

**PENGARUH KONSENTRASI BIAKAN DAN LAMA INKUBASI DENGAN
Trichoderma viride TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR
Sargassum filipendula SEGAR**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN**

Oleh:

DEWI INDRA PURNAMASARI

NIM. 0810830050

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



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



**PENGARUH KONSENTRASI BIAKAN DAN LAMA INKUBASI DENGAN
Trichoderma viride TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR
Sargassum filipendula SEGAR**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN**

Oleh:
DEWI INDRA PURNAMASARI
NIM. 0810830050

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Kartini Zaelani, MS)
NIP. 19550503 198503 2 001
Tanggal:

Dosen Penguji II

(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal:

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

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

Dosen Pembimbing II

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

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

RINGKASAN

DEWI INDRA PURNAMASARI. Pengaruh Konsentrasi Biakan dan Lama Inkubasi dengan *Trichoderma viride* terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar *Sargassum filipendula* Segar (di bawah bimbingan Ir. Bambang Budi Sasmito, MS dan Dr. Ir. Hardoko, MS)

Sargassum filipendula potensial sebagai sumber antioksidan alami, yang banyak ditemukan di perairan Indonesia. Salah satunya di Pantai Ponjuk Desa Padike Kecamatan Talango Kabupaten Sumenep Pulau Madura. Antioksidan alami dapat melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif. Untuk mendapatkan zat antioksidan dari *Sargassum filipendula* diperlukan metode inkubasi sampel yang tepat. Penambahan metode fermentasi dan penambahan konsentrasi biakan yang tepat pada saat inkubasi sampel berpengaruh terhadap zat antioksidan yang akan didapatkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi biakan dan lama inkubasi yang tepat untuk mengekstrak senyawa antioksidan pada *Sargassum filipendula*, sehingga ekstrak yang dihasilkan optimal dan memiliki aktivitas antioksidan yang baik.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari 2012 - Maret 2013.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan utama. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor, 3 level dan 2 kali ulangan. Parameter uji yang digunakan ada dua yaitu kuantitatif dan kualitatif. Parameter kualitatifnya yaitu uji senyawa fitokimia sedangkan parameter kuantitatifnya yaitu jumlah rendemen, kadar air, nilai IC_{50} dan total fenol. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter uji, dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan jika terdapat hasil yang berbeda sangat nyata maka dilakukan uji Duncan pada taraf 5% untuk mengetahui perlakuan terbaik.

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa konsentrasi biakan 5% dan lama inkubasi 6 hari memberikan nilai IC_{50} yang lebih rendah daripada kontrol yaitu sebesar 41.54 ppm. Semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Konsentrasi biakan 5% dan lama inkubasi 6 hari kemudian dijadikan titik acuan untuk penelitian utama. Persen kadar air tertinggi pada perlakuan konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi 7 hari sebesar 96.94% sedangkan kadar air terendah pada perlakuan konsentrasi biakan 7% dan lama inkubasi 11 hari sebesar 93.37%. Persen rendemen tertinggi pada perlakuan konsentrasi biakan 7% dan lama inkubasi 11 hari sebesar 26.26% sedangkan persen rendemen terendah pada perlakuan konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi 7 hari sebesar 13.64%. Aktivitas antioksidan terendah pada perlakuan konsentrasi biakan 3% dengan nilai IC_{50} sebesar 87.69 ppm, sedangkan pada perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan nilai IC_{50} sebesar 71.27 ppm. Nilai total fenol tertinggi pada perlakuan konsentrasi biakan 3% sebesar 51.48 mg GAE/1000 g, sedangkan pada perlakuan lama inkubasi 7 hari sebesar 55.56 mg GAE/1000 g. Hasil uji fitokimia dari perlakuan yang terbaik menunjukkan bahwa ekstrak *Sargassum filipendula* positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan fenolik. Perlakuan yang terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari *Sargassum filipendula* adalah perlakuan konsentrasi 3% dan lama inkubasi 7 hari karena memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis bisa menyelesaikan laporan Skripsi dengan judul Pengaruh Konsentrasi Biakan dan Lama Inkubasi dengan *Trichoderma viride* terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar *Sargassum filipendula* Segar. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Strata 1 pada program studi THP, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi biakan dan lama waktu inkubasi yang efektif untuk mengekstrak komponen antioksidan pada *Sargassum filipendula* sehingga dapat diketahui aktivitas antioksidannya. Atas terselesaikannya laporan Skripsi, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- Bapak Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Dr.Ir. Hardoko, MS selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan serta pengarahan dalam penyusunan laporan Skripsi
- Ibu Dr.Ir. Kartini Zaelani, MS selaku dosen penguji I dan Ibu Dr.Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji serta memberikan banyak pengarahan.
- Bapak Yoseph Sri Nuryanto, Ibu Rahayu Sudjarwati, Kak Adi, Angga dan Yoga yang telah memberikan dukungan materiiil maupun non materiiil
- Teman spesial Addinsyah atas doa, semangat dan dukungannya
- Teman-teman team antioksidan, Ester, Nita, Agus dan mas Harris yang telah berjuang bersama-sama, sahabatku Ingrid, Devi dan Yendi serta semua teman THP 2008 yang selalu memberikan semangat
- Semua pihak yang banyak membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian Skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa masih ada kekurangan yang harus diperbaiki dan disempurnakan pada penulisan skripsi ini. Oleh karenanya, saran dan kritik yang membangun diperlukan guna perbaikan dalam skripsi ini, sehingga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis pribadi maupun bagi pembaca.

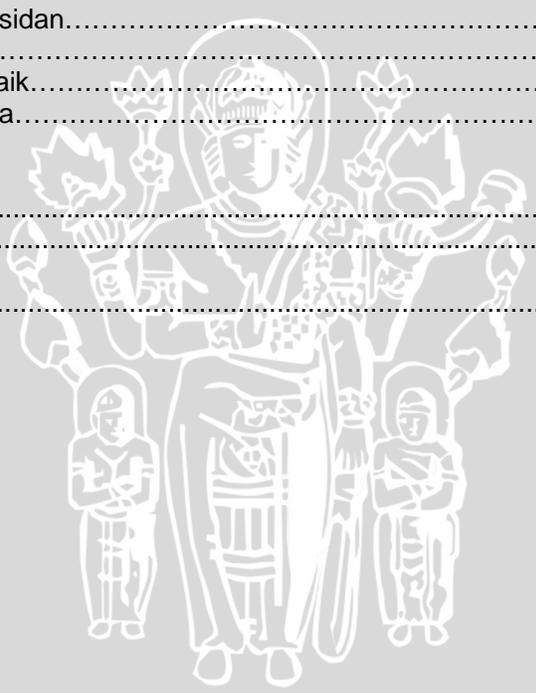
Malang, Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

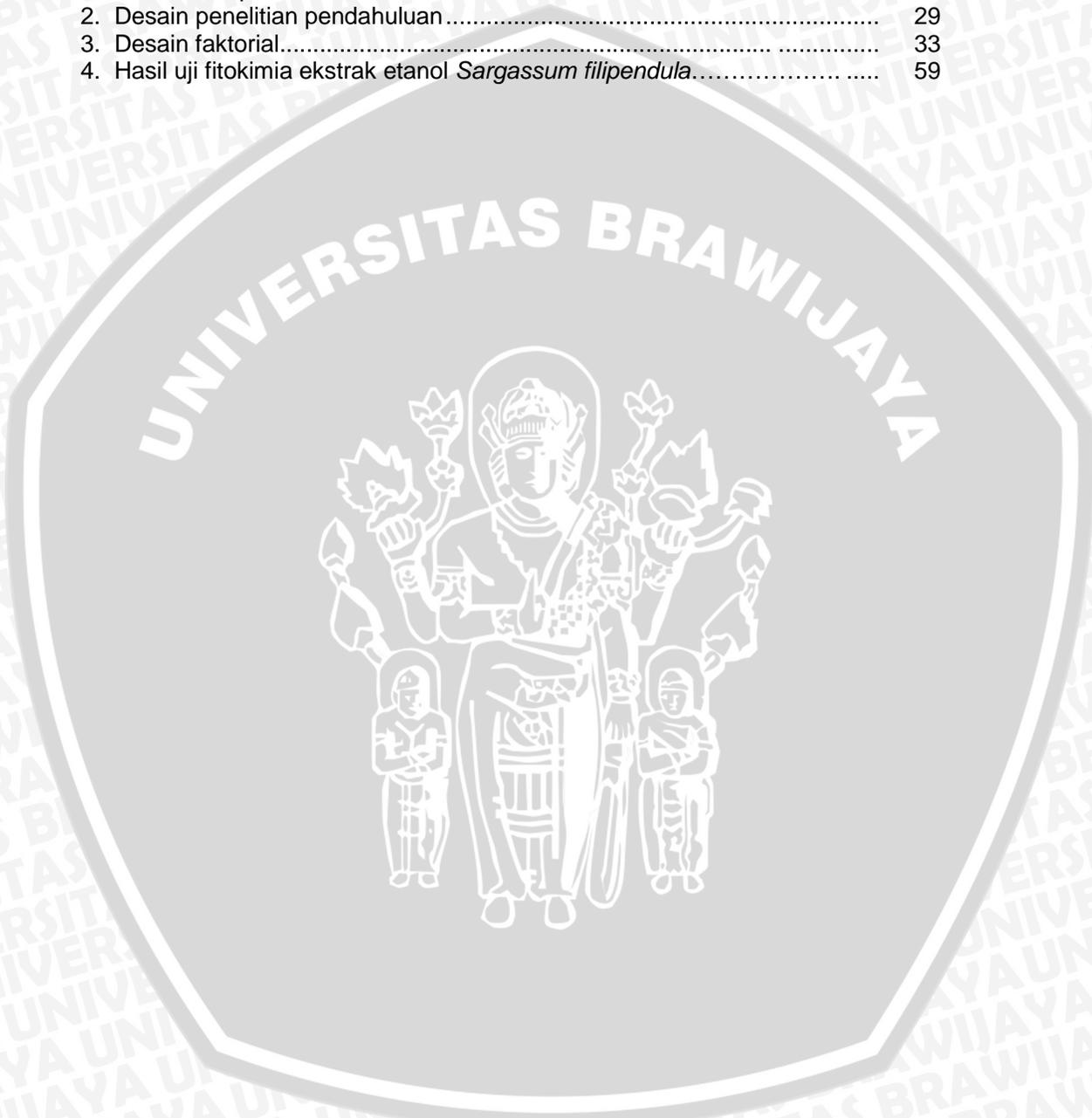
	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Kegunaan Penelitian.....	5
1.6 Tempat dan Waktu.....	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Coklat.....	7
2.2 <i>Sargassum filipendula</i>	8
2.3 Fermentasi.....	9
2.4 <i>Trichoderma viride</i>	10
2.5 Mekanisme kerja <i>Trichoderma viride</i>	12
2.6 Radikal bebas.....	13
2.7 Antioksidan.....	15
2.8 Mekanisme Kerja Antioksidan.....	16
2.9 Ekstraksi Senyawa Aktif.....	18
2.10 Pelarut.....	20
2.11 Metode DPPH.....	21
2.12 Kandungan <i>Sargassum filipendula</i> yang berpotensi sebagai senyawa antioksidan.....	23
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi penelitian.....	26
3.1.1. Bahan penelitian.....	26
3.1.2. Alat penelitian.....	27
3.2 Metode penelitian.....	27
3.2.1. Penelitian pendahuluan.....	28
3.2.1.1. Pembuatan kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	28
3.2.1.2. Perlakuan dan rancangan penelitian.....	29
3.2.1.3. Prosedur penelitian.....	30
3.2.1.3.1 Pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur <i>Trichoderma viride</i>	30
3.2.1.3.2 Fermentasi dan ekstraksi.....	31
3.2.1.4. Parameter uji.....	32
3.2.2. Penelitian Utama.....	32
3.2.2.1. Perlakuan dan rancangan penelitian.....	32
3.2.3. Prosedur penelitian utama.....	34
3.2.3.1. Pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur <i>Trichoderma viride</i>	34

3.2.3.2. Fermentasi <i>Sargassum filipendula</i>	35
3.2.3.3. Ekstraksi <i>Sargassum filipendula</i>	36
3.2.4. Prosedur analisis parameter.....	36
3.2.4.1. Perhitungan koloni jamur dengan <i>haemocytometer</i>	36
3.2.4.2. Uji antioksidan (DDPH).....	37
3.2.4.3. Uji fitokimia.....	37
3.2.4.4. Uji kadar air.....	38
3.2.4.5. Uji total fenol.....	39
3.2.4. Parameter uji.....	39
3.2.5. Analisis data.....	40
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	41
4.2 Penelitian pendahuluan.....	42
4.3 Penelitian utama.....	44
4.4 Kadar air dan rendemen.....	45
4.4.1 Kadar air.....	45
4.4.2 Rendemen.....	47
4.5 Aktivitas antioksidan.....	49
4.6 Total fenol.....	55
4.7 Perlakuan terbaik.....	57
4.8 Analisa fitokimia.....	59
5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	62
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat – sifat pelarut umum	20
2. Desain penelitian pendahuluan	29
3. Desain faktorial.....	33
4. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol <i>Sargassum filipendula</i>	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum filipendula</i>	8
2. <i>Trichoderma viride</i> dan koloninya.....	11
3. Mekanisme kerja selulase.....	13
4. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida.....	17
5. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi.....	17
6. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH.....	22
7. Kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	41
8. Grafik nilai IC ₅₀ ekstrak kasar <i>Sargassum filipendula</i>	42
9. Grafik persen kadar air ekstrak kasar <i>Sargassum filipendula</i>	46
10. Grafik persen rendemen ekstrak kasar <i>Sargassum filipendula</i>	48
11. Grafik nilai IC ₅₀ dengan perlakuan lama inkubasi.....	51
12. Grafik nilai IC ₅₀ dengan perlakuan konsentrasi biakan.....	51
13. Grafik nilai total fenol dengan perlakuan lama inkubasi.....	55
14. Grafik nilai total fenol dengan perlakuan konsentrasi biakan.....	56
15. Rumus bangun DPPH.....	59



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan koloni jamur <i>Trichoderma viride</i> dengan <i>Haemacytometer</i> ...	71
2. Analisis Keragaman (ANOVA) nilai IC ₅₀ <i>Sargassum filipendula</i> yang difermentasi selama 6, 9 dan 12 hari.....	73
3. Analisis Keragaman (ANOVA) persen kadar air ekstrak etanol <i>Sargassum filipendula</i>	77
4. Analisis Keragaman (ANOVA) persen rendemen ekstrak etanol <i>Sargassum filipendula</i>	81
5. Analisis Keragaman (ANOVA) Nilai IC ₅₀ <i>Sargassum filipendula</i> yang difermentasi selama 7, 9 dan 11 hari.....	86
6. Analisis Keragaman (ANOVA) total fenol ekstrak etanol <i>Sargassum filipendula</i>	90
7. Gambar prosedur penelitian.....	95
8. Flowchart prosedur penelitian.....	102



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut merupakan salah satu komoditas hasil laut yang penting, serta tumbuh dan tersebar hampir di seluruh perairan laut Indonesia. Tumbuhan ini bernilai ekonomi tinggi dalam bidang industri makanan maupun bukan makanan (industri kosmetik, tekstil, dan farmasi), untuk memenuhi permintaan dalam negeri maupun luar negeri (Indriani dan Sumiarsih, 1992).

Ganggang coklat adalah salah satu ganggang yang tersusun atas zat warna atau pigmentasinya. *Phaeophyta* (ganggang coklat) ini berwarna coklat karena mengandung pigmen xantofis. Bentuk tubuhnya seperti tumbuhan tinggi. *Thallus* dari jenis golongan *Phaeophyceae* bersel banyak (multiseluler), umumnya mikroskopik dan mempunyai bentuk tertentu. Sel mengandung promakropora yang berwarna coklat kekuning-kuningan karena adanya kandungan *fukoxantin* yang melimpah. Dinding sel sebagian besar tersusun oleh tiga macam polimer yaitu selulosa, asam alginat, fukan dan fukoidin (Hamid, 2009).

Sargassum sp. merupakan alga coklat yang termasuk dalam kelas *Phaeophyceae*. Salah satu jenis *Sargassum sp.* yaitu *Sargassum filipendula*. Ciri-ciri marga *Sargassum filipendula* adalah bentuk *thallus* yang umumnya silinder atau gepeng, tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat, berukuran relatif besar, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter), dan warna *thallus* umumnya coklat (Hartono, 2008).

Hasil penelitian beberapa tahun terakhir menunjukkan adanya kandungan antioksidan di beberapa jenis alga di luar negeri sehingga berpotensi sebagai

produk pangan fungsional (Kusumawati, 2009). Secara sederhana antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang mampu menghambat atau mencegah terjadinya oksidasi. Antioksidan memiliki kemampuan dalam memberikan elektron, mengikat dan mengakhiri reaksi berantai radikal bebas yang mematikan. Antioksidan yang dipakai kemudian didaur ulang oleh antioksidan lain untuk mencegahnya menjadi radikal bebas (bagi dirinya sendiri) atau tetap dalam bentuk tersebut tetapi dengan struktur yang tidak dapat merusak molekul lainnya (Rohdiana, 2008).

Hasil penelitian Mori *et al.*, (2004) yang mengisolasi tiga metabolit *fucoxanthin* dari tiga alga coklat (*Undaria pinnatifida*, *Petalonia binghamiae* dan *Laminaria religiosa*) menunjukkan senyawa antioksidan yang ada dalam alga coklat adalah *fucoxanthin*, golongan karotenoid yang bertanggung jawab memberikan warna coklat pada alga coklat. Zahra *et al.*, (2007) juga membuktikan bahwa *Sargassum boveanum* potensial sebagai sumber antioksidan alami.

Zat antioksidan dari *Sargassum filipendula* diperoleh melalui proses ekstraksi, tetapi jumlah antioksidan yang dihasilkan masih sedikit. Sehingga pada penelitian ini, proses ekstraksi *Sargassum filipendula* dilakukan secara fermentasi melibatkan enzim-enzim pemecah dinding sel rumput laut. Komponen penyusun dinding sel rumput laut terdiri dari algin, selulosa dan pektin. Diharapkan dengan adanya proses fermentasi selama maserasi dapat memecah dinding sel secara sempurna agar zat antioksidan yang dihasilkan semakin banyak.

Fermentasi mempunyai arti suatu proses terjadinya perubahan kimia sepenuhnya suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Fanjiono, 2012). Selulase dapat diproduksi oleh fungi, bakteri, dan ruminansia. Produksi enzim secara komersial biasanya menggunakan fungi

atau bakteri. Salah satu fungi yang bisa menghasilkan selulase antara lain genus *Trichoderma* (Sa'adah, 2010). *Trichoderma* merupakan fungi multiseluler berbentuk filamen sehingga masuk kelompok kapang (*molds*) (Wahyudi dan Hendriana, 2012). Pada penelitian ini digunakan kapang *Trichoderma viride* karena menurut Supriyati *et al.*, (2010), kapang ini mempunyai sifat selulolitik. *Trichoderma viride* telah dimanfaatkan untuk memfermentasi jerami padi.

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan masa zat aktif yang semula berada dalam sel, ditarik oleh cairan penyari. Salah satu cara ekstraksi yang paling sederhana adalah maserasi. Maserasi merupakan proses penyaringan dengan cara serbuk direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut (Ansel, 1989). Hasil penelitian mengenai alga coklat telah banyak dilaporkan, yaitu pada penelitian yang dilakukan oleh Suryaningrum *et al.*, (2006) yang menggunakan pelarut metanol, etil asetat dan heksan untuk mengekstrak antioksidan dari *Halymenia harveyana* dan *Euचेuma cottoni*, aktivitas antioksidan yang tinggi terhadap radikal bebas DPPH ditunjukkan pada fraksi metanol (pelarut bersifat polar) pada alga jenis *H. Harveyana* dengan nilai IC₅₀ sebesar 176.50 ppm.

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (Blois, 1958). Pengujian dengan DPPH didasarkan pada pengukuran kemampuan antioksidan yang diuji dalam menangkap radikal bebas stabil *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (Moreno, 2002). Ditambahkan Sunarni *et al.*, (2007), DPPH pada uji ini ditangkap oleh antioksidan yang melepaskan hidrogen, sehingga membentuk DPPH-H tereduksi. Warna berubah dari violet menjadi kuning dan diikuti penurunan serapan pada panjang gelombang 517 nm. Adanya penurunan serapan tersebut maka aktivitas antioksidan penangkap radikal dapat diketahui.

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk eksplorasi pemanfaatan biota laut yang banyak terdapat di Indonesia, khususnya pengetahuan mengenai metode ekstraksi dengan penambahan fermentasi dan efektifitasnya. Pemilihan konsentrasi biakan dan lama inkubasi yang tepat dapat mengoptimalkan proses ekstraksi dan senyawa antioksidan yang didapatkan. Kedepannya, diharapkan senyawa antioksidan dari *Sargassum sp.* dapat menjadi zat antioksidatif baku yang dapat diterapkan pada produk pangan maupun nonpangan.

1.2 Rumusan Masalah

Beberapa penelitian tentang aktivitas antioksidan dari alga coklat menunjukkan bahwa hasil aktivitas antioksidan yang dihasilkan masih rendah. Hal ini disebabkan karena proses ekstraksi yang kurang maksimal sehingga dinding sel alga coklat tidak terdegradasi secara sempurna. Selulosa merupakan komponen struktural utama dinding sel dari alga coklat. Untuk mendapatkan zat antioksidan diperlukan modifikasi dan penambahan metode ekstraksi yaitu dengan fermentasi karena selulase yang dihasilkan oleh jamur *Trichoderma viride* dapat memecah selulosa. Pemilihan konsentrasi biakan dan lama inkubasi yang tepat sangat menentukan jumlah antioksidan yang akan didapatkan. Dari paragraf diatas dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah konsentrasi biakan *Trichoderma viride* berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula* ?
2. Apakah lama inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula* ?
3. Apakah konsentrasi biakan dan lama inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan secara umum yaitu 1) untuk mengetahui pengaruh konsentrasi biakan *Trichoderma viride* terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*, 2) untuk mengetahui pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*, 3) untuk mengetahui pengaruh konsentrasi biakan dan lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*. Tujuan secara khusus yaitu untuk mendapatkan daya antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula* yang diekstrak dengan penambahan metode fermentasi serta untuk mendapatkan senyawa aktif antioksidan yang terkandung pada alga coklat *Sargassum filipendula*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Konsentrasi biakan *Trichoderma viride* berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*
2. Lama inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*
3. Konsentrasi biakan dan lama inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*

1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga dan institusi lain mengenai manfaat senyawa antioksidan yang ada pada *Sargassum filipendula* dan masyarakat dapat memanfaatkan *Sargassum filipendula* sebagai alternatif antioksidan alami yang sangat potensial.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari 2012 – Maret 2013.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat

Ganggang coklat adalah salah satu ganggang yang tersusun atas zat warna atau pigmentasinya. *Phaeophyta* (ganggang coklat) ini berwarna coklat karena mengandung pigmen xantofis. Pada *Phaeophyta* umumnya dapat ditemukan adanya dinding sel yang tersusun dari tiga macam polimer yaitu selulosa asam alginat, fukan dan fukoidin. Algin dari fukoidin lebih kompleks dari selulosa dan fukoidin lebih kompleks dari selulosa dan gabungan dan keduanya membentuk fukokoloid. Dinding selnya juga tersusun atas lapisan luar dan lapisan dalam, lapisan luar yaitu selulosa dan lapisan dalam yaitu gumi (Hamid, 2009).

Sargassum memiliki ciri-ciri sebagai berikut, bentuk *thallus* umumnya silindris, percabangan rimbun mempunyai pepohonan di darat, bangun daun melebar, lonjong atau menyerupai pedang, mempunyai gelembung udara (blader) yang umumnya soliter, panjangnya dapat mencapai tujuh meter dan warna *thallus* umumnya coklat. Umur tanaman lebih dari satu tahun (perennial), terutama pada bagian pangkal bagian utamanya, sedang sebagian besar *thalli* dapat rontok atau terlepas secara musiman dalam satu tahun (Kadi dan Atmadja, 1988).

Alat pelekatnya terdiri dari cakram pipih, dari cakram ini muncul tangkai pendek, silendrik yang kuat. Kemudian tangkai dari pendek ini muncul poros-poros silendrik panjang, masing-masing poros ini dapat mencapai 1 meter panjangnya. Bentuk-bentuk seperti daun, gelembung udara, dan cabang perkembangbiakan terdapat poros yang silendrik dengan diameter 3 mm (Romimohtarto dan Juwana, 1999). *Phaeophyta* (*Sargassum* dan *Tubinaria*) mengandung pigmen klorofil a dan c, beta karoten, violasantin dan fukosantin,

peranoid dan filakoid (lembar fotosintesis), cadangan makanan berupa lamirin, dinding sel yang terdapat selulosa dan algin (Kadi dan Atmadja,1988).

Secara umum, rumput laut mempunyai kandungan nutrisi cukup lengkap. Secara kimia rumput laut terdiri dari air (27,8%), protein (5,4%), karbohidrat (33,3%), lemak (8,6%) serat kasar (3%) dan abu (22,25%). Selain karbohidrat, protein, lemak dan serat, rumput laut juga mengandung enzim, asam nukleat, asam amino, vitamin (A, B, C, D, E dan K) dan makro mineral seperti nitrogen, oksigen, kalsium dan selenium serta mikro mineral seperti zat besi, magnesium dan natrium. Kandungan asam amino, vitamin dan mineral rumput laut mencapai 10 -20 kali lipat dibandingkan dengan tanaman darat (Fahri, 2009).

2.2 *Sargassum filipendula*



Gambar 1. *Sargassum filipendula*

Menurut Wikipedia (2012)^a, klasifikasinya sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Phaeophyta
Class	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Family	: Sargasseceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>Sargassum filipendula</i>

Salah satu jenis *Sargassum sp.* yaitu *Sargassum filipendula*. Ciri-ciri marga *Sargassum filipendula* adalah berbentuk *thallus* yang umumnya silinder atau gepeng, tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat, berukuran relatif besar, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter), dan warna *thallus* umumnya coklat. *Sargassum filipendula* ini hidup melekat pada batu karang dan dapat terlepas dari substratnya apabila ombak besar dan hanyut dipermukaan laut atau terdampar di permukaan pasir pantai (Hartono, 2008).

2.3 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia pada substrat organik, baik karbohidrat, protein, lemak atau lainnya, melalui kegiatan katalis biokimia yang dikenal sebagai enzim dan dihasilkan oleh jenis mikroba yang spesifik (Prescot dan Dunn 1981). Proses ekstraksi *Sargassum* secara fermentasi melibatkan enzim-enzim pemecah dinding sel. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, suhu dan lamanya reaksi enzimatik (Pelczar dan Chan, 1986).

Pada proses fermentasi diperlukan *starter*, sebagai perombak. *Starter* yang digunakan adalah mikrobiotik atau campuran mikrobiotik. Mikrobiotik yang digunakan untuk meningkatkan mutu limbah pertanian yaitu kapang jenis *Trichoderma* maupun *Aspergillus*. Kapang *Trichoderma viride* dilaporkan mempunyai sifat selulolitik (Supriyati *et al.*, 2010).

Moeljoarjo (1979) menyatakan bahwa untuk memperoleh hasil fermentasi yang baik diperlukan kondisi fermentasi yang optimal. Artinya harus ada jaminan perkembangan mikroba yang aktif untuk menjalankan fermentasi.

Kondisi yang kurang cocok bagi perkembangbiakan mikroba akan menghambat fermentasi. Bahkan bukan hanya hambatan saja yang terjadi, tetapi juga merangsang tumbuhnya mikroba lain yang tidak dikehendaki. Untuk itu, perlu diperhatikan suhu fermentasi tertentu, pH media, kecukupan air, oksigen, dan nutrient untuk tumbuhnya mikroorganisme yang diharapkan (Fardiaz, 1992).

2.4 *Trichoderma viride*

Klasifikasi *Trichoderma viride* menurut Domsch dan Gams (1972) adalah sebagai berikut :

Divisio	: Thallophyta
Phylum	: Fungi (Eumycota)
Kelas	: Deuteromycetes
Famili	: Moniliales
Ordo	: Moniliaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i> (genus dengan filaspora ameros porous)
Spesies	: <i>Trichoderma viride</i>

Trichoderma viride merupakan salah satu fungi yang memproduksi spora dengan cara mitosis (aseksual), memiliki suhu pertumbuhan optimum 15-30°C. Kapang dapat mencapai diameter lebih dari 5 cm dalam waktu 9 hari, semula berwarna putih halus (menyerupai kapas kemudian menjadi putih kehijauan dan selanjutnya hijau redup terutama pada bagian yang menunjukkan banyak terdapat konidia. Kapang ini hidup pada bahan-bahan organik yang telah mati atau tumbuh langsung pada kayu yang komposisi dasarnya adalah selulosa yang merupakan polimer dari glukosa. Kapang ini memiliki enzim selulase untuk mendegradasi selulosa dan lignoselulosa (Volk, 2004).

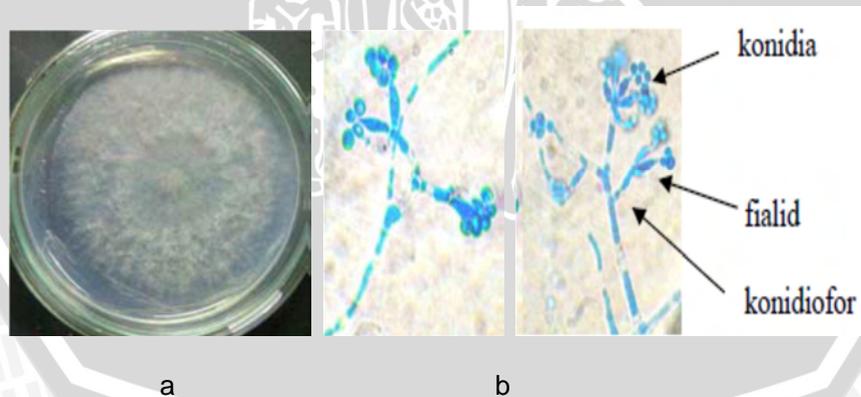
Jamur *Trichoderma viride* mempunyai sifat selulolitik (Supriyati *et al.*, 2010). Kelebihan dari *Trichoderma viride* selain menghasilkan enzim selulolitik

yang lengkap, juga menghasilkan enzim xyloglukanolitik (Tribak *et al.*, 2002). Menurut Gunam *et al.*, (2011), keberadaan enzim ini akan semakin mempermudah enzim selulolitik dalam memecah selulosa.

Morfologi *Trichoderma viride* adalah miselium berseptata, bercabang banyak, konidioseptat dan cabang yang paling ujung berfungsi sebagai sterigma, konidia yang berwarna hijau cerah bergerombol menjadi satu berbentuk bola, dan berkas hifa yang berwarna putih terlihat menonjol jelas antara konidiosphora, serta mampu tumbuh linier hingga sepanjang 100-150 mm (Frazier dan Westhoff, 1977).

Trichoderma viride dapat diisolasi dari tanah. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 15^o – 30^oC dan maksimum 30^o – 36^oC (Gandjar *et al.*, 1999). *Trichoderma viride* lebih menyukai suasana asam, dengan suasana asam tersebut, *Trichoderma viride* akan menghasilkan antibiotika gliotoksin dan viridin (Basuki dan Situmorang, 1994).

Gambar dari koloni *Trichoderma viride* dan konidianya dapat dilihat pada Gambar 2 (Samingan, 2009) :



Gambar 2. *Trichoderma viride* a). koloni dalam cawan petri, b). konidia

Pada media PDA koloni yang berumur tujuh hari pada suhu ruang berdiameter 7 cm, berwarna putih, tekstur *felty cottony*, tepi koloninya tidak rata. Hifa *septat*

berdiameter $\pm 2.5 \mu\text{m}$, konidiofor *hialin*, tegak dan panjangnya $\pm 7.85 \mu\text{m}$, fialid pendek dan tebal, konidium *globus* berdiameter $2.5 \times 3 \mu\text{m}$.

2.5 Mekanisme Kerja *Trichoderma viride*

Menurut Martina (2002), jamur *Trichoderma viride* dari genus *Trichoderma* ini dikenal sebagai penghasil enzim hidrolitik, selulase, pektinase dan xilanase yang mampu mendegradasi polisakarida kompleks seperti selulosa, pektin, hemiselulosa dan xilan. Fungsi enzim selulase pada alga coklat yaitu untuk mendegradasi selulosa, hemiselulosa dan pektin. Selulase merupakan enzim kompleks yaitu bekerja secara sinergis satu sama lain. Menurut Miyamoto (1997) selulase terdiri dari tiga komponen enzim yang penting yaitu endoglukanase, selobiohidrolase dan β -glukosidase, yaitu :

1. Endoglukanase

Enzim ini berfungsi memotong secara acak ikatan selulosa menjadi selooligosakarida. Enzim ini aktif menyerang pada bagian selulosa yang tersubstitusi seperti CMC.

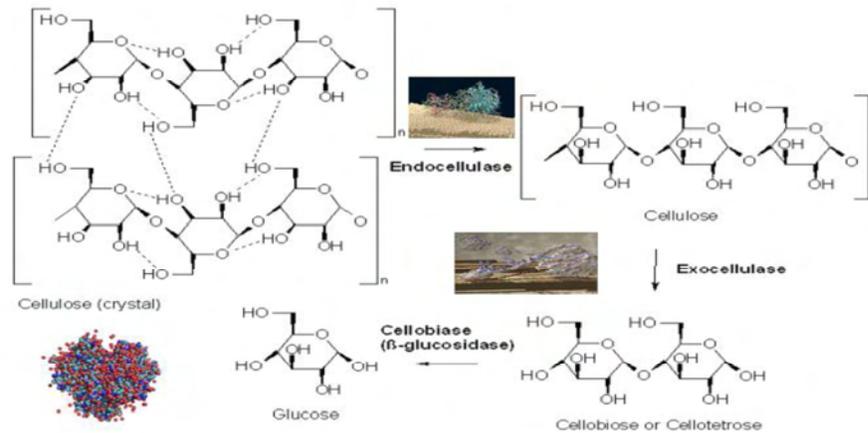
2. Selobiohidrolase/Eksoglukanase

Enzim ini menyerang ujung rantai selulosa non-pereduksi dan membebaskan selobiosa dari rantai selulosa.

3. β -glukosidase

Enzim ini menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa.

Gambar berikut adalah mekanisme kerja selulase pada degradasi komponen selulosa menjadi glukosa (Anil 2008).



Gambar 3. Mekanisme kerja selulase (Anil 2008)

Hidrolisis enzim selulase ditentukan oleh struktur substrat. Struktur kristal lebih sulit dihidrolisis dibandingkan dengan struktur amorf maka hidrolisis dilakukan oleh enzim endoselulase atau endoglukanase (Coughlan 1985). *T. viride* mampu memproduksi kompleks enzim selulase yang lengkap yaitu endoselulase dan eksoselulase yang dapat menghidrolisis selulosa kristalin dan selulosa non kristalin. Di alam, selulase yang mampu menghidrolisis selulosa kristal memegang peranan penting dalam hidrolisis selulosa alami yang sebagian besar terdapat dalam bentuk kristalin (Lynd *et al.*, 2002). Walaupun demikian, peranan endoglukanase yang bekerja pada selulosa amorf juga tidak bisa diabaikan begitu saja. Adanya aktivitas endoglukanase yang berperan menghidrolisis secara acak struktur internal selulosa dapat mempermudah kerja eksoglukanase yang dapat mendegradasi selulosa kristal untuk melanjutkan hidrolisis selulosa tersebut (Perez *et al.*, 2002).

2.6 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya. Merupakan juga suatu kelompok bahan kimia dengan reaksi jangka pendek yang

memiliki satu atau lebih elektron bebas (Arief, 2007). Radikal bebas ialah suatu spesies atau molekul turunan yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya sehingga bersifat sangat reaktif. Molekul tersebut sangat berbahaya karena dapat merusak jaringan tubuh sehingga menyebabkan penyakit degeneratif, seperti jantung, kanker, diabetes dan mempercepat timbulnya penuaan dini (Silalahi, 2006).

Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultraviolet, zat pemicu radikal dalam makanan dan polutan lain. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis, yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata. Contoh penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung, kanker, katarak dan menurunnya fungsi ginjal. Untuk mencegah atau mengurangi penyakit kronis karena radikal bebas diperlukan antioksidan (Wikipedia, 2012)^b.

Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein dan jaringan lemak. Radikal bebas terbentuk di dalam tubuh akibat produk sampingan proses metabolisme ataupun karena tubuh terpapar radikal bebas melalui pernapasan (Dalimarta dan Soediby, 1998). Di dalam tubuh terdapat mekanisme antioksidan atau antiradikal bebas secara endogenik (Dyatmiko *et al.*, 2000). Tetapi bila jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih maka dibutuhkan antioksidan yang berasal dari sumber alami atau sintetik dari luar tubuh. Senyawa antioksidan ini akan menyerahkan satu atau lebih elektronnya kepada radikal bebas sehingga dapat menghentikan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Praptiwi *et al.*, 2006).

Tubuh memerlukan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan meredam dampak negatif senyawa ini.

Vitamin C dan vitamin E telah digunakan secara luas sebagai antioksidan karena lebih aman dan efek samping yang ditimbulkan lebih kecil dibandingkan antioksidan sintetik. Antioksidan sintetik seperti BHA (*butil hidroksi anisol*) dan BHT (*butil hidroksi toluen*) memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan vitamin C dan vitamin E (Han *et al.*, 2004), tetapi antioksidan sintesis ini dapat menimbulkan karsinogenesis (Kikuzaki *et al.*, 2002). Antioksidan dari tumbuhan dapat menghalangi kerusakan oksidatif melalui reduksi dengan radikal bebas, membentuk kelat dengan senyawa logam katalitik, dan menangkap oksigen (Khlifi *et al.*, 2005).

2.7 Antioksidan

Senyawa antioksidan merupakan inhibitor penghambat oksidasi. Cara kerja senyawa antioksidan adalah bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Utami *et al.*, 2009).

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam (Suhartono, 2002). Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik) (Dalimartha dan Soediby, 1999). Antioksidan sintetik seperti BHA, (*butil hidroksi anisol*), BHT (*butil hidroksi toluen*), PG (*propil galat*), dan TBHQ (*tert-butil hidrokuinon*) dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz *et al.*, 2000). Oleh karena itu penelitian dan pengembangan antioksidan yang berasal dari alam sedang banyak dilakukan sebagai alternatif pengganti antioksidan sintetik. Penelitian menunjukkan bahwa antioksidan alami memiliki aktivitas antioksidatif

lebih tinggi daripada antioksidan sintetis. Karena itu, antioksidan alami mulai meningkat penggunaannya dan menggantikan antioksidan sintesis (Paiva dan Robert, 1999).

Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidase lipid pada makanan. Meningkatnya minat untuk mendapatkan antioksidan alami terjadi beberapa tahun terakhir ini. Antioksidan alami umumnya mempunyai gugus hidroksi dalam struktur molekulnya (Sunarni, 2005).

Antioksidan terbagi menjadi antioksidan enzim dan vitamin. Antioksidan enzim meliputi *superoksida dismutase* (SOD), katalase dan *glutation peroksidase* (GSH.Prx). Antioksidan vitamin lebih populer sebagai antioksidan dibandingkan enzim. Antioksidan vitamin mencakup alfa tokoferol (vitamin E), beta karoten dan asam askorbat (vitamin C) yang banyak didapatkan dari tanaman dan hewan. Sebagai antioksidan, betakaroten adalah sumber utama vitamin A yang sebagian besar terdapat pada tumbuhan. Selain melindungi buah-buahan dan sayuran berwarna kuning atau hijau gelap dari bahaya radiasi matahari, betakaroten juga berperan serupa dalam tubuh manusia. Betakaroten terkandung dalam wortel, brokoli, kentang dan tomat. Senyawa lain yang memiliki sebagai antioksidan adalah flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terdapat pada teh, buah-buahan, sayuran, anggur, bir dan kecap (Sofia, 2006).

2.8 Mekanisme Kerja Antioksidan

Mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen 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 lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil (Gordon,1990).

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi (Gambar 3). Menurut Gordon (1990), radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru .

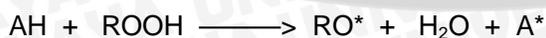


Radikal lipida



Gambar 4. Reaksi Penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida (Gordon 1990).

Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan (Gambar 4). Pengaruh jumlah konsentrasi pada laju oksidasi tergantung pada struktur antioksidan, kondisi dan sampel yang akan diuji.



Gambar 5. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi (Gordon 1990).

2.9 Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi adalah metode pemisahan suatu komponen *solute* (cair) dari campurannya menggunakan sejumlah massa solven sebagai tenaga pemisah. Proses ekstraksi terdiri dari tiga langkah besar, yaitu proses pencampuran, proses pembentukan fasa setimbang, dan proses pemisahan fasa setimbang. Solven merupakan faktor terpenting dalam proses ekstraksi, sehingga pemilihan solven merupakan faktor penting. Solven ini harus saling melarutkan terhadap salah satu komponen murninya, sehingga diperoleh dua fasa rafinat. Proses ekstraksi dapat berjalan dengan baik bila pelarut ideal harus memenuhi syarat-syarat yaitu selektivitasnya tinggi, memiliki perbedaan titik didih dengan *solute* cukup besar, bersifat inert, perbedaan *density* cukup besar, tidak beracun, tidak bereaksi secara kimia dengan *solute* maupun diluen, viskositasnya kecil, tidak bersifat korosif, tidak mudah terbakar, murah dan mudah didapat. Beberapa faktor yang berpengaruh dalam proses ekstraksi adalah temperatur, waktu kontak, perbandingan *solute*, faktor ukuran partikel, pengadukan dan waktu dekantasi (Yasita dan Rachmawati, 2009).

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam. Pada proses perendaman, dinding serta membran sel sampel tumbuhan akan terpecah akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Hal tersebut mengakibatkan metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Lama perendaman yang diatur akan menghasilkan ekstraksi yang sempurna. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Indrayani, 2006).

Zat yang akan dimaserasi ditempatkan pada wadah dengan permukaan lebar, bersama menstrum yang telah ditetapkan. Bejana yang digunakan untuk merendam bahan maserasi ditutup rapat dan isinya dikocok berulang-ulang lamanya, biasanya berkisar 2-14 hari (Ansel, 1989). Pengocokan rendaman dilakukan kira-kira 3 kali sehari (Voight, 1971). Maserasi umumnya dilakukan pada temperatur 15-20°C dalam waktu selama 3 hari sampai bahan-bahan yang larut, melarut. Zat yang mudah larut, melarut dalam menstrum, turun ke dasar bejana karena menaikan gaya berat dari cairan, menstrum yang segar naik ke permukaan dan proses ini berlanjut secara siklis. Ekstrak dipisahkan dari ampas dengan memeras dan kemudian membilasnya dengan penambahan menstrum baru (Ansel, 1989). Selesai waktu maserasi artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan telah tercapai, maka proses difusi segera berakhir (Voight, 1971).

Maserasi sampel dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol karena karena etanol mempunyai polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstrak oleoresin lebih banyak dibandingkan jenis pelarut organik yang lain. Pelarut yang mempunyai gugus karboksil (alkohol) dan karbonil (keton) termasuk dalam pelarut polar. Etanol mempunyai titik didih yang rendah dan cenderung aman. Etanol juga tidak beracun dan berbahaya (Ramadhan dan Phaza, 2010). Etanol yang digunakan adalah etanol 96% yang lazim digunakan untuk ekstraksi sampel segar. Setelah melalui proses maserasi, ekstrak etanol dipekatkan dengan destilasi vakum agar dapat mengurangi tekanan udara pada permukaan sehingga akan menurunkan titik didihnya. Ini akan dapat mengurangi kemungkinan terurainya senyawa yang terdapat dalam sampel tersebut pada suhu tinggi. Kemudian ekstrak di *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut dan air yang masih tersisa sehingga didapatkan ekstrak kental dengan berat konstan (Harborne, 1987).

2.10 Pelarut

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair atau gas, yang menghasilkan sebuah larutan. Pelarut paling umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga umum digunakan adalah pelarut organik (mengandung karbon). Pelarut biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar (Guenther, 1987).

Tabel 1. 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)	$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$	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: Wikipedia, (2012)^c

Etanol (alkohol) adalah nama suatu golongan senyawa organik yang mengandung unsur C, H dan O. Etanol dalam ilmu kimia disebut sebagai etil

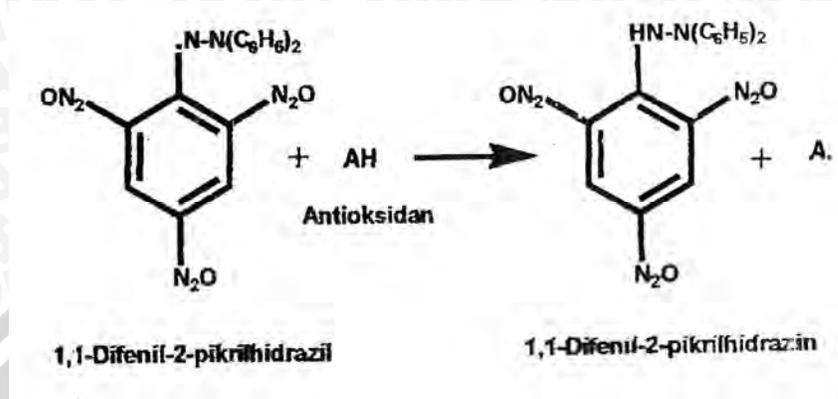
alkohol dengan rumus kimia C_2H_5OH (Siregar, 1988). Karakteristik etanol meliputi: berupa zat cair, tidak berwarna, berbau spesifik, mudah terbakar dan menguap, dapat bercampur dengan air dalam segala perbandingan (Endah *et al.*, 2007). Aseton, metanol dan etanol merupakan pelarut polar. Aseton merupakan pelarut polar-aprotik yang tidak dapat memberikan ion OH^- , sedangkan metanol dan etanol merupakan pelarut polar-protik yaitu yang dapat memberikan ion OH^- , sehingga lebih mudah berinteraksi dengan gugus fungsional yang polar (Marnoto *et al.*, 2012).

2.11 Metode DPPH

DPPH pada uji ini ditangkap oleh antioksidan yang melepaskan hidrogen, sehingga membentuk DPPH-H tereduksi. Warna berubah dari violet menjadi kuning dan diikuti penurunan serapan pada panjang gelombang 517 nm. Adanya penurunan serapan tersebut maka aktivitas antioksidan penangkap radikal dapat diketahui (Sunarni *et al.*, 2007). Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Selain itu metode ini terbukti akurat, reliabel dan praktis (Prakash, 2001).

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul *diamagnetic* yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya

zat antioksidan. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH terdapat pada Gambar 5. (Suratmo, 2009).



Gambar 6. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH (Suratmo, 2009)

Pengukuran antioksidan secara “efek peredaman radikal bebas DPPH” merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode yang lain (*xanthin-xanthin oxidase*, metode tiosianat, antioksidan total). Pada metode ini, DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut dan membentuk 1,1-difenil-2-pikril hidrazil. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga aktivitas peredaman dapat ditentukan. Jika absorbansi sampel lebih besar daripada absorbansi blanko, maka sampel tidak aktif sebagai antioksidan (Juniarti *et al.*, 2009).

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak etanol dari *Sargassum filipendula* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode Blois (1958), ekstrak etanol dari *Sargassum filipendula* dilarutkan dalam etanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 3 ml. Ke dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM dalam

etanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan 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 (*inhibition concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀ menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Aktivitas antioksidan dapat dikatakan kuat apabila mempunyai IC₅₀ kurang dari 200 µg/ml Blois (1958).

Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian dengan metode DPPH adalah IC₅₀ (*inhibition concentration*). IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50 % (Molyneux, 2004). Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 0,05 mg/ml, kuat untuk IC₅₀ antara 0,05-0,1 mg/ml, sedang jika IC₅₀ bernilai 0,101-0,150 mg/ml, dan lemah jika IC₅₀ bernilai 0,150-0,200 mg/ml (Andriyanti, 2009).

2.12 Kandungan *Sargassum filipendula* Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan

1. Senyawa Fenol

Fenol adalah senyawa dengan gugus OH yang terikat pada cincin aromatik. Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari

tumbuhan, yang memiliki cirri-ciri yang sama, yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena sering berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harbone, 1987).

Kandungan senyawa fenolik banyak diketahui sebagai terminator radikal bebas dan pada umumnya kandungan senyawa fenolik berkorelasi positif terhadap aktivitas antiradikal, sedangkan polifenol memiliki kemampuan untuk berikatan dengan metabolit lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat membentuk senyawa kompleks yang stabil sehingga menghambat mutagenesis dan karsinogenesis. Selain itu, polifenol memiliki sifat antioksidatif dan antitumor (Mukhopadhiay, 2000).

2. Alkaloid

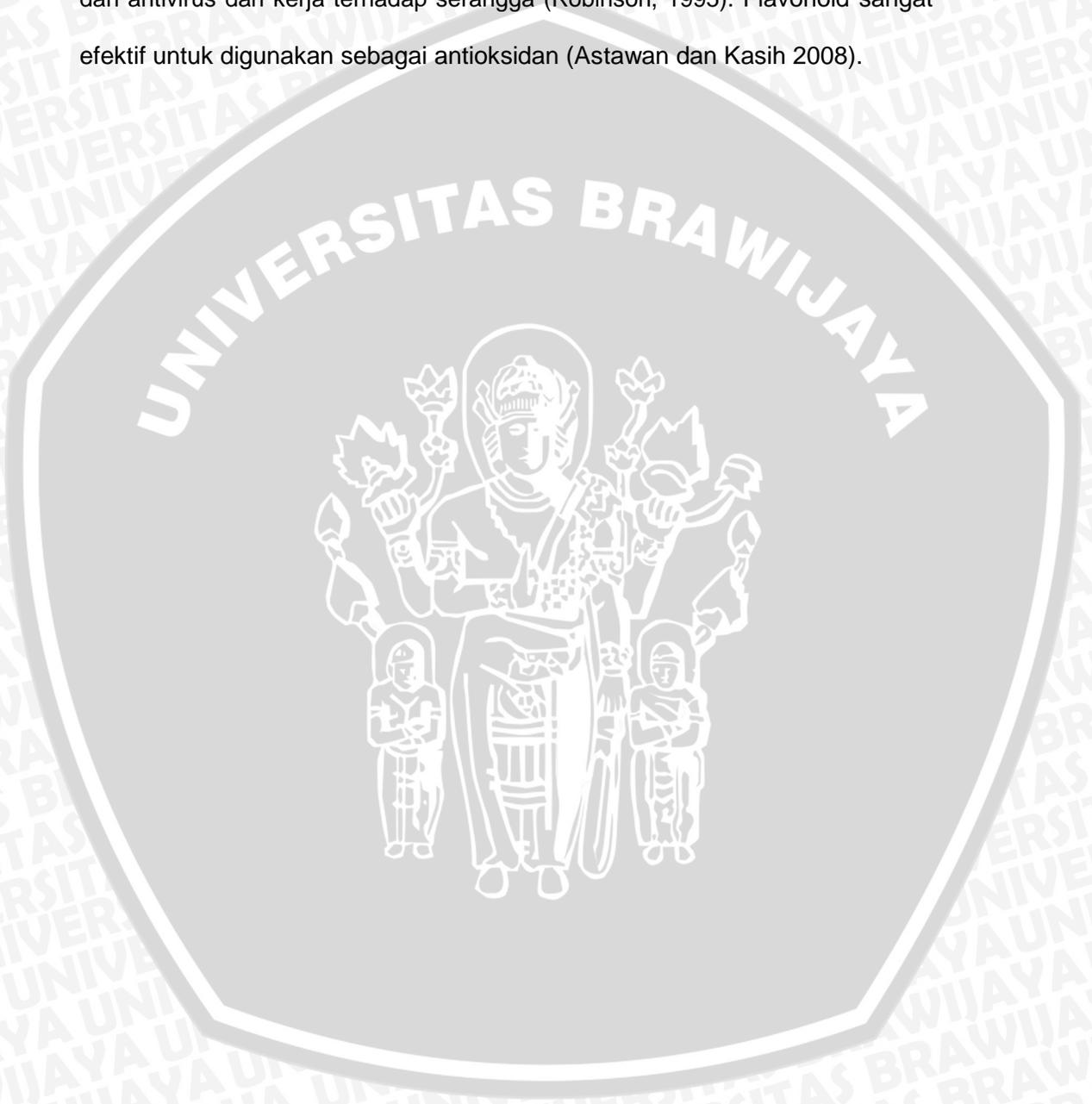
Alkaloid adalah senyawa kimia tanaman hasil metabolit sekunder yang terbentuk berdasarkan prinsip pembentukan campuran (Sirait, 2007). Pada umumnya alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa (adanya gugus amino) yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen dalam bentuk gabungan sebagai bagian dari sistem siklik (Harbone, 1987).

3. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa polifenolik yang biasa ditemukan secara luas dalam buah-buahan dan sayur-sayuran dari hampir semua tumbuhan dari bangsa alga. Senyawa terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, bunga dan biji (Sastrohamidjojo, 1996). Flavonoid dapat diklasifikasikan menjadi flavon, flavonol, flavanon, flavononon, isoflavon, calkon, dihidrokalkon, auron, antosianidin, katekin, dan flavan-3,4-diol (Sirait, 2007).

Flavonoid memberikan kontribusi keindahan dan kesemarakkan pada buah-buahan di alam. Flavon memberikan warna kuning atau jingga, antosianin

memberikan warna merah, ungu atau biru, yaitu semua warna yang terdapat pada pelangi kecuali hijau (Sastrohamidjojo, 1996). Flavonoid pada tumbuhan berfungsi dalam pengaturan tumbuh, pengaturan fotosintesis, kerja antimikroba dan antivirus dan kerja terhadap serangga (Robinson, 1995). Flavonoid sangat efektif untuk digunakan sebagai antioksidan (Astawan dan Kasih 2008).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Alga coklat *Sargassum filipendula* segar diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Rumput laut dipanen dari daerah budidaya dan pada saat pemanenan bahan dicuci dengan air laut. Sampel dicuci untuk membersihkan sisa lumpur, pasir dan kotoran lainnya yang masih melekat. Sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik warna hitam untuk menghindari kontak dengan sinar matahari agar tidak terjadi pigmentasi (pencoklatan). Sampel dimasukkan ke dalam *coolbox* lalu diberi es balok dan bagian luar *coolbox* disegel dengan lakban untuk mempertahankan suhu rendah dalam *coolbox* selama proses transportasi. Selang waktu pengangkutan dari tempat pemanenan ke laboratorium adalah sehari semalam.

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi antioksidan alga coklat *Sargassum filipendula* yaitu pelarut etanol teknis. Digunakan pelarut etanol karena etanol memiliki kepolaran yang hampir sama dengan karakteristik antioksidan *Sargassum filipendula*. Bahan lain yang digunakan adalah air yang digunakan pada *waterbath* pada saat proses pengentalan ekstraksi (pemisahan pelarut dari ekstrak) dengan *vacuum rotary evaporator*. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji DPPH adalah serbuk DPPH (*1,1 diphenil-2-pikrilhydrazil*) sebesar 20 mg sedangkan kontrol pembanding dalam penelitian ini adalah Vitamin C (Merck p.a). Bahan-bahan yang digunakan untuk uji total fenol adalah 18 ml etanol 96%, 90 ml aquadest, 9 ml *follin ciocalteau* dan 18 ml Na_2CO_3 . Bahan-bahan yang digunakan untuk uji fitokimia adalah HCL 2N, dan 6 ml aquadest untuk uji alkaloid, 20 ml etanol 96%, larutan FeCl_3 untuk uji fenol, serbuk magnesium (Mg) dan 2 ml HCL 2N untuk uji flavonoid.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam maserasi (ekstraksi) senyawa antioksidan dari alga coklat *Sargassum filipendula* adalah baskom, pisau, tissue, talenan, timbangan analitik, *beaker glass* 500 ml, erlenmeyer 500 ml, gelas corong, spatula, gelas ukur 100 ml, blender dan *shaker*. Alat-alat yang digunakan pada saat pemisahan pelarut dari ekstrak adalah 1 unit *rotary vacuum evaporator* dan botol vial. Adapun alat-alat yang digunakan untuk uji DPPH adalah botol vial, erlenmeyer 250 ml, *beaker glass* 100 ml, bola hisap, spektrofotometer, pipet volume 10 ml dan pipet volume 5 ml. Untuk uji total fenol digunakan alat gelas ukur 100 ml, *beaker glass* 500 ml, botol vial dan spektrofotometer. Untuk identifikasi senyawa fitokimia digunakan alat *beaker glass* 100 ml, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan gelas ukur.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding (Nazir, 1989).

Eksperimen yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pengaruh konsentrasi biakan dan lama inkubasi *Trichoderma viride* terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula*. Pelaksanaan penelitian ini dibagi menjadi 2 tahapan yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

Indikator yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga *inhibition concentration* (IC_{50}), dimana $IC_{50} < 200$ ppm maka senyawa antioksidan berhasil memberikan penghambatan 50% karakter radikal bebas yang diekstraksi dari sampel.

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

3.2.1.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Pembuatan kurva tumbuh digunakan untuk menentukan fase pertumbuhan kapang *Trichoderma viride* yang akan diinokulasi. Kurva fase pertumbuhan dibuat berdasarkan perhitungan jumlah koloni / ml PDB dengan menggunakan *haemocytometer*.

- Disiapkan jamur *Trichoderma viride* dan media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) untuk penanaman sebanyak 2,4 gram dan 100 ml aquadest
- Setiap labu erlenmeyer diisi 1,2 gram PDB dan dilarutkan dalam 50 ml aquadest dan diulangi sebanyak dua kali
- Dua labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci lalu disterilisasi untuk membersihkan dari kontaminan
- Setelah disterilisasi, disiapkan kapang *Trichoderma viride* yang telah tumbuh di media PDA untuk ditanam ke media PDB dan *dishaker*
- Dihitung jumlah koloni (spora) / ml setiap hari selama 7 hari. Pertumbuhan maksimal *T. viride* ditentukan dengan membuat kurva pertumbuhan yang diamati setiap hari selama 7 hari (Arnata, 2009), dengan menggunakan *haemocytometer* (Zubaidah *et al.*, 2006)
- Diperoleh data, selanjutnya dibuat grafik kurva pertumbuhan

3.2.1.2 Perlakuan dan Rancangan Penelitian

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui lama waktu inkubasi yang tepat untuk inkubasi sampel dan konsentrasi biakan yang tepat untuk starter sampel. Fase starter yang digunakan pada penelitian ini yaitu fase stasioner sesuai dengan kurva pertumbuhan *Trichoderma viride*. Dari hasil penelitian Arnata (2009), fase stasioner pertumbuhan *Trichoderma viride* diperoleh setelah kultivasi selama 6 hari dengan jumlah spora maksimum $1,58 \times 10^9$.

Perlakuan yang diberikan adalah lama inkubasi (A) selama 6, 9, 12 hari dengan konsentrasi biakan (B) 5 %, 10 %, 20% (v/b) dari berat sampel (10 g) di dalam 2 ml PDB serta 0 hari sebagai kontrol. Rancangan penelitian pendahuluan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor (lama inkubasi dan konsentrasi biakan) yang terdiri dari 3 level dan 2 kali ulangan. Adapun desain penelitian pendahuluannya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Desain Penelitian Pendahuluan

Lama inkubasi (A)	Konsentrasi biakan (B)		
	B1	B2	B3
A1	(A1B1) ₁	(A1B2) ₁	(A1B3) ₁
	(A1B1) ₂	(A1B2) ₂	(A1B3) ₂
A2	(A2B1) ₁	(A2B2) ₁	(A2B3) ₁
	(A2B1) ₂	(A2B2) ₂	(A2B3) ₂
A3	(A3B1) ₁	(A3B2) ₁	(A3B3) ₁
	(A3B1) ₂	(A3B2) ₂	(A3B3) ₂

Keterangan:

- A1 = lama waktu inkubasi 6 hari
- A2 = lama waktu inkubasi 9 hari
- A3 = lama waktu inkubasi 12 hari
- B1 = konsentrasi 5 % dari berat sampel (10 g) di dalam 2 ml PDB

- B2 = konsentrasi 10 % dari berat sampel (10 g) di dalam 2 ml PDB
B3 = konsentrasi 20 % dari berat sampel (10 g) di dalam 2 ml PDB
Kontrol = 0 hari

3.2.1.3 Prosedur Penelitian

3.2.1.3.1 Pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur *Trichoderma viride*

- Cawan petri, labu erlenmeyer 250 ml dan jarum ose dicuci bersih lalu dioven sebentar dengan suhu 35°C untuk menghilangkan air
- Untuk penanaman pertama, diambil serbuk media PDA (*Potatoes dextrose agar*) sebanyak 2,34 gram untuk dilarutkan ke dalam 60 ml aquadest lalu dimasukkan labu erlenmeyer 250 ml
- Cawan petri, jarum ose dan labu erlenmeyer berisi media PDA direbus dalam panci selama 10 menit dengan suhu 100°C
- Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 15 menit dengan tekanan 0.1 MPa
- Media PDA lalu dituang ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi lalu dibiarkan dingin agar menggejel
- Lalu jamur *Trichoderma viride* diambil dari stok menggunakan jarum ose lalu ditanam pada media PDA dengan posisi dibalik
- Diinkubasi dalam *incase* dan ditunggu 1 minggu
- Setelah jamur tumbuh merata, disiapkan media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) untuk peremajaan sebanyak 7,2 gram dan dilarutkan dalam 300 ml aquadest
- Labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci lalu disterilisasi untuk membersihkan dari kontaminan

- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan jamur *Trichoderma viride* yang telah tumbuh di media PDA untuk ditanam ke media PDB
- Lalu diinkubasi selama enam hari agar jamur tumbuh merata sambil tiap hari *dishaker* selama 6 jam sekali sampai fase stasionernya agar nutrient yang mengendap bisa tercampur merata
- Didapatkan starter berupa jamur *Trichoderma viride* dalam media PDB

3.2.1.3.2 Fermentasi dan ekstraksi

- Sampel *Sargassum filipendula* segar dicuci bersih untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran dan mineral pengotor yang masih menempel pada bahan
- Sampel ditiriskan lalu dihaluskan menggunakan blender untuk memperluas permukaan bahan dan mempermudah proses maserasi bahan
- Diatur pH awal substrat pada pH 3. Pertumbuhan *T. viride* optimal pada pH sekitar 4 sedangkan untuk produksi enzim selulase mendekati pH 3. Selama produksi enzim, pH harus dipertahankan dalam kisaran 3-4 karena inaktivasi enzim akan terjadi di bawah pH 2 (Waluyo, 2004)
- Ditimbang dengan timbangan digital sebanyak 10 gram untuk tiap perlakuan
- Tiap sampel dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 ml, ditambah *starter* 5 %, 10 %, 20% (v/b) jamur *Trichoderma viride* dari berat sampel (10 g) di dalam 2 ml PDB lalu ditutup dengan alufo yang telah diberi lubang-lubang kecil lalu difermentasi selama 6, 9, 12 hari pada suhu ruang dan 0 hari tanpa penambahan *starter* sebagai kontrol
- Sampel dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:3 (Suryaningrum *et al.*, 2006) dan *dishaker* selama 24 jam (Indriani, 2007).
- Disaring dengan kertas saring kasar lalu dipisahkan antara pelarut dan sampel menggunakan *vacuum rotary evaporator* selama 3 jam

- Didapatkan ekstrak kasar *Sargassum fillipendula* lalu diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Sunarni, 2005)

3.2.1.4 Parameter Uji

Parameter yang digunakan untuk mengetahui mutu dan aktivitas antioksidan dari sampel adalah nilai *inhibition concentration 50* (IC_{50}) (Suryaningrum *et al.*, 2006), rendemen (Suryaningrum *et al.*, 2006), kadar air (Sudarmadji *et al.*, 2007) dan uji fitokimia (Harbone, 1987). Hasil terbaik dari penelitian pendahuluan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan lama inkubasi dan konsentrasi biakan untuk penelitian utama.

3.2.2 Penelitian Utama

Penelitian utama mengambil standar acuan dari perlakuan terbaik pada penelitian pendahuluan. Penelitian utama ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang terbaik dari semua perlakuan dengan penambahan jamur *Trichoderma viride* dan lama waktu inkubasi.

3.2.2.1 Perlakuan dan Rancangan 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 dalam penelitian ini adalah perlakuan yang digunakan. Perlakuan yang pertama yaitu faktor konsentrasi biakan (W) dengan level 3 %, (W1), 5 % (W2) dan 7 % (W3). Perlakuan kedua yaitu faktor lama inkubasi (P) dengan level 7 hari (P1), 9 hari (P2) dan 11 hari (P3). Variabel terikat penelitian ini adalah parameter yang diamati, yaitu nilai *inhibition concentration 50* (IC_{50}) dari sampel dengan perlakuan yang berbeda-beda.

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktor (faktor W dan faktor P) yang terdiri dari 3 level (1,2,3) dan 2 kali ulangan. Model matematika dari penelitian ini yaitu :

$$y_{ijk} = \mu + w_i + p_j + (w_i p_j) + \xi_{ijk}$$

μ adalah rata-rata umum, w_i adalah faktor w dengan level i, p_j adalah faktor p dengan level j, $(w_i p_j)$ adalah korelasi antara faktor w_i dan p_j , dan ξ_{ijk} adalah galat dari semua faktor. Desain faktorial ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Desain Faktorial

	P1	P2	P3
W1	(W1P1) ₁	(W1P2) ₁	(W1P3) ₁
	(W1P1) ₂	(W1P2) ₂	(W1P3) ₂
W2	(W2P1) ₁	(W2P2) ₁	(W2P3) ₁
	(W2P1) ₂	(W2P2) ₂	(W2P3) ₂
W3	(W3P1) ₁	(W3P2) ₁	(W3P3) ₁
	(W3P1) ₂	(W3P2) ₂	(W3P3) ₂

Keterangan :

- W1 : Konsentrasi biakkan 3% (v/b)
- W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)
- W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)
- P1 : Lama inkubasi 7 hari
- P2 : Lama inkubasi 9 hari
- P3 : Lama inkubasi 11 hari

Pada penelitian ini menggunakan lama inkubasi 7, 9 dan 11 hari. Menurut Arnata (2009), aktivitas selulase yang maksimal dihasilkan setelah fermentasi selama 7 hari dari kapang *Trichoderma viride*. Sedangkan perlakuan fermentasi selama 9 dan 11 hari digunakan sebagai pembanding. Selain itu, konsentrasi biakan yang digunakan yaitu (3% v/b) dari 50 g, (5% v/b) dari 50 g dan (7 % v/b) dari 50 g. Konsentrasi (5% v/b) tersebut merupakan konsentrasi terbaik dalam degradasi selulosa pada rumput laut *Sargassum filipendula* yang diperoleh dari

hasil penelitian pendahuluan sebelumnya. Sedangkan konsentrasi biakan (3% v/b) dan (7% v/b) digunakan sebagai pembanding.

3.2.3 Prosedur Penelitian Utama

3.2.3.1 Pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur *Trichoderma viride*

- Cawan petri, labu erlenmeyer 250 ml dan jarum ose dicuci bersih lalu dioven sebentar dengan suhu 35⁰C untuk menghilangkan air
- Untuk penanaman pertama, diambil serbuk media PDA (*Potatoes dextrose agar*) sebanyak 2,34 gram untuk dilarutkan ke dalam 60 ml aquadest lalu dimasukkan labu erlenmeyer 250 ml
- Cawan petri, jarum ose dan labu erlenmeyer berisi media PDA direbus dalam panci selama 10 menit dengan suhu 100⁰C
- Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk untuk disterilisasi selama 15 menit dengan tekanan 0.1 MPa
- Media PDA lalu dituang kedalam cawan petri yang telah disterilisasi lalu dibiarkan dingin agar menggejel
- Lalu jamur *Trichoderma viride* diambil dari stok menggunakan jarum ose lalu ditanam pada media PDA dengan posisi dibalik
- Diinkubasi dalam *incase* dan ditunggu 1 minggu
- Setelah jamur tumbuh merata, disiapkan media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) untuk peremajaan sebanyak 7,2 gram dan dilarutkan dalam 300 ml aquadest
- Labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci lalu disterilisasi untuk membersihkan dari kontaminan

- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan jamur *Trichoderma viride* yang telah tumbuh di media PDA untuk ditanam ke media PDB
- Lalu diinkubasi selama enam hari agar jamur tumbuh merata sambil tiap hari di *shaker* selama 6 jam sekali sampai fase stasionernya agar nutrient yang mengendap bisa tercampur merata
- Didapatkan starter berupa jamur *Trichoderma viride* dalam media PDB

3.2.3.2 Fermentasi *Sargassum filipendula*

- *Sargassum filipendula* segar dicuci dengan menggunakan air yang mengalir sampai bersih untuk membersihkan sampel dari sisa-sisa mineral dan kotoran yang masih menempel pada sampel
- Setelah dicuci, diangin-anginkan hingga kering
- Setelah kelihatan kering *Sargassum filipendula* dihaluskan dengan menggunakan blender untuk memperluas permukaan sampel dan mempermudah proses maserasi
- Diatur pH awal substrat pada pH 3. Pertumbuhan *T. viride* optimal pada pH sekitar 4 sedangkan untuk produksi enzim selulase mendekati pH 3. Selama produksi enzim, pH harus dipertahankan dalam kisaran 3-4 karena inaktivasi enzim akan terjadi di bawah pH 2 (Waluyo, 2004)
- Ditimbang sebanyak 50 g dan tiap sampel ditambah starter kapang *Trichoderma viride* dengan konsentrasi yang berbeda-beda dengan perbandingan konsentrasi biakkan : substrat yaitu 3% / 50 g, 5% / 50 g, 7% / 50 g (v/b)
- Lalu difermentasi selama 7, 9 dan 11 hari

3.2.3.3 Ekstraksi *Sargassum filipendula* (Suryaningrum et al., 2006)

- Semua sampel dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 24 jam dan *dishaker* menggunakan *shaker* (Indriani, 2007). Perbandingan antara sampel dan pelarut yaitu 1:3
- Setelah dimaserasi sampel disaring menggunakan kertas saring kasar
- Sisa residu dibuang sedangkan filtratnya di rotary dengan *rotary vacuum evaporator* suhu 40°C untuk memisahkan antara pelarut dengan sampel
- Setelah terpisah, ekstrak sampel dihitung rendemennya dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

- Lalu ekstrak dianalisa kadar air dan kadar antioksidannya

3.2.4 Prosedur Analisis Parameter

3.2.4.1 Perhitungan Koloni Jamur dengan *Haemocytometer*

Dalam metode petroff hauser, hitungan mikroskopik dilakukan dengan pertolongan kotak-kotak skala dimana dalam setiap ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 25 buah kotak besar dengan luas 0.04 mm² dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil. Tinggi sampel yang terletak diantara gelas obyek dan gelas penutup adalah 0.02 mm². Jumlah setiap sel dalam beberapa kotak besar dihitung, kemudian dihitung jumlah sel rata-rata dalam satu kotak besar. Jumlah sel per ml sampel dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{jumlah sel rata-rata tiap petak} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{luas petak (mm}^2\text{)} \times \text{kedalaman petak (mm}^2\text{)}}$$

Catatan : Bila jumlah sel setiap petak terlalu banyak, maka suspensi diencerkan dengan larutan pengencer steril sampai jumlah sel setiap petak sekitar 50 (Zubaidah et al., 2006)

3.2.4.2 Uji Antioksidan (DPPH)

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak kasar etanol dari *Sargassum filipendula* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode Blois (1958). Ekstrak etanol dari *Sargassum filipendula* dilarutkan dalam etanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 3 ml. Kedalam tiap tabung reaksi ditambahkan 1 ml larutan DPPH 1 mM dalam etanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan 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).

3.2.4.3 Uji Fitokimia (Harbone, 1987)

Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak *Sargassum filipendula*. Uji fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, flavonoid, dan fenolik. Metode uji didasarkan pada Harbone (1987).

- a. **Uji Alkaloid:** Larutan ekstrak sebanyak 3 ml ditambahkan dengan 1 ml HCL 2N, dan 6 ml aquadest, kemudian filtrat diperiksa adanya senyawa alkalooid dengan terdapatnya endapan berwarna putih.
- b. **Uji Fenol:** Sebanyak 20 ml etanol 96% dimasukan 1 g sampel ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃. Senyawa fenol ditunjukkan dengan pembentukan warna hijau tua atau hitam.
- c. **Uji Flavonoid:** Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan dengan sedikit serbuk magnesium (Mg) dan 2 ml HCL 2N. Senyawa flavonoid ditunjukkan dengan pembentukan warna jingga hingga merah.

3.2.4.4 Uji Kadar Air (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Uji kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah air bebas ekstrak sampel dalam 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 didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Prosedurnya yaitu sampel yang telah diketahui beratnya dimasukan dalam botol timbang yang juga telah diukur beratnya lalu dimasukan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Ditimbang berat akhir sampel setelah dikeringkan lalu dihitung persen kadar air dengan rumus :

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

Keterangan :

A = Berat botol timbang

B = Berat sampel

C = Berat akhir (Botol timbang + sampel)

3.2.4.5 Uji Total Fenol

Kandungan total fenol diukur dengan spektrofotometer menggunakan reagen *Follin-Ciocalteu* (Apostolidis dan Lee, 2010). Ekstrak rumput laut segar sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 1 ml etanol 96% dalam tabung reaksi. Ditambahkan 5 ml aquades, 0,5 ml reagen *Folin-Ciocalteu* (50% v/v) dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 ml larutan natrium karbonat (5% b/v), dihomogenasi dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dalam kondisi tanpa cahaya (gelap). Kandungan total fenol diukur dengan spektrofotometer UV-Visible (UV-Vis) pada panjang gelombang 725 nm. Standar asam galat yang digunakan menggunakan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm. Serapan standar tersebut kemudian diukur panjang gelombangnya dan dibuat kurva kalibrasi dari hubungan antara konsentrasi asam galat dengan absorban. Dari persamaan garis kurva yang didapat, yakni $y = ax + b$, ditentukan bahwa aksis y mewakili nilai absorbansi dan aksis x mewakili kadar asam galat, nilai absorbansi larutan ekstrak kasar *Sargassum filipendula* dimasukkan ke dalam nilai-y pada persamaan kurva. Selanjutnya didapatkan nilai-x sebagai kadar total fenol *Sargassum filipendula* ekuivalen dengan asam galat. Total fenol dibaca sebagai mg ekuivalen asam galat (GAE)/g sampel.

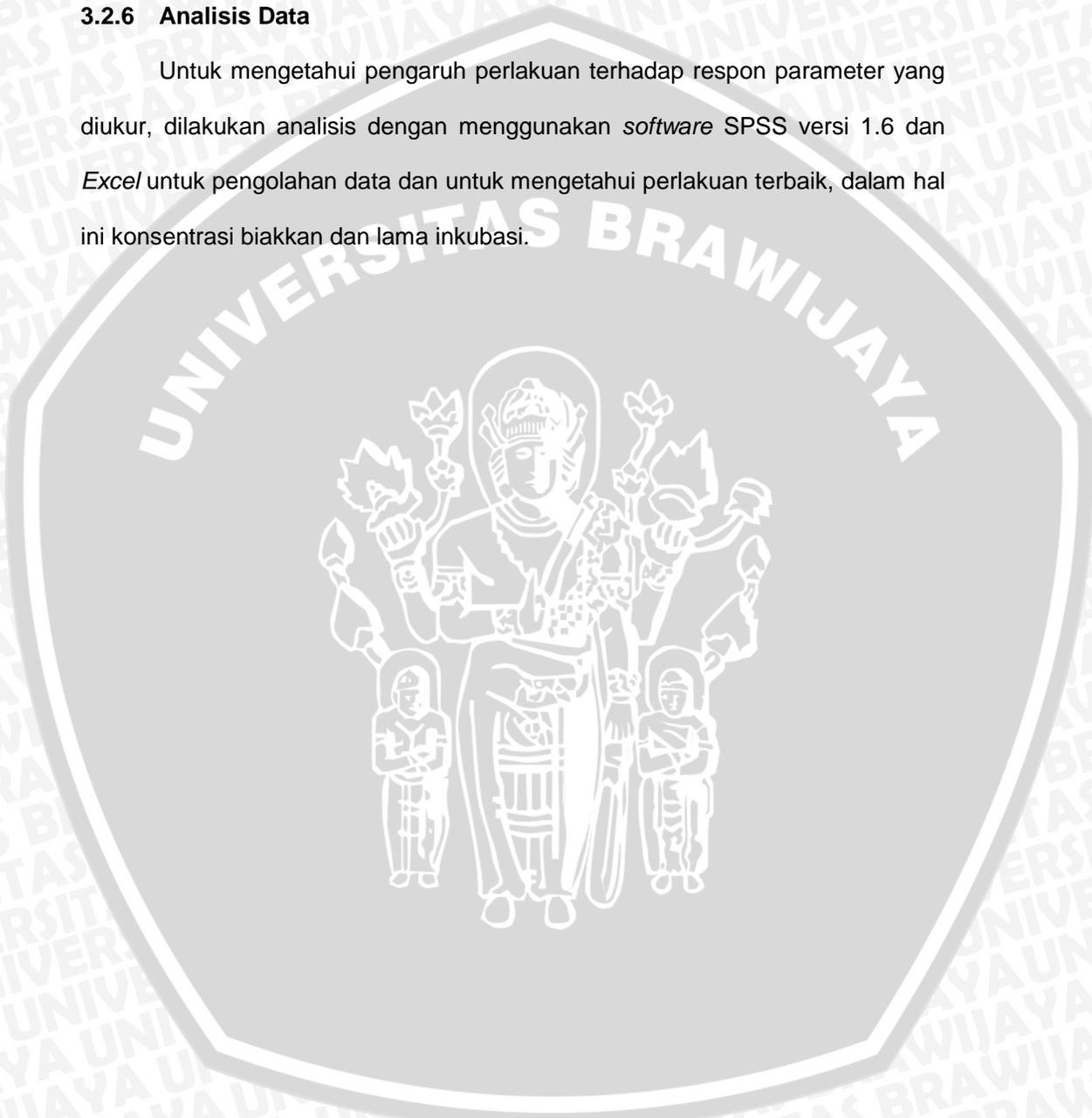
3.2.5 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh dari hasil perhitungan IC_{50} , yaitu senyawa antioksidan berhasil memberikan penghambatan 50% karakter radikal yang diekstraksi dari sampel. Uji kualitatif senyawa fitokimia berdasarkan metode Harbone (1987). Uji ini dibagi menjadi tiga yaitu uji alkaloid, uji flavonoid dan uji fenol. Selain itu, juga dilakukan uji kadar air, rendemen dan total fenol untuk mengetahui kadar air,

rendemen dan total fenol ekstrak kasar *Sargassum filipendula* dari sisa sampel hasil maserasi yang berupa supernatan.

3.2.6 Analisis Data

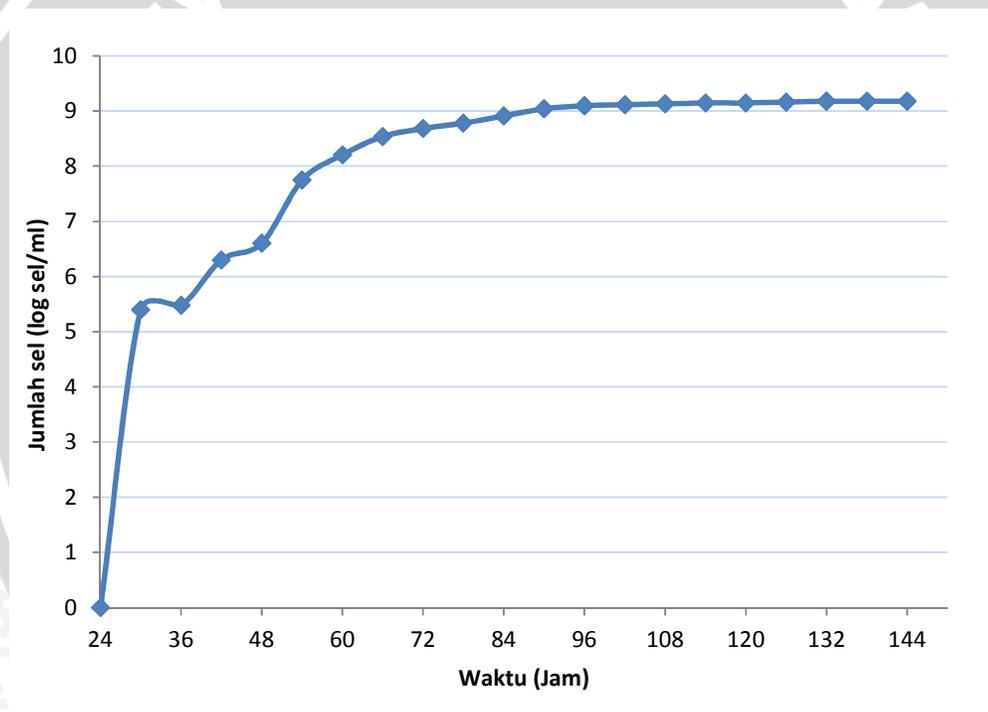
Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, dilakukan analisis dengan menggunakan *software* SPSS versi 1.6 dan *Excel* untuk pengolahan data dan untuk mengetahui perlakuan terbaik, dalam hal ini konsentrasi biakkan dan lama inkubasi.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Kurva pertumbuhan merupakan kurva yang menggambarkan fase pertumbuhan dari jamur *Trichoderma viride* dan pembuatannya bertujuan untuk mengetahui waktu panen paling baik dalam proses fermentasi. Kurva fase pertumbuhan dibuat berdasarkan perhitungan jumlah koloni/ml PDB dengan menggunakan *haemocytometer* (lampiran 1). Gambar 7. merupakan kurva pertumbuhan *Trichoderma viride*.



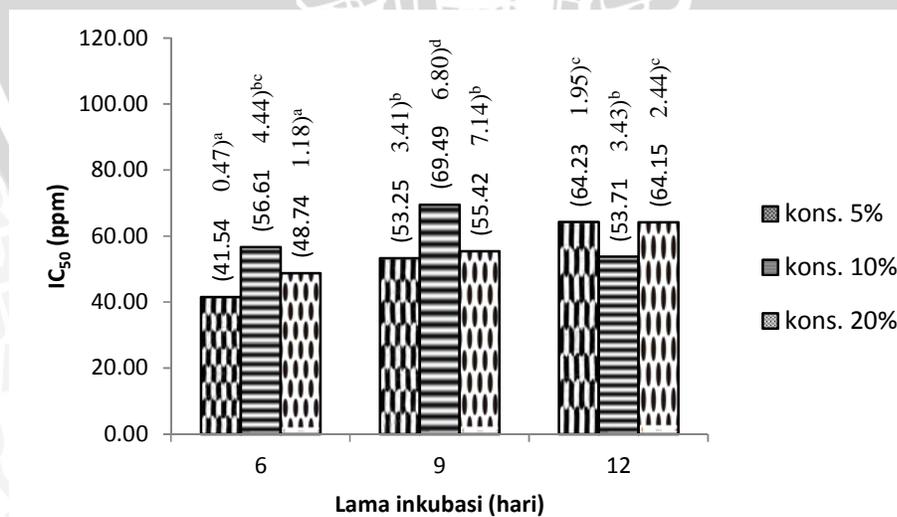
Gambar 7. Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Berdasarkan kurva tersebut, hari pertama dan kedua merupakan fase adaptasi. Hari ketiga sampai hari kelima merupakan fase eksponensial yang ditandai dengan kenaikan jumlah koloni jamur dari *Trichoderma viride* signifikan, hal tersebut mengindikasikan bahwa pada range waktu tersebut *Trichoderma viride* membelah dengan cepat. Hari kelima sampai hari keenam merupakan

fase stasioner. Metabolit yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* pada fase stasioner adalah metabolit sekunder. Dari hasil penelitian, fase stasioner pertumbuhan koloni *T. viride* setelah kultivasi selama 6 hari dengan jumlah koloni maksimum rata-rata $1,5 \times 10^9$ /ml. Hal ini yang mendasari dilakukannya masa panen pada fase stasioner yang berada pada hari keenam. Fase stasioner berakhir pada saat jumlah sel menurun disebut fase kematian.

4.2 Penelitian Pendahuluan

IC₅₀ adalah parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH (Andayani *et al.*,2008). Semakin kecil nilai IC₅₀, maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) nilai IC₅₀ (lampiran 2) menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ ekstrak sampel dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan lama inkubasi dan konsentrasi biakan sampel ($p < 0.05$), serta interaksi kedua perlakuan mempengaruhi secara nyata ($p < 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Nilai IC₅₀ ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Semakin tinggi nilai IC_{50} suatu sampel, maka aktivitas antioksidannya semakin kecil, karena nilai IC_{50} dan aktivitas antioksidan berbanding terbalik. Perlakuan konsentrasi biakan 5% dan lama inkubasi 6 hari memiliki nilai IC_{50} rendah, sedangkan konsentrasi biakan 10% dan lama inkubasi 9 hari memiliki nilai IC_{50} tinggi. Konsentrasi biakan akan mempengaruhi persaingan pengambilan nutrisi oleh jamur, sehingga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan jamur dan aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Menurut Fardiaz (1992), konsentrasi inokulum yang terlibat dalam fermentasi sangat mempengaruhi efektivitas penghasil produk.

Semakin lama waktu inkubasi maka aktivitas antioksidan semakin menurun. Menurut Atmaja *et al.*, (2013), waktu inkubasi merupakan waktu kontak antara enzim dan substrat untuk menghasilkan produk. Waktu inkubasi yang terlalu singkat mengakibatkan hanya sedikit enzim yang berikatan dengan substrat, sedangkan pada waktu inkubasi yang terlalu panjang seluruh enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga tidak terjadi penambahan produk dan memungkinkan terjadinya reaksi balik terurainya kompleks enzim substrat menjadi enzim bebas dan substrat kembali sehingga produk yang dihasilkan semakin sedikit. Selain itu dalam beberapa kasus, penambahan produk juga memungkinkan terjadinya inhibisi balik pada enzim.

Dari hasil penelitian pendahuluan ini, maka dapat diketahui bahwa penambahan perlakuan fermentasi pada sampel *Sargassum filipendula* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari sampel. Fermentasi merupakan proses pemecahan senyawa organik menjadi senyawa sederhana yang melibatkan organisme (Pujaningsih, 2005). Dengan penambahan konsentrasi biakan dan lama inkubasi *Trichoderma viride* terlebih dahulu, senyawa-senyawa kompleks penyusun dinding *Sargassum filipendula* terhidrolisis dan menjadi senyawa yang

lebih sederhana sehingga mempermudah ekstraksi sampel dan bisa didapatkan lebih banyak senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan.

Aktivitas antioksidan kesembilan sampel masih tergolong kuat karena nilai IC_{50} -nya sekitar 41.54 – 69.49 ppm, sedangkan kontrol yang dihasilkan tergolong sedang karena nilai IC_{50} -nya 123 ppm. Menurut Zuhra *et al.*, (2008), senyawa antioksidan dikategorikan dalam empat golongan yaitu sangat kuat (IC_{50} antara 1-50 ppm), kuat (IC_{50} antara 50-100 ppm), sedang (IC_{50} antara 100-150 ppm) dan lemah (IC_{50} antara 150-200 ppm). Jika IC_{50} lebih dari 200 ppm maka tidak berpotensi sebagai senyawa antioksidan. Dari hasil penelitian pendahuluan, dilanjutkan ke dalam penelitian utama dengan penambahan starter jamur *Trichoderma viride* dengan konsentrasi biakan dan lama inkubasi dimana konsentrasi biakan dan lama inkubasi yang digunakan berbeda dari yang sebelumnya.

Dari hasil penelitian pendahuluan, didapatkan hasil konsentrasi biakan yang terbaik untuk *starter* sampel adalah 5%, sedangkan lama inkubasi yang terbaik untuk menginkubasi sampel adalah 6 hari sehingga konsentrasi biakan dan lama waktu inkubasi ini yang dipakai sebagai acuan dasar pemilihan konsentrasi biakan dan lama inkubasi untuk penelitian utama. Penambahan konsentrasi biakan dan lamanya waktu inkubasi menunjukkan *Trichoderma viride* mampu mendegradasi selulosa pada substrat *Sargassum filipendula* sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan meningkat.

4.3 Penelitian Utama

Penelitian utama mengambil acuan dasar dari hasil terbaik penelitian pendahuluan. Pada tahap penelitian utama ditambahkan *starter* berupa jamur *Trichoderma viride* untuk mempercepat proses fermentasi dan penambahan konsentrasi biakan saat inkubasi. Sampel yang telah terfermentasi secara

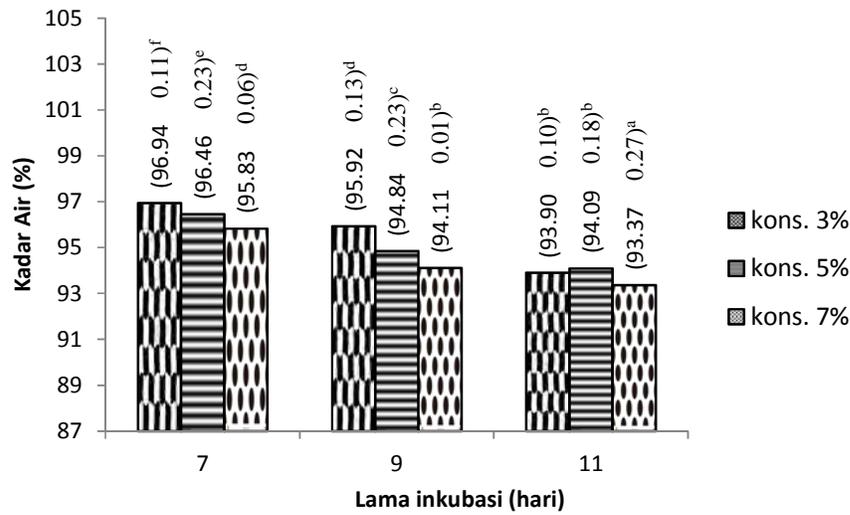
struktur telah berubah bentuk yaitu dari sampel kasar dan kenyal menjadi sampel yang lebih lunak. Hal ini mengindikasikan bahwa jamur *Trichoderma viride* telah berhasil menghasilkan enzim selulase untuk mendegradasi komponen dinding sel alga coklat *Sargassum filipendula*. Sampel yang terfermentasi selanjutnya diekstraksi. Proses ekstraksi menghasilkan sampel berwarna hijau tua dan coklat kehitaman.

4.4 Kadar air dan rendemen

4.4.1 Kadar air

Perbedaan perlakuan yang digunakan akan memberikan hasil yang berbeda terhadap ekstrak yang dihasilkan. Kadar air ekstrak merupakan jumlah air yang terkandung dalam ekstrak sampel dan nilainya dinyatakan dalam persen. Dengan mengetahui jumlah kadar air dalam sampel maka dapat diketahui konsentrasi sampel dalam ekstrak kasar.

Perhitungan analisis terhadap persen kadar air ekstrak etanol *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 3. Hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) persen kadar air (lampiran 3) menunjukkan bahwa kadar air ekstrak dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan konsentrasi biakan dan lama inkubasi ($p < 0.05$), serta interaksi kedua perlakuan ($p < 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Persen kadar air ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Persen kadar air dan persen rendemen sampel saling berhubungan. Nilai rendemen tinggi belum tentu berkualitas tinggi dan lebih banyak senyawa bioaktif yang dihasilkan karena jika kadar airnya juga tinggi maka konsentrasi ekstrak yang didapatkan rendah. Perlakuan yang berbeda konsentrasi biakan dan lama inkubasi memberikan hasil persen rendemen dan persen kadar air yang berbeda-beda juga.

Perlakuan konsentrasi biakan 7% dan lama inkubasi 11 hari memiliki nilai persen kadar air rendah, sedangkan konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi 7 hari memiliki nilai kadar air tinggi. Secara umum jamur juga membutuhkan air untuk pertumbuhannya. Fermentasi selulolitik merupakan cara mengatasi kendala bahan kaya selulosa. Mikrobia melepas enzim selulase untuk mendegradasi dan mentransformasi makromolekul selulosa menjadi molekul sederhana yang mudah diabsorpsi sel (Gianfreda dan Rao, 2004). Degradasi dinding sel akibat hidrolisis enzimatis menyebabkan dinding sel *Sargassum filipendula* mudah terurai, sehingga senyawa bioaktif yang ada didalamnya akan

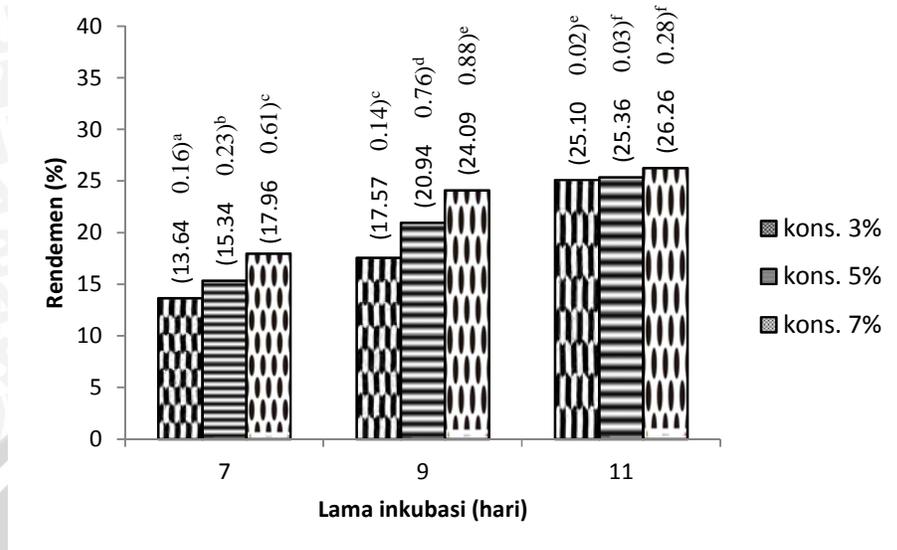
mudah diekstraksi. Semakin banyak senyawa-senyawa dalam jaringan alga yang terekstrak oleh etanol, maka semakin tinggi kadar air dalam jaringan alga.

Semakin tinggi konsentrasi biakan yang ditambahkan semakin rendah kadar air yang dihasilkan. Hal ini diduga disebabkan karena semakin banyak jumlah jamur yang ditambahkan maka semakin tinggi penggunaan air oleh jamur tersebut. Hal ini sesuai dengan Pirt (1975), air digunakan oleh mikroorganisme di dalam sel terutama dalam proses hidrolisis. Semakin lama inkubasi yang digunakan semakin rendah kadar air yang dihasilkan. Selama proses fermentasi berlangsung, enzim-enzim mikroba memecahkan karbohidrat dan senyawa-senyawa tersebut, sehingga air menjadi bebas dan lebih mudah menguap (Murniati, 2005). Akibatnya tekstur bahan semakin lunak dan berpori sehingga menyebabkan penguapan air selama proses pengeringan semakin mudah dan kadar air akan semakin rendah (Herawati, 2002).

4.4.2 Rendemen

Rendemen ekstrak merupakan perbandingan antara bobot ekstrak kasar yang dihasilkan dengan bobot awal yang digunakan dan nilainya dinyatakan dalam bentuk persen. Persen rendemen menunjukkan seberapa banyak ekstrak yang bisa diambil dari sampel. Semakin besar persen rendemen maka semakin banyak ekstrak senyawa bioaktif yang didapatkan.

Perhitungan analisis terhadap persen rendemen ekstrak etanol *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 4. Hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) rendemen (lampiran 4) menunjukkan bahwa rendemen antioksidan dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan konsentrasi biakan dan lama inkubasi ($p < 0.05$), serta interaksi kedua perlakuan ($p < 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Persen rendemen ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Hasil ekstraksi yang berbeda lama inkubasi, menunjukkan nilai rendemen yang berbeda-beda. Perlakuan konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi 7 hari memiliki nilai persen rendemen yang rendah karena jumlah rendemen ekstrak sangat dipengaruhi oleh kadar airnya. Rendemen dan kadar air saling berhubungan. Rendemen tinggi belum tentu berkualitas tinggi karena jika kadar airnya rendah maka konsentrasi ekstrak yang didapatkan juga rendah.

Perlakuan konsentrasi biakan 7% dan lama inkubasi 11 hari memiliki persen rendemen yang tinggi karena *Trichoderma viride* mampu menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis dinding sel *Sargassum filipendula*. Hal ini diduga karena semakin tinggi konsentrasi biakan semakin tinggi pula rendemen yang didapat. Kelebihan dari *Trichoderma viride* selain menghasilkan enzim selulolitik yang lengkap, juga menghasilkan enzim xyloglukanolitik (Tribak *et al.*, 2002). Keberadaan enzim ini akan semakin mempermudah enzim selulolitik dalam memecah selulosa, sehingga memudahkan ekstraksi. Semua kapang bersifat aerobik, yakni membutuhkan oksigen dalam pertumbuhannya. Kebanyakan kapang dapat tumbuh baik pada pH luas, yakni 2,0 sampai 8,5

tetapi biasanya pertumbuhannya akan baik bila pada kondisi asam atau pH rendah (Waluyo, 2004).

4.5 Aktivitas Antioksidan

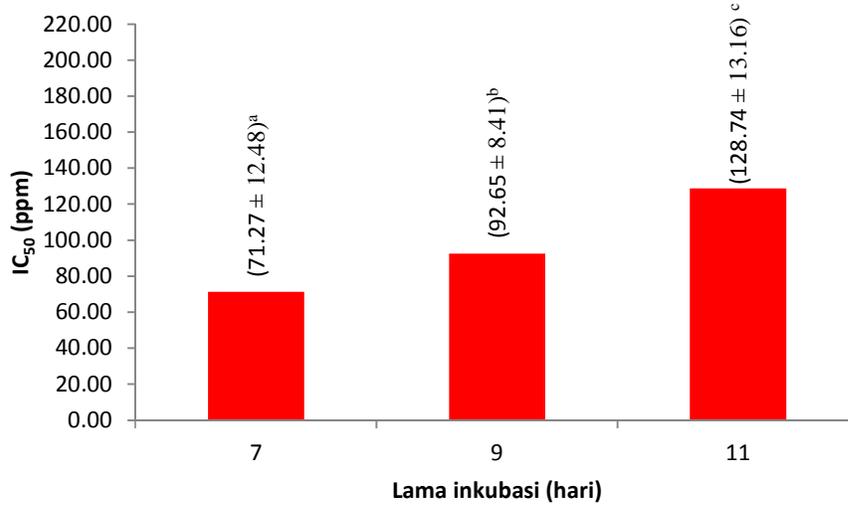
Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH untuk mengetahui pengaruh konsentrasi biakan dan lama inkubasi *Trichoderma viride* terhadap ekstrak kasar *Sargassum filipendula* sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau *Efficient Concentration* (EC_{50}) atau *Inhibition Concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persen penghambatan 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga EC_{50} atau IC_{50} yang rendah (Suratmo, 2009).

Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen menjadi DPPH-H yang diagnetik karena adanya pasangan elektron. Keadaan yang diagnetik pada DPPH-H ini tidak bersifat radikal bebas lagi. Reaksi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Prakash, 2001). Berdasarkan mekanisme tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa antioksidan mempunyai sifat yang relatif stabil dalam bentuk radikalnya. Senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dapat diprediksi dari golongan fenolat, flavonoid dan alkaloid. Antioksidan pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah Vitamin C.

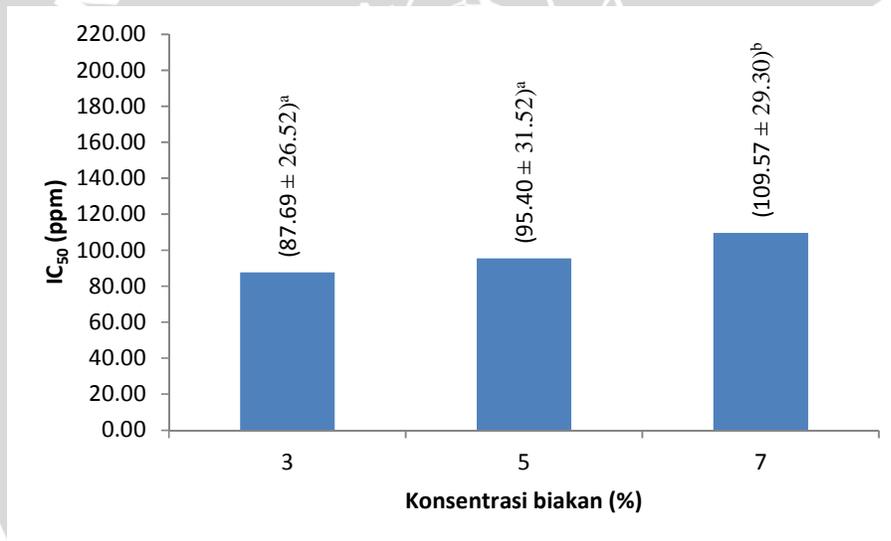
Reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh ekstrak *Sargassum filipendula* diindikasikan dengan berubahnya warna ungu menjadi warna kuning. Perubahan warna ini membuktikan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antioksidan. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Molyneux (2004), suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi warna kekuningan. Tingkat diskolorisasi warna ungu DPPH mengindikasikan aktivitas penghambatan radikal bebas oleh sampel antioksidan Abdille *et al.*, (2004). Perubahan warna yang terjadi pada ekstrak *Sargassum filipendula* disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas DPPH dengan satu atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa yang terkandung dalam sampel untuk membentuk senyawa 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl yang berwarna kuning.

Nilai IC_{50} ekstrak *Sargassum filipendula* yang difermentasi dengan starter jamur *Trichoderma viride* dengan konsentrasi biakan 3%, 5%, dan 7% (b/v) serta lama inkubasi 7, 9 dan 11 hari diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari nilai konsentrasi dan % inhibisi tersebut, maka dengan model LR (*Linear Regresion*) diperoleh persamaan garis dan didapatkan besarnya nilai IC_{50}

Perhitungan analisis terhadap nilai IC_{50} ekstrak etanol *Sargassum filipendula* yang difermentasi selama 7, 9 dan 11 hari disajikan pada Lampiran 5. Hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) nilai IC_{50} (lampiran 5) menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak sampel dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan konsentrasi biakan dan lama inkubasi sampel ($p < 0.05$), akan tetapi interaksi kedua perlakuan tidak mempengaruhi secara nyata ($p > 0.05$). Nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin rendah. Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 11 dan Gambar 12.



Gambar 11. Nilai IC₅₀ dengan perlakuan lama inkubasi



Gambar 12. Nilai IC₅₀ dengan perlakuan konsentrasi biakan

Hasil penelitian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Sargassum filipendula* yang ditambah konsentrasi biakan 3% dapat meningkatkan nilai IC₅₀ dari 165.96 ppm menjadi 87.69 ppm dan lama inkubasi 7 hari dapat meningkatkan nilai IC₅₀ dari 165.96 ppm menjadi 71.27 ppm. Hal ini diduga karena jamur mampu menghasilkan enzim selulase untuk mendegradasi substrat secara maksimal. Hal tersebut

sesuai dengan pernyataan Arnata (2009), bahwa aktivitas selulase yang maksimal dihasilkan setelah fermentasi selama 7 hari dari kapang *Trichoderma viride*. Baublis (2000) menjelaskan, senyawa fenolik memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi setelah dihidrolisis oleh enzim mikroba dari polisakarida yang mengikatnya.

Secara keseluruhan nilai IC_{50} vitamin C masih lebih kecil dibanding dengan nilai IC_{50} ekstrak *Sargassum filipendula*. Hal ini menunjukkan vitamin C masih merupakan penangkap radikal yang paling baik karena vitamin C merupakan senyawa yang sudah murni sedangkan ekstrak *Sargassum filipendula* masih dalam bentuk campuran dari beberapa senyawa. Menurut Wikanta *et al.*, (2005) kadar senyawa antioksidan dalam ekstrak sangat rendah akibat banyaknya komponen lain yang merupakan pengotor atau komponen pengotor yang terdapat didalam ekstrak masih sangat tinggi. Produk alam dari laut secara umum mengandung kadar garam yang tinggi. Apabila komponen pengotor paling utama yang terdapat dalam ekstrak tersebut adalah garam, maka perlu upaya *desalting* lebih dahulu agar didapatkan bahan aktif yang lebih murni dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

Jamur *Trichoderma* juga banyak menghasilkan substansi aktif seperti senyawa protein enzim ataupun senyawa lain dari golongan furan atau fenol (Suwahyono, 2002). Golongan fenol merupakan antioksidan yang terbaik. Perbedaan aktivitas antioksidan disebabkan perbedaan penambahan konsentrasi biakan, meskipun pada jumlah konsentrasi biakan tertinggi 7% justru aktivitas antioksidan menurun. Hal ini disebabkan pengaruh reaksi oksidasi selama fermentasi, dimana semakin tinggi jumlah konsentrasi biakan yang ditambahkan akan memicu reaksi oksidasi yang lebih besar, sehingga menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan. Menurut Rahman (1989), proses fermentasi melibatkan berbagai tipe reaksi kimia termasuk reaksi oksidasi. Menurut Fardiaz

(1992), konsentrasi inokulum yang terlibat dalam fermentasi sangat mempengaruhi efektivitas penghasilan produk.

Penggunaan lama inkubasi yang berbeda berpengaruh terhadap aktivitas senyawa antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*. Semakin lama waktu inkubasi maka aktivitas antioksidannya semakin menurun. Hal ini diduga karena dengan semakin lama inkubasi yang digunakan maka semakin kecil kemampuan jamur *Trichoderma viride* untuk menguraikan substrat *Sargassum filipendula*. Selain itu, penurunan jumlah jamur mungkin juga disebabkan kurangnya nutrisi dalam substrat, sehingga akhirnya jamur banyak yang mati. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Suhartono (1989), bahwa nutrisi yang ditambahkan ke dalam media fermentasi akan dihabiskan selama berlangsungnya proses fermentasi sampai dihasilkan aktivitas enzim yang maksimal, kemudian dengan berkurangnya nutrisi akan mengakibatkan aktivitas produksi enzim dan pertumbuhan mikroorganisme akan menurun. Jumlah inokulum akan mempengaruhi persaingan pengambilan nutrisi oleh jamur, sehingga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan jamur dan enzim selulase yang dihasilkan.

Menurut Martina (2002), jamur *Trichoderma viride* dari genus *Trichoderma* ini dikenal sebagai penghasil enzim hidrolitik, selulase, pektinase dan xilanase yang mampu mendegradasi polisakarida kompleks seperti selulosa, pektin, hemiselulosa dan xilan. Seperti yang diketahui bahwa dinding sel alga coklat secara umum mengandung senyawa selulosa, hemiselulosa dan pektin yang terikat kuat. Selulosa merupakan komponen struktural utama dinding sel dari alga coklat. Apabila struktur dinding sel tersebut dapat dihidrolisis, maka komponen senyawa bioaktif yang dihasilkan akan meningkat jumlah dan aktivitasnya. Pertumbuhan *T. viride* optimal pada pH sekitar 4 sedangkan untuk produksi enzim selulase mendekati pH 3. Selama produksi enzim, pH harus

dipertahankan dalam kisaran 3-4 karena inaktivasi enzim akan terjadi di bawah pH 2 (Waluyo, 2004). Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai. Terjadinya fermentasi ini menyebabkan perubahan sifat pangan, sebagai akibat dari pemecahan kandungan bahan pangan tersebut. Hasil-hasil fermentasi terutama tergantung pada jenis bahan pangan (substrat), jenis mikroba dan kondisi sekelilingnya yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikroba tersebut (Zurriyati, 1995). Pengkondisian lingkungan substrat yang sesuai sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan jamur dan enzim selulase yang dihasilkan.

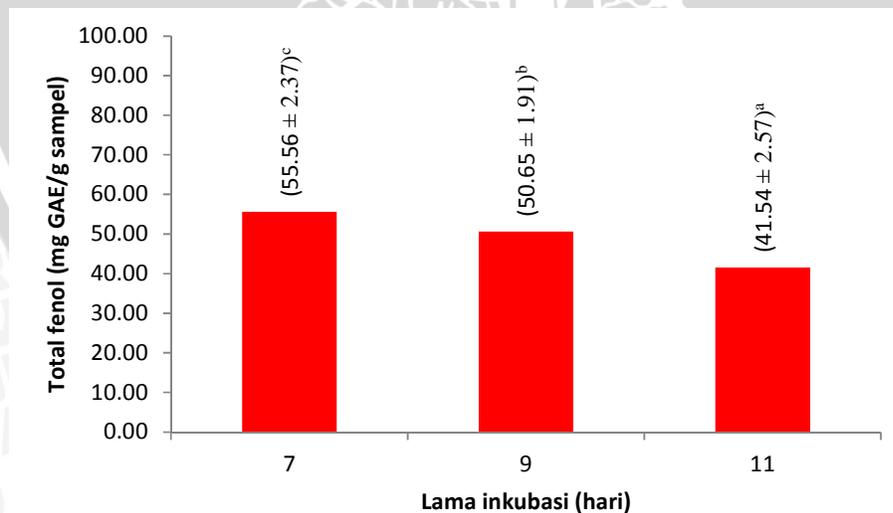
Interaksi jumlah konsentrasi biakan dan lama inkubasi tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidan, hal ini diduga karena kombinasi jumlah konsentrasi biakan dan lama inkubasi dalam penelitian tidak sebanding. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Rahman *et al.*, (1992), bahwa lamanya waktu inkubasi tergantung dari jumlah inokulum dan aktivitas kultur.

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol *Sargassum filipendula* memiliki nilai IC_{50} yang masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan vitamin C, hal ini diduga akibat sampel *Sargassum filipendula* masih berupa ekstrak kasar dan belum melalui proses pemurnian. Akan tetapi dari hasil penelitian telah diketahui bahwa ekstrak *Sargassum filipendula* yang difermentasi dengan *starter* jamur *Trichoderma viride* selama 7 hari memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar 71.27 ppm. Menurut Zuhra *et al.*, (2008), senyawa antioksidan dikategorikan dalam empat golongan yaitu sangat kuat (IC_{50} antara 1-50 ppm), kuat (IC_{50} antara 50-100 ppm), sedang (IC_{50} antara 100-150 ppm) dan lemah (IC_{50} antara 150-200 ppm).

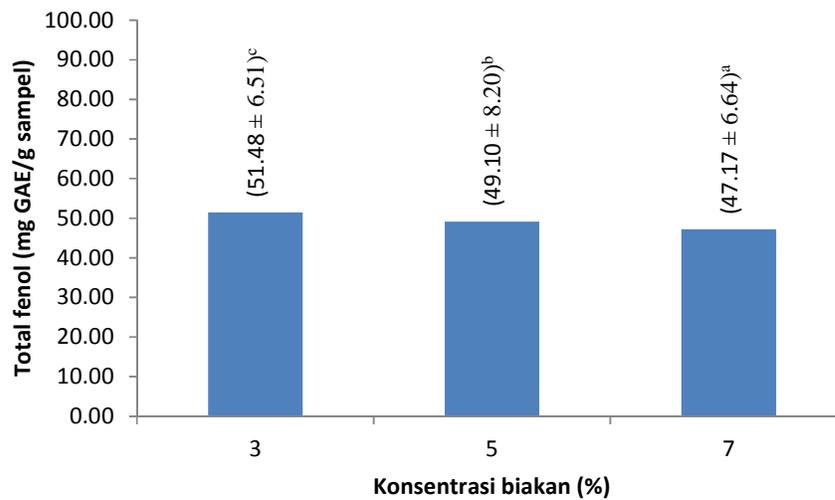
4.6 Total Fenol

Uji total fenol dilakukan untuk mengetahui banyaknya jumlah fenol dalam suatu sampel yang dihitung berdasarkan nilai absorbansi sampel yang disesuaikan dengan nilai absorbansi asam galat. Kadar fenol total dalam ekstrak uji dihitung sebagai miligram asam galat per gram ekstrak (GAE). Penetapan dilakukan dengan memasukkan data serapan ekstrak pada konsentrasi tertentu ke dalam persamaan regresi linier kurva baku asam galat (Y) sehingga dapat diketahui kadar total fenol (X).

Perhitungan analisis terhadap nilai total fenol ekstrak etanol *Sargassum filipendula* dengan penambahan konsentrasi biakan 3%, 5%, dan 7% (b/v) yang difermentasi selama 7, 9 dan 11 hari disajikan pada Lampiran 6. Hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) nilai total fenol (lampiran 6) menunjukkan bahwa nilai total fenol ekstrak sampel dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan konsentrasi biakan dan lama inkubasi sampel ($p < 0.05$), akan tetapi interaksi kedua perlakuan tidak mempengaruhi secara nyata ($p > 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 13 dan Gambar 14.



Gambar 13. Nilai total fenol dengan perlakuan lama inkubasi



Gambar 14. Nilai total fenol dengan perlakuan konsentrasi biakan

Nilai total fenol tertinggi pada perlakuan lama inkubasi 7 hari sebesar 55.56 ± 2.37 mg GAE/ g sampel. Sedangkan nilai total fenol tertinggi pada perlakuan konsentrasi biakan 3% sebesar 51.48 ± 6.51 mg GAE/ g sampel. Menurut Demirel *et al.*, (2009), kandungan fenol dari alga coklat bervariasi mulai dari 0.4 ± 0.2 mg GAE/ g sampai 189.6 ± 8.6 mg GAE/ g. Hasil penelitian Casal *et al.*, (2009), juga membuktikan kandungan polifenol yang tinggi ditemukan di *Sargassum sp.* yang ikut berperan sebagai antioksidan yaitu sebesar 80.39 ± 43.8 mg GAE/ g.

Semakin lama inkubasi maka nilai total fenol yang dihasilkan semakin rendah. Nilai total fenol pada ekstrak *Sargassum filipendula* dengan lama inkubasi 7 hari memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan lama inkubasi 9 dan 11 hari. Hal ini diduga karena lama inkubasi yang singkat dan terlalu lama berpengaruh terhadap nilai total fenol yang dihasilkan. Menurut Atmaja *et al.*, (2013), waktu inkubasi merupakan waktu kontak antara enzim dan substrat untuk menghasilkan produk. Waktu inkubasi yang terlalu singkat mengakibatkan hanya sedikit enzim yang berikatan dengan substrat, sedangkan pada waktu inkubasi yang terlalu panjang seluruh enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga tidak

terjadi penambahan produk dan memungkinkan terjadinya reaksi balik terurainya kompleks enzim substrat menjadi enzim bebas dan substrat kembali sehingga produk yang dihasilkan semakin sedikit. Selain itu dalam beberapa kasus, penambahan produk juga memungkinkan terjadinya inhibisi balik pada enzim.

Jamur *Trichoderma* juga banyak menghasilkan substansi aktif seperti senyawa protein enzim ataupun senyawa lain dari golongan furan atau fenol (Suwahyono, 2002). Akan tetapi semakin tinggi penambahan konsentrasi biakan maka nilai total fenol semakin menurun. Hal ini diduga karena banyaknya jumlah konsentrasi biakan selama fermentasi. Reaksi oksidasi dari proses fermentasi juga menyebabkan senyawa fenol bereaksi sebagai antioksidan untuk melawan reaksi oksidasi tersebut.

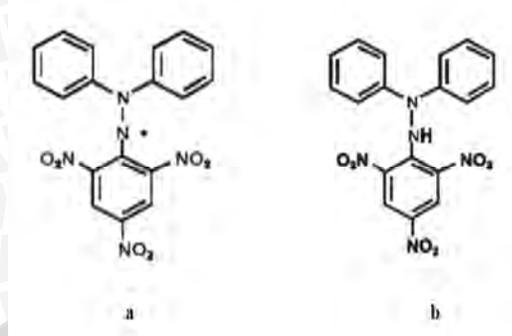
Semakin tinggi kandungan total fenol dalam ekstrak sampel uji semakin tinggi pula aktivitas penangkapan radikal yang ditunjukkan dengan semakin kecilnya nilai IC_{50} . Meenakshi *et al.* (2009) dan Lim *et al.* (2002) menyatakan bahwa adanya hubungan antara total fenol dan aktivitas antioksidan dimana jika di dalam suatu bahan memiliki konsentrasi senyawa fenol yang tinggi maka aktivitas antioksidan dalam bahan tersebut juga tinggi. Menurut Andayani *et al.*, (2008), senyawa fenol yang memiliki aktivitas antioksidan biasanya memiliki gugus -OH dan -OR seperti flavonoid dan asam fenolat. Oktaviana (2010) juga menyatakan bahwa senyawa fenol bisa berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya meniadakan radikal-radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipida.

4.7 Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik dari penelitian pengaruh konsentrasi biakan dan lama inkubasi dengan *Trichoderma viride* terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula* segar ini ditentukan dengan perhitungan aktivitas

antioksidan sampel yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Perlakuan yang pertama yaitu konsentrasi biakan *Trichoderma viride* 3%, 5%, dan 7% (b/v). Sedangkan perlakuan yang kedua yaitu lama inkubasi dengan starter jamur *Trichoderma viride* selama 7, 9 dan 11 hari. Tiap perlakuan diulangi sebanyak 2 kali ulangan. Berdasarkan data penelitian yang diperoleh, perlakuan yang terbaik adalah perlakuan konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi selama 7 hari dengan nilai rata-rata IC_{50} sebesar 87.69 ppm dan 71.27 ppm. Menurut Zuhra, *et al.*, (2008), IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang jika IC_{50} bernilai 100-150 ppm dan lemah jika nilai IC_{50} sebesar 151-200 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *Sargassum filipendula* yang difermentasi selama 7 hari dengan penambahan starter *Trichoderma viride* dapat menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50% pada konsentrasi tersebut.

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan radikal bebas dari DPPH dan membentuk DPPH tereduksi. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat reduktor (Molyneux, 2004). Rumus molekul DPPH dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Rumus Bangun DPPH

Keterangan:

- Bentuk radikal (DPPH)
- Bentuk nonradikal (DPPH-H)

4.8 Analisis fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa-senyawa fitokimia di dalam sampel *Sargassum filipendula*. Analisis fitokimia dilakukan terhadap hasil terbaik dari semua perlakuan yaitu ekstrak kasar sampel dengan konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi 7 hari. Hasil dari uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Fitokimia ekstrak ethanol *Sargassum filipendula*

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil (+/-)	Keterangan
Alkaloid	Wagner	+	Terbentuk endapan merah atau coklat
	Meyer	+	Terbentuk endapan putih kekuningan
Flavonoid	H ₂ SO ₄	+	Terbentuk endapan merah, kuning, atau jingga
Fenolik	FeCl ₃	+	Terbentuk warna hijau, biru hingga ungu pekat

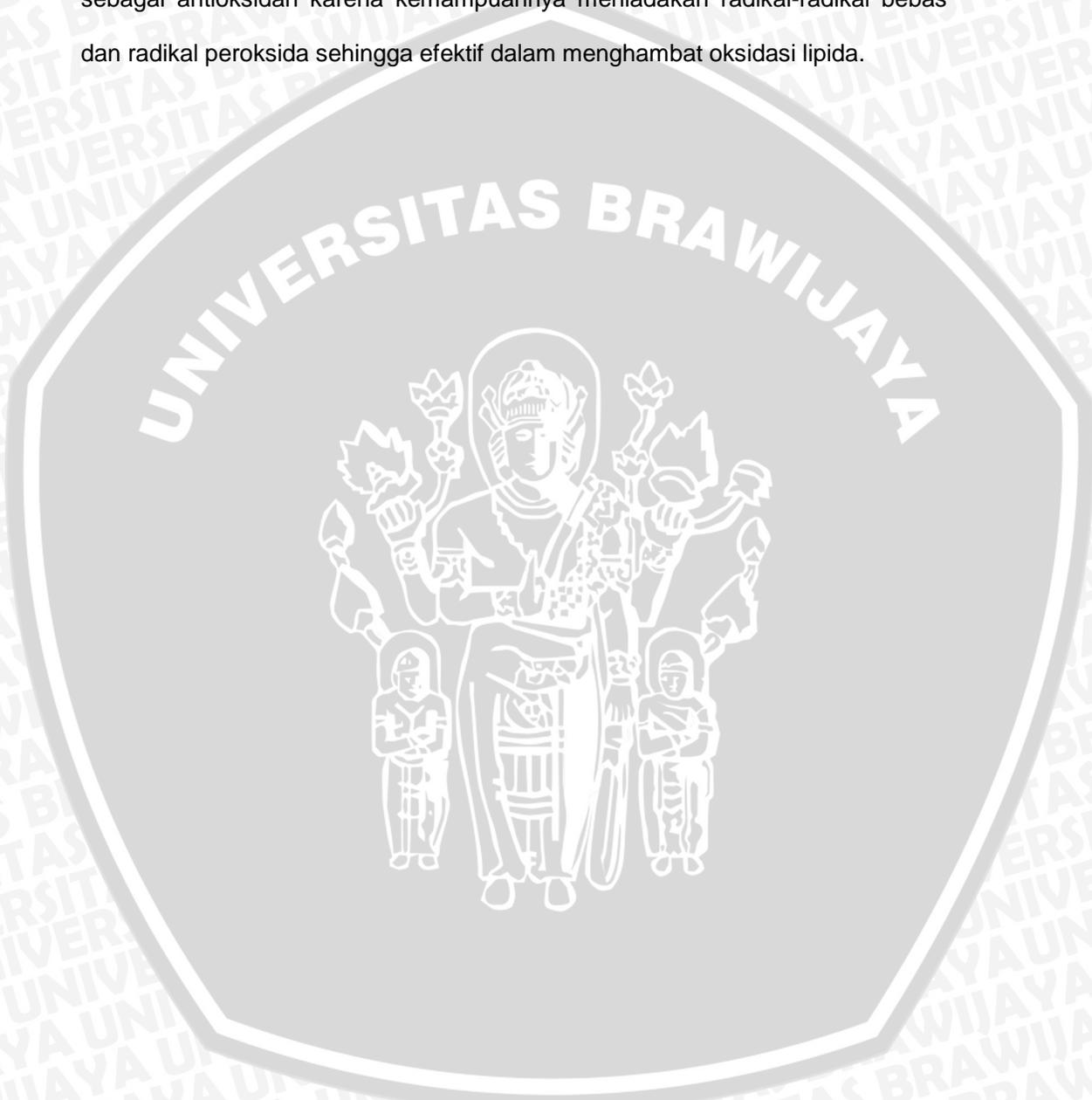
Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa *Sargassum filipendula* yang ditambah konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi 7 positif mengandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid dan fenol. Alkaloid merupakan golongan

senyawa metabolit sekunder yang terbesar dan secara kimia heterogen dimana ia berkisar dari senyawa sederhana seperti koniin sampai pada senyawa dengan cincin pentasiklik seperti strikhnin. Senyawa metabolit sekunder ini dapat ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, insekta, amfibi, jamur dan kadangkadangkang pada mamalia. Banyak senyawa alkaloid yang mempunyai aktivitas farmakologis yang penting seperti d-tubocurarin sebagai relaksasi otot dalam anestesi, reserpin sebagai antihipertensi dan obat psikotropik. Secara umum alkaloid mencakup senyawa yang bersifat basa, yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen dalam atau luar cincin heterosiklik (Nassel, 2008)

Flavonoid merupakan salah satu dari sekian banyak senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh suatu tanaman, yang biasa dijumpai pada bagian daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga dan biji. Secara kimia, flavonoid mengandung cincin aromatik tersusun dari 15 atom karbon dengan inti dasar tersusun dalam konjugasi C₆-C₃-C₆ (dua inti aromatik terhubung dengan 3 atom karbon) (10,11). Keberadaan cincin aromatik menyebabkan pitanya terserap kuat pada daerah panjang UV-Vis (Sriningsih, 2002). Flavonoid merupakan sekelompok besar antioksidan bernama polifenol yang terdiri atas antosianidin, biflavon, katekin, flavanon, flavon, dan flavonol (Waji dan Sugraeni, 2009). Menurut Cos *et al.*, (1998), aktivitas flavonoid sebagai penurun kadar asam urat melalui penghambatan enzim xantinoksidase dari beberapa flavonoid selain dapat menghambat enzim xantin oksidase juga bersifat sebagai antioksidan penangkap radikal superoksida.

Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya senyawa ini seringkali berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Adanya senyawa fenol dalam suatu bahan ditandai dengan terbentuknya warna hijau, biru hingga ungu pekat saat dilakukan uji fitokimia karena bahan bereaksi dengan pereaksi FeCl₃ (Harbone, 1987).

Menurut Andayani *et al.*, (2008), senyawa fenol yang memiliki aktivitas antioksidan biasanya memiliki gugus -OH dan -OR seperti flavonoid dan asam fenolat. Oktaviana (2010) juga menyatakan bahwa senyawa fenol bisa berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya meniadakan radikal-radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipida.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- Konsentrasi biakan 3% meningkatkan nilai IC_{50} *Sargassum filipendula* sebesar 47.16%
- Lama inkubasi 7 hari meningkatkan nilai IC_{50} *Sargassum filipendula* sebesar 57.06%
- Perlakuan terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari alga coklat yaitu perlakuan konsentrasi biakan 3% dan lama inkubasi 7 hari dengan nilai rerata total fenol masing-masing sebesar 51.48 dan 55.56 mg GAE/g sampel serta pengujian fitokimia memberikan hasil positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan fenolik

5.2 Saran

Disarankan untuk mengurangi lama waktu inkubasi, pemilihan konsentrasi biakan yang tepat dan jamur yang sesuai agar ekstrak yang didapatkan semakin meningkat aktivitas antioksidannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdille, H.M.D., Sing R. P., Jayaprakasha G. K. dan Jena B. S. 2004. **Antioxidant Activity of the Extract from *Dillenia indica* Fruits**. Journal of Food Chemistry. 90:891-896
- Amarowicz, R., Naczek, M. dan Shahidi, F., 2000. **Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls**. JAOCS, 77: 957-961
- Andayani R., Lisawati Y. dan Maimunah. 2008. **Penentuan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total dan likopen pada buah tomat (*Solanum lycopersicum* L)**. Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi. 13(1): 1-9
- Andriyanti, R. 2009. **Ekstraksi Senyawa Aktif Antioksidan dari Lintah Laut (*Discodoris sp.*)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor
- Anil, A. 2008. **Advances in glycosyl hydrolases for improved biomass conversion: theory and practice**. Training course and summer school on Next Generation biofuels. Institute of Chemical Technology
- Ansel, H. C., 1989. **Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi**. Edisi 4. UI Press. Jakarta. 94-147
- Apostolidis, E. dan C. M. Lee. 2010. **In Vitro Potential of *Ascophyllum nodosum* Phenolic Antioxidant-Mediated α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition**. Journal of Food Science. Vol. 75 No. 3. Hlm 97-102
- Arief, S. 2007. **Radikal Bebas**. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya
- Arnata, I. W. 2009. **Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae***. Thesis Master. IPB. Bogor.
- Astawan, M. dan Kasih, A. L. 2008. **Khasiat Warna-Warni Makanan**. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama
- Atmaja, D. S., Wuryanti dan Khairul A. 2013. **Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Amilase dari *Trichoderma viride* FNCC 6013**. Universitas Diponegoro. Vol 1. No 1. Hal. 85-93
- Baublis, A. J. 2000. **Potential of Wheat-Based Breakfast Cereals as Source of Dietary Antioxidant**. The American College of Nutrition, Massachusetts
- Basuki dan A. Situmorang. 1994. ***Trichoderma koningii* dan Pemanfaatannya Dalam Pengendalian Penyakit Akar Putih (*Rigidoporus microporus*) Pada Tanaman Karet**. Pusat Penelitian Karet Sei Putih. Hlm. 19-20
- Blois, M.S. 1958. **Antioxidant Determinations by The Use of a Stable Free Radical**. Nature, 181 : 199-200

- Cos ,P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. dan Berghe, D.V., 1998. **Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers**. J.Nat. Prod., 61 : 71-76
- Coughlan, M. P. 1985. **The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application**. Biotechnology Genetic Enggining. Review, 3, 39-109
- Dalimartha, S. dan Soediby, M. 1999. **Awet Muda Dengan Tumbuhan Obat dan Diet Supleme**. Trubus Agriwidya. Jakarta. hal. 36-40
- Demirel, Z., Ferda F. Yilmaz-Koz, Ulkun. Karabay-Yavasoglu, Guven Ozdemir dan Atakan Sukatar. 2009. **Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea**. J. Serb. Chem. Soc. 74 (6) 619–628
- Domsch, K.H., dan W. Gams. 1972. **Fungi in Agricultural Soils**. Longman Group Limited Publishing. London.
- Dyatmiko W, M.H. Santosa dan A.F. Hafid. 2000. **Aktifitas Penangkapan Radikal Bebas Dalam Sistem Molekuler dan Seluler Sari Air Rimpang Tanaman Obat Zingiberaceae**. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Pusat Penelitian Obat Tradisional Univ. Airlangga. Surabaya
- Endah, R.D., Sperisa, D., Adrian, N. dan Paryanto. 2007. **Pengaruh Kondisi Fermentasi terhadap Yield Etanol pada Pembuatan Bioetanol dari Pati Garut**. Gema Teknik, No. 2
- Fahri, M. 2009. **Alga Coklat Sargassum duplicatum**. <http://elfahrybima.blogspot.com/2009/12/alga-coklat-sargassum-duplicatum.html>. Diakses tanggal 13 Mei 2013
- Fanjiono, A. 2012. **Fermentasi**. <http://arifanjiono.blogdetik.com/?p=3>. Diakses tanggal 13 Mei 2012
- Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pangan 1**. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Frazier, W.C. dan D.C. Westhoff. 1977. **Food Microbiology**. 4th ed. McGraw-Hill Book. Publishing. Co. Ltd. New York.
- Casal-Garcia N. M., Jose Ramirez, Irene Leets, Ana C. P. dan Maria F. Q. 2009. **Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva sp.*, *Sargassum sp.* and *Porphyra sp.*) in human subjects**. British Journal of Nutrition, 101, 79–85
- Gianfreda, L. dan Rao, M.A. 2004. **Potential of Extra Cellular Enzymes in Remediation of Poluted Soils a Review**. Enzyme Microb Tech, 35: 339-354
- Gordon, M.H. 1990. **The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro**. Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. Food Antioxidants. Elsvier Applied Science, London

- Guenther, E. 1987. **Minyak Atsiri**. Diterjemahkan oleh R.S. Ketaren dan R. Mulyono. UI Press. Jakarta
- Gunam, I. B. W., Wayan R. A. dan I. B. N. S. Darma. 2011. **Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi**. Jurnal Biologi XV (2):29-33
- Han, S.S., Lo, S.C., Choi, Y.W., Kim, J.H. dan Baek, S.H., 2004. **Antioxidant Activity of Crude Extract and Pure Compounds of Acer ginnala Max.**, Bull. Korean Chem. Soc., Vol. 25, No. 3389
- Hamid,H.2009.**Phaeophyta**.<http://zaifbio.wordpress.com/2009/01/30/phaeophyta-algae-coklat/>Diakses tanggal 15 Februari 2012
- Harborne, J.B. 1987. **Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**. Ed ke-2. ITB. Bandung
- Hartono,W.2008.**Sargassumfilipendula**.<http://diaryroomblog.blogspot.com/2008/11/sargassum-filipendhula.html>. Diakses tanggal 2 September 2012
- Herawati, F. 2002. **Pemakaian Berbagai Jenis Bahan Pengisi Pada Pembuatan Tepung Tape Ubi Kayu dengan Menggunakan Pengering Semprot**. IPB. Bogor
- Indrayani, L., Soetjipto,H., dan Sihasale, L, 2006.**Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L. Vahl*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach**. Berk. Penelitian. Hayati: 12(57-61), 2006
- Indriani, H. dan E. Sumiarsih. 1992. **Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut**. Penebar Swadaya. Jakarta
- Juniarti, D.O., dan Yuhernita. 2009. **Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (*1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazyl*) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius L.*)**. Makara Sains Vol. 13 No. 1: 50-54
- Kadi, A. dan Atmadja, W.S. 1988. **Rumput laut, Jenis, Reproduksi, Budidaya dan Pascapanen**. Seri Sumber Daya Alam NO. 141. Puslitbang Oseanologi LIPI, Jakarta
- Khlifi, S., Hachimi, Y., Khalil, A., Essafi, N., dan Abboyi, A. 2005.**In Vitro Antioxidant Effect of *Globularia alypum L.* Hydromethanolic Extract**.Indian Journal of Pharmacology
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., dan Taniguchi, H. 2002. **Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds**.J. Agric. Food Chem., 50, 2161-2168
- Kusumawati, P. 2009. **Potensi Pengembangan Produk Pangan Fungsional Berantioksidan dari Makroalga dan Mikroalga**. Oseana Vol. 34 No. 3: 9-18

- Lim, S.N., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C., Ang P.O. 2002. **Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum***. Journal of Agricultural Food Chemistry. 50: 3862-3866.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Vanzyl W. dan Pretorius I.S. 2002. **Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology**. Microbiol Mol Biol Rev.66:506-577
- Marnoto, T., Gogot, H., Dewi, G. dan Fendy, A. P. 2012. **Ekstraksi Tannin Sebagai Bahan Pewarna Alami dari Tanaman Putrimalu (*Mimosa pudica*) Menggunakan Pelarut Organik**. Reaktor, Vol. 14 No. 1, Hal. 39-45
- Martina, A. 2002. **Optimasi Beberapa Faktor Fisik terhadap Laju Degradasi Selulosa Kayu Albasia (*Paraserianthes falcataria*(L.))**. Jurnal Natur Indonesia 4. 2:156-163
- Meenakshi S., Gnanambigai D.M., Mozhi S.T., Arumugam M., dan Balasubramanian T. 2009. **Total Flavonoid and *in vitro* Antioksidant Activity of Two Seaweeds of Rameshwaram Coast**. Global Journal of Pharmacology. 3(2): 59-62
- Miyamoto, K. 1997. **Renewable Biological System For Alternative Sustainable Senergy Production**. FAO Agricultural Services Bulletin 128
- Moeljoharjo, D.S. 1979. **Pengantar Biokimia**. Departemen Biokimia. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Molyneux, P., 2004. **The Use Of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity**. J. Sci. Technol., 26 (2), 211-219
- Moreno, C.S. 2002. **Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems**. Food Science and Technology Internasional8:(3), 121-137
- Mori, K., T. Ooi, M. Hiraoka, N. Oka, H. Hamada, M. Tamura dan T. Kusumi. 2004. **Fucoxanthin and Its Metabolites in Edible Brown Algae Cultivated in Deep Seawater**. Marine Drugs (2):63-72
- Mukhopadhiay, M. 2000. **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide**. CRC Press. London. New York
- Murniati, A. 2005. **Pengaruh Jenis Ragi dan Lama Fermentasi Terhadap Sifat Fisik-Kimia dan Organoleptik Tepung Ubi Kayu Tersakarifikasi**. Teknologi Hail Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang
- Nazir, M. 1989. **Metode Penelitian**. PT. Ghalia Indonesia. Jakarta
- Nassel, F. M. 2008. **Isolasi Alkaloid Utama dari Tumbuhan *Lerchea interrupta Korth***. Percikan: Vol. 91. ISSN: 0854-8986

- Oktaviana, P.R. 2010. **Kajian Kadar Kurkuminoid, Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) pada Berbagai Teknik Pengeringan dan Proporsi Pelarutan.** Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Paiva, A.R dan Robert, M.R. 1999. **Carotene and and Carotenoids As Antioxidants.** Journal of the American College of Nutrition, Vol. 18, No. 5, 426-433 (1999)
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 1986. **Dasar-dasar Mikrobiologi.** Penerjemah Hadiutomo, R.S. UI Press. Jakarta
- Perez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T. dan Martinez J. 2002. **Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin : an overview.** Int Microbiol. 5:53-63.
- Pirt, J. S. 1975. **Principle of Microbe and Cultivation.** John Willey and sons. NY. USA
- Praptiwi, P. Dewi dan M. Harapini. 2006. **Nilai Peroksida dan Anti Radikal Bebas *Diphenyl Pycrylhydrazil Hidrate* DPPH Ekstrak Methanol *Knema laurina*.** Majalah Farmasi Indonesia, (17)1:32-36
- Prakash, A., (2001). **Antioxidant Activity. Medallion Laboratories-Analytical Progress.** Volume 19. No.2
- Prescott S. C. dan Dunn M. 1981. **Industrial Microbiology.** New York: Mc. Graw Hill Book. Co. Ltd
- Pujaningsih, R. 2005 **Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas Pakan.** Laboratorium Teknologi Makanan Ternak, Universitas Diponegoro, Semarang
- Rahman, A. 1989. **Pengantar Teknologi Fermentasi.** Pusat AntarUniversitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor. Hal. 90 – 92
- Rahman, A., S. Fardiaz, W.P. Rahayu, Suliantari dan C.C. Nurwitri. 1992. **Bahan Pengajaran Teknologi Fermentasi Susu.** Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor
- Ramadhan, A. E. dan Haries A. P. 2010. **Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu dan Jumlah Stage Pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale Rosc*) Secara Batch.** Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang
- Robinson, T. 1995. **Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi.** Penerbit ITB Bandung. Bandung
- Rohdiana, D. 2001. **Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol Dalam Daun Teh.** Majalah Jurnal Indonesia 12, (1), 53-58
- Romimohtarto, K dan Juwana, S. 1999. **Biologi Laut : Pengetahuan Tentang Biota Laut.** Puslitbang Oseanografi – LIPI. Jakarta

- Sa'adah, Zulfatus, Noviana I. S., dan Abdullah. 2010. **Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat.** Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang
- Samingan. 2009. **Suksesi Fungi dan Dekomposisi Serasah Daun *Acacia mangium* Willd. Dalam Kaitan Dengan Keberadaan *Ganoderma* dan *Trichoderma* di Lantai Hutan Akasia.** Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Sastrohamidjojo, H. 1996. **Sintesis Bahan Alam.** Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- Siregar, M. 1988. **Dasar-Dasar Kimia Organik.** Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Proyek. Jakarta
- Silalahi, J. 2006. **Makanan Fungsional.** Kanisius. Yogyakarta
- Sirait, M. 2007. **Penuntun Fitokimia dalam Farmasi.** ITB. Bandung
- Sofia, D. 2006. **Antioksidan dan Radikal Bebas.** <http://www.chemistry.org>. Diakses 15 Februari 2012
- Sriningsih, Hapsoro, W. A., Wahono S., Agung E. W., Caidir, Firdayani, Susi K. dan Pertamawati K. 2002. **Analisa Senyawa Golongan Flavonoid Herba Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.).** Universitas Pancasila
- Sudarmadji, S.B., Haryono., dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian.** Liberty. Yogyakarta.
- Suhartono. 1989. **Enzim dan Bioteknologi.** PAU Bioteknologi. IPB. Bogor
- Suhartono, E., Fujiati, dan Aflanie I. 2002. **Oxygen Toxicity by Radiation and Effect of Glutamic Piruvat Transamine (GPT) Activity Rat Plasma after Vitamine C Treatmen.** Diajukan padaInternational seminar on *Environmental Chemistry and Toxicology*, Yogyakarta.
- Sunarni, T. 2005. **Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia *Papilionaceae*.**Jurnal Farmasi Indonesia 2 (2), 2001, 53-61
- Sunarni, T., S. Pramono dan R. Asmah. 2007. **Flavonoid Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. Dan Th.).** Majalah Farmasi Indonesia, 18(3), 111-116
- Supriyati, T. Haryati, I-G.M. Budiarsana dan I-K. Utama. 2010. **Fermentasi Jerami Padi Menggunakan *Trichoderma viride*.** Balai Penelitian Ternak. Bogor
- Surakhmad, W. 1994.**Pengantar Penelitian Ilmiah dan Dasar Metode Teknik.** Transito. Bandung
- Suratmo. 2009. **Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Antioksidan.** Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang

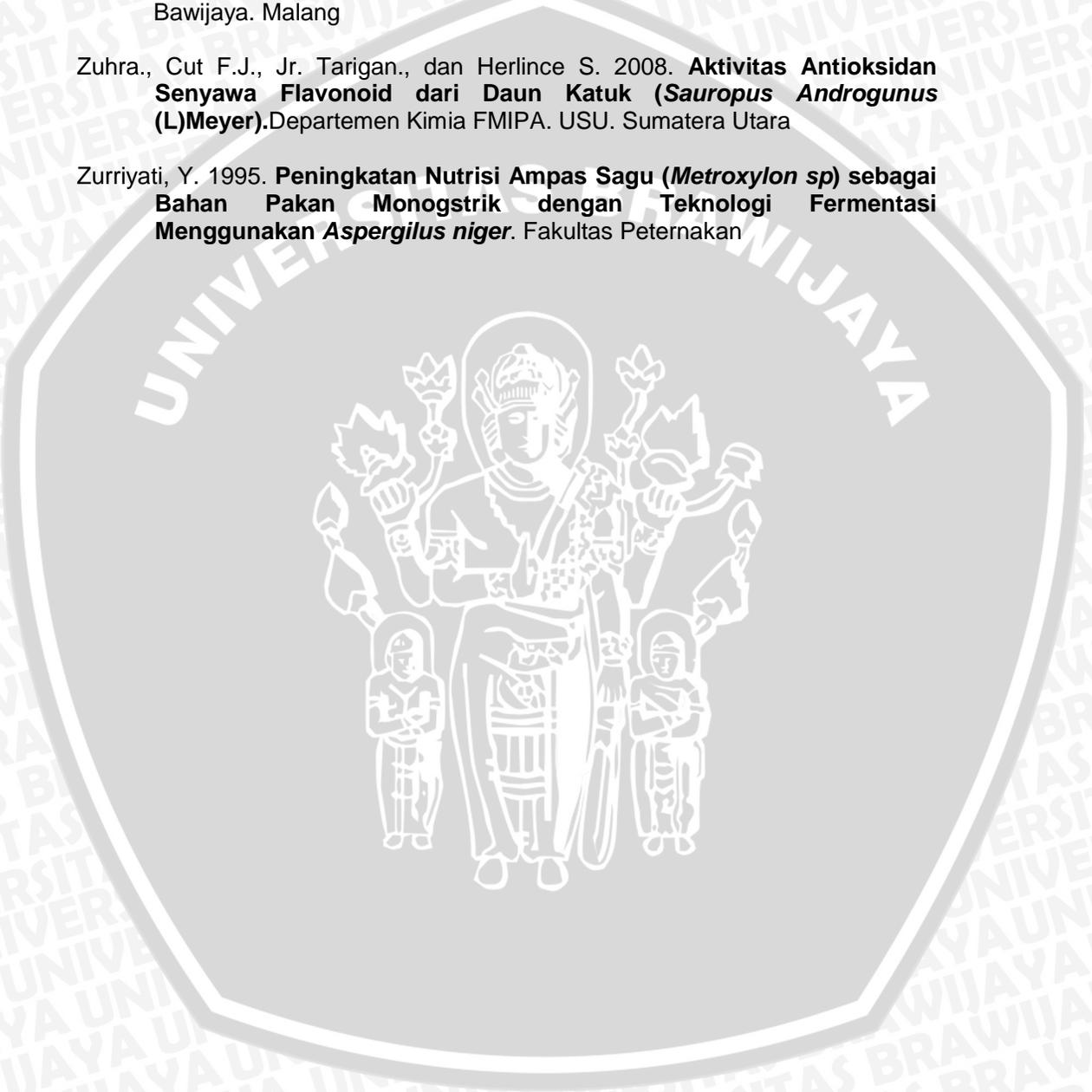
- Suryaningrum, D., Thamrin W. dan Hendy K. 2006. **Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Eucheuma cottoni***. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Vol.1 No. 1 Juni 2006
- Suwahyono, U. 2002. **Biopestisida**. Penebar Swadaya, Jakarta
- Tribak, M., J.A. Ocampo, dan I. Garcia Romera. 2002. **Production of xyloglucanolyticenzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus***. Mycologia. 3: 404-410
- Utami, T. S., Rita A., Heri H. dan Ahmad R. 2009. **Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpup (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA**. ISBN 978-979-98300-1-2
- Voight, R. 1971. **Buku Pelajaran Teknologi Farmasi**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Volk, T. J. 2004. **Tom Volk's Fungus of the Month for November 2004**. University of Wisconsin-La Crosse. http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi.pdf diakses tanggal 25 Januari 2013
- Wahyudi, P. dan M. Hendriana. 2012. **Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman *Quisqualis indica* L, dan Uji Potensinya dalam Menghasilkan Senyawa Antimikroba**. BPPT. Jakarta
- Waluyo, L. 2004. **Mikrobiologi Umum**. Universitas Muhamadiyah Press. Malang
- Wikanta, T., Hedi I.Y., dan M. Nursed. 2005. **Uji Aktivitas Antioksidan, Toksisitas dan Sitotoksitas Ekstrak Alga Merah *Rhodomyea Palmata***. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia Volume 11 Nomor 4 Tahun 2005. Jakarta
- Waji, R.A. dan Sugraeni, A. 2009. **Flavonoid (*Quercetin*)**. Fakultas MIPA. Universitas Hasanuddin. Makassar
- Wikipedia. 2012^a. **Klasifikasi *Sargassum fillipendula***. [Http://www.Wikipedia.org/klasifikasi_sargassum_fillipendula/wiki/htm](http://www.Wikipedia.org/klasifikasi_sargassum_fillipendula/wiki/htm). Diakses Tanggal 2 September 2012.
- _____. 2012^b. **Radikal Bebas**. http://id.wikipedia.org/wiki/Radikal_bebas. Diakses tanggal 15 Februari 2012
- _____. 2012^c. **Pelarut**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Pelarut>. Diakses tanggal 1 Juli 2012
- Yasita, D. dan Rachmawati, I. D. 2009. **Optimasi Proses Ekstraksi Pada Pembuatan Karaginan dari Rumput Laut *Eucheuma cottoni* untuk mencapai Foodgrade**. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang

Zahra, R.,M. Mehrnaz, V. Farzaneh dan S. Kohzad. 2007. **Antioxidant Activity of Extract from a Brown Alga, *Sargassum bovenanum***. African Journal of Biotechnology Vol.6 (24):2740-2745

Zubaidah, E., Saparianti E., dan Widya D. 2006. **Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Pangan**. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Bawijaya. Malang

Zuhra., Cut F.J., Jr. Tarigan., dan Herlince S. 2008. **Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus Androgunus* (L)Meyer)**.Departemen Kimia FMIPA. USU. Sumatera Utara

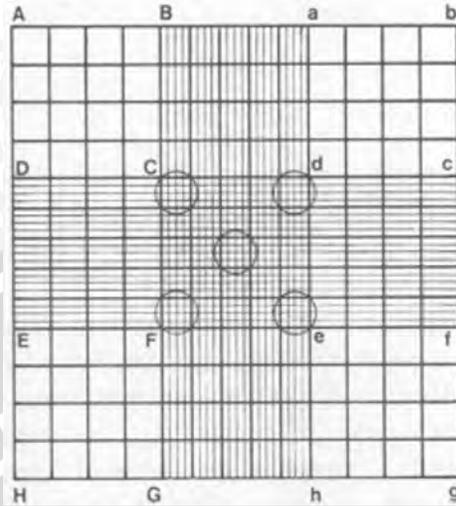
Zurriyati, Y. 1995. **Peningkatan Nutrisi Ampas Sagu (*Metroxylon sp*) sebagai Bahan Pakan Monogstrik dengan Teknologi Fermentasi Menggunakan *Aspergillus niger***. Fakultas Peternakan





LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan dan Data koloni jamur *Trichoderma viride* dengan *Haemacytometer*



Kotak c, d, e, f, dan o ditengahnya yang dilingkari adalah kotak yang dihitung jumlah konidianya. Adapun cara kerjanya sebagai berikut :

- dibersihkan *Haemacytometer* dan gelas penutupnya dengan larutan detergen, bilas dengan air suling lalu alkohol dan kemudian kering anginkan
- suspensi *Trichoderma viride* dalam media PDB yang akan ditentukan ditentukan jumlah selnya digojog dengan vortex sehingga merata
- diambil suspensi tersebut dengan pipet tetes sebanyak kira-kira 1-2 tetes dan teteskan tepat pada petak-petaknya
- ditutup dengan gelas penutupnya dan taruh pada meja mikroskop
- mula-mula diamati dengan menggunakan perbesaran lemah untuk menemukan petak-petaknya. Kemudian tentukan dari petak mana penghitungan akan dimulai,
- kemudian perbesaran mikroskop diubah keperbesaran sedang, atur fokus sampai sel-sel *Trichoderma viride* nampak jelas
- dihitung jumlah sel dalam setiap petak kecil, sel-sel yang berada pada garis batas atas atau batas kanan dihitung sebagai milik petak yang bersangkutan, tapi bila berada pada batas bawah atau batas kiri tidak dihitung

- dijumlah sel rata-rata dari 5 petak untuk menghitung jumlah sel tiap ml bahan
- hitung jumlah sel yang ada sampai 6 hari dan jumlah sel rata-rata per hari dibuat sebagai kurva fase pertumbuhan jamur dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{Jumlah sel rata-rata tiap petak} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Luas petak (mm}^2\text{)} \times \text{kedalaman petak (mm}^2\text{)}}$$

2. Data hasil perhitungan koloni jamur *Trichoderma viride* dengan *Haemacytometer*

Hari ke	jam ke-	rata-rata \sum sel spora	\sum sel	faktor pengenceran	\sum sel (spora/ml)	\sum sel (log sel/ml)
1	24	0.00	0	1×10^0	0.00×10^0	0
	30	1.00	5	1×10^0	2.50×10^5	5.40
	36	1.20	6	1×10^0	3.00×10^5	5.48
	42	0.80	4	1×10^1	2.00×10^6	6.30
2	48	1.60	8	1×10^1	4.00×10^6	6.60
	54	22.40	112	1×10^1	5.60×10^7	7.75
	60	6.40	32	1×10^2	1.60×10^8	8.20
	66	13.80	69	1×10^2	3.45×10^8	8.54
3	72	19.20	96	1×10^2	4.80×10^8	8.68
	78	24.20	121	1×10^2	6.05×10^8	8.78
	84	32.60	163	1×10^2	8.15×10^8	8.91
	90	44.00	220	1×10^2	1.10×10^9	9.04
4	96	5.00	25	1×10^3	1.25×10^9	9.10
	102	5.20	26	1×10^3	1.30×10^9	9.11
	108	5.40	27	1×10^3	1.35×10^9	9.13
	114	5.60	28	1×10^3	1.40×10^9	9.15
5	120	5.60	28	1×10^3	1.40×10^9	9.15
	126	5.80	29	1×10^3	1.45×10^9	9.16
	132	0.60	3	1×10^4	1.50×10^9	9.18
	138	0.60	3	1×10^4	1.50×10^9	9.18
6	144	0.60	3	1×10^4	1.50×10^9	9.18

Lampiran 2. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) Nilai IC₅₀ *Sargassum filipendula* yang difermentasi selama 6, 9 dan 12 hari

1. Data Hasil IC₅₀

Perlakuan	Ulangan	Persamaan regresi	Kadar IC ₅₀ (%)	Rerata IC ₅₀ (%)	
A1	B1	1	$y = 0.306x + 37.39$	41.21	41.54
		2	$y = 0.289x + 37.90$	41.87	
	B2	1	$y = 0.285x + 34.76$	53.47	56.61
		2	$y = 0.277x + 33.45$	59.75	
	B3	1	$y = 0.310x + 35.15$	47.90	48.74
		2	$y = 0.283x + 35.97$	49.58	
A2	B1	1	$y = 0.309x + 32.80$	55.66	53.25
		2	$y = 0.286x + 35.46$	50.84	
	B2	1	$y = 0.235x + 32.54$	74.30	69.49
		2	$y = 0.269x + 32.60$	64.68	
	B3	1	$y = 0.300x + 31.86$	60.47	55.42
		2	$y = 0.331x + 33.33$	50.36	
A3	B1	1	$y = 0.278x + 31.76$	65.61	64.23
		2	$y = 0.302x + 31.02$	62.85	
	B2	1	$y = 0.290x + 33.72$	56.14	53.71
		2	$y = 0.287x + 35.28$	51.29	
	B3	1	$y = 0.269x + 32.28$	65.87	64.15
		2	$y = 0.280x + 32.52$	62.43	
W0			$y = 0.182x + 27.29$	124.78	123.23
			$y = 0.191x + 26.76$	121.68	

Keterangan :

W0 : Kontrol

A1 : Lama inkubasi 6 hari

A2 : Lama inkubasi 9 hari

A3 : Lama inkubasi 12 hari

B1 : Konsentrasi biakkan 5% (v/b)

B2 : Konsentrasi biakkan 10% (v/b)

B3 : Konsentrasi biakkan 20% (v/b)

2. Tabel 2 arah

Konsentrasi biakan	Lama inkubasi			Rata-Rata
	A1	A2	A3	
B1	41.54	53.25	64.23	53.01
B2	56.61	69.49	53.71	59.94
B3	48.74	55.42	64.15	56.10
Rata-Rata	48.96	59.39	60.70	

Keterangan :

W0 : Kontrol

A1 : Lama inkubasi 6 hari

A2 : Lama inkubasi 9 hari

A3 : Lama inkubasi 12 hari

B1 : Konsentrasi biakkan 5% (v/b)

B2 : Konsentrasi biakkan 10 % (v/b)

B3 : Konsentrasi biakkan 20 % (v/b)

3. Rumus Perhitungan Data Hasil IC₅₀

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

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 (*inhibition 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).

4. Hasil ANOVA IC₅₀ *Sargassum filipendula*

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	494,5841	2	247,2920	14,6101	0,0015	4,2565
Columns	144,7856	2	72,3928	4,2770	0,0495	4,2565
Interaction	538,6881	4	134,6720	7,9565	0,0050	3,6331
Within	152,3345	9	16,9261			
Total	1330,3922	17				

Hasil ANOVA menunjukkan perlakuan A (lama inkubasi) perlakuan B (konsentrasi biakan) berpengaruh nyata ($p < 0,05$) serta interaksi keduanya ($p < 0,05$).

5. Analisis Uji Lanjut Duncan

Karena hasil interaksi dua perlakuan berbeda nyata, maka diperlukan uji lanjut Duncan untuk menentukan notasi yang berbeda

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{KT\ Galat}{Ulangan}}$$

$$= \sqrt{\frac{16,9261}{2}}$$

$$= 2,91$$

➤ r.p = (perlakuan, galat)

r (perlakuan)	p (db galat)	r,p	Hasil tabel nilai-nilai r,p untuk uji jarak Duncan (DMRT)
2	9	2,9	3,20
3	9	3,9	3,34
4	9	4,9	3,41
5	9	5,9	3,47
6	9	6,9	3,50
7	9	7,9	3,52
8	9	8,9	3,52
9	9	9,9	3,52

➤ R.P

Banyaknya perlakuan (r)	Selangan	R.P = (r,p). $S_{\bar{x}}$
2	0	(2,9) x 2,91 => (3,20) x 2,91 = 9,31
3	1	(3,9) x 2,91 => (3,34) x 2,91 = 9,72
4	2	(4,9) x 2,91 => (3,41) x 2,91 = 9,92
5	3	(5,9) x 2,91 => (3,47) x 2,91 = 10,10
6	4	(6,9) x 2,91 => (3,50) x 2,91 = 10,19
7	5	(7,9) x 2,91 => (3,52) x 2,91 = 10,24
8	6	(8,9) x 2,91 => (3,52) x 2,91 = 10,24
9	7	(9,9) x 2,91 => (3,52) x 2,91 = 10,24

Pembanding Duncan	2	3	4	5	6	7	8	9
$S_{\bar{x}}$	2,91	2,91	2,91	2,91	2,91	2,91	2,91	2,91
r.p	3,20	3,34	3,41	3,47	3,50	3,52	3,52	3,52
R.P	9,31	9,72	9,92	10,10	10,19	10,24	10,24	10,24

Pengurutan hasil IC_{50} dari terendah ke tertinggi untuk penentuan notasi

Nilai rerata	Hasil pengurangan	Pembanding Duncan (R.P)	Notasi
41,54	-	-	a
48,74	48,74 – 41,54 = 7,2	< 9,31	a
53,25	53,25 – 41,54 = 11,71	> 9,72	b
53,71	53,71 – 53,25 = 0,46	< 9,31	b
55,42	55,42 – 53,25 = 2,17	< 9,72	b
56,61	56,61 – 53,25 = 3,36 64,15 – 56,61 = 6,4	< 9,92 \leq 9,31	bc
64,15	64,15 – 53,25 = 10,9	> 10,10	c
64,23	64,23 – 56,61 = 7,62	< 9,72	c
69,49	69,49 – 56,61 = 12,88	> 9,92	d

Konsentrasi	Lama inkubasi (hari)		
	6	9	12
5%	41,54 ^a	53,25 ^b	64,23 ^c
10%	56,61 ^{bc}	69,49 ^d	53,71 ^b
20%	48,74 ^a	55,42 ^b	64,15 ^c

Lampiran 3. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) persen kadar air ekstrak ethanol *Sargassum filipendula*

1. Data Hasil Kadar Air

Perlakuan	Ulangan	Berat Botol Timbang (A)	Berat Sampel (B)	Berat Botol + Berat Sampel (C)	Kadar Air (%)	Rerata Kadar Air (%)	
P1	W1	1	18.4718	2.0210	18.5352	96.86	96.94
		2	18.8104	2.0365	18.8710	97.02	
	W2	1	17.1748	2.0186	17.2496	96.29	96.46
		2	18.4263	2.0358	18.4951	96.62	
	W3	1	18.1878	2.0064	18.2724	95.78	95.83
		2	17.3426	2.0258	17.4263	95.87	
P2	W1	1	21.0691	2.0208	21.1533	95.83	95.92
		2	17.5291	2.0284	17.6099	96.02	
	W2	1	18.3355	2.0261	18.4367	95.01	94.84
		2	20.7240	2.0102	20.8309	94.68	
	W3	1	21.7329	2.0061	21.8512	94.10	94.11
		2	16.2625	2.0057	16.3805	94.12	
P3	W1	1	25.5269	2.0304	25.6493	93.97	93.90
		2	18.6398	2.0050	18.7634	93.84	
	W2	1	25.2357	2.0184	25.3524	94.22	94.09
		2	18.3265	2.0104	18.4478	93.97	
	W3	1	16.3312	2.0031	16.4602	93.56	93.37
		2	17.4528	2.0055	17.5897	93.17	
W0		18.7705	2.0040	18.9701	90.04	-	

Keterangan :

P1 : Lama inkubasi 7 hari

P2 : Lama inkubasi 9 hari

P3 : Lama inkubasi 11 hari

W1 : Konsentrasi biakkan 3 % (v/b)

W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)

W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)

W0 : Kontrol

2. Tabel 2 arah

Konsentrasi biakan	Lama inkubasi			Rata-Rata
	P1	P2	P3	
W1	96.94	95.92	93.90	95.59
W2	96.46	94.84	94.09	95.13
W3	95.83	94.11	93.37	94.43
Rata-Rata	96.41	94.96	93.79	

Keterangan :

P1 : Lama inkubasi 7 hari

P2 : Lama inkubasi 9 hari

P3 : Lama inkubasi 11 hari

W1 : Konsentrasi biakkan 3% (v/b)

W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)

W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)

3. Rumus Perhitungan Data Hasil Kadar Air

➤ Kadar Air :

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

Keterangan :

A : Berat Botol Timbang (A)

B : Berat Sampel

C : Berat Botol Timbang + Sampel

4. Hasil ANOVA Persen Kadar Air

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	20,6928	2	10,3464	366,0251	0,0000	4,2565
Columns	4,0685	2	2,0342	71,9655	0,0000	4,2565
Interaction	1,0890	4	0,2723	9,6316	0,0026	3,6331
Within	0,2544	9	0,0283			
Total	26,1047	17				

Hasil ANOVA menunjukkan perlakuan perlakuan P (lama inkubasi), W (konsentrasi biakan) dan interaksi keduanya berpengaruh nyata ($p < 0,05$).

5. Analisis Uji Lanjut Duncan

Karena hasil interaksi dua perlakuan berbeda nyata, maka diperlukan uji lanjut Duncan untuk menentukan notasi yang berbeda

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{KT\ Galat}{Ulangan}}$$

$$= \sqrt{\frac{0,0283}{2}}$$

$$= 0,12$$

➤ r.p = (perlakuan, galat)

r (perlakuan)	p (db galat)	r,p	Hasil tabel nilai-nilai r,p untuk uji jarak Duncan (DMRT)
2	9	2,9	3,20
3	9	3,9	3,34
4	9	4,9	3,41
5	9	5,9	3,47
6	9	6,9	3,50
7	9	7,9	3,52
8	9	8,9	3,52
9	9	9,9	3,52

➤ R.P

Banyaknya perlakuan (r)	Selangan	R.P = (r,p). $S_{\bar{x}}$
2	0	$(2,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,20) \times 0,12 = 0,38$
3	1	$(3,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,34) \times 0,12 = 0,40$
4	2	$(4,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,41) \times 0,12 = 0,41$
5	3	$(5,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,47) \times 0,12 = 0,42$
6	4	$(6,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,50) \times 0,12 = 0,42$
7	5	$(7,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,52) \times 0,12 = 0,42$
8	6	$(8,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,52) \times 0,12 = 0,42$
9	7	$(9,9) \times 0,12 \Rightarrow (3,52) \times 0,12 = 0,42$

Pembanding Duncan	2	3	4	5	6	7	8	9
$S_{\bar{x}}$	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
r.p	3,20	3,34	3,41	3,47	3,50	3,52	3,52	3,52
R.P	0,38	0,40	0,41	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42

Pengurutan hasil kadar air dari terendah ke tertinggi untuk penentuan notasi

Nilai rerata	Hasil pengurangan	Pembanding Duncan (R.P)	Notasi
93,37	-	-	a
93,90	$93,90 - 93,37 = 0,53$	$> 0,38$	b
94,09	$94,09 - 93,90 = 0,19$	$< 0,38$	b
94,11	$94,11 - 93,90 = 0,21$	$< 0,40$	b
94,84	$94,84 - 93,90 = 0,94$	$> 0,41$	c
95,83	$95,83 - 94,84 = 0,99$	$> 0,38$	d
95,92	$95,92 - 95,83 = 0,09$	$< 0,40$	d
96,46	$96,46 - 95,92 = 0,54$	$> 0,38$	e
96,94	$96,94 - 96,46 = 0,48$	$> 0,38$	f

Konsentrasi	Lama inkubasi (hari)		
	7	9	11
3%	96,94 ^f	95,92 ^d	93,90 ^b
5%	96,46 ^e	94,84 ^c	94,09 ^b
7%	95,83 ^d	94,11 ^b	93,37 ^a



Lampiran 4. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) persen rendemen ekstrak ethanol *Sargassum filipendula*

1. Data Hasil Rendemen

Perlakuan		Ulangan	Berat Ekstrak Sampel (g)	Berat Basah Ekstrak (g)	Berat Kering Ekstrak (g)
P1	W1	1	21.85	21.16	0.69
		2	22.72	22.04	0.68
	W2	1	20.87	20.10	0.77
		2	22.40	21.64	0.76
	W3	1	20.73	19.86	0.87
		2	22.18	21.26	0.92
P2	W1	1	20.97	20.10	0.87
		2	22.15	21.27	0.88
	W2	1	20.39	19.37	1.02
		2	20.20	19.13	1.07
	W3	1	20.89	19.66	1.23
		2	19.92	18.75	1.17
P3	W1	1	20.85	19.59	1.26
		2	20.29	19.04	1.25
	W2	1	21.90	20.63	1.27
		2	20.93	19.67	1.26
	W3	1	20.48	19.16	1.32
		2	19.08	17.78	1.30

Keterangan :

P1 : Lama inkubasi 7 hari

P2 : Lama inkubasi 9 hari

P3 : Lama inkubasi 11 hari

W1 : Konsentrasi biakkan 3 % (v/b)

W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)

W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)

Perlakuan	Ulangan	Berat Sampel Awal (g)	Berat Basah Sampel Awal (g)	Berat Kering Sampel Awal (g)	Rendemen Kering (%)	Rerata Rendemen Kering (%)
P1	W1	1	50.06	45.07	4.99	13.75
		2	50.19	45.19	5.00	13.52
	W2	1	50.10	45.11	4.99	15.50
		2	50.08	45.09	4.99	15.18
	W3	1	50.06	45.07	4.99	17.53
		2	50.03	45.05	4.98	18.39
P2	W1	1	50.21	45.21	5.00	17.47
		2	50.12	45.13	4.99	17.67
	W2	1	50.13	45.14	4.99	20.40
		2	50.20	45.20	5.00	21.48
	W3	1	50.06	45.07	4.99	24.71
		2	50.14	45.15	4.99	23.47
P3	W1	1	50.29	45.28	5.01	25.09
		2	50.00	45.02	4.98	25.12
	W2	1	50.10	45.11	4.99	25.38
		2	50.04	45.06	4.98	25.34
	W3	1	50.04	45.06	4.98	26.46
		2	50.18	45.18	5.00	26.06

Keterangan :

P1 : Lama inkubasi 7 hari

P2 : Lama inkubasi 9 hari

P3 : Lama inkubasi 11 hari

W1 : Konsentrasi biakkan 3 % (v/b)

W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)

W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)

W0 : Kontrol

2. Tabel 2 arah

Konsentrasi biakan	Lama inkubasi			Rata-Rata
	P1	P2	P3	
W1	13.64	17.57	25.10	18.77
W2	15.34	20.94	25.36	20.55
W3	17.96	24.09	26.26	22.77
Rata-Rata	15.65	20.87	25.57	

Keterangan :

P1 : Lama inkubasi 7 hari

P2 : Lama inkubasi 9 hari

P3 : Lama inkubasi 11 hari

W1 : Konsentrasi biakkan 3 % (v/b)

W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)

W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)

3. Rumus Perhitungan Data Hasil Rendemen

- Berat Basah Ekstrak :

$$\frac{\text{Kadar Air}}{100} \times \text{Berat Ekstrak Sampel}$$

- Berat Kering Ekstrak :

$$\text{Berat Ekstrak Sampel (g)} - \text{Berat Basah Ekstrak}$$

- Berat Basah Sampel Awal :

$$\frac{\% \text{ Kadar Air Kontrol Sampel}}{100} \times \text{Berat Sampel Awal}$$

- Berat Kering Sampel Awal

$$\text{Berat Sampel Awal (g)} - \text{Berat Basah Sampel Awal}$$

- Rendemen Berat Kering

$$\frac{\text{Berat Kering Ekstrak}}{\text{Berat Kering Sampel Awal}} \times 100 \%$$

4. Hasil ANOVA Persen Rendemen

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	296,0782	2	148,0391	700,9796	0,0000	4,2565
Columns	48,1995	2	24,0998	114,1147	0,0000	4,2565
Interaction	14,7844	4	3,6961	17,5014	0,0003	3,6331
Within	1,9007	9	0,2112			
Total	360,9628	17				

Hasil ANOVA menunjukkan perlakuan P (lama inkubasi), perlakuan W (konsentrasi biakan) dan interaksi keduanya berpengaruh nyata ($p < 0,05$).

5. Analisis Uji Lanjut Duncan

Karena hasil interaksi dua perlakuan berbeda nyata, maka diperlukan uji lanjut Duncan untuk menentukan notasi yang berbeda

$$= \frac{r}{p} = \frac{2}{9} = 0,33$$

- r.p = (perlakuan, galat)

r (perlakuan)	p (db galat)	r,p	Hasil tabel nilai-nilai r,p untuk uji jarak Duncan (DMRT)
2	9	2,9	3,20
3	9	3,9	3,34
4	9	4,9	3,41
5	9	5,9	3,47
6	9	6,9	3,50
7	9	7,9	3,52
8	9	8,9	3,52
9	9	9,9	3,52

➤ R.P

Banyaknya perlakuan (r)	Selangan	R.P = (r,p). $S_{\bar{x}}$
2	0	$(2,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,20) \times 0,33 = 1,06$
3	1	$(3,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,34) \times 0,33 = 1,10$
4	2	$(4,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,41) \times 0,33 = 1,13$
5	3	$(5,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,47) \times 0,33 = 1,15$
6	4	$(6,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,50) \times 0,33 = 1,16$
7	5	$(7,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,52) \times 0,33 = 1,16$
8	6	$(8,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,52) \times 0,33 = 1,16$
9	7	$(9,9) \times 0,33 \Rightarrow (3,52) \times 0,33 = 1,16$

Pembanding Duncan	2	3	4	5	6	7	8	9
$S_{\bar{x}}$	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
r.p	3,20	3,34	3,41	3,47	3,50	3,52	3,52	3,52
R.P	1,06	1,10	1,13	1,15	1,16	1,16	1,16	1,16

Pengurutan hasil rendemen dari terendah ke tertinggi untuk penentuan notasi

Nilai rerata	Hasil pengurangan	Pembanding Duncan (R.P)	Notasi
13,64	-	-	a
15,34	$15,34 - 13,64 = 1,7$	$> 1,06$	b
17,57	$17,57 - 15,34 = 2,23$	$> 1,10$	c
17,96	$17,96 - 17,57 = 0,39$	$< 1,06$	c
20,94	$20,94 - 17,57 = 3,37$	$> 1,10$	d
24,09	$24,09 - 20,94 = 3,15$	$> 1,06$	e
25,10	$25,10 - 24,09 = 1,01$	$< 1,06$	e
25,36	$25,36 - 24,09 = 1,27$	$> 1,10$	f
26,26	$26,26 - 25,36 = 0,9$	$< 1,06$	f

Konsentrasi	Lama inkubasi (hari)		
	7	9	11
3%	13,64 ^a	17,57 ^c	25,10 ^e
5%	15,34 ^b	20,94 ^d	25,36 ^f
7%	17,96 ^c	24,09 ^e	26,26 ^f



Lampiran 5. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) Nilai IC₅₀ *Sargassum filipendula* yang difermentasi selama 7, 9 dan 11 hari

1. Data Hasil IC₅₀

Perlakuan	Ulangan	Persamaan regresi	Kadar IC ₅₀ (%)	Rerata IC ₅₀ (%)	
P1	W1	1	$y = 0.260x + 32.78$	66.23	63.10
		2	$y = 0.251x + 34.95$	59.96	
	W2	1	$y = 0.233x + 32.53$	74.98	65.09
		2	$y = 0.310x + 32.89$	55.19	
	W3	1	$y = 0.216x + 32.23$	82.27	85.63
		2	$y = 0.250x + 27.75$	89.00	
P2	W1	1	$y = 0.194x + 34.58$	79.48	84.02
		2	$y = 0.213x + 31.14$	88.54	
	W2	1	$y = 0.207x + 30.93$	92.13	93.11
		2	$y = 0.200x + 31.18$	94.10	
	W3	1	$y = 0.216x + 27.90$	102.31	100.82
		2	$y = 0.223x + 27.85$	99.33	
P3	W1	1	$y = 0.200x + 27.12$	114.40	115.96
		2	$y = 0.181x + 28.73$	117.51	
	W2	1	$y = 0.203x + 22.78$	134.09	128.01
		2	$y = 0.202x + 25.37$	121.93	
	W3	1	$y = 0.180x + 24.39$	142.28	142.25
		2	$y = 0.176x + 24.97$	142.22	
W0		$y = 0.178x + 20.46$	165.96	-	

Keterangan :

- P1 : Lama inkubasi 7 hari
- P2 : Lama inkubasi 9 hari
- P3 : Lama inkubasi 11 hari
- W1 : Konsentrasi biakkan 3 % (v/b)
- W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)
- W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)
- W0 : Kontrol

2. Tabel 2 arah

Konsentrasi biakan	Lama inkubasi			Rata-Rata
	P1	P2	P3	
W1	63.10	84.02	115.96	87.69
W2	65.09	93.11	128.01	95.40
W3	85.63	100.82	142.25	109.57
Rata-Rata	71.27	92.65	128.74	

Keterangan :

P1 : Lama inkubasi 7 hari

P2 : Lama inkubasi 9 hari

P3 : Lama inkubasi 11 hari

W1 : Konsentrasi biakkan 3 % (v/b)

W2 : Konsentrasi biakkan 5 % (v/b)

W3 : Konsentrasi biakkan 7 % (v/b)

3. Rumus Perhitungan Data Hasil IC₅₀

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

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).

4. Hasil ANOVA IC₅₀ *Sargassum filipendula*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11722.008 ^a	8	1465.251	36.204	.000
Intercept	171299.556	1	171299.556	4.232E3	.000
HARI	10123.375	2	5061.687	125.065	.000
KONSENTRASI	1477.591	2	738.796	18.254	.001
HARI * KONSENTRASI	121.042	4	30.261	.748	.584
Error	364.252	9	40.472		
Total	183385.816	18			
Corrected Total	12086.260	17			

a. R Squared = ,970 (Adjusted R Squared = ,943)

Hasil ANOVA menunjukkan perlakuan P (lama inkubasi) dan perlakuan W (konsentrasi biakan) berpengaruh nyata ($p < 0,05$) akan tetapi interaksi keduanya ($p > 0,05$).

5. Tabel Uji Duncan

5.1 Perlakuan lama inkubasi

IC50					
	HARI	N	Subset		
			1	2	3
Duncan ^a	7	6	7.12722E1		
	9	6		9.26497E1	
	11	6			1.28738E2
Sig.			1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 40,472.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Kesimpulan yang dapat diambil yaitu perlakuan yang terbaik untuk mengekstrak senyawa antioksidan sampel *Sargassum filipendula* yaitu lama inkubasi 7 hari.

5.2 Perlakuan konsentrasi biakan

IC50				
	KONSENTRASI	N	Subset	
			1	2
Duncan ^a	3	6	8.76892E1	
	5	6	9.54032E1	
	7	6		1.09568E2
	Sig.		.065	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 40,472.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Kesimpulan yang dapat diambil yaitu perlakuan yang terbaik untuk mengekstrak senyawa antioksidan sampel *Sargassum filipendula* yaitu konsentrasi biakan 3%.

Lampiran 6. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) total fenol ekstrak ethanol *Sargassum filipendula*

1. Data Hasil Total Fenol *Sargassum filipendula*

Perlakuan	Ulangan	Absorbansi	Total Fenol	Rerata Total Fenol (mg GAE/g)	
P1	W1	1	0.474	57.000	57.38
		2	0.480	57.750	
	W2	1	0.459	55.125	56.44
		2	0.480	57.750	
	W3	1	0.452	54.250	52.88
		2	0.430	51.500	
P2	W1	1	0.443	53.125	52.56
		2	0.434	52.000	
	W2	1	0.425	50.875	50.63
		2	0.421	50.375	
	W3	1	0.404	48.250	48.75
		2	0.412	49.250	
P3	W1	1	0.378	45.000	44.50
		2	0.370	44.000	
	W2	1	0.340	40.250	40.25
		2	0.340	40.250	
	W3	1	0.338	40.000	39.88
		2	0.336	39.750	

Keterangan :

- P1 : Lama inkubasi 7 hari
 P2 : Lama inkubasi 9 hari
 P3 : Lama inkubasi 11 hari
 W1 : Konsentrasi biakkan 3% (v/b)
 W2 : Konsentrasi biakkan 5% (v/b)
 W3 : Konsentrasi biakkan 7% (v/b)

2. Tabel 2 arah

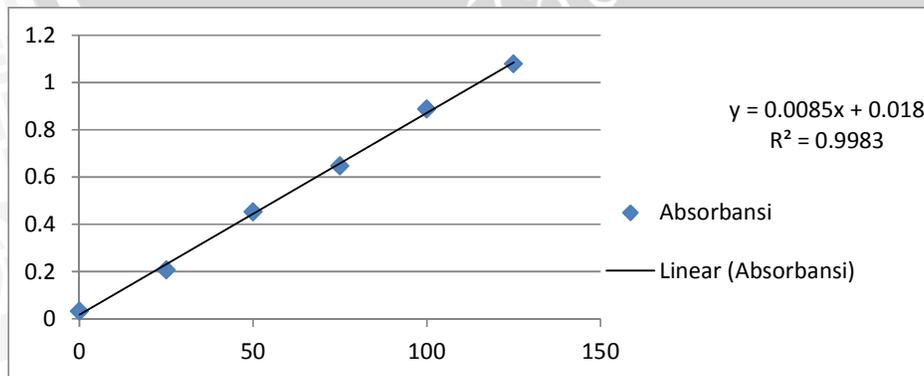
Konsentrasi biakan	Lama inkubasi			Rata-Rata
	P1	P2	P3	
W1	57.38	52.56	44.50	51.48
W2	56.44	50.63	40.25	49.10
W3	52.88	48.75	39.88	47.17
Rata-Rata	55.56	50.65	41.54	

Keterangan :

- P1 : Lama inkubasi 7 hari
- P2 : Lama inkubasi 9 hari
- P3 : Lama inkubasi 11 hari
- W1 : Konsentrasi biakkan 3% (v/b)
- W2 : Konsentrasi biakkan 5% (v/b)
- W3 : Konsentrasi biakkan 7% (v/b)

3. Data Asam Galat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
AsamGalat	0	0.033
	25	0.207
	50	0.453
	75	0.647
	100	0.888
	125	1.078



4. Rumus Perhitungan Data Hasil Total Fenol

➤ Total Fenol :

$$Y = \frac{x-b}{a}$$

Keterangan :

- Y = Total Fenol
- a = 0.008 (nilai yang tertera pada grafik data asam galat dari persamaan $Y = 0.008x + 0.018$)
- b = 0.018 (nilai yang tertera pada grafik data asam galat dari persamaan $Y = 0.008x + 0.018$)
- x = nilai absorbansi dari masing-masing sampel ulangan

5. Hasil ANOVA total fenol *Sargassum filipendula*

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: TOTALFENOL					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	670.766 ^a	8	83.846	81.168	.000
Intercept	43660.125	1	43660.125	4.227E4	.000
HARI	607.286	2	303.643	293.947	.000
KONSENTRASI	55.984	2	27.992	27.098	.000
HARI * KONSENTRASI	7.495	4	1.874	1.814	.210
Error	9.297	9	1.033		
Total	44340.188	18			
Corrected Total	680.062	17			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,974)

Hasil ANOVA menunjukkan perlakuan P (lama inkubasi) dan perlakuan W (konsentrasi biakan) berpengaruh nyata ($P < 0,05$) dan interaksi kedua perlakuan PW (konsentrasi biakan dan lama inkubasi) tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$).

6. Tabel Uji Duncan

6.1 Perlakuan lama inkubasi

TOTALFENOL					
HARI	N	Subset			
		1	2	3	
Duncan ^a	11	6	4.15417E1		
	9	6		5.06458E1	
	7	6			5.55625E1
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,033.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Kesimpulan yang dapat diambil yaitu untuk mendapatkan total fenol yang banyak dari sampel yaitu menggunakan perlakuan lama inkubasi 7 hari.

6.2 Perlakuan konsentrasi biakan

TOTALFENOL					
KONSENTRASI	N	Subset			
		1	2	3	
Duncan ^a	7	6	4.71667E1		
	5	6		4.91042E1	
	3	6			5.14792E1
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

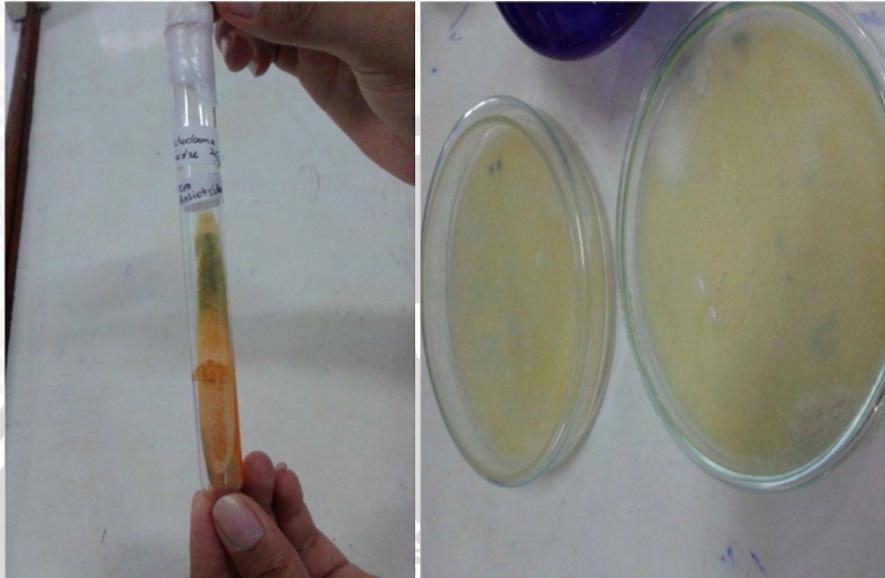
The error term is Mean Square(Error) = 1,033.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Kesimpulan yang dapat diambil yaitu untuk mendapatkan total fenol yang banyak dari sampel yaitu menggunakan perlakuan konsentrasi biakan 3%.

Lampiran 7. Gambar Proses Penelitian

A). Proses pembiakan starter jamur *Trichoderma viride*



1. stok jamur *T. viride*

2. Koloni jamur *T. viride* dalam media PDA



3. *T. viride* dalam media PDB



B). Perhitungan koloni jamur *Trichoderma viride* dengan *Haemacytometer*



4. Penanaman dalam media PDB



5. Jamur yang sudah tumbuh



6. Divortex agar homogen



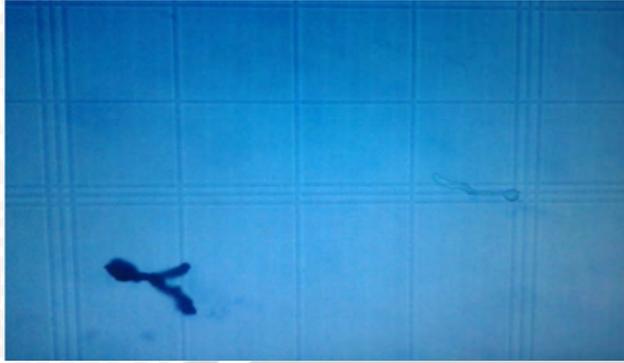
7. Proses pengenceran



8. Perhitungan dengan *Haemacytometer*



9. Reagen *methylen blue*



10. Gambar sel yang hidup dan yang mati

C). Penanganan awal sampel *Sargassum filipendula*



11. *Sargassum filipendula* segar



12. Pencucian



13. Penirisan



14. Proses chopping

D). Proses fermentasi sampel *Sargassum fillipendula*



15. Pengaturan pH awal substrat



16. Penambahan starter *T. viride*



17. Sampel yang telah terfermentasi

E). Proses ekstraksi sampel



18. Proses penambahan etanol teknis 96%



19. Maserasi selama 24 jam dan dishaker



20. Penyaringan sampel yang telah dimaserasi



21. Hasil penyaringan



22. Pemisahan pelarut dengan sampel menggunakan alat vacuum rotary evaporator



23. Ekstrak kasar *Sargassum filipendula*

F). Proses perhitungan rendemen dan kadar air



24. Perhitungan rendemen



25. Perhitungan kadar air

G). Uji aktifitas Antioksidan (Metode DPPH)



26. Proses pengenceran



27. Hasil pengenceran



28. Larutan DPPH



29. Sampel yang telah ditambah DPPH

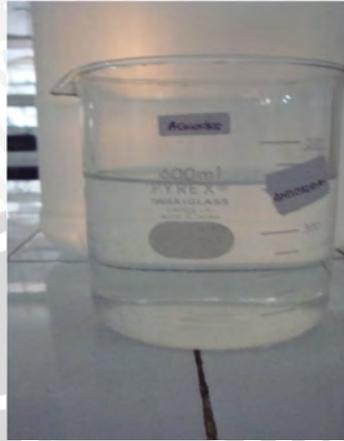


30. Proses penghitungan absorbansi sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

H). Uji Total Fenol



31. Reagen etanol



32. Reagen aquades



33. Reagen follin



34. Reagen Na_2CO_3



35. Proses penghitungan absorbansi sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



36. Sampel yang telah diuji total fenol

I). Uji Fitokimia



37. Reagen HgCl₂



38. Reagen I₂ dan KI



39. Uji fenolat



40. Uji flavonoid



41. Uji alkaloid meyer



42. Uji alkaloid wagner

Lampiran 8. *Flowchart* Prosedur Penelitian