

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN β -KAROTEN ALGA COKELAT
***Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN “TEH”**

LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

Oleh :
ADIWIRA SANDRIKANATA
NIM. 105080303111002



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN β -KAROTEN ALGA COKELAT
***Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN “TEH”**

LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

Oleh :
ADIWIRA SANDRIKANATA
NIM. 105080303111002



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN β -KAROTEN ALGA COKELAT
***Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN “TEH”**

LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

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

Oleh :
ADIWIRA SANDRIKANATA
NIM. 105080303111002



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN β -KAROTEN ALGA COKELAT
***Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN “TEH”**

Oleh :

ADIWIRA SANDRIKANATA

NIM. 105080303111002

Telah dipertahankan didepan penguji

Pada tanggal 13 Agustus 2014

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

SK Dekan No. :

Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS

NIP. 19570119 198601 1 001

Tanggal :

Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.Si

NIP. 1960726 198903 2 004

Tanggal :

Dosen Pembimbing II,

Dr. Ir. Yahya, MP

NIP. 19630706 199003 1 003

Tanggal :

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Arning Wilujeng E., MS)

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini 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 ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 10 Agustus 2014

Mahasiswa

Adiwira Sandrikanata



UCAPAN TERIMA KASIH

Atas berkat rahmat dan karunia Allah SWT, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Aktivitas Antioksidan Pigmen β -karoten 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 sebagai Dosen Pembimbing I dan Dr. Ir. Yahya, MP sebagai Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini laporan ini
3. Keluarga terutama Bapak, Ibu, dan Adik-adik saya yang telah memberikan motivasi dan dukungan moril maupun spiritual kepada penulis.
4. Bu Iwin, Mbak Lisa, Hosnatus dan Anam yang selalu membantu penelitian kami. Dan teman-teman tim pigmen Hafid dan Intan yang selalu bersama-sama dari pagi sampai larut malam terima kasih atas semangat dan kerja keras kalian.
5. Teman-teman seperjuangan penelitian Tim Bunda Rani, Elda, Bias, Tacik, Alin. Desty, Mbok, Dessy, Tubagus dan Agnes yang meberikan masukan, informasi yang sangat membantu penulis.
6. Teman-teman THP 2010 yang selalu memberi support bagi penulis
7. Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikanya laporan skripsi ini, saya mengucapkan banyak terima kasih.

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



RINGKASAN

ADIWIRA SANDRIKANATA. AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN β -KAROTEN ALGA COKLAT *Sargassum cristaefolium* SEGAR DAN “TEH” (Di bawah bimbingan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS dan Dr. Ir. Yahya,MP)

Pigmen adalah zat warna alami yang diperoleh dari ekstraksi bahan alam, yang berasal dari tanaman maupun hewan. Pigmen utama yang terdapat pada jaringan tanaman adalah klorofil dan karotenoid (Anis, 2008). Salah satu pigmen yang diteliti pada *Sargassum cristaefolium* yaitu β -karoten. Menurut Fitriani (2011), β -karoten berfungsi sebagai antioksidan dan provitamin A. Antioksidan berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah proses oksidasi dalam sistem yang memiliki tekanan oksigen rendah. Senyawa β -karoten mempunyai aktivitas vitamin A yang tinggi Menurut Merdekawati dan Susanto (2009), sebagai antioksidan, karotenoid mampu melindungi sel dan organisme dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan, Fakultas Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium MRCCP Universitas Macung Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Muhammadiyah Malang. pada bulan Maret 2014 - Juni 2014

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksploratif-deskriptif. Dalam metode eksploratif ini β -karoten diidentifikasi dengan menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), Spektrofotometer UV-vis, analisa HPLC (Hight Performance Liquid Chromatography), analisa L,a,b dengan dibandingkan $^{\circ}$ hue dan uji antioksidan menggunakan metode DPPH. Dan untuk metode deskriptif menggunakan Uji T yang untuk mengetahui perbedaan antioksidan *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh”

Hasil identifikasi β -Karoten pada sampel alga coklat *Sargassum cristaefolium* didapatkan nilai Rf segar sebesar 0,8 dan “teh” sebesar 0,8. Pada pola spektra didapatkan sampel segar sebesar 452,60 nm dan “teh” sebesar 452 nm. Untuk analisa L,a,b dengan dibandingkan menggunakan $^{\circ}$ hue didapatkan sampel segar sebesar 60,8 dan “teh” sebesar 56,7. Untuk uji HPLC didapatkan waktuambat segar yaitu 11,276 menit dan “teh” 11,827 menit. Pada Uji DPPH dengan perlakuan segar dan “teh” yang ditunjukan dengan nilai IC₅₀ masing – masing sebesar 124,387 ppm dan 132,884 ppm.

Perlu berhati-hati dalam proses penanganan sampel dan saat melakukan penelitian untuk menjaga kualitas pigmen pigmen β -karoten agar tidak terjadi kerusakan pada pigmen.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur dan keagungan Tuhan Yang Maha Esa karena berkat ridho dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul Aktivitas Antioksidan Pigmen B-Karoten Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* Segar dan “Teh”. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS sebagai Dosen Pembimbing I dan Dr. Ir. Yahya, MP sebagai Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini laporan ini, serta kedua orang tua, teman-teman tim pigmen dan rekan-rekan mahasiswa THP 2010 Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya yang selalu berdoa dan memberikan motivasi kepada penulis.

Penulis menyadari atas keterbatasan ilmu dan pengetahuannya sehingga diharapkan adanya kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan tulisan ini. Penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak untuk pengembangan wawasan kita semua. Amin

Malang, 10 Agustus 2014

Penulis

DAFTAR ISI

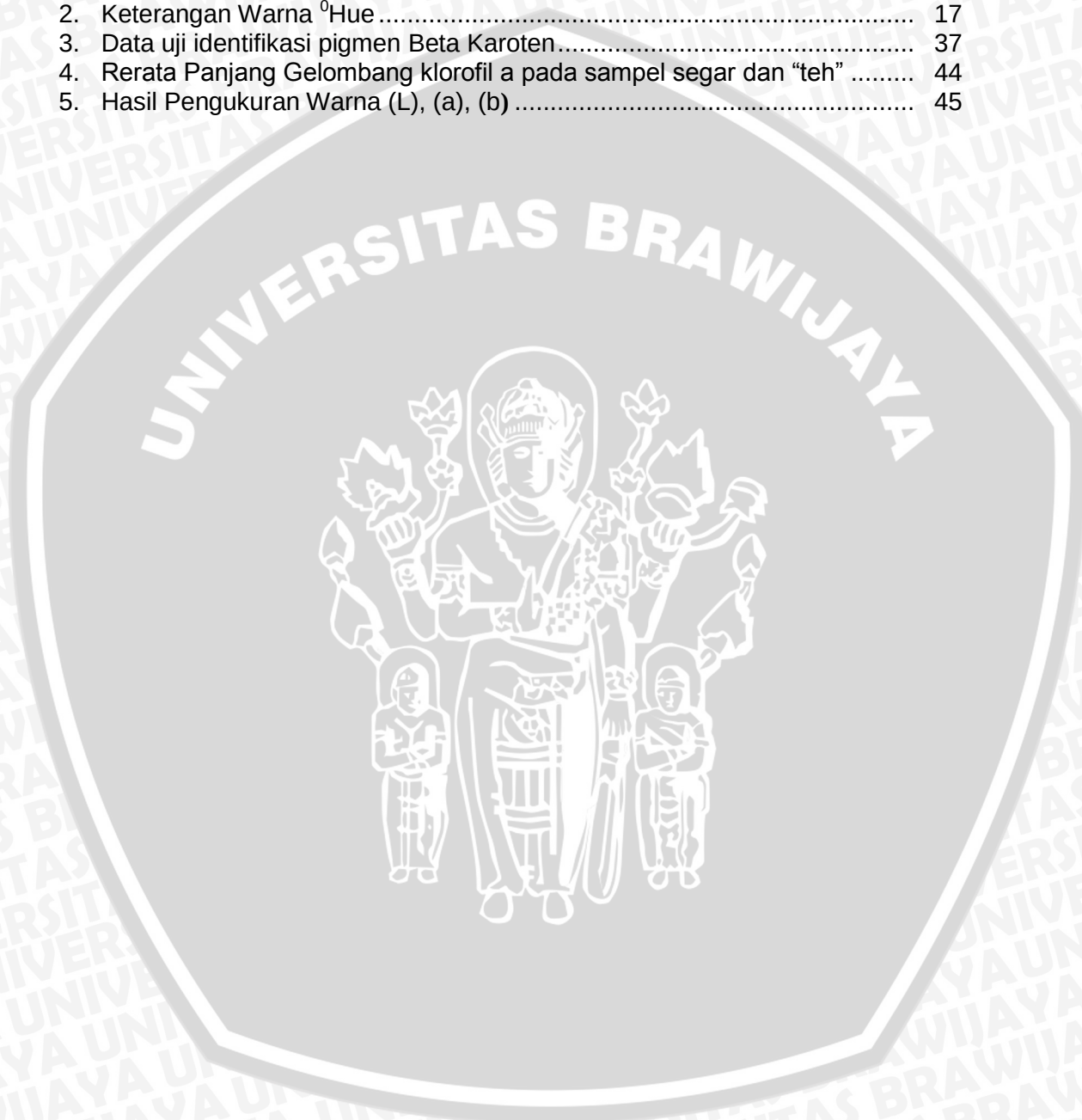
	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
LEMBAR UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian.....	3
1.5 Waktu dan Tempat.....	3
 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Sargassum cristaefolium</i>	5
2.2 Antioksidan.....	8
2.3 Beta Karoten.....	9
2.4 Ekstraksi Pigmen.....	11
2.5 Partisi (Fraksinasi).....	12
2.6 Kromatografi Kolom.....	13
2.7 Analisa Kuantitatif Beta Karoten.....	14
2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	14
2.7.2 Spektrofotometer UV-Vis.....	15
2.7.3 High Performens Liquid Chromatography (HPLC).....	16
2.7.4 Derajat Hue.....	17
 3. METODE PENELITIAN	
3.1. Bahan Penelitian.....	22
3.2 Alat Penelitian.....	22
3.3 Metode Penelitian.....	23
3.4 Persiapan Sampel.....	24
3.5 Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen.....	25
3.6 Isolasi Beta Karoten.....	28
3.7 Kromatografi Kolom Lapis Tipis (KLT).....	31
3.8 Prosedur Analisis Parameter Uji.....	45
3.8.1 Spektrofotometer UV-Vis.....	32
3.8.2 Analisa KCKT.....	33
3.8.3 Analisa DPPH.....	34
3.8.4 Analisa Intensitas Warna (L,a,b) dari nilai ⁰ Hue.....	36
 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Data Hasil Penelitian.....	37

4.2 Pembahasan	38
4.2.1 Isolasi Beta Karoten	38
4.2.2 Identifikasi Beta Karoten dengan KLT	39
4.2.3 Identifikasi Beta Karoten dengan Spektrofotometri UV-Vis.....	41
4.2.4 Analisa Warna (L,a,b)	45
4.2.5 Analisis High Pressuere Liquid Chromatography (HPLC).....	47
4.2.6 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Metode DPPH.....	49
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	60



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Senyawa Antioksidan di dalam sel	8
2. Keterangan Warna °Hue	17
3. Data uji identifikasi pigmen Beta Karoten.....	37
4. Rerata Panjang Gelombang klorofil a pada sampel segar dan “teh”	44
5. Hasil Pengukuran Warna (L), (a), (b)	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum cristaefolium</i>	6
2. Struktur klorofil a	10
3. Proses Kromatografi Kolom	14
4. Pemisahan Sampel	14
5. Spektrofotometer UV-VIS	16
6. Persiapan Awal Sampel	25
7. Ekstraksi dan Fraksinasi untuk Isolasi Pigmen	28
8. Isolasi beta karoten dengan kromatografi kolom	30
9. Identifikasi beta karoten dengan KLT	31
10. Prosedur Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis 1601	32
11. Analisa HPLC	34
12. Prosedur Analisa DPPH	35
13. Analisa Intensitas Warna	36
14. Isolasi Pigmen β -karoten	38
15. Hasil Isolasi β -karoten	39
16. Hasil KLT β -karoten	40
17. a. Pola Spektra Pigmen Beta Karoten Jeffrey <i>et al.</i> , (1997)	43
b. Pola Spektra Pigmen Beta Karoten Segar	43
c. Pola Spektra Pigmen Beta Karoten "Teh"	43
18. a. Hasil HPLC waktu tambat Literatur Hegazi (1998)	48
b. Hasil HPLC waktu tambat sampel Segar Alga Coklat	48
c. Hasil HPLC waktu tambat sampel "Teh" Alga Coklat	48
19. Nilai IC ₅₀ Pigmen Beta Karoten	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alir Penelitian	60
2. Prosedur persiapan sampel dan pembuatan "Teh" Alga coklat	61
3. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi.....	63
4. Prosedur Kolom Kromatografi.....	65
5. Prosedur pembuatan silica gel.....	66
6. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis	67
7. Prosedur Analisa Spektrofotometer dan Analisa HPLC.....	68
8. Prosedur Pembuatan Larutan, Fase Diam, Garam Grosok, Silica Gel	69
9. Perhitungan Kadar β -karoten.....	71
10. Data antioksidan beta karoten segar.....	72
11. Data antioksidan beta karoten "teh"	72
12. Grafik %Inhibisi Beta karoten (segar) ulangan 1 dan 2.....	73
13. Grafik %Inhibisi Beta karoten ("teh") ulangan 1 dan 2.....	74
14. Perhitungan IC_{50} Pigmen Beta Karoten.....	75
15. Data Hasil Uji T.....	77
16. Foto Pengolahan Teh	80
17. Foto Proses Ekstraksi.....	82
18. Foto Proses Partisi, Evaporator dan Gas N_2	83
19. Foto Proses Kromatografi Kolom	84
20. Proses Identifikasi Pigmen Beta Karoten	85
21. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat "Teh"	86
22. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat Segar	88

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut termasuk jenis alga, yang dikelompokkan menjadi empat kelas, yaitu alga hijau (*Chlorophyceae*), alga hijau biru (*Cyanophyceae*), alga coklat (*Phaeophyceae*) dan alga merah (*Rhodophyceae*) (Wresdiyati *et al.*, 2011). Jenis rumput laut coklat yang terdapat di perairan Indonesia ada 28 species yang berasal dari 6 genus yaitu *Sargassum*, *Turbinaria*, *Padina*, *Dictyota*, *Hormophysa*, dan *Hydroclathrus* (Chaidir, 2006).

Alga coklat *Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu marga *Sargassum* termasuk dalam kelas *Phaeophyceae*. Ada 150 jenis marga *Sargassum* yang dijumpai di daerah perairan tropis, subtropis dan daerah bermusim dingin. Habitat alga *Sargassum* tumbuh diperairan pada kedalaman 0,5–10 m, ada arus dan ombak. Pertumbuhan alga ini sebagai makro alga bentik melekat pada substrat dasar perairan. Di daerah tubir tumbuh membentuk rumpun besar, panjang thalli utama mencapai 0,5-3 m dengan untaian cabang thalli terdapat kantong udara (bladder), selalu muncul di permukaan air (Fahry, 2010).

Pada umumnya, teh dibuat dari pucuk (daun muda) yang melalui proses pengolahan tertentu. Selama ini bahan dasar teh berasal dari daun teh (*Camelia sinensis*). Dengan bergulirnya waktu, saat ini dimunculkan teh yang dibuat bukan dari daun teh melainkan dari alga coklat jenis *Sargassum* sp. Teh rumput laut coklat *Sargassum* sp memiliki kandungan bahan alginat, iodine dan guluronat yang dapat membuang zat-zat sisa dalam tubuh, seperti lemak dan sel-sel mati akibat radikal bebas (Firdhayani, 2010). Menurut Putri (2011), didalam *Sargassum* sp terkandung senyawa-senyawa aktif seperti steroida, alkaloida,

fenol, dan triterpenoid yang dapat menjadikan *Sargassum sp* sebagai minuman sejenis *slimming tea*.

Pigmen adalah zat warna alami yang diperoleh dari ekstraksi bahan alam, yang berasal dari tanaman maupun hewan. Pigmen utama yang terdapat pada jaringan tanaman adalah klorofil dan karotenoid (Anis, 2008). Salah satu pigmen yang diteliti pada *Sargassum cristaefolium* yaitu β -karoten. Menurut Fitriani (2011), β -karoten berfungsi sebagai antioksidan dan provitamin A. Antioksidan berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah proses oksidasi dalam sistem yang memiliki tekanan oksigen rendah. Senyawa β -karoten mempunyai aktivitas vitamin A yang tinggi. Menurut Merdekawati dan Susanto (2009), sebagai antioksidan, karotenoid mampu melindungi sel dan organisme dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Penghambatan radikal bebas oleh karotenoid terutama dilakukan oleh β -karoten. Ditambahkan oleh Hariyani (2012), beta karoten selain mampu melawan radikal bebas juga berfungsi sebagai anti penuaan dan anti kanker, serta dapat membantu meningkatkan kekebalan tubuh. Oleh karena itu beta karoten telah banyak digunakan sebagai bagian dari pengobatan maupun terapi. Penelitian mengenai aktivitas antioksidan beta karoten selain dilakukan oleh Merdekawati dan Susanto (2009), juga telah diteliti oleh Leenawaty Limantara (2009) yang menggunakan sampel *Sargassum sp*. Namun penelitian mengenai aktivitas antioksidan beta karoten pada alga coklat *Sargassum cristaefolium* belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, peneliti untuk menggali lebih dalam mengenai aktivitas antioksidan beta karoten pada *Sargassum cristaefolium*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Apakah terdapat perbedaan aktivitas antioksidan β -karoten pada *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” rumput laut ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan β -karoten pada *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” rumput laut.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari hasil penelitian yang didapatkan adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan pigmen β -karoten *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” rumput laut sehingga untuk kedepannya dapat memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga dan institusi untuk memanfaatkan *Sargassum cristaefolium* sebagai salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan, Fakultas Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium MRCPP Universitas Machung Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Muhamadiyah Malang pada bulan Maret 2014 - Juni 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Sargassum cristaefolium*

Rumput laut termasuk jenis alga, yang dikelompokkan menjadi empat kelas, yaitu alga hijau (*Chlorophyceae*), alga hijau biru (*Cyanophyceae*), alga coklat (*Phaeophyceae*) dan alga merah (*Rhodophyceae*) (Wresdiyati *et al.*, 2011). Jenis rumput laut coklat yang terdapat di perairan Indonesia ada 28 species yang berasal dari 6 genus yaitu *Sargassum*, *Turbinaria*, *Padina*, *Dictyota*, *Hormophysa*, dan *Hydroclathrus* (Chaidir, 2006).

Alga coklat *Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu marga *Sargassum* termasuk dalam kelas *Phaeophyceae*. Ada 150 jenis marga *Sargassum* yang dijumpai di daerah perairan tropis, subtropis dan daerah bermusim dingin. Habitat alga *Sargassum* tumbuh diperairan pada kedalaman 0,5–10 m, ada arus dan ombak. Pertumbuhan alga ini sebagai makro alga bentik melekat pada substrat dasar perairan. Di daerah tubir tumbuh membentuk rumpun besar, panjang thalli utama mencapai 0,5-3 m dengan untaian cabang thalli terdapat kantong udara (bladder), selalu muncul di permukaan air (Fahry, 2010). *Sargassum cristaefolium* dapat dilihat pada Gambar 1. Klasifikasi *Sargassum cristaefolium* menurut C. Agardh (1820) dalam Guiry (2013) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Chromista
Phylum	: Ochrophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Famili	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>Sargassum cristaefolium</i> C. Argadh



Gambar 1. *Sargassum cristaefolium*

Ciri-ciri dari *Sargassum cristaefolium* adalah thalli bulat pada batang utama dan agak gepeng pada percabangan, permukaan halus atau licin, percabangan dichotomous dengan daun bulat lonjong, pinggir bergerigi, tebal dan duplikasi, serta vesicle melekat pada batang daun, bulat telur atau elips (Hidayat, 2012). Warna thallus rumput laut cokelat berasal dari campuran pigmen golongan klorofil dan pigmen golongan karotenoid. Variasi warna thallus setiap spesies rumput laut cokelat sangat dipengaruhi oleh komposisi serta kandungan pigmen penyusunnya (Limantara dan Heriyanto, 2010).

Secara umum menurut Aslan (1999), ciri alga coklat ini yaitu mempunyai pigmen klorofil a dan c, beta karoten, violasantin dan fukosantin; warna umumnya coklat; persediaan makanan (hasil fotosintesis) berupa laminaran (beta, 1-3 ikatan glukosa); pada bagian dalam dinding selnya terdapat asam alginik dan alginat; mengandung pirenoid dan tilakoid (lembaran fotosintesis).

Menurut Firdhayani (2010), minuman dari *Sargassum sp* salah satunya yaitu teh rumput laut coklat (*Sargassum sp*), merupakan produk herbal efisien dan bernilai ekonomis. Karena teh rumput laut coklat (*Sargassum sp*) dengan kandungan bahan alginat, iodine danguluronate yang dapat membuang zat-zat sisa dalam tubuh, seperti lemak dan sel-sel mati akibat radikal bebas.

Proses pembuatan teh rumput laut berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kustina (2006), terdapat empat tahap yaitu pemilihan, pencucian, perendaman, dan proses pengeringan. Menurut Ristianti (2003), Pengkondisian rumput laut yaitu berupa perendaman dan atau pemucatan. Perendaman yang dilakukan bertujuan untuk melanjutkan pembersihan rumput laut dari kotoran-kotoran yang mungkin masih melekat.

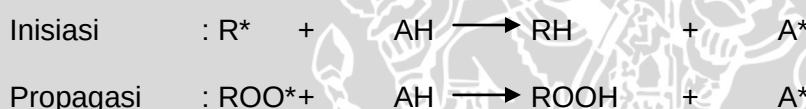
Kapur berasal dari kulit kerang laut atau cangkang dari kerang yang telah dibakar. Kapur sirih biasa ditemukan berwarna putih baik dalam bentuk kering atau basah. Saat kering kapur sirih berumus molekul CaO , sedangkan saat basah/larutan berumus molekul Ca(OH)_2 . Kapur sirih (Ca(OH)_2) yang dilarutkan dalam air akan terionisasi membentuk ion OH^- yang bersifat basa dan dapat menetralkan suasana asam (Paembong, 2012).

Pengeringan adalah proses pengeluaran air dari suatu bahan pertanian menuju kadar air keseimbangan dengan udara sekeliling atau pada tingkat kadar air, dimana mutu suatu bahan pertanian dapat dijaga dari serangan jamur, aktivitas serangga dan enzim (Wadli, 2005). Dasar pengeringan adalah terjadinya penguapan air dari bahan ke udara karena perbedaan kandungan uap air antara udara dengan bahan yang dikeringkan. Dalam hal ini udara mengandung uap air atau kelembapan nisbi yang lebih rendah sehingga terjadi penguapan (Siallagan 2009).

Keuntungan pengeringan adalah bahan menjadi tahan lama disimpan dan volume bahan menjadi lebih kecil sehingga mempermudah dan menghemat ruang pengangkutan dan pengepakan (Kartika, 2011). Sedangkan kerugian proses pengeringan adalah hilangnya flavor yang mudah menguap, pemucatan pigmen, perubahan struktur, dan timbulnya bau gosong bila kondisi pengeringan tidak terkendali (Buckle *et al.*, 1985).

2.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pendonor satu atau lebih atom hydrogen. Gordon (1990) dalam Nuraini (2007) mengemukakan antioksidan memiliki fungsi sebagai pemberi atom hydrogen dan menghambat laju reaksi autooksidasi dengan mekanisme memutus rantai reaksi autooksidasi dan mengubah radikal bebas menjadi radikal yang stabil. Senyawa antioksidan memberikan atom hydrogen dengan cepat ke senyawa radikal bebas (R^* , ROO^*) dan mengubahnya ke bentuk senyawa radikal stabil, sementara senyawa turunan antioksidan (A^*) relatif stabil. Namun pada konsentrasi yang tinggi, aktivitas antioksidan senyawa grup fenolik dapat berubah menjadi prooksidan. Berikut ini reaksi antara senyawa antioksidan dan senyawa radikal bebas:



Dalam mempertahankan diri dari radikal bebas endogen yang dihasilkan dari proses metabolisme tubuh, sel dalam tubuh juga memproduksi senyawa antioksidan di dalam sel. Berikut ini merupakan senyawa antioksidan endogen yang ada di dalam sel menurut Arief (2003), yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Senyawa Antioksidan di dalam Sel

Antioksidan	
– Glutathione	– Antioksidan utama di dalam (2-10 μM) dan di luar sel (plasma 5-25 μM)
– Sulfhydryl	– Cysteine dan homocysteine
– Vitamin C	– Antioksidan hidrofilik ekstraseluler (plasma 40-140 μM)
– Vitamin E	– Pembersih di ruang hidrofobik (plasma 10-40 μM)
– β -carotene	– 0,055 mg/dl
– Uric Acid	– Hasil metabolic adenosine dan xanthine, bereaksi pada radikal hidroksil (OH^*)
– Billirubin	– Antioksidan hidrofobik terikat pada albumin 20 μM
– Coenzyme Q10	– 0,08 mg/dl

Sumber: Arief, 2003.

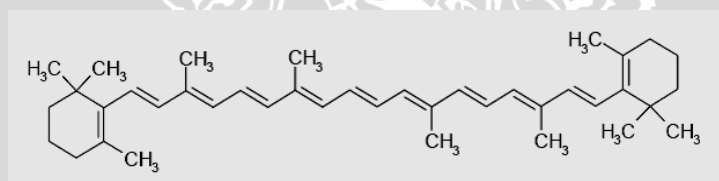
Menurut Tamat *et al.*, (2007) mengemukakan bahwa antioksidan dibagi menjadi 3 golongan yaitu antioksidan preventif, antioksidan primer, dan antioksidan komplementer. Contoh dari masing-masing golongan antioksidan ialah (enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase) sebagai antioksidan preventif, (vitamin A, fenolat, flavonoid, katekin, dan kuersetin) sebagai antioksidan primer, (vitamin C, β -karotin, retinoid) sebagai antioksidan komplementer. Ditambahkan oleh Dwihandita (2009) bahwa antioksidan primer merupakan senyawa pendonor atom hydrogen dan menghasilkan senyawa radikal stabil, kelompok antioksidan primer antara lain vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat), α -karoten, dan sistein. Sedangkan antioksidan sekunder merupakan antioksidan pencegahan dengan menurunkan kecepatan inisiasi melalui pengikatan ion logam, penangkapan oksigen, dan mengurangi hidroperoksida, kelompok antioksidan sekunder antara lain turunan asam folat, asam askorbat, senyawa karoten, fosfolipid, dan produk reaksi Maillard. Menurut Julyasih *et al.*, (2010) melaporkan kandungan karotenoid dalam rumput laut memiliki fungsi biologis sebagai antioksidan, sistem imun, mencegah penyakit degenerative, anti-inflamasi, anti stress, menghambat oksidasi lipid, dan menurunkan kadar kolesterol darah.

2.3 Beta Karoten

Karotenoid merupakan senyawa isoprenoid dan tetraprenoid yang disintesis oleh tanaman. Pada tanaman senyawa karotenoid berperan dalam proses fotosintesis dan melindungi bagian tertentu dari tanaman terhadap kerusakan yang disebabkan oleh intensitas paparan energi cahaya. Karotenoid tersusun atas likopen, α -karoten, β -karoten, lutein, zeaxanthin, dan cryptoxanthin (Riawan, 2013). Sebagai antioksidan, karotenoid mampu melindungi sel dan organisme dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas.

Penghambatan radikal bebas oleh karotenoid terutama dilakukan oleh β -karoten (Merdekawati dan Susanto, 2009). Beta karoten selain mampu melawan radikal bebas juga berfungsi sebagai anti penuaan dan anti kanker, serta dapat membantu meningkatkan kekebalan tubuh. Oleh karena itu beta karoten telah banyak digunakan sebagai bagian dari pengobatan maupun terapi (Hariyani, 2012).

β -karoten merupakan senyawa organik yang berantai karbon panjang dan bersifat non polar. Beta karoten mempunyai dua struktur cincin yang sama pada kedua sisi rantai karbon alifatik, yaitu berupa cincin beta-ionon (β -5-1, 1,5-trimetil-siklo-heksan). Oleh karena itu, molekul ini disebut pula β,β -karoten (Ismiyati, 2008). Struktur kimia beta karoten menurut Almatsier (2002) dalam Winarni (2007) dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kimia Beta Karoten (Almatsier, 2002)

Beta-karoten mempunyai rumus molekul $C_{40}H_{56}$ dengan berat molekul 536.873g/mol, berat jenis 0.941 ± 0.06 g/cm³, titik didih 180 -182 dan larut dalam kloroform (Susilowati, 2008). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Leenawaty dan Heriyanto (2010), beta karoten dapat terdeteksi pada panjang gelombang 452 dan 478 nm. Pada penelitian Britton *et al.* (1995) nilai R_f beta karoten adalah 0,8 – 1,0.

Menurut Fitriani (2011), β -karoten berfungsi sebagai antioksidan dan provitamin A. Antioksidan berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah proses oksidasi dalam sistem yang memiliki tekanan oksigen rendah. Senyawa β -karoten mempunyai aktivitas vitamin A yang tinggi.

2.4 Ekstraksi Pigmen

Ekstraksi adalah pemisahan satu atau beberapa bahan dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut. Ekstraksi juga merupakan proses pemisahan satu atau lebih dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair (solven) sebagai separating agen. Pemisahan terjadi atas dasar kemampuan larut yang berbeda dari komponen-komponen dalam campuran (Sukma, 2013).

Teknik ekstraksi sangat berguna untuk pemisahan secara cepat dan “bersih” baik untuk zat organik maupun zat anorganik. Cara ini dapat digunakan untuk analisis makro maupun mikro. Melalui proses ekstraksi, ion logam dalam pelarut air ditarik keluar dengan suatu pelarut organik (fasa organik). Secara umum, ekstraksi ialah proses penarikan suatu zat terlarut dari larutannya di dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak dapat bercampur dengan air (fasa air). Tujuan ekstraksi ialah memisahkan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan pelarut (Purwani, 2008). Pemilihan pelarut yang akan dipakai dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diisolasi. Sifat yang penting adalah polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa (Septiana dan Ari, 2012). Menurut Al-Ash'ary *et al.*, (2010), pelarut polar akan melarutkan solut yang non polar atau disebut dengan *like dissolve like*.

Metode maserasi atau metode perendaman merupakan metode yang paling sederhana dan digunakan terutama jika kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam tumbuhan cukup banyak (Warsito, 2007). Ditambahkan oleh Andayani *et al.*, (2008) metode ini mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana yaitu cukup dengan merendam sampel dalam pelarut.

2.5 Partisi (Fraksinasi)

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama kandungan yang lain. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa yang bersifat non-polar akan masuk ke pelarut non-polar (Harborne 1987). Ditambahkan oleh Lestari (2011), pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada diatas.

Metanol merupakan salah satu pelarut organik yang dapat bercampur dengan air dan secara umum digunakan dalam proses ekstraksi karotenoid serta klorofil dari sampel biologis (Leenawaty dan Heriyanto, 2011).

Aseton mempunyai nama lain dimetil asetat, dimetil keton, metal asetat, ketopropan, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul aseton adalah CH_3COCH_3 . Umumnya digunakan sebagai pelarut karena mempunyai sifat higroskopis, baunya ringan, sangat volatil, tidak berresidu dan mudah terbakar. Mempunyai berat molekul 58,1 g/mol dengan titik leleh $-94,6^\circ\text{C}$; titik didih $56,1^\circ\text{C}$ (Arindah, 2010).

Dietil eter atau biasa disebut eter, merupakan cairan tak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar dengan titik didih $34,5^\circ\text{C}$. Eter ini biasa digunakan sebagai pelarut organik dan sebagai obat bius (Sukir, 2012). Dietil eter banyak digunakan sebagai bahan pelarut untuk reaksi organik dan pemisahan senyawa organik dari sumber alamnya (Widayat dan Hantoro, 2008).

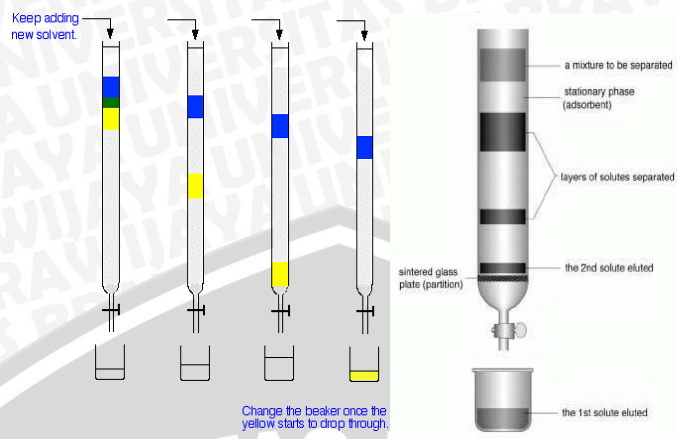
Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil (mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3% dan larut dalam air hingga kelarutannya 8% pada suhu kamar. Kelarutannya meningkat pada suhu yang lebih tinggi. Namun, senyawa ini tidak

stabil dalam air yang mengandung asam dan basa (Lagan, 2012). Etil asetat dengan rumus $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ digunakan sebagai pelarut tinta, perekat, resin (SNI, 2008).

Nama lain dari Heksana (*Hexane*) adalah kaproil hidrida, metil n-butil metan dengan rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$. Heksana mempunyai karakteristik sangat tidak polar, volatil, mempunyai bau khas yang dapat menyebabkan pingsan. Berat molekul heksana adalah 86,2 gram/mol dengan titik leleh $-94,3$ sampai $-95,3^\circ\text{C}$. Titik didih heksana pada tekanan 760 mmHg adalah 66 sampai 71°C . Dalam keadaan standar senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air (Munawaroh dan Prima, 2010).

2.6 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah suatu istilah umum yang digunakan untuk bermacam-macam teknik pemisahan yang didasarkan atas partisi sampel diantara suatu fasa gerak yang bisa berupa gas ataupun cair dan fasa diam yang juga bisa berupa cairan ataupun suatu padatan (Subani, 2008). Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal. Sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (Haqiqi, 2008). Perubahan yang mungkin terjadi sejalan dengan perubahan waktu ditunjukkan pada Gambar 3.

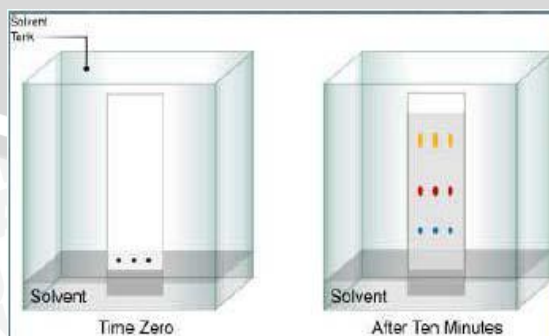


Gambar 3. Proses Kromatografi Kolom (Chemistry, 2013)

2.7 Analisa Kuantitatif Beta Karoten

2.7.1 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). Proses pemisahan sampel pada kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pemisahan Sampel
(Sumber: Abidin, 2011)

Menurut Soebagio *et al.*, (2005), pada tahap identifikasi atau penampakan noda, jika noda sudah berwarna dapat langsung diperiksa dan ditentukan harga R_f -nya. Besaran R_f ini menyatakan derajat retensi suatu komponen dalam fasa diam. R_f juga disebut faktor retardasi atau faktor retensi. Harga R_f dihitung sebagai jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh eluen (fasa gerak).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Beberapa keuntungan kromatografi lapis tipis menurut Abidin (2011), antara lain : 1) Kromatografi lapisan tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis. 2) Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, flourosensi atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet. 3) Metode pemisahan senyawa yang cepat, mudah dan menggunakan peralatan sederhana dalam menentukan kadar. 3) Dapat menggunakan sampel yang sangat kecil (mikro).

2.7.2 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah anggota teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif (Fernandez, 2011). Metode ini sangat sensitif dan dengan demikian sangat cocok untuk tujuan analisis. Spetroskopi UV-VIS bersifat sangat kuantitatif dan jumlah sinar yang diserap oleh sampel disebut juga dengan hukum Lambert-Beer (Takeuchi, 2006). Gambar alat Spektrofotometri UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Spektrofotometer UV-Vis

2.7.3 High Performens Liquid Chromatography (HPLC)

Menurut Adnan (1997), keunggulan HPLC yaitu dapat menangani senyawa – senyawa yang stabilitasnya terhadap suhu terbatas, begitu juga volatilnya 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 koefisien variansi dapat kurang dari 1 %. HPLC juga merupakan teknik analisa yang peka.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya (Putra, 2004).

2.7.4 Derajat Hue

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 $^{\circ}\text{Hue}$ untuk melihat intensitas warna dengan rumus : $^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1} (b/a)$, dimana hasilnya dapat di lihat pada Tabel 2 :

Tabel 2. Keterangan Warna $^{\circ}\text{Hue}$

$^{\circ}\text{Hue}$	Keterangan warna
18-54 $^{\circ}$	Berwarna <i>red (R)</i>
54-90 $^{\circ}$	Berwarna <i>yellow red (YR)</i>
90-126 $^{\circ}$	Berwarna <i>yellow (Y)</i>
126-162 $^{\circ}$	Berwarna <i>yellow green (YG)</i>
162-198 $^{\circ}$	Berwarna <i>green (G)</i>
198-234 $^{\circ}$	Berwarna <i>blue green (BG)</i>
234-270 $^{\circ}$	Berwarna <i>blue (B)</i>
270-306 $^{\circ}$	Berwarna <i>blue purple (BP)</i>
306-342 $^{\circ}$	Berwarna <i>purple (P)</i>
342-18 $^{\circ}$	Berwarna <i>red purple (RP)</i>

Sumber: Soekarto (1990).

3. MATERI DAN METODE

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* yang diperoleh Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan adalah aseton PA (Pro analisis) dan teknis, metanol PA, etil asetat PA, dietil eter, heksan, CaCO_3 , larutan saturasi garam, *silica gel*, alumunium foil, *cling wrap*, kertas saring kasar, kertas saring halus, kertas *Whatman* no. 42 diameter 11, gas nitrogen HP (*high pure*), tisu, pasir laut (*sea sand*), aquades, kapas, kertas label dan DPPH (2,2 *diphenyl 1-picrylhydrazil*). Bahan kimia ini dengan merk Merck dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Makmur Sejati Malang, Laboratorium Panadia Malang dan Laboratorium MRCPP Universitas Macung.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan ekstraksi dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, gunting, mortar, beaker glass 1000ml, erlenmeyer 250ml, gelas ukur 25ml, 50ml dan 100ml, corong kaca, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *rotary evaporator vaccum*, spatula, botol sampel, pipet volume 1ml dan 10ml, pipet tetes, statif, corong pisah, dan oven *vaccum*. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah spektrofotometri UV-Vis *shimadzu*, HPLC *shimadzu*, kolom kromatografi dengan panjang 28 cm dan diameter 2 cm, tabung reaksi, rak tabung reaksi, KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dengan lebar pelat 1 cm

dan panjang 5 cm, mikro pipet, penggaris, beaker glass 100 ml, cawan petri dan *color reader*.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ialah metode eksploratif. Menurut Amirin (2009), penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian. Metode eksploratif mempunyai upaya menemukan informasi umum mengenai suatu topik ataupun masalah yang belum dipahami sepenuhnya oleh seseorang peneliti. Jadi, penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan penelitian yang digunakan untuk meneliti sesuatu (yang menarik perhatian) yang belum pernah diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik selama ini.

Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam (Singarimbun dan Effendi, 1989).

Metode eksploratif pada penelitian ini yaitu dengan pengumpulan data melalui tahapan penelitian. Penelitian dilakukan untuk memperoleh data mengenai perbedaan aktivitas antioksidan beta karoten *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh". Untuk mendapatkan perbedaan maka perlu adanya perhitungan uji T. Untuk mendapatkan perhitungan perhitungan uji T maka perlu adanya metode eksploratif-deskriptif. Menurut Irawan (2007), metode deskriptif digunakan untuk mengkaji sesuatu seperti apa adanya (variabel tunggal) atau pola hubungan (korelasional) antara dua atau lebih variabel. Tahap-tahap penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel *Sargassum cristaefolium* dari Pulau Talango, Madura. Tahap kedua dilakukan proses maserasi, selanjutnya tahap ketiga dilakukan fraksinasi (partisi) dengan menggunakan dietil eter. Tahap

selanjutnya yaitu evaporasi dan isolasi pigmen menggunakan kolom kromatografi. Tahap kelima yaitu identifikasi pigmen menggunakan KLT. Selanjutnya dilakukan analisa pigmen menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Tujuan analisa pigmen menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) adalah untuk mengetahui gugus fungsinya, setelah dilakukan analisa menggunakan spektrofotometer dilanjutkan dengan uji DPPH (*2,2 diphenyl 1-picrylhydrazil*). untuk mengetahui ada tidaknya antioksidant pada alga coklat dan yang terakhir adalah uji L,a,b. Dari hasil uji L,a,b ini kemudian ditentukan warna sampel yang diuji dengan menghitung nilai $^{\circ}\text{hue}$.

3.4 Persiapan Sampel

Alga coklat *Sargassum cristaefolium* diambil dari perairan Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. Setelah sampel datang selanjutnya sampel dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Alga coklat yang telah dicuci kemudian dimasukkan kedalam *polybag* dan disimpan didalam *freezer*. Untuk perlakuan segar sampel diambil dari *freezer* kemudian disortasi dan diambil bagian thallus hal ini dikarenakan pada bagian thallus diasumsikan terdapat banyak jenis pigmen, dipotong kecil-kecil $\pm 1\text{cm}$ dan ditimbang sebanyak 100 gram lalu dihaluskan dengan mortar dan diberi CaCO_3 kemudian di ekstraksi. Fungsi penambahan CaCO_3 pada saat penghalusan sampel adalah untuk agen penetral.

Sedangkan untuk sampel yang diberi perlakuan teh kering, sampel alga coklat *Sargassum cristaefolium* direndam dalam 20 gr CaCO_3 sampai pH 11 selama $\pm 4,5$ jam hal ini bertujuan untuk mengurangi bau amis yang ada dalam sampel, kemudian sampel dicuci sampai bersih dan ditiriskan selama 5 menit di atas koran bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga tidak dibutuhkan

waktu yang terlalu lama saat pengeringan. Setelah itu dikeringkan dengan *mikrowave* dengan suhu 80°C selama 30 menit atau sampai kadar airnya 10%, digiling dengan blender sampai menjadi serbuk teh kemudian di bungkus dengan menggunakan alufo. Skema Persiapan Awal Sampel dan Pembuatan Teh Alga Coklat dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Persiapan Awal Sampel
(Hemawan *et al.*, 2013)

3.5. Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen

Langkah-langkah yang dilakukan untuk mendapatkan ekstrak pigmen pada sampel segar pertama-tama alga coklat dicuci dan dibersihkan untuk

menghilangkan kotoran yang menempel. Alga coklat selanjutnya dipotong-potong $\pm 1\text{cm}$ agar sampel cepat kering dan untuk memperluas permukaan bidang sehingga pigmen dapat terekstraksi dengan maksimal, ditimbang sebanyak 100 gram, dihaluskan dengan mortar dan ditambahkan CaCO_3 yang berfungsi sebagai penetral, hal ini dikarenakan pigmen beta karoten yang terkandung dalam alga tidak tahan pada pH basa tertentu. Alga coklat yang telah ditimbang dimaserasi secara bertingkat, yaitu selama 24 jam, 6 jam, dan 12 jam dengan pelarut metanol: aseton (7:3, v/v) sebanyak 250ml.

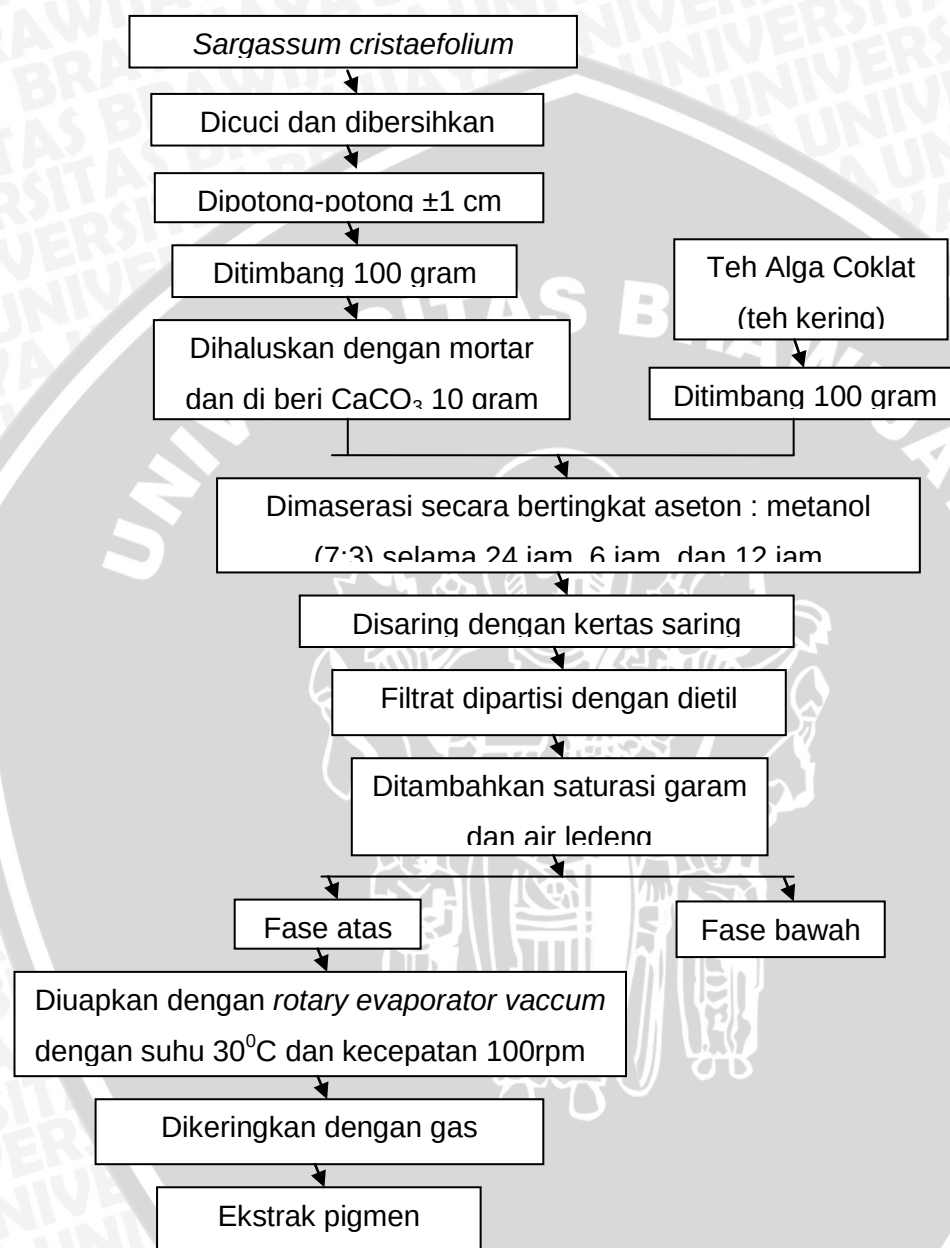
Sistem kerja dari proses ekstraksi adalah sel tanaman yaitu pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar. Adapun tujuan dari penggunaan metanol (CH_3OH) agar dapat melarutkan semua senyawa organik yang terkandung pada bahan. Sedangkan penggunaan pelarut aseton (CH_3COCH_3) adalah untuk mengangkat pigmen yang bersifat polar (pelarut yang cocok untuk beta karoten). Prinsip dari maserasi adalah mengambil senyawa target dengan cara merendam. Sampel yang diekstraksi dengan cara maserasi kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring halus hingga mendapatkan fitrat.

Tahapan setelah maserasi dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Filtrat selanjutnya dipartisi menggunakan dietil eter, saturasi garam, dan air ledeng dengan perbandingan 50 : 25 : 60 : 5 mL. Fungsi dietil eter adalah untuk mengikat senyawa yang bersifat semi polar sehingga senyawa tersebut berada pada fase atas, sedangkan tujuannya adalah dapat mengurangi kepadatan senyawa organik dalam sampel, memiliki titik uap yang paling rendah sehingga dapat mempermudah penghilangan pelarut pada sampel untuk proses selanjutnya. Fungsi saturasi garam adalah agar pelarut lebih tertarik mengikat

larutan yang memiliki elektronegatifan dan elektropositifan yang lebih tinggi dari pada senyawa target sehingga pelarut metanol dan aseton terikat pada saturasi garam dan berada dibawah. Tujuan penambahan saturasi garam ini adalah untuk mengikat senyawa yang bersifat polar.

Fase yang diambil dalam fraksinasi (partisi) adalah fase atas karena hampir seluruh pigmen berada dalam fase ini, dan hasil dari fase bawah tidak dipergunakan karena merupakan campuran dari methanol, aseton, saturasi garam dan air. Pada tahap fraksinasi (partisi) pada penelitian ini digunakan dua perlakuan yaitu *Sargassum cristaefolium* segar dan basa kering "Teh". Hasil fase atas dari sampel *Sargassum cristaefolium* segar sebanyak 435 mL sedangkan fase atas untuk basa kering didapatkan 448 ml. Untuk hasil fase bawah dari sampel *Sargassum cristaefolium* segar didapatkan 1389 ml dan fase bawah untuk perlakuan basa kering didapat sebanyak 1451 mL. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya di *rotary evaporator vacum* dengan suhu 30°C dengan kecepatan 100rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Penguapan atau evaporasi pada ekstraksi pigmen fukosantin dengan alat *rotary evaporator vacum* dimaksudkan untuk menguapkan pelarut, sehingga didapat konsentrat pigmen. Selanjutnya filtrat yang telah berbentuk kerak kemudian dipindahkan ke dalam botol sampel dengan cara ditetesi dengan larutan DE $\pm$ 4ml kemudian sampel dikeringkan dengan gas nitrogen sampai kering sempurna. Fungsi dari pengeringan dengan menggunakan gas nitrogen ini adalah untuk menguapkan pelarut yang ada dalam sampel sehingga untuk perlakuan selanjutnya sampel dapat ditambahkan dengan jenis pelarut yang lainnya. Kemudian ekstrak pigmen kering ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam *freezer*. Sedangkan untuk perlakuan teh kering sebelum dilakukan maserasi sampel yang telah disiapkan sebelumnya ditimbang sebanyak 100 gram kemudian dihaluskan dengan menggunakan mortar lalu ditambahkan CaCO₃ yang berfungsi sebagai

agen penetral dan untuk selanjutnya dilakukan tahapan proses yang sama dengan perlakuan segar. Prosedur ekstraksi dan fraksinasi untuk isolasi dapat dilihat pada Gambar 7



Gambar 7. Ekstraksi dan Fraksinasi untuk Isolasi Pigmen
Pangestuti et al ., (2008) yang dimodifikasi Mu'amar (2009)

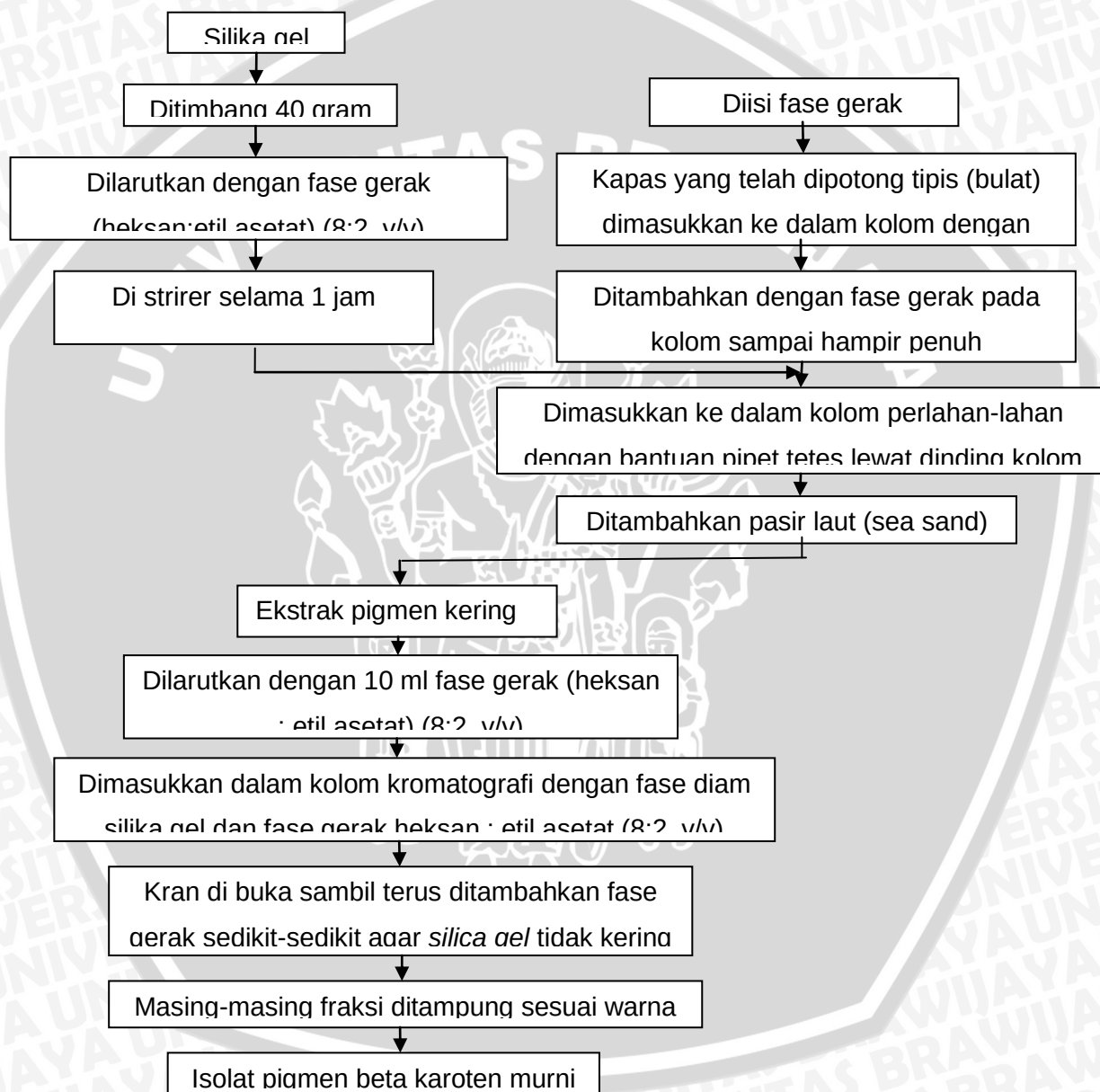
3.6 Isolasi Beta Karoten

Isolasi pigmen beta karoten dari alga coklat dilakukan dengan kolom kromatografi menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak berupa heksan :

etil asetat (8:2, v/v) ± 100 ml. Silika gel ditimbang sebanyak 40 gram dan dilarutkan dengan fase gerak heksan dan di stirrer selama total 1 jam, dengan rincian pada 45 menit pertama menggunakan kecepatan 1300 rpm, 1100 rpm dan 900 rpm yang dikecepatannya diubah setiap 15 menit sekali selanjutnya pada 15 menit terakhir menggunakan kecepatan 700 rpm, 500 rpm, 300 rpm dan yang terakhir 150 rpm yang dikecepatannya diubah setiap 5 menit sekali, hal ini bertujuan agar tidak ada gelembung udara yang tersisa dalam silika gel dan agar saat silika gel dimasukkan ke dalam kolom tidak mengalami keretakan. Fase diam (*silica gel*) berfungsi sebagai fase penyerap komponen senyawa sedangkan fase gerak untuk melarutkan zat komponen campuran. Sementara proses stirrer sedang berlangsung disiapkan juga kolom yang telah dipasang pada statif dan diisi fase gerak sedikit untuk membasahi kapas. Kapas dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi. Tahapan selanjutnya kolom diisi fase gerak sampai penuh secara perlahan melalui dinding kolom. Bubur silika gel dimasukkan ke dalam kolom kromatografi sampai kolom dapat terbentuk sempurna, dimana silika gel yang dimasukkan mencapai $\frac{3}{4}$ tinggi kolom. Selanjutnya kolom yang sudah siap dibiarkan selama 24 jam untuk mengetahui apakah ada keretakan atau tidak. Jika fase diam (*silika gel*) pecah maka dilakukan pengulangan prosedur karena akan berakibat pada proses penyerapan senyawa yang tidak sempurna. Tahap berikutnya pasir (*sea sand*) sebanyak 2 gram ditambahkan agar pelarut tidak mengenai silika gel dan sebagai penyaring saat sampel dimasukkan.

Sampel kering yang telah dilarutkan dengan 10 ml fase gerak heksan:etil asetat (8:2, v/v) dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan agar tidak merusak silika gel. Kran pada kolom dibuka dan pita-pita warna yang terbentuk ditampung pada tabung reaksi sesuai warna masing-masing sambil terus

menambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar silika gel tidak kering. Fase gerak yang ditambahkan ditingkatkan terus menerus kepolarannya dengan menaikkan konsentrasi etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan adalah 8:2 v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v, dan 5:5 v/v. Prosedur isolasi beta karoten dengan kromatografi dapat dilihat pada Gambar 8.

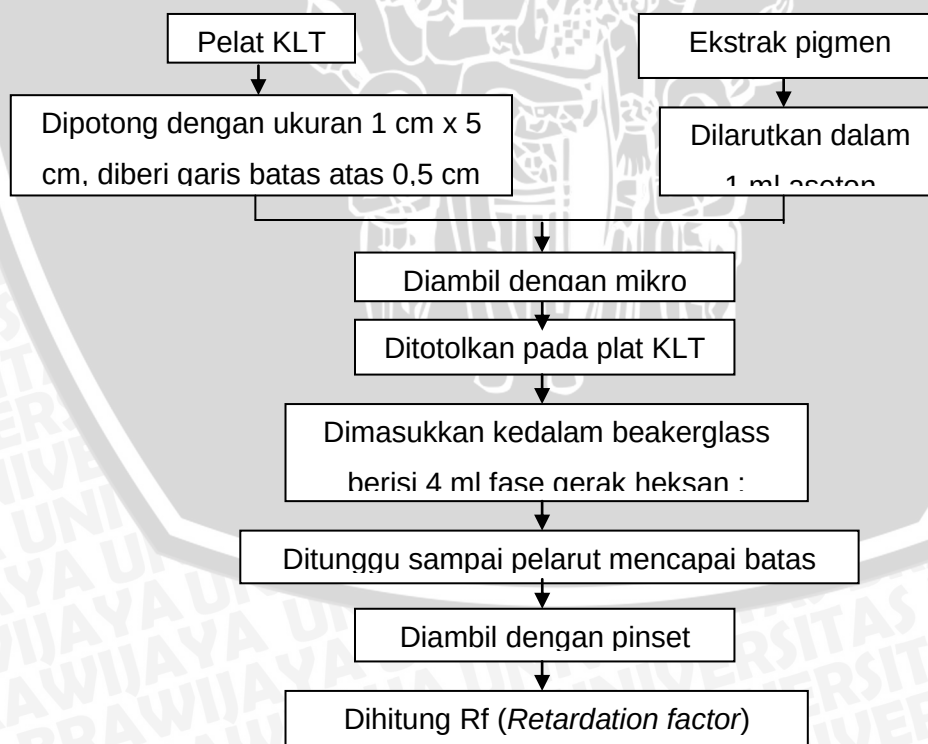


Gambar 8. Isolasi beta karoten dengan kromatografi kolom

Pangestuti *et al.*, (2008) yang dimodifikasi Mu'amar (2009)

3.7 Kromatografi Kolom Lapis Tipis

Identifikasi pigmen beta karoten dilakukan dengan metode Kromatografi Kolom Lapis Tipis (KLT). Tahap pertama dalam KLT ini adalah membuat garis dari pelat dengan menggunakan pensil 2B pada kedua ujung plat. Pada bagian bawah plat berukuran 1 cm yang berfungsi untuk menunjukkan posisi awal dimana fraksi ditotolkan sedangkan pada bagian atas plat berukuran 0,5 cm digunakan sebagai batas akhir yang ditempuh pelarut. Selanjutnya pigmen fukosantin kering dilarutkan dengan aseton secukupnya dan ditotolkan pada plat KLT bagian bawah dengan menggunakan *mikro pipet* dan di tunggu sampai pelat kering. Selanjutnya pelat KLT dimasukkan dalam beaker glass yang berisi fase gerak berupa heksan : etil asetat (8:2, v/v) 10ml, ditutup dengan cawan petri agar pelarut tidak menguap dan ditunggu sampai pelarut mencapai batas atas. Pelat KLT dihitung nilai Rf-nya. Prosedur KLT untuk identifikasi beta karoten dapat dilihat pada Gambar 9.

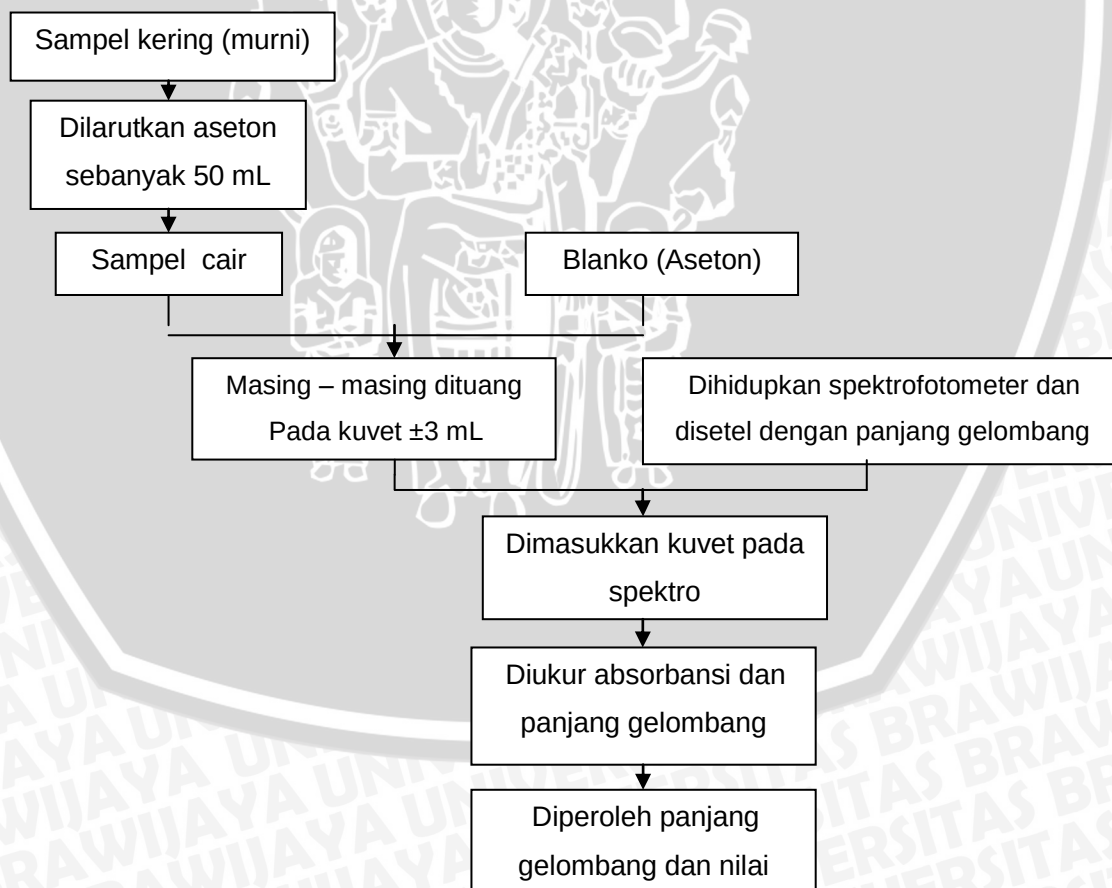


Gambar 9. Identifikasi beta karoten dengan KLT
Pangestuti et al., (2008)

3.8 Prosedur Analisis Parameter Uji

3.8.1 Spektrofotometer UV-vis (Limantara *et.al.*, 2009)

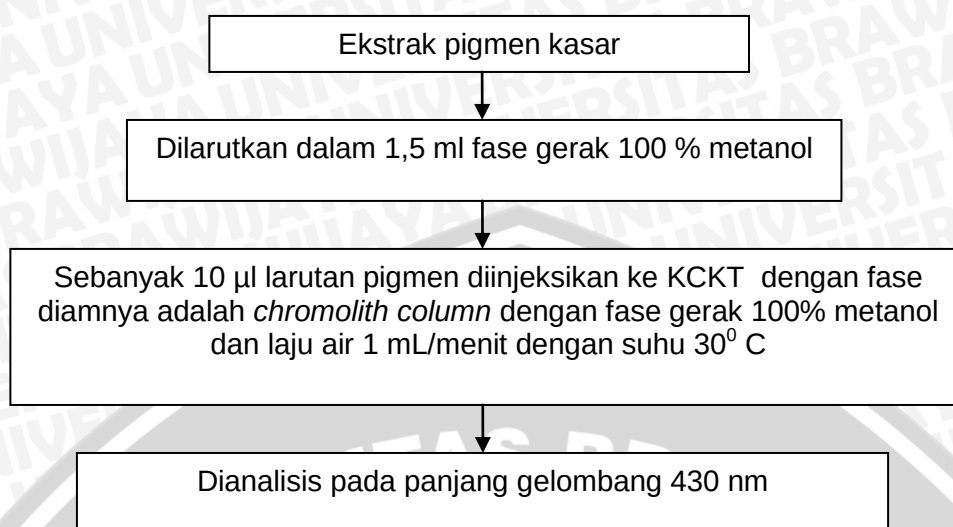
Langkah pertama dalam pengujian spektrofotometer UV-Vis adalah fraksi hasil dari kromatografi kolom dan KLT yang telah diyakini sebagai fukosantin dan kemudian disiapkan aseton di dalam *beaker glass* secukupnya. Sampel yang telah dilarutkan sebelumnya selanjutnya dimasukkan kedalam beaker glass sedikit menggunakan pipet tetes. Larutan pigmen dituangkan pada kuvet ± 3 mL dan kuvet kemudian dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer 1601 Shimadzu dan dilakukan pengujian. Hasil serapan maksimum yang terbentuk oleh pimen fukosantin kemudian dibandingkan dengan serapan spektra maksimum menurut literatur. Prosedur Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Prosedur Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis 1601

3.8.2 Analisa KCKT

Perkembangan KCKT merupakan suatu terobosan untuk analisis karotenoid (Syahputra dkk, 2005). Pada ekstrak pigmen yang diduga beta karoten diidentifikasi menggunakan metode KCKT. Tahap ini disebut proses pemisahan, yaitu untuk memisahkan pigmen beta karoten dengan pigmen-pigmen lain 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° 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 software (solusi LC versi 1.25) Shimadzu. Prosedur analisa KCKT dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Analisa KCKT

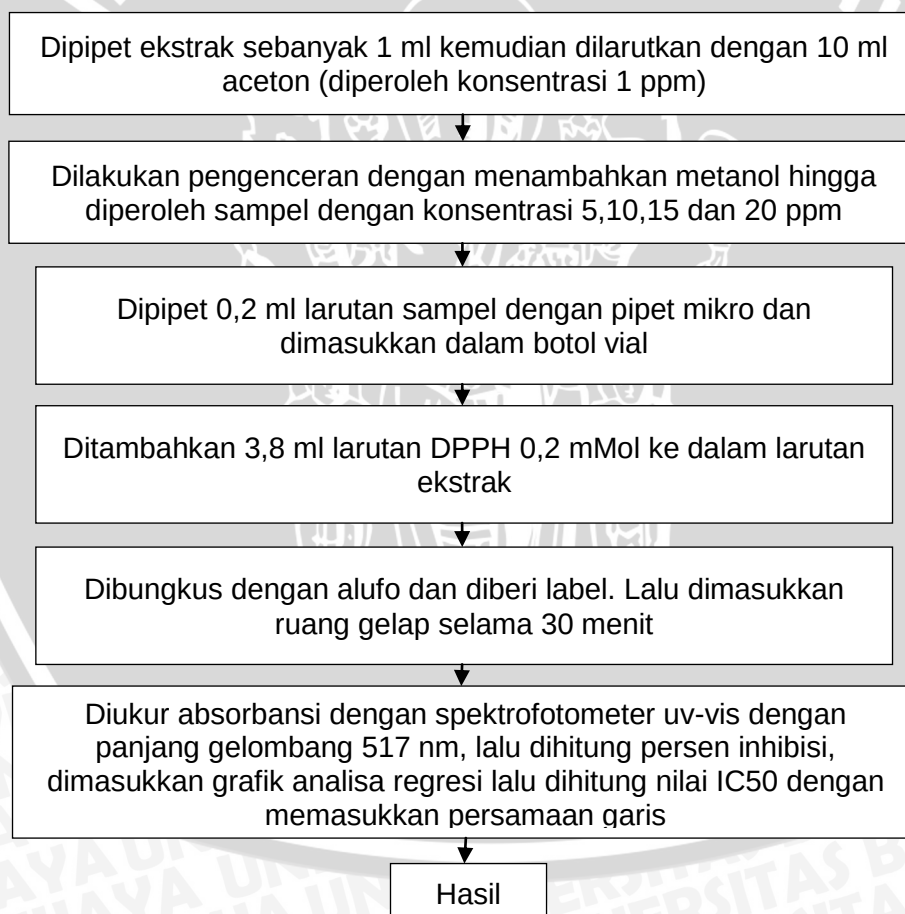
3.8.3 Analisa DPPH

Analisa aktivitas antioksidan untuk mengetahui kemampuan rumput laut *Sargassum cristaefolium* baik sampel segar dan basa kering “Teh” yang digunakan untuk menghambat aktivitas radikal bebas. Ekstra kasar pigmen fukosantin perlakuan segar dan basa kering “Teh” tersebut dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (*2,2 diphenyl 1-picrylhidrazil*). Ekstra kasar pigmen beta karoten yang sudah dilarutkan sebelumnya menggunakan 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 ekstra kasar pigmen beta karoten dengan fariasi berbeda dimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan 4,0 mL larutan DPPH 1 mm dalam pelarut methanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *shimadzu* pada panjang gelombang 517nm. Lalu pada proses 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 12.

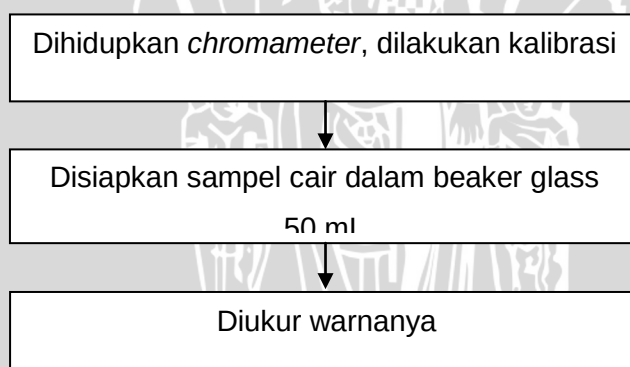


Gambar 12. Prosedur Analisa DPPH

3.8.4 Intensitas Warna (L, a, b) dan Nilai °Hue

Menurut Khuluq *et al.*, (2007), kandungan pigmen yang tinggi mempengaruhi tingkat kecerahan. Hal ini dapat menyebabkan kenampakan ekstrak semakin cerah. Pengukuran warna ini menggunakan alat *colour reader*. L, a+, b+. Nilai L mewakili *lightness*, yaitu 0 untuk hitam dan 100 untuk putih, axis a menunjukkan intensitas warna merah (+) atau hijau (-), dan axis b menunjukkan intensitas warna kuning (+) atau biru (-) (Saati, 2002).

Menurut Setianingtias (2005), nilai a dan b digunakan untuk menentukan derajat HUE. Derajat HUE berfungsi untuk menentukan warna dari produk. Derajat HUE mempunyai rumus, yaitu $^{\circ}\text{HUE} = \arctan (b/a)$ Nilai warna yang ditentukan berdasarkan nilai derajat HUE. Warna kuning merah mempunyai derajat HUE paling rendah dan warna ungu mempunyai derajat HUE paling tinggi. Prosedur analisa intensitas warna (L,a,b) dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Analisa intensitas warna (L, a, b)

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

Hasil ekstraksi dan isolasi beta karoten dari alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” dengan parameter hasil kolom kromatografi, identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), pengukuran pola spectra dan panjang gelombang dengan spektrofotometri UV-Vis, identifikasi gugus fungsi dengan *High Performens Liquid Chromatography* (HPLC), serta pengukuran warna L,a,b dapat dilihat pada Tabel 3.

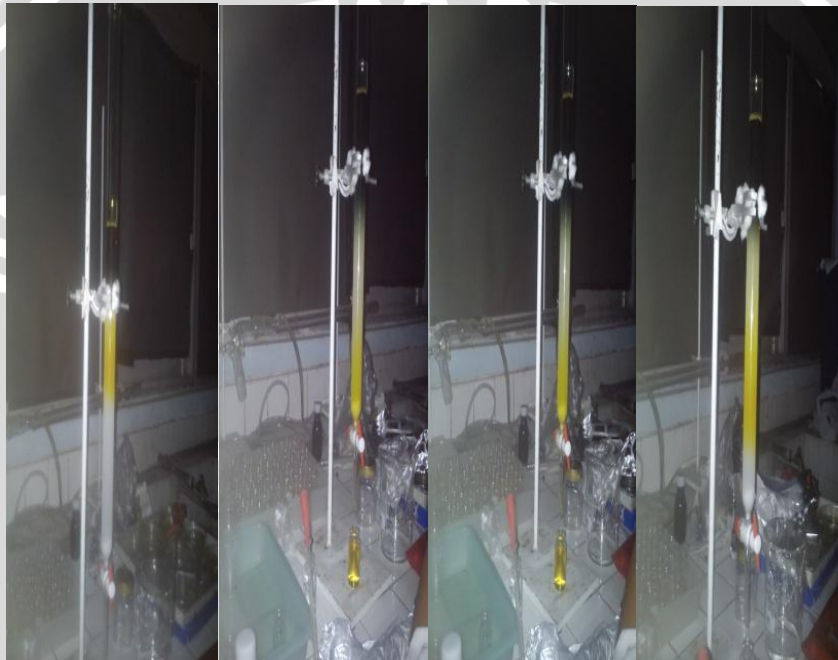
Tabel 3. Data Hasil Isolasi Beta Karoten

No	Uji Identifikasi	Hasil		Literatur
		Segar	Basa kering	
1.	Kolom Kromatografi	64 isolat pigmen dalam botol vial, volume tiap botol vial ± 10 ml. isolate beta karoten dari botol 2 sampai 4 warna kuning pekat	87 isolat pigmen dalam botol vial, volume tiap botol vial ± 10 ml. Isolate β -karoten dari botol 3 sampai 6 kuning pekat	β -karoten berwarna kuning merah (Gross, 1991)
2.	KLT	Rf 0,8	Rf 0,8	Rf β -karoten 0,8-1,0 (Britton <i>et al.</i> , 1995)
3.	Pola Spektra (Uv-Vis 1601 shimadzu)	452,60 nm	452 nm	Dalam pelarut aseton panjang gelombang 453,5 nm (SCOR WG 78 data dalam Jeffrey <i>et al.</i> , 1997) 452 nm (Britton <i>et al.</i> , 1995)
4.	HPLC	11,276 menit	11,827 menit	Hegazi. <i>et.al</i> (1998).

4.2 Pembahasan

4.2.1 Isolasi Beta Karoten

Isolasi β -karoten dengan kolom kromatografi menggunakan silica gel sebagai fase diam dan fase gerak heksan : etil asetat dengan perbandingan 8 : 2 v/v (250 ml), 7:3 v/v (200 ml), 6:4 v/v (200 ml) dan 5:5 v/v (200 ml). Isolasi β -karoten pada kolom kromatografi dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Isolasi Pigmen β -karoten

Hasil kromatografi kolom menunjukkan terbentuknya pita-pita pigmen berdasarkan warna dan tingkat kepolarannya. Sistem kromatografi kolom pada penelitian ini digunakan system “normal phase”, yaitu fase diam yang digunakan bersifat polar sedangkan fase gerak bersifat lebih non polar, sehingga pigmen yang bersifat non polar akan keluar terlebih dahulu (Jeffrey *et al.*, 1997). Ditambahkan oleh Haqiqi (2008), komponen yang mudah larut dalam fase diam, akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat.

Pemisahan pigmen pada kromatografi kolom pada penelitian ini dihasilkan 64 fraksi untuk sampel segar dan 87 fraksi untuk sampel “teh”. Seluruh fraksi ditampung berdasarkan warnanya di dalam botol vial dengan isi ± 10 ml. Fraksi yang diduga pigmen β -karoten pada sampel segar terdapat pada botol 2 sampai 4, sedangkan pada sampel “teh” terdapat pada botol 3 sampai 6. Warna fraksi yang diduga pigmen β -karoten berwarna kuning merah, hal ini sesuai dengan yang diungkapkan oleh Gross (1991) bahwa pigmen beta karoten berwarna kuning merah. Pada penelitian ini pigmen β -karoten keluar saat perbandingan fase gerak heksan : etil asetat 8:2 v/v. Hal tersebut dapat diketahui bahwa tingkat kepolaran pigmen β -karoten bersifat non polar. Menurut Satriyanto *et al.*, (2012), β -karoten merupakan senyawa organik bersifat non polar. Hasil isolasi pigmen β -karoten yang ditampung dalam botol vial dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Hasil Isolasi β -karoten

4.2.2 Identifikasi β -karoten dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Isolasi sampel segar dan “teh” hasil kromatografi kolom yang diduga sebagai pigmen β -karoten dilakukan identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silica gel dan fase gerak heksan : aseton (7:3 v/v). Tujuan

penggunaan fase gerak heksan dan aseton (7:3 v/v) yaitu untuk melarutkan senyawa yang non-polar, semi polar, dan polar sehingga senyawa tersebut akan larut dan tertarik ke atas sesuai tingkat kepolaranya, salah satunya β -karoten yang sifatnya non-polar. Menurut Gusti (2012), beta karoten merupakan senyawa non polar yang sangat larut baik dalam pelarut non polar seperti heksana. Ditambahkan oleh Erawati (2006), kombinasi pelarut heksana dan aseton mampu menambah daya tarik pelarut terhadap beta karoten. Hasil identifikasi β -karoten dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Hasil KLT β -karoten

Hasil KLT diatas menunjukan bahwa totol yang terbentuk hanya satu warna , yaitu warna kuning merah. Hal ini sesuai dengan Gross (1991), bahwa pigmen β -karoten berwarna kuning merah. Hasil KLT diperkuat dengan perhitungan R_f yaitu perbandingan antara jarak yang ditempuh fraksi pigmen dengan jarak yang ditempuh pelarut. Nilai R_f yang didapat pada sampel segar dan “teh” sebesar 0,8. Nilai tersbut sama dengan penelitian Britton *et al.*, (1995), dengan fase gerak non polar diperoleh nilai R_f sebesar 0,8 – 1,0. Jumlah spot dan nilai retention factor (R_f) yang terpisah menunjukan banyaknya komponen yang terdektesi, sedangkan warna yang dihasilkan merupakan karakteristik warna senyawa yang terkandung dalam

setiap ekstrak. Ketebalan spot mengindikasikan besar kecilnya konsentrasi dari senyawa yang terpisah, artinya tebal spot yang terpisah maka konsentrasi senyawa tersebut semakin banyak (Lestari, 2010).

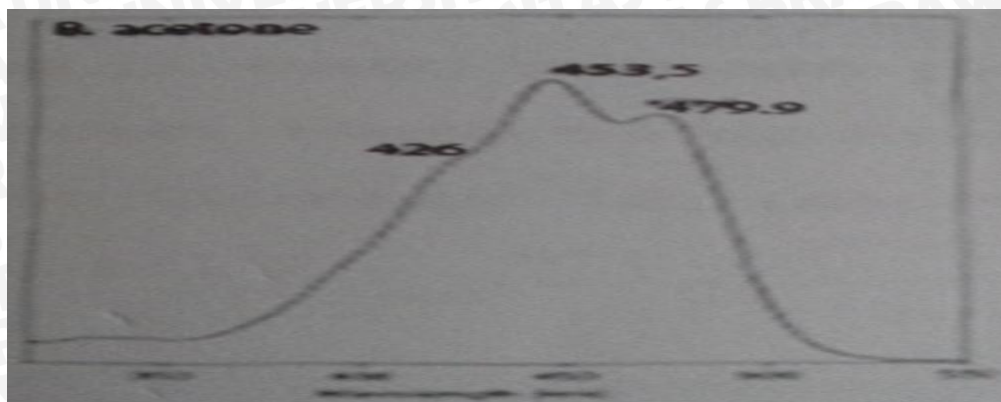
Identifikasi pigmen beta karoten dengan menggunakan KLT lebih efisien karena kelebihanannya dibanding analisa lainnya, menurut Setiawan (2008), pemisahan pada KLT dapat dilakukan dengan cepat, analisis dapat lebih sensitif, mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan, dan dapat digabungkan dengan instrumen deteksi yang lain untuk evaluasi hasil pemisahannya (Setiawan, 2008). Kromatografi lapis tipis merupakan cara analisis cepat yang memerlukan bahan sedikit. Tujuan kualitatif KLT digunakan untuk menganalisis senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil, menetuka pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparative maupun kromatografi kolom dan untuk mengidentifikasi komponen penyusun campuran melalui suatu perbandingan dengan senyawa yang diketahui strukturnya (Novianti, 2012). Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi komposisi pigmen berdasarkan warna adalah nilai R_f . Nilai R_f pada KLT ini merupakan salah satu kelemahannya. Menurut Sastrohamidjojo (2007), faktor yang mempengaruhi harga R_f antara lain : struktur kimia senyawa yang dipisahkan, sifat penyerap dan derajat aktifitasnya, tebal dan kerataan lapisan penyerap, pelarut fase gerak, kejenuhan ruang kromatografi, suhu, dan penetesannya.

4.2.3 Identifikasi β -karoten dengan Pola Spektra dan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{max})

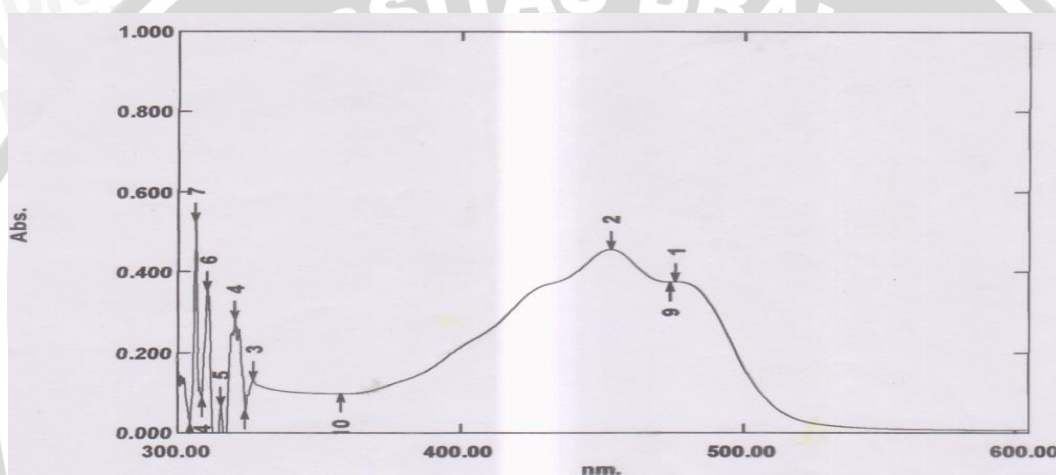
Identifikasi β -karoten dengan pengukuran pola spectra dan panjang gelombang dilakukan untuk membuktikan bahwa hasil yang didapat benar-benar

senyawa β -karoten. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601. Pengukuran pola spectra terhadap standar β -karoten tidak dilakukan, identifikasi pigmen β -karoten digunakan serapan panjang gelombang, serta nilai Rf pada KLT sesuai literature menurut Jeffrey *et al.*, 1997 dalam pelarut aseton. Pola spectra UV-Vis β -karoten menurut Jeffrey *et al.*, (1997), dapat dilihat pada Gambar 17. (a). Pola spectra pada sampel segar dapat dilihat pada Gambar 16. (b). Dan pola spektra pada sampel “teh” dapat dilihat pada Gambar 16. (c).

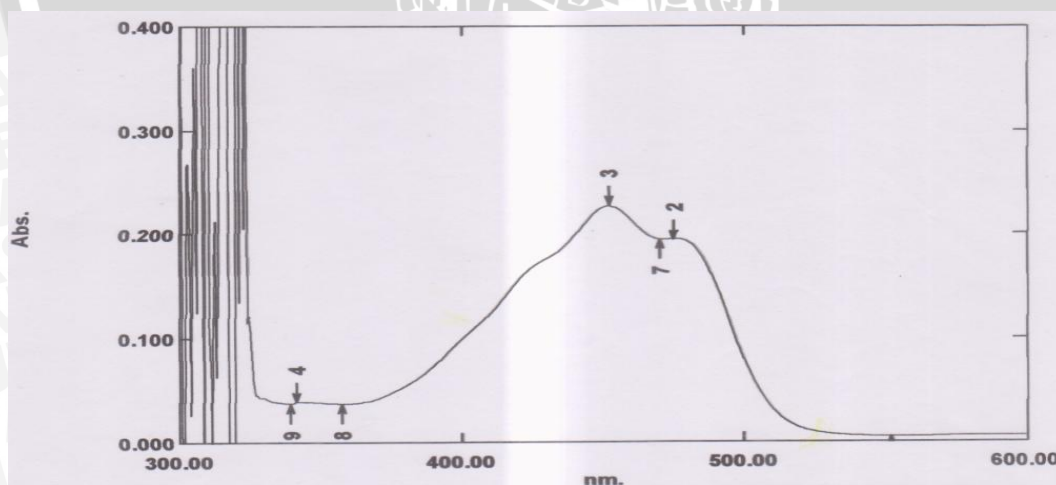
Dari gambar dibawah menunjukkan hasil pengukuran pola spectra menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601. Hasil pengukuran pola spektra pada penelitian ini dengan menggunakan pelarut aseton dapat diperoleh serapan maksimum pada sampel segar sebesar 452,60 nm, untuk sampel “teh” diperoleh serapan maksimum sebesar 452 nm. Sedangkan serapan maksimum dalam pelarut aseton menurut SCOR WG 78 data dalam Jeffrey *et al.*, (1997), sebesar 453,5 nm. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa β -karoten mengalami sedikit perubahan pola spektra dan pergeseran panjang gelombang pada sampel segar. Perubahan pola spektra tersebut diduga terjadi degradasi pada β -karoten. Ditambahkan Nurcahyanti dan Limantara (2007), yang menyatakan bahwa degradasi pigmen dapat dilihat dari perubahan pola spektranya, penurunan absorbansi dan pergeseran panjang gelombang. Penurunan absorbansi tersebut menunjukkan terjadinya pembentukan degradasi yang lebih kecil dari molekul awal. Hal ini didukung oleh Gunawan *et al.*, (2009), bahwa semakin banyak ikatan rangkap dua yang terkonjugasi dalam molekul, maka pita serapan utama makin bergeser ke daerah panjang gelombang yang lebih tinggi. Pergeseran serapan maksimum (λ_{max}) pada sampel segar dan sampel teh kering dapat dilihat pada Tabel



(a)



(b)



(c)

Gambar 17. (a). Pola Spektra Pigmen β -karoten Jeffrey *et al.*, (1997)
 (b). Pola Spektra Pigmen β -karoten Sampel segar
 (c). Pola Spektra Pigmen β -karoten Sampel "teh"

Tabel 4. Rerata Panjang Gelombang β -karoten Pada Sampel Segar dan “Teh”

Sampel	Retara Panjang Gelombang ($\lambda_{\max}$)	Panjang Gelombang Menurut Literatur
Segar	452,60nm	Menurut Jeffrey <i>et al.</i> , (1997) panjang gelombang β -karoten adalah 453,5
“Teh”	452nm	

Pada tabel 4. menunjukan bahwa pengolahan “teh” alga coklat *Sargassum cristaefolium* mengalami pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih pendek (hipsokromik). Pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih pendek atau ke daerah merah (hipsokromik) maupun ke arah yang lebih panjang atau ke daerah merah (batokromik) menunjukkan terjadinya degradasi. Pergeseran yang terjadi juga dimungkinkan karena perbedaan alat yang digunakan pada saat proses (Rahmawan, 2008). Hal ini didukung penelitian yang dilakukan oleh Fretes *et al.*, (2012), bahwa puncak serapan dari ketiga ketiga varian yang diteliti bergeser ke arah hipsokromik sebesar 1,5 nm setelah pemanasan selama 48 jam. Pergeseran puncak serapan maksimum ini mengindikasikan terjadinya isomerisasi cis-trans karotenoid.

Menurut Satriyanto *et al.*, (2012) mengatakan bahwa pengaruh suhu terhadap oksidasi karotenoid adalah karotenoid belum mengalami kerusakan pada pemanasan 60°C tetapi reaksi oksidasi karotenoid dapat berjalan lebih cepat pada suhu yang relative tinggi. Degradasi yang dialami sampel “teh” diduga akibat dari proses pengeringan yang menyebabkan terjadinya oksidasi. Menurut Khoo *et al.*, (2011), degradasi oksidatif karotenoid karena berbagai metode pengolahan dapat menyebabkan isomerisasi cis-trans dan pembentukan epoksida karotenoid.

4.2.4 Analisa warna (L), (a), (b)

Salah satu pendekatan untuk mengetahui jumlah beta karoten adalah dengan pengukuran warna. Pengukuran warna dilakukan untuk mengetahui nilai L^* a^* b^* . Menurut Indriani (2003), nilai L (lightness) adalah suatu nilai yang menyatakan gelap dan terangnya warna bahan yang dianalisis. Semakin besar nilai L, semakin terang atau cerah bahan tersebut. Nilai a menyatakan derajat kemerahan (a^+) atau kehijauan (a^-). Nilai b menyatakan derajat kekuningan (b^+) atau kebiruan (b^-). Hasil analisa warna (L), (a), dan (b) pada pigmen β -karoten dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengukuran Warna (L), (a), (b)

Sampel	Nilai L	Nilai a	Nilai b	$^{\circ}$ hue
Segar	27,2	9,2	16,5	60,8
"Teh"	27,0	7,4	11,3	56,7

Keterangan : $^{\circ}$ Hue = $\tan^{-1} (b/a)$

Berdasarkan hasil pengukuran warna (L,a,b), parameter tingkat kecerahan (L) pada pigmen β -karoten diperoleh nilai yang paling rendah pada perlakuan "Teh" yaitu 27,0 sedangkan pada sampel segar yaitu 27,2. Menurut Satriyanto et al., (2012), 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 warna tingkat kecerahan (L) dari kedua sampel menunjukkan bahwa warna pigmen pada sampel "teh" lebih gelap daripada sampel segar. Hal ini dapat disimpulkan bahwa sampel "teh" mengalami degradasi warna dilihat dari intensitas warna kecerahan (L). Menurut Mas'ud (2011), karotenoid akan mengalami kerusakan pada suhu tinggi sehingga terjadi dekomposisi karotenoid yang mengakibatkan turunya intensitas warna karotenoid atau terjadi pemucatan.

Dari hasil pengukuran warna parameter merah-hijau (a) pada sampel segar menunjukkan nilai a (+) yaitu 9,2, sedangkan pada sampel "teh" nilai warna a (+) yaitu

7,7. Menurut Suyatma (2009), untuk notasi a^* warna kromatik campuran merah-hijau dengan nilai $+a^*$ (positif) dari 0 sampai +80 untuk warna merah dan nilai $-a^*$ (negatif) dari nilai 0 sampai -80 untuk warna hijau.

Berdasarkan hasil pengukur warna parameter kuning-biru (b) pigmen β -karoten pada sampel segar diperoleh nilai (b) sebesar +16,5 sedangkan pada perlakuan “teh” nilai warna warna (b) sebesar +11,3. 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. Pada penelitian ini memiliki nilai positif yang menunjukkan bahwa β -karoten cenderung berwarna kuning. Hasil tersebut menunjukkan sampel segar memiliki intensitas warna lebih kuning dibanding sampel “teh”. Menurut Satriyanto *et al.*, (2012), semakin rendah kadar beta karoten akan menurunkan warna a^* (kemerahan) dan makin tinggi kadar β -karoten maka makin merah atau kuning warnanya.

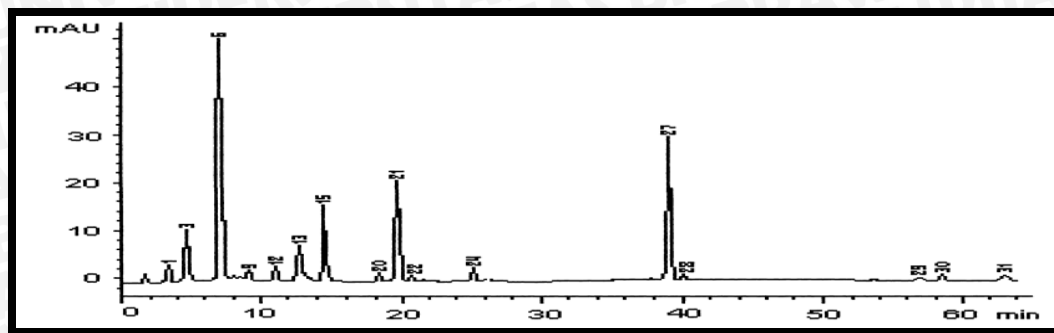
Berdasarkan nilai a dan b yang telah dihitung ^0hue untuk mengetahui kisaran warna sampel. Nilai ^0hue pada sampel segar sebesar 60,8 sedangkan pada sampel “teh” sebesar 56,7. Nilai ^0hue yang didapat berada dikisaran warna kromatisitas (54^0 - 90^0) dilihat berdasarkan tabel warna kromatisitas menurut Soekarto (1990).

Dari analisa (L),(a),(b) yang etakah didapatkan bahwa kedua sampel masih mengandung pigmen β -karoten yang dibuktikan dari terdapatnya warna kuning. Hal ini didukung oleh Rachmawaty dan Wahono (2013), beta karoten merupakan pigmen kelompok dari pigmen karotenoid yang berkontribusi terhadap warna kuning, oranye, dan merah pada buah dan sayuran. Namun pigemn beta karoten diduga mengalami degradasi pada sampel “teh” dilihat dari intensitas kecerahan yang lebih cerah dan nilai ^0hue lebih kecil dibanding sampel segar.

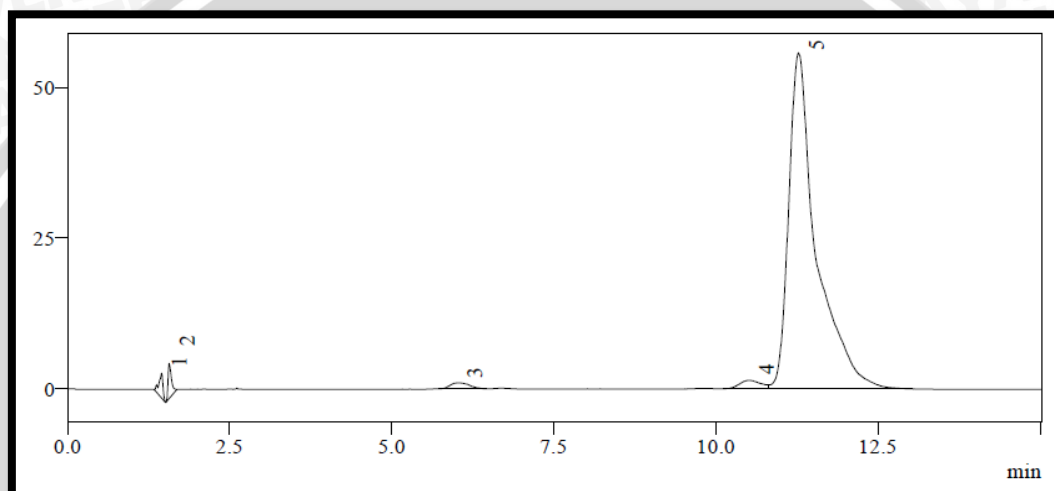
Banyak faktor yang dapat mempengaruhi kestabilan karoten. Karoten stabil pada pH netral, alkali namun tidak stabil pada kondisi asam, adanya udara atau oksigen, cahaya dan panas. Selain itu, dapat mengalami isomerisasi bila terkena panas, cahaya dan asam. Isomerisasi dapat menyebabkan penurunan intensitas warna dan titik cair (Yulianawati, 2012).

4.2.5 Analisa *High Pressuere Liquid Chromatography* (HPLC)

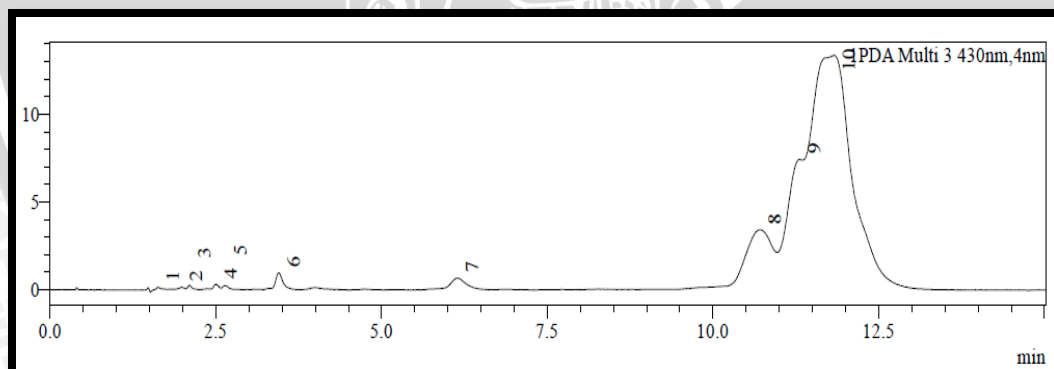
KCKT merupakan suatu metode yang sangat baik dalam menganalisis pigmen pada tumbuhan tingkat tinggi dan alga karena dengan sampel sedikit dan analisa yang pendek dapat memisahkan klorofil, karotenoid, serta turunannya (Gross, 1991). Kandungan pigmen dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi 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 membandingkan *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. Hasil analisa HPLC pada sampel segar didapat waktuambat 11,276 menit dan sampel “teh” didapat waktuambat 11,827 menit. Grafik hasil analisa HPLC dapat dilihat pada Gambar 18. (a) literatur pembanding Hegazi *et al.*, (1998), gambar (b) sampel segar dan gambar (c) sampel “teh”



(a)



(b)



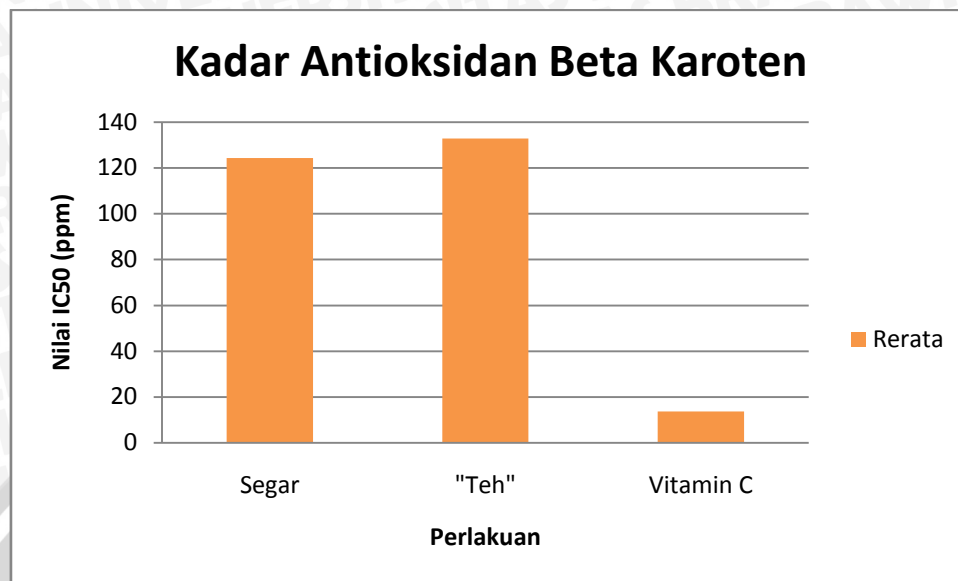
(c)

Gambar 18. (a). Hasil HPLC waktu tambat literatur Hegazi *et al.*, (1998).
 (b). Hasil HPLC waktu tambat sampel segar alga coklat
 (c). Hasil HPLC waktu tambat sampel "teh" alga coklat

Hasil analisa HPLC dari *Sargassum cristaefolium* sampel segar dan “teh” diidentifikasi dengan menggunakan panjang gelombang 430 nm selanjutnya dibandingkan dengan literatur Hegazi *et al.*, (1998) yang sama panjang gelombang 430 nm. Dari gambar diatas, hasil analisa menunjukkan bahwa menurut literatur Hegazi *et al.*, (1998), bahwa β -karoten pada alga *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* dan *Padina pavonica* terdeteksi pada waktu retensi 57,14 menit.

4.2.6 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. Metode ini dipilih karena memiliki kelebihan yaitu sederhana, mudah cepat, peka dan membutuhkan sedikit sampel (Purwaningsih, 2012). Aktivitas antioksidan dihitung melalui nilai IC_{50} , dimana semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Prinsip uji dengan metode ini yaitu DPPH berperan sebagai radikal bebas yang direndam oleh yang direndam oleh bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk *1,1-difenil-2-pikrilhidrazin*. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning atau kuning gelap yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis 517 nm, sehingga aktivitas perendaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Sunarni *et al.*, 2005). Antioksidan pembanding pada penelitian ini menggunakan vitamin C. Nilai IC_{50} pigmen Beta Karoten dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Nilai IC₅₀ Pigmen Beta Karoten

Dari Gambar 19. Memperhatikan nilai IC₅₀ terkecil dimiliki oleh sampel segar sebesar 124,387 ppm, perlakuan "teh" sebesar 132,884 ppm. Nilai IC₅₀ yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin tinggi. Dari diagram diatas dapat dilihat bahwa nilai IC₅₀ pigmen Beta Karoten segar dan "teh" masih cukup tinggi dari pada nilai IC₅₀ vitamin C sebagai kontrol pembandingan 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). ini dapat disebutkan bahwa aktivitas antioksidan perlakuan segar dan "teh" diakatgorikan sebagai antioksidan dengan aktivitas sedang dengan kisaran nilai IC₅₀ antara 100-150 ppm. Menurut Molyneux (2004), nilai IC₅₀ dapat dikatakan berbanding terbalik dengan antioksidan. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC₅₀ 50–100 ppm, sedang apabila nilai IC₅₀ 100-150 ppm, dan lemah bilai nilai IC₅₀ antara 150-200 ppm. Pada Lampiran 15. Telah dibuktikan menggunakan uji T, bahwa

aktivitas antioksidan pada sampel segar dan “teh” tidak ada perbedaan. Dan aktivitas antioksidan pada perlakuan segar dan “teh” masuk dalam katagori sedang, itu diakibatkan adanya perlakuan basa. Sedangkan antioksidan tidak dapat berada dalam suasana basa.

Menurut Zena (2013), perbedaan aktivitas antioksidan pada *sargassum cristaefolium* diduga disebabkan oleh (1) pelarut yang dipergunakan dalam proses ekstraksi (metanol) dan (2) adanya pengaruh reaksi dengan basa pada struktur polifenol (flafonoid) pada perlakuan basa kering. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Muawwanah *et al.*, (1997) terhadap ekstrak alga laut *Sargassum sp.* Basah memperhatikan aktivitas antioksidan tertinggi dengan pelarut metanol sedangkan ekstrak *Sargassum sp.* kering kurang mempunyai aktivitas antioksidan.

Menurut Adam (2013), kemampuan metanol dalam mengekstrak jaringan tanaman disebabkan pelarut ini secara efektif dapat melarutkan senyawa polar, seperti gula, asam amino dan glikosida. Berdasarkan penelitian Atta-ur-Rahman (2001), senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flafonoid, fenolat dan alkaloid, yang merupakan senyawa-senyawa polar, akan terektrak pada fraksi ekstrak etanol karena etanol adalah pelarut polar. Menurut Shahidi dan Naczk (2004), sebagian besar flafonoid memiliki aktivitas antioksidan yang disebabkan karena danya gugus hidroksi fenolik dalam struktur molekulnya. Semakin tinggi kadar flafonoid maka potensi antioksidanya juga akan semakin tinggi. Akan tetapi, komponen polifenol mudah teroksidasi menjadi bentuk lain yang dapat mengurangi kemampuannyasebagai antioksidan.

Senyawa antioksidan dapat berupa senyawa alam ataupun senyawa sintetik. Berbagai golongan senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang dikenal sebagai sumber *radical scavenger* adalah golongan senyawa fenol, seperti: flafonoid,

flafonon, flavon, fenil propanoid, antrakuinon, ataupun lignin; senyawa-senyawa alkaloid, saponin, fenol, flafonoid, dan antra-kuinon (Lisdawati *et al.*, 2006).

Pengujaian dengan radikal bebas DPPH merupakan suatu metode pengujian secara kuantitatif, yang menunjukkan jika nilai IC_{50} semakin kecil, maka semakin tinggi aktivitas senyawa antioksidan yang terkandunga dalam *crude* ekstrak menangkap radikal DPPH begitu juga sebaliknya jika nilai IC_{50} semakin besar maka semakin rendah aktivitas senyawa antioksidan yang terkandung di dalam *crude* ekstrka penangkap radikal DPPH.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan pada alga cokelat *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” memiliki aktivitas yang sama tidak ditemukan perbedaan. Hasil ini didapatkan berdasarkan uji statistik dengan nilai perlakuan segar sebesar 124,387 ppm, dan perlakuan “teh” sebesar 132,884 ppm.

5.2 Saran

Perlu berhati-hati dalam proses penanganan sampel dan saat melakukan penelitian untuk menjaga kualitas pigmen pigmen β -karoten agar tidak terjadi kerusakan pada pigmen.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 2011. **Analisa Pengukuran Kadar Larutan Temulawak Menggunakan Metode TLC (Thin Layer Chromatography)** Seminar Tugas akhir, Institut Sepuluh November. Surabaya.
- Adam, C.,G.S Djakarsi., M.M. Ludong dan T. Langi. 2013. **Penentuan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Leilem (Clerodendrum Minahassae).** Jurnal Teknologi Pertanian. Hlm :1-5
- Adnan, M. 1997. **Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan.** Andi Yogyakarta. Yogyakarta
- Al-Ash'ary, M.N., F.M Titin S., dan Zackiyah.2010. **Penentuan Pelarut Terbaik Dalam mengekstraksi Senyawa Bioaktif dari Kulit Batang Artocapus heterophyllus.** Jurnal Sains dan Teknologi Kimia Vol. 1 no.2 Oktober 2010 Hal. 150-158. ISSN 2087-7412
- Almatsier, S. 2002. **Prinsip Dasar Ilmu Gizi.** PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Andayani, R., Y.Lisawati dan Maimunah. 2008. **Penentuan Aktivitas Antioksidan Kadar Fenolat total dan Lekopen Pada Buah Tomat (Solanum lycopersium L).** Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi Vol. 13 No. 1 2008
- Anis, E. 2008. **Pigmen sebagai Zat Pewarna dan Antioksidan Alami.** UMM Press. Malang
- Britton, G, Liaaen-J, S, and Pfander, H. 1995. **Carotenoids 2: Genetics and Molecular Biology of Carotenoid Pigmen Biosynthesis.** Faseb J., 10 (2), 228-37
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet dan M. Wootton. 1995. **Ilmu Pangan.** Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta
- Chaidir, A. 2006. **Kajian Rumput Laut Sebagai Sumber Serat Alternatif Untuk Minuman Berserat.** Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Chemistry. 2007. **Kromatografi Kolom.** <http://www.chem-is-try.org> diakses pada tanggal 13 April 2013
- Erawati, C.M. 2006. **Kendali Stabilitas Beta Karoten Selama Proses Produksi Tepung Ubi Jalar (Ipomoea batatas L.)** (Thesis). Institut Pertanian Bogor. Bogor

- Fahri, Muhammad. 2010. **Kajian Kandunagn Metabolit Sekunder dari Alga Coklat sargassum cristaefolium.** <http://elfahrybima.blogspot.com/2010/10/kajian-kandungan-metabolit-sekunder.html>. Diakses pada tanggal 2 Juni 2013 pukul 23.51 WIB
- Fernandez, Rio. 2011. **Spektroskopi Infra Merah (FT-IR) dan Sinar Tampak (UV-Vis).** Pasca sarjana Universitas Andalas. Padang
- Firdhayani, I.N. 2010. **Solusi Sehat Bagi Penderita kanker dan Diabetes.** Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Frete, Helly de., A.B Susanto., Budhi P., dan Leenawaty L. 2012. **Estimasi Produk Degradasi Ekstrak Kasar Pigmen Alga Merah Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty varian Merah, Coklat dan Hijau: Telaah Perbedaan Spektrum Serapan.** Jurnal Ilmu Kelautan Maret 2012. Vol. 17 (1): 31-38. ISSN 0853-7291
- Gross, J. 1991. **Pigments In Vegetables Chlorophylls And Carotenoids.** Library of Congress Catalog, ISBN 0-442-00657-8
- Guiry, M.D dan Guiry, G.M. 2013. **Sargassum cristaefolium C. Argadh (Algae Base).** (Serial Online). <http://www.algaebase.org>. Diakses pada tanggal 2 Juni 2013. pukul 23.37
- Gunawan, E. 2009. **Profil Peningkatan Recovery Pada Proses Pemekatan β -Karoten Dari Minyak Sawit Kasar Dengan Metode Pengulangan Fraksinasi Pelarut.** Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Gusti, D.R. 2012. **Studi Pengaruh Kerusakan Beta-karoten dalam Pelarut Heksana, Aseton, dan Metanol Serta Tanpa Pelarut Dalam Udara Terbuka.** Jurnal Penelitian Universitas jambi Seri Sains Vol. 14 N0. (2) Hal. 25-28. ISSN 0852-8349
- Haqiqi, S.H. 2008. **Kromatografi Lapis Tipis.** Diakses dari <http://d4him.files.wordpress.com/2009/02/paper-kromatogarfi-lapis-tipis.pdf> pada tanggal 20 Juni 2014 18.40 WIB
- Harborne. 1987. **Metode Fltokimia-Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan.** ITB. Bandung
- Hariyani, R. 2012. **Uji Stabilitas Karotenoid Dalam Madu.** Universitas Kristen Satya Wacana. Salatiga.
- Hegazi, M.M., A.P. Ruzata, L.Almela and M.E Candela. 1998. **Separation and Identification of Chlorophylls and Carotenoids from Caulerpa Polifera, Jania Rubens and Padina Davonica by Reversedphase High Performance Liquid Chromatography.** Jurnal of Chromatography. A 829: 153-159

- Hermawan, A.M., Hartati K., dan Kartini Z. 2013. **Perbedaan pH Perendaman Dalam Larutan Kapur ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ Dengan Pengeringan Oven Terhadap Kualitas Kimia Teh Alga Coklat (*Sargassum filipendula*)** (skripsi). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang
- Hidayat, I.N. 2012. **Khasiat Rumput Laut**. <http://khasiatrumputlaut.blogspot.com/2011/02/sargassumcristaefolium.html>. Diakses tanggal 20 Juni 2014.
- Indriani, H dan Sumarsih. 1992. **Budidaya Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut**. Penebar Suradaya. Jakarta
- Ismiyati, U. 2008. **Penentuan Tahanan Nanofiltrasi Menggunakan Model Tahanan Seri Pada Pemisahan Beta-karoten dan Alfa-Karoten Minyak Sawit dalam Isopropanol**. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Jeffrey, S.W, Mantoura, R.F. C, and Wright, S.W. 1997. **Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Method**. UNESCO Publishing, Paris, 661 pp
- Kartika, H.P. 2011. **Pemanfaatan Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh**. Fakultas Perikanan dan ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Khoo, H.E., K.N. Prasad, K.W. Kong, Y, Jiang, & A.Ismail. 2011. **Carotenoids and their isomers: Color pigments in Fruits and vegetables**. *Molecules*, 16:1710-1738
- Kustina, L. 2006. **Studi Kasus Fisika Pangan Hasil Pembuatan teh Rumput laut Jenis *sargassum* sp**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Lestari, S.W. 2011. **Fraksinasi Bertingkat**. <http://sardewforester.blogspot.com/2011/12/fraksinasi-bertingkat.html> Diakses pada tanggal 11 Juni 2014 pukul 10.00 WIB
- Lestari, T.A. 2010. **Profil Kimiawi Ekstrak Ramuan Kunyit, temulawak, dan Meniran Berdasarkan Aktivitas Antioksidan (skripsi)**. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor
- Limantara, L dan Heriyanto. 2010. **Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Cokelat dari perairan Madura Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**. *Ilmu kelautan* Maret 2010 Vol. 15 (1) 23-32. Issn 0853-7291
- Limantara, L., Windu M., dan A.B Susanto. 2009. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Klorofil a dan β -karoten *Sargassum* sp**. *Jurnal Kelautan Nasional* Vol. 2 Edisi khusus Januari 2009

- Lisdawati, V., L. Broto dan S. Kardono. 2006. **Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocorpa*)**. Media Litbang kesehatan xvi (4): 1-7
- Mas'ud, F. 2011. **Optimasi Proses Pemanasan Pada Pembuatan Chips Wortel Kaya Karotenoid Menggunakan Renpose Surface Methodology**. Jurnal AgriTechno (Vol. 4 No.1 September 2011) ISSN: 1979-7362
- Merdekawati, W., A.B Susanto dan Leenawaty L. 2009. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Klorofil a dan β -karoten *Sargassum* sp.** Jurnal Kelautan Nasional Vol. 2 Edisi Khusus Januari 2009
- Mu'amar, H.A. 2009. **Studi Termostabilitas Pigmen Fukosantin, Klorofil a dan Ekstrak Kasar *Padina australis* dan *Sargassum polycystum* Terhadap Suhu dan Lama Pemanasan Yang Berbeda**. Universitas Brawijaya> Malang. Hal 1:141
- Muawwanah., I. Setyaningsih., W.Zahiruddin, dan Anggadireja. 1997. **Ekstraksi Antioksidan Dari Alga LAut *Sargassum* sp dan Efektivitasnya Dalam Menghambat Kerusakan Awal Emulsi Minyak Ikan**. Buletin Teknologi Hasil Perikanan. Vol III. No.1 THP 6-9
- Munawaroh, S dan Prima A.H. 2010. **Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*citrus hystrix* D.C) Dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana**. Jurnal Kompetensi Teknik Vol 2 No.1, November 2010
- Molyneux, P. 2004. **The Use og Stable Free Radical Diphenilpicrylhidrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity**. Songklanakarin J.Sci. Technol 26(2) : 211-219
- Novianti, N.D. 2012. **Isolasi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Jambo-Jambo (*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr)** (skripsi). FMIPA Universitas Indonesia. Depok.
- Nurchahyanti, A.D.R dan Limantara, L. 2007. **Fotodegradasi Ekstrak Kasar, Klorofil a dan Fucoxantin *Padina australis* dan *Dictyota crenulata***. Prosiding Seminar Nasional Pigmen, universitas Kristen atya Wacana, Salatiga, p:243-260
- Pangestuti, R, Leenawaty L, dan A. Susanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystum* C. Agardh**. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal. 201-209.
- Purwaningsih, S. 2012. **Aktivitas Antioksidan Dan Komposisi Kimia Keong Mata Merah (*Cerithidae obtusa*)**. Departemen teknologi Hasil Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB: Bogor

- Putri, K.H. 2011. **Pemanfaatan Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh**. Teknologi Hasil Pertanian IPB. Bogor
- Rachmawaty, N dan Wahono, H.S. 2013. **Pembuatan Pasta Buah Mangga Podang (*Mangifera Indica* L) (Kajian Konsentrasi Asam Sitrat dan Gula Pasir)**. (skripsi) Fakultas teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang
- Rahmawan, Landdyan Sjahid. 2008. **Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L)**. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhamadiyah Surakarta. Surakarta
- Riawan. 2013. **Ketersediaan Karotenoid Total dan Klorofil Total Dalam Jaringan Prostat Mencit Balb/c Akibat Pemberian Pasta tomat**. Skripsi. IKIP PGRI Semarang. Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Program Studi Pendidikan Biologi. Semarang
- Sastrohamidjojo, H. 2007. **Spektroskopi Inframerah**. Cetakan keempat. Yogyakarta: Penerbit Liberty
- Satriyanto, B, Simon, B.W, dan Yunianta. 2012. **Stabilitas Warna Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus*) Terhadap Pemanasan Sebagai Sumber Potensial Pigmen Alami**. Jurnal Teknologi Pertanian Vol. 13 No. 3 (Desember 2012) 157-168.
- Septiana, A.T dan Ari A. 2012. **Kajin Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi**. Agointek Vol 6, no.1 Maret 2012.
- Setiawan, S. 2008. **Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Jati Belanda Berpotensi Antioksidan**. (skripsi). Bogor: Fakultas matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Shahidi, F dan M. Nazck. 2004. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press LLC. USA
- Siallagan, B. 2009. **Kajian Proses Pengeringan Kemoreaksi Jahe Dengan Kapur Api (CaO)**. Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara. Medan
- Singarimbun, M dan Sofian Effendi. 1989. **Metode Penelitian Survei**. Jakarta: LP3ES
- Soebagio, b.E, Ibnu, M.S, widarti, H.R, dan Munzil. 2005. **Kimia Analitik II**. Penerbit Universitas Negeri Malang. Malang. Hal: 88-91
- Standar Nasional Indonesia. 2008. **Etil Asetat**. SNI 06-2583-1992

- Subani. 2008. **Penentuan Kadar Natrium Benzoat, Kalium Sorbat, dan Natrium Sakarin dalam Sirup Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) di Balai Besar Pengawasan Obat dan Makanan Medan.** Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara.Medan
- Sunarni, T. 2005. **Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Kecambah dari Biji Tanaman Familia Papilion aceae.** Jurnal Farmasi Indonesia 2 (2) 2001, 53-61.
- Susanto, W.H. 1999. **Teknologi Lemak dan Minyak Makan.** jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya Malang.
- Susilowati. 2008. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Karotenoid dari cabai Merah (Capsicum annum L.)** (skripsi). Universitas Islam Negeri (UIN). Malang
- Suyatma. 2009. **Diagram Warna Hunter (Kajian Pustaka).** Jurnal Penelitian Ilmiah Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Page8-9.
- Takeuchi, Y. 2006. **Pengantar Kimia.** Iwanami Shoten Publisher. Tokyo
- Tamat, S.R., T. Wikanta., dan L.S. Maulina. 2007. **Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau Ulva Reticulata Forsskal.** Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. Vol. 5, No.1 Hlm. 31-36.
- Tuarita, Mirna Zena. 2013. **Karakteristik Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Polifenol Teh Alga Coklat (Sargassum cristaeofolium) Dengan Pelarut Metanol.** Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang. Malang
- Wadli. 2005. **Kajian Pengeringan Rumput Laut Menggunakan Alat Pengering Efek Rumah kaca.** Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Warsito. 2007. **Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder dari Tanaman.** Jurnal Fakultas MIPA Universitas Brawijya. Malang.
- Widayat dan Hantoro, S. 2008. **Optimasi Pembuatan Dietil Eter Dengan Proses Reaktif Distilasi.** Reaktor vol. 12 no. 1 Juni 2008, hal 7-11
- Winarni, O. 2007. **Kinetika Desorpsi Isotermal Beta Karoten Olein Sawit Kasar Dari Atapulgit Dengan Menggunakan Etanol** (skripsi). Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yulisnawati, T.A. 2012. **Perubahan Kandunagn Beta Karoten, total Asam, dan Sifat Sensorik Yoghurt labu Kuning Berdasarkan Lama Simpan dan Pencapaian** (skripsi). Jurusan Teknologi Teknologi Pertanian, Universitas Muhamadiyah Semarang. Semarang

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



Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



Lampiran 2. 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 sampel 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 1000mL.
- 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°C 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 3. 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°C 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 $\pm$ 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 4. 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 *stirrer*, pelarut heksan dan etil asetat (p.a), beaker glass 500 mL, gelas ukur 100 ml, pasir laut, corong kaca, dan tabung rekasi.
- Prosedur pembuatan silika gel sebagai berikut : Disiapkan serbuk silika gel, beaker glass 1000 ml, magnetic stirrer dan timbangan digital Ditimbang silika gel sebanyak 40 gram Dilarutkan dalam fase gerak (heksan : etil asetat) (8 : 2 v/v) $\pm$ 250 ml. Distirer selama 1 jam Setelah 1 jam silika gel siap di tuang kedalam kromatografi kolom secara perlahan untuk proses selanjutnya.
- 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 5. Prosedur pembuatan silika gel

- Disiapkan serbuk silika gel, beaker glass 1000 ml, magnetic stirrer dan timbangan digital
- Ditimbang silika gel sebanyak 40 gram dilarutkan dalam fase gerak (heksan : etil asetat) (8 : 2 v/v) ± 250 ml.
- Distirer selama 1 jam Setelah 1 jam silika gel siap di tuang kedalam kromatografi kolom secara perlahan untuk proses selanjutnya.



Lampiran 6. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis dan Pemurnian Pigmen Beta Karoten

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 ekstrak 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 7. 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) $\pm$ 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 $\pm$ 3mL lalu dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Prosedur Analisa Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Fung *et. al* 2009)

- Disiapkan ekstrak pigmen kasar
- Dilarutkan dalam 1,5 mL fase gerak 100 % metanol
- Sebanyak 10 μ l 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° C
- Dianalisis pada panjang gelombang 430 nm

Lampiran 8. Prosedur Pembuatan Larutan dan Garam Grosok

Larutan Ekstraksi

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

- Metanol = $\frac{7}{10} \times 300 \text{ ml} = 210 \text{ mL}$
- Aseton = $\frac{3}{10} \times 300 \text{ ml} = 90 \text{ mL}$

Larutan Kolom

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

$$\text{Heksan} = \frac{8}{10} \times 10 \text{ ml} = 8 \text{ mL}$$

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

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

$$\text{Heksan} = \frac{8}{10} \times 250 \text{ ml} = 200 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{2}{10} \times 250 \text{ ml} = 50 \text{ mL}$$

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

$$\text{Heksan} = \frac{7}{10} \times 200 \text{ ml} = 140 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{3}{10} \times 200 \text{ ml} = 60 \text{ mL}$$

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

$$\text{Heksan} = \frac{6}{10} \times 200 \text{ ml} = 120 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{4}{10} \times 200 \text{ ml} = 80 \text{ mL}$$

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

$$\text{Heksan} = \frac{5}{10} \times 200 \text{ ml} = 100 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{5}{10} \times 200 \text{ ml} = 100 \text{ mL}$$

Larutan KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

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

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

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 9. Perhitungan Kadar β -karoten

Data Absorbansi

Alga Coklat	Perlakuan	Absorbansi
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Segar	0,457
	"Teh"	0,227

Kadar β -karoten

Algacoklat	Perlakuan	Kandungan β -karoten
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Segar	0,0001828 <i>mLg</i>
	"Teh"	0,0000908 <i>mLg</i>

Data Rendemen

Alga Coklat	Perlakuan	Gram sampel	Rendemen (%)
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Segar	100 gram	0,00 25
	"Teh"	100 gram	0,00 25

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan: A= absorbansi

ϵ = absorptifitas molar (Molar extinction coefficient)

L= lebar bagian dalam kuvet

c= konsentrasi (molar)

- Kadar β -karoten segar

Panjang Gelombang 452,60 nm absorbansi 0,457

$$C = \frac{A}{\epsilon \times b} = \frac{0,457}{2500 (100 \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm}} = 0,0001828 \text{ mLg}$$

- Kadar β -karoten "Teh" (Kering)

Panjang Gelombang 452,0 nm absorbansi 0,227

$$C = \frac{A}{\epsilon \times b} = \frac{0,227}{2500 (100 \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm}} = 0,0000908 \text{ mLg}$$

Perhitungan Kadar Rendemen

$$\begin{aligned}\% \text{ Berat rendemen} &= \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat Awal}} \times 100\% \\ &= \frac{0,25}{100 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 0,0025 \text{ gram}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\% \\ &= \frac{0,25}{100 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 0,0025 \text{ gram}\end{aligned}$$

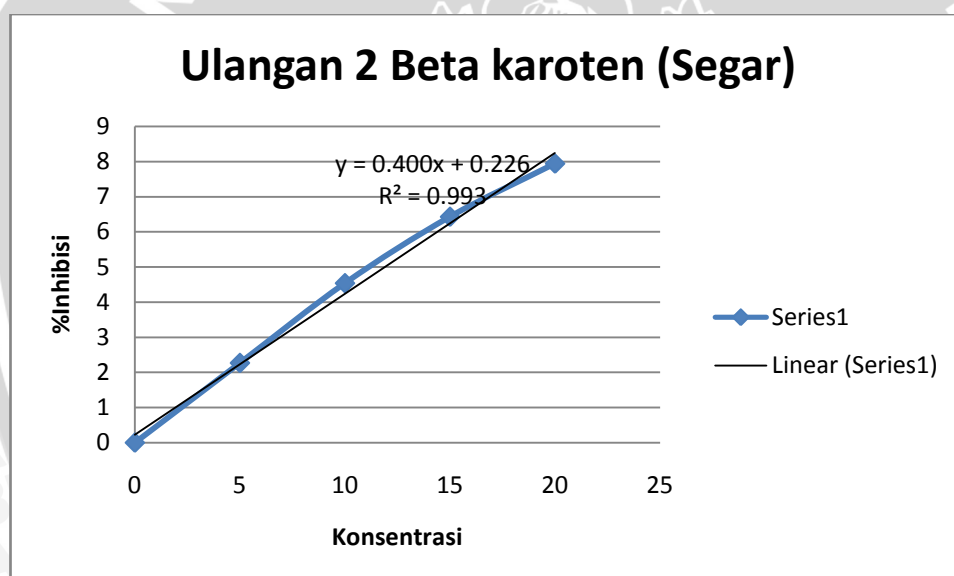
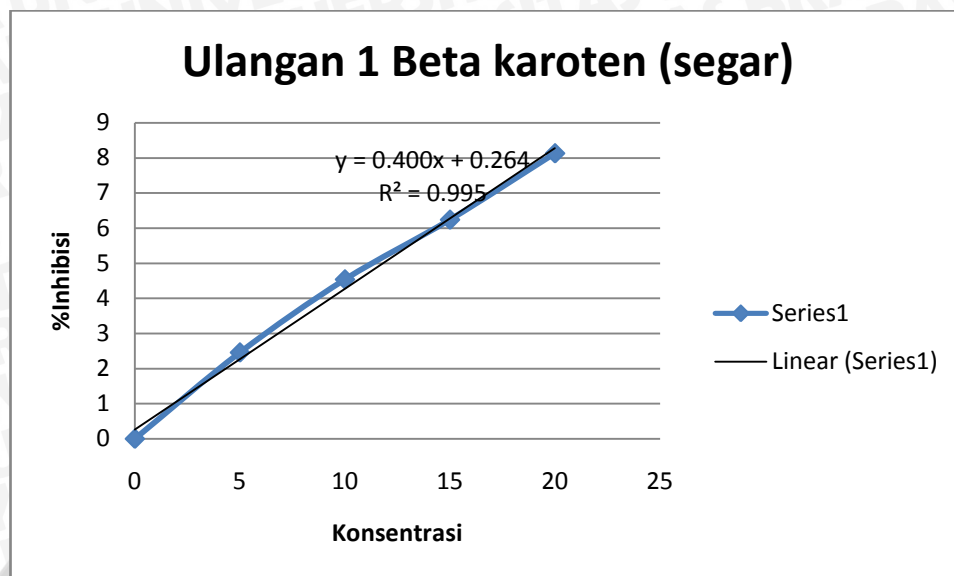
Lampiran 10. Data antioksidan beta karoten segar

Konsentrasi (ppm)	ulangan	m smpl	Absorbansi	%aktivitas	IC50 1 (ppm)	IC50 2 (ppm)	Rata-Rata (ppm)
0	1	0.2	0.529	0.000	124.34	124.435	124.3875
	2	0.2	0.529	0.000			
5	1	0.2	0.516	2.457			
	2	0.2	0.517	2.268			
10	1	0.2	0.505	4.537			
	2	0.2	0.505	4.537			
15	1	0.2	0.496	6.238			
	2	0.2	0.495	6.427			
20	1	0.2	0.486	8.129			
	2	0.2	0.487	7.940			

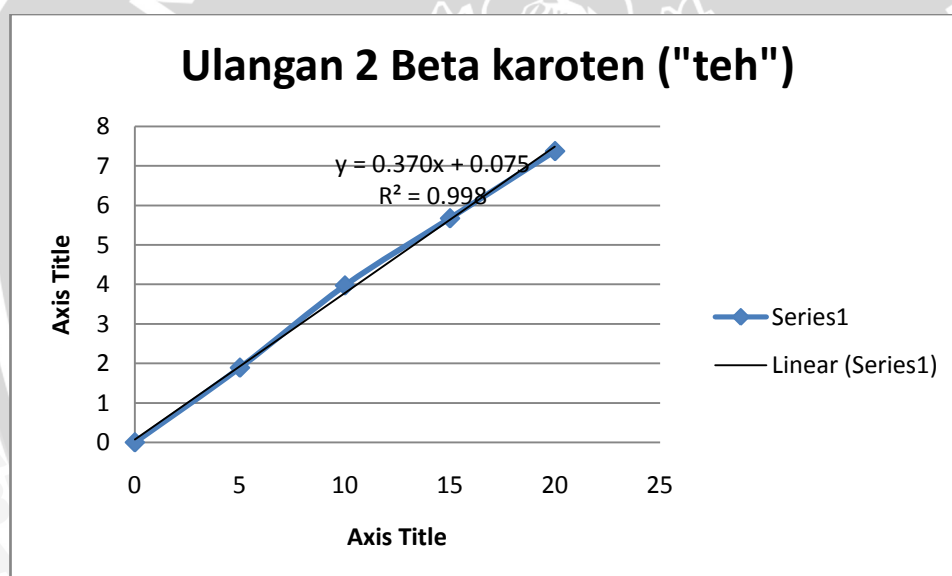
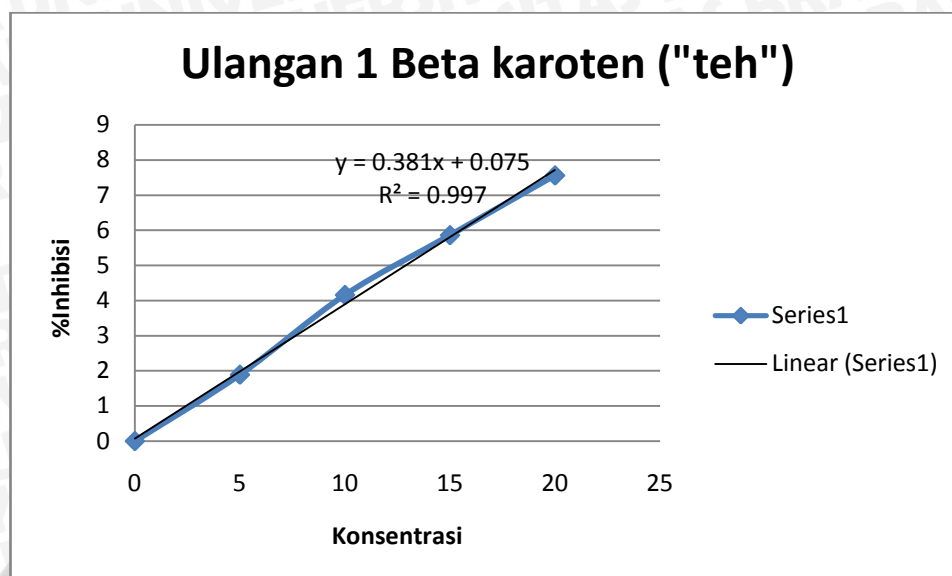
Lampiran 11. Data antioksidan beta karoten "teh"

Konsentrasi (ppm)	ulangan	m smpl	Absorbansi	% aktivitas	IC50 1 (ppm)	IC50 2 (ppm)	Rata-Rata (ppm)
0	1	0.2	0.529	0.000	130.837	134.932	132.8845
	2	0.2	0.529	0.000			
5	1	0.2	0.519	1.890			
	2	0.2	0.519	1.890			
10	1	0.2	0.507	4.159			
	2	0.2	0.508	3.970			
15	1	0.2	0.498	5.860			
	2	0.2	0.499	5.671			
20	1	0.2	0.489	7.561			
	2	0.2	0.49	7.372			

Lampiran 12. Grafik %Inhibisi Beta karoten (segar) ulangan 1 dan 2



Lampiran 13. Grafik %Inhibisi Beta karoten ("teh") ulangan 1 dan 2



Lampiran 14. Perhitungan IC₅₀ Pigmen Beta Karoten

- **Ulangan 1 sampel segar beta karoten**

$$y = 0,400x + 0,264$$

$$R^2 = 0,995$$

$$50 - 0,264 = 0,400x$$

$$49,736 = 0,400x$$

$$x = \frac{49,736}{0,400}$$

$$x = 124,34 \text{ ppm}$$

- **Ulangan 2 sampel segar beta karoten**

$$y = 0,400x + 0,266$$

$$R^2 = 0,993$$

$$50 - 0,226 = 0,400x$$

$$49,774 = 0,400x$$

$$x = \frac{49,774}{0,400}$$

$$x = 124,435 \text{ ppm}$$

- **Ulangan 1 sampel basa kering beta karoten**

$$y = 0,381x + 0,075$$

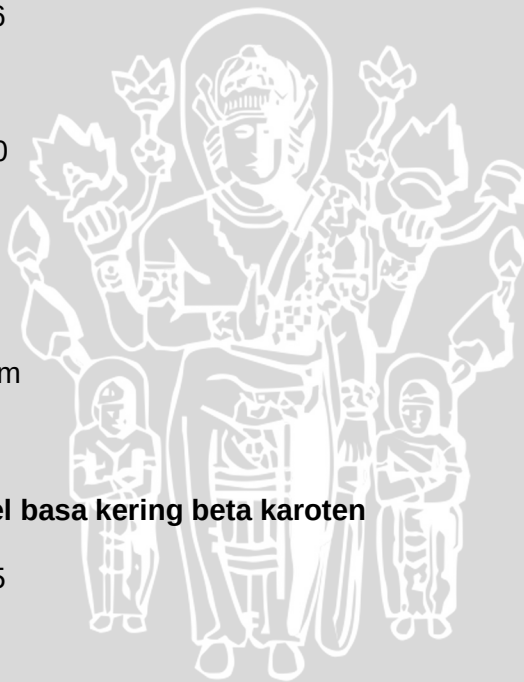
$$R^2 = 0,997$$

$$50 - 0,075 = 0,381x$$

$$49,925 = 0,381x$$

$$x = \frac{49,849}{0,381}$$

$$x = 130,837 \text{ ppm}$$



- **Ulangan 2 sampel basa kering beta karoten**

$$y = 0,370x + 0,075$$

$$R = 0,998$$

$$50 - 0,075 = 0,370x$$

$$x = \frac{49,736}{0,370}$$

$$x = 134,932 \text{ ppm}$$

- **Rata-Rata sampel segar dan basa kering beta karoten**

$$\text{Ulangan 1-2 segar : } 124,340 + 124,435 = \frac{248,775}{2}$$

$$= 124,3875$$

$$\text{Ulangan 1-2 basa kering : } 130,387 + 134,932 = \frac{265,769}{2}$$

$$= 132,8845$$



Lampiran 15. Data Hasil Uji T

Konsentrasi (ppm)	Hasil IC ₅₀ Segar			Hasil IC ₅₀ "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	-4.2533	8.5066	0	-3.8373	7.6746
	0	-4.2533	8.5066	0	-3.8373	7.6746
5	2.457	-1.7963	3.5926	1.89	-1.9473	1.9473
	2.268	-1.9853	3.9706	1.89	-1.9473	1.9473
10	4.537	0.2837	0.5674	4.159	0.3217	0.6434
	4.537	0.2837	0.5674	3.97	0.1327	0.2654
15	6.238	1.9847	3.9694	5.86	2.0227	4.0454
	6.427	2.1737	4.3474	5.671	1.8337	3.6674
20	8.129	3.8757	7.7514	7.561	3.7237	7.4474
	7.94	3.6867	7.3734	7.372	3.5347	7.0694
Total	42.533	0	49.1528	38.373	0	42.3822
Rerata	4.2533			3.8373		

1. Perhitungan Standart Defiasi (SD)

$$\begin{aligned}
 SD_1 &= \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{x})^2}{n-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{(49,1528)^2}{10-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{2415,998}{10-1}} \\
 &= \sqrt{268,44} \\
 &= 16,384 (s_2) \text{ (pembilang)}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SD_1 &= \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{x})^2}{n-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{(42,3822)^2}{10-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{1796,250}{9}} \\
 &= \sqrt{199,58} \\
 &= 14,127 (s_1) \text{ (penyebut)}
 \end{aligned}$$

2. Perhitungan F hitung

$$\begin{aligned}
 S_i^2 &= \frac{S_1^2}{S_2^2} \\
 &= \frac{(16,384)^2}{(14,127)^2}
 \end{aligned}$$

$$= \frac{268,435}{199,572}$$

$$= 1,345$$

Dengan $df = n_1 - 1$

$$= 10 - 1 = 9$$

dan $= n_2 - 1$

$$= 10 - 1 = 9$$

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

F hitung > F tabel H_0 diterima dan H_1 ditolak

Perhitungan T Hitung

$$T_{hitung} = \frac{x_1 - x_2}{SP \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}}$$

dimana Perhitungan $SP = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{Df}}$ dengan $Df = n_1 + n_2 - 2$

$$Df = n_1 + n_2 - 2$$

$$= 10 + 10 - 2$$

$$= 18$$

$$SP = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{Df}}$$

$$= \sqrt{\frac{(10-1)(16,384)^2 + (10-1)(14,127)^2}{10}}$$

$$= \sqrt{\frac{(9)(268,435) + (9)(199,572)}{10}}$$

$$= \sqrt{\frac{(2415,9) + (1796,1)}{10}}$$

$$= \sqrt{\frac{4212}{10}}$$

$$= \sqrt{234}$$

$$= 15,297$$

$$\begin{aligned}\text{maka } T_{\text{hitung}} &= \frac{x_1 - x_2}{SP \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}} \\ &= \frac{38,373 - 42,533}{15,29 \sqrt{(1/10) + (1/10)}} \\ &= \frac{-4,16}{15,29 \sqrt{(0,1) + (0,1)}} \\ &= \frac{-4,16}{1,83 \sqrt{0,2}} \\ &= \frac{-4,16}{6,7276} = 0,6183\end{aligned}$$



Lampiran 16. Foto Pengolahan Teh



a.



b.



c.



d.



e.



f.



g.



h.



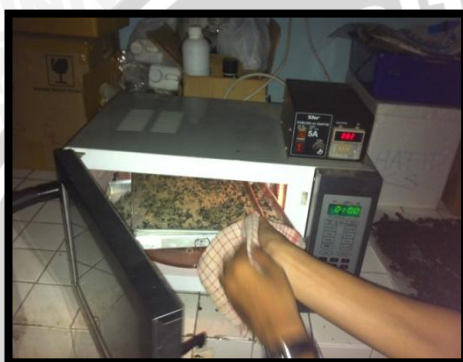
i.



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 17. Foto Proses Ekstraksi



a.



b.



c.



d.



e.



f.

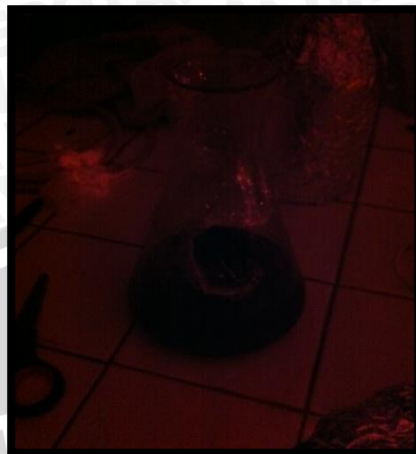
Keterangan :

- 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

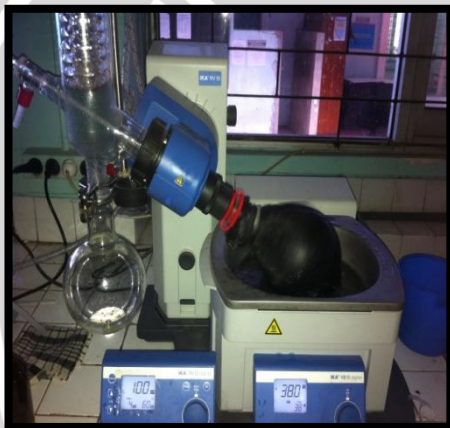
Lampiran 18. Foto Proses Partisi, Evaporator dan Gas N₂



a.



b.



c.

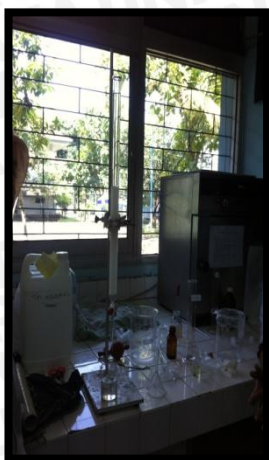


d.

Keterangan :

- a. Proses Fraksinasi
- b. Hasil Fase Atas
- c. Proses Rotary Evaporator Vacuum
- d. Proses Pengeringan menggunakan Gas N₂

Lampiran 19. Foto Proses Kromatografi Kolom



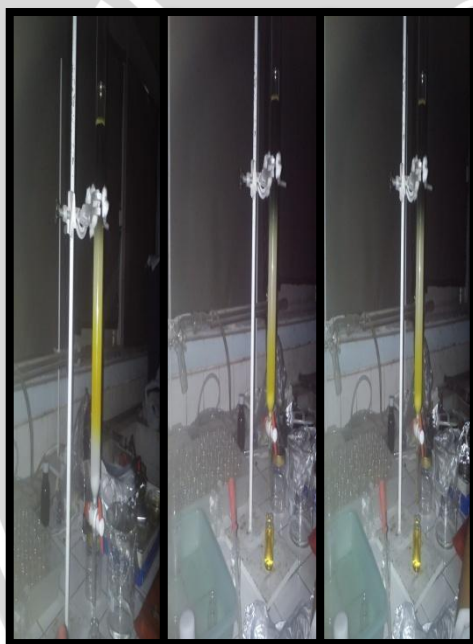
a.



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 Fukosantin hasil isolasi kromatografi kolom

Lampiran 20. Proses Identifikasi Pigmen Beta Karoten



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 21. 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 22. 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				

