AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN KLOROFIL a ALGA COKLAT *Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN "TEH"

SKRIPSI

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh:

HAFID CYNDIA MUFTI

NIM. 105080300111013

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN KLOROFIL a ALGA COKLAT *Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN "TEH"

SKRIPSI

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

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

Oleh:

HAFID CYNDIA MUFTI

NIM. 105080300111013

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN KLOROFIL a ALGA COKLAT *Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN "TEH"

Oleh:
HAFID CYNDIA MUFTI
NIM. 105080300111013

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 13 Agustus 2014
dan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. : _____
Tanggal : _____

Menyetujui **Dosen Penguji I**	**Menyetujui** **Dosen Pembimbing I**
(Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS)	**(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih,MS)**
NIP. 19570119 198601 1 001	**NIP. 19640726 198903 2 004**
	Dosen Pembimbing II
	(Dr.Ir. Yahya, MP)
	NIP. 19630706 199003 1 003

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, Agustus 2014

Mahasiswa,

Hafid Cyndia Mufti

NIM. 105080300111013

RINGKASAN

Hafid Cyndia Mufti. 105080300111013. Laporan Skripsi Judul Aktivitas Antioksidan Pigmen Klorofil a Alga Coklat (*Sargassum cristefolium)* Segar dan "Teh". Dibawah bimbingan **Dr. Ir. HARTATI KARTIKANINGSIH, MS** dan **Dr.Ir. YAHYA, MP**.

Pigmen sebagai bentuk nutrisi yang ditemukan dalam rumput laut, memiliki sifat nutraceutical penting, termasuk antioksidan. Pigmen dalam alga coklat sendiri memiliki ciri khas antara lain ketidakstabilan cahaya, pH, suhu, oksigen dan pelarut alkohol. Salah satu pigmen pada rumput laut adalah klorofil a. Pigmen klorofil a berwarna hijau kebiruan, merupakan pigmen utama dalam proses fotosintetik dari tumbuhan. Molekul klorofil tersusun atas 4 cincin pirol dengan Mg sebagai inti. Pigmen sangat berpotensi sebagai antioksidan, meskipun sifatnya kurang stabil dan mudah terdegradasi apabila terkena cahaya ataupun oksigen sehingga mempengaruhi aktivitas antioksidanya.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Muhammadiyah Malang, Laboratorium MRCPP (*Ma Chung Research for Photosynthetic Pigments*) Universitas *Ma cung* Malang pada bulan Maret – Juni 2014.

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksploratif diskriptif. Dalam metode eksploratif ini klorofil a diidentifikasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis, Spektofotometer, HPLC, analisa L,a,b dengan membandingan ^{0}hue dan uji antioksidan menggunakan metode DPPH. Penelitian ini dilakukan agar mendapatkan data mengenai perbedaan aktivitas antioksidan pigmen klorofil a sampel *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh". Untuk mendapatkan data perbedaan antioksidan maka, perlu adanya perhitungan uji T uji statistik. Untuk mendapatkan perhitungan uji T ini maka perlu adanya metode deskriptif pada penelitian ini.

Hasil penelitian menunjukkan klorofil a memiliki kisaran nilai Rf 0,40. Pada sampel segar 662nm dan "teh" mengalami pergeseran panjang gelombang (hipsokromik) yaitu 654nm. Hasil uji HPLC pada sampel segar didapatkan waktu tambat 32,42 menit dan sampel "teh" 34,46 menit. Hasil uji L,a,b didapatkan pada sampel segar 32,28 ^{0}hue dan sampel "teh" 37,46 ^{0}hue. Sedangkan analisa DPPH didapatkan kadar kandungan antioksidan sampel segar 138,968 ppm dan sampel "teh" didapatkan 147,484 ppm yang tidak berbeda secara statistik.

KATA PENGANTAR

Atas berkat rahmat dan karunia Allah SWT, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Aktivitas Antioksidan Pigmen Klorofil a Alga Coklat Sargassum cristaefolium Segar dan "Teh". Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Allah S.W.T atas segala kemudahan dan rahmat yang telah diberikan.
2. Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS, dan Dr. Ir. Yahya, MP selaku dosen Pembimbing atas segala bimbingan, pengarahan, motivasi dan masukan yang telah diberikan kepada penulis sejak penyusunan usulan skripsi sampai dengan selesainya penyusunan laporan skripsi.
3. Dr. Ir. Bambang Budi S, MS dan Eko Waluyo, S.Pi. MSc selaku dosen Penguji atas segala arahanya.
4. Keluarga terutama Ibu saya, Bapak, mbak Sinta, Dek Haris, yang telah memberikan motivasi dan dukungan moril maupun spiritual kepada penulis.
5. Mbak Lisa, Hosnatus, Anam yang selalu membantu penelitian kami. Dan teman-teman tim pigmen yang selalu bersama-sama dari pagi sampai larut malam. Intan dan Adiwira terima kasih atas semangat dan kerja keras kalian.
6. Teman-teman seperjuangan penelitian Tim Bunda Elda, Rani, Bias, Tacik, Alin, Desty, Mbok, Desy, Tubagus, Agnes yang memberikan masukan, informasi yang sangat membantu penulis.

7. Genk Cicak yang sudah menemani mulai maba sampai dengan selesainya perkuliahan ini. Dan sahabat saya Tari (kunti), Mami Gaura, Ipit, Fani, Nizhar yang sudah memberikan motivasi dan dukungan kepada penulis.

8. Teman-teman THP'2010 yang selalu memberikan suport kepada penulis.

9. Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikanya laporan skripsi ini, saya ucapkan banyak terimakasih.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Akhirnya penulis berharap semoga Laporan Skripsi ini bermanfaat sebagai salah satu informasi bagi semua pihak yang memerlukan dan bagi yang membacanya.

Malang, 13 Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL ..... **i**
HALAMAN PENGESAHAN ..... **ii**
PERNYATAAN ORISINALITAS ..... **iii**
RINGKASAN ..... **iv**
KATA PENGANTAR ..... **v**
DAFTAR ISI ..... **vii**
DAFTAR TABEL ..... **ix**
DAFTAR GAMBAR ..... **x**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xi**

1. PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.4 Kegunaan Penelitian 3
1.5 Waktu dan Tempat 4

2. TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Alga Coklat 5
2.2 Komposisi Kimia Alga Coklat 7
2.3 Teh 8
2.3.1 Teh *Sargassum* 9
2.4 Pigmen Alga Coklat 11
2.4.1 Klorofil pada Alga Coklat 13
2.4.2 Klorofil a 13
2.5 Ekstraksi Pigmen 15
2.5.1 Pelarut 18
2.5.2 Metanol 18
2.5.3 Aseton 19
2.5.4 Heksan 20
2.5.5 Etil Asetat 21
2.5.6 Dietil Eter 21
2.5.7 Fraksinasi (Partisi) 22
2.6 Antioksidan 22
2.7 Kromatografi Kolom 27
2.8 Kromatografi Lapis Tipis 28
2.9 Spektrofotometer UV-Vis 29
2.10 HPLC (High Perfomance Liquid Chromatography) 31
2.11 Intensitas Warna (L,a,b) 33

3. METODE PENELITIAN
3.1.Bahan Penelitian 34
3.2 Alat Penelitian 34
3.3 Metode Penelitian 35
3.4 Persiapan Sampel 36
3.5 Ekstraksi Pigmen Alga Coklat 39
3.6 Fraksinasi Pigmen Alga Coklat 40

3.7 Isolasi Klorofil a 41
3.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 45
3.9 Spektofotometer UV-Vis 46
3.10 Analisa HPLC 48
3.11 Analisa DPPH 49
3.12 Analisa Intensitas Warna (L,a,b) dari nilai ^{0}Hue 51

4. HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1 Data Hasil Penelitian..... 53
4.2 Pembahasan 54
4.2.1 Hasil Isolasi Klorofil a 54
4.2.2 Identifikasi Klorofil a dengan KLT 56
4.2.3 Identifikasi Klorofil a dengan Spektrofotometri UV-Vis..... 57
4.2.4 Intensitas Warna (L,a,b) 61
4.2.5 Analisis High Pressuere Liquid Chromatography (HPLC) 63
4.2.6 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Metode DPPH 66

5. KESIMPULAN DAN SARAN
5.1 Kesimpulan..... 69
5.2 Saran..... 69

DAFTAR PUSTAKA..... 70

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Komposisi Kimia Sargassum	7
2.	Pigmen yang terkandung dalam Alga Coklat	13
3.	Konstanta Dielektrik Berbagai Pelarut	18
4.	Sifat fisika dan Kimia Metanol	19
5.	Sifat fisik dan Kimia Aseton	20
6.	Sifat-sifat Fisika n-Heksan	20
7.	Syarat mutu Etil Asetat	21
8.	Sifat-sifat Dietil Eter	22
9.	Interval panjang gelombang utama dan warna komplemen	31
10.	Keterangan warna ^{0} Hue	33
11.	Data uji identifikasi pigmen klorofil a	53
12.	Rerata Panjang Gelombang klorofil a pada sampel segar dan “teh”	60
13.	Hasil analisa intensitas warna (L,a,b)	61

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. *Sargassum cristaefolium* 6
2. Struktur klorofil a 15
3. Struktur Kimia senyawa DPPH radikal bebas dan non radikal 26
4. Proses Kromatografi Kolom 28
5. Metode Kromatografi Lapis Tipis 29
6. Spektrofotometer UV-VIS 30
7. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 32
8. Persiapan Sampel Segar 37
9. Persiapan Sampel "Teh" Alga Coklat 38
10. Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Alga Coklat Segar dan "Teh" 43
11. Proses Pemurnian Pigmen Klorofil a dengan Kromatografi kolom 44
12. Proses Kromatografi Lapis Tipis 46
13. Prosedur Analisa dengan Spektrofotometer UV-1601 47
14. Prosedur Analisa dengan HPLC 49
15. Prosedur Analisa DPPH 50
16. Analisa Intensitas Warna 51
17. Diagram Alir Penelitian 52
18. Isolasi Klorofil a 54
19. Hasil Isolasi klorofil a 55
20. Hasil KLT Pigmen Klorofil a Murni 57
21. a. Pola Spektra Pigmen klorofil a segar dalam pelarut aseton 58
    b. Pola Spektra Pigmen klorofil a "Teh" dalam pelarut aseton 58
    c. Pola Spektra Klorofil a dalam pelarut aseton Jeffrey *et.,al* (1997) 58
22. a. Hasil HPLC waktu tambat Literatur Hegazi (1998) 65
    b. Hasil HPLC waktu tambat sampel "Teh" Alga Coklat 65
    c. Hasil HPLC waktu tambat sampel Segar Alga Coklat 65
23. Data Diagram batang IC_{50} 67

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur persiapan sampel dan pembuatan “Teh” Alga coklat	80
2. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi	82
3. Prosedur Kolom Kromatografi	84
4. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis	86
5. Prosedur Analisa Spektrofotometer dan Analisa HPLC	87
6. Prosedur Pembuatan Larutan, Fase Diam, Garam Grosok, Silica Gel	88
7. Data Absorbansi Alga coklat Segar dan “Teh”	90
8. Kadar Klorofil a sampel Segar dan “Teh”	90
9. Data Rendamen sampel Segar dan “Teh”	90
10. Perhitungan Kadar Klorofil a	90
11. Perhitungan Kadar Rendamen	91
12. Foto Pengolahan Teh	92
13. Foto Proses Ekstraksi	94
14. Foto Proses Partisi, Evaporator, dan Gas N_2	95
15. Foto Proses Kromatografi Kolom	96
16. Foto Prose Identifikasi Pigmen Klorofil a	97
17. Hasil Analisa HPLC segar dan “teh”	98
18. Nilai IC_{50} Segar dan “Teh” dan Grafik IC_{50}	100
19. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat “Teh”	103
20. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat Segar	105
21. Analisa Uji T Antioksidan Pigmen Klorofil a segar dan “teh”	107

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagai negara kepulauan, Indonesia mempunyai panjang pantai kurang lebih 81.000 km dengan luas perairan pantai sekitar 6.846.000 km^2 (Handayani *et al.,* 2004). Hal ini menunjukkan bahwa Indonesia mempunyai potensi yang baik untuk mengembangkan dan memanfaatkan kekayaan lautnya, termasuk rumput laut (Sulistyawati, 2003). Salah satu jenis rumput laut yang sangat potensial salah satunya adalah *Sargasum cristaefolium. Sargasum cristaefolium* merupakan alga coklat dari salah satu marga *Sargassum* sp. Menurut Atmadja (2012), habitat alga coklat tumbuh diperairan pada kedalaman 0,5-10 m. Alga coklat hidup didaerah perairan yang jernih yang mempunyai substrat dasar batu karang dan dapat tumbuh subur pada daerah tropis (Khotimah *et al.*, 2013). Alga coklat sering dianggap sebagai sampah laut karena pada musim tertentu banyak yang hanyut di permukaan laut dan terdampar dipantai karena patah akibat ombak yang besar (Yunizal, 1999). Namun sekarang ini jenis alga coklat sudah banyak digunakan untuk keperluan manusia salah satunya adalah pemanfaatan rumput laut coklat dalam bidang industri, diantaranya untuk industri makanan, minuman, obat-obatan, kosmetik, kertas, detergen, cat, tekstil, fotografi, dan lain-lain (Supirman *et al.,* 2013). Ditambahkan oleh Putri (2011), di Vietnam bagian selatan hingga tengah telah memanfaatkan *Sargassum* sebagai minuman teh berkhasiat medis.

Dalam kandungan minuman teh rumput laut terdapat zat menguntungkan bagi tubuh dan ada juga yang tidak baik untuk tubuh. Salah satunya yang kurang menguntungan adalah kafein. Meskipun kafein aman dikonsumsi, zat ini dapat menimbulkan reaksi yang tidak dikehendaki seperti insomnia, gelisah,

merangsang, delirium, takikardia, ekstrasistole, pernapasan meningkat, tremor otot, dan diuresis (Misra *et al.*, 2008). Sedangkan pengolahan teh yang memiliki khasiat berasal dari kandungan zat biaoaktif yang terdapat dalam daun teh rumput laut. Selain itu di dalam daun teh rumput laut terdapat pigmen klorofil a. Pigmen penyusun pada rumput laut coklat berasal dari golongan klorofil dan turunannya, golongan karotenoid polar (ksantofil), serta golongan karotenoid non polar (karoten). Klorofil merupakan pigmen yang berperan dalam proses fotosintesis yang banyak ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, pakis, lumut, alga, dan organisme prokariota, terdiri dari klorofil a sebagai pigmen utama dan klorofil b sebagai pigmen pelengkap (Gross *et al.,* 1987). Selain berperan penting dalam lingkungan aslinya, klorofil memiliki manfaat penting bagi kehidupan manusia. Sifat biokimia dan fotokimia klorofil memberikan kontribusi yang besar terutama dalam bidang kesehatan dan pangan, antara lain penambah sel darah merah, antioksidan, antibakteria, meningkatkan imunitas, pengganti sel-sel yang rusak, dan pewarna (Da costa *et al*., 2007).

Pigmen sangat berpotensi sebagai antioksidan, meskipun sifatnya kurang stabil dan mudah terdegradasi apabila terkena cahaya ataupun oksigen sehingga mempengaruhi aktivitas antioksidanya (Natalina *et al.,* 2008). Pigmen-pigmen yang terkandung didalamnya ialah klorofil a, klorofil c, betacaroten, xantofil, violaxantin, fukosantin, flavoxantin, serta neoxantin a dan b (Yunizal, 2004). Walaupun banyak terdapat jenis pigmen dan perbedaan kandungan yang ada pada antioksidan pigmen klorofil a. Perbedaan kandungan ini disebabkan karena antioksidan mudah terdegradasi maupun fotodegradasi. Ditambahkan oleh Suryaningrum *et al.,* (2006), kelemahan dari antioksidan adalah sifatnya yang mudah rusak bila terpapar oksigen, cahaya, suhu tinggi dan pengeringan. Beberapa peneliti telah membuktikan adanya aktivitas antioksidan pada β-

karoten dan klorofil a jenis makroalga *Sargassum cristaefolium* yang sudah terlebih dahulu dilaporkan oleh Merdekawati dan Susanto (2009) ditambahkan oleh penelitian lain seperti fotodegradasi dan aktivitas antioksidan klorofil a dari serbuk *Spirulina* (*Spirulina* sp.) juga sudah dilaporkan oleh Cristina, Kristopo, dan Limantara (2008) juga sudah dilaporkan. Namun sejauh ini penelitian mengenai aktifitas antioksidan pigmen klorofil a alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" belum pernah dilakukan dan dilaporkan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji kadar dan aktifitas antioksidan yang terdapat dalam pigmen klorofil a alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh".

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Apakah terdapat perbedaan aktivitas antioksidan klorofil a pada *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh"

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui perbedaan antioksidan pigmen klorofil a alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi nilai guna rumput laut khususnya rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium,* untuk masyarakat, lembaga dan institusi lain mengenai kadar antioksidan pigmen klorofil a alga coklat *Sargassum cristaefolium* bagi masyarakat.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Muhammadiyah Malang, Laboratorium MRCPP (*Ma Chung Research for Photosynthetic Pigments*) Universitas *Ma cung* Malang pada bulan Maret – Juni 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Cokelat

Rumput laut coklat atau *Sargassum* sp. merupakan salah satu marga *Sargassum* dalam kelas *phaeophyceae*. Ada 150 jenis marga *Sargassum* yang dijumpai di perairan tropis, sub tropis dan daerah bermusim dingin. Sedangkan di Indonesia sendiri terdapat 15 jenis Algae *Sargassum* dan baru 12 jenis *Sargassum* yang baru dikenal oleh masyarakat luas, terutama penduduk dipinggiran laut (Firdhayani, 2010). Secara umum, rumput laut *Sargassum* sp. belum banyak dikenal dan dimanfaatkan. Padahal dari beberapa penelitian, dilaporkan bahwa alga coklat mempunyai kandungan nutrisi/zat gizi cukup tinggi, seperti protein dan beberapa mineral esensial, hanya saja analisis komposisi nutrisinya masih belum lengkap (Mursyidin *et al.,* 2002).

Sargassum tumbuh dari daerah intertidal, subtidal sampai daerah tubir dengan ombak besar dan arus deras. Karakteristik daerah untuk pertumbuhan yaitu kedalamam 0,5–10 m, suhu perairan 27,25 – 29,30 ^{0}C dan salinitas 32–33,5 ‰. Kebutuhan intensitas cahaya matahari marga *Sargassum* lebih tinggi dari pada marga alga merah. Pertumbuhan *Sargassum* membutuhkan intensitas cahaya matahari berkisar 6500–7500 lux. *Sargassum* tumbuh berumpun dengan untaian cabang-cabang. Panjang *thalli* utama mencapai 1–3 m dan tiap-tiap percabangan terdapat gelembung udara berbentuk bulat yang disebut *Bladder,* berfungsi untuk menopang cabang-cabang *thalli* terapung ke arah permukaan air dalam mendapatkan intensitas cahaya matahari (Fahri, 2010).

Kelompok alga coklat memiliki bentuk yang bervariasi dan sebagian besar jenis-jenisnya berwarna coklat. Alga coklat biasanya memiliki ciri-ciri sifat,

adanya pigmen coklat, yaitu fukosantin yang menutupi warna hijau dari pigmen klorofil a dan c (Juneidi, 2004). *Sargassum* memiliki bentuk *thallus* silindris atau gepeng, banyak percabangan yang menyerupai pepohonan darat, bentuk daun melebar, lonjong atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter) dan warna *thallus* umumnya coklat (Aslan, 1998).

Sargassum cristaefolium merupakan salah satu genus dari kelompok rumput laut coklat *Sargassum* sp. Gambar *Sargasssum cristaefolium* dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasi *Sargassum* menurut Bold dan Wayne (1985) adalah sebagai berikut :

Divisi : Thallophyta
Kelas : Phaeophyceae
Ordo : Fucalus
Famili : Sargassaceae
Genus : *Sargassum*
Spesies : *Sargassum* sp.

Gambar 1. *Sargassum cristaefolium*

2.2 Komposisi Kimia Alga Coklat

Rumput laut telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat dan dunia industri untuk berbagai keperluan. Sejak masyarakat pesisir mengenal komoditi laut tersebut, telah dimanfaatkan sebagai sumber makanan dengan mengkonsumsinya secara langsung, dan diproses menjadi berbagai bentuk pangan olahan. Dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, maka rumput laut diketahui mengandung senyawa hidrokolid, senyawa bioaktif dan berbagai senyawa penting lainya (Widiastuti, 2009). Rumput laut secara umum mengandung senyawa klorofil a dan b serta senyawa karoten yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Ditambahkan oleh Yunizal (1999), komposisi kimia *Sargassum* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia *Sargassum*

Komposisi Kimia	Jumlah dalam %
Karbohidrat	19,06
Protein	5,53
Lemak	0,74
Air	11,71
Abu	34,57
Serat Kasar	28,39

Sumber : Yunizal (1999)

Menurut Winarno (1990), kadar kalsium rumput laut coklat sebesar 200-300 mg/100 g (berdasarkan berat kering) dan ditambahkan oleh Atmaja *et al.,* (1996) mengemukakan bahwa kadar kalsium *Sargassum* sp. pada umumnya sekitar 0,42% dari berat kering atau sekitar 420 mg/100 g berat kering. Berdasarkan rata-rata kadar kalsiumnya, *S. crassifolium* dapat digunakan sebagai bahan makanan sumber kalsium.

Ditinjau secara biologi, rumput laut adalah kelompok tumbuhan berklorofil yang terdiri dari satu atau banyak sel dan berbentuk koloni. Didalam alga

terkandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral dan juga senyawa bioaktif (Putra, 2006).

2.3 Teh

Salah satu produk komoditas dunia yang dihasilkan Indonesia adalah teh. Teh menjadi produk minuman yang mempunyai banyak manfaat bagi kesehatan (Ma'roef, 2000). Salah satu manfaat teh digunakan sebagai antioksidan, hal ini disebabkan karena di dalam kandungan teh terdapat senyawa-senyawa bermanfaat seperti polifenol, theofilin, flavonoid/ metilsantin, tanin, vitamin C dan E, catecin serta sejumlah mineral seperti Zn, Se, Mo, Ge, Mg. Makadari itu, tidak heran bila minuman ini disebut-sebut sebagai minuman kaya manfaat. Ditambahkan oleh Pambudi (2000), teh cukup banyak mengandung mineral, baik makro maupun mikro. Komponen aktif yang terkandung dalam teh, baik yang volatil maupun yang non-volatil antara lain adalah polyphenol (10-25%), methylxanthines, asam amino, peptida, *tannic acid* (9-20%), vitamin (C, E dan K), kalium (1795 mg%), flour (0,1-4,2 mg/L), zinc (5,4 mg%), mangan (300-600 µg/ml), magnesium (192 mg%), betakaroten (13-20%), selenium (1-1,8 ppm%), tembaga (0,01 mg%) dan kafein (45-50 mg%). Kandungan senyawa-senyawa tersebut berbeda-beda antara masing-masing jenis teh. Produk teh di Indonesia sendiri terdiri dari dua macam yaitu teh hitam dan teh hijau. Perbedaan kedua macam teh tersebut disebabkan oleh perbedaan cara pengolahan. Dalam proses pengolahan teh hitam memerlukan proses oksidasi enzimatis sedangkan teh hijau tidak memerlukan proses oksidasi enzimatis (Primanita, 2010). Menurut La Vecchia *et al*., (1992), teh memiliki khasiat kesehatan karena mengandung zat bioaktif yang disebut polifenol terutama katekin teh yang bersifat sebagai senyawa antioksidan yang berperan dalam meredam aktifitas radikal bebas yang

sangat berbahaya bagi tubuh sehingga bermanfaat bagi pencegahan beberapa penyakit kronis misalnya penyakit jantung dan kanker.

2.3.1 Teh *Sargassum*

Di negara Vietnam khusunya daerah bagian selatan hingga tengah seperti Khan Hoa, Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, dan lain-lain sudah sejak lama memanfaatkan rumput laut jenis *Sargassum* sp. dan *Phorphyra* sebagai sumber iodium pada campuran minuman yaitu pada teh yang berkhasiat medis (Susanto, 2003). Khasiat yang dimiliki oleh minuman teh berasal dari kandungan zat bioaktif yang terdapat dalam daun teh. Menurut La Vecchia *et al*., (1992) teh memiliki khasiat kesehatan karena mengandung zat bioaktif yang disebut polifenol. Pengolahan teh di Indonesia sendiri memerlukan bahan dasar berupa daun teh segar melalui tahapan proses pelayuan, penggilingan, fermentasi, pengeringan dan sortasi. Tujuan dari proses pembuatan teh tersebut ialah mengubah kondisi fisik dan komposisi kimia teh segar secara terkendali sehingga diperoleh hasil olahan berupa bubuk teh kering yang memiliki sifat-sifat yang dikehendaki seperti kenampakan bubuk, warna air seduhan, aroma, serta warna ampas seduhanya. Proses pembuatan teh tahap pertama adalah teh yang sudah dipilih selanjutnya dimulai tahap pelayuan *(withening)*. Ditambahkan oleh Arifin (1994), pada proses pelayuan bertujuan untuk membuat daun teh agar lebih lentur dan mudah digulung sehingga memudahkan cairan sel keluar jaringan pada saat digulung. Waktu yang diperlukan dalam proses pelayuan 12-15 jam dengan derajat layu 44-46%. Pada tahap kedua adalah penggilingan yaitu daun-daun bergumpal-gumpal menjadi bingkahan-bingkahan, harus sering dipecah-pecah lagi sambil diayak untuk memisahkan daun yang berukuran kecil. Ditambahkan oleh Loo (1983), penggilingan daun teh bertujuan untuk memecahkan sel-sel daun segar agar cairan sel dapat dibebaskan sehingga

terjadi reaksi antara cairan sel dengan oksigen yang ada diudara. Peristiwa ini dikenal dengan nama oksidasi enzimatis (fermentasi). Proses fermentasi ini adalah tahapan ketiga dimana fungsi dari proses fermentasi sendiri agar mendapatkan teh yang berwarna coklat tua dan harum baunya (Nazaruddin *et al.,* 1993). Tahapan keempat adalah pengeringan menurut Battacharya dan Swamy (1967) menyimpulkan pengeringan tercepat berturut-turut diperoleh pada suhu 80, 60, dan 40 ^{0}C. Hal senada diungkapkan oleh Agusniar dan Setiyani (2011), yang menyimpulkan bahwa pengeringan yang disertai pemanasan pada suhu 50 ^{0}C memberikan waktu pengeringan tersingkat dibandingkan pada suhu 30 dan 40 ^{0}C.

Tujuan utama pengeringan adalah menghentikan oksidasi enzimatis senyawa polifenol dalam teh pada saat komposisi zat-zat pendukung kualitas mencapai keadaan optimum. Adanya pengeringan maka kadar air dalam teh menurun, dengan demikian teh akan tahan lama dalam penyimpanan (Arifin, 1994). Pengeringan bertujuan memperpanjang umur simpan dan menghambat pertumbuhan suatu mikroba dan aktivitas enzim. Mekanisme pengeringan yang berlaku pada bahan pangan yaitu udara panas dialirkan ke bahan pangan kemudian ditransfer kepermukaan bahan sehingga menyebabkan air dalam bahan pangan menguap Fellows, (1990). Tahap terakir adalah sortasi teh yang berasal dari proses pengeringan biasanya masih heterogen atau masih bercampur baur, baik bentuk maupun ukuranya. Selain itu teh juga masih mengandung debu, tangkai daun, dan kotoran lainya yang akan sangat berpengaruh pada mutu teh nantinya, untuk itu sangat dibutuhkan proses penyortiran (Nazzaruddin *et al.,* 1993). Di dalam proses pengolahan teh *Sargassum cristaefolium* adanya penambahan kapur sirih agar pH alga coklat menjadi 11 sampai menjadi basa. Kapur sirih sering ditemukan berwarna putih

baik dalam bentuk kering atau basah (encer). Saat kering kapur sirih berumus molekul CaO, sedangkan saat basah/larutan berumus molekul $Ca(OH)_2$ (Bayani, 2009). Kapur sirih merupakan senyawa atau bahan oksida, hidroksida, dan karbonat dari kalsium (Ca). Kapur atau yang disebut cunam (kapur mati) berwarna putih likat seperti krim yang dihasilkan dari cangkang siput laut yang telah dibakar. Menurut Ahmadsoffa (2009), perendaman rumput laut dalam larutan kapur selama satu malam dapat menghilangkan garam dan mineral-mineral yang menempel pada rumput laut yang menyebabkan bau amis saat menjadi produk.

Kapur sirih atau CaO adalah bahan yang bersifat reaktif dengan air dan akan membentuk $Ca(OH)_2$ berupa bubuk yang mudah larut dalam air. Reaksi CaO dengan air merupakan reaksi eksoterm yang akan melepaskan energi panas (Chang dan Tikkanen, 1988).

2.4. Pigmen Alga Coklat

Pigmen, sebagai bentuk nutrisi yang ditemukan dalam rumput laut, memiliki sifat *nutraceutical* penting, termasuk antioksidan, selain menyediakan anti-obesitas, antikanker dan anti inflamasi efek (Maeda *et al.,* 2008). Selain memiliki sifat yang bermanfaat bagi tubuh, pigmen dalam alga coklat sendiri memiliki ciri khas antara lain ketidakstabilan cahaya, pH, suhu, oksigen dan pelarut alkohol. Intensitas cahaya yang cukup tinggi dan waktu iradiasi cahaya yang lama dapat menyebabkan degradasi klorofil (Gross, 1991). Ditambahkan Hellebust (1970), intensitas cahaya berpengaruh terhadap alga dan setiap jenis alga memiliki toleransi tertentu terhadap intensitas cahaya. Dampak sekunder perbedaan intensitas cahaya berpengaruh terhadap suhu perairan serta mempengaruhi pertumbuhan rumput laut. Salah satu jenisnya yaitu *Sargassum* sp. dikenal mempunyai komposisi kimia dan pigmen yang sangat bervariasi.

Pigmen yang terkandung di dalamnya adalah klorofil a, klorofil c, betakaroten, xantofil, fukosantin (Merdekawati *et al.*, 2009).

Pigmen atau disebut zat warna, pada tumbuh-tumbuhan tingkat tinggi pada umumnya terdapat dalam sel-sel jaringan meristem yang dalam perkembanganya akan membentuk kloroplast. Kloroplast pada alga mempunyai bentuk dan ukuran yang sangat beragam, sedangkan pada tumbuh-tumbuhan tingkat tinggi pada umumnya seragam (Bogorad, 1962). Warna daun berasal dari klorofil, pigmen warna hijau yang terdapat di dalam kloroplast. Energi cahaya yang diserap klorofil inilah yang menggerakkan sitesis molekul makanan dalam kloroplast. Kloropast ditemukan terutama dalam sel mesofil, yaitu jaringan yang terdapat di bagian dalam daun. Karbondioksida masuk ke dalam daun, dan oksigen keluar, melalui pori mikroskopik yang di sebut stomata (Campbell *et al.,* 2002). Kloroplast terutama berfungsi adalah sebagai tempat berlangsungnya fotosintesis. Pigmen-pigmen pada membran tilakoid akan menyerap cahaya matahari atau sumber cahaya lainnya dan mengubah energi cahaya tersebut menjadi energi kimia dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP) (Lakitan, 2001). Klorofil adalah pigmen berwarna hijau yang terdapat dalam kloroplast. Dalam kloroplast, pigmen utama klorofil serta karotenoid dan xantofil terdapat pada membran tilakoid (Salisbury dan Ross, 1991). Pigmen yang terkandung dalam alga coklat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pigmen Yang Terkandung Dalam Alga Cokelat

Jenis Pigmen	Warna
Klorofil c	Hijau Terang
Fukosantin	Orange
Klorofil a	Hijau Biru
Xanthofil	Sedikit Kuning
Karoten	Kuning

Sumber : Strain *et al.,* (1943)

2.4.1 Klorofil pada Alga Coklat

Klorofil merupakan pigmen utama yang berperan dalam reaksi fotokimia pada pusat reaksi fotosintesis. Fungsi utama klorofil di dalam perangkat fotosintesis diantaranya sebagai penyerap cahaya, pentransfer energi eksitasi ke pusat reaksi dan pemisah muatan pada membran fotosintetik (Schaber *et al.,*1984).

Klorofil dan karotenoid merupakan pigmen yang melimpah pada rumput laut coklat. Pada rumput laut coklat , klorofil a berfungsi sebagai penangkap cahaya yang utama dalam proses fotosintesis yaitu sekitar 99% (Gross, 1991). Keberadaan klorofil a pada rumput coklat dilengkapi dengan pigmen pendukung yaitu klorofil c dan karotenoid yang berfungsi melindungi klorofil a dari fotooksidasi (Nurdiana, 2008).

2.4.2 Klorofil-a

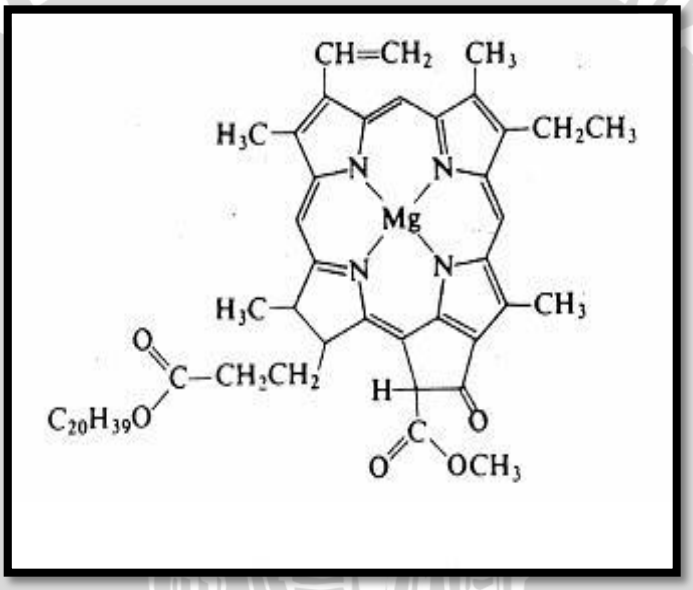
Klorofil atau pigmen utama tumbuhan banyak dimanfaatkan sebagai *food suplement* yang dimanfaatkan untuk membantu mengoptimalkan fungsi metabolik, sistem imunitas, detoksifikasi, meredakan radang *(inflamatorik)* dan menyeimbangkan sistem hormonal (Limantara, 2007). Klorofil sendiri adalah suatu pigmen yang berperan dalam proses fotosintesis ditemukan dalam tumbuhan tingkat tinggi seperti pakis, lumut, alga, dan organisme prokariota,

yang terdiri dari klorofil a sebagai pigmen utama dan klorofil b sebagai pigmen pelengkap (Da Costa *et al.,* 2009). Pada keadaan normal, proporsi klorofil-a jauh lebih banyak dari pada klorofil-b. Selain klorofil, pada membran thylakoid juga terdapat pigmen-pigmen lain, baik yang berupa turunan-turunan klorofil-a maupun pigmen lainnya (Suyitno, 2006). Klorofil sendiri sangat rentan dan mudah mengalami proses degradasi menjadi turunanya. Klorofil dapat terdegradasi oleh pengaruh suhu, cahaya, air, asam, basa dan alkohol. Faktor-faktor tersebut pasti sangat mempengaruhi. Turunan klorofil yang berupa feofitin ternyata juga mempunyai banyak manfaat. Berdasarkan hasil penelitian , feofitin dapat berfungsi sebagai antioksidan.

Klorofil a merupakan substansi yang baik dalam menstimulasi terbentuknya singlet oksigen serta merupakan prekursor potensial untuk sintesis sensitiser baru (Brandis *et al.,* 2006). Molekul klorofil tersusun atas 4 cincin pirol dengan Mg sebagai inti. Pada klorofilm terdapat rangkaian yang disebut fitil ($C_{20}H_{39}O$) yang jika terkena air dengan pengaruh enzim klorofilase akan berubah menjadi fitol ($C_{20}H_{39}OH$). Fitol adalah alkohol primer jenuh yang mempunyai daya afinitas yang kuat terhadap O^2 dalam proses reduksi klorofil (Suyitno, 2006). Ditambahkan oleh Hutajulu *et al.,* (2008), klorofil merupakan molekul yang sangat besar dan terdiri dari empat cincin pirol yang dihubungkan satu dengan yang lainya oleh gugus metana (CH=) membentuk sebuah molekul yang pipih. Perbedaan antara klorofil a ($C_{55}H_{72}MgN_4O_5$) dan klorofil b ($C_{55}H_{70}MgN_4O_6$) terletak pada atom C nomor tiga metil pada klorofil b diganti dengan aldehida pada klorofil a. Diperjelas oleh penelitian dari Hutajulu *et al.,* (2008), pengamatan kemurnian dari klorofil a menggunakan analisa FTIR bahwa pola spektrum standar klorofil a dan b dapat dibedakan bahwa pada klorofil a terdapat serapan pada 2940 cm^{-1} 1455 cm^{-1} dan 1380 cm^{-1}, menunjukkan adanya

serapan gugus CH_3 (gugus metil) sedangkan pada klorofil b terdapat serapan pada 2750 cm^{-1} 2680 cm^{-1} dan 1650 cm^{-1} menunjukkan adanya serapan gugus –CHO (gugus aldehid).

Klorofil a memiliki serapan maksimum didaerah 380-430 nm dan 530-665 nm dalam pelarut organik (Christiana *et al.,* 2008). Klorofil a mempunyai rumus kimia $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, yang banyak mengandung suatu atom magnesium diikat oleh nitrogen dari kedua cincin pirol lain melalui ikatan kovalen (Anis, 2008). Struktur kimia klorofil dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur gambar klorofil a (Google image, 2014)

2.5 Ekstraksi Pigmen

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi padat-cair atau *leaching* adalah transfer difusi komponen terlarut dari padatan *inert* kedalam pelarutnya. Proses ini merupakan proses yang bersifat fisik karena komponen terlarut kemudian dikembalikan lagi keadaan semula tanpa

mengalami perubahan kimiawi. Ekstrak dari bahan padat dapat dilakukan jika bahan yang diinginkan dapat larut dalam pelarut pengekstraksi (Irawan, 2010).

Menurut Utami *et al., (*2009) ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu. Pemikiran metode ekstraksi senyawa bukan atom dipergunakan oleh beberapa faktor yaitu sifat jaringan tanaman, sifat kandungan zat aktif dan kelarutan dalam pelarut yang digunakan. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut non polar (n-heksan) lalu pelarut yang kepolarannya menengah (diklor metan atau etil asetat) kemudian pelarut yang bersifat polar (metanol atau etanol). Prinsip dasar ekstraksi adalah berdasarkan kelarutan, untuk memisahkan zat terlarut yang diinginkan atau menghilangkan komponen zat terlarut yang tidak diinginkan dari fase padat, maka fase padat dikontakkan dengan fase cair. Pada kontak dua fase tersebut, zat terlarut terdifusi dari fase padat ke fase cair sehingga terjadi pemisahan dari komponen padat.

Menurut Lenny (2006), maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Adapun tujuan dari penggunaan pelarut metanol (CH_3OH) agar dapat melarutkan senyawa organik yang terkandung pada sampel.

Sedangkan penggunaan pelarut aseton (CH_3COCH_3) untuk mengikat pigmen yang bersifat polar.

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 di 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 (Hijaz, 2009). Ditambahkan oleh Indraswari (2008), maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif dan zat aktif akan larut. Simplisia yang akan diekstraksi ditempaykan pada wadah atau bejana yang bermulut lebar bersama larutan penyari yang telah ditetapkan, bejana ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan simplisia. Rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya atau perubahan warna). Waktu maserasi pada umumnya 5 hari, setelah waktu tersebut keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan luar sel telah tercapai. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan perpindahan bahan aktif.

2.5.1 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu benda cair atau gas yang dapat melarutkan benda padat, cair dan 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 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).

Menurut Rahman (2009), pemilihan eluen yang digunakan untuk memisahkan komponen senyawa alam harus ditentukan dengan teliti agar kualitas pemisahan dapat mencapai hasil yang baik. Pemilihan eluen tersebut didasari oleh polaritas atau nilai konstanta dielektrik dari masing-masing pelarut. Konstanta dielektrik berbagai pelarut dapat dlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Konstanta Dielektrik Berbagai Pelarut

Pelarut	Konstanta Dielektrik
Air	78,5
Metanol	32,6
Aseton	20,7
Etil Asetat	6,0
Kloroform	4,8
Benzena	2,7
Toluena	2,3
n-Heksana	1,9

Sumber : Rahman (2009).

2.5.2 Metanol

Menurut Hikmah dan Zuliyana (2010), methanol sudah dari dulu dikenal sebagai metal alkohol, *wood* alkohol atau spiritus yaitu senyawa kimia dengan rumus kimia CH_3CH. Metanol merupakan bentuk senyawa paling sederhana. Pada keadaan atmosfer, metanol cairan yang ringan, mudah menguap, mudah terbakar dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan dari pada

etanol). Metanol bisanya digunakan untuk bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai *additive* bagi etanol industri.

Metanol termasuk dalam menstrum (agen ekstraksi) golongan alkohol. Alkohol yang biasanya digunakan sebagai menstrum dalam ekstraksi adalah golongan alkohol rendah atau yang memiliki rantai atom C pendek seperti methanol, etanol, propanol, dan butanol. Metanol lebih polar dibandingkan dengan etanol karena memiliki jumlah atom C yang lebih sedikit. Akan tetapi, kedua pelarut tersebut termasuk golongan alkohol yang pada umumnya bersifat non polar (Purwanti, 2009). Sifat-sifat Fisika dan Kimia Metanol dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sifat Fisika dan Kimia Metanol

Sifat dan Karateristik	Metanol
Massa molar	32,04 g/mol
Wujud	Cairan tidak berwarna
Specific gravity	0,7918
Titik leleh	-97^0C, $-142{,}9^0$F (176K)
Titik didih	32,04 g/mol
Kelarutan dalam air	0,7918
Keasaman *(pKb)*	-2,43

Sumber : Schelfan *et al.,* (1983).

2.5.3 Aseton

Larutan aseton memiliki nama latin dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul aseton sendiri adalah CH_3COCH_3. Aseton biasa digunakan untuk bahan pelarut karena memiliki sifat hidroskopis, sangat volatile, tidak beresidu dan tidak mudah terbakar (Schelfan *et al.,*1983). Sifat fisik dan kimia aseton dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Sifat Fisik dan Kimia Aseton

Karakteristik	Aceton
Nama lain	B-ketopropana, dimetil keton, dimetilformaldehidehida, DMK
Rumus bangun	CH_3COCH_3
Sifat	Mudah terbakar, sangat volatil, tidak beresidu
Berat molekul	58,1
Titik leleh	$-94,6^0C$
Titik didih	$56,1-56,6^0C$
Massa molar	58,08 g/mol
Kelarutan	Larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter
Densisitas	0,79 g/cm^3, cair

Sumber : Schelfan *et al.,* (1983).

2.5.4 Heksana

Heksana adalah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} isomer utama n-heksana memiliki rumus $CH_3(CH_2)_4CH_3$. Awalan heks merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran–ana berasal dari alkana, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. N-heksana merupakan jenis pelarut non polar (Maulida dan Naufal, 2010). Sifat-sifat fisika n-Heksana dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Sifat-sifat Fisika n-Heksan

Sifat	Nilai
Titik didih	69^oC
Indeks polaritas (*synyder*)	0,0
Koefisien dielektri	18,8
Tegangan permukaan	18,4 dyne/cm
(20)	0,6548 gr/ml
Berat jenis	(cair)
Viskositas	0,294 cp (25^oC)
Titik cair	-95^oC (178K)

Sumber: Andaka (2008).

2.5.5 Etil Asetat

Menurut SNI (1992), etil asetat adalah cairan jernih, tak berwarna, berbau khas, yang bagian terbesarnya terdiri dari etil asetat dengan rumus $CH_3COOC_2H_5$ dan terutama digunakan sebagai pelarut tinta, perekat resin. Syarat mutu etil asetat dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Syarat mutu etil asetat

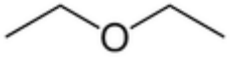
Uraian	Satuan	Persyaratan
Warna	Hazen	Maks. 10
Kadar etil asetat	%b/b	Min 99,0
Bobot jenis 20/20^{o}C	-	0,900-0,903
Indeks bias, NO 20C	-	1,370-1,375
Jarak destilasi	^{o}C	76,5-78,5
Sisa Penguapan	%b/b	Maks 0,01
Keasaman (dihitung sebagai asam asetat)	%b/b	Maks 0,01
Kadar air	%b/b	Maks 0,01

Sumber : SNI (1992).

2.5.6 Dietil Eter

Dietil eter merupakan cairan bening yang mudah terbakar dan memiliki bau yang khas. Dietil eter banyak dipakai sebagai pelarut laboratorium yang umum, memiliki kelarutan terbatas dalam air dan kelarutan yang tinggi didalam minyak, lemak, dan resin sehingga sering digunakan untuk proses ekstraksi cair. Selain itu dietil eter merupakan anestetika yang paling sering digunakan dan dianggap aman. Cairan dietil eter bersifat volatil. Pada kondisi atmosferik, dietil eter menguap pada suhu 38^{0}C (Savitri dan Veronica, 2007). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Sifat-sifat Dietil eter

No.	Karakteristik	Dietil Eter
1.	Nama lain	Eter dan etoksi etana,
2.	Rumus molekul	$C_4H_{10}O$, $C_2H_5OC_2H_5$ 
3.	Sifat	Mudah menguap,tidak berwarna
4.	Titik leleh	−116.3 °C (156.85 K)
5.	Titik didih	34.6 °C (307.75 K)
6.	Titik nyalah	-45 °C
7.	Massa molar	74.12 g/mol
8.	Densitas	6.9 g/100 ml (20 °C
9.	Visikositas	0.224 pada 25 °C
	Konstanta dielektrik	4.3

Sumber : Wikipedia (2014).

2.5.7 Fraksinasi (Partisi)

Metode partisi pelarut yang sering digunakan yakni dua pelarut yang tidak campur didalam corong pisah. Pada metode ini komponen terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi. Metode partisi juga disebut penyarian cair-cair, yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010).

Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan larutan tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, suspensi atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) komposisi perubahan menurut kelandaianya. Pemisahan ini bedasarkan pada suatu bobot dari setiap fraksi, fraksi yang senyawanya lebih berat akan berada paling dasar sedangkan fraksi yang senyawanya lebih ringan akan berada diatas (Widianti, 2010).

2.6. Antioksidan

Rumput laut merupakan salah satu komoditas ekspor yang potensial untuk dikembangkan. Dewasa ini rumput laut dimanfaatkan sebagai kosmetik, farmasi, dan industri makanan. Pada umumnya, rumput laut mengandung

senyawa fenol dan turunanya sebagai salah satu cara proteksi terhadap lingkungan yang ekstrim (Meenakshi *et al.,* 2009). Rumput laut coklat mempunyai aktivitas antioksidan, karena mampu menghambat peroksidasi lemak dan aktivitas radikal bebas (Firdaus *et al.,* 2009). Antioksidan merupakan salah satu bahan aditif yang dapat melindungi bahan pangan dari kerusakan oksidasi penyebab ketengikan. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi atas antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami dianggap lebih aman daripada antioksidan sintetik (Muawwanah *et al.,* 1997). Adanya kekhawatian akan kemungkinan efek samping antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan (Kuncahyo, 2007). Antioksidan sintetik seperti BHA (Butil Hidroksi Anisiol), PG (Propil Galat), dan TBHQ (Tert-Butil Hidrokuinon) dapat menyebabkan karsinogenesis (Rohman, 2005). Ditambahkan oleh Hernani dan Rahardjo (2005), antioksidan adalah senyawa penting yang mampu menjaga kesehatan tubuh karena dapat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas yang banyak terbentuk selama metabolisme tubuh. Ditambahkan Tossel dalam Hudson (1990), berkaitan dengan fungsinya senyawa-senyawa antioksidan dapat diklasifikasikan dalam 5 tipe antioksidan yaitu: (1) *Primary Antioxidant* yaitu senyawa-senyawa, terutama senyawa-senyawa fenol yang mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak. Dalam hal ini memberikan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksi senyawa fenol sehingga terbentuk senyawa yang stabil. Senyawa antioksidan yang termasuk kelompok ini misalnya: BHA, BHT, TBHQ, PG dan tokoferol. (2) *Oxygen Scavengers* yaitu senyawa-senyawa yang berperan sebagai pengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Dalam hal ini, senyawa tersebut akan mengadakan reaksi dengan oksigen yang berada dalam sistem sehingga jumlah oksigen akan berkurang. Contoh dari senyawa-

senyawa kelompok ini adalah vitamin C (asam askorbat) askorbil palmitat, asam eritorbat dan sulfit. (3) *Secondary Antioxydant* yaitu senyawa-senyawa yang mempunyai kemampuan untuk mendekomposisi hidroperoksida menjadi produk akhir yang stabil. Pada umumnya tipe antioksidan ini digunakan untuk menstabilkan polyoefin resin contohnya adalah asam tiodipropionat dan dilauril tipropionat. (4) *Antioxidant Enzime* yaitu enzim yang berperan mencegah terbentuknya radikal bebas. Contohnya: glukosaoksidase, superoksiddismutase (SOD) glutation perioksidase dan katalase. (5) *Chelator Sequestrants* yaitu senyawa-senyawa yang mampu mengikat logam seperti besi (Fe) dan tembaga (Cu) yang mampu mengkatalisa reaksi oksidasi lemak. Senyawa antioksidan yang termasuk didalamnya adalah asam sitrat, asam amino, etylenediaminetetra aceticacid (EDTA) dan fosfolipid.

Fungsi utama antioksidan digunakan sebagai upaya untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi. Lipid peroksidasi merupakan salah satu faktor yang cukup berperan dalam kerusakan selama dalam penyimpanan dan pengolahan makanan (Hernani dan Raharjo, 2005).

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting bagi kesehatan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan mengurangi resiko terhadap penyakit degeneratif (Kosasih, 2004). Berdasarkan mekanismenya kerja dan sumbernya, antioksidan diklasifikasikan menjadi 3 golongan, yaitu golongan antioksidan sekunder, antioksidan primer, dan antioksidan tersier. Antioksidan primer mekanisme kerjanya adalah dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal

bebas yang telah terbentuk menjadi stabil dan kurang reaktif dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi) (Winarsih, 2007).

Mekanisme antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau disebut antioksidan non-enzimatis, yaitu antioksidan yang tidak diproduksi secara alami oleh tubuh dan didapatkan dari asupan makanan maupun minuman. Mekanisme kerja antioksidan sekunder biasanya dengan memotong suatu reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkap radikal bebas. Sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler (Winarsih, 2007).

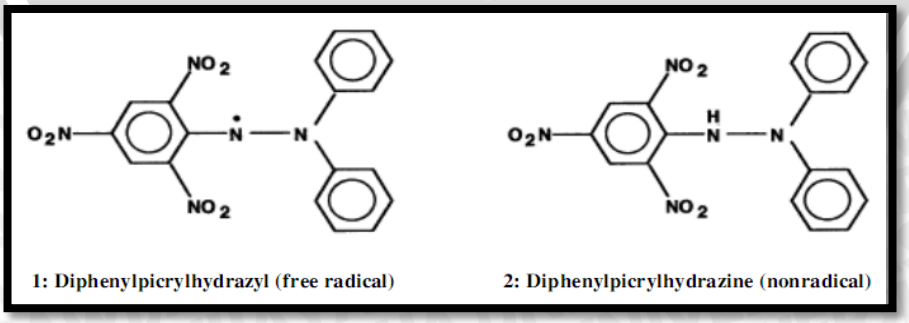
Menurut Winarsih (2007), jenis antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat aktifitas radikal bebas. Kerusakan DNA akibat radikal bebas dapat dicirikan oleh rusaknya *single* atau *double strand* pada gusus basa dan non basa.

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 (Gordon, 1990).

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada suatu bahan dapat dilakukann pengujian terhadap bahan tersebut. Metode pengujian aktivitas antioksidan yang dapat digunakan diantaranya metode DPPH (Hanani, 2005). Salah satu metode yang umum digunakan yaitu dengan menggunakan radikal bebas stabil *diphenilpycrylhydrazil* (DPPH). Metode ini, larutan DPPH yang

berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan senyawa antioksidan, sehingga DPPH akan berubah menjadi *diphenilpycrilhydrazine* yang bersifat non-radikal yang tidak barbahaya. Meningkatnya jumlah *diphenilpycrilhydrazine* akan ditandai dengan berubahnya warna ungu, pada larutan menjadi warna kuning pucat (Molyneux, 2004).

Ditambahkan oleh Aini (2007), antioksidan sendiri dapat menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai donor H terhadap radikal bebas sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil. Hasil dari metode DPPH umumnya dibuat dalam bentuk IC_{50} (*Inhibitor Concentration* 50*)*, yang didefinisikan sebagai konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan tereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin besar aktivitas antioksidan maka nilai IC_{50} akan semakin kecil. Molyneux (2004) menyatakan bahwa suatu senyawa antioksidan dinyatakan baik jika nilai IC_{50} nya semakin kecil. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm (IC_{50} < 50 ppm), kuat (50 ppm< IC_{50} <100 ppm), sedang (100 ppm < IC_{50} <150 ppm), lemah (150 ppm < IC_{50} < 200 ppm), dan sangat lemah (IC_{50} > 200 ppm) (Putranti, 2013). Struktur molekul senyawa radikal bebas DPPH *(diphenylpicrylhidrazyl)* sebelum dan sesudah berikatan dengan elektron dari senyawa lain dapat dilihat pada Gambar 3.

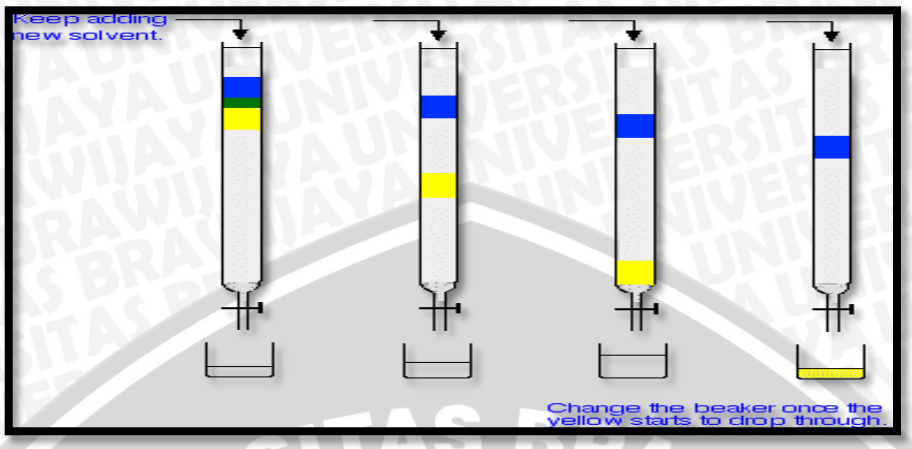


Gambar 3. Struktur kimia senyawa DPPH radikal bebas dan non radikal (Molyneux, 2004).

2.7 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah suatu nama yang diberikan untuk teknik pemisahan tertentu. Cara yang asli telah diketengahkan pada tahun 1903 oleh Tsweet, yang menggunakan untuk pemisahan senyawa yang berwarna. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu satu fase tetap (*stationary)* dan yang lain fase bergerak *(mobile).* Dalam kromatografi kolom ini khususnya kromatografi elusi untuk larutan pekat yang diperiksa dimasukkan ke dalam kolom kemudian pelarut elusi ditambahkan dan sedapat mungkin dibiarkan mengalir pada suhu dan kecepatan aliran yang konstan sampai terjadi pemisahan. Campuran senyawa akan terpisah menjadi zona-zona. Zona adalah bagian kolom pemisah yang mengandung senyawa yang ditentukan. Zat yang bergerak cepat akan segera meninggalkan kolom selama proses kromatografi dan akan muncul eluat yaitu dalam cairan yang keluar, dimana eluat tersebut ditampung dengan sejumlah tabung reaksi secukupnya. Zat yang bergerak lambat, selama proses kromatografi ini tidak terelusi. Zat ini akan tinggal tetap dalam kolom dan setelah berakhirnya pemisahan mekanik kolom dielusi dan adsorben secara ekstraksi dengan pelarut yang sesuai (Widodo, 2007).

Kecepatan bergerak dari suatu komponen tergantung pada berapa besarnya komponen terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat dari pada yang diserap kuat. Akan terlihat bahwa jika perbedaan-perbedaan dalam serapan cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna (Sastrohamidjojo, 2007). Gambar kolom kromatografi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Proses Kromatografi Kolom (Google Imege, 2014)

2.8 Kromatografi Lapis Tipis

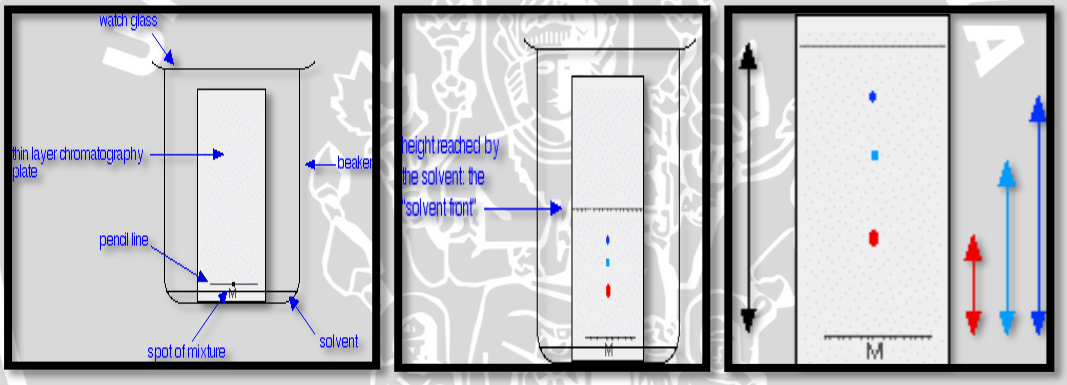
Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fitokimia. Lapisan tipis yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah, berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal), kemudian pelat dimasukkan di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak). Pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembang) dan selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Susilowati, 2008).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu metode kromatografi yang paling sering digunakan untuk analisis fitokimia. Metode pemisahan yang terjadi didasarkan atas suatu penyerapan, partisi. Keuntungaan penggunaan KLT antara lain penggunaan tunggal fase diam (tidak ada efek memori), kemungkinan optimasi yang luas, model pengembangan dan metode deteksi yang khusus, fungsi penyimpanan dari plat kromatografi (semua daerah dapat dideteksi dalam setiap kromatogram dengan berbagai metode), biyaya

yang murah untuk pemakaian rutin serta ketersediaan prosedur untuk pemurnian dan isolasi (Waksmundzka Hajnos *et al.,* 2008).

Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *retardation factor* (Rf) (Jeffrey *et al.,* 1997). Pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna. Nilai Rf untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus :

$$\mathbf{Rf} = \frac{\textbf{Jarak yang ditempuh komponen}}{\textbf{Jarak yang ditempuh eluen}}$$



Gambar 5. Metode Kromatografi Lapis Tipis (Clark, 2007).

2.9 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Visible adalah salah satu alat yang sering digunakan di laboratorium. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia semi kualitatif. Prinsip kerja spektofotometer UV-Vis didasarkan pada suatu fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia tertentu didaerah ultra lembayung (ultra violet) dan sinar tampak (visible) (Huda, 2001).

Alat spektrofotometer pada dasarnya terdiri dari sumber sinar monokromator, tempat sel (kuvet) untuk zat yang diperiksa, detektor, penguat arus, dan alat ukur atau pencatat. Spektofotometer dapat bekerja secara otomatis ataupun tidak, dapat mempunyai sistem sinar tunggal atau ganda. Kuvet yang digunakan untuk pengukuran pada daerah ultraviolet dibuat dari silika, sedangkan untuk pengukuran pada daerah cahaya tampak dibuat dari kaca. Yang banyak digunakan adalah kuvet dengan tebal 1 cm (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979). Gambar Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 6.

Gambar 6. Spektrofotometer UV-Vis (Google image, 2014)

Spektrofotometri UV-Vis mengukur jumlah analit, dengan cara membandingkan sinyal analit dengan sinyal standar pada konsentrasi yang sama. Reproduksi sumber sinar yang linier (akurasi fotometri) berperan penting terhadap akurasi koefisien ekstingsi yang akan digunakan untuk mencirikan analit serta memastikan transmitans atau absorbans merupakan sinyal dari analit analit atau sekunder (Chan *et al*., 2004). Pergeseran panjang gelombang kearah lebih pendek/ ke daerah merah (hipsokromik) maupun kearah yang lebih panjang/ ke daerah merah (batokromik) menunjukkan terjadinya degradasi

(Limantara, 2006). Interval panjang gelombang, warna dan warna komplemen dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Interval Panjang Gelombang, Warna dan Warna Komplemen pada Spektrovotometri UV-Vi

Panjang Gelombang	Warna	Warna Komplemen
400-435	Violet	Kuning Hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau Biru	Orange
490-500	Biru Hijau	Merah
500-560	Hijau	Merah Violet
560-580	Kuning Hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Orange	Hijau Biru
610-680	Merah	Biru Hijau
680-700	Merah Violet	Hijau

Sumber: Stewart, (1990).

2.10 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography)*

Pada KCKT dengan detektor UV-tampak konvensional pengukuran hanya dapat dilakukan pada satu panjang gelombang, sehingga untuk menentukan komposisi suatu sampel pada banyak panjang gelombang harus dilakukan pengukuran berulang-ulang. Hal ini berbeda dengan KCKT detektor PDA, pengukuran dapat dilakukan pada banyak panjang gelombang secara simultan, sehingga dapat diperoleh komposisi suatu sampel pada rentang panjang gelombang yang diinginkan. Keunggulan lain, rentang panjang gelombang dapat menghasilkan pola spektra dari puncak-puncak yang diperoleh sehingga secara kualitatif dapat ditentukan tanpa harus menganalisis marker (Brriton, 1995).

Metode HPLC bekerja dengan cara memisahkan campuran menjadi komponen-komponen penyusunya. Setelah itu dilakukan analisa kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui jenis senyawa penyusun campuran dan kadarnyan(Nollet, 2000).

Menurut Adnan (1997), keunggulan HPLC adalah HPLC dapat menangani senyawa-senyawa yang stabilitasnya terhadap suhu terbatas, begitu juga volatilitasnya bila tanpa menggunakan derivatisasi, HPLC dapat juga memisahkan senyawa yang sangat serupa dengan resolusi baik, waktu yang diperlukan untuk pemisahan suatu larutan dengan HPLC biasanya singkat, HPLC dapat juga digunakan untuk analisa kuantitatif dengan baik dan dengan presisi yang tinggi, dengan koevisien variasi dapat kurang dari 1%, HPLC juga merupakan teknik analisa yang peka. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) baik fase stasioner maupun fase gerak berupa cairan. Oleh karena itu antara fase stasioner dan fase gerak digunakan cairan atau pelarut yang tidak bercampur. Fase stasioner merupakan cairan yang dilapiskan pada permukaan zat padat penyangga dan dipakai sebagai isian *(packing material)* untuk kolom. Gambar HPLC (*High Performance Liquid Chromatography)* dapat dilihat pada Gambar 7.

Gambar 7. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography)*
(Google Image, 2014)

2.11 Intensitas Warna (L,a,b)

Menurut Soekarto (1990) pengukuran warna dilakukan dengan menggunakan alat *chromameter*. Hasil yang didapat dalam pengukuran warna diperoleh tiga nilai yang diganti dalam notasi warna yaitu L, a, b. Notasi warna L menyatakan kecerahan (light) yang mempunyai nilai dari 0 (hitam) sampai 100 (putih). Nilai L menyatakan cahaya pantul yang menghasilkan warna kromatik putih, abu-abu dan hitam. Notasi a menyatakan warna kromatik campuran hijau-merah, dengan nilai +a (positif) dari 0 sampai +60 untuk warna merah dan nilai –a (negatif) dari 0 sampai -60 untuk warna hijau. Notasi b menyatakan warna kromatik campuran biru-kuning, dengan nilai +b (positif) dari 0 sampai +60 untuk warna kuning dan nilai –b (negatif) dari 0 sampai -60 untuk warna biru.

Dari nilai a dan b dapat dihitung ^{0} Hue untuk melihat intensitas warna dengan rumus :

$^{0}\text{Hue} = \tan^{-1}(b/a)$, dimana hasilnya dapat dilihat pada Tabel 10 .

Tabel 10. Keterangan Warna ^{0}Hue

^{0} **Hue**	**Keterangan warna**
18-54^{0}	Berwarna *red (R)*
54-90^{0}	Berwarna *yellow red (YR)*
90-126^{0}	Berwarna *yellow (Y)*
126-162^{0}	Berwarna *yellow green (YG)*
162-198^{0}	Berwarna *green (G)*
198-234^{0}	Berwarna *blue green (BG)*
234-270^{0}	Berwarna *blue (B)*
270-306^{0}	Berwarna *blue purple (BP)*
306-342^{0}	Berwarna *purple (P)*
342-18^{0}	Berwarna *red purple (RP)*

Sumber: Soekarto (1990).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari bahan utama, bahan kimia, dan bahan penunjang. Bahan utama yang digunakan adalah alga coklat *Sargassum cristaefolium* yang diperoleh dari perairan Desa Cabiya, Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan adalah aseton, metanol, heksan, etil asetat, dietil eter bahan-bahan kimia tersebut yang digunakan untuk penelitian memiliki grade pro analisis (PA). Adapun bahan penunjang lainya adalah $CaCO_3$, aquades, gas nitrogen (HP) *high pure*, larutan saturasi garam, *silica gel* F-254, plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dengan panjang 5 cm dan lebar 1 cm, aluminium foil, *cling wrap,* kertas saring kasar, kertas saring halus, whatman 0,2, tisu, pasir laut (*sea sand*), kapas, air ledeng dan kertas label, kertas koran, plastik hitam, plastik wrap.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi peralatan untuk ekstraksi dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain gunting, mortar, alu, timbangan digital, beaker glass 40 mL, 500 mL dan 1000 mL, gelas ukur 10 mL dan 100 mL, erlenmeyer 250 mL, corong kaca, *magnetic stirrer*, *hot plate,* spatula, botol vial, *rotary evaporator vaccum*, pipet volume 10 mL, bola hisap, pipet tetes, statif, corong pisah. Sedangkan peralatan yang telah digunakan untuk analisa antara lain spektrofotometer UV-Vis 1601 merk Shimadzu, alat uji intensitas warna *color reader*, kolom kromatografi dengan panjang 40 cm dan diameter 3 cm, penggaris, mikro pipet, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography)* dengan merk Shimadzu. Adapun peralatan

yang digunakan untuk menyiapkan sampel “teh” adalah *microwave*, loyang, *hot plate*, blender, baskom.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif yakni mengumpulkan data dengan melakukan penelitian. Ditambahkan oleh Singarimbun dan Effendi (1989), metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Tahapan penelitian ini adalah identifikasi klorofil a menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), pengukuran panjang gelombang dan absorbansi menggunakan alat spektofotometer UV-Vis, selanjutnya dilakukan analisa menggunakan alat HPLC untuk mengetahui waktu retensi klrofil a, analisa DPPH mengetahui kadar antioksidan klorofil a pada pigmen dan yang terakhir dilakukan pengujian intensitas warna L, a, b dengan *color reader*. Penelitian ini dilakukan agar mendapatkan data mengenai perbedaan aktivitas antioksidan alga coklat pigmen klorofil a pada sampel yang digunakan *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh”. Untuk mendapatkan data perbedaan antioksidan maka, perlu adanya perhitungan statistik menggunakan uji T. Untuk mendapatkan perhitungan uji T ini maka perlu adanya metode deskriptif pada penelitian ini. Menurut Narbuko dan Achmadi (2010), penelitian deskriptif yaitu penelitian yang berusaha untuk menuturkan pemecahan masalah yang ada sekarang, jadi ia juga menyajikan data, menganalisis dan menginterpretasi. Ia juga bersifat komperatif dan korelatif. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini adalah tahap pertama pengambilan sampel *Sargassum cristaefolium* dari pulau Talango, Madura Jawa Timur. Tahap kedua dilakukan ekstraksi dengan cara sampel yang sudah disiapkan dimasrasi selama 24 jam ,6 jam, dan 12 jam. Tahap ketiga dilakukan fraksinasi (partisi) menggunakan pelarut dietil eter,

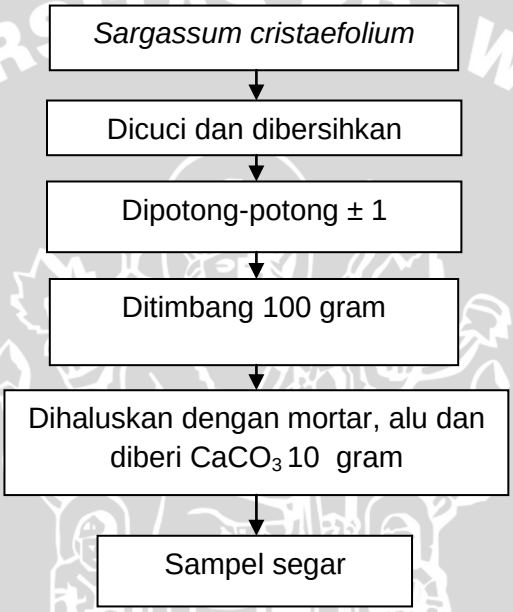
saturasi garam, dan air ledeng. Tahap keempat isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom dengan menggunakan fase diam *silica gel* dan fase gerak heksan dan etil asetat. Tahap kelima identifikasi pigmen klorofil a menggunakan plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), setelah diperoleh hasil klorofil a dihitung nilai Rf. Selanjutnya analisa pigmen klorofil a dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, HPLC dan uji antioksidan DPPH. Parameter uji pada penelitian ini yaitu perubahan pola, intensitas warna L, a, b, waktu retensi dan kadar antioksidan dalam ppm.

3.4 Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan untuk penelitian adalah alga coklat *Sargassum cristaefolium* yang diperoleh langsung dari perairan di Desa Cabiyya, Pulau Talango, Madura Jawa Timur, dicuci dan dibersihkan sebelum dikirim ke Malang untuk menghilangkan kotoran dan lendir yang masih menempel. Selanjutnya dibilas menggunakan air bersih dengan menggunakan air tawar. Alga coklat *Sargassum cristaefolium* yang sudah dibersihkan dan siap untuk dikirim dimasukkan ke dalam kantong *polybag* hitam dan disimpan ke dalam kardus yang ditambahi es batu agar kondisi alga coklat masih dalam keadaan segar. Sehabis tiba dimalang sampel alga coklat disimpan ke dalam *freezer*.

Sampel yang digunakan untuk penelitian menggunakan dua sampel *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” *Sargassum cristaefolium*. Persiapan sampel untuk perlakuan segar yaitu *Sargassum cristaefolium* yang disimpan didalam *frezzer* diambil di*thawing* dan dibersihkan terlebih dahulu dengan air ledeng yang mengalir. Alga coklat kemudian diangin-anginkan menggunakan keranjang plastik dan koran. Tujuan diangin-anginkan untuk mengurangi resapan air yang terdapat pada bahan. Tahap selanjutnya adalah alga coklat dipotong-potong kurang lebih 1 cm untuk memperluas permukaan bidang dan

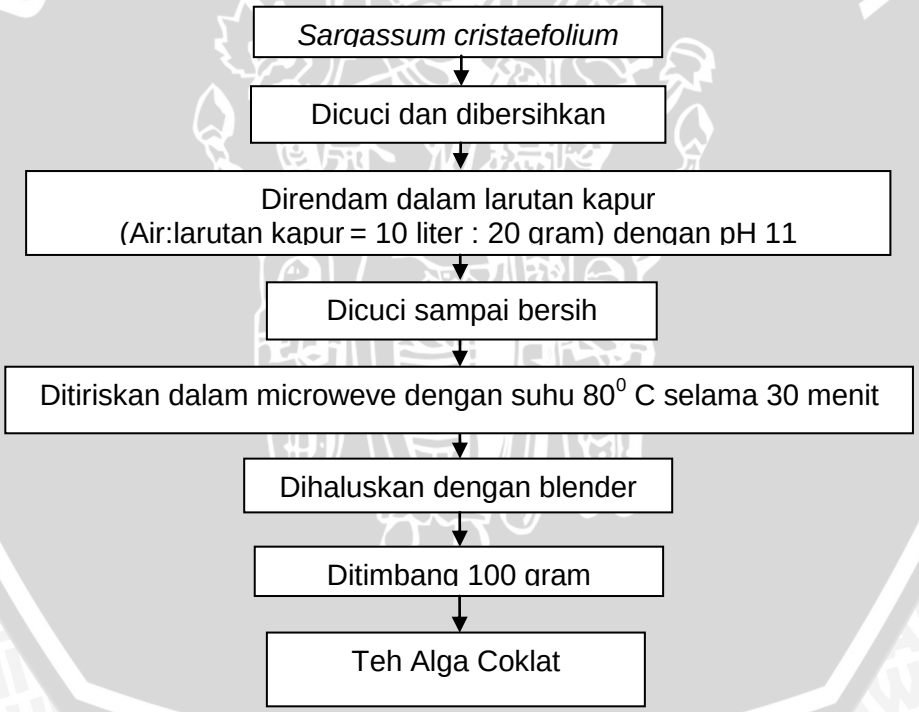
mempermudah saat dihaluskan sehingga pigmen yang ada di dalam daun dapat terekstraksi dengan maksimal. Selanjutnya *Sargassum cristaefolium* yang sudah kering ditimbang menggunakan timbangan digital sebanyak 100 gram kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan alu serta ditambahkan $CaCO_3$ sebanyak 10 gram. Penambahan $CaCO_3$ bertujuan untuk menetralkan alga coklat, karena klorofil akan mengalami proses perubahan pH khusunya asam. Persiapan sampel segar dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Persiapan Sampel Segar

Tahap selanjutnya adalah pembuatan "teh" *Sargassum cristaefolium*. Sampel yang sudah dipotong – potong 1 cm diletakkan dalam loyang. Pada tahap pembuatan sampel "teh" *Sargassum cristaefolium* dilakukan beberapa tahap yaitu sampel yang sudah disimpan dalam *frezzer dithawing* dan dibersihkan dahulu dengan air yang mengalir, selanjutnya dikeringkan untuk mengurangi resapan air yang terdapat pada sampel. Sampel yang sudah bersih dilakukan perendaman dengan air kapur selama 4 jam 30 menit dengan pH 11. Kapur yang digunakan adalah kapur sirih $Ca(OH)_2$ sebanyak 20 gram. Perendaman air

kapur ini bertujuan untuk menghilangkan aroma amis dari rumput laut. Tahap selanjutnya setelah proses perendaman dengan air kapur, sampel dicuci kembali agar bau kapur yang menempel pada alga coklat dapat hilang. Sampel alga coklat yang sudah bersih ditiriskan dalam keranjang untuk mengurangi kadar air pada sampel. Selanjutnya sampel dikeringkan dengan menggunakan *microweve* dengan suhu 80^0 C selama 30 menit atau sampai kadar airnya kurang dari 5%. Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan mengunakan blender hingga menjadi serbuk teh. Serbuk teh yang sudah halus dikemas dengan plastik klip dan dilapisi aluminium foil untuk menjaga kualitas pigmen alga coklat. Persiapan sampel teh basa kering dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Persiapan Sampel "Teh" Alga coklat (*Sargassum cristaefolium*)

3.5 Ekstraksi Pigmen Alga Coklat

Ekstraksi klorofil a dengan sampel *Sargassum cristaefolium* pada penelitian ini menggunakan metode Pangestuti *et al., (*2008) yang sudah dimodifikasi oleh Muamar (2009). Sampel yang dilakukan ekstraksi adalah sampel alga coklat segar dan “teh”. Pada proses ekstraksi dilakukan sama. Proses ekstraksi pada penelitian ini dengan masrasi bertingkat, yaitu dengan cara *Sargassum cristaefolium* direndam menggunakan metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COOCH_3) dengan perbandingan (7:3 v/v) sebanyak 300 ml. Masrasi dilakukan sebanyak 3 kali tahapan. Pada sempel *Sargassum cristaefolium* segar tahap pertama masrasi dilakukan selama 24 jam didapat filtrat 273 mL , tahap kedua selama 12 jam didapat filtrat 210 mL, dan tahap ketiga selama 6 jam didapat filtrat 280 mL. Sedangkan untuk masrasi dengan sampel “teh” *Sargassum cristaefolium* masrasi 24 jam didapat filtrat 200 mL, tahap masrasi 12 jam didapat hasil filtrat 284 mL, dan tahap ketiga masrasi selama 6 jam didapat hasil filtrat 280 mL. Pemilihan pelarut metanol dikarenakan pelarut metanol (CH_3OH) dapat melarutkan semua senyawa organik di dalam bahan, sedangkan pelarut aseton (CH_3COCH_3) berfungsi untuk mengangkat pigmen yang bersifat polar. Selanjutnya setelah proses masrasi selama 24, 12, dan 6 jam sudah selesai dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring halus hingga didapat filtrat dari proses masrasi. Proses penyaringan ini bertujuan untuk mengambil zat-zat yang mengandung pigmen dan sisa-sisa (ampas) rumput laut ditimbang berat rendamennya setelah ditimbang akan mendapatkan hasil rendamenya selanjutnya ampas rumput laut dibuang.

3.6 Fraksinasi Pigmen Alga Coklat

Tahap selanjunya setelah proses masrasi yaitu fraksinasi. Pada tahap fraksinasi alga coklat *(Sargassum cristaefolium)* pada penelitian ini menggunakan metode Pangestuti *et al., (*2008) yang sudah dimodifikasi oleh Muamar (2009). Filtrat yang diperoleh dari proses penyaringan selanjutnya dilakukan proses fraksinasi (partisi) dengan menggunakan corong pisah dan larutan dietil eter, saturasi garam, dan air ledeng dengan perbandingan 50:25:60:5 mL. Disini penggunaan dietil eter berfungsi untuk mengikat seluruh senyawa yang bersifat non polar sehingga senyawa tersebut berada pada fase atas, lalu ditambahkan dengan larutan saturasi garam grosok dan air ledeng yang berfungsi untuk mengikat senyawa yang bersifat polar serta agar pelarut lebih tertarik mengikat larutan saturasi garam grosok dan air yang memiliki elektronegatifan dan elektropositifan yang lebih tinggi dari pada senyawa target sehingga pelarut metanol dan aseton terikat pada larutan saturasi garam grosok dan air sehingga berada dibawah.

Fase yang diambil dalam fraksinasi (partisi) adalah fase atas karena hampir seluruh pigmen berada pada fase ini, dan hasil dari fase bawah tidak digunakan karena merupakan campuran dari metanol, aseton, dan air. Pada tahap fraksinasi (partisi) pada penelitian ini digunakan dua perlakuan yang berbeda yaitu sampel *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh”. Hasil fase atas dari sampel *Sargassum cristaefolium* segar sebanyak 435 mL dan fase bawah sebanyak 1389 mL. Sedangkan untuk sampel “teh” *Sargassum cristaefolium* hasil fase atas sebanyak 448 mL dan hasil fase bawah sebanyak 1451 mL. Selanjutnya hasil dari proses partisi ditampung dalam erlemeyer yang sudah dibungkus *aluminium foil* agar tidak terkena cahaya dari luar. Proses selanjutnya di *rotary evaporator vacum* dengan suhu 30^{o}C dengan kecepatan 100 rpm yang

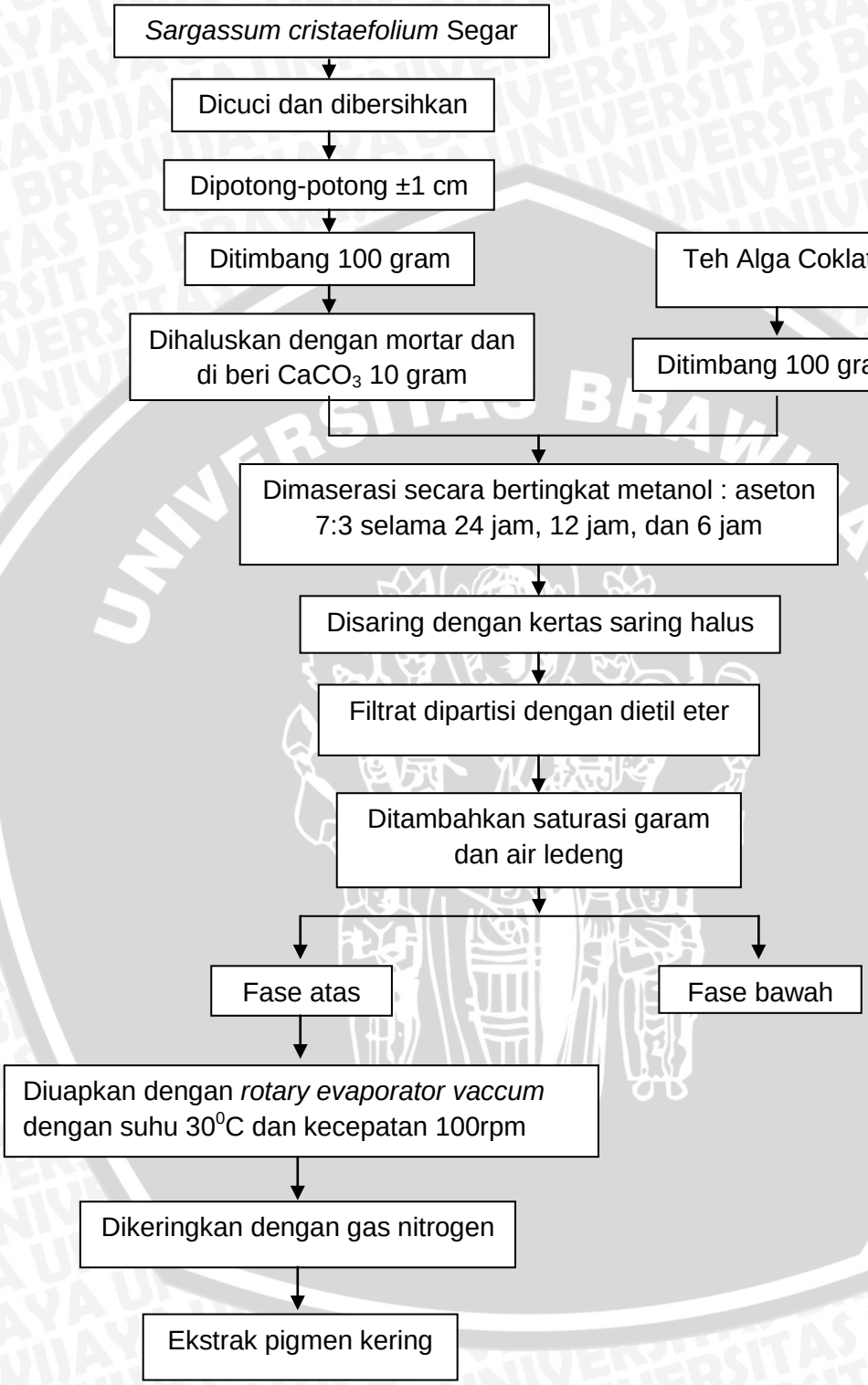
bertujuan untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Filtrat yang didapat dari proses *rotary evaporator vacum* dikerik menggunakan sendok tanduk dan diambil disimpan pada botol sampel. Selanjutnya filtrat yang didapat dalam keadaan cair dikeringkan dengan gas nitrogen hingga menjadi kerak pada botol sempel sedangkan filtrat bentuk padat tetap disimpan pada botol sampel. Ekstrak pigmen kering dan padat ditutup dengan *aluminium foil*. Bagian penutup botol dilapisi oleh *cling wrap* kemudian disimpan dalam *frezzer.* Prosedur ekstraksi dan fraksinasi alga coklat dapat dilihat pada gambar 10.

3.7 Isolasi Klorofil a

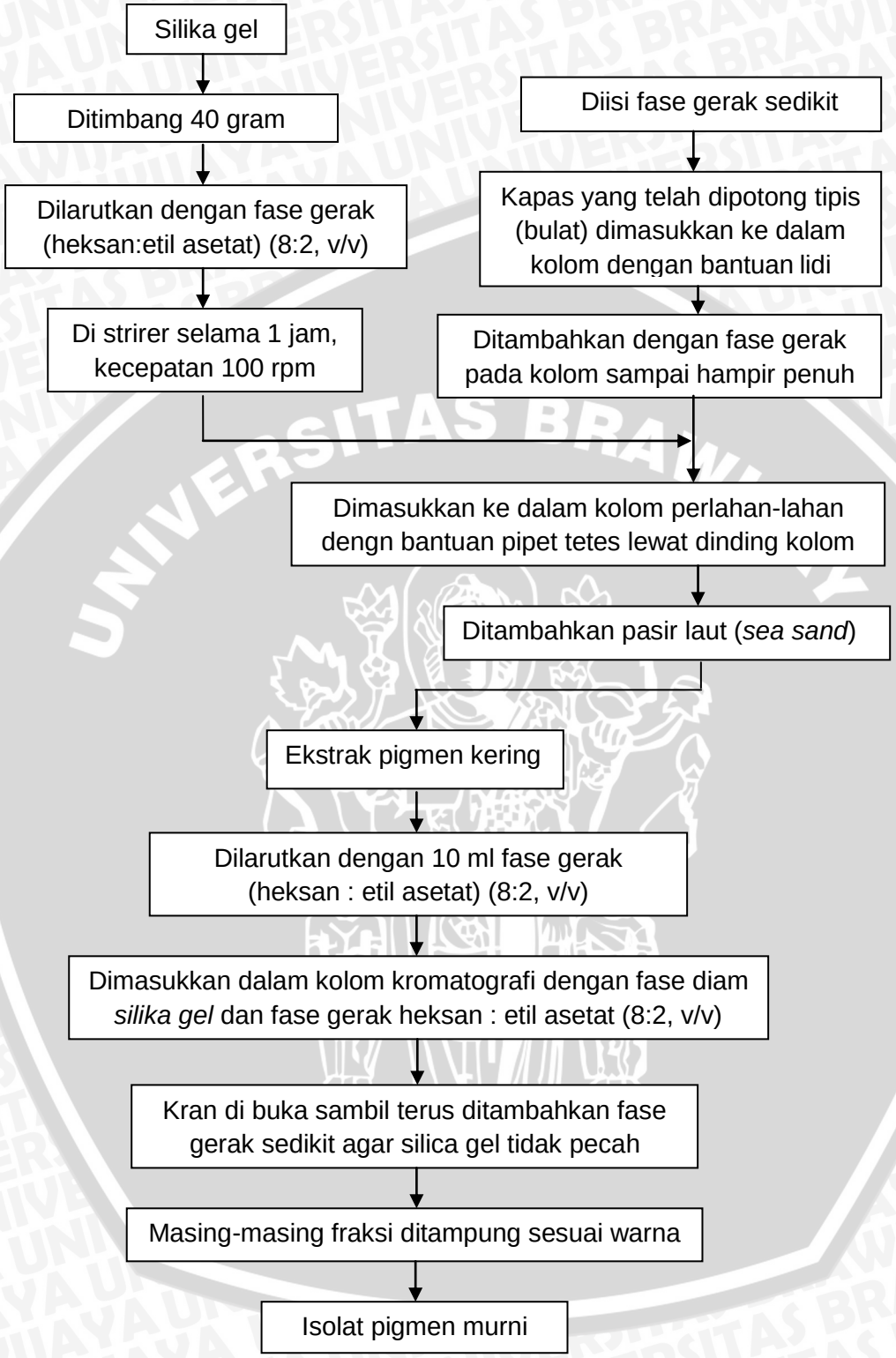
Isolasi klorofil a dilakukan untuk mendapatkan klorofil a murni. Isolasi klorofil a menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam *silica gel*. Fase gerak untuk isolasi klorofil a menggunakan heksan : etil asetat (8:2v/v). Ukuran kolom kromatrografi yang digunakan dengan panjang 40 cm dengan diameter 3 cm. *Silica gel* yang digunakan sebanyak 40 gram dilarutkan dengan fase gerak 250 mL dan distirer selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm. Tujuannya adalah agar tidak ada lagi gelembung udara dalam *silica gel* dan *silica gel* tidak pecah/retak ketika dimasukkan dalam kolom hal ini bertujuan agar fase diam dapat berfungsi seperti yang diharapkan. Fase diam berfungsi untuk penyerap komponen senyawa, sedangkan fase gerak untuk melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Pada proses selanjutnya kolom dipasang pada statif dan diisi sedikit fase gerak untuk membasahi kapas. Kapas tipis dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi, kemudian ditambahkan fase gerak sampai hampir penuh. Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan corong pisah dan pipet tetes. *Silica gel* yang akan dimasukkan diaduk terus menerus agar tidak terdapat rongga udara di tengah-tengah kolom. Timbunan bubur *silica gel* akan mencapai

¾ tinggi kolom. Kolom dibiarkan selama 24 jam dengan tujuan untuk mengetahui apakah fase diam (*silica gel*) pecah/retak ataupun tidak. Apabila fase diam mengalami pecah/retak dilakukan pengulangan prosedur sampai tidak terjadi pecah/retak dalam *silica gel*. Jika fase diam pecah akan berakibat pada hasil penyerapan senyawa yang kurang sempurna. Selanjutnya setelah dibiarkan selama 24 jam ditambahkan *sea sand* (pasir laut) agar pelarut tidak mengenai *silica gel* dan sebagai penyaring saat sampel dimasukkan.

Ekstrak kering dilarutkan dalam 10 mL fase gerak heksan : etil asetat (8:2 v/v), selanjutnya dimasukan ke dalam kolom dengan bantuan pipet tetes pada pinggir kolom agar tidak merusak permukaan kolom dan *sea sand*. Kran kolom yang berada dibawah dibuka. Ekstrak akan meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Selanjutnya dimasukkan fase gerak sambil kran kolom dibuka perlahan-lahan. Fase gerak akan mengalir terus menerus, sehingga perlu menambahkan fase gerak baru agar kolom tidak menjadi kering. Fase gerak yang ditambahkan kedalam kolom ditingkatkan terus menerus kepolarannya dengan menaikan konsentrasi etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan untuk heksan : etil asetat 8:2v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v dan 5:5 v/v. Tahap selanjutnya fraksi yang keluar berwarna hijau kebiruan dimasukkan dalam botol vial dan dikeringkan menggunakan gas nitrogen untuk selanjutnya dianalisa menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Prosedur isolasi klorofil a dapat dilihat pada Gambar 11.



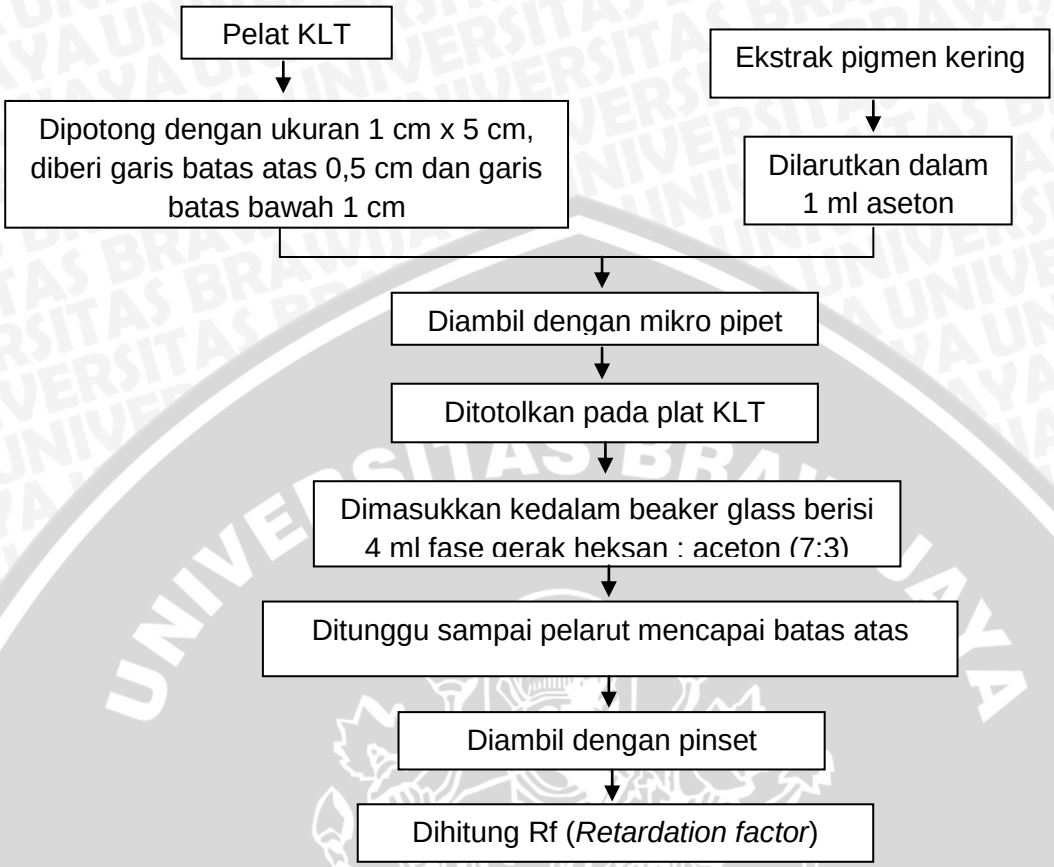
Gambar 10. Ekstraksi dan Fraksinasi Alga Coklat Segar dan "Teh" Alga Coklat Pangestuti *et al.,*(2008) yang Dimodifikasi oleh Mu'amar (2009).



Gambar 11. Pemurnian Pigmen Klorofil a dengan Kromatografi Kolom Pangestuti *et al*., (2008) yang dimodifikasi oleh Mu'amar (2009).

3.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil isolasi pigmen klorofil a di uji menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis yang digunakan untuk mengetahui komposisi pigmen berdasarkan totol warna yang terbentuk dan nilai Rf. Fase diam berupa silika gel F-254 dan fase gerak berupa Heksan : Aseton (7 : 3, v/v) ±4 ml. Tujuan pengunaan fase gerak heksan dan aseton adalah untuk melarutkan senyawa yang tidak polar, polar maupun semi polar seperti pada klorofil a, sehingga senyawa tersebut dapat larut dan tertarik keatas sesuai tingkat kepolaranya. Tahapan selanjutnya dalam proses KLT adalah membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil 2b pada kedua ujung pelat. Bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika ditotolkan, sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh pelarut. Selanjutnya, fraksi dari kolom yang ditampung dalam tabung reaksi diambil secukupnya menggunakan mikro pipet dan ditotolkan pada pada pelat KLT sambil ditiup-tiup. Setelah bercak tersebut mengering, pelat dimasukkan dalam *beaker glass* berisi fase gerak heksan:aseton (7:3 v/v). Fase gerak yang dimasukan dalam beaker glass jumlahnya tidak terlalu banyak sekitar 4ml. Selanjutnya *beaker glass* ditutup menggunakan *cling wrap* dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas. Selanjutnya diambil dan diamati warna pigmen pada plat KLT dan dihitung nilai Rf-nya (*retardation factor*). Prosedur KLT dapat dilihat pada Gambar 12.

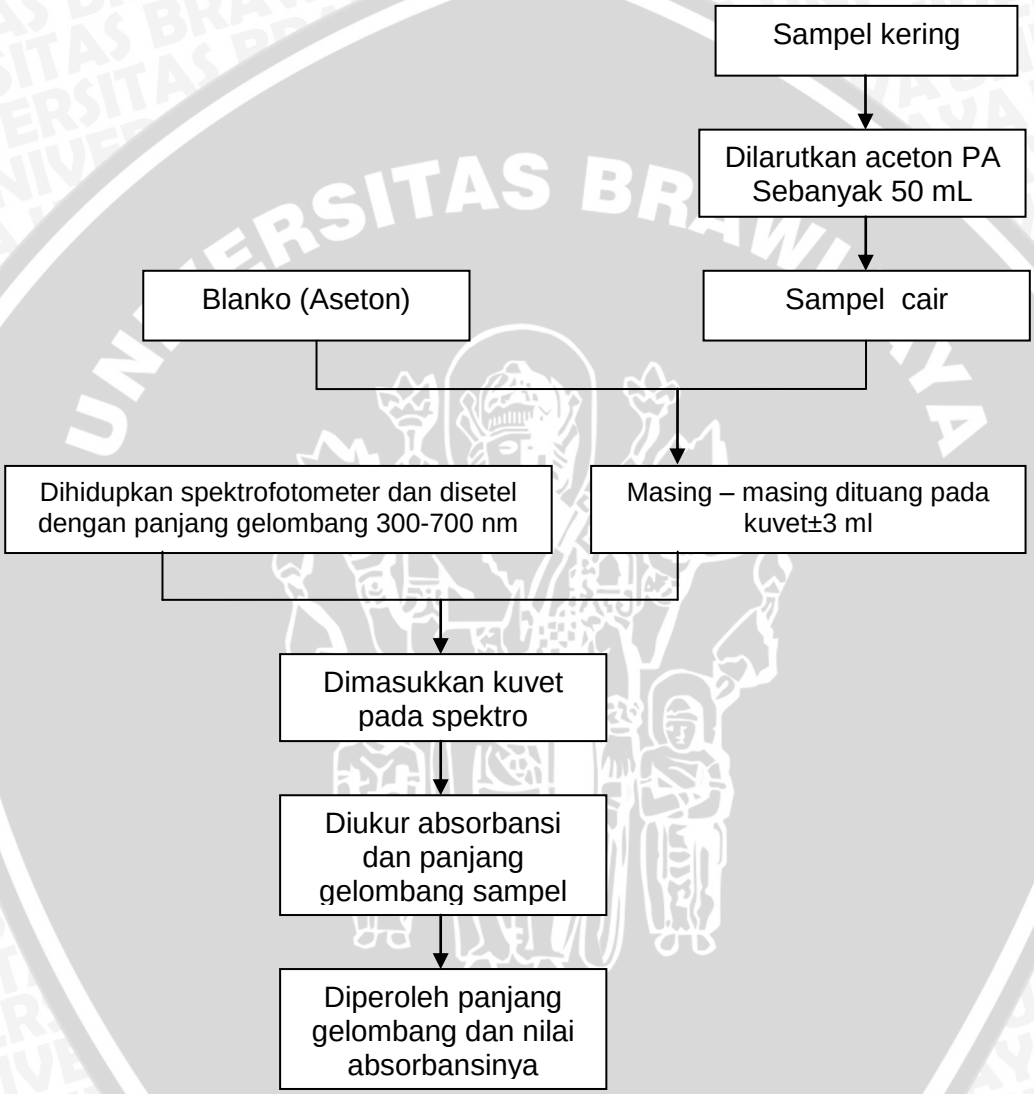


Gambar 12. Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti *et al.,* 2008).

3.9 Spektrofotometer UV-Vis

Analisa spektrofotometri UV-Vis dilakukan untuk mengetahui pola spektra (serapan cahaya yang diabsorbsi) pigmen yang terkandung dalam alga cokelat. Pigmen kering yang telah dilakukan pemurnian dengan menggunakan KLT ditambahkan aseton (p.a) ± 3 ml. Selanjutnya disiapkan beker glass 50 mL yang sudah diisi aseton (p.a). Pigmen yang sudah diencerkan dengan aseton ditambahkan ke dalam beaker glass yang berisi aseton 50 mL, dengan menggunakan mikro pipet secukupnya sesuai absorbansi yang diinginkan. Larutan pigmen dituang pada kuvet ± 3 ml dan kuvet kemudian dimasukan ke dalam instrumen spektrofotometer 1601 Shimadzu untuk dilakukan pengujian.

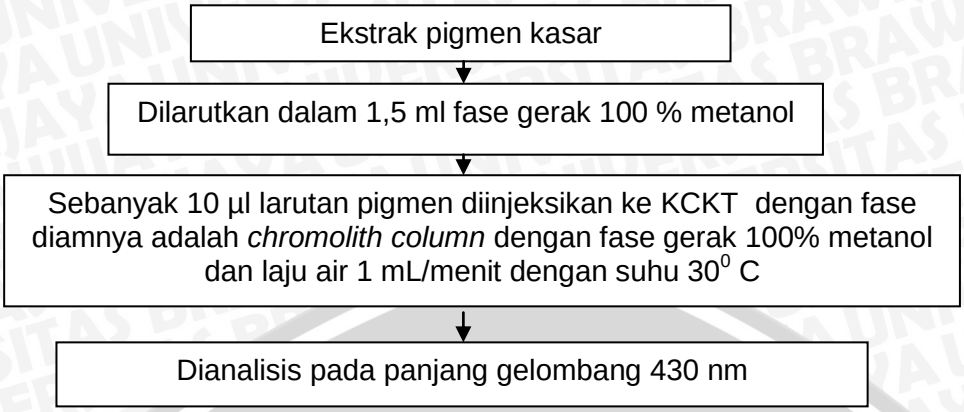
Hasil dari pengujian yang berupa serapan maksimum yang terbentuk oleh pigmen klorofil a dibandingkan dengan serapan spektra maksimum menurut literatur. Prosedur analisa spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Prosedur Analisa dengan Spektrofotometer UV-Vis 1601

3.10 Analisa HPLC

Ekstrak pigmen yang diduga klorofil a diidentifikasi menggunakan KCKT. Tahap ini disebut proses pemisahan, yaitu untuk memisahkan pigmen klorofil a dengan pigmen-pigmen lainya yang terdapat pada alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" dengan melihat waktu tambat masing-masing puncak yang terbentuk. Tahap pertama ekstrak kering dilarutkan 1,5 mL dengan fase gerak 100% metanol (Terasaki *et al*., 2009). Fase gerak merupakan salah satu variabel yang mempengaruhi pemisahan, dengan memperlihatkan faktor-faktor antara lain murni (tidak ada kontaminan), tidak bereaksi dengan wadah, dapat melarutkan sampel. Tahap selanjutnya sebanyak 10 µl larutan pigmen diinjeksi ke KCKT dengan fase diamnya adalah *chromolith column* dengan sistem elusi gradien 100% metanol lama elusi selama 15 menit dan laju alirnya 1 mL/menit pada suhu 30^0 C. Elusi gradien adalah penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Efek dari elusi gradien adalah mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat pada kolom. Tahap berikutnya dilakukan analisa pada panjang gelombang 430 nm. Selanjutnya komponen yang dihasilkan direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah *peak* menyatakan komponen sedangkan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran. Komputer dapat digunakan untuk mengontrol absorbansi dan analisis kerja sistem KCKT dan mengumpulkan serta mengolah data hasil pengukuran KCKT dengan cara online *sofwere* (solusi LC versi 1.25) Shimadzu. Prosedur analisa KCKT dapat dilihat pada Gambar 14.



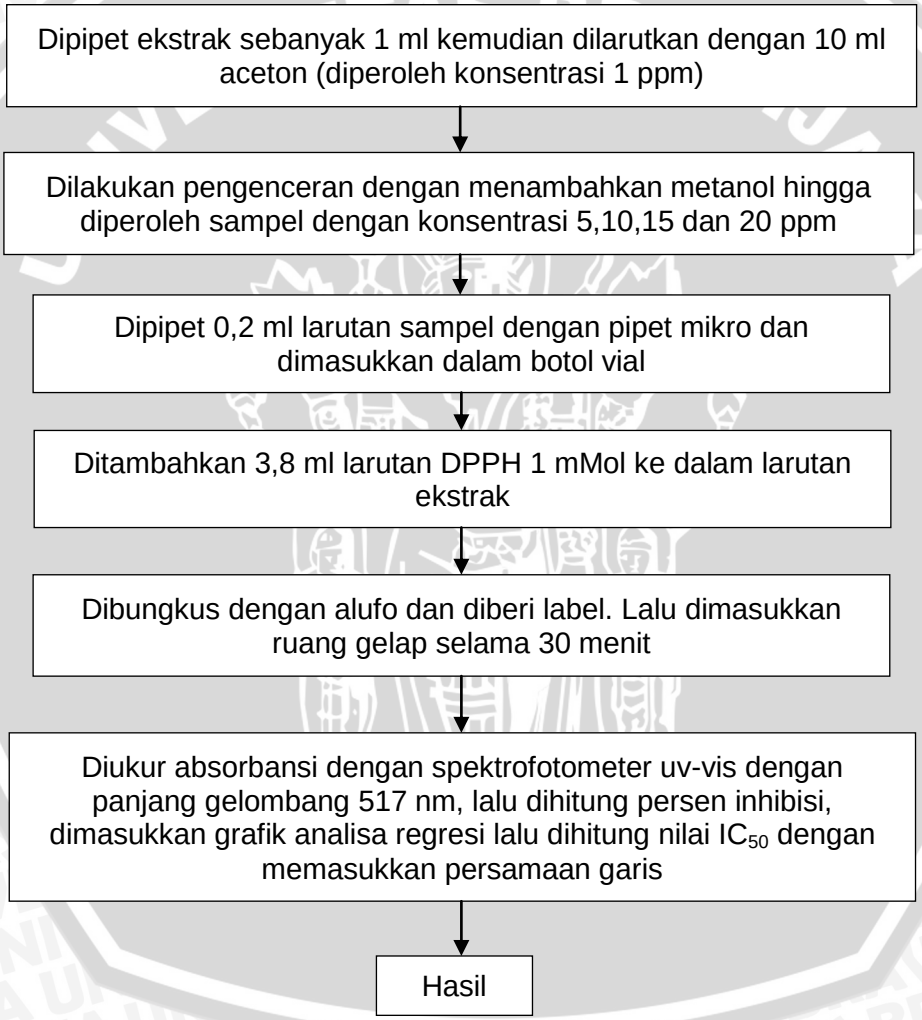
Gambar 14. Analisa KCKT (Fung *et al.,* 2013)

3.11 Analisa DPPH

Analisa aktivitas antioksidan untuk mengetahui kemampuan rumput laut *Sargassum cristaefolium* baik sampel segar dan "teh" untuk menghabat aktivitas radikal bebas. Ekstrak kasar pigmen klorofil a perlakuan segar dan "teh" tersebut dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH (*2,2 dipheny 1-picrylhydrazil).* Ekstrak kasar pigmen klorofil a yang sudah dilarutkan dengan aseton diambil sebanyak 2 mL dan dibuat dalam fariasi konsentrasi (0, 5, 10, 15, dan 20 ppm) konsentrasi 0 ppm sebagai blanko. Dari fariasi-fariasi konsentrasi tersebut dibuat menjadi 2 ulangan. Masing-masing ekstrak kasar pigmen klorofil a dengan fariasi berbeda dimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan 4,0 mL larutan DPPH 1mM dalam pelarut metanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nM. Selanjutnya dilakukan juga pengukuran absorbansi pada blanko. Besarnya aktifitas antioksidan dapat dihitung menggunakan rumus:

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

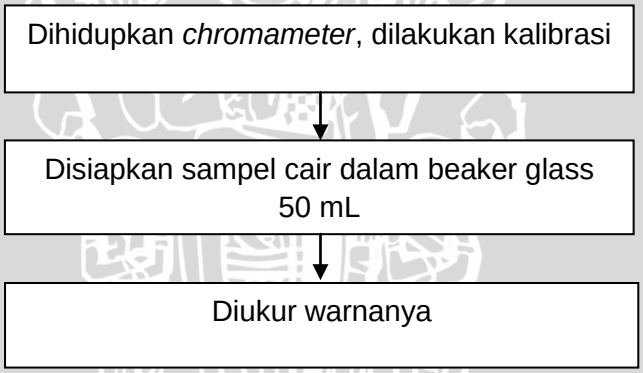
Nilai konsentrasi dan hambatan ekstrak diplot masing-masing pada sumbu x dan y. Persamaan garis yang sudah diperoleh dalam bentuk y =bLn + a digunakan untuk mencari nilai IC (*inhibitor concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Suryaningrum *et al*., 2006). Prosedur analisa DPPH dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Prosedur Analisa DPPH

3.12 Analisa Intensitas Warna (L, a, b) dari nilai ^{0}Hue

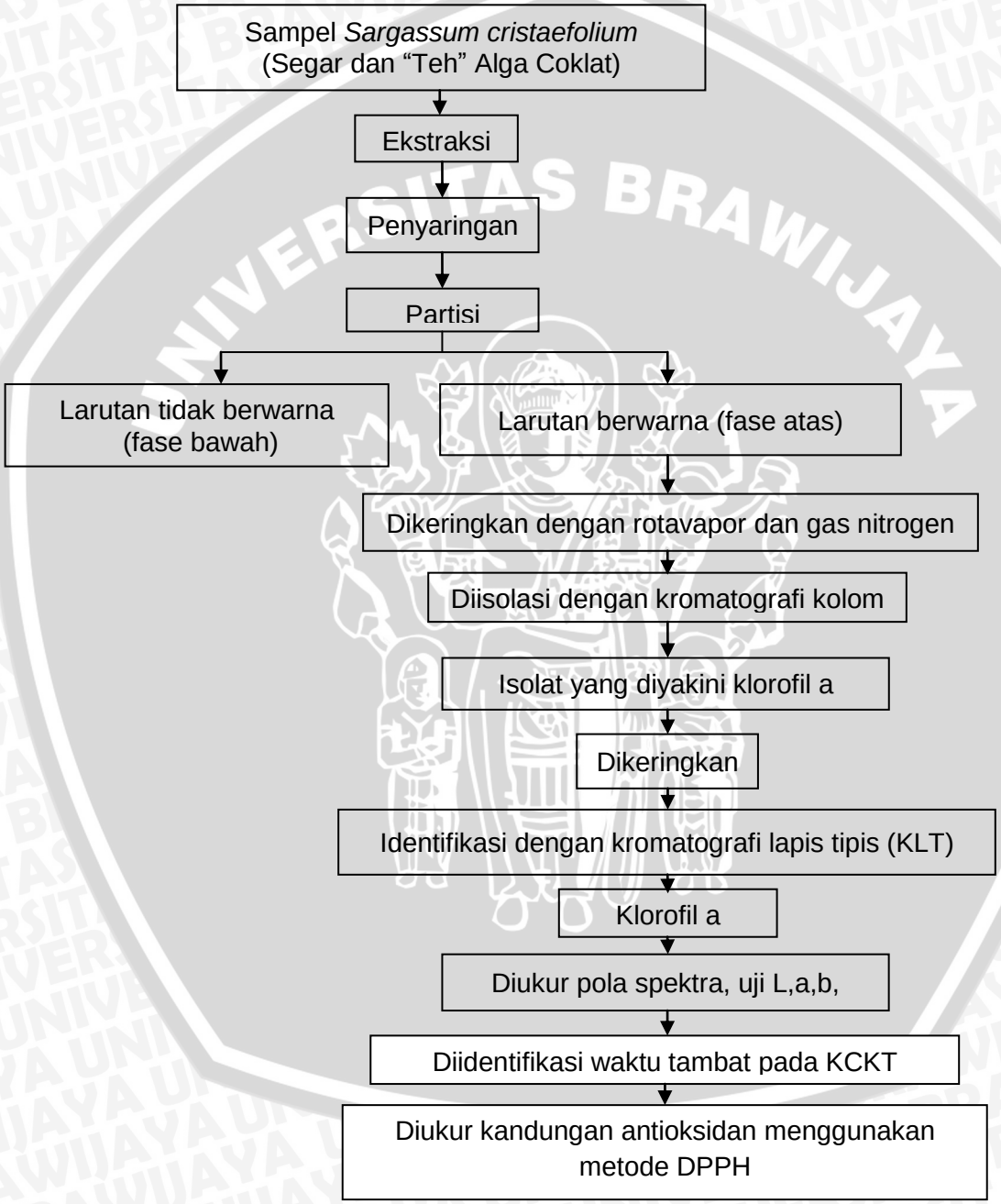
Analisa Insensitas Warna (L) *Lighness*, (a) *Redness*, (b) *Yellowness* dilakukan pada perlakuan sampel rumput laut *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh". Untuk menganalisa intensitas warna menggunakan alat ukur *chromameter.* Pengukuran beberapa interval spektrum elektromagnetik, dimana aliran tenaga dari radiasi muncul, atau datang ke suatu permukaan. Hue adalah atribut dari warna yang diasosiasikan dengan panjang gelombang yang dominan didalam campuran gelombang cahaya. Jika suatu obyek dikatakan biru, kuning, atau hijau, maka hue sudah dispesifikasikan. Dengan kata lain adalah atribut dari sensasi visual dimana sebuah area nampak mirip dengan warna merah, kuning, hijau, dan biru, atau kombinasi dari keduanya. Prosedur pengukuran (L, a, b) dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Analisa intensitas warna (L, a, b)

Kecerahan merupakan spektrum warna dasar, penambahan warna lain pada suatu obyek akan menurunkan nilai kecerahan. Nilai L* menyatakan tingkat gelap terang dengan kisaran 0-100 dimana nilai 0 menyatakan kecenderungan warna hitam atau sangat gelap, sedangkan nilai 100 menyatakan kecenderungan warna terang/putih. Nilai intensitas warna a* menunjukkan intensitas warna merah (+) atau hijau (-), sedangkan b* menunjukkan intensitas warna kuning (+) atau biru (-). Hasil pengamatan derajat kekuningan (b*) Pomeranz dan Meloans

(1994). Selanjutnya didapatkan nilai a* dan b* setelah itu dihitung menggunakan ^{0} Hue yang menunjukkan kisaran warna sampel. Diagram alir penelitian tentang analisa antioksidan pigmen klorofil a alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Diagram Alir Penelitian

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

Data Hasil penelitian isolasi klorofil a dari alga coklat *(Sargassum cristaefolium)* segar dan "teh" dengan parameter isolasi hasil kolom kromatografi, uji identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), pola spektra dengan spektofotometer UY-Vis, analisa HPLC waktu retensi puncak klorofil a dan Analisa kadar DPPH dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Data Uji Identifikasi Pigmen Klorofil a

No	Uji Identifikasi	Hasil		Literatur
		Segar	**"Teh"**	
1.	Kromatografi Kolom	64 isolat pigmen dalam botol vial, dengan volume tiap tabung 10 mL. Isolat pigmen klorofil a didapat dari botol vial ke 22 sampai 25 warna hijau kebiruan.	87 isolat pigmen dalam botol vial, dengan volume tiap tabung 10 mL. Isolat pigmen klorofil a didapat dari botol vial ke 45 sampai 51 warna hijau kebiruan.	Klorofil a berwarna hijau kebiruan (Jeffrey., 1961).
2	KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	Rf 0,39-0,45	Rf 0,39-0,45	Rf klorofil a 0,40-0,45 (Wang *et al.,* 1995 dan Msane, 2011).
3.	Pola Spektra (UV-Vis)	662 nm	654 nm	Dalam pelarut aseton panjang gelombang 662 nm (SCOR WG 78 data)
4	HPLC	32,42 menit	34,46 menit	38,01 menit (Hegazi *et al.,* 1998)

4.2 Pembahasan

4.2.1 Hasil Isolasi Klorofil a

Isolasi klorofil a dengan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam berupa silica gel dan fase gerak yang digunakan dengan perbandingan heksan : etil asetat 8:2 v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v, dan 5:5 v/v. Tinggi kolom 30 cm dan diameter kolom yang digunakan sekitar 2 cm. Gambar isolasi klorofil a dapat dilihat pada Gambar 18.

Gambar 18. Isolasi Klorofil a

Berdasarkan hasil isolasi kromatografi kolom dapat dilihat terbentuknya pita-pita pigmen berdasarkan warna dan tingkat kepolaranya. Didapat klorofil a yang berwarna hijau kebiruan. Pada proses penelitian fase yang digunakan oleh kromatografi kolom adalah "*normal phase*", yaitu fase diam yang digunakan bersifat polar yaitu silica gel dan fase geraknya lebih bersifat nonpolar yaitu heksan dan etil asetat, sehingga pigmen yang bersifat non polar akan keluar terlebih dahulu (Jeffre*y et al.,* 1997). Ditambahkan oleh Lenny (2006), komponen

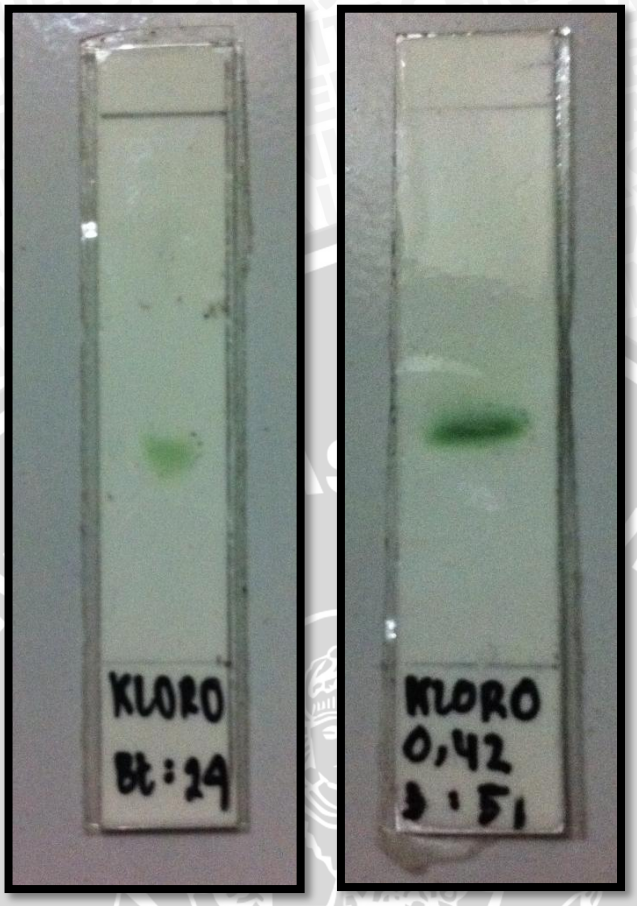
yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Warna pigmen klorofil a keluar pada perbandingan fase gerak heksan : etil asetat 7:3 v/v untuk perlakuan alga coklat *(Sargassum cristaefolium)* segar. Sedangkan untuk perlakuan alga coklat *(Sargassum cristaefolium)* "teh" pigmen yang keluar dengan perbandingan heksan : etil asetat 5:5 v/v.

Selanjutnya hasil isolasi ditampung dalam botol vial, masing-masing botol vial berisi 10 mL. Hasil fraksi pigmen dengan perlakuan sampel alga coklat *(Sargassum cristaefolium)* segar didapatkan sebanyak 64 botol vial, isolasi klorofil a diduga sebagai pigmen klorofil a terdapat pada botol vial 22 sampai 25. Sedangkan untuk perlakuan sampel alga coklat "teh" hasil fraksi pigmen didapat sebanyak 87 botol vial, isolasi klorofil a diduga sebagai pigmen klorofil a terdapat pada botol vial ke 45 sampai 51. Isolat pigmen yang sudah didapatkan diyakini sebagai klorofil a murni didasarkan pada warna pigmen hijau kebiruan yang merupakan ciri khas dari pigmen klorofil a (Jeffrey, 1997). Hasil isolasi klorofil a yang ditampung dalam botol vial dapat dilihat pada Gambar 19.

Gambar 19. Hasil Isolasi Klorofil a

4.2.2 Identifikasi Klorofil a dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi klorofil a dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam *silica gel* dan fase gerak heksan : aseton (7:3 v/v). Tujuan penggunaan fase gerak ini untuk melarutkan suatu senyawa yang tidak polar, polar, dan semi polar salah satunya pada klorofil a, sehingga senyawa tersebut akan larut dan tertarik keatas sesuai tingkatan kepolaranya. Waktu yang dicapai pelarut hingga mencapai batas atas ± 5 menit. Selanjutnya KLT diambil dan dilihat apakah totol yang terbentuk berwarna hijau kebiruan dan masuk nilai Rf. Data yang sudah didapatkan dibandingkan dengan literatur yang dimiliki oleh Jeffrey (1997), yang menyatakan bahwa pigmen klorofil a berwarna hijau kebiruan. Hasil diperkuat dengan perhitungan Rf yaitu dari perbandingan antara jarak tempuh yang ditempuh oleh fraksi pigmen dengan jarak yang ditempuh pelarut. Nilai Rf pada sampel segar dan "teh" yaitu 0,39-0,45. Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.,* (1995) dan Msane (2011) menunjukan bahwa klorofil a mempunyai nilai Rf 0,40-0,45. Menurut Warsito (2007), selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan juga dapat digunakan untuk megetahui tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika diperoleh satu totol warna maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni. Identifikasi pigmen menggunakan KLT lebih efisien karena memiliki kelebihan dari pada analisa lainya. Menurut Harbone (1987), kepekaan KLT yang lebih besar disebabkan oleh sifat penyerap yang lebih. Kepekaan KLT disebabkan memisahkan bahan yang jumlahnya lebih sedikit dari ukuran µg. Gambar identifikasi klorofil a dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dapat dilihat pada Gambar 20.

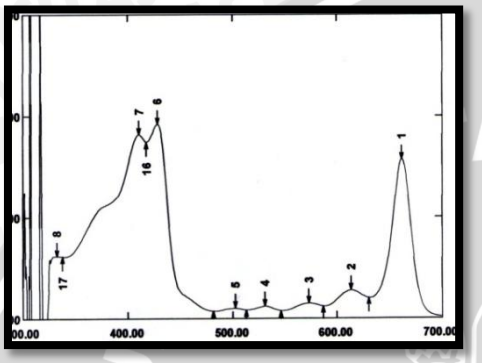


Gambar 20. Hasil KLT Pigmen Klorofil a Murni

4.2.3 Identifikasi Klorofil a dengan Spektrofotometri UV-1601

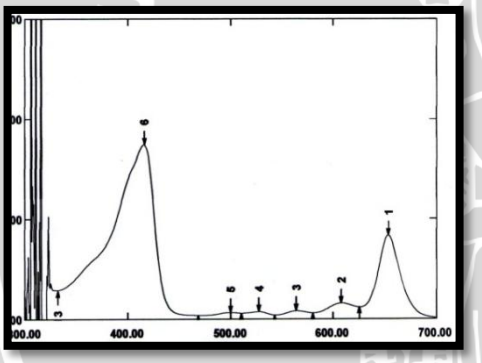
Pengukuran pola spektra pigmen klorofil a hasil isolasi dengan menggunakan spektrofotometer diperlukan untuk menguatkan identifikasi klorofil a dengan KLT. Isolat yang diduga sebagai klorofil a murni dianalisa menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601 dengan tujuan untuk mengetahui pola spektra dan panjang gelombangnya. Ditambahkan oleh (Gross, 1991) klorofil dan turunanya memiliki karateristik spesifik yang memungkinkan dilakukannya identifikasi secara spektroskopi. Molekul yang berwarna hijau tersebut memiliki serapan khas pada daerah biru dan merah dari spektrum tampak. Data yang didapat selanjutnya dibandingkan dengan literatur Jeffrey *et*

al., (1997) dalam pelarut aseton. Hasil identifikasi spektrofotometer pada sampel segar dapat dilihat pada Gambar 21. (a) sedangkan hasil identifikasi spektrofotometer sampel “teh” dapat dilihat pada Gambar 21. (b) dan gambar pembanding literatur dari Jeffrey *et.,al* (1997), dapat dilihat pada Gambar 21. (c).



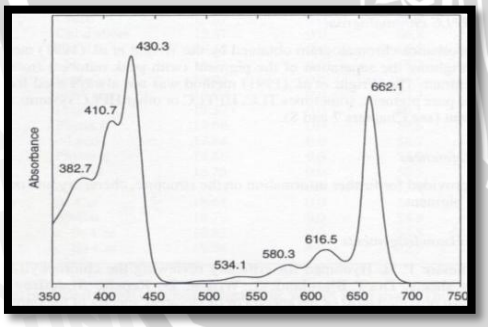
No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	662.00	0.314	
2	●	613.50	0.054	
3	●	573.00	0.029	

(a)



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	654.00	0.417	
2	●	608.00	0.078	
3	●	564.50	0.039	

(b)



(c)

Gambar 21. **(a)**. Pola spektra pigmen klorofil a sampel segar dalam pelarut aseton.
(b). Pola spektra pigmen klorofil a “teh” dalam pelarut aseton.
(c). Pola spektra klorofil a dalam pelarut aseton (Jeffrey *et al.,*1997).

Gambar diatas menunjukkan hasil pengukuran pola spektra menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran pola spektra pada penelitian ini menggunakan pelarut aseton didapat serapan maksimum pada sampel *Sargassum cristaefolium* segar 662 nm. Sedangkan untuk sampel "teh" *Sargassum cristaefolium* didapatkan hasil serapan maksimum 654 nm. Berdasarkan hasil gambar diatas, menunjukkan bahwa klorofil a sampel "teh" yang dikeringkan dengan *microweve* mengalami sedikit perubahan dan pergeseran panjang gelombang. Perbedaan pola spektra pada sampel "teh" diduga karena terjadi proses pemanasan. Ditambahkan oleh Gaur *et al.,* (2006), menyatakan bahwa gugus CH_3 pada atom C-7 klorofil a sangat rentan terdapat pelepasan elektron selama pemanasan. Perubahan struktur klorofil menjadi turunanya akibat induksi cahaya merupakan tahap peredaman terhadap fotoreaksi (Kakitani *et al.*, 2003). Ditambahkan oleh Gross (1991), klorofil sangat mudah terdegradasi oleh cahaya, pH, suhu, oksigen dan alkohol yang berlebihan. Intensitas cahaya yang tinggi dan waktu iradiasi cahaya yang lama dapat menyebabkan degradasi klorofil. Diperjelas oleh Robinson (1995), berbagai turunan klorofil yang terdapat di alam atau sebagai molekul hasil degradasi klorofil terbentuk karena hilangnya magnesium dan hidrolisis salah satu gugus ester atau keduanya.

Hasil yang didapat pada penelitian ini tidak berbeda dengan literatur SCOR WG 78 data: Jeffrey *at el*., (1997), yaitu 662,1 nm sehingga hasil serapan pada penelitian ini dapat disimpulkan sama karena memiliki serapan yang hampir sama. Pergeseran serapan maksimum pada sampel segar dan sampel "teh" dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Rerata Panjang Gelombang klorofil a pada sampel segar dan "teh"

Sampel	Rerata panjang gelombang	Panjang Gelombang Menurut Literatur
Segar	662	Menurut SCOR WG 78 data 662
"Teh"	654	

Tabel diatas menunjukkan bahwa pengolahan "teh" *Sargassum cristaefolium* mengalami pergeseran panjang gelombang kearah yang lebih pendek (hipsokromik). Menurut Wiles dan Carlsson (1987) melaporkan bahwa cahaya UV dengan panjang gelombang pendek menyebabkan molekul terdegradasi lebih cepat. Mercandate (2008), menyatakan bahwa proses degradasi akan mengarah pada pembentukan *cis-isomer*. Degradasi pigmen dapat dilihat pula dari perubahan pola spektranya, penurunan absorbansi dan pergeseran panjang gelombang. Penurunan absorbansi tersebut menunjukkan terjadinya pembentukan produk degradasi yang lebih kecil dari molekul awal (Nurcahyanti dan Limantara, 2007). Diperjelas oleh Rahmawan (2008), menyatakan bahwa pergeseran panjang gelombang kearah lebih pendek atau ke arah merah (hipsokromik) maupun kearah yang lebih panjang atau ke daerah merah (batokromik) menunjukkan terjadinya degradasi. Cahaya diduga menyebabkan oksidasi sehingga struktur kimia pigmen mengalami kerusakan. Ditambahkan oleh Smith (2006), melaporkan bahwa cahaya merupakan salah satu faktor degradasi oksidatif penyebab kerusakan pigmen. Diperjelas oleh Fretes *et al.,* (2012), pergeseran puncak serapan maksimum menandakan bahwa intensitas cahaya yang digunakan dalam perlakuan iradiasi dapat menimbulkan kerusakan yang signifikan terhadap ekstrak kasar pigmen dan membentuk produk degradasi pigmen.

4.2.4 Intensitas Warna Tingkat Kecerahan (L), Kemerahan (a), Kekuningan (b)

Analisis terhadap warna pigmen klorofil a dilakukan secara obyektif dengan menggunakan alat *Colour Reader.* Dengan menggunakan alat ini warna dari pigmen klorofil a yang diukur dengan tiga nilai yang dilambangkan dengan L (Kecerahan), a (Kemerahan), b (Kekuningan). Nilai L menyatakan derajat kecerahan pigmen, nilai a menyatakan gradasi warna dari hijau hingga merah, sedangkan nilai b menyatakan gradasi warna dari biru hingga kuning. Untuk nilai a dan b rentang nilainya adalah dari negatif hingga positif. Hasil analisis intensitas warna (L), (a), (b) pada pigmen klorofil a dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Hasil analisis intensitas warna (L), (a), (b).

Sampel	Nilai (L)	Nilai (a)	Nilai (b)	^{0} Hue
Segar	20,9	7,6	4,8	32,28
“Teh”	21,4	7,7	5,9	37,46

Nilai L merupakan parameter yang menyatakan cahaya pantul yang menghasilkan warna kromatik putih, abu-abu dan hitam (Soekarto, 1990). Pada pengujian analisa intensitas warna memperlihatkan tingkat kecerahan (light) dari suatu bahan yang diuji dengan kisaran 0 (hitam) sampai 100 (putih). Hasil analisa ragam nilai kecerahan (L) pada klorofil a sampel segar 20,9 sedangkan pada sampel “teh” 21,4. Hal ini tingkat kecerahan pada klorofil a didapatkan pada sampel “teh” yaitu 21,4. Sedangkan pada sampel segar menunjukan nilai yang lebih rendah diasumsikan pigmen lebih gelap yaitu 20,9. Perbedaan kecerahaan ini diduga karena adanya pemberian perlakuan pengeringan sehingga warna pigmen berubah atau lebih cerah. Ditambahkan oleh Khuluq *et al.,* (2007), bahwa kandungan pigmen yang tinggi mempengaruhi tingkat kecerahan, pigmen tersebut mengalami degradasi membentuk molekul yang lebih kecil dan ikatan rangkap lebih sedikit.

Berdasarkan analisa ragam nilai a menyatakan warna kromatik dari hijau-merah dengan nilai +a dari 0 hingga 60 untuk merah dan nilai –a dari 0 sampai (-60) untuk warna hijau. Hasil yang didapat untuk sampel segar 7,6. Sedangkan pada sampel “teh” menunjukkan nilai yang lebih tinggi 7,7. Pada nilai intensitas warna yang didapat pada penelitian ini cenderung lebih berwarna merah namun pada sampel segar memiliki nilai yang lebih rendah menunjukkan bahwa klorofil berwarna hijau karena nilai ragamnya lebih mendekati nilai 0. Sedangkan pada sampel “teh” cenderung memiliki nilai positif yang menunjukkan klorofil pada sampel “teh” cenderung berwarna merah. Pada sampel “teh” diduga telah terjadi degradasi warna.

Berdasarkan analisa ragam nilai b menyatakan warna kromatik biru dan kuning dengan b positif untuk warna kuning dan nilai b negatif untuk warna biru. Hasil yang didapat nilai b pada sampel segar 4,8. Sedangkan pada sampel “teh” 5,9. Nilai b yang tinggi didapat pada sampel “teh” sedangkan nilai b yang rendah didapat pada sampel segar. Menurut Suyatma (2009), notasi b*: warna kromatik campuran biru-kuning dengan nilai +b* (positif) dari 0 sampai +70 untuk warna kuning dan nilai –b (negatif) dari 0 sampai -70 untuk warna biru. Dari hasil analisa nilai b untuk sampel segar dan “teh” didapat nilai postif semua yang menunjukan bahwa klorofil a cenderung berwarna kuning, namun sampel segar lebih mendekati kearah nilai negatif 0 sehingga dapat disimpulkan mendekati nilai biru. Hal ini dapat disimpulkan bahwa sampel “teh” mengalami proses degradasi karena nilai yang didapat lebih tinggi. Selanjutnya dilakukan perbandingan nilai a dan b dengan cara dihitung dan dibandingkan dengan nilai ^{0}Hue.

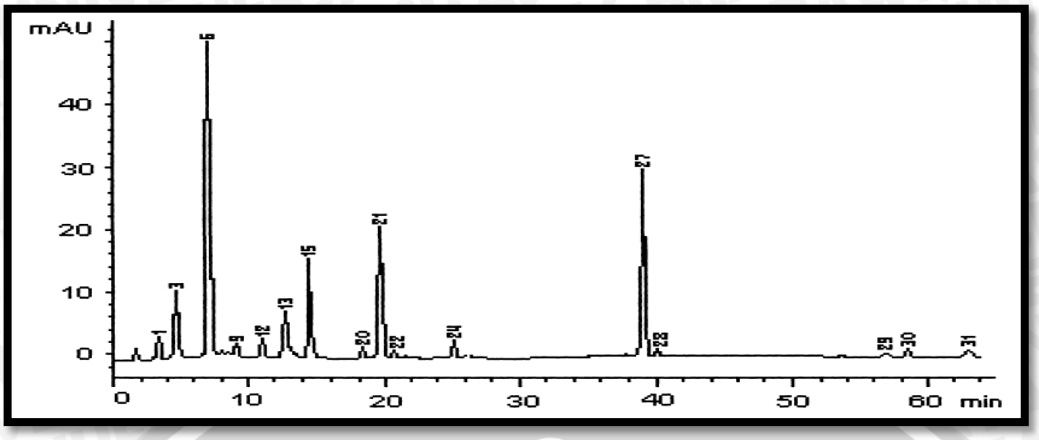
Berdasarkan nilai ragam a dan b dihitung menggunakan ^{0}Hue untuk mengetahui kisaran sama sampel. Nilai ragam ^{0}Hue untuk sampel segar sebesar

32,28 sedangkan dalam sampel “teh” sebesar 37,46. Nilai ^{0}Hue yang diperoleh berdasarkan tabel warna kromatisitas merah (18-54^0) dilihat tabel warna kromatisitas menurut Soekarto (1990). Hal ini intensitas dalam ^{0}Hue berwarna merah dan mengakibatkan kenampakan ekstrak pigmen semakin terang. Selain itu diduga terjadi kerusakan pigmen klorofil akibat dekomposisi struktur pigmen pada proses evaporasi pemisahan pelarut sehingga terjadi pemucatan, menyebabkan warna semakin terang. Ditambahkan oleh Suparmi *et al.,* (2007), pudarnya warna pada rumput laut, dikarenakan pigmen yang terkandung mengalami fotodegradasi, yaitu perubahan kimiawi dari suatu senyawa atau molekul menjadi senyawa atau molekul yang lebih kecil akibat absorbansi foton, baik yang berasal dari cahaya ultraviolet, cahaya tampak, ataupun cahaya infra merah. Diperjelas oleh Gross (1991), pemucatan warna pigmen yang disebabkan oleh cahaya sering disebut dengan istilah *fotobleaching* yang mengindikasikan pigmen telah terdegradasi. Menurut Jenie (1997) menyatakan bahwa terjadinya penurunan warna merah disebabkan oleh terjadinya kerusakan pada gugus aktif pigmen (flavium kation) yang menyebabkan pemucatan warna. Adapun dugaan perubahan warna tersebut disebabkan karena kurangnya penyesuaian kondisi yang tepat pada sampel klorofil a, seperti pengkondisian waktu penyimpanan sampel, ruangan uji dan alat uji yang seharusnya diruang gelap. Adanya paparan cahaya lampu saat penyimpanan, pengujian sampel dimungkinkan menyebabkan terjadinya oksidasi terhadap sampel klorofil a (Ayuningtyas, 2013).

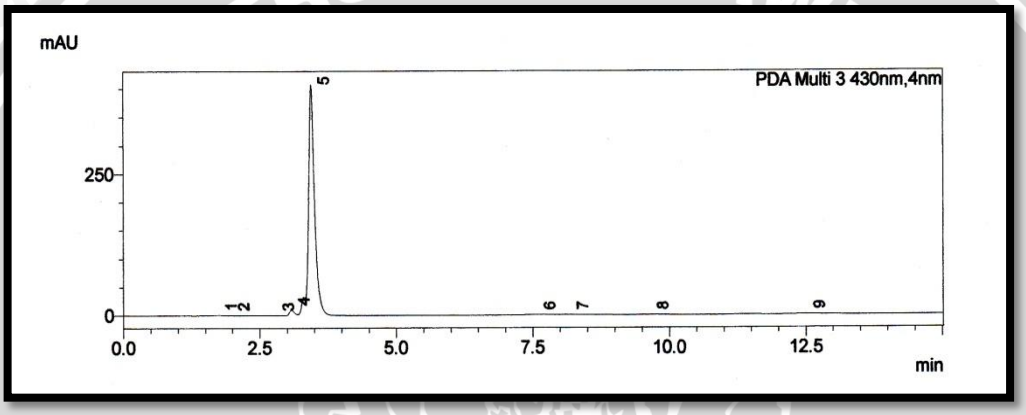
4.2.5 Analisis High Pressuere Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau High Pressuere Liquid Chromatography (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT merupakan suatu metode yang sangat baik dalam menganalisis pigmen

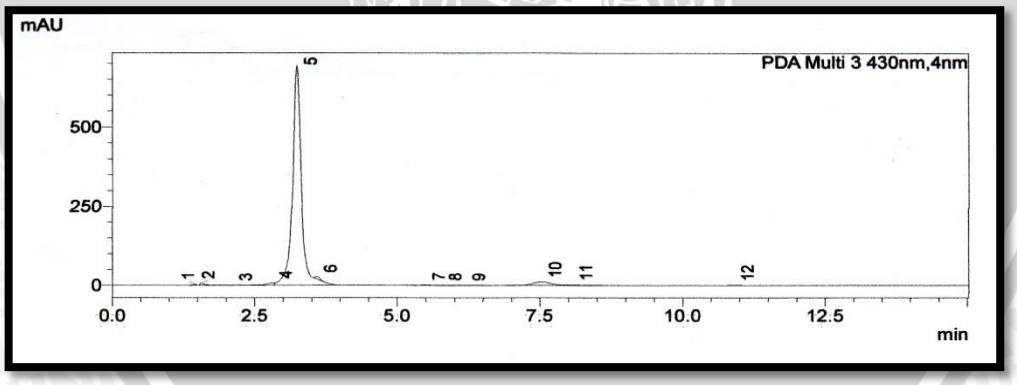
pada tumbuhan tingkat tinggi dan alga karena dengan sampel sedikit dan analisa yang pendek dapat memisahkan klorofil, karatenoid, serta turunanya (Gross, 1991). Kandungan pigmen dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi selanjutnya diidentifikasi dengan detektor PDA yang dapat menghasilkan pola spektra dari puncak-puncak yang diperoleh secara kuantitatif (Bonora *et al.,* 2000). Penentuan jenis pigmen alga coklat dilakukan dengan memandingkan *retention time* hasil penelitian dengan literatur yang menggunakan HPLC yang sama dengan penelitian, dan fase gerak dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang hampir sama. Pada analisa HPLC pada perlakuan segar hasil yang diperoleh waktu tambat klorofil a pada menit ke 32,42 sedangkan pada sampel "teh" diperoleh waktu tambat klorofil a pada menit ke 34,46. Menurut literatur Hegazi *et al.,* (1998), bahwa klorofil a pada jenis rumput laut *Caulerpa prolifera,Jania rubens* dan *Padina pavonica* terdeteksi pada waktu 38,01 menit. Dari data *retention time* sampel segar dan "teh" dari jenis *Sargassum cristaefolium* menunjukkan bahwa sedikit berbeda dengan literatur Hegazi *et al.,* (1998), hal ini dikarenakan fase diam yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan fase diam pada literatur, sehingga waktu tambat yang diperoleh pada penelitian ini agak bergeser jika dibandingkan dengan waktu tambat yang ada pada literatur, namun pergeseran tersebut masih dalam kisaran yang tidak jauh beda. Penguatan untuk analisa kuantitatif ditunjukkan pada *spiking* bahwa sampel yang diinjeksikan menunjukkan peak yang bertambah tinggi (Sastrohamidjojo, 2007). Hasil identifiksi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi waktu tambat dapat dilihat pada Gambar 22. (a) literatur pembanding Hegazi, *et al.,* (1998), gambar 22. (b) sampel "teh" dan gambar 22. (c) sampel segar.



a.



b.



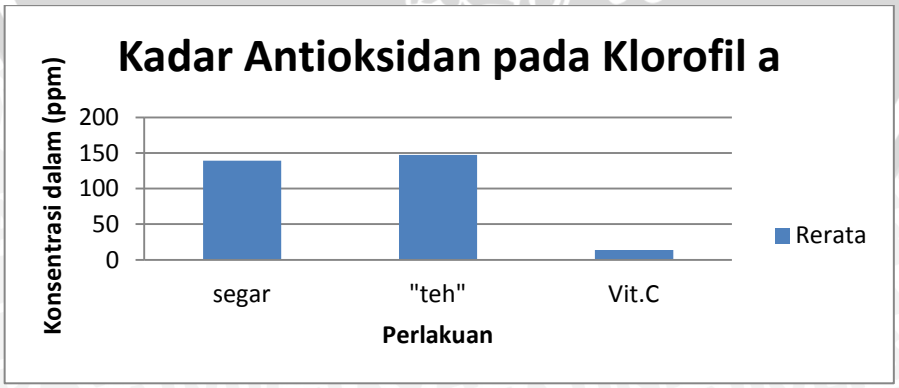
c.

Gambar 22. **a.** Hasil HPLC waktu tambat literatur Hegazi.*et.,al* (1998).
b. Hasil HPLC waktu tambat sampel "teh" alga coklat
c. Hasil HPLC waktu tambat sampel segar alga coklat

4.2.6 Pengukuran Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH

Molyneux (2004) menyatakan bahwa metode uji aktivitas antioksidan dengan DPPH merupakan yang metode yang paling banyak digunakan. DPPH (*diphenylpicrylhydrazyl*) merupakan senyawa radikal bebas yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol. Pengujian kuantitatif metode DPPH dilakukan dengan cara menghitung nilai persen inhibisi dan dilanjutkan dengan perhitungan nilai IC_{50}. Persen inhibisi adalah nilai penghambatan radikal bebas sedangkan IC_{50} atau *Inhibitor Concentration* 50% menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Antioksidan pembanding pada penelitian ini menggunakan vitamin C dengan nilai IC_{50} 13,676 ppm, semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Perhitungan persen inbibisi IC_{50} untuk sampel segar didapatkan rata-rata nilai IC_{50} pada sampel segar 138,968 ppm sedangkan perhitungan IC_{50} untuk sampel “teh” didapatkan nilai rata-rata IC_{50} sebesar 147,484 ppm, bahwa aktivitas antioksidan pada perlakuan segar dan “teh” tidak ada perbedaan. Telah dibuktikan dengan menggunakan uji T. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Merdekawati dan Susanto (2009) hasil aktivitas antioksidan pigmen klorofil a sebesar (350,63±0,03 ppm). Aktivitas antioksidan pigmen klorofil a segar dan “teh” yang didapat masih tergolong sedang. Diperjelas oleh Zuhra *et al.,* (2008), senyawa antioksidan dikatagorikan 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). Nilai IC_{50} pada sampel segar lebih kecil jika dibandingkan dengan sampel “teh”. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Panjaitan (2008), kondisi ini kemungkinan karena presentase kandungan klorofil yang tinggi dan terbentuknya alomer serta epimer klorofil. Kenyataan ini terjadi karena dalam ekstrak kasar *Sargassum* sp.

banyak terkandung pigmen klorofil dan turunanya serta karotenoid dan senyawa non pigmen lainya (Merdekawati, 2009). Sedangkan untuk sampel “teh” yang memiliki nilai IC_{50} lebih tinggi dari pada sampel segar diduga telah terjadi fotodegradasi karena perlakuan pengeringan yang menyebabkan terjadinya perubahan pola spektra ke arah yang lebih pendek dan diakibatkan adanya perlakuan basa. Ditambahkan oleh Smith (2006), melaporkan bahwa cahaya merupakan salah satu faktor degradasi oksidatif penyebab kerusakan pigmen. Secara keseluruhan nilai IC_{50} pigmen klorofil a segar dan “teh” masih cukup tinggi dari pada nilai IC_{50} vitamin C sebagai kontrol pembanding dalam penelitian ini. Pigmen sangat berpotensi sebagai antioksidan, meskipun sifatnya kurang stabil dan mudah terdegradasi apabila terkena cahaya ataupun oksigen sehingga mempengaruhi aktivitas antioksidanya (Natalina *et al.,* 2008). Menurut Blouis (1958), suatu senyawa antioksidan dikatakan kuat apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 200 ppm. Aktivitas antioksidan yang muncul pada klorofil dapat disebabkan oleh beberapa hal yaitu, klorofil mampu menangkap oksigen singlet dengan melakukan resonansi maupun vibrasi untuk membuang (disipasi) energi yang berlebihan ke lingkungan sekelilingnya (Yanishlieva, 2003). Data diagram batang nilai IC_{50} dapat dilihat pada Gambar 23.



Gambar 23. Nilai IC_{50} pigmen klorofil a

Mekanisme antioksidan klorofil ini dapat terjadi karena struktur utama klorofil dalam bentuk tetrapinol dan –ena terkonjugasi. Struktur ini mengakibatkan energi dapat distabilkan dengan baik, terutama melalui resonansi dalam struktur orbital pi yang overlap (Tugiman, 2007). Faktor lain diikuti dengan karotenoid yang mengalami isomerisasi dan terbentuknya sejumlah karatenoid yang memiliki gugus hidroksil, dimana gugus hidroksil ini akan menambah kepolaran karotenoid, dan gugus hidroksil ini berkaitan dengan kemampuan berikatan dengan radikal bebas (Limantara dan Rahayu, 2007). Klorofil juga dimungkinkan mampu menangkap radikal bebas yang ada dalam lingkungan sekitar, terutama klorofil termasuk senyawa yang lipofilik (Burrati *et al.,* 2001).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang Aktivitas Antioksidan Pigmen Klorofil a Alga Coklat *Sargasum cristaefolium* Segar dan “teh”, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan pada alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” memiliki aktivitas yang sama tidak ada perbedaan. Hasil ini didapatkan berdasarkan uji statistik dengan kandungan aktivitas antioksidan sampel segar 147,484 ppm dan sampel “teh” 138,968 ppm. Pigmen klorofil a dari alga coklat *Sargassum cristaefolium* perlakuan segar dan “teh” masih memiliki senyawa aktivitas antioksidan walaupun nilai IC_{50} cukup tinggi dan kandungan antioksidannya masuk dalam katagori sedang.

5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antioksidan pigmen klorofil a untuk diaplikasikan pada produk pangan lainya. Serta dalam melakukan penelitian ini perlu berhati-hati, teliti dan trampil untuk menjaga kualitas pigmen.

DAFTAR PUSTAKA

Adnan, M. 1997. **Teknik Kromatografi untuk Analisa Bahan Makanan**. Penerbit Andi. Yogyakarta.

Agusniar, A. dan D. Setiyani. 2011. **Pengeringan Jagung Dengan Metode Mixed-Adsorpstion Drying Menggunakan Zeolite Pada Unggun Terfluidisasi.** Universitas Diponegoro: Skripsi.

Ahmadsoffa. 2009. **Cerita Rumput Laut dari Alor**. http://Theahmadinstitute.com. Diaskes pada tanggal 12 Juli 2013, pukul 11.38 WIB.

Aini, N. 2007. **Structure – Antioxidant Activities Relationship Analysis Of Isoeugenol, Eugenol, Vanilin and their Derivatives**. *Indonesian Journal of Chemistry*. 7(1):61-66.

Andaka, G. 2008. **Optimasi Proses Ekstraksi Minyak Kacang Tanah Dengan Pelarut n-Heksana**. Jurnal Teknologi. Volume 2(1) :80-88.

Anis, E. 2008. **Pigmen Sebagai Zat Pewarna dan Antioksidan Alami**. UMM Press. Malang.

Arifin, S. 1994. **Petunjuk Teknis Pengolahan Teh**. Pusat Penelitian Teh. Pusat Penelitian Teh dan Kina. Gambung.

Aslan, L. M. 1998. **Rumput Laut**. Kanisius. Yogyakarta.

Atmadja, W. S., A. Kadi., Sulistijo., dan Rachmaniar. 1996. **Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia.** Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta.

_____, 2012. **Apa Rumput Laut Itu Sebenarnya?**. http:// www.coremap.or.id/print/article.php?id=264, diakses Tanggal 14 Februari 2012.

Ayuningtyas, G. M. 2013. **Karateristik Pigmen Klorofil a Pada "Teh" Alga Coklat (*Sargassum cristaefolium*) Kering**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Bayani, R. M. 2009. **Kanker Rongga Mulut Disebabkan oleh Kebiasaan Menyirih.** (Laporan Kasus). Skripsi. Medan : Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Sumatera Utara.

Besral, Meilianingsih L, Sahar J, 2007. **Pengaruh Minum Teh Terhadap Kejadian Anemia pada Usila di Kota Bandung**. Makara, Kesehatan, Vol. 11, No. 1: 38-43.

Blois, M.S. 1958. **Antioxidant Determinations by The Use of a Stable Free Radical**. Nature, 181, pp. 1199-1200.

Bogorad, D.L .1962. **Chlorophyll. In Physiology and Biochemistry of Algae**. (R. Lewin ed). Academic Press, New York :3-23.

Bonora, A., Pancaldi S., Gualandri, R., and Fasulo, M. 2000. **Carotenoid and Ultrasturucture Variations in Plastids of Arum italicum Miller Fruit During Maturation and Ripening. Ferrara**. Italy. Journal of Experimental Botany. 51:pp. 873-884.

Bhattacharya, K. R. dan Y. M. I. Swamy .1967. **Conditions of Drying Parboiled Paddy for Optimum Milling Quality**. Central Food Tecnological Research Institute, Mysore, India.

Bold, H.C dan Wayne. 1975. **Interoduction to the Algae: Structure and Reproduction**. Prentice Hall of India, New Delhi : xiv+706 hal.

Brandis, A. S., Salomon, Y., and A. Scherz, Bacteriochlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy, in B. Grimm, J. Porra, W. Rudiger., and H. Scheer, (Eds.), 2006, **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls, Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications, Advances in Photosynthesis and Respiration, Springer**, Dordrecht, 485-494.

Brriton, G., Liaaen J. S., and Pfander, H. 1995. **Carotenoids : Isolation and Analysis**. Birkhauser Verlag, Basel. Boston. Berlin, 328 pp.

Burrati, S., Pellegrini, N., Brenna, O. V., and Mannino, S. 2001. **Rapid Electrochemical Method for the Evaluation of the Antioxidant Power of some Lipophilic Food Extract**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49:5136-5141.

Campbell, N. A., Reece, J.B., dan Mitchell, L. G. 2002. **Biologi**. Penerjemah, Wasmen Manalu. Penerbit Erlangga. Jakarta. 472 Halaman. Hal 399.

Chan, C. 2004. **Analytical Method Validation and Instrument Perfomance Verification**. New Jersey : J Wiley.

Chang, R. dan W. Tikkanen. 1988. **The Top Fifty Industrial Chemicals**. Random House. New York.

Clark, J. 2007. **Kromatografi Lapis Tipis.** http://www.chem-is-try.org. Diakses tanggal 13 Mei 2014.

Christiana, R., A.B Susanto., dan Limantara, L. 2008. **Analisis Pigmen Ekstrak Aseton Rumput Laut *Udotea* sp*, Amphiora rigida,* dan *Turbinaria conoides*.** Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal.194-210.

Da Costa, J. F., Karwur, F. F., dan Limantara, L. 2007. **Fotoproteksi Betacaroten dan Lutein Terhadap Klorofil a dalam Aseton**. Prosiding Seminar Pigmen Nasional 2007 Back to Nature Dengan Pigmen Alami. Salatiga, 24 Agustus 2007.

_____, 2009. **Efek Betacaroten dan Agregasi Klorofil Pada Fotostabilitas Klorofil a dalam Pelarut Aseton**. Jurnal Natur Indonesia 11(2), April 2009:115-123. ISSN 1410-9379.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. **Farmakope Indonesia Edisi III**. Jakarta : Departemen Kesehatan RI, 772-773.

Firdaus, M., S. S. Karyono., dan M. Astawan. 2009. **Penapisan Fitokimia dan Identifikasi Ekstrak Rumput Laut Coklat *(Sargassum duplicatum)***. Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (Life Sciences), 21 : 1. (abstrak).

Firdhayani, I. R. 2010. **Solusi Sehat Bagi Penderita Kanker dan Diabetes**. Program Kreativitas Mahasiswa. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Fellows, P. 1990. **Food Processing Technology** : Principles and Practise. Ellis Horwood Limited. New York.

Fung, A., Hamid, N., Lu, J. 2013. **Fucoxanthin content and antioxidant properties of Undaria pinnatifida.** Journal Food Chemistry 136 (2013) 1055-1062.

Gaur, S., U. S. Shivhare, and J. Ahmed, 2006, **Degradation of Chlorophyll during processing of green Vegetables**, a Review, Stewart Postharvest Rev., **2:5**, 1-8.

Gordon, M. H. 1990. **The Mecanism of Antioxidant Action in Vitro**. in Sahidi, F and Mariam, N. 1995. Food Phenolies, Source Chemistry Effect Aplications. Technomic Publisher. Lancaster-Basel

Gross, J. 1987. **Pigments In Fruits. Academic**. Press Inc. London.

_____. 1991. **Pigments In Vegetables Chlorophylls And Carotenoids.** Library of Congress Catalog, ISBN 0-442-00657-8

Guenther, E. Diterjemahkan oleh S. Ketaren.1987. **Minyak Atsiri I**. Penerbit UI. Jakarta

Hanani, E., A. Mun'im., dan R, Sekarini. 2005. **Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia* sp**. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2(3):127-133

Handayani, T., Sutarno., dan D.S, Ahmad. 2004. **Analisis Komposisi Nutrisi Rumput Laut *Sargassum crassifolium* J. Agardh**. Biofarmasi 2 (2): 45-52, Agustus 2004, ISSN: 1693-2242.

Hanum, T. 2000. **Ekstraksi dan Stabilitas Zat Pewarna Alami dari Katul Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa* glutinosa).** Buletin Teknologi dan Industri Pangan.

Hellebust, J. A. 1970. **Light : Plants. In Kinne, O. (ed)**. Marine Ecology, Vol. 1. Part 1. Wiley Interscience. London. Pp. 125-158.

Hernani, R. M. 2005. **Tanaman berkhasiat Antioksidan**. Penebar Swadya, Jakarta.

Hegazi, M.M., Ruzafa A. P., Aimela L. and Candela M. E.1998. **Separation and Identification of Chlorophylls and carotenoids from Caulerpraprolifera, Jania rubens, and Padina pavonica by Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography**. Journal of Chromatography A. 829 (1-2): 153-159.

Hijaz, M.N. 2009. **Uji Aktivitas Antioksidan Karaginan Dalam Alga Merah Jenis *Eucheuma spinosum dan Gracilaria verrucosa*.** UIN. Malang.

Hikmah, M.N., Zuliyana. 2010. **Pembuatan Metil ester (Biodiesel) dari Minyak Dedal dan Metanol dengan Proses Esterifikasi dan Transesterifikasi**. Universitas Diponegoro. Semarang.

Huda, N. 2001. **Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis. GBC 911A menggunakan Pewarna Tratrazine CL 19140**. Jurnal Bidang Evaluasi dan Pengembangan Keselamatan Istalasi, P2TKN. Batan.

Hudson, B.J.F. 1990. **Food Antioxidant**. Elsevier Applied Science. London

Hutajulu, T. F., Subagia. 2008. **Proses Ekstraksi Zat Warna Hijau Klorofil Alami untuk Pangan dan Karateristiknya**. Balai Besar Industri Argo-Bogor. Jurnal Riset Industri Vol. 2 no.1. hal 44-45.

Indraswari, A. 2008. **Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L*) Menggunakan Metode Maserasi dengan Parameter Kadar Total Senaywa Fenolik dan Flavonoid**. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakartalsmadi, 1993.

Irawan, T.A. Bambang., 2010. **Peningkatan Mutu Minyak Nilam dengan Ekstraksi dan Destilasi Pada berbagai Komposisi Pelarut**. Magister Teknik kimia. Universitas Diponegoro. Semarang.

Jeffrey, S. W. 1961. **Paper Chromatographic Separation of Chlorophylls and Carotenoids from Marine Algae**. C. S. I. R. O. Marine Laboratory. Cronulla. Sydney. Australia.

_____. Mantoura, and S. W Wright. 1997. **Phytoplankton Pigments in Oceanography**. (Dalam Pangestuti R, L. Limantara, dan A. Suanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh**. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal 201-209.

Juneidi, W. 2004. **Budidaya rumput laut**. http://www.scribd.com diakses pada tanggal 20 Mei 2014.

Johson, E.L. and Steven S.R. 1987. **Basic Liquid chromatography**. Varian, California.

Kakitani, Y., R. S. Rondonuwu, T. Mizoguchi, Y. Watanabe, and Y. Koyama, 2003. **Energy Dissipation from The Qy State Following Singlet-singlet and Triplet-triplet Annihilation Reaction in The Cylindrical Aggregate and Its Reversible Dissosiation into The Piggy-Back Dimers***, J. Phys. Chem. B*, **107** , 14545-14555.

Khotimah, K., Darius, dan Sasmito B.B. 2013. **Uji aktivitas senyawa aktif alga coklat *(Sargassum filipendulla*) sebagai antioksidan pada minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Khuluq, A. D., S.B. Widjanoko dan E. S. Murtini. 2007. **Ekstraksi dan Stabilitas Betasianin Daun Darag (Alternatif dentata) Kajian Perbandingan Pelarut Air : Etabol dan Suhu Ekstraksi**. Jurnal Teknologi Pertanian. 8 (3) Hal: 169-178

Kosasih, 2004. **Peranan Antioksidan Pada Lanjut Usia**. Jakarta : Pusat Kajian Nasional Masalah Lanjut Usia, hal. 48-49, 56-59 press.

Kuncahyo, I., Sunardi. 2007. **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh *(Averrhua belimbi.L)* Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picryhidrazyl (DPPH)**. Seminar Nasional Teknologi. ISSN 1977-1978.

La Vecchia, C., E. Negri, S. Francheschi , B. D'Avanzo, P. Boyle. 1992. **Tea Consumption and Cancer Risk**. Nutr. Cancer, 17, 27 – 31.

Lenny, S. 2006. **Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp**. USU repository.

Limantara, L dan P. Rahayu. 2008. **Sains dan Teknologi Pigmen Alami**. **Prosiding** Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal: 2-42.

_____. 2006. **Buku Panduan Praktikum**. Widya Sari Press. Salatiga.

_____. 2007. **Mengapa Kita Butuh Makanan Tambahan / Food Suplemen?** http://pengobatan.wordpress.com/2007/04/1 4/mengapa-kita-butuh-makanan-tambahanfood- suplemen/ 6 Juli 2008.

Loo, T.G. 1983. **Penuntun Praktis Mengelola Teh dan Kopi**. PT. Kinta. Jakarta.

Lenny, S. 2006. **Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp**. USU Repository.

Maeda, H., T. Tsukui., T. Sashima., M. Hosokawa., dan K. Miyashita. 2008. **Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. Asia Pacific journal of clinical nutrition**. 17 Suppl (1) hal: 196-199.

Ma'roef, M. 2000. **Memacu Peningkatan Produksi Dan Konsumsi Teh di Era Globalisasi Dengan Pemanfaatan Teh Untuk Kesehatan.** Prosiding Seminar Sehari Teh Untuk Kesehatan. Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung. Bandung.

Maulida, D dan Naufal Z. 2010**. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) Dari Buah Tomat dengan Menggunakan Sovlent Campuran, N-Heksana, Aseton, dan Ethanol**. Skripsi Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro. Semarang.

Meenakshi, S., D. M. Gnanambigai., S. T. Mozhi., M. Arumugam and T. Balasubramanian. 2009. **Total Flavonoid and In Vitro Antioxidant Activity of Two Seaweed of Rameshwaram Coast**. Global Journal of Pharmacology, 3 (2) : 59-62.

Merdekawati, W., A.B Susanto., dan Leenawaty L. 2009. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Klorofil a dan ß-Karoten *Sargassum* sp.** Jurnal Kelautan Nasional Vol.2 Edisi Khusus Januari 2009.

Mercadate, A.Z. 2008. **Carotenoid in Food Source and Stability During Processing and Storage In Carmen S (ed) Food Chimical and Fungtional Properties.** Boca Raton CRC Press.

Misra, H., D. Mehta, B.K. Mehta, M. Soni., D.C. Jain. 2008. **Study of Extraction and HPTLC – UV Method for Estimation of Caffeine in Marketed Tea (Camellia sinensis) Granules**. International Journal of Green Pharmacy : 47-51.

Molyneux, P. 2004. **The use of the stable free radical diphenylpicrylhidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**. Songklanarin Journal of Science Technology. 26(2):211-219.

Muhammad, F. 2010. **Kajian Kandungan Metabolit Sekunder dari Alga coklat *Sargassum cristaefolium***. http://elfahrybima.blogspot.com.html. Diakses pada tanggal 23 Mei 2014.

Mursyidin, D.H., D.P. Perkasa, dan Prabowo. 2002. **Pemanfaatan Rumput Laut *Sargassum* sp. untuk Mengatasi Krisis Ekonomi, Pangan dan Zat Gizi Indonesia**. [Laporan Karya Tulis Ilmiah]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

Muthalib, A. 2009. **Klorofil dan Penyebaran di Perairan**. http://www.abdulmuthalib.co.cc/2009/06. Diakses pada tanggal 25 Maret 2014.

Natalina, E., Rahayu P, Sulistiowati, dan Limantara L. 2009. **Fotoproteksi Kurkumin terhadap B-Karoten pada Berbagai Nisbah Molar serta Aktivitas Antioksidanya.** Jurnal Natur Indonesia 12(1), Oktober 2009.

Narbuko, C., dan A. Achmadi H.A. 2010. Metodologi Penelitian. Bumi Aksara. Jakarta. Hml :44.

Nazaruddin, Fary B, Paimin. 1993. **Pembudidayaan dan Pengolahan Teh**. Penebar Swadaya. Jakarta.

Nollet, L. M. L., 2000. **Food Analysis by HPLC**. Marcell Dekker, Inc. New York.

Nurcahyanti, A. D. R dan K.H Timotius. 2007. **Fucoxantin Sebagai Anti Obesitas. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan**, Vol. ZVIII No. 2. Hal : 134-141.

Nurdiana, D. N dan Limantara, 2008. **Ragam Pigmen Rumput Laut Coklat : Potensi dan Aplikasi**. Departemen Biologi, Universitas Airlangga. Surabaya.

Pangestuti, R., L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh**. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal : 201-209.

Pambudi, J. 2000. **Potensi Teh Sebagai Sumber Zat Gizi dan Perannya Dalam Kesehatan**. Prosiding Seminar Sehari Teh Untuk Kesehatan. Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung. Bandung 17 Oktober 2000.

Pomeranz, Y and Meloan CE. 1994. **Food Anlysis Theory and Practise.** Van Nostrand Reinhold Company. New York.

Primanita, A. Y. 2010. **Proses Produksi Teh Hitam**. Program Studi Diploma Tiga Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

Purwanti, E. 2009. **Profil Komponen Bioaktif Tanaman Kava-Kada *(Piper methysticumfost, F)* dengan Pelarut Etanol dan Metanol**. Naskah Publikasi. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.

Putra, S . E. 2006. **Alga Laut sebagai Biotarget Industri**. http://www.chem-is-try.org/?sect=fokus&ext=24.html diakses tanggal 29 April 2014 pukul 20:02.

Putranti I. R. 2013. **Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut Sargassum duplicatum dan Turbinaria ornata dari Jepara.** Thesis. Program Studi Magister Manajemen Sumberdaya Pantai. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro. Semarang.

Putri, K. H. 2011. **Pemanfaatan Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh**. Teknologi Hasil Petanian IPB. Bogor.Rahman, 2009.

Rahmawan, L. S. 2008. **Isolasi dan Identivikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru *(Eugenia uniflora L.)***. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.

Rahman, M.N. 2009. **Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Biotransformasi Kurmikum Oleh Mikrob Endofit Asal Kunyit**. IPB. Bogor.

Rahayuningtiyas, D. 2013. **Pengaruh Pemberian FPE (Fermented Plant Extract) Rebung Terhadap Berat Basah, Kadar Klorofil, Dan Kandungan Antioksidan Tanaman Sawi Hijau *(Brassica juncea L.)*.** Skripsi. IKIP PGRI Semarang. Program Studi Pendidikan Biologi. Semarang.

Robinson, T. 1995. **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**, alih bahasa oleh Kosasih Padmawinata. Bandung : ITB.

Rohman, A dan S. Riyanto. 2005. **Daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) secara *in vitro***. *Majalah Farmasi Indonesia*. 16(3):136-140.

Rohmatulloh dan Marimin. 2007. **Logika Fuzzy Dan Jaringan Syaraf Tiruan Untuk Peningkatan Mutu Teh Hitam**. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan 18 (2): 96-101.

Salisbury, F.B dan C.W. Ros. 1991. **Wadsworth Publishing Company**. Inc. Belmont, California.

Sastrohamidjoyo, H. 2007. **Kromatografi**. Penerbit : Liberty. Yogyakarta.

Savitrise, Nike .D dan Veronica, 2007. **Proses Produksi Dietil eter dengan Dehidrasi Etanol pada fase cair.** Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang.

Singarimbun, M dan Effendi, S. 1989. **Metode Penelitian Survei**. Jakarta : LP3ES.

Smith, J. 2006. **Annatto Extracts, Chemical and Technical Assessment**. CTA 2006, P. L-21.

Sholihah, H. M. 2010. **Uji Afrodisiaka Fraksi Larut Air Ekstrak Etanol 70 % Kuncup Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum (L.)* Merr. & Perry) Terhadap Lipido Tikus Jantan**. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhamadyah Surakarta. Surakarta.

Sulistyowati, H. 2003. **Struktur komunitas *seaweed* (rumput laut) di Pantai Pasir Putih Kabupaten Situbondo**. *Jurnal Ilmu Dasar* 4 (1): 58-61.

Suryaningrum, D., Wikanta, T., dan Kristiana, H. 2006. **Uji Aktivitas Antioksidan dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euchema cottonni***. Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan 1 (1) : 51-63.

Suparmi., Prasetyo, B., dan Limantara, L. 2007. **Fotodegradasi pixmen bixin dari biji kesumba (*Bixa orellana*) : potensi sebagai pewarna alami makanan**. Paper yang dipresentasikan pada seminar nasional pigmen “Back to Nature” dilaksanakan oleh Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga pada tanggal 24 Agustus 2007.

Susilowati, 2008. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Karotenoid dari Cabai Merah (*Capsicum annuum L*.).** Skripsi, Universitas Islam Negeri (UIN). Malang.Susilowati, 2008.

Susanto, A. 2008. **Kadar Klorofil Pada Berbagai Tanaman yang Berbeda Umur**. Skripsi Universitas Negeri Surabaya. Surabaya.

Suyitno, A. L. 2006. **Klorofil/Pigmen Fotosintesis. Jurusan Pendidikan Biologi**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.

Supirman, Kartikaningsih, H., Zaelani, K. 2013. **Pengaruh Perbedaan pH Perendaman Asam Jeruk Nipis (*Citrus auratifolia*) Dengan Pengeringan Sinar Matahari Terhadap Kualitas Kimia Teh Alga Coklat (*Sargassum Fillipendula*).** Jurnal Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Suyatma, 2009. **Diagram Warna Hunter (Kajian Pustaka)**. Jurnal Penelitian Ilmiah Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Page 8-9.

Soekarto, S. I. 1990. **Dasar-Dasar Pengawasan dan Standarisasi Mutu Pangan**. PAU Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Schelfan, L and Morris B. J.1983. **The Handbook of Solvent. D. Van Nostrand Comp**. Inc. New York.

Schaber, P. M., J.E. Hunt., R. Fries., and J. J. Katz. 1984. **Hight Perfomance Liquid Chromatograpic Study of the Chlorophyll Allomerization Reaction**, J. Chromatogr., 316, 25-41.

SNI. 1992. **Etil Asetat. Pusat Standarisasi Industri**. Departemen Perindustrian. Jakarta.

Stewart, S. **GBC 911 and 911 A UV-Visible Spectrophotometers Operation Manual, 3rd** edition, GBC Equipment Pty. Ltd., Australia, April, 1990.

Strain, H. H., Winston M. M., and G. Hardins. 1943. **Xanthophylls and Carotenes of Diatoms, Brown Algae, Dinoflagellates, and Sea-Anemones**. Carnegie institution of Washington. Division of Plant Biology. Stanford University. California.Tohir, 2013.

Terasaki, M., Hirose, A., Narayan, B., Baba, Y., Kawagoe, C., Yasui, H. 2009. **Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents**. Journal of Phycology, 45(4), 974–980.

Tugiman, Kusmiati, L., Rondonuwu, F., dan Limantara, L. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Pigmen Utama Ekstrak Kasar Sayur Lokal**. Magister Biologi. UKSW Salatiga. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami. 76-84.

Utami, T. S., Arbianti, R., Hermansyah, H., dan Reza, A. 2009. **Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpur (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA.** Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok. 6 hal.

Wang, B., Yu, Z., dan Hwang, L.S. 1995. **Quantitative Analyses of Chlorophylls and their derivatives by Thin Layer Chromathography**. Journal of Chenese Agricultural Chemical Society, 33 (5) 550-560.

Warsito, 2007. **Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder Dari Tanaman**. Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Waksmudzka-Hajnos, M., Sherma, J., dan Kowalska, T. 2008. **Thin layer chromatography for phytochemistry**. USA : CRC Press, 103-129.

Widianti, 2010. **Fraksinasi seluler.** Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institusi Pertanian Bogor. Bogor. Hal : 1-9.

Widodo, N. 2007. **Isolasi dan Karateristik Senyawa Alkoloid Dalam Jamur Tiram Putih. Tugas Akhir II**. Fakultas MIPA. Universitas Negeri Semarang.

Widyastuti, S. 2009. **Kadar Alginat Rumput Laut Yang Tumbuh Di Perairan Laut Lombok Yang Diekstrak Dengan Dua Metode Ekstraksi**. Fakultas Pertanian Universitas Mataram. Mataram.

Winarno, 1990. **Teknologi Pengolahan Rumput Laut**. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta

Winarsi, H. 2007. **Antioksidan Alami dan Radikal Bebas**. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Wikipedia, 2014. **Dietil Eter.** http://www.wikipedia.org. Diakses tanggal 20 April 2014 pukul 12.45 WIB.

Wiles, D. M. and Carlsson, D.J. 1987. ***Mc Graw-Hill Encyclopedia of Science & Technology***. New York: Mc Graw-Hill Book Company 13(6):337-379.

Yuslinda., E., Mukhtar, H dan Khairunnisa. 2012. **Penentuan Aktivitas Antioksidan Dari Beberapa Ekstrak Sayur-Sayuran Segar dan Dikukus Dengan Metode DPPH**. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau Pekan Baru. Scientia Vol. 2 No.1

Yunizal, 1999. **Teknologi Pengolahan Alginat. Badan Riset Kelautan dan Perikanan**. Jakarta.

_____. 2004, **Teknologi Pengolahan Alginat**. Pusat Riset Pengolahan Produk Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. BRKP, Jakarta, 66 hml.

Zuhra, C.F., Julianti, B.R. dan Herlince. S. 2010. **Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (Sauropus androgunus (L) Merr.),** Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hassanudin. Makasar. Jurnal Biologi Sumatera, Januari 2008, hml. 7-10 Vol.3, No.1 ISSN 1907-5537.

Lampiran 1. Prosedur Persiapan Sampel dan Pembuatan "Teh" Alga Coklat

Prosedur Persiapan Sampel

Prosedur persiapan sampel segar, sebagai berikut :

- *Sargassum cristaefolium* segar dicuci dengan air tawar mengalir dan disikat bagian daun untuk menghilangkan sisa pasir dan lendir yang menempel sehingga alga coklat menjadi bersih.
- Sampel ditiriskan untuk mengurangi resapan air pada bahan.
- Sampel dipilih dan diambil bagian daun lalu digunting kecil-kecil kurang lebih 1 cm.
- Ditimbang dengan timbangan digital dengan ketelitian 10^{-4} sebanyak 100 gram.
- Dihaluskan menggunakan mortar serta ditambahkan $CaCO_3$ sebanyak 10 gram untuk menetralkan alga coklat.
- Hasil sempel segar.

Prosedur persiapan sampel "teh", sebagai berikut :

- Disiapkan *Sargassum cristaefolium* segar yang sudah bersih, timbangan digital, bak, larutan air kapur, pH paper, dan beaker glass 1000 mL.
- Dibuat larutan air kapur dengan pH 11 dengan cara ditimbang kapur sirih 20 gram dan dilarutkan dalam air keran sebanyak 5000 mL (5 L), lalu diukur pH dengan pH paper.
- Alga coklat direndam kedalam larutan air kapur selama 4,5 jam.
- Dicuci kembali hingga bersih untuk menghilangkan bau kapur.
- Ditiriskan menggunakan keranjang dan dikeringkan diatas lembaran koran untuk mengurangi kandungan air pada bahan.

- Dikeringkan sampel menggunakan *microwave* dengan suhu 80^0C selama 30 menit sampai kadar airnya 5%.
- Digiling sampel menggunakan blender sampai menjadi serbuk teh.
- Serbuk teh dimasukkan ke dalam plastik klip dilapisi dengan aluminium foil. Tujuannya untuk menjaga kualitas pigmen teh.
- Teh alga coklat.

Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi (Pangestuti *et al.*, (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009)

Prosedur Ekstraksi

Prosedur ekstraksi dilakukan sebagai berikut:

- Disiapkan alga coklat segar yang sudah bersih, teh alga coklat, mortar dan alu, $CaCO_3$ beaker glass 1000 mL, gelas ukur 100 mL, pelarut aseton (p.a), metanol (p.a), kertas saring halus, aluminium foil, dan wrap.
- Ditimbang sampel segar dan teh alga coklat sebanyak 100 gram dengan timbangan digital dengan ketelitian 10^{-4} gram.
- Dihaluskan dengan menggunakan mortar dan diberi $CaCO_3$ sebanyak 10 gram sampel segar. Untuk sampel teh langsung ke perlakuan selanjutnya.
- Dimaserasi bertingkat dengan pelarut metanol : aseton ((7:3 v/v)) sebanyak 300 mL selama 24 jam, 12 jam, dan 6 jam.
- Disaring filtrat setiap pergantian waktu maserasi dengan menggunakan kertas saring halus.
- Filtrat hasil maserasi lalu di partisi.

Prosedur Fraksinasi

Prosedur fraksinasi, sebagai berikut:

- Disiapkan filtrat hasil maserasi, beaker glass 1000mL, erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 100 mL, pelarut dietil eter (p.a), saturasi garam, air ledeng, kertas saring halus, corong pisah, rotavapor, boto vial, aluminium foil, dan wrap.
- Filtrat partisi dengan pelarut dietil eter, saturasi garam, dan air ledeng dengan perbandingan 50 mL : 25 mL : 60 mL : 5 mL. Penambahan pelarut berurutan dimulai dari filtrat – dietil eter – saturasi garam – air ledeng.
- Diambil fase atas dan fase bawah dibuang. Fase atas ditampung ke dalam erlenmeyer 250 mL.
- Filtrat hasil dari partisi di *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 30^0C dan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang dan terbentuk kerak.
- Dipindahkan filtrat kerak ke dalam botol vial dengan cara ditetesi pelarut dietil eter ± 4mL.
- Dikeringkan kembali dengan gas nitrogen agar sampel kering sempurna.
- Ditutup botol vial dengan cling wrap dan dilapisi aluminium foil. Lalu disimpan di dalam *freezer*.
- Ekstrak pigmen kering.

Lampiran 3. Prosedur Kolom Kromatografi (Pangestuti *et al.,* (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009)

Prosedur kolom kromatografi untuk isolasi pigmen alga coklat, sebagai berikut:

- Disiapkan ekstrak pigmen kering, silika gel F-254, kolom kromatografi, *magnetic* dan *stirer*, pelarut heksan dan etil asetat (p.a), beaker glass 500 mL, gelas ukur 100 ml, pasir laut, corong kaca, dan tabung rekasi.
- Ditimbang fase diam silika gel ditimbang sebanyak 40 gram dengan timbangan digital dengan ketelitian 10^{-4} gram. Lalu dibuat fase gerak yaitu campuran pelarut heksan : etil asetat (8:2, v/v) ± 250 mL.
- Distirer fase diam dilarutkan dengan fase gerak. Proses stirer dilakukan selama 1 jam.
- Disiapkan kolom kromatografi dengan cara diisi fase gerak sedikit lalu dimasukkan kapas tipis yang dibentuk bulat ke dalam kolom. Kemudian ditambahkan fase gerak sampai setengah kolom.
- Fase diam yang telah distirer dimasukkan perlahan ke dalam kolom dengan bantuan corong kaca dialirkan melalui dinding kolom. Selama memasukkan fase diam, kolom diketuk-ketuk agar tidak terdapat gelembung udara.
- Ditunggu 24 jam untuk melihat ada tidaknya keretakan pada kolom.
- Ditambahkan pasir laut sebanyak 2 gram.
- Dimasukkan ekstrak pigmen kering yang dilarutkan lebih dulu dengan fase gerak 10 mL (heksan : etil asetat) (8:2, v/v) ke dalam kolom.
- Dibuka kran kolom sambil terus ditambahkan fase gerak agar silika gel tidak mengering. Komposisi fase gerak antara lain : 8:2v/v, 7:3 v/v. 6:4 v/v dan 5:5 v/v.

- Ditampung fraksi di dalam tabung reaksi sesuai warnanya. Lalu dimasukkan ke dalam botol vial sesuai warnanya dan dikeringkan dengan gas nitrogen.
- Didapat isolat pigmen murni,

Lampiran 4. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti *et al.,* 2008)

Prosedur kromatografi lapis tipis, sebagai berikut:

- Disiapkan Plat KLT, fase gerak dengan pelarut heksan : aseton, pensil 2B, penggaris, gunting, beaker glass 50 mL, gelas ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, mikropipet, dan plastik wrap.
- Dibuat garis pada plat yang berukuran 1 cm x 5 cm dimana 1 cm pada bagian bawah dan 0,5 cm di bagian atas.
- Ekstrak pigmen kering dilarutkan dengan 1 mL aseton.
- Ditotolkan ektrak pigmen cair dengan bantuan mikropipet pada garis bawah dan ditunggu sampai kering.
- Dimasukkan ke dalam beaker glas berisi fase gerak berupa heksan : aseton (7:3, v/v) sebanyak 4 mL, lalu ditutup dengan plastik wrap dan ditunggu sampai pelarut mencapai batas atas.
- Dihitung nilai Rf warna pada plat KLT.

Lampiran 5. Prosedur Analisa Spektrofotometer UV-Vis dan Analisa HPLC

Prosedur Analisa Spektrofotometer UV-Vis (Indra, 2012)

Prosedur analisa spektrofotometer UV-Vis, sebagai berikut :

- Disiapkan ekstrak pigmen kering segar dan teh hasil dari pemurnian KLT.
- Diencerkan pigmen kering dengan aseton (p.a) ± 3mL.
- Dimasukkan larutan pigmen murni ke dalam beaker glass yang berisi aseton (p.a) 50 mL menggunakan mikropipet sesuai absorbansi yang diinginkan.
- Dituang ke dalam kuvet ± 3mL lalu dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Prosedur Analisa High Pressuere Liquid Chromatography (Fung *et al.,* 2009)

- Disiapkan ekstrak pigmen kasar
- Dilarutkan dalam 1,5 mL fase gerak 100 % metanol
- Sebanyak 10 µl larutan pigmen diinjeksikan ke KCKT dengan fase diamnya adalah *chromolith column* dengan fase gerak 100% metanol dan laju air 1 mL/menit dengan suhu 30^0 C
- Dianalisis pada panjang gelombang 430 nm

Lampiran 6. Prosedur Pembuatan Larutan, Fase Diam, Larutan Garam Grosok dan Fase Diam Silica Gel

Larutan Ekstraksi

Metanol : aseton (7:3, v/v) dalam 300 mL

- Metanol = $\frac{7}{10} x300\ ml = 210\ mL$
- Aseton = $\frac{3}{10} x300\ ml = 90\ mL$

Larutan Kolom Fase Gerak

- Heksan : Etil Asetat (8:2, v/v) dalam 10 mL

  Heksan = $\frac{8}{10} x10\ ml = 8\ mL$

  Etil asetat = $\frac{2}{10} x10\ ml = 2\ mL$

- Heksan : Etil Asetat (8:2, v/v) dalam 250 mL

  Heksan = $\frac{8}{10} x250\ ml = 200\ mL$

  Etil asetat = $\frac{2}{10} x250\ ml = 50\ mL$

- Heksan : Etil Asetat (7:3, v/v) dalam 200 mL

  Heksan = $\frac{7}{10} x200\ ml = 140\ mL$

  Etil asetat = $\frac{3}{10} x200\ ml = 60\ mL$

- Heksan : Etil Asetat (6:4, v/v) dalam 200 mL

  Heksan = $\frac{6}{10} x200\ ml = 120\ mL$

  Etil asetat = $\frac{4}{10} x200\ ml = 80\ ml$

- Heksan : Etil Asetat (5:5, v/v) dalam 200 ml

  Heksan = $\frac{5}{10} x200\ ml = 100\ ml$

  Etil asetat = $\frac{5}{10} x200\ ml = 100\ ml$

Fase Diam Silica Gel

- Serbuk silica gel ditimbang sebanyak 40 gram
- Dimasukkan ke dalam beaker glass
- Dilarutkan silica gel dengan pelarut fase gerak 250 mL
- Distirer selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm

Larutan KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Heksan : Aseton (7 : 3 v/v) dalam 5 ml

- Heksan $= \frac{7}{10}\ x\ 5\ ml = 3{,}5\ ml$
- Aseton $= \frac{3}{10}\ x\ 5\ ml = 1{,}5\ ml$

Larutan Saturasi Garam Grosok

- Disiapkan Garam grosok 300 gram dan botol aqua 1L
- Dilarutkan dengan air ledeng 600 mL
- Disaring dengan kapas
- Disaring dengan kertas saring kasar
- Disaring dengan kertas saring halus
- Larutan saturasi garam dapur

Lampiran 7. Data absorbansi Alga coklat segar dan "teh"

Alga Coklat	Perlakuan	Absorbansi
Sargassum cristefolium	Segar	0,314
	"teh"	0,417

Lampiran 8. Kadar Klorofil a

Alga Coklat	Perlakuan	Kandungan klorofil a
Sargassum cristaefolim	Segar	0,0036 mLg
	"teh"	0,0048 mLg

Lampiran 9. Data Rendemen

Alga Coklat	Perlakuan	Gram sampel	% Rendemen
Sargassum cristaefolium	Segar	100 gram	0,0030
	"teh"	100 gram	0,0029

Lampiran 10. Perhitungan Kadar Klorofil a

Hukum *Lambert-Beer*, yaitu:

A = εbc

Keterangan: A= absorbansi

ε= absorptifitas molar (Molar extinction coefficient)

b= lebar bagian dalam kuvet

c= konsentransi (molar)

Perlakuan segar :

Absorbansi klorofil a 0,314

A =εbc

$C = \frac{A}{\varepsilon \text{ x b}}$

$C = \frac{0{,}314}{88{,}15\ g^{-1}\ cm^{-1}\ x\ 1\ cm}$

$C = \frac{0{,}314}{88{,}15\ g^{-1}}$

C = 0,0036 *mLg*

Perlakuan "teh"

Absorbansi 0,417

A=εbc

A =εbc

C $= \frac{A}{\varepsilon \text{ x b}}$

C $= \frac{0{,}417}{88{,}15\ g^{-1}\ cm^{-1}\ x\ 1\ cm}$

C $= \frac{0{,}417}{88{,}15\ g^{-1}}$

C = 0,0048 *mLg*

Lampiran 11. Perhitungan Kadar Rendemen

Rendemen $= \frac{Berat\ akhir}{Berat\ awal}$ x100%

Segar $= \frac{0{,}30\ \ gram}{100\ gram}$ X100%

= 0,0030 %

"teh" $= \frac{0{,}29\ gram}{100\ gram}$ X100%

= 0,0029 %

Rata-rata berat rendamen = $\frac{0{,}0030+0{,}0029}{2}$ = 0, 00295 %

Lampiran 12. Foto Pengolahan Teh

a.

b.

c.

d.

e.

f.

g.

h.

i.

j.

k.

l.

m.

Keterangan :

a. Proses pencucian alga coklat *Sargassum cristaefolium*
b. Proses pemotongan alga coklat *Sargassum cristaefolium*
c. Proses diangin-anginkan setelah di *thawing*
d. Proses penimbangan alga coklat 100 gram
e. Proses sebelum di tumbuk menggunakan mortar
f. Proses penimbangan $CaCO_3$
g. Proses alga coklat ditambah $CaCO_3$
h. Proses pembuatan larutan kapur
i. Proses perendaman alga coklat
j. Proses pengukuran pH larutan kapur
k. Proses Pengeringan alga oklat dalam *microwave*
l. Proses pengambilan alga coklat yang sudah kering
m. Hasil teh kering

Lampiran 13. Foto Proses Ekstraksi

a.

b.

c.

d.

e.

f.

Keterangan :

a. Sampel Alga Coklat
b. Proses Pembuatan Larutan Ekstraksi
c. Proses Masrasi
d. Penyaringan Filtrat Sampel Segar
e. Penyaringan Filtrat Sampel “Teh”
f. Pengukuran Filtrat Hasil Masrasi

Lampiran 14. Foto Proses Partisi, Evaporator dan Gas N_2

a.

b.

c.

d.

e.

Keterangan :

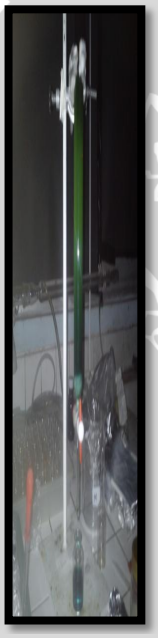
a. Proses Fraksinasi
b. Penuangan Larutan Dietil eter
c. Hasil Fase Atas
d. Proses *Rotary Evaporator Vaccum*
e. Proses Pengeringan menggunakan Gas N_2

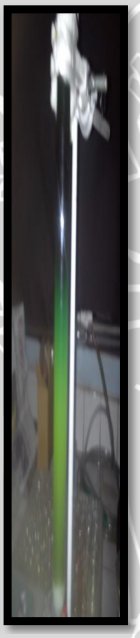
Lampiran 15. Foto Proses Kromatografi Kolom

a.

b.

c.





d.

e.

Keterangan :

- **a.** Penimbangan Silica Gel
- **b.** Proses pemasukan kapas ke dasar kolom
- **c.** Proses Silica Gel dibiarkan selama 24 jam
- **d.** Pergerakan Pigmen dalam kromatografi kolom
- **e.** Pigmen klorofil a hasil isolasi kromatografi kolom

Lampiran 16. Proses Identifikasi Pigmen Klorofil a

a. **b.** **c.** **d.**

Keterangan :

- **a.** Proses totol sampel menggunakan mikro pipet
- **b.** Hasil totol pada plat KLT
- **c.** Proses pergerakan pigmen menggunakan KLT
- **d.** Hasil identifikasi dengan KLT

Lampiran 17. Hasil Analisa Klorofil a segar dan "teh" menggunakan High Pressuere Liquid Chromatography (HPLC)

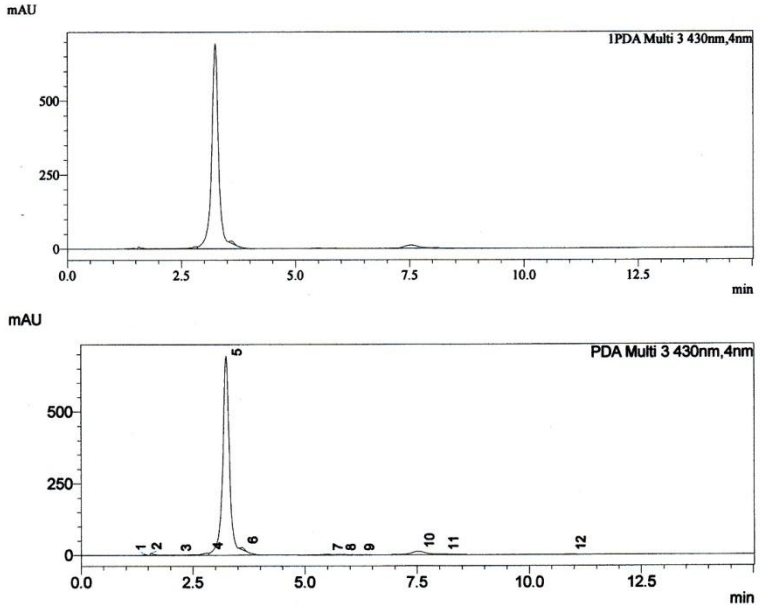
5/12/2014 3:05:01 PM Page 1 / 1

SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: Chlor_a 1.5 mL 10uL 100 MeOH 30 C (12052014)		
Sample ID	: 1		
Data Filename	: Chlor_a 1.5 mL 10uL 100 MeOH 30 C (12052014).lcd		
Method Filename	: cek B 100% MeOH (19032014).lcm		
Batch Filename	: batch 1.lcb		
Vial #	: 1-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 5/12/2014 2:31:38 PM	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 5/12/2014 2:46:41 PM	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>



Peak Table

PDA Ch3 430nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	1.456	16718	2918	0.205	0.396
2	1.565	52707	7280	0.648	0.989
3	2.098	12481	880	0.153	0.120
4	2.808	108952	7284	1.339	0.990
5	3.242	7531025	693769	92.544	94.260
6	3.586	45515	7404	0.559	1.006
7	5.486	33332	1764	0.410	0.240
8	5.772	23621	1335	0.290	0.181
9	6.187	9547	475	0.117	0.065
10	7.531	251530	10660	3.091	1.448
11	8.066	42674	1858	0.524	0.252
12	10.903	9679	389	0.119	0.053
Total		8137781	736015	100.000	100.000

D:\LCMSMS\Data\Analisa Sampel\Hafid Cyndia FPIK UB\Chlor_a 1.5 mL 10uL 100 MeOH 30 C (12052014).lcd

a) HPLC Sampel Segar

6/6/2014 12:56:13 PM Page 1 / 1

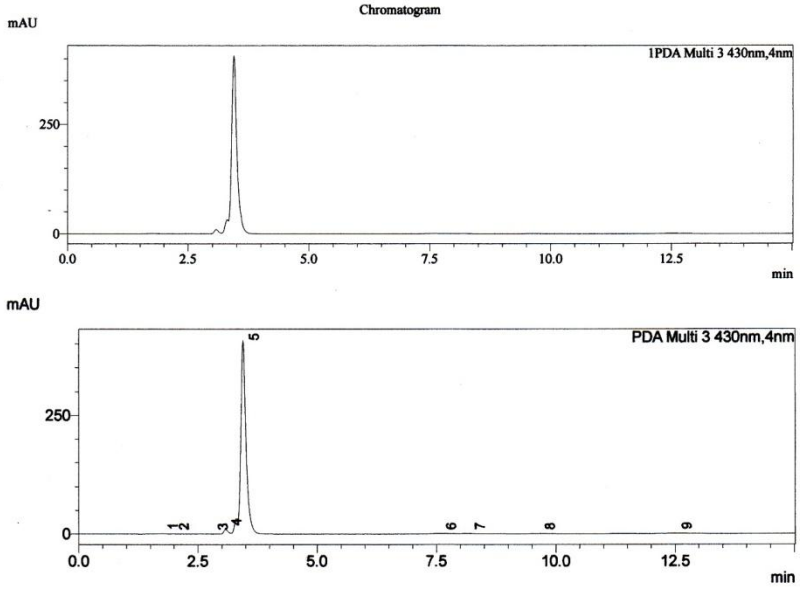
SHIMADZU LabSolutions **Analysis Report**

<Sample Information>

Sample Name	: klorofil 2 1.5 mL MeoH. 100% MeOH 30C 1uL(06062014)		
Sample ID	:		
Data Filename	: klorofil 2 1.5 mL MeoH1. 100% MeOH 30C 1uL(06062014).lcd		
Method Filename	: cek B 100% MeOH (19032014).lcm		
Batch Filename	:		
Vial #	: 1-32	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 1 uL		
Date Acquired	: 6/6/2014 10:37:43 AM	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 6/6/2014 10:52:46 AM	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

Chromatogram



Peak Table

PDA Ch3 430nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	1.751	10554	919	0.314	0.218
2	1.982	2286	371	0.068	0.088
3	2.796	1377	210	0.041	0.050
4	3.080	62609	9746	1.860	2.313
5	3.446	3226152	407580	95.844	96.710
6	7.583	16448	828	0.489	0.197
7	8.183	11498	652	0.342	0.155
8	9.649	9008	383	0.268	0.091
9	12.520	26109	755	0.776	0.179
Total		3366042	421445	100.000	100.000

D:\LCMSMS\Data\Analisa Sampel\Hafid Cyndia FPIK UB\klorofil 2 1.5 mL MeoH1. 100% MeOH 30C 1uL(06062014).lcd

b) HPLC Sampel "Teh"

Lampiran 18. Nilai IC_{50} segar dan "Teh" dan Grafik IC_{50}

Nilai IC_{50} Segar

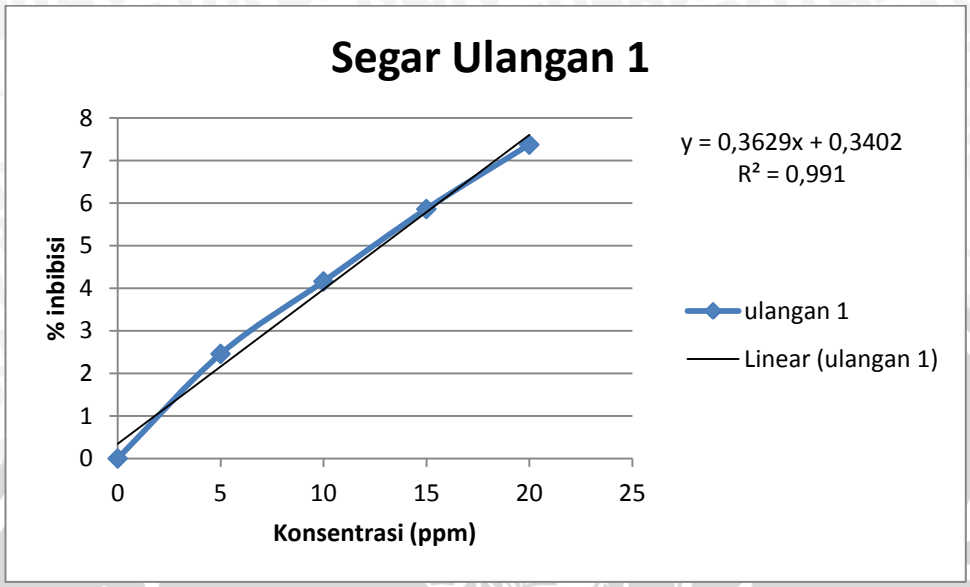
Konsentrasi (ppm)	Ulangan	m smpl	Absorbansi	%inbibisi	IC_{50} 1 (ppm)	IC_{50} 2 (ppm)	Rata-Rata IC50
0	1	0.2	0.529	0.000			
	2	0.2	0.529	0.000			
5	1	0.2	0.516	2.457			
	2	0.2	0.516	2.457			
10	1	0.2	0.507	4.159	136,841 ppm	141,131 ppm	138,986 ppm
	2	0.2	0.507	4.159			
15	1	0.2	0.498	5.860			
	2	0.2	0.499	5.671			
20	1	0.2	0.49	7.372			
	2	0.2	0.491	7.183			

Nilai IC_{50} "Teh"

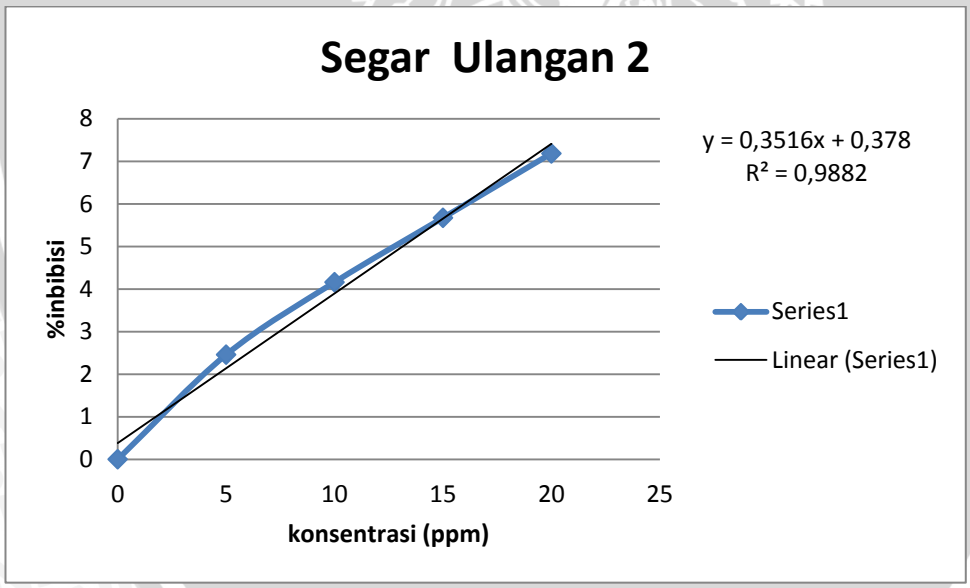
Konsentrasi (ppm)	Ulangan	m smpl	Absorbansi	%inbibisi	IC50 1 (ppm)	IC50 2 (ppm)	Rata-Rata IC50
0	1	0.2	0.529	0.000			
	2	0.2	0.529	0.000			
5	1	0.2	0.517	2.268			
	2	0.2	0.516	2.457			
10	1	0.2	0.508	3.970	149,262 ppm	145,707 ppm	147,484 ppm
	2	0.2	0.507	4.159			
15	1	0.2	0.501	5.293			
	2	0.2	0.5	5.482			
20	1	0.2	0.493	6.805			
	2	0.2	0.492	6.994			

Grafik Nilai IC_{50} Sampel Segar

Segar Ulangan 1

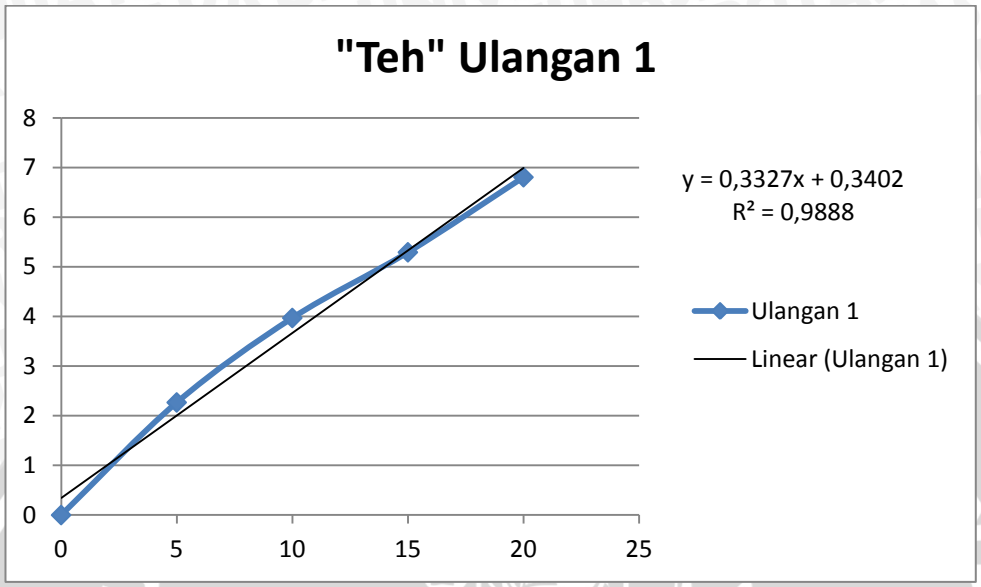


Segar Ulangan 2

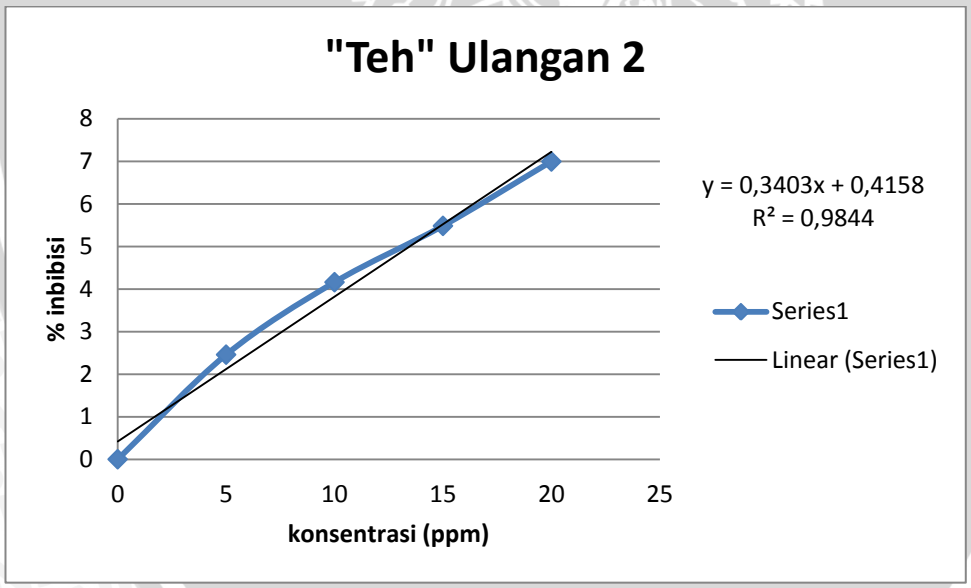


Grafik Nilai IC_{50} Sampel "Teh"

"Teh" Ulangan 1



"Teh" Ulangan 2



Lampiran 19. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* "Teh"

Tabung Ke-	Menit	Warna	Pelarut (Heksan: Etil asetat)	mL Pelarut	Jumlah Pelarut Tiap botol vial	Keterangan
1	10.37	Bening	8:2	250 mL	10 mL	
2	10.40	Kuning bening				
3	10.45	Kuning pekat				β – Karoten
4	10.49	Kuning pekat				β – Karoten
5	10.53	Kuning pekat				β – Karoten
6	10.58	Kuning pekat				β – Karoten
7	11.03	Kuning bening				
8	11.13	Kuning bening				
9	11.22	Kuning bening				
10	11.32	Kuning kehijauan				
11	11.43	Kuning kehijauan				
12	11.53	Hijau kehijauan	7:3	200 mL	10 mL	
13	11.57	Kuning kehijauan				
14	12.06	Kuning kehijauan				
15	12.12	Kuning kehijauan				
16	12.18	Kuning kehijauan				
17	12.23	Kuning kehijauan				
18	12.29	Kuning kehijauan				
19	12.34	Kuning kehijauan				
20	12.42	Kuning kehijauan				
21	12.48	Kuning kehijauan				
22	12.52	Kuning kehijauan				
23	12.59	Kuning kehijauan				
24	13.03	Bening				
25	13.09	Bening				
26	13.16	Bening				
27	13.24	Bening	6:4	200 mL	10 mL	
28	13.32	Bening				
29	13.39	Bening				
30	13.45	Bening				
31	13.55	Bening				
32	14.06	Bening				
33	14.15	Bening				
34	14.22	Bening				
35	14.40	Bening kekuningan				
36	14.56	Bening kekuningan				
37	15.06	Bening kekuningan				
38	15.12	Kuning kehitaman				
39	15.27	Kuning kehitaman				
40	15.47	Kuning kehitaman	5:5	200 mL	10 mL	
41	16.05	Kuning kehitaman				
42	16.21	Kuning kehitaman				
43	16.49	Kuning kehitaman				

44	16.54	Kuning kehitaman				
45	16.58	Biru				Klorofil
46	17.00	Biru pekat				Klorofil
47	17.03	Biru pekat				Klorofil
48	17.09	Biru pekat				Klorofil
49	17.15	Biru pekat				Klorofil
50	17.21	Biru pekat				Klorofil
51	17.27	Biru pekat				Klorofil
52	17.35	Biru pekat				Klorofil
53	17.42	Biru pekat				Klorofil
54	17.49	Biru kehijauan				
55	17.57	Biru kehijauan				
56	18.04	Hijau pekat				
57	18.11	Hijau pekat				
58	18.22	Hijau pekat				
59	18.31	Hijau pekat				
60	18.39	Hijau pekat				
61	18.48	Hijau pekat				
62	18.59	Hijau pekat				
63	19.08	Hijau pekat				
64	19.17	Hijau pekat				
65	19.27	Hijau pekat				
66	19.34	Hijau pekat				
67	19.43	Hijau pekat				
68	19.52	Hijau bening				
69	19.58	Hijau kekuningan				
70	20.04	Kuning pekat				
71	20.11	Orange				Fukosantin
72	20.16	Orange				Fukosantin
73	20.21	Orange				Fukosantin
74	20.26	Orange				Fukosantin
75	20.31	Orange				Fukosantin
76	20.36	Orange				
77	20.41	Orange				
78	20.46	Orange				
79	20.51	Orange				
80	20.58	Orange				
81	21.04	Orange				
82	21.14	Orange				
83	21.22	Orange				
84	21.29	Orange				
85	21.35	Kuning pekat				
86	21.43	Kuning pekat				
87	22.00	Kuning pekat				

Lampiran 20. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* Segar

Tabung Ke-	Menit	Warna	Pelarut (Heksan: Etil asetat)	mL Pelarut	Jumlah Pelarut Tiap botol vial	Keterangan
1	11.39	Kuning bening	8:2	250 mL	10 mL	
2	11.55	Kuning pekat				β – Karoten
3	12.13	Kuning pekat				β – Karoten
4	12.29	Kuning pekat				β – Karoten
5	12.57	Kuning bening				
6	13.26	Kuning bening				
7	13.52	Bening				
8	14.15	Bening				
9	14.32	Bening				
10	14.49	Hijau kecoklatan				
11	15.05	Hijau kecoklatan				
12	15.11	Hijau kecoklatan				
13	16.19	Hijau kecoklatan				
14	15.37	Hijau kecoklatan				
15	15.51	Abu-abu				
16	16.08	Abu-abu				
17	16.23	Hijau kekuningan	7:3	200 mL	10 mL	
18	16.38	Kuning bening				
19	16.54	Kuning bening				
20	17.09	Hijau bening				
21	17.26	Hijau bening				
22	17.32	Biru bening				Klorofil
23	17.41	Biru kehijauan				Klorofil
24	17.50	Biru kehijauan				Klorofil
25	17.56	Biru kehijauan				Klorofil
26	18.09	Hijau pekat				
27	18.15	Hijau pekat				
28	18.18	Hijau pekat				
29	18.26	Hijau pekat				
30	18.34	Hijau bening				
31	18.43	Hijau bening				
32	18.51	Hijau bening				
33	18.58	Hijau bening				
34	19.14	Hijau bening				
35	19.26	Kuning bening				
36	19.45	Kuning bening				
37	20.00	Kuning bening				
38	20.16	Kuning bening				
39	20.32	Kuning bening				
40	20.47	Kuning bening				
41	21.01	Kuning bening				
42	21.16	Kuning bening				
43	21.31	Kuning bening				

44	21.47	Kuning bening				
45	21.56	Kuning pekat	6:4	200 mL	10 mL	
46	22.03	Kuning pekat				
47	22.11	Kuning pekat				
48	22.18	Kuning pekat				
49	22.25	Kuning pekat				
50	22.32	Orange				Fukosantin
51	22.40	Orange				Fukosantin
52	22.48	Orange				Fukosantin
53	22.56	Orange				Fukosantin
54	23.03	Orange				Fukosantin
55	23.11	Orange				Fukosantin
56	23.18	Orange				Fukosantin
57	23.26	Orange				Fukosantin
58	23.36	Orange				Fukosantin
59	23.40	Orange	5:5	200 mL	10 mL	Fukosantin
60	23.46	Orange				Fukosantin
61	00.13	Orange				Fukosantin
62	00.25	Orange				Fukosantin
63	00.44	Kuning				
64	00.50	Kuning				

Lampiran 21. Analisa Uji T Kandungan Antioksidan Pigmen Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh"

Hipotesa pada penelitian ini meliputi:

H_0 : Diduga bahwa kandungan IC_{50} sampel *Sargassum cristaefolium* segar dan sampel *Sargassum cristaefolium* "teh" tidak terdapat perbedaan pengaruh terhadap kandungan antioksidannya.

H_1 : Diduga bahwa kandungan IC_{50} sampel *Sargassum cristaefolium* segar dan sampel *Sargassum cristaefolium* "teh terdapat perbedaan pengaruh terhadap kandungan antioksidannya.

Konsentrasi (ppm)	IC $_{50}$ Sampel Segar			IC_{50} Sampel "Teh"		
	X_1	X_1-$\bar{x}$ 1	$(X_1$- $\bar{x}$ 1$)^2$	X_2	X_2-$\bar{x}$ 2	$(X_2$-$\bar{x}$ 2$)^2$
0	0	-3,9318	15,4591	0	-3,7428	14,0086
	0	-3,9318	15,4591	0	-3,7428	14,0086
5	2,457	-1,4748	2,17504	2,268	-1,4748	2,17504
	2,457	-1,4748	2,17504	2,457	-1,2858	1,65328
10	4,159	0,2272	0,05162	3,97	0,2272	0,05162
	4,159	0,2272	0,05162	4,159	0,4162	0,17322
15	5,86	1,9282	3,71796	5,293	1,5502	2,40312
	5,671	1,7392	3,02482	5,482	1,7392	3,02482
20	7,372	3,4402	11,835	6,805	3,0622	9,37707
	7,183	3,2512	10,5703	6,994	3,2512	10,5703
Total	39,318	0	64,5195	37,428	0	57,4456
Rerata	3,9318			37,428		

Keterangan :

X_1 : Nilai IC_{50} Sampel segar alga coklat *Sargassum cristaefolium*

X_1-$\bar{x}$ 1 : Selisih nilai IC_{50} sampel segar dengan rata-rata nilai IC_{50} sampel segar

$(X_1 - \bar{x}1)^2$: Hasil kuadrat dari perhitungan $X_1 - \bar{x}1$

X_2 : Nilai IC_{50} Sampel "teh" alga coklat *Sargassum cristaefolium*

$X_2 - \bar{x}2$: Selisih nilai IC_{50} sampel "teh" dengan rata-rata nilai IC_{50} sampel "teh"

$(X_2 - \bar{x}2)^2$: hasil kuadrat dari perhitungan $X_2 - \bar{x}2$

1. Perhitungan Standart Defiasi (SD)

   Sampel Segar

   $SD_1 = \frac{\sqrt{\sum(x1-\bar{x}1)2}}{n-1}$

   $= \frac{\sqrt{64,5195}}{10-1}$

   = 21,506 (pembilang)

   $SD_2 = \frac{\sqrt{\sum(x2-\bar{x}2)2}}{n-1}$

   $= \frac{\sqrt{57,4456}}{10-1}$

   = 19,146 (penyebut)

2. Perhitungan F hitung

   F hitung = $\frac{S1^2}{S2^2}$

   $= \frac{(21,506)^2}{(19,146)^2}$

   $= \frac{462,508}{366,569}$

   = 1,261

   Dengan *df* = n_1 - *1*

   = 10-1=9

   dan = n_2 – *1*

   = 10-1=9

   F tabel 0,05 (9.9) = 3,18

F hitung < F tabel, maka H_0 diterima dan H_1 ditolak. H_0 diterima artinya bahwa dengan IC_{50} sampel segar dan "teh" tidak berpengaruh (sama) terhadap kandungan antioksidan.

3. Perhitungan T Hitung

$$T_{hitung} = \frac{x_1 - x_2}{SP\sqrt{(1/n1) + (1/n2)}}$$

dimana Perhitungan $SP = \sqrt{\frac{(n1-1)S1^2 + (n2-1)S2^2}{Df}}$ dengan $Df = n_1 + n_2 - 2$

$Df = n_1 + n_2 - 2$

$= 10 + 10 - 2$

$= 18$

$$SP = \sqrt{\frac{(n1-1)S1^2 + (n2-1)S2^2}{Df}}$$

$$= \sqrt{\frac{(10-1)(21{,}506)^2 + (10-1)(19{,}146)^2}{18}}$$

$$= \sqrt{\frac{(9)(462{,}54) + (9)(366{,}56)}{18}}$$

$$= \sqrt{\frac{(4162{,}86) + (3299{,}04)}{18}}$$

$$= \sqrt{\frac{7461{,}9}{18}}$$

$$= \sqrt{414.550}$$

$= 20{,}36$

maka $T_{hitung} = \frac{x_1 - x_2}{SP\sqrt{(1/n1) + (1/n2)}}$

$$= \frac{39{,}318 - 37{,}428}{20{,}36\sqrt{(1/10) + (1/10)}}$$

$$= \frac{1{,}89}{20{,}36\sqrt{(2/10)}}$$

$$= \frac{-1{,}89}{20{,}36\sqrt{0{,}44}}$$

$$= \frac{1,89}{18,958}$$

$$= 0,211$$

T tabel (n = 18) dengan selang kepercayaan 95% yaitu 2,10092

Kesimpulan : H_0 diterima dan H_1 ditolak, artinya bahwa IC_{50} sampel segar dan "teh" tidak terdapat perbedaan pengaruh terhadap kandungan antioksidan.