut *Eucheuma Cottonii* Sebagai Tahap Awal Pembuatan Etanol Generasi Kedua**.
- Yudha, I. G. 2004. **Pemanfaatan Pesisir dan Laut untuk Kegiatan Budidaya Perikanan Berbasis Ekosistem dan Masyarakat**. Makalah Pelatihan untuk Pelatih Pengelolaan (TOT) Wilayah Pesisir Terpadu. Bogor. Kerjasama PKSPL IPB – Proyek Pesisir CRC URI.
- Yunizal. 2004. **Teknologi Pengolahan Alginat**. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 66 Hal.

Lampiran 1

Data Hasil Penelitian

Std	Run	Faktor Kode		Faktor Aktual		Respon		
		X ₁	X ₂	t	T	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	7	-1	-1	4	18.00	5.20	78.000	141.700
2	10	-1	-1	4	18.00	7.54	76.625	140.624
3	20	-1	-1	4	18.00	6.84	73.500	144.070
4	3	+1	-1	6	18.00	5.20	86.000	133.107
5	14	+1	-1	6	18.00	7.14	87.750	132.345
6	21	+1	-1	6	18.00	8.82	89.625	130.002
7	16	-1	+1	4	26.00	7.64	91.875	129.024
8	18	-1	+1	4	26.00	7.58	88.625	130.732
9	19	-1	+1	4	26.00	8.86	85.375	132.592
10	5	+1	+1	6	26.00	7.14	106.875	122.744
11	12	+1	+1	6	26.00	7.54	107.750	120.688
12	9	+1	+1	6	26.00	5.20	108.875	121.256
13	6	-1.86	0	3.14	22.00	9.13	158.125	101.258
14	17	+1.86	0	6.86	22.00	6.84	407.750	55.573
15	8	0	-1.86	5	14.56	5.66	182.375	98.570
16	13	0	+1.86	5	29.44	5.75	385.500	58.416
17	2	0	0	5	22.00	8.90	95.375	127.521
18	1	0	0	5	22.00	8.33	94.375	128.491
19	11	0	0	5	22.00	9.09	99.000	125.208
20	4	0	0	5	22.00	8.46	97.125	126.183
21	15	0	0	5	22.00	9.13	96.125	126.461

Keterangan : Respon = Parameter Uji
 X₁ dan t = Waktu (jam)
 X₂ dan T = Suhu (°C)
 Y₁ = Rendemen (%)
 Y₂ = Total polyphenol content (mg GAE/g ekstrak)
 Y₃ = DPPH / IC₅₀ (ppm)

Lampiran 2

Design Summary Hasil Rancangan Penelitian

Design Summary

Study Type	Response Surface	Runs	21
Initial Design	Central Composite	Blocks	No Blocks
Design Model	Quadratic		

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.
A	Waktu	Jam	Numeric	4.00	6.00	-1.000	1.000	5.000	0.949
B	Suhu	oC	Numeric	18.00	26.00	-1.000	1.000	22.000	3.798

Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	Rendemen	%	21	Polynomial	5.195	9.131	7.427	1.353	1.758	None	Quadratic
Y2	TPC	mg GAE/g ek	21	Polynomial	73.500	407.750	123.411	90.578	5.548	None	Mean
Y3	DFPH / IC50	oom	21	Polynomial	55.573	144.070	120.313	23.148	2.592	None	Mean



Lampiran 3

Analysis of Variance (ANOVA) Respon Rendemen

Response 1 Rendemen

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	21.49	5	4.30	3.80	0.0201	significant
A-Waktu	2.51	1	2.51	2.22	0.1571	
B-Suhu	0.61	1	0.61	0.54	0.4745	
AB	2.79	1	2.79	2.47	0.1372	
A ²	1.41	1	1.41	1.24	0.2821	
B ²	15.56	1	15.56	13.75	0.0021	
Residual	16.97	15	1.13			
Lack of Fit	2.78	3	0.93	0.78	0.5259	not significant
Pure Error	14.19	12	1.18			
Cor Total	38.46	20				

Std. Dev.	1.06	R-Squared	0.5587
Mean	7.43	Adj R-Squared	0.4117
C.V. %	14.32	Pred R-Squared	0.1073
PRESS	34.33	Adeq Precision	6.319

Factor	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Intercept	8.53	1	0.43	7.61	9.45	
A-Waktu	-0.36	1	0.24	-0.89	0.16	1.00
B-Suhu	0.18	1	0.24	-0.34	0.70	1.00
AB	-0.48	1	0.31	-1.14	0.17	1.00
A ²	-0.28	1	0.25	-0.82	0.26	1.08
B ²	-0.94	1	0.25	-1.48	-0.40	1.08

Persamaan hasil optimasi rendemen

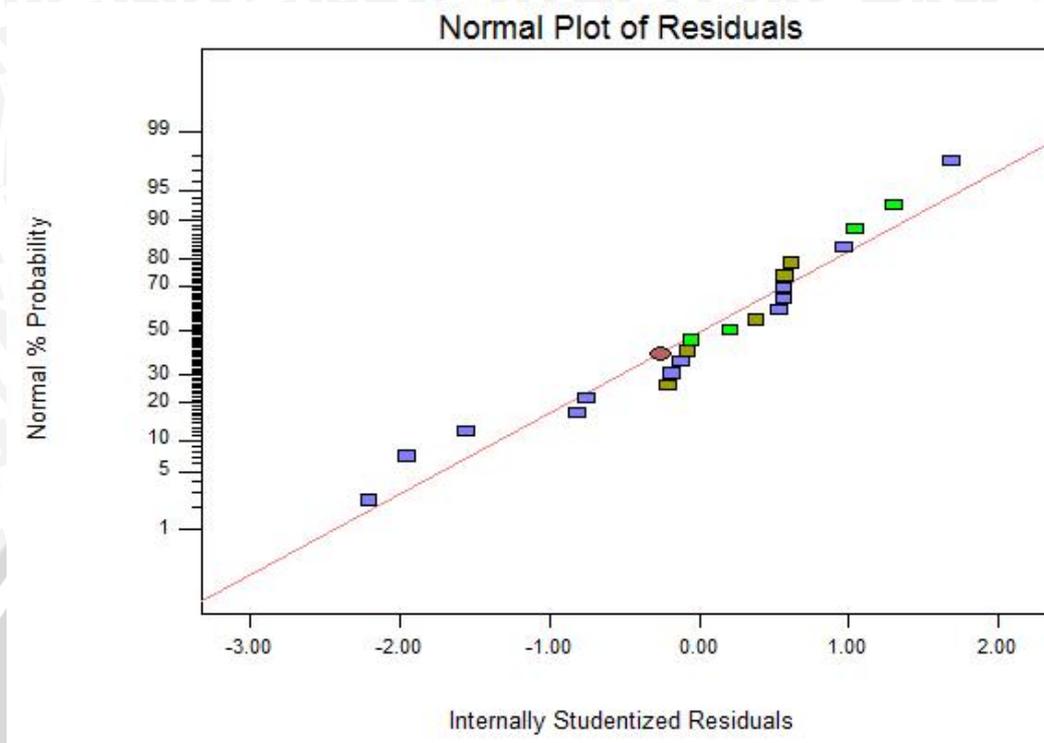
Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} = & +8.53 \\ & -0.36 * A \\ & +0.18 * B \\ & -0.48 * A * B \\ & -0.28 * A^2 \\ & -0.94 * B^2 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} = & -39.42318 \\ & +5.11730 * t \\ & +3.23426 * T \\ & -0.12054 * t * T \\ & -0.28294 * t^2 \\ & -0.058789 * T^2 \end{aligned}$$

Lampiran 4



Lampiran 5

Models Fit Summary

Response 1 Rendemen Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model and higher are Aliased! ***

Summary (detailed tables shown below)

	Sequential	Lack of Fit	Adjusted	Predicted	
Source	p-value	p-value	R-Squared	R-Squared	
Linear	0.4672	0.0508	-0.0210	-0.2625	
2FI	0.2439	0.0500	0.0043	-0.2920	
<u>Quadratic</u>	<u>0.0076</u>	<u>0.5259</u>	<u>0.4117</u>	<u>0.1073</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	0.6868	0.2378	0.3593	-1.6389	Aliased

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Mean vs Total	1158.40	1	1158.40			
Linear vs Mean	3.12	2	1.56	0.79	0.4672	
2FI vs Linear	2.79	1	2.79	1.46	0.2439	
<u>Quadratic vs 2</u>	<u>15.58</u>	<u>2</u>	<u>7.79</u>	<u>6.89</u>	<u>0.0076</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quad	0.95	2	0.48	0.39	0.6868	Aliased
Residual	16.02	13	1.23			
Total	1196.85	21	56.99			

Sequential Model Sum of Squares [Type I]: Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Linear	21.15	6	3.52	2.98	0.0508	
2FI	18.36	5	3.67	3.10	0.0500	
<u>Quadratic</u>	<u>2.78</u>	<u>3</u>	<u>0.93</u>	<u>0.78</u>	<u>0.5259</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	1.83	1	1.83	1.54	0.2378	Aliased
Pure Error	14.19	12	1.18			

Lack of Fit Tests: Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Model Summary Statistics

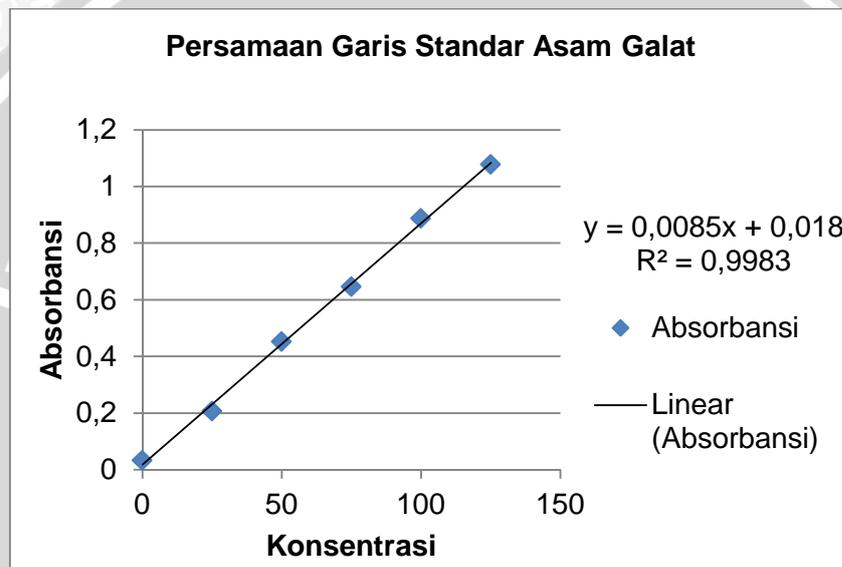
Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	1.40	0.0811	-0.0210	-0.2625	48.55
2FI	1.38	0.1536	0.0043	-0.2920	49.68
<u>Quadratic</u>	<u>1.06</u>	<u>0.5587</u>	<u>0.4117</u>	<u>0.1073</u>	<u>34.33</u>
Cubic	1.11	0.5835	0.3593	-1.6389	101.48

Model Summary Statistics: Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Lampiran 6

Persamaan Regresi Standar Asam Galat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Persamaan Garis
Asam Galat	0	0.033	$y = 0,008 + 0,018x$
	25	0.207	
	50	0.453	
	75	0.647	
	100	0.888	
	125	1.078	



Lampiran 7

Analysis of Variance (ANOVA) Respon Total Polyphenol Content (TPC)

Response	2	TPC			
ANOVA for Response Surface Mean Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Model	0.000	0			
Residual	1.723E+00E	20	8614.65		
<i>Lack of Fit</i>	1.722E+00E	8	21530.01	4887.98	< 0.0001
<i>Pure Error</i>	52.86	12	4.40		
Cor Total	1.723E+00E	20			
Std. Dev.	92.82	R-Squared	0.0000		
Mean	128.41	Adj R-Squared	0.0000		
C.V. %	72.28	Pred R-Squared	-0.1025		
PRESS	1.900E+00E	Adeq Precision			
Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	128.41	1	20.25	86.16	170.66



Lampiran 8

Analysis of Variance (ANOVA) Respon DPPH / IC₅₀

Response 3 DPPH / IC50

ANOVA for Response Surface Mean Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

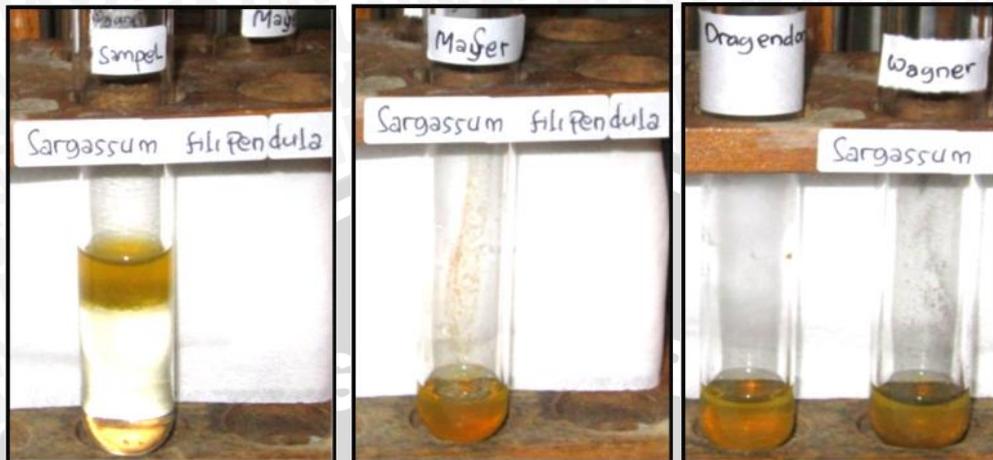
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Model	0.000	0				
Residual	11252.23	20	562.61			
Lack of Fit	11225.74	8	1403.22	635.82	< 0.0001	significant
Pure Error	26.48	12	2.21			
Cor Total	11252.23	20				

Std. Dev.	23.72	R-Squared	0.0000
Mean	120.31	Adj R-Squared	0.0000
C.V. %	19.71	Pred R-Squared	-0.1025
PRESS	12405.58	Adeq Precision	

Factor	Coefficient		Standard Error	95% CI	
	Estimate	df		Low	High
Intercept	120.31	1	5.18	109.52	131.11

Lampiran 9

Gambar Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar (*Crude Extract*)
Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula*



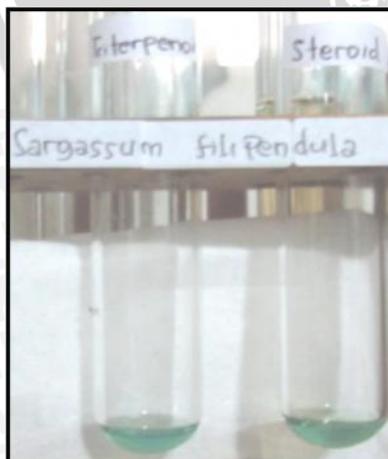
(a) Uji Alkaloid



(b) Uji Flavonoid



(c) Uji Saponin



(d) Uji Triterpenoid dan Steroid



(e) Uji Tanin

Lampiran 10

Gambar proses pembekuan rumput laut *Sargassum filipendula*



Rumput laut coklat *Sargassum filipendula*



Proses pemisahan daun dan batang



Proses penimbangan sampel

Lampiran 11

Gambar proses ekstraksi rumput laut *Sargassum filipendula*



(a)



(b)

Proses maserasi. (a) didiamkan pada suhu ruang ($\pm 27^\circ\text{C}$) dan (b) menggunakan shaker pada suhu ruang ($\pm 27^\circ\text{C}$)



(a)



(b)

Proses penyaringan. (a) menggunakan kain saring dan (b) menggunakan kertas Whatman no. 42



Proses evaporasi filtrat dengan rotary vacuum evaporator

Lampiran 12

Gambar proses pembekuan lambat rumput laut *Sargassum filipendula*



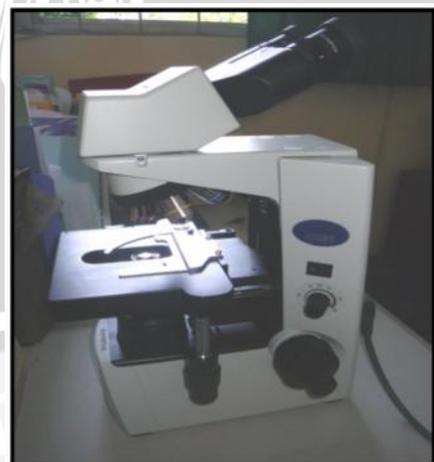
Proses pembekuan. (a) keadaan sampel dalam freezer dan (b) *thermocouple* yang menunjukkan suhu dalam freezer



Proses *thawing*



(a)



(b)

Pengamatan sel rumput laut coklat *Sargassum filipendula* menggunakan mikroskop. (a) proses fiksasi sampel (perendaman sampel pada larutan Formaldehide-Asam Asetat Glisial-Alkohol) dan (b) mikroskop cahaya