

**UJI TOKSISITAS FUKOSANTIN DARI *Sargassum filipendula*  
TERHADAP *Artemia salina* DENGAN METODE  
BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)**

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

Oleh :

**PUTRI RAHAYU SEPTIKA DEWI  
NIM. 125080300111031**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2016**

UJI TOKSISITAS FUKOSANTIN DARI *Sargassum filipendula*  
TERHADAP *Artemia salina* DENGAN METODE  
BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)

SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

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

Oleh :  
PUTRI RAHAYU SEPTIKA DEWI  
NIM. 125080300111031



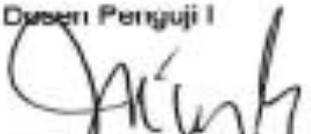
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016

SKRIPSI  
UJI TOKSISITAS FUKOSANTIN DARI *Sargassum filipendula*  
TERHADAP *Artemia salina* DENGAN METODE  
BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)

Oleh :  
PUTRI RAHAYU SEPTIKA DEWI  
NIM. 125080300111031

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 15 Juli 2016  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

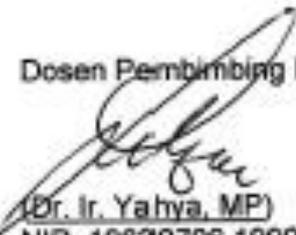
Dosen Penguji I

  
(Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP)  
NIP. 19680919 200501 1 001  
Tanggal : ~~10 8 AUG 2016~~

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I,

  
(Dr. Ir. Kartini Zailanie, MS)  
NIP. 19550503 198503 2 001  
Tanggal 0 8 AUG 2016

Dosen Pembimbing II

  
(Dr. Ir. Yahya, MP)  
NIP. 19630706 199003 1 003  
Tanggal : \_\_\_\_\_  
0 8 AUG 2016



Mengetahui,  
Ketua Jurusan  
(Dr. Ir. Arning Widieng E., MS)  
NIP. 19620805 198603 2 001  
Tanggal : 0 8 AUG 2016

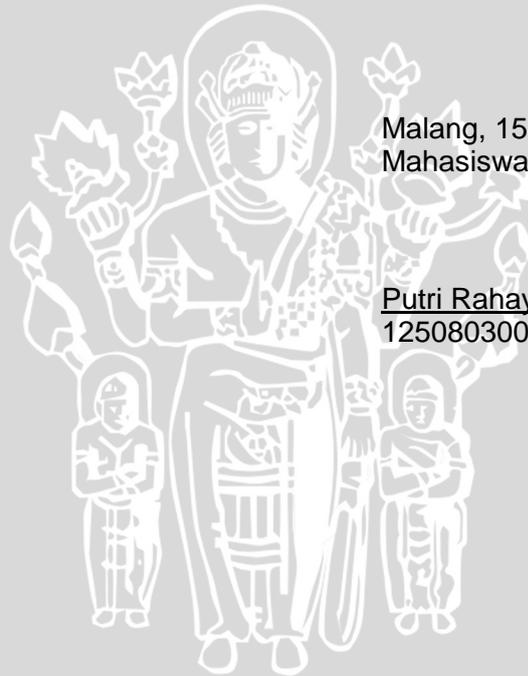


## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 15 Juli 2016  
Mahasiswa

Putri Rahayu S. D.  
125080300111031



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya ucapkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan hidayah-Nya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tugas akhir dengan penulisan skripsi yang berjudul "Uji Toksisitas Fukosantin dari *Sargassum filipendula* Terhadap *Artemia salina* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*".

Dengan terselesainya penulisan laporan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan kekuatan dan hikmah sehingga Laporan skripsi ini dapat selesai.
2. Ayah Suyadi (Alm) dan Mama Sujatwati yang telah memberikan do'a dan dorongan serta selalu memberi supportnya dalam setiap langkahku berjalan.
3. Dr. Ir. Kartini Zailanie, MS. dan Dr. Ir. Yahya, MP. selaku dosen pembimbing yang selalu memberi arahan dan kritikan yang membangun selama penyusunan laporan.
4. Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP. selaku dosen penguji yang selalu memberikan masukan serta kritikan yang dapat membangun dan menyempurnakan laporan skripsi ini.
5. Tim pigmen (Rany, lyuz, Fafa, Fitri dan Amba) yang mau membagi keluh kesah, dinginnya lantai laboratorium dan menghabiskan waktu untuk penelitian dan mengerjakan laporan ini dan teman-teman bimbingan skripsi lainnya.
6. Mbak Yuni, Mas Danang dan Mas Adi yang selalu menyayangi dan memberikan semangat untuk menyelesaikan laporan ini
7. Rima, Titis, Ira yang selalu menemani dan memberi dukungan disaat sudah penat dengan laporan.

8. Kos Kertosariro yang selalu memberikan keceriaan.
9. Teman-teman THP '12 yang selalu memberi dorongan dan arahan sehingga membantu penulis dalam menyelesaikan laporan ini.
10. Serta semua orang sekitar yang telah memberikan waktu dan tenaganya untuk mensupport saya dalam penelitian dan mengerjakan laporan ini.

Penulis menyadari dalam laporan ini tentunya ada kekurangan, maka diharapkan kritik dan saran sehingga dapat menjadi lebih sempurna. Semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya, dan bagi pembaca pada umumnya.

Malang, 15 Juli 2016

Penulis



## RINGKASAN

**Putri Rahayu Septika Dewi.** Laporan Skripsi. Uji Toksisitas Fukosantin dari *Sargassum filipendula* Terhadap *Artemia salina* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Dibawah dosen pembimbing **Dr. Ir. Kartini Zailanie, MS.** dan **Dr. Ir. Yahya, MP.**

---

*Sargassum filipendula* merupakan salah satu jenis *Phaeophyceae* atau alga coklat. Rumput laut coklat memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai fitofarmaka karena kandungan fukosantin yang tinggi. Fukosantin merupakan salah satu pigmen warna yang dominan pada rumput laut coklat dengan rumus  $C_{42}H_{58}O_6$  dan bermanfaat sebagai antikanker. Bahan yang diperkirakan memiliki sifat antikanker harus melalui tahap pendaluan diantaranya dengan uji toksisitas yang dapat menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2016 di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Mineral dan Material Maju Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif ini ingin mencoba menguji jenis-jenis teori, konsep-konsep baru dan pengembangan baru dengan menggunakan metodologi yang sudah ada. Isolasi pigmen dengan kromatografi kolom yang kemudian diidentifikasi menggunakan KLT, Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Pigmen fukosantin diuji toksisitas dengan metode BSLT. Hasil penelitian ini didapatkan eluat pigmen dari kromatografi kolom berwarna orange yang memiliki nilai  $R_f$  0,27. Hasil spektrofotometer UV-Vis didapat nilai absorbansi 447,17 nm dan kadar fukosantin 0,0189%. Pembacaan FTIR menunjukkan adanya gugus C-H Alkena, C-H cincin aromatik, C-O alcohol / eter / asam karboksilat / ester, O-H alkohol ikatan hydrogen / fenol, C-H alkana serta C=O aldehid / keton / asam karboksilat / ester. Nilai  $LC_{50}$  pigmen fukosantin sebesar 282,31  $\mu\text{g/mL}$ , namun pada hasil ini fukosantin belum memberikan efek secara signifikan terhadap *Artemia salina* karena sifat fukosantin yang non polar belum tercampur dengan media uji.

Dari penelitian yang dilakukan, perlu penelitian lebih lanjut yang membahas tentang potensi fukosantin sebagai fitofarmaka dengan metode dan alat yang lebih baik sehingga diharapkan dapat diaplikasikan langsung pada dunia kesehatan.

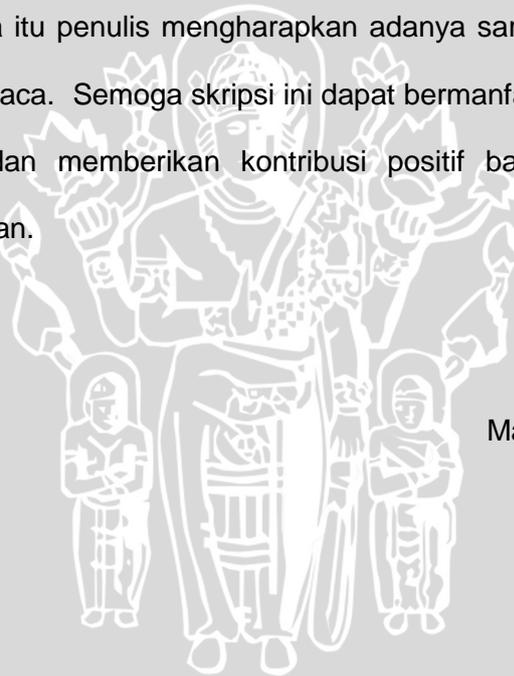
## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kehadiran Allah SWT atas rahmat dan hidayahnya yang telah diberikan kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan Laporan Skripsi penelitian yang berjudul Uji Toksisitas Fukosantin dari *Sargassum filipendula* Terhadap *Artemia salina* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi isolasi dan identifikasi fukosantin serta pengujian  $LC_{50}$  dengan metode BSLT.

Penulis menyadari bahwa laporan sederhana ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang membangun dari pembaca. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang membutuhkan dan memberikan kontribusi positif bagi perkembangan perikanan di masa depan.

Malang, 15 Juli 2016

Penulis



DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
RINGKASAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Kegunaan.....	3
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Fukosantin.....	4
2.2 Sargassum filipendula.....	5
2.3 Larutan (bahan kimia).....	6
2.3.1 Metanol (CH <sub>3</sub> OH).....	7
2.3.2 Aseton (CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> ).....	8
2.3.3 Dietil Eter (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O).....	9
2.3.4 Etil Asetat (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ).....	9
2.3.5 Heksan (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ).....	10
2.4 Toksisitas.....	11
2.4.1 LC <sub>50</sub> .....	12
2.4.2 BSLT.....	12
2.5 Artemia.....	12
3. METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.2 Materi Penelitian.....	15
3.2.1 Bahan Penelitian.....	15
3.2.2 Alat Penelitian.....	16
3.3 Metode Penelitian.....	16
3.3.1 Metode Eksploratif.....	16
3.3.2 Rancangan Penelitian.....	17
3.4 Prosedur Penelitian.....	19
3.4.1 Ekstraksi.....	19
3.4.2 Fraksinasi.....	20
3.4.3 Evaporasi.....	21
3.4.4 Isolasi Kromatografi Kolom.....	22
3.4.5 KLT.....	25
3.4.6 Spektrofotometer UV-Vis.....	27

3.4.7 FTIR ..... 30

3.4.8 Uji Toksisitas BSLT..... 31

3.5 Analisa Data ..... 32

4. HASIL DAN PEMBAHASAN ..... 33

4.1 Hasil Penelitian..... 33

4.2 Pembahasan ..... 34

4.2.1 Kromatografi Kolom ..... 34

4.2.2 KLT..... 35

4.2.3 Spektrofotometer UV-Vis ..... 36

4.2.4 FTIR ..... 37

4.2.5 Rendemen Ekstrak ..... 39

4.2.6 BSLT ..... 39

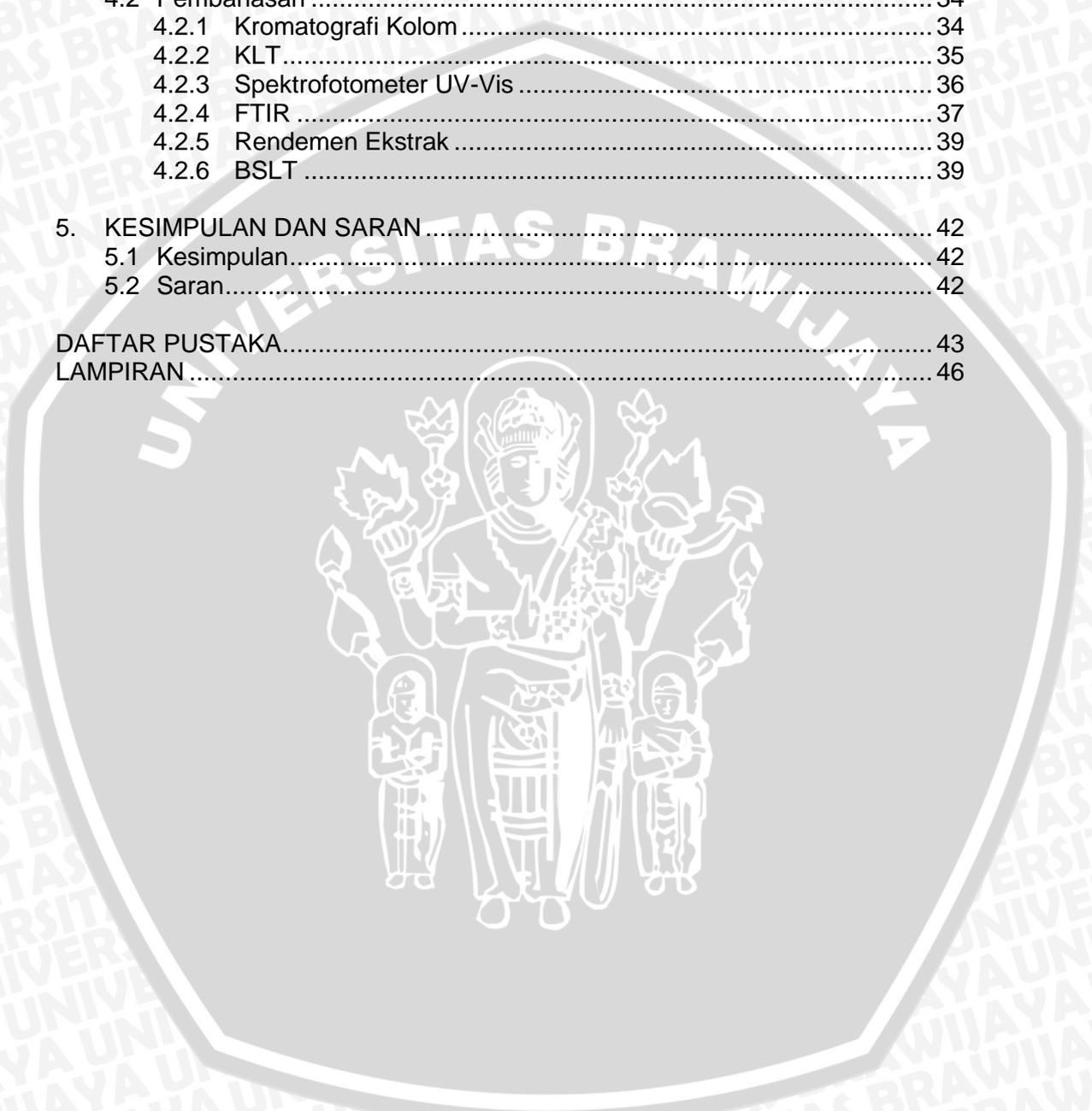
5. KESIMPULAN DAN SARAN ..... 42

5.1 Kesimpulan..... 42

5.2 Saran..... 42

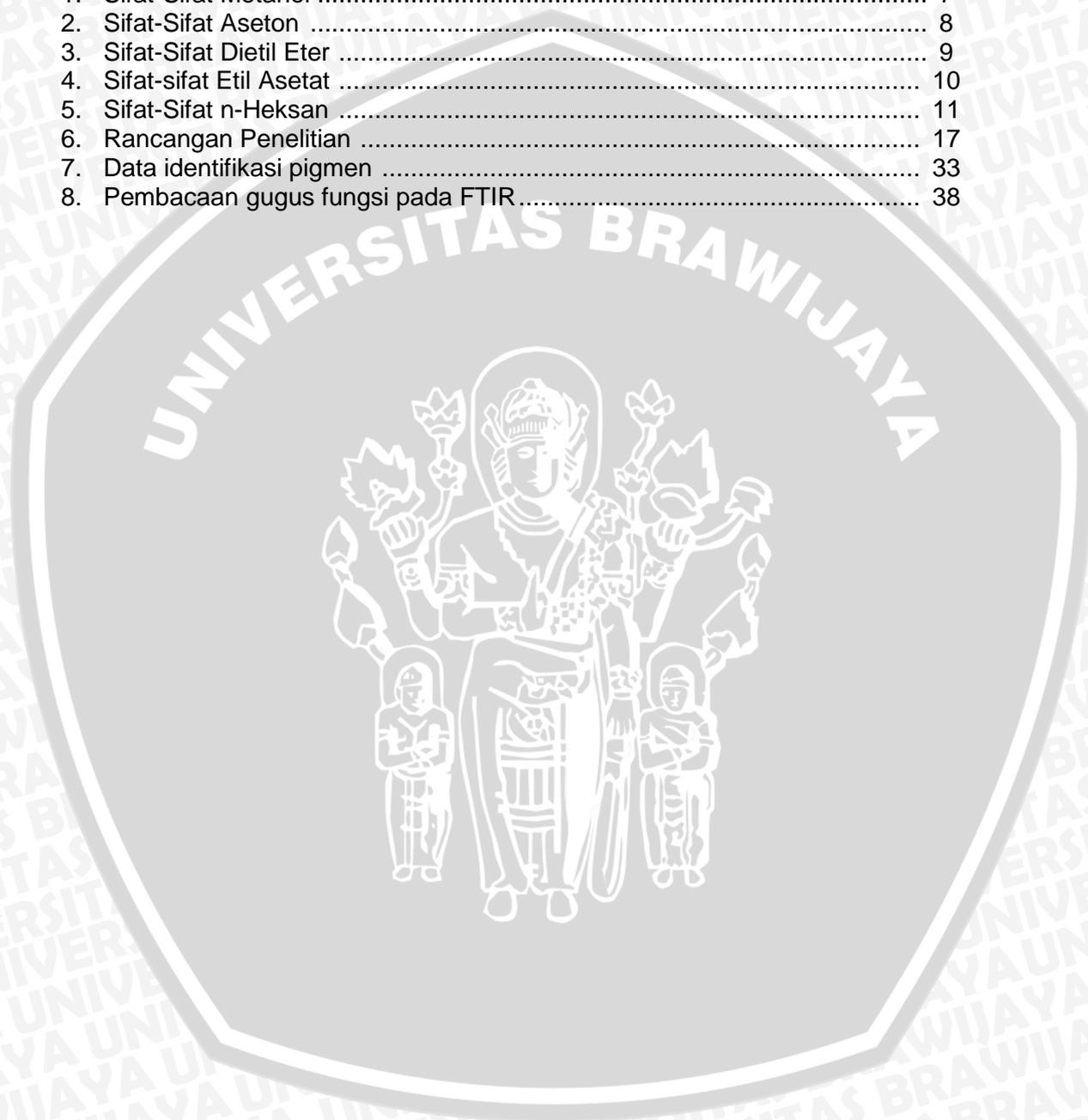
DAFTAR PUSTAKA..... 43

LAMPIRAN ..... 46



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat-Sifat Metanol .....	7
2. Sifat-Sifat Aseton .....	8
3. Sifat-Sifat Dietil Eter .....	9
4. Sifat-sifat Etil Asetat .....	10
5. Sifat-Sifat n-Heksan .....	11
6. Rancangan Penelitian .....	17
7. Data identifikasi pigmen .....	33
8. Pembacaan gugus fungsi pada FTIR.....	38



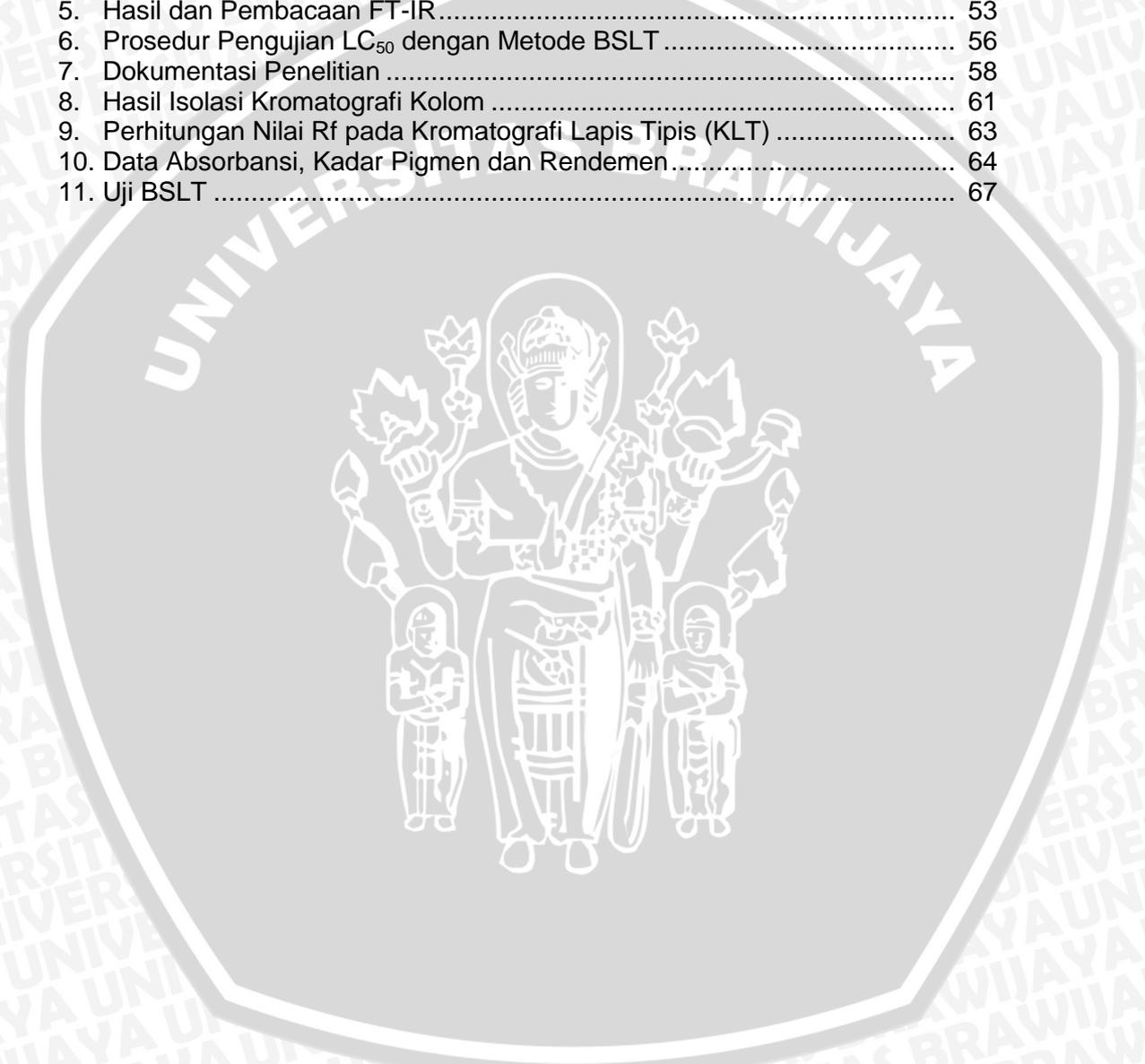
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur molekul fukosantin.....	4
2. <i>Sargassum filipendula</i> .....	6
3. Struktur molekul metanol .....	8
4. Struktur molekul aseton .....	8
5. Struktur molekul dietil eter .....	9
6. Struktur molekul etil asetat .....	10
7. Struktur molekul n-heksan .....	10
8. <i>Artemia salina</i> .....	13
9. Morfologi artemia .....	14
10. Diagram alir penelitian .....	18
11. Rotary vacuum evaporator.....	21
12. Diagram alir isolasi pigmen dengan kromatografi kolom .....	23
13. Skema kromatografi Lapis .....	26
14. Diagram Alir Analisa Pigmen dengan Spektrofotometer UV-Vis .....	28
15. Spektrofotometer UV-Vis .....	29
16. Alat spektroskopi FTIR.....	30
17. Prosedur analisa gugus fungsi dengan FTIR .....	30
18. Prosedur uji BSLT .....	31
19. Proses isolasi dengan kromatografi kolom .....	34
20. Pigmen hasil isolasi .....	35
21. Hasil KLT pigmen fukosantin .....	35
22. Absorbansi fukosantin dengan spektrofotometer UV-Vis.....	36
23. Hasil FTIR.....	37
24. Persentase kematian <i>Artemia salina</i> berdasarkan dosis fukosantin .....	39
24. Nilai LC <sub>50</sub> pada tiap ulangan .....	40



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen.....	47
2. Prosedur Isolasi dengan Kromatografi Kolom.....	48
3. Prosedur Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	51
4. Prosedur Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	52
5. Hasil dan Pembacaan FT-IR.....	53
6. Prosedur Pengujian LC <sub>50</sub> dengan Metode BSLT.....	56
7. Dokumentasi Penelitian.....	58
8. Hasil Isolasi Kromatografi Kolom.....	61
9. Perhitungan Nilai R <sub>f</sub> pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	63
10. Data Absorbansi, Kadar Pigmen dan Rendemen.....	64
11. Uji BSLT.....	67



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Rumput laut merupakan salah satu komoditi ekspor yang potensial. Produksi rumput laut di Kabupaten Sumenep tahun 2014 mencapai 583.691,05 ton (DKP, 2015). Selain sebagai makanan dan minuman, rumput laut juga berguna sebagai obat-obatan (Khotimah *et al.*, 2013). Senyawa bahan alam dari makroalga telah terbukti menjadi salah satu sumber senyawa bioaktif diantaranya sebagai antimikroba dan antitumor (Fajarningsih *et al.*, 2008). Rumput laut berdasarkan warna *thallus* dikelompokkan menjadi 3 jenis, yaitu rumput laut merah (*Rhodophyta*), rumput laut hijau (*Chlorophyta*) dan rumput laut cokelat (*Phaeophyta*). Jenis rumput laut cokelat banyak ditemukan di perairan Pulau Talango, Sumenep, Madura, namun belum dibudidayakan dan dikembangkan secara optimal (Limantara dan Heriyanto, 2010).

Warna rumput laut cokelat berasal dari salah satu pigmen dominan yang terdapat dalam rumput laut ini yaitu fukosantin, yang bermanfaat sebagai anti-kanker dan anti-obesitas (Limantara dan Heriyanto, 2011). Fukosantin dari alga cokelat berpotensi untuk dikembangkan sebagai antioksidan dan agen kemopreventif karena kemampuannya dalam meredam radikal bebas (Nursid *et al.*, 2013). Penelitian uji toksisitas pada *Artemia salina* merupakan langkah awal untuk melihat potensi suatu senyawa sebagai fitofarmaka (Sanjayasari dan Pliliang, 2011). Uji toksisitas dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik dan untuk meneliti batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan senyawa yang ada dalam tumbuhan tersebut (Agustini, 2002).

Carballo *et al.* (2002) dalam Fajarningsih *et al.* (2008) mengungkapkan kelayakan penggunaan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk pengujian aktivitas farmakologi produk bahan alam dari laut yang menunjukkan

adanya korelasi positif antara BSLT dan uji sitotoksik terhadap sel tumor paru-paru A-549 dan sel tumor kolon HT-29, dimana 50% spesies yang aktif dalam BSLT juga aktif dalam uji sitotoksik. Sementara itu, penelitian Fajarningsih *et al.* (2006) dalam Fajarningsih *et al.* (2008) menunjukkan bahwa BSLT dapat mengeliminasi 53,9% sampel spons dan soft coral yang tidak aktif dalam uji sitotoksik terhadap sel tumor HeLa. Aktivitas biologis suatu senyawa dalam menunjukkan adanya kandungan zat aktif yang bersifat sitotoksik dapat dari nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh (Agustini, 2002).

Meskipun penelitian fukosantin sudah banyak dilakukan namun pengujian toksisitas fukosantin dari *Sargassum filipendula* sebagai potensi sebagai anti kanker belum banyak dilakukan. Penelitian ini untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  pigmen fukosantin dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa anti kanker.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan hasil uraian di atas, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Berapakah kandungan fukosantin yang terdapat pada *Sargassum filipendula* ?
2. Berapakah besar nilai  $LC_{50}$  fukosantin dari *Sargassum filipendula* terhadap hewan uji *Artemia salina* ?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui kandungan fukosantin dari *Sargassum filipendula*
2. Mendapatkan nilai  $LC_{50}$  fukosantin dari *Sargassum filipendula* terhadap hewan uji *Artemia salina*.

### 1.4 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan data dan informasi terbaru kepada pihak-pihak yang berkepentingan terhadap jumlah kandungan fukosantin yang terdapat pada spesies alga coklat khususnya *Sargassum filipendula* terhadap toksisitas *Artemia salina* sehingga dapat dijadikan acuan dari penelitian terdahulu serta acuan penelitian terkait di masa mendatang.

### 1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Perekayasa Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Mineral dan Material Maju Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang pada bulan Januari sampai Maret 2016.



Kandungan fukosantin ini sangat dipengaruhi oleh tempat tumbuh dari setiap rumput laut cokelat. Rumput laut cokelat yang tumbuh pada dasar laut akan meningkatkan kandungan pigmen fotosintetiknya sebagai respon akan ketersediaan cahaya yang rendah (Limantara dan Heriyanto, 2010). Fukosantin merupakan zat warna yang terdapat di dalam sel, khususnya pada kloroplas dan dapat diperoleh dengan pelarut organik, DMSO dan air, aseton, metanol dan air melalui pemecahan dinding sel. Sedangkan untuk mendapatkan fukosantin murni dilakukan dengan kromatografi kolom. Fukosantin mampu mengabsorpsi energi warna hijau-biru dan melewatkannya ke klorofil untuk proses fotosintesis, aktivitas tersebut ditunjukkan dengan sifat absorbansi pada panjang gelombang 400-540 nm (Zailanie, 2014).

## 2.2 *Sargassum filipendula*

*Sargassum* mempunyai 3 sifat yang dapat dijadikan ciri yaitu adanya pigmen coklat yang menutupi warna hijau, hasil dari fotosintesis disimpan dalam bentuk laminaran dan algin serta adanya fladel (Putranti, 2013). *Sargassum filipendula* merupakan salah satu marga *Sargassum* termasuk dalam kelas *Phaeophyceae* atau rumput laut cokelat (Indriani, 2010). Gambar *Sargassum filipendula* segar dapat dilihat pada Gambar 2. Klasifikasi dari *Sargassum filipendula* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Phaeophyta  
Class : Phaeophyceae  
Ordo : Fucales  
Family : Sargassaceae  
Genus : *Sargassum*  
Spesies : *Sargassum filipendula*



Gambar 2. *Sargassum filipendula* (Google Image, 2016).

*Sargassum filipendula* merupakan salah satu jenis alga yang masuk pada kelas *Phaeophyceae* atau ganggang coklat. Alga coklat berbentuk benang atau lembaran, bahkan ada yang menyerupai tumbuhan tingkat tinggi dengan bagian-bagian serupa akar, batang dan daun. Habitat alga coklat tumbuh di perairan pada kedalaman 0,5-10 m ada arus dan ombak. Alga coklat hidup di perairan yang jernih yang mempunyai substrat dasar batu karang dan dapat tumbuh subur pada daerah tropis. Alga coklat berupa tumbuh-tumbuhan bercabang berbentuk benang kecil yang halus (*Ectocarpus*), bertangkai pendek dan bertalus lebar. Selain itu *Sargassum filipendula* juga mempunyai pigmen klorofil a dan b,  $\beta$ -karoten, viosalantin dan fukosantin (Khotimah *et al.*, 2013).

### 2.3 Bahan kimia

Larutan adalah campuran homogen terdiri dari dua atau lebih zat. Larutan terdiri dari pelarut dan zat terlarut. Pelarut adalah zat yang berada dalam larutan pada jumlah besar, sedangkan zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut (*solute*). Pelarut yang baik untuk proses ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan tinggi terhadap zat yang diekstraksi (Sastrohamidjoyo, 2007). Menurut Indriani (2010), berdasarkan sifat kelarutannya pelarut dibagi menjadi polar dan non polar. Pelarut polar adalah pelarut yang mampu melarutkan zat ionik dan zat polar lainnya karena mampu mengurangi gaya tarik menarik antara

elektrolit kuat dan lemah sehingga mampu memecah ikatan kovalen dan elektrolit yang berionisasi lemah akibat dari pembentukan jembatan hidrogen dengan elektrolit. Sedangkan pelarut non polar adalah pelarut yang mampu melarutkan zat non polar sebab tidak dapat mengurangi gaya tarik menarik antara ikatan kovalen dan elektrolit yang berionisasi lemah karena tidak mampu membentuk jembatan hidrogen dengan non elektrolit (Indriani, 2010).

### 2.3.1 Metanol (CH<sub>3</sub>OH)

Metanol merupakan monohidrat dimana setiap molekulnya mengandung satu gugus hidroksil. Pada keadaan atmosfer berupa cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan dari etanol) (Susiana, 2014). Metanol memiliki struktur molekul kecil yang mampu menembus semua jaringan sel untuk menarik senyawa aktif keluar, metanol dapat melarutkan semua senyawa organik, baik polar maupun non polar (Wardani, 2010). Sifat-sifat metanol dapat dilihat pada Tabel 1.

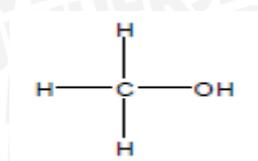
Tabel 1. Sifat-Sifat Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu, karbinol
2.	Rumus kimia	CH <sub>3</sub> OH
3.	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	-97°C
5.	Titik didih	64,7°C
6.	Massa molar	32,04 g/mol
7.	Densitas	0,7918 g/cm <sup>3</sup> , cair
8.	Titik nyala	11°C
9.	Konstanta dielektrik	33

Sumber: Indriani (2010).

Metanol dikenal menjadi pelarut terbaik untuk ekstraksi fukosantin dari rumput laut segar. Metanol merupakan salah satu pelarut organik yang dapat bercampur dengan air dan secara umum digunakan dalam proses ekstraksi karotenoid. Pelarut metanol dapat mengekstrak fukosantin relatif optimal atau

lebih efektif dibandingkan dengan etanol, DMSO, asetonitril dan aseton (Limantara dan Heriyanto, 2011). Struktur metanol dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur molekul metanol (Anam *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )

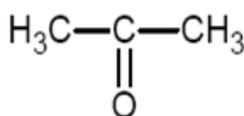
Aseton mempunyai nama lain dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul dari aseton adalah  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ . Aseton biasa digunakan sebagai pelarut karena mempunyai sifat higroskopis, sangat volatil, tidak beresidu dan mudah terbakar. Kegunaan aseton antara lain adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, campuran adesif, parfum, pembersih, bahan campuran resin dan lain sebagainya (Indriani, 2010). Sifat-sifat aseton dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat-Sifat Aseton

No.	Karakteristik	Aseton
1.	Nama lain	$\beta$ -ketopropana, dimetil keton, imetilformaldehida, DMK
2.	Rumus kimia	$\text{CH}_3\text{COCH}_3$
3.	Sifat	Bening, larut dalam air
4.	Titik leleh	$-94^\circ\text{C}$
5.	Titik didih	$57^\circ\text{C}$
6.	Massa molar	58,08 g/mol
7.	Densitas	$0,7918 \text{ g/cm}^3$ , cair
8.	Konstanta dielektrik	20

Sumber: Ariyani *et al.*, (2008).

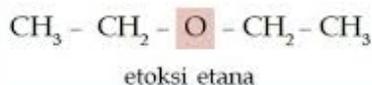
Pigmen alga memiliki sifat kepolaran beragam dan aseton merupakan pelarut yang sesuai untuk ekstraksi pigmen yang sifatnya hidrofilik maupun lipofilik (Zailanie, 2012). Struktur aseton dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur molekul aseton (Google Image, 2016).

### 2.3.3 Dietil Eter (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O)

Dietil eter (eter dan etoksi etana) adalah cairan mudah terbakar yang jernih, tak berwarna, dan bertitik didih rendah serta berbau khas. Anggota paling umum dari kelompok campuran kimiawi yang secara umum dikenal sebagai eter ini merupakan sebuah isomernya butanol. Berformula CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, dietil eter digunakan sebagai pelarut biasa dan telah digunakan sebagai anestesi umum (Susiana, 2014). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 3. Struktur dietil eter dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur molekul dietil eter (Google Image, 2016).

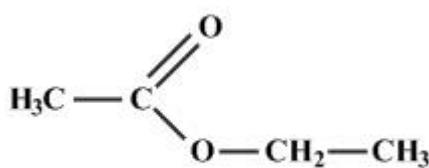
Tabel 3. Sifat-Sifat Dietil Eter

No.	Karakteristik	Dietil Eter
1.	Nama lain	Eter dan etoksi etana
2.	Rumus kimia	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
3.	Sifat	Mudah menguap, tidak berwarna
4.	Titik leleh	-116,3°C
5.	Titik didih	34,6°C
6.	Titik nyala	-45°C
7.	Massa molar	74,12 g/mol
8.	Konstanta dielektrik	20

Sumber: Indriani (2010)

### 2.3.4 Etil Asetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>3</sub>. Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tak berwarna, memiliki aroma yang khas (Indriani, 2010). Sifat-sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 4. Struktur dietil eter dapat dilihat pada Gambar 6.



Etil Asetat

Gambar 6. Struktur molekul etil asetat (Google Image, 2016).

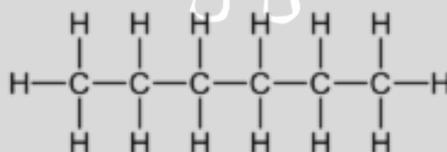
Tabel 4. Sifat-sifat Etil Asetat

No.	Karakteristik	Etil asetat
1.	Nama lain	Etil ester, Ester asetat, Ester etanol
2.	Rumus kimia	$C_4H_8O_2$ , $CH_3CH_2OC(O)CH_3$
3.	Sifat	Cairan tak berwarna
4.	Titik leleh	$-83.6^\circ C$ (189.55 K)
5.	Titik didih	$77.1^\circ C$ (350.25 K)
6.	Densitas	$0,897 \text{ g/cm}^3$
7.	Massa molar	$88,12 \text{ g/mol}$
8.	Konstanta dielektrik	6

Sumber: Indriani (2010)

### 2.3.5 Heksan ( $C_6H_{14}$ )

Heksan adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia  $C_6H_{14}$  (isomer utama n-heksan memiliki rumus  $CH_3(CH_2)_4CH_3$ ). Awalan heks- merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran -ana berasal dari alkana, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atomatom karbon tersebut (Indriani, 2010). Sifat heksan dilihat pada Tabel 5. Struktur dietil eter dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur molekul n-heksan (Google Image, 2016).

Tabel 5. Sifat-Sifat n-Heksan

No.	Karakteristik	N-Heksan
1.	Nama lain	-
2.	Rumus kimia	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>
3.	Sifat	Bening, larut dalam pelarut organik dan alkohol, tidak larut air
4.	Titik leleh	-95,30°C
5.	Titik didih	68,5°C
6.	Massa molar	86.18 g/mol
7.	Konstanta dielektrik	1,89

Sumber: Ariyani *et al.*, (2008).

## 2.4 Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan mengamati kematian hewan percobaan dan respon kematian ini dianggap sebagai pengaruh senyawa yang diuji. Uji toksisitas dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik dan untuk meneliti batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan senyawa yang ada dalam tumbuhan tersebut. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT menggunakan *Artemia salina* karena mempunyai keunggulan seperti berkembangbiakan cepat, harga murah, metode percobaan mudah, sampel yang diperlukan sedikit, tidak memerlukan laboratorium yang khusus dan hasilnya dapat dipercaya. Sifat toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva udang (Agustini, 2002).

Tingkat toksisitas suatu ekstrak dapat diketahui dengan menghitung persentase kematian naupli artemia sebagai hewan uji dalam BSLT. Suatu ekstrak dianggap sangat toksik bila memiliki nilai LC<sub>50</sub> dibawah 30 ppm, dianggap toksik bila memiliki nilai LC<sub>50</sub> 30-1000 ppm dan dianggap tidak toksik bila nilai LC<sub>50</sub> diatas 1000 ppm. Tingkat toksisitas tersebut akan memberi makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antitumor (Aprilia *et al.*, 2012). Pengujian toksisitas pada *Artemia salina* dari subfraksi kromatografi kolom dilakukan untuk mengetahui tingkat toksisitas dari masing-masing fraksi (Tamat *et al.*, 2007).

#### 2.4.1 LC<sub>50</sub>

Uji mortalitas dilakukan dengan *Lethal concentration* 50% (LC<sub>50</sub>). LC<sub>50</sub> adalah suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50%. Nilai 50% per hari (LC<sub>50</sub> dalam unit waktu) ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi antara log konsentrasi dan mortalitas (%) (Atmoko dan Ma'ruf, 2009). Nilai konsentrasi letal tengahan (LC<sub>50</sub>) yaitu kadar yang menyebabkan 50% hewan uji mati pada waktu tertentu (Gaffar, 2010). Konsentrasi kematian (*Lethal Concentration*) 50% merupakan tingkat kematian artemia mencapai 50% dari total populasi. Penggunaan larva udang atau *artemia sp* yang telah diinkubasi selama 48 jam dianalogikan sebagai 1 sensitivitas sel kanker pada manusia (Sanjayasari dan Piliang, 2011).

#### 2.4.2 BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Metode prediksi BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) biasa dilakukan dalam uji pendahuluan untuk skrining atau penapisan aktivitas farmakologis pada produk alam. Metoda BSLT juga biasa dilakukan pada tahap pendahuluan dalam penapisan bahan-bahan yang diperkirakan memiliki sifat antitumor atau antikanker sebelum melangkah pada uji *in vitro* menggunakan sel lestari tumor. Metoda ini diketahui digunakan sebagai *bioassay guided fractionation* bahan alam, metoda pra-skrining penelitian sel tumor (Tamat *et al.*, 2007).

### 2.5 Artemia

*Artemia salina* Leach merupakan komponen dari invertebrata dari fauna pada ekosistem perairan laut. Udang renik ini mempunyai peranan yang penting dalam aliran energi dan makanan. Spesies invertebrata ini umumnya digunakan sebagai organisme sentinel sejati berdasarkan pada penyebaran, fasilitas

sampling dan karakteristik ekologi dan sensitifitasnya terhadap bahan kimia (Agustini, 2002). Gambar *Artemia salina* Leach dapat dilihat pada Gambar 8.

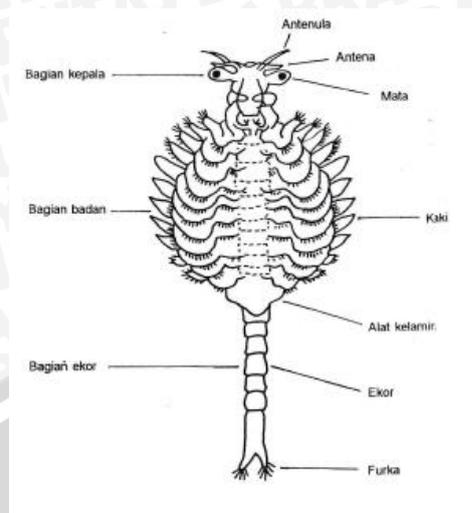
Klasifikasi dari *Artemia salina* Leach adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
Phylum : Arthropoda  
Class : Crustacea  
Subclass : Branchiopoda  
Ordo : Anostraca  
Family : Artemiidae  
Genus : Artemia  
Spesies : *A. salina* L.



Gambar 8. *Artemia salina* (Google Image, 2016).

Bentuk artemia dewasa menyerupai udang kecil. Ukurannya 10-20 mm. Bagian kepala berukuran lebih besar dan kemudian mengecil hingga ke bagian ekor. Panjang ekor kurang lebih sepertiga dari total panjang tubuh. Di bagian kepala terdapat sepasang mata dan sepasang antenula (sungut). Pada bagian tubuh terdapat sebelas pasang kaki atau secara khusus seperti torakopoda. Jumlah kakinya inilah yang membedakan artemia dengan spesies dari kelas Crustacea lainnya yang umumnya hanya memiliki sepuluh pasang kaki (Harefa, 2003). Untuk lebih jelasnya morfologi artemia dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Morfologi *Artemia salina* (Harefa, 2003).

Mortalitas *Artemia salina* L pada larutan ekstrak daun katuk (*Saoropus androgenus* (L) merr.) disebabkan senyawa fitokimia flavonoid, yang berperan sebagai anti oksidan dan anti kanker. Adanya flavonoid dalam lingkungan sel menyebabkan gugus  $\text{OH}^-$  pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel. Hal tersebut menyebabkan ter bendungnya transport aktif  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$ . Transport aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion  $\text{Na}^+$  yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran sel. Pecahnya membran sel inilah yang mengakibatkan kematian sel atau larva udang *Artemia salina* L. (Scheuer, 2004) dalam Sanjayasari dan Piliang (2011).

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Mineral dan Material Maju Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang pada bulan Januari sampai Maret 2016.

#### 3.2 Materi Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu rumput laut coklat *Sargassum fillipendula*, diambil dari perairan desa Cabiye, pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura dan *Artemia salina*. Adapun bahan kimia yang digunakan antara lain metanol PA (*pro analysis*), aseton PA, dietil eter PA, n-heksan PA, aquadest pH-7, etil asetat PA,  $\text{CaCO}_3$ , saturasi garam, air laut, gas Nitrogen ( $\text{N}_2$ ), air, *silica gel* F-254 (60 mesh), *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas saring kasar dan halus, kapas, pasir laut (*sea sand*), plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), kertas label, kertas tisu, kertas Koran dan kertas Whatman no. 42.

### 3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi, isolasi dan peralatan analisa. Alat yang digunakan untuk ekstraksi dan isolasi yaitu gunting, timbangan digital, *beakerglass* (ukuran 1000 mL, 500 mL, 250 mL), gelas ukur 100 mL, spatula, corong kaca, labu erlenmeyer 250 mL, corong pisah, *rotary vacuum evaporator*, sendok bahan, pipet tetes, *hot plate*, *magnetic* stirer, bola hisap, kolom kromatografi, statif, dan botol vial 10 ml. Adapun alat yang digunakan pada proses analisa, yaitu: penggaris, *cutter*, pensil, pipa kapiler, pinset, *beakerglass* 50 ml, pipet tetes, Spektrofotometer *UV-Vis* dan FTIR. Sedangkan alat yang digunakan dalam uji toksisitas, yaitu: toples kaca, selang dan aerator.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Metode Eksploratif

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif ini ingin mencoba menguji jenis-jenis teori, konsep-konsep baru dan pengembangan baru dengan menggunakan metodologi yang sudah ada. Hasil penelitian ini merupakan pengetahuan yang sangat bermanfaat untuk menjelaskan obyek penelitian (Aldita, 2015). Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah 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 (Indriani, 2010).

### 3.3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Rancangan Penelitian

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
0 µg/mL					
31,2 µg/mL					
62,5 µg/mL					
125 µg/mL					
250 µg/mL					
500 µg/mL					

Perhitungan ulangan menggunakan estimasi perhitungan dengan rumus *Frankle Wallen* yaitu:  $(np-1) - (p-1) \geq p(2)$  dengan  $n$  merupakan jumlah sampel tiap perlakuan dan  $p$  sebagai jumlah perlakuan. Penelitian ini menggunakan 6 perlakuan, maka jumlah hewan percobaan untuk masing-masing perlakuan menjadi:

$$(np-1) - (p-1) \geq p(2)$$

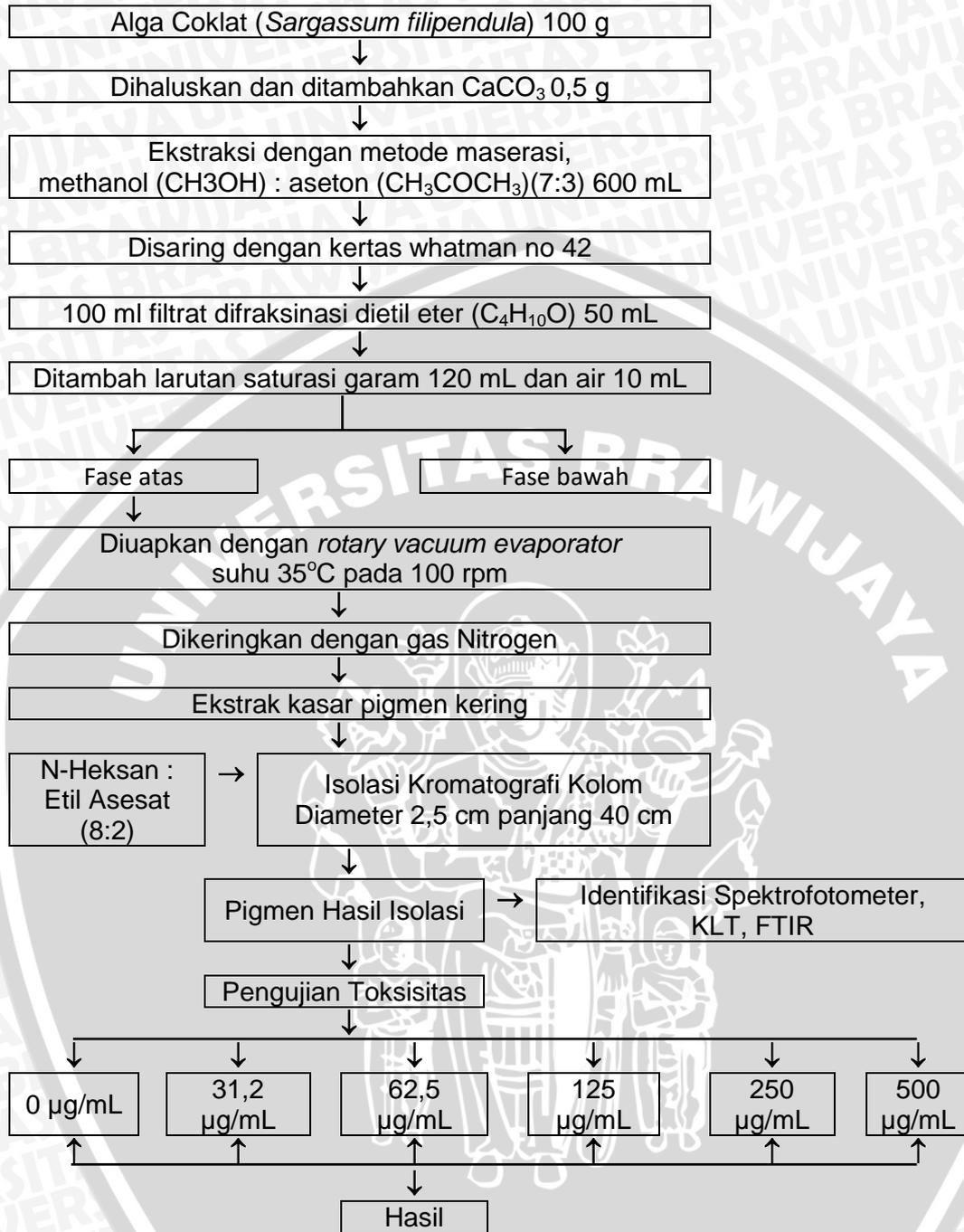
$$(6n-1) - (6-1) \geq 6(2)$$

$$6n - 6 \geq 12$$

$$6n \geq 18$$

$$n \geq 3$$

Berdasarkan rumus di atas, diperoleh tikus percobaan untuk masing-masing perlakuan adalah 3 ulangan uji BSLT terhadap *Artemia salina*. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Diagram alir penelitian

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Ekstraksi

Rumput laut coklat dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran, selanjutnya sampel ditiriskan menggunakan kain dan dimasukkan ke dalam kantong *polyback* hitam. Selama perjalanan, sampel disimpan dalam wadah dingin berisi es. Sampel rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dipotong kecil-kecil untuk memperluas permukaan, kemudian ditimbang 100 g dan dihaluskan dengan mortal alu sambil ditambahkan 0,5 g  $\text{CaCO}_3$  sebagai agen penetral alga coklat sehingga tidak bersifat basa, ini karena pigmen fukosantin yang terkandung dalam alga tidak tahan pada pH tertentu khususnya basa. Menurut Limantara dan Heriyanto (2010), sebelum proses ekstraksi, rumput laut dipotong kecil-kecil dan ditambah dengan  $\text{CaCO}_3$  sebagai agen penetral, kemudian ditumbuk sampai halus.

Ekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu dengan cara merendam sampel dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan. Pada penelitian ini maserasi menggunakan larutan metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) : aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) (7:3 v/v) dengan total larutan 600 mL dengan 2 kali maserasi. Maserasi pertama selama 24 jam tanpa pengadukan dan maserasi kedua selama 24 jam disertai dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Menurut Tamat *et al* (2007) bahan segar diekstraksi dengan metode maserasi selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan kertas Whatman. Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu (Utami *et al.*, 2009).

Sampel umumnya diekstraksi dengan pelarut organik polar karena efisiensi proses ekstraksi ditentukan oleh struktur kimia dari karotenoid yang terdapat dalam sampel. Fukosantin merupakan karotenoid dominan dan bersifat polar diekstraksi lebih optimal menggunakan metanol daripada etanol, DMSO,

asetonitril dan aseton (Limantara dan Heriyanto, 2011). Proses ekstraksi komponen kimia dalam sel yaitu pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut 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 sel (Ali *et al.*, 2013).

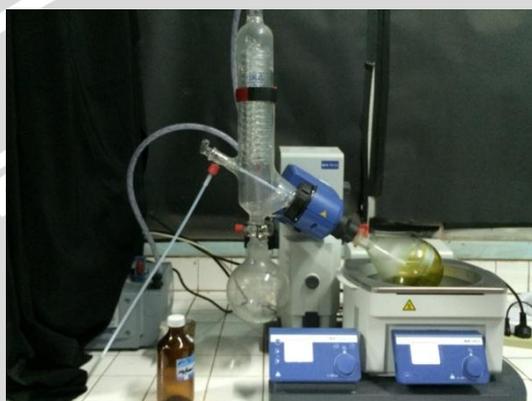
### 3.4.2 Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien tertentu (Zailanie, 2014). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan fraksi pigmen yang terkandung dalam filtrat. Fraksinasi dilakukan dengan perbandingan filtrat, dietil eter ( $C_4H_{10}O$ ), saturasi garam dan air (100 mL : 50 mL : 120 mL : 10 mL) dalam corong pisah, sehingga terbentuk dua fase. Fase atas (non polar) adalah fraksi yang mengandung ekstrak kasar pigmen yang terlarut dalam dietil eter, sedangkan fase bawah (polar) adalah fraksi yang terdiri dari campuran saturasi garam, air dan pelarut yang digunakan dalam proses maserasi sebelumnya.

Fraksinasi atau partisi disebut juga penyarian cair-cair, yaitu proses pemisahan dimana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak tercampur. Komponen yang difraksinasi akan terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi. Umumnya proses fraksinasi menggunakan corong pisah (Sholihah, 2010). Ekstrak pigmen yang diperoleh kemudian dipartisi dengan dietil eter dan etil asetat (1:1 v/v) dan penambahan dengan larutan saturasi garam serta air keran sampai terjadi pemisahan. Lapisan atas mengandung ekstrak pigmen ditampung dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* (Limantara dan Heriyanto, 2011).

### 3.4.3 Evaporasi

Hasil fase atas dari fraksinasi dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 35°C kecepatan 100 rpm selama  $\pm$  30 menit. Evaporasi bertujuan untuk menguapkan pelarut (dietil eter) sehingga didapatkan ekstrak kasar (*crude*) yang ditampung dalam botol sampel. *Rotary vacuum evaporator* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Rotary vacuum evaporator

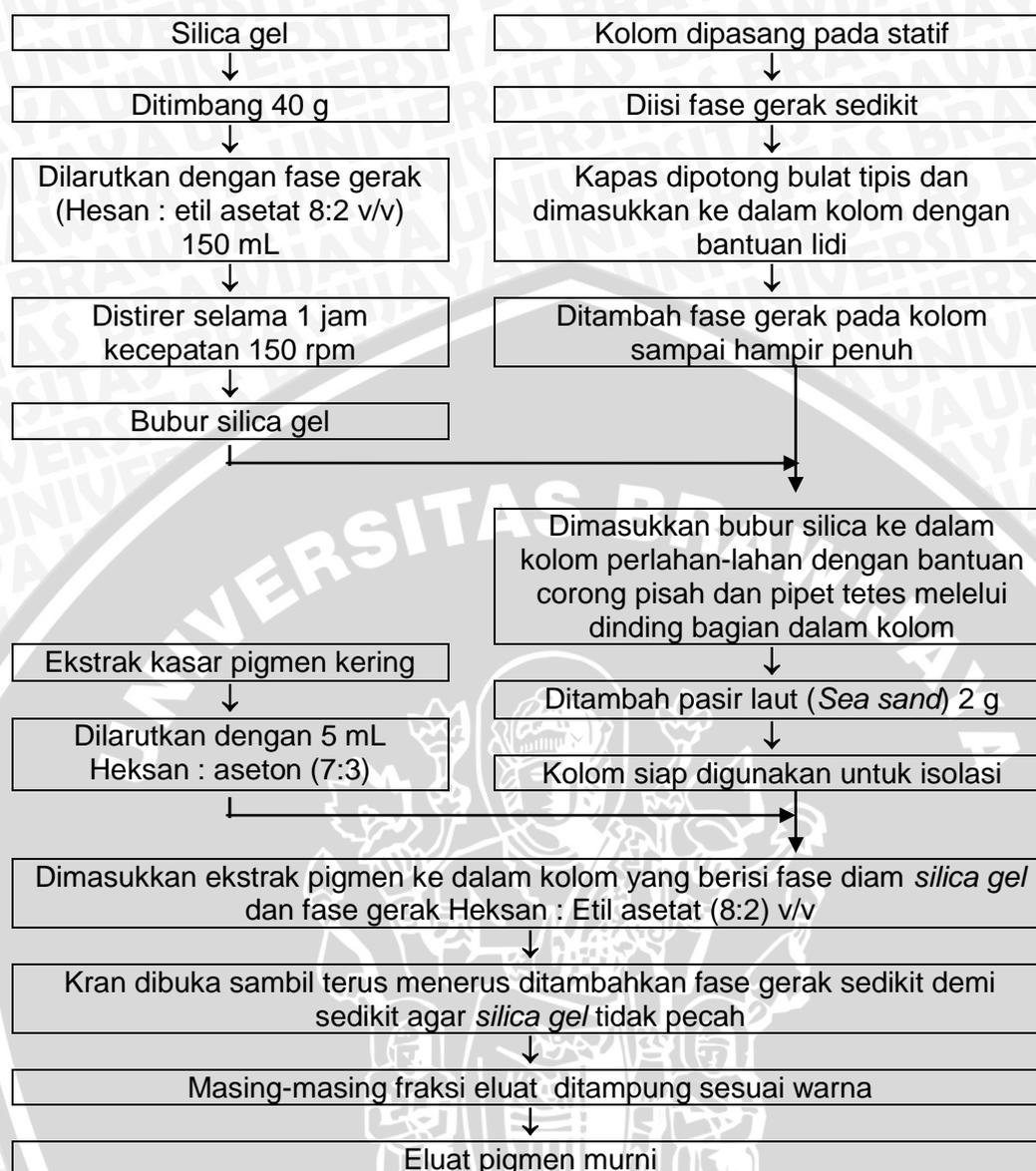
*Rotary vacuum evaporator* merupakan alat yang digunakan dalam laboratorium kimia dan biokimia untuk menguapkan pelarut tanpa pemanasan berlebihan dan sangat efektif untuk memisahkan pelarut organik (Ariyani, 2008). Kelebihan *rotary vacuum evaporator* adalah dapat diperolehnya kembali pelarut yang telah diuapkan. Prinsip kerja alat ini berdasarkan titik didih pelarut dan adanya tekanan yang menyebabkan uap dari pelarut terkumpul di atas, serta adanya kondensor dengan suhu dingin yang menyebabkan uap ini dapat mengembun dan menetes ke tabung penerima (Senjaya dan Wahyu, 2013).

Setelah didapatkan ekstrak kasar pekat, kemudian ekstrak dikeringkan dengan menguapkan sisa pelarut yang masih tertinggal menggunakan aliran gas nitrogen ( $N_2$ ). Metode penguapan pelarut dengan menggunakan gas  $N_2$  adalah penyemprotan gas nitrogen pada tekanan tertentu, sehingga molekul  $N_2$  berikatan dengan molekul pelarut dan diuapkan melalui reaksi dengan oksigen.

Botol sampel ditutup dengan *plastic wrap* dan dibungkus dengan *aluminium foil* kemudian disimpan dalam *freezer*.

#### 3.4.4 Isolasi Kromatografi Kolom

Beberapa metode pemisahan dan identifikasi pigmen dari rumput laut telah dikembangkan dengan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (Limantara dan Heriyanto, 2010). Tujuan kromatografi kolom yaitu untuk mengisolasi pigmen yang terkandung didalam ekstrak rumput laut. Prinsip dari pemisahan kromatografi adalah adanya distribusi komponen-komponen dalam fase diam dan fase gerak berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen yang akan dipisahkan dalam medium tertentu (Ardianingsih, 2009). Kromatografi kolom adalah poses pemisahan fraksi berdasarkan perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase diam adalah pengisi kolom dimana fase gerak akan mengalir. Senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat (Noviyanti, 2010). Diagram alir isolasi kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Diagram alir isolasi pigmen dengan kromatografi kolom.

Dalam penelitian ini digunakan *normal phase*, yaitu penggunaan fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar dengan fase diam *silica gel* ( $\text{SiO}_2$ ) F-254 yang bersifat polar dan fase gerak campuran antara n-heksan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) dan etil asetat ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) yang cenderung bersifat non polar. Tahap awal dalam isolasi pigmen menggunakan metode kromatografi kolom adalah preparasi kolom kromatografi. *Silica gel* F-254 ditimbang sebanyak 40 gram kemudian dilarutkan dalam 200 mL fase gerak dari campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8 : 2 (v/v) di dalam *beaker glass* kemudian

ditutup dengan *plastic wrap* untuk meminimalkan penguapan fase gerak. Selanjutnya *silica gel* dan fase gerak duhomogenkan menggunakan *magneic stirer* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm. Tujuannya adalah untuk ekuilibrase antara fase gerak dan fase diam sehingga tidak terbentuk gelembung udara di dalam kolom kromatografi yang dapat menyebabkan pecahnya *silica gel* (fase diam).

Tahap berikutnya, kolom kromatografi dipasang pada statif dan diisi dengan gulungan kapas yang telah dibasahi dengan fase gerak kemudian dipadatkan di dasar kolom kromatografi dengan menggunakan lidi. Pemberian kapas bertujuan untuk menahan fase diam agar tidak keluar melalui kran kolom kromatografi. Selanjutnya kolom kromatografi diisi dengan fase gerak n-heksan dan etil asetat (8 : 2 v/v) sampai setengah panjang kolom kromatografi untuk membasahi bagian dalam kolom kromatografi. Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom kromatografi sedikit demi sedikit dengan bantuan sendok dalam posisi kran kromatografi terbuka, sambil terus diaduk agar tidak terdapat gelembung udara. Setelah seluruh *silica gel* dimasukkan, kran kromatografi ditutup kembali. Kemudian kolom kromatografi dipukul-pukul perlahan menggunakan bola hisap atau alat pemukul lainnya agar fase diam benar-benar padat dan permukaannya rata.

Selanjutnya kolom kromatografi dibiarkan selama 12 jam untuk memastikan *silica gel* benar-benar padat. Pada saat didiamkan, mulut kolom dan ujung kran kolom kromatografi ditutup menggunakan *plastic wrap* untuk meminimalkan penguapan fase gerak. Batas atas fase diam ditandai dengan kertas label untuk mengetahui padat atau tidaknya fase diam di dalam kolom. Fase diam yang belum padat dapat diketahui dengan turunnya permukaan fase diam, apabila terdapat gelembung udara, terbentuk retakan atau lapisan-lapisan dalam *silica gel*. Apabila fase diam belum padat, maka preparasi kolom

kromatografi diulangi dari awal. Setelah kolom kromatografi didiamkan selama 24 jam, dimasukkan pasir laut 2,5 g kemudian diketuk-ketuk untuk meratakan permukaan.

Selanjutnya fase gerak di dalam kolom dikurangi volumenya sampai permukaan fase gerak mendekati permukaan pasir laut. Ekstrak kasar pigmen kering selanjutnya dilarutkan dengan 10 mL fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v). Kemudian seluruh fase gerak dikeluarkan dulu dari kolom kromatografi hingga batas *sea sand*. Larutan ekstrak pigmen dimasukkan secara perlahan dengan pipet tetes. Lalu kran kolom kromatografi dibuka dan ditunggu sampai seluruh ekstrak pigmen melewati batas *sea sand* dan masuk ke dalam fase diam silica gel-60. Kemudian ditambahkan dengan fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v) perlahan sampai kolom terisi hampir penuh. Selanjutnya seluruh fraksi warna muncul dan ditampung ke dalam botol vial. Botol vial dibungkus aluminium foil untuk melindungi isolat dari degenerasi karena pengaruh cahaya.

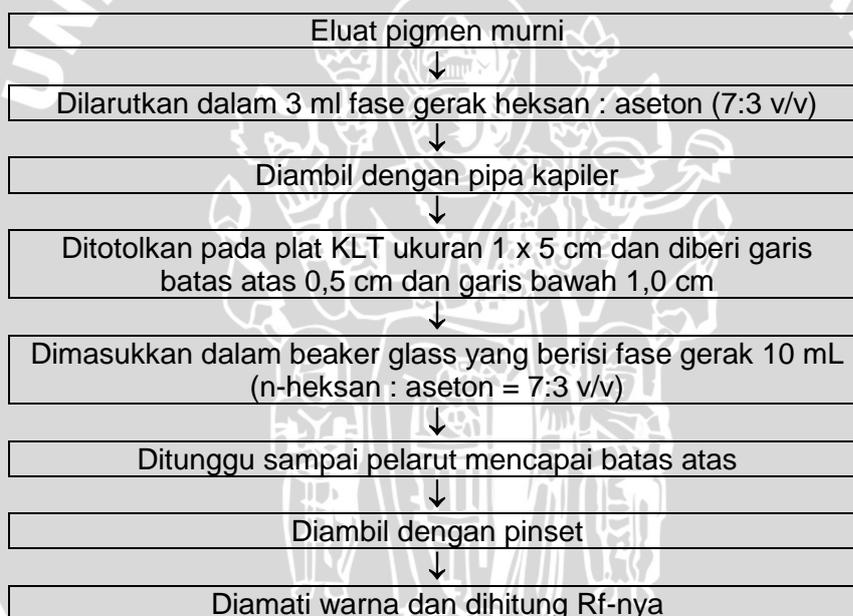
Fase gerak yang digunakan terus ditingkatkan kepolarannya dengan rata-rata volume 200-300 mL yaitu dari perbandingan n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v), (7:3 v/v), (6:4 v/v), (5:5 v/v), hingga (4:6 v/v). Seluruh fraksi warna yang tertampung diberi tanda penomoran dengan keterangan warna dan waktu ditampung.

#### 3.4.5 KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu metode pemisahan secara fitokimia. KLT merupakan bentuk dari kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Bentuk planar ini merupakan bentuk terbuka dari kromatografi kolom. Pada KLT fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang dilapisi dengan lempeng kaca, pelat aluminium atau pelat plastik (Prawirodiharjo, 2014). Uji KLT

bertujuan untuk menentukan kemurnian dari isolat fukosantin pada *Sargassum filipendula* hasil dari kromatografi kolom.

Prinsip dari metode kromatografi lapis tipis adalah mengetahui tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi. Identifikasi awal untuk mengetahui komponen pigmen adalah dengan menggunakan KLT. KLT merupakan salah satu kromatografi serapan. Fase diam berbentuk lapis tipis yang melekat pada gelas kaca atau plastic, sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut dengan perbandingan tertentu (Sastrohamidjoyo, 2007). Ekstrak ditotolkan pada plat KLT jarak 10 mm dari batas bawah (Tamat *et al.*, 2007). Diagram alir KLT dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Skema kromatografi Lapis

Dalam penelitian ini, identifikasi kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam yaitu plat KLT *silica gel* F-254, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah pelarut n-heksan dan aseto (7:3 v/v). Langkah awal adalah plat KLT dipotong 1 x 5 cm kemudian dibuat garis melintang di kedua ujung plat pada permukaan *silica gel*. Garis pertama dibuat pada jarak 1 cm dari tepi plat KLT untuk menunjukkan batas bawah atau posisi awal fraksi warna

ketika ditotolkan, dan garis kedua dibuat pada ujung lainnya dengan jarak 0,5 cm dari tepi KLT untuk menunjukkan batas atas atau batas jarak yang ditempuh oleh fase gerak. Sehingga terbentuk jarak tempuh senyawa sepanjang 3,5 cm.

Tahap selanjutnya, disiapkan sebanyak 10 mL fase gerak dengan menghomogenkan n-heksan : aseton (7:3 v/v). Penggunaan fase gerak bertujuan untuk melarutkan senyawa polar, semi polar dan non polar sehingga senyawa yang teridentifikasi akan larut dan tertarik ke atas sesuai tingkat kepolarannya. Kemudian ekstrak kasar dan isolat pigmen dari hasil kromatografi kolom yang diduga mengandung fukosantin diambil secukupnya menggunakan pipa kapiler kemudian ditotolkan tepat pada garis batas bawah. Lalu plat KLT dimasukkan pada fase gerak di dalam *beakerglass* 50 mL dan ditutup menggunakan plastik *cling wrap* untuk menghindari penguapan pelarut dan memaksimalkan proses kapilaritas dari fase gerak ke fase diam. Proses kapilaritas ditunggu hingga fase gerak mencapai batas atas. Plat KLT diambil menggunakan pinset, kemudian bercak warna yang muncul pada plat KLT diamati dan dihitung nilai  $R_f$ -nya.

Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *ratrdation factor* ( $R_f$ ). Pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna. Nilai  $R_f$  untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus :

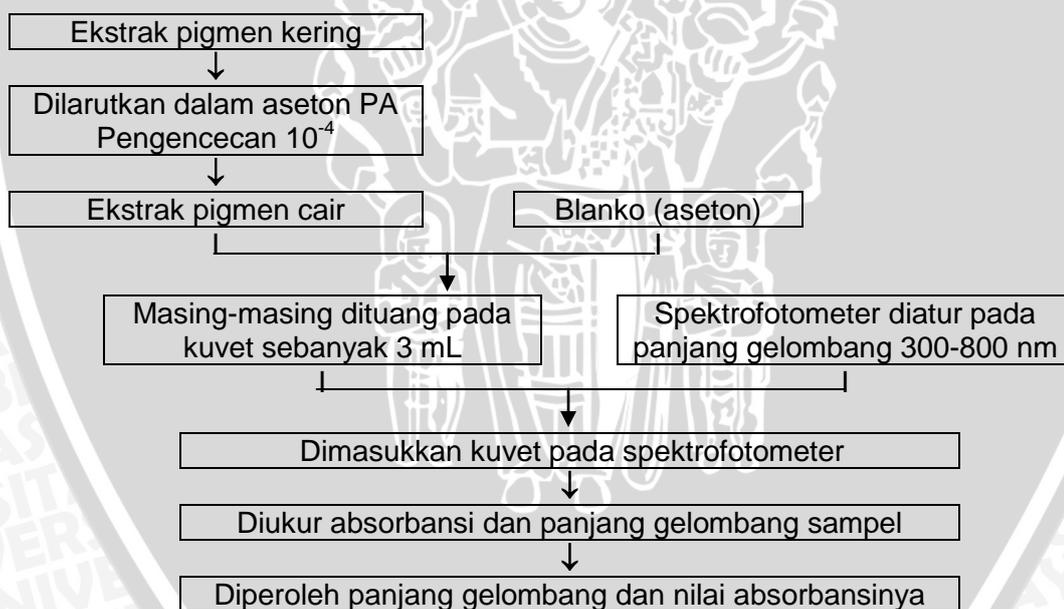
$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

#### 3.4.6 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Prinsip

kerja dari spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia tertentu di daerah ultra violet dan sinar tampak/visible (Khotimah *et al.*, 2013). Tujuan dari Spektrofotometer UV-Visa yaitu untuk mengukur absorbansi maksimum sehingga dapat dihitung kadar pigmen yang terjandung berdasarkan Lambert-Beer.

Prinsip dari Spektrofotometer UV-Vis adalah menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer UV-Visible merupakan alat yang umum digunakan di laboratorium kimia untuk analisa kimia kuantitatif. Spektrofotometri menggunakan dua sumber cahaya yang berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible (Huda, 2001). Diagram Alir Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 14. Diagram Alir Analisa Pigmen dengan Spektrofotometer UV-Vis (Fretes *et al.*, 2012)

Isolat warna hasil kromatografi kolom yang diketahui sebagai fukosantin berdasarkan warna dan nilai R<sub>f</sub> dari proses KLT terlebih dahulu dikeringkan dengan dialiri gas nitrogen (N<sub>2</sub>). Isolat warna yang telah kering diencerkan

menggunakan aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) PA dengan pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  kemudian larutan dituang ke dalam kuvet  $\pm 3$  mL. Selanjutnya dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis jenis 1201 merk Shimadzu dengan panjang gelombang 300 nm sampai 700 nm, sehingga diketahui pola spektra dan nilai absorbansi maksimal dari isolat pigmen yang diuji. Alat spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 15. Spektrofotometer UV-Vis

Nilai absorbansi pada  $\lambda_{mak}$  fukosantin dapat digunakan untuk memperkirakan kandungan fukosantin berdasarkan hukum Lambert-Beer, meskipun nilai absorbansi pada  $\lambda_{mak}$  tersebut tidak hanya berasal dari serapan fukosantin tetapi juga dari senyawa karotenoid lainnya. Absorbansi  $\lambda_{mak}$  fukosantin pada 447 nm (Limantara dan Heriyanto, 2011). Besar penyerapan cahaya sebanding dengan jumlah molekul, sesuai dengan hukum Lambert-Beer, dengan ketentuan harus jernih yang bebas koloid dan encer:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan:

A = absorbansi

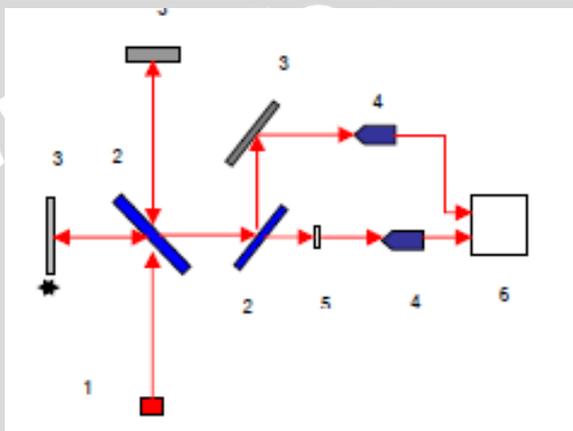
$\epsilon$  = absorptifitas molar ( $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi fukosantin (mol)

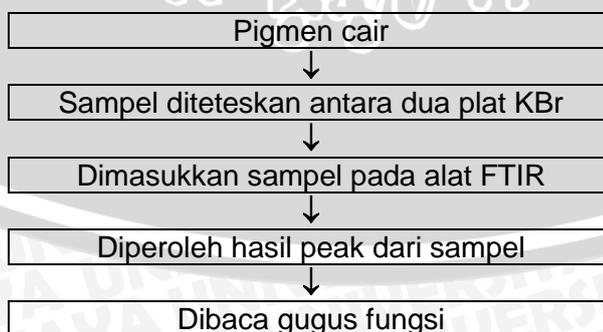
### 3.4.7 FTIR

Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) merupakan spektroskopi infrared yang dilengkapi dengan Fourier untuk analisis hasil spektrumnya. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari pentransmisian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai panjang gelombang (Anam *et al.*, 2007). Alat spektroskopi FTIR dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Alat spektroskopi FTIR

Spektrofotometer FTIR ini digunakan untuk mengetahui gugus fungsi dari pigmen fukosantin. Inti dari FTIR adalah Interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisa frekuensi dalam sinyal gabungan. Prosedur Spektroskopi FTIR dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Prosedur analisa gugus fungsi dengan FTIR

### 3.4.8 Uji Toksisitas BSLT

Sejumlah  $\pm 20$  mg telur *Artemia salina* Leach dimasukkan ke dalam wadah penetas yang berisi air laut sintetik yang dibuat dengan cara menimbang 38 g garam tanpa iodium dilarutkan dalam 1 L air atau dengan air laut langsung kemudian disaring dengan kertas Whatman dan diberi penyinaran dengan lampu TL 18 Watt. Setelah 24 jam telur yang sudah menetas menjadi *Nauplii* dipindahkan ke tempat lain, 24 jam setelah itu *Nauplii* dapat digunakan sebagai hewan uji (Agustini, 2002). Prosedur BSLT dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Prosedur uji BSLT

Membuat larutan induk dengan konsentrasi 2000 ppm dengan melarutkan 20 mg sampel dengan air laut sampai volume 10 mL. Ekstrak yang sukar larut dapat ditambahkan DMSO 1% satu sampai tiga tetes (Atmoko dan Ma'ruf, 2009). Ditambahkan oleh Agustini (2002), jika sampel sukar larut maka ditambah dimetil sulfoksida (DMSO) 1% sebanyak 0,1-50  $\mu$ L. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi pengenceran yang diinginkan dari pengenceran larutan induk dengan menggunakan larutan garam fisiologis. Sebagai kontrol digunakan larutan garam dan 1% DMSO (konsentrasi DMSO tertinggi pada perlakuan). Maksimal

kematian larva *Artemia salina* pada kontrol tidak boleh melebihi 10% dari total populasi uji (Fajarningsih *et al.*, 2008).

### 3.5 Analisa Data

Menurut Sanjayasari dan Pliliang (2011), setelah 24 jam dihitung survival rate dari artemia pada masing-masing konsentrasi dan ulangan dalam vial menggunakan rumus :

$$\% \text{ kematian larva udang} = \frac{T-K}{10} \times 100\%$$

Keterangan :T = jumlah larva uji yang mati

K = jumlah larva control yang mati

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan melihat jumlah *Artemia salina* yang mati pada setiap konsentrasi. Penentuan LC<sub>50</sub> dalam µg/ml atau ppm dilakukan menggunakan analisa probit (Tamat *et al.*, 2007). Untuk menghitung LC<sub>50</sub> digunakan kurva yang menyatakan log konsentrasi sebagai sumbu x dan % mortalitas sebagai sumbu y. Hasil LC<sub>50</sub> diperoleh dari perpotongan garis terhadap kedua sumbu tersebut (Agustini, 2002).

#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Hasil Penelitian

Hasil ekstraksi berupa rendemen ekstrak kasar, isolasi fukosantin dengan kromatografi kolom, identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan pola spektra serta uji BSLT dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Data identifikasi pigmen fukosantin

No	Parameter	Pengujian	Hasil	Literatur
1.	Rendemen		0,0189 % ± 0,0240145	
2.	Kolom	Kromatografi kolom	Isolat berwarna kuning orange botol ke 45-53	Fukosantin berwarna orange (Mufti <i>et al.</i> , 2014).
3.	KLT	KLT	Rf 0,28 Rf 0,26 Rf 0,26	Rf fukosantin 0,25-0,28 (Yan <i>et al.</i> , 1997)
4.	Pola Spektra	Spektrofotometer UV-Vis	447,17 nm 443,9 nm 446,1 nm	447 nm (Nursid <i>et al.</i> , 2013).
5.	Gugus fungsi	FTIR	C-H aromatik → 690-900 cm <sup>-1</sup> C-O → 1050-1300 cm <sup>-1</sup> C-H alkana → 1340-1470 cm <sup>-1</sup> CH <sub>2</sub> → 1465 cm <sup>-1</sup> C=O → 1690-1760 cm <sup>-1</sup> O-H → 2995 cm <sup>-1</sup>	fukosantin memiliki gugus fungsi OH (hidroksil), gugus C-H, ikatan alenik, C=O, dan C=C konjugasi, CH <sub>2</sub> , C-O asetat, C-O-C dan C=c trans-disubstitusi (Mufti <i>et al.</i> , 2013).
6.	LC <sub>50</sub>	BSLT	238,857 µg/mL 252,393 µg/mL 282,31 µg/mL	

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Kromatografi Kolom

Pemurnian pigmen fukosantin menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam berupa *silica gel* dan fase gerak n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8:2 v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v, 5:5 v/v dan 4:6 v/v masing-masing sebanyak 200 mL. Kolom kromatografi yang digunakan mempunyai tinggi 30 cm dan diameternya sekitar 2 cm. Isolasi pigmen dengan kolom kromatografi dapat dilihat pada gambar 19.



Gambar 19. Proses isolasi dengan kromatografi kolom

Dari gambar pita pigmen fukosantin yang berwarna kuning tua (orange). Dari hasil isolat kromatografi kolom diperoleh 62 botol isolat. Isolat yang diyakini merupakan fukosantin murni adalah isolat yang berwarna kuning orange botol ke 45-53. Menurut Mufti *et al.*, (2014), isolat fukosantin berwarna orange (kuning tua). Pigmen warna hasil isolasi ditampung dalam botol vial dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Pigmen hasil isolasi

#### 4.2.2 KLT

Untuk menyelidiki bahwa hasil isolasi kromatografi kolom pada alga coklat *Sargassum filipendula* adalah pigmen fukosantin maka dilakukan identifikasi pertama dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui *Redartation Factor* (Rf). Identifikasi KLT menggunakan fase diam berupa *silica gel* yang memiliki sifat lebih polar dibanding fase gerak yang terdiri dari heksan : aseton (7:3 v/v). Hasil pengujian KLT pigmen fukosantin dapat dilihat pada gambar 21.



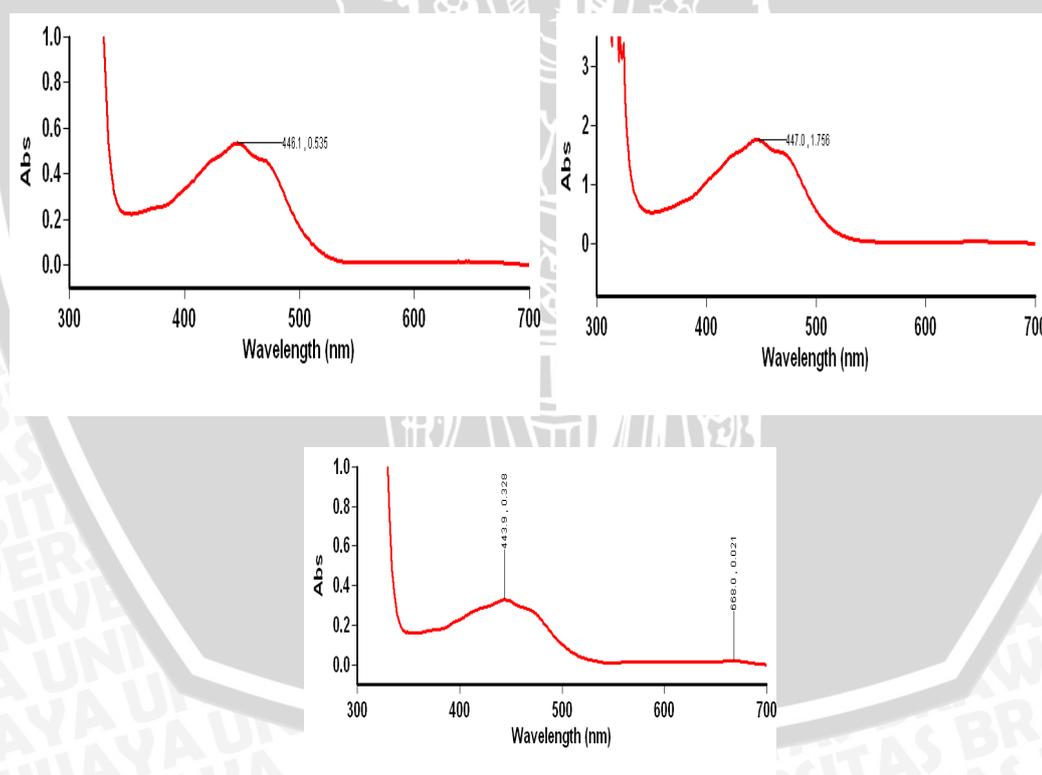
Gambar 21. Hasil KLT pigmen fukosantin

Dari gambar di atas diketahui bahwa pengujian KLT menghasilkan satu spot warna orange. Untuk mengetahui bahwa pigmen yang dihasilkan adalah fukosantin maka dilakukan perhitungan Rf yakni dengan membagi jarak tempuh yang ditempuh oleh fraksi pigmen dengan jarak yang ditempuh pelarut. Dari hasil

perhitungan Rf hasil KLT dibandingkan dengan nilai Rf literatur menurut Yan *et al.*, (1999) nilai Rf fukosantin berkisar antara 0,25 - 0,28 sedangkan nilai Rf yang didapat pada penelitian ini sebesar 0,27 maka semakin memperkuat bahwa pigmen yang dihasilkan adalah fukosantin murni.

#### 4.2.3 Spektrofotometer UV-Vis

Untuk menguatkan hasil identifikasi fukosantin dari KLT maka dilakukan identifikasi lanjutan melalui pengukuran pola spektra menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Tujuan dari penggunaan spektrofotometer UV-Vis adalah untuk mengetahui panjang gelombang maksimum dan nilai absorbansi pigmen fukosantin. Pola spektra fukosantin dalam pelarut aseton dapat dilihat pada Gambar 22.



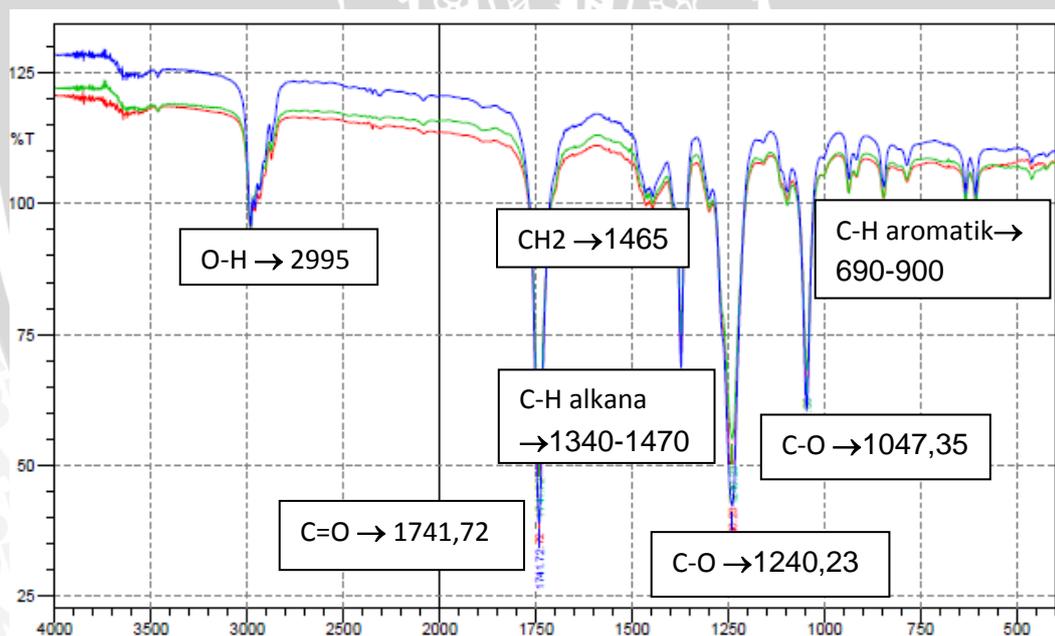
Gambar 22. Absorbansi fukosantin dengan spektrofotometer UV-Vis.

Berdasarkan hasil pengukuran hasil isolat fukosantin menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan hasil serapan maksimum dengan pelarut

aseton 447,17 nm, 443,9 nm dan 446,1 nm, hal ini sejalan dengan serapan maksimum puncak spektra fukosantin pada penelitian Nursid *et al.*, (2013) yaitu pada 447 nm.

#### 4.2.4 FTIR

Fukosantin merupakan senyawa karotenoid yang masuk dalam golongan santofil. Ciri khas fukosantin karena adanya ikatan allenic, monoepoksida, dua gugus hidroksil, gugus karbonil dan gugus asetil di ujung cincin fukosantin. Ikatan allenic bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan dari fukosantin (Nursid *et al.*, 2013). Identifikasi pigmen metode FTIR (*Fourier Transform Infrared*) dengan menggunakan KBr pada sampel hasil isolasi yang diduga merupakan pigmen fukosantin. Hasil Uji FTIR dapat dilihat pada gambar 23.



Gambar 23. Hasil identifikasi FTIR pigmen fukosantin.

Hasil uji gugus fungsi menggunakan spektroskopi FTIR menunjukkan adanya gugus C-H cincin aromatik pada 690-900  $\text{cm}^{-1}$ , gugus C-O pada 1050-1300  $\text{cm}^{-1}$ , gugus C-H alkana pada 1340-1470  $\text{cm}^{-1}$ , CH<sub>2</sub> pada 1465  $\text{cm}^{-1}$ ,

gugus C=O aldehyd / keton / asam karboksilat / ester pada 1690-1760  $\text{cm}^{-1}$  dan gugus O-H pada 2995  $\text{cm}^{-1}$ . Pembacaan gugus fungsi melalui tabel 8.

Tabel 8. Pembacaan gugus fungsi pada FTIR

Gugus Fungsional	Frekuensi ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	Nur (1989)	Pembacaan
Alkil		
C-H (stretching)		1340 - 1470
Isopropil -CH ( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub>	2853 - 2962	
	1380 - 1385 dan 1365 - 1370	
tert-butil-C( $\text{CH}_3$ ) <sub>3</sub>	1385 - 1395 dan 1365	
-CH <sub>3</sub> (bending)	1375 - 1450	
-CH <sub>2</sub> (bending)	1465	
Aromatik		
Substitusi Aromatik (C-H bending keluar bidang)		690 - 900
Mono	690 - 710 dan 730 - 770	
Orto	735 - 770	
Meta	680 - 725 dan 750 - 810	
Para	790 - 840	
Alkohol, Fenol, Asam Karboksilat		
OH (asam karboksilat, ikatan hirogen)	2400 - 3400	2995
Aldehida, Keton, Ester dan Asam Karboksilat		
C=O (stretching)	1600 - 1820	1741
Alkohol, Eter, Ester, Asam Karboksilat, Anhidrat		
C-O	1000 - 1300	1047 dan 1240

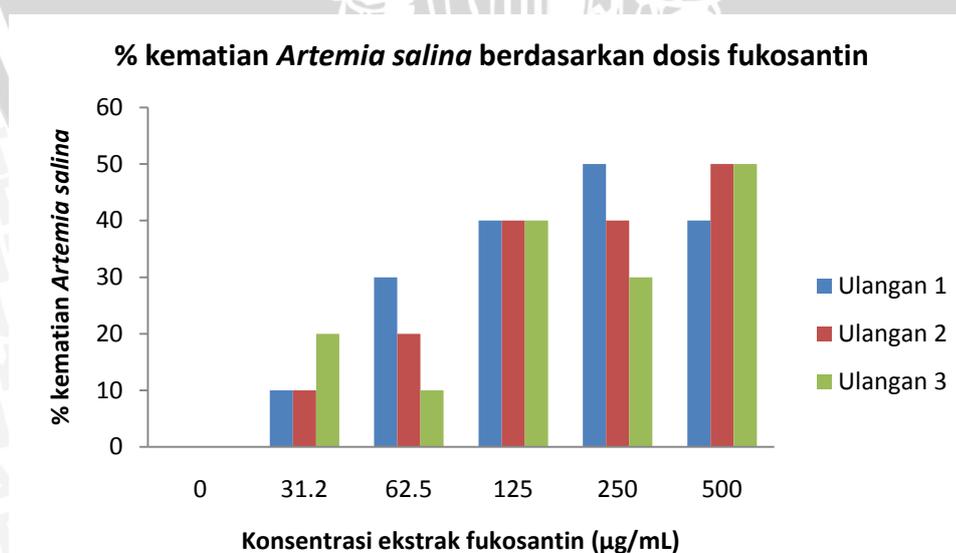
Jika dibandingkan dengan penelitian Nurhanif *et al.* (2013), hasil uji gugus fungsi menggunakan spektroskopi FT-IR gugus alenik dan C=O tidak muncul dan didapatkan gugus hidroksil, C-H, C=C, CH<sub>2</sub> dan C-O. Hasil uji spektroskopi FT-IR pada pH 2 yakni fukosantin memiliki gugus fungsi OH (hidroksil), gugus C-H, ikatan alenik, C=O, dan C=C konjugasi, CH<sub>2</sub>, C-O asetat, C-O-C dan C=c trans-disubstitusi (Mufti *et al.*, 2013).

#### 4.2.5 Rendemen Ekstrak

Hasil rerata kandungan pigmen fukosantin murni pada alga coklat (*Sargassum filipendula*) yang dihitung dengan membagi antara kandungan fukosantin yang didapatkan dengan sampel awal alga coklat yang digunakan adalah 0,0189 %. Pada penelitian Aldita (2015), rendemen fukosantin pada *Sargassum filipendula* sebesar 0,021%. Besar dari kandungan fukosantin ini sangat dipengaruhi oleh tempat tumbuh dari setiap rumput laut coklat. Rumput laut coklat yang tumbuh pada dasar laut akan meningkatkan kandungan pigmen fotosintetiknya sebagai respon akan ketersediaan cahaya yang rendah (Limantara dan Heriyanto, 2010).

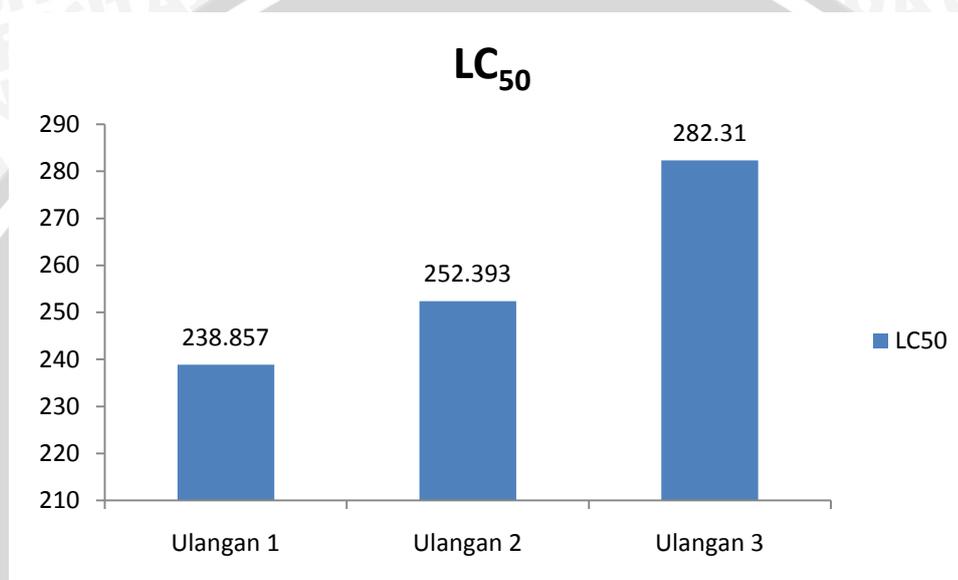
#### 4.2.6 BSLT

Pengujian toksisitas pigmen fukosantin menggunakan metode BSLT untuk mencari nilai  $LC_{50}$ . Persentase (%) kematian dihitung berdasarkan jumlah *Artemia* yang mati pada tiap konsentrasi fukosantin dan pada tiap ulangan. Persentase (%) kematian berdasarkan dosis fukosantin dapat dilihat pada gambar 24.



Gambar 24. Persentase kematian *Artemia salina* berdasarkan dosis fukosantin

Dari grafik diatas dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi fukosantin yang diberikan akan meningkatkan % kematian pada *Artemia salina*. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Sanjayasari dan Piliang (2011), bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka sifat toksiknya akan semakin tinggi. Sedangkan nilai  $LC_{50}$  ditentukan berdasarkan analisa probit % kematian. Hasil perhitungan  $LC_{50}$  dapat dilihat pada gambar 25.



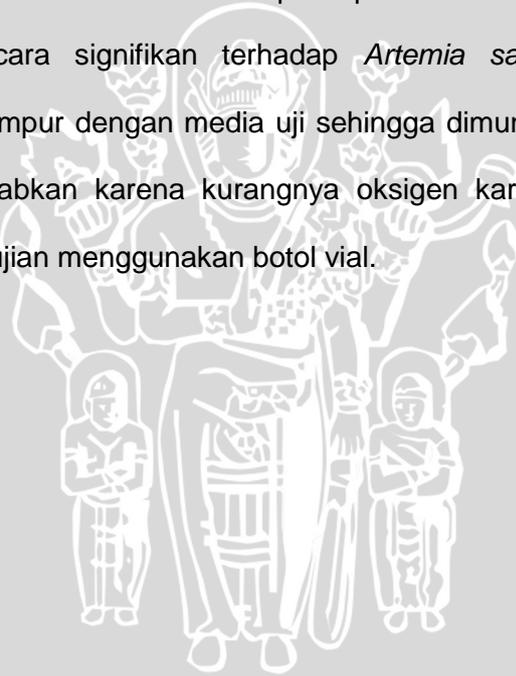
Gambar 25. Nilai  $LC_{50}$  pada tiap ulangan

Dari grafik diatas diketahui bahwa Hasil uji toksisitas fukosantin dari *Sargassum filipendula* dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. Nilai  $LC_{50}$  paling tinggi yaitu pada ulangan 3 sebesar 282,31  $\mu\text{g/mL}$ . Senyawa kimia tidak memiliki potensi bioaktivitas bila mempunyai nilai  $LC_{50}$  relatif kecil atau kurang dari 1000 ppm, semakin kecil nilai  $LC_{50}$  menunjukkan bahwa senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak tersebut semakin kuat (Atmoko dan Ma'ruf, 2009).

Apabila ekstrak termasuk golongan tidak toksik maka kemungkinan dapat dikembangkan penggunaannya untuk tujuan yang luas, misalnya sebagai makanan suplemen atau bahan baku kosmetika. Sedangkan apabila termasuk golongan senyawa toksik maka kemungkinan penggunaannya dapat dikembangkan untuk bahan baku obat (Tamat *et al.*, 2007). Menurut Meyer *et al.*

(1982) dalam Agustini (2002) mengungkapkan bahwa suatu ekstrak dikatakan toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach apabila mempunyai nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  dan dikatakan tidak toksik bila nilai  $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ .

Seperti yang dijelaskan Scheuer (2004) dalam Sanjayasari dan Pliliang (2011), adanya flavonoid dalam lingkungan sel menyebabkan gugus  $\text{OH}^-$  pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel. Hal tersebut menyebabkan terbundungnya transport aktif  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$ . Transport aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion  $\text{Na}^+$  yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran sel yang mengakibatkan kematian sel atau larva udang *Artemia salina* L. Namun pada penelitian ini fukosantin belum memberikan efek secara signifikan terhadap *Artemia salina* karena sifat fukosantin belum tercampur dengan media uji sehingga dimungkinkan kematian *Artemia salina* disebabkan karena kurangnya oksigen karena tidak adanya aerasi pada saat pengujian menggunakan botol vial.



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai toksisitas pigmen fukosantin pada alga coklat *Sargassum filipendula* dengan metode BSLT diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil isolasi fukosantin menghasilkan kandungan pigmen fukosantin pada *Sargassum filipendula* sebesar  $0,0189 \% \pm 0,0240145$
2. Hasil uji toksisitas fukosantin dari *Sargassum filipendula* dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. didapatkan nilai  $LC_{50}$  tertinggi sebesar 282,31  $\mu\text{g/mL}$ , namun pada hasil ini fukosantin belum memberikan efek secara signifikan terhadap *Artemia salina* karena sifat fukosantin yang belum tercampur dengan media uji sehingga dimungkinkan kematian *Artemia salina* disebabkan karena kurangnya oksigen karena tidak adanya aerasi pada saat pengujian menggunakan botol vial.

### 5.2 Saran

Dari penelitian yang dilakukan, perlu penelitian lebih lanjut yang membahas tentang potensi fukosantin sebagai fitofarmaka dengan metode dan alat yang lebih baik terutama dengan memberikan aerasi pada toples (tabung) uji.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, N. W. S. 2002. Aktivitas antioksidan dan uji toksisitas hayati pigmen fikobiliprotein dari ekstrak *Spirulina platensis*. Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. *Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS*. Surakarta.
- Aldita, R. 2015. Identifikasi komponen pigmen pada rumput laut cokelat *Sargassum filipendula* dengan Kromatografi Cair kinerja Tinggi (KCKT). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Ali, Farida, Ferawati dan R. Arqomah. 2013. Ekstraksi zat warna dari kelompok bunga rosella (study pengaruh konsentrasi asam asetat dan asam sitrat). *Jurnal Teknik Kimia* **19** (1). Januari 2013.
- Anam, C., Sirojudin dan Firdausi K. S. 2007. analisis gugus fungsi pada sampel uji, bensin dan spiritus menggunakan metode spektroskopi FTIR. *Berkala Fisika* **10** (1). ISSN: 1410-9662.
- Anam, M. C. 2014. Isolasi dan identifikasi  $\beta$ -karoten rumput laut coklat *Padina australis* dengan Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Aprilia, H. A., Pringgenies, D. dan Yudiati, E. 2012. Uji toksisitas ekstrak kloroform cangkang dan duri landak laut (*Diadema setosum*) terhadap mortalitas Nauplius *Artemia sp.* *Journal of Marine Research*, **1** (1), hlm. 75-83.
- Ardianingsih, R. 2009. Penggunaan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam proses analisa deteksi ion. *Berita Dirgantara*, **10** (4). Desember 2009: 101-104.
- Ariyani, F., Setiawan L. E. dan Soetardjo F. E. 2008. Ekstraksi minyak atsiri dari tanaman sereh dengan menggunakan pelarut metanol, aseton dan n-heksan. *Widya Teknik*, **7** (2), hlm 124-133.
- Atmoko, T. dan Ma'ruf, A. 2009. Uji toksisitas dan skrining fitokimia ekstrak tumbuhan sumber pakan orangan terhadap larva *Artemia salina* L. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*, **6** (1), hlm 37-45.
- DKP. 2015. Produksi Rumput Laut Kabupaten Sumenep, Madura.
- Fajarningsih, N. D., Nursid, M., Wikanta, T dan Marraskuranto, E. 2008. Bioaktivitas ekstrak *Turbinaria decurrens* sebagai antitumor (HeLa dan T47D) serta efeknya terhadap proliferasi limfosit. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, **3** (1).
- Gaffar, A. K. 2010. Pengaruh lethal tembakau rokok terhadap anakan ikan nila (*Oreochromis niloticus* L.). *Sainmatika*, **7** (2), hlm 54-58.

- Harefa, F. 2003. *Pembudidayaan Artemia Untuk Pakan Udang dan Ikan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Huda, N. 2001. *Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis. Bidang Evaluasi dan Pengembangan Keselamatan Instalasi*. Sigma Epsilon. Jakarta.
- Indriani, E. 2010. *Isolasi fukosantin dari alga coklat (*Sargassum filipendula*) dengan menggunakan kromatografi kolom*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Khotimah, K., Darius dan Sasmito, B. B. Uji aktivitas senyawa aktif alga coklat (*Sargassum filipendula*) sebagai antioksidan pada minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). *THPi student journal* 1 (1) pp 10-20. Universitas Brawijaya. Malang.
- Limantara, L. dan Heriyanto. 2010. *Studi komposisi pigmen dan kandungan fukosantin rumput laut coklat dari perairan maduran dengan kromatografi cair kinerja tinggi*. Ilmu Kelautan, 15 (1), hlm 23-32. ISSN 0853-7291.
- \_\_\_\_\_. 2011. *Optimasi proses ekstraksi fukosantin rumput laut coklat *Padina australis* Hauck menggunakan pelarut organik polar*. Ilmu Kelautan, 16 (2), hlm 86-94. ISSN 0853-7291.
- Mufti, E. D., Zaelanie, K. dan Kartikaningsih, H. 2013. *Stabilitas fukosantin dari alga coklat (*Sargassum cristaefolium*) pada berbagai pH*. *THPi student journal*, 1 (1), pp 41-50. Universitas Brawijaya. Malang.
- Noviyanti, L. 2010. *Modifikasi teknik kromatografi kolom untuk pemisahan trigliserida dari ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.)*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Nurhanif, A. E., Zailanie, K. dan Hartati, K. 2013. *Stabilitas fukosantin dari rumput laut coklat (*Sargassum cristaefolium*) dalam berbagai pH*. *THPi Student journal*, 1 (1), pp 11-20. Universitas Brawijaya. Malang.
- Nursid, M., Wikanta, T. dan Susilowati, R. 2013. *Aktivitas antioksidan, sitotoksisitas dan kandungan fukosantin ekstrak rumput laut coklat dari pantai Binuangun, Banten*. *JPB Kelautan dan Perikanan*, 8 (1), hlm 73-84.
- Pangestuti, R; Limantara L. dan Susanto A. B. 2007. *Kandungan dan aktivitas antioksidan fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh. Prossiding Back to Nature dengan Pigmen Alami*. Hlm. 201-209.
- Prawirodiharjo, E. 2014. *Uji aktivitas antioksidan dan uji toksisitas ekstrak etanol 70% dan ekstrak air kulit batang kayu jawa (*Lannea coomandelica*)*. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. Jakarta.
- Putranti, R. I. 2013. *Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut *Sargassum duplicatum* dan *Turbinaria ornata* dari Jepara*. Tesis.

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro. Semarang.

Sanjayasari, D. dan Pliliang, W. G. 2011. Skrining fitokimia dan uji toksisitas ekstrak daun katuk (*Saoropus androgenus* (L) Merr.) terhadap larva udang *Artemia salina*: potensi fitofarmaka pada ikan. *Berkala Perikanan Terubuk*, **39** (1), hlm 91-100. ISSN 0126-6265.

Schefflan, Leopoid dan Morris B. J. 1983. *The Handbook of Solvent*. D. Van Nostrand Comp. Inc. New York.

Senjaya, Y. A. dan Wahyu S. 2013. Potensi ekstrak daun pinus (*Pinus merkusii* Jungh. Et de Vriese) sebagai bioherbisida penghambat perkecambahan *Echinochloa colonum* L. dan *Amaratus viridis*. Jurusan Biologi. FMIPA. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.

Sholihah, H, M. 2010. Uji afrosiaka fraksi larut air ekstrak etanol 70% kuncup bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* l.) terhadap libido tikus jantan. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Sastrohamidjoyo, H. 2007. *Kromotografi*. Liberty. Yogyakarta.

Susiana. 2014. Isolasi dan identifikasi klorofil a dengan loquid chromatography mass spektrocropy (LC-MS) pada alga coklat (*Sargassum filipendula*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Malang.

Tamat, S. R., Wikanta, T., dan Maulina, L. S. 2007. Aktivitas antioksidan dan toksisitas senyawa bioaktif dari ekstrak rumput laut hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, **5** (1), hlm. 31-36. ISSN 1693-1831.

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

Wardani, R. K. 2010. Uji Toksisitas dan uji antiproliferasi fraksi metanol dari *Sargassum cristaefolium*. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Yan, X., Y. Chuda., M. Suzuki dan T. Nagata. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in hijika fusiformis, a common edible seaweed. *Biochem*, **63** (3), 605-607.

Zailanie, K. 2012. *Studi kandungan dan identifikasi fukosantin dari desa Padike Kecamatan Talango Kepulauan Madura*. Disertasi. Program Doktor Ilmu Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.

\_\_\_\_\_. 2014. *Fukosantin dan Metode Analisa*. Bayumedia Publishing. Malang.

## LAMPIRAN

**Lampiran 1. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen (Costa et al., 2009)  
yang telah dimodifikasi beberapa prosesnya.**

- **Prosedur Ekstraksi**
  - Rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dicuci dan dibersihkan dengan air mengalir, kemudian dipotong kecil ukuran  $\pm 1$  cm.
  - Ditimbang 100 g dan ditambahkan  $\text{CaCO}_3 \pm 0,05$  g kemudian ditumbuk dengan mortal dan alu.
  - Rumput laut yang sudah dihaluskan kemudian diekstraksi dengan metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) : aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) perbandingan 7 : 3 (v/v) sebanyak 300 mL selama 24 jam (dilakukan sebanyak 2 kali).
  - Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas Whatman No. 42 sehingga didapatkan filtrat.
- **Prosedur Fraksinasi**
  - Filtrat : Dietil eter ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) : Saturasi garam : Air dengan perbandingan (100 mL : 50 mL : 120 mL : 10 mL) dimasukkan ke dalam corong pisah secara berurutan dilakukan pada ruang gelap.
  - Larutan dalam corong pisah dihomogenkan sampai terbentuk 2 fase.
  - Fase bawah yang berwarna bening dibuang dan fase atas berwarna lebih pekat ditampung dalam labu erlenmeyer.
  - Fase atas diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu  $35^\circ\text{C}$  kecepatan 100 rpm sampai pelarut menguap dan berbentuk kerak atau pasta.

- Kerak atau pasta ditampung dalam botol sampel kemudian untuk memaksimalkan penguapan dialiri dengan gas nitrogen (N<sub>2</sub>) sehingga didapatkan ekstrak kasar kering.
- Botol sampel ditutup *plastic wrap* dan dilapisi *aluminium foil* kemudian disimpan dalam *freezer*.

- **Pembuatan Larutan Ekstraksi**

Metanol : Aseton (7 : 3 v/v) sebanyak 300 mL

$$\text{Metanol} = \frac{7}{10} \times 300 \text{ mL} = 210 \text{ mL}$$

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 300 \text{ mL} = 90 \text{ mL}$$

- **Pembuatan Saturasi Garam**

- Ditimbang ± 1500 g garam grosok
- Dimasukkan ke dalam botol dengan kapasitas 1,5 L
- Ditambahkan air hingga penuh
- Dikocok hingga garam jenuh dan tidak larut lagi
- Disaring dengan kertas saring dengan susunan berturut-turut dari bawah kertas saring kasar, kertas saring halus dan kapas dilakukan 2 kali penyaringan
- Diperoleh saturasi garam dalam botol

Lampiran 2. Prosedur Isolasi dengan Kromatografi Kolom (Pangestuti *et al.*, 2007) yang telah dimodifikasi oleh Wijayanti (2010).

- **Preparasi Kolom Kromatografi**

- Fase diam *silica gel* 60 mesh ditimbang  $\pm 40$  g, kemudian dihomogenkan dengan 200 mL fase gerak berupa pelarut n-heksan dan etil asetat perbandingan (8 : 2 v/v) menggunakan *magnetic stirer* kecepatan 150 rpm selama  $\pm 1$  jam.
- Kapas direndam dengan larutan fase gerak, dimasukkan pada ujung kolom kromatografi dengan bantuan lidi.
- Kolom kromatografi dipasang pada statif.
- Setelah itu bubuk *silica gel* 60 mesh dimasukkan ke dalam kolom kromatografi dan diratakan dengan cara diketuk-ketuk menggunakan bola hisap.
- Ditutup pada bagian ujung dan pangkal kolom dan dibiarkan selama  $\pm 12$  jam.
- Dimasukkan *sea sand* (pasir laut halus)  $\pm 2,5$  g.

- **Isolasi Pigmen**

- Dilarutkan ekstrak kasar pigmen kering  $\pm 0,3-0,4$  g ke dalam 10 mL fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v)
- Kran kolom kromatografi dibuka, dikeluarkan semua fase gerak dari kolom kromatografi sampai batas *sea sand*.
- Larutan ekstrak pigmen dimasukkan secara perlahan dengan menggunakan pipet tetes.

- Setelah ekstrak pigmen melewati *sea sand* dan masuk ke dalam *silica gel*-60, kemudian ditambahkan fase gerak (n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8:2 v/v) sedikit demi sedikit adar *Silica gel* tidak pecah.
- Fraksi yang keluar ditampung pada botol sampel sesuai warna yang keluar dan diberi nomor pada setiap botolnya.
- Polaritas fase gerak (n-heksan : etil asetat) dinaikkan rata-rata volume 200-300 mL dari perbandingan (8:2 v/v), (7:3 v/v), (6:4 v/v), dan (5:5 v/v) sampai semua fraksi warna ekstrak terpisah keluar.

- **Perhitungan Fase Gerak pada Kromatografi Kolom**

- Heksan : Etil asetat (8 : 2 v/v) sebanyak 200 mL

$$\text{Heksan} = \frac{8}{10} \times 200 \text{ mL} = 160 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{2}{10} \times 200 \text{ mL} = 40 \text{ mL}$$

- Heksan : Etil asetat (7 : 3 v/v) sebanyak 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) sebanyak 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) sebanyak 200 mL

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

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

– Heksan : Etil asetat (4 : 6 v/v) sebanyak 200 mL

$$\text{Heksan} = \frac{4}{10} \times 200 \text{ mL} = 80 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{6}{10} \times 200 \text{ mL} = 120 \text{ mL}$$



**Lampiran 3. Prosedur Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**  
**(Pangestutu *et al.*, 2009 dimodifikasi oleh Hasanah, 2014).**

- Disiapkan fase gerak dengan menghomogenkan n-heksan dan aseton dengan perbandingan (7:3 v/v) sebanyak 10 mL.
- Fase diam (plat KLT *silica gel* F-254) dipotong beberapa bagian dengan ukuran 1 x 5 cm.
- Disetiap potongan KLT diberi tanda bagian bawah berjarak 1,0 cm dan pada bagian atas berjarak 0,5 cm sehingga terbentuk jarak 3,5 cm.
- Beberapa sampel warna yang diduga termasuk komponen pigmen diambil dengan pipa kapiler dan ditotolkan pada garis batas bawah plat KLT.
- Plat KLT dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 mL yang berisi fase gerak dan ditutup dengan plastik *clink wrap*.
- Ditunggu hingga fase gerak mencapai batas atas plat KLT.
- Lalu plat KLT diambil dengan pinset.
- Kemurnian isolat diidentifikasi dengan menghitung *Rf* (*Retardation factor*) dengan membandingkan rasio jaak yang ditempuh oleh total warna dengan jaak yang ditempuh oleh pelarut.

- **Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Lapis Tipis**

Heksan : Aseton (7 : 3 v/v) sebanyak 10 mL

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

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 10 \text{ mL} = 3 \text{ mL}$$

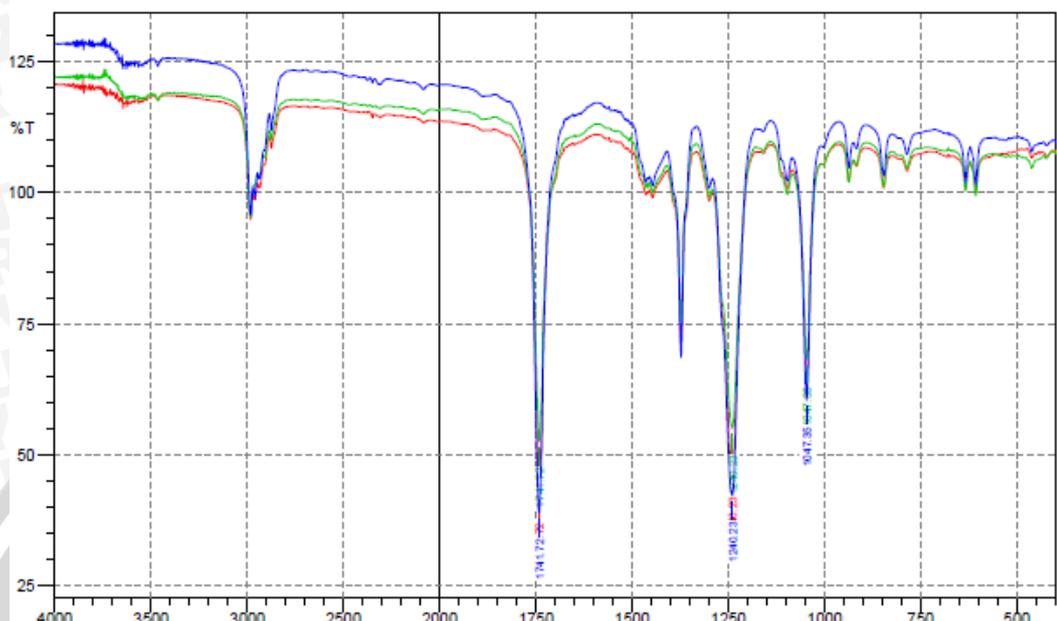
**Lampiran 4. Prosedur Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis (Fretes et al., 2010).**

- Sampel kering isolat pigmen yang teridentifikasi masuk ke dalam range Rf hasil identifikasi dari KLT dilarutkan ke dalam aseton PA dan dimasukkan pada kuvet sebanyak  $\pm 4$  mL menggunakan pipet tetes.
- Panjang gelombang spektrofotometer diatur 300-800 nm.
- Kuvet dimasukkan pada instrumen spektrofotometer UV-Vis.
- Diukur absorbansi dan panjang gelombang sampel.



## Lampiran 5. Hasil dan Pembacaan FT-IR

Hasil Uji FTIR dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Keterangan pembacaan :

1. Muncul puncak pada angka gelombang  $675-995\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H Alkena yang biasanya muncul pada angka gelombang  $675-995$  dan  $3010-3095\text{ cm}^{-1}$ .
2. Muncul puncak pada angka gelombang  $690-900\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H cincin aromatik yang biasanya muncul pada angka gelombang  $690-900$  dan  $3010-3100\text{ cm}^{-1}$ .
3. Muncul puncak pada angka gelombang  $1050-1300\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-O alcohol / eter / asam karboksilat / ester yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
4. Muncul puncak pada angka gelombang  $3200-3600\text{ cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus O-H alkohol ikatan hydrogen / fenol yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.

5. Muncul puncak pada angka gelombang 1340-1470 dan 2850-2970  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C-H alkana yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.
6. Muncul puncak pada angka gelombang 1690-1760  $\text{cm}^{-1}$  yang kemungkinan menunjukkan adanya gugus C=O aldehyd / keton / asam karboksilat / ester yang biasanya muncul pada angka gelombang tersebut.

Tabel absorpsi infra merah beberapa gugus fungsional (Nur, 1989).

Gugus Fungsional	Frekuensi ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensitas
<b>Alkil</b>		
C-H (stretching)		
Isopropil -CH ( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub>	2853 - 2962	sedang-tajam
	1380 - 1385 dan 1365 - 1370	tajam
tert-butyl-C( $\text{CH}_3$ ) <sub>3</sub>	1385 - 1395 dan 1365	Sedang
-CH <sub>3</sub> (bending)	1375 - 1450	Sedang
-CH <sub>2</sub> (bending)	1465	Sedang
<b>Alkenil</b>		
C-H (stretching)	3010 - 3095	Sedang
R=C (stretching)	1600 - 1680	sedang-lemah
R-CH=CH	985 - 1000	Tajam
C-H (bending)	880 - 900	Tajam
R <sub>2</sub> C=CH <sub>2</sub> (keluar bidang)	675 - 730	Tajam
cis-RCH=CHR	960 - 975	Tajam
trans-RCH=CHR		
<b>Alkunil</b>		
=C-H (stretching)	3300	Tajam
C=C (stretching)	2100 - 2250	lemah-tajam
<b>Aromatik</b>		
C=C	1475 dan 1600	sedang-lemah
Ar-H (stretching)	3030	Tajam
<b>Substitusi Aromatik</b>		
(C-H bending keluar bidang)		
Mono	690 - 710 dan 730 - 770	sangat tajam
Orto	735 - 770	Tajam
Meta	680 - 725 dan	Tajam
	750 - 810	sangat tajam
Para	790 - 840	sangat tajam
<b>Alkohol, Fenol, Asam Karboksilat</b>		
OH (alkohol, fenol)	3590 - 3650	Sedang
OH (alkohol, fenol, ikatan hidrogen)	3300 - 3600	Sedang
OH (asam karboksilat, ikatan hirogen)	2400 - 3400	Sedang

## Aldehida, Keton, Ester dan Asam

## Karboksilat

C=O (stretching)	1600 - 1820	Tajam
Aldehida	1690 - 1740	Tajam
Keton	1650 - 1730	Tajam
Ester	1735 - 1750	Tajam
asam karboksilat	1710 - 1780	Tajam
Amida	1630 - 1690	Tajam
Anhidrida	1760 dan 1810	Tajam
Amida		
N-H	3100 - 3500	Sedang
Nitril		
C=N	2240 - 2260	sedang-tajam
Alkohol, Eter, Ester, Asam		
Karboksilat, Anhidrat		
C-O	1000 - 1300	Tajam
aldehida (C-H)	2700 - 2800 dan 2800 - 2900	Lemah
nitro (N=O)	1300 - 1390 dan 1500 - 1600	Tajam
Merkaptan		
S-H	2550	Lemah



## Lampiran 6. Prosedur Pengujian LC<sub>50</sub> dengan Metode BSLT

- **Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji**

- Larutan konsentrasi 1000 µg/mL

$$\frac{18900 \mu\text{g}}{x} = \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mL}}$$

$$1000 x = 18900 \mu\text{g}$$

$$x = \frac{18900 \mu\text{g}}{1000 \mu\text{g}}$$

$$x = 18,9 \text{ mL}$$

Ekstrak kasar 18900 µg ditambah air laut 18,9 maka dihasilkan

konsentrasi 1000 µg/mL

- Larutan konsentrasi 500 µg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 30 \text{ mL} \times 500$$

$$V_1 = \frac{15000}{1000} = 15 \text{ mL}$$

Mengambil 15 mL dari konsentrasi 1000 µg/mL dan ditambahkan air laut

sampai 30 mL, maka dihasilkan 500 µg/mL

- Larutan konsentrasi 250 µg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 500 = 30 \text{ mL} \times 250$$

$$V_1 = \frac{7500}{500} = 15 \text{ mL}$$

Mengambil 15 mL dari konsentrasi 500 µg/mL dan ditambahkan air laut

sampai 30 mL, maka dihasilkan 250 µg/mL.

- Larutan konsentrasi 125 µg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 250 = 30 \text{ mL} \times 125$$

$$V_1 = \frac{3750}{250} = 15 \text{ mL}$$

Mengambil 15 mL dari konsentrasi 250 µg/mL dan ditambahkan air laut sampai 30 mL, maka dihasilkan 125 µg/mL.

- Larutan konsentrasi 62,5 µg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 125 = 30 \text{ mL} \times 62,5$$

$$V_1 = \frac{1875}{125} = 15 \text{ mL}$$

Mengambil 15 mL dari konsentrasi 125 µg/mL dan ditambahkan air laut sampai 30 mL, maka dihasilkan 62,5 µg/mL.

- Larutan konsentrasi 31,25 µg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 62,5 = 30 \text{ mL} \times 31,25$$

$$V_1 = \frac{937,5}{62,5} = 15 \text{ mL}$$

Mengambil 15 mL dari konsentrasi 62,5 µg/mL dan ditambahkan air laut sampai 30 mL, maka dihasilkan 31,25 µg/mL.

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



Pencucian



Dipotong kecil-kecil



Diangin-anginkan



Ditimbang 250 gram



Ditambah 0,5 gram  $\text{CaCO}_3$



Dihaluskan



Dimaserasi



Dimagnetik stirer



Disaring kertas wattman



Garam grosok



Dilarutkan air



Disaring



Saturasi garam



Fraksinasi



Ditimbang rendemen



Evaporasi



Nitrogen



Uji KLT ekstrak





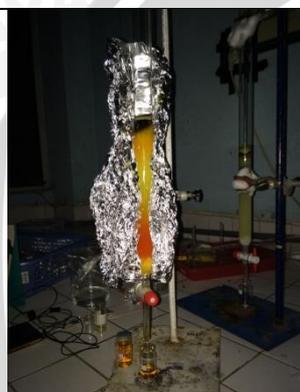
Hasil KLT ekstrak



Silica gel dihomogenkan



Kromatografi kolom



Fukosantin turun



Hasil isolasi



Hasil KLT isolat fukosantin



Uji spektrofotometer UV-Vis



Uji FTIR



Uji BSLT

### Lampiran 8. Hasil Isolasi Kromatografi Kolom

Panjang Kolom Kromatografi = 50 cm

Diameter Kolom Kromatografi = 2 cm

No. Botol	Waktu	Warna	Konsentrasi Fase Gerak
1	10.55	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
2	11.25	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
3	12.44	Kuning Pekat	(8:2) N-Heksan:etil asetat
4	14.02	Kuning Pekat	(8:2) N-Heksan:etil asetat
5	15.29	Kuning Pekat	(8:2) N-Heksan:etil asetat
6	16.48	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
7	18.09	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
8	19.36	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
9	21.01	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
10	22.33	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
11	23.56	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
12	24.56	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
13	01.58	bening kehijauan	(8:2) N-Heksan:etil asetat
14	03.00	bening kehijauan	(8:2) N-Heksan:etil asetat
15	04.10	bening kehijauan	(8:2) N-Heksan:etil asetat
16	05.13	bening kehijauan	(7:3) N-Heksan:etil asetat
17	06.00	bening kehijauan	(7:3) N-Heksan:etil asetat
18	06.45	bening kehijauan	(7:3) N-Heksan:etil asetat
19	07.15	bening kehijauan	(7:3) N-Heksan:etil asetat
20	07.45	Hijau Bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
21	08.15	Hijau Bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
22	08.39	Hijau Bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
23	09.03	Hijau Bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
24	09.28	Hijau Bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
25	09.56	Hijau Bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
26	10.26	Hijau bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
27	11.09	Hijau Biru	(6:4) N-Heksan:etil asetat
28	11.34	Hijau Biru	(6:4) N-Heksan:etil asetat
29	11.49	Hijau Biru	(6:4) N-Heksan:etil asetat
30	12.08	Hijau Biru	(6:4) N-Heksan:etil asetat
31	12.26	Hijau Biru	(6:4) N-Heksan:etil asetat
32	12.43	hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
33	13.00	hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
34	13.21	hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
35	13.36	hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
36	14.00	hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
37	14.18	hijau pekat	(6:4) N-Heksan:etil asetat
38	14.33	hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat

39	14.49	hijau bening	(5:5) N-Heksan:etil asetat
40	15.03	hijau bening	(5:5) N-Heksan:etil asetat
41	15.21	hijau bening	(5:5) N-Heksan:etil asetat
42	15.41	hijau bening	(5:5) N-Heksan:etil asetat
43	15.55	kuning keorangean	(5:5) N-Heksan:etil asetat
44	16.09	Orange	(5:5) N-Heksan:etil asetat
45	16.21	Orange	(5:5) N-Heksan:etil asetat
46	16.39	Orange	(5:5) N-Heksan:etil asetat
47	16.48	Orange	(5:5) N-Heksan:etil asetat
48	17.03	Orange	(5:5) N-Heksan:etil asetat
49	17.20	Orange	(5:5) N-Heksan:etil asetat
50	17.36	Orange	(4:6) N-Heksan:etil asetat
51	17.47	Orange	(4:6) N-Heksan:etil asetat
52	18.03	Orange	(4:6) N-Heksan:etil asetat
53	18.15	Orange	(4:6) N-Heksan:etil asetat
54	18.27	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
55	18.39	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
56	18.53	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
57	19.07	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
58	19.17	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
59	19.29	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
60	19.39	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
61	19.49	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
62	20.02	bening kehijauan	(4:6) N-Heksan:etil asetat

**Lampiran 9. Perhitungan Nilai Rf pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**Rumus Perhitungan Rf (*Retardation Factor*)

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik awal}}$$

$$\text{Ulangan 1} = \frac{1,0}{3,5} = 0,28$$

$$\text{Ulangan 2} = \frac{0,9}{3,5} = 0,26$$

$$\text{Ulangan 3} = \frac{0,9}{3,5} = 0,26$$

$$\text{Rf rata-rata} = 0,27$$



## Lampiran 10. Data Absorbansi, Kadar Pigmen dan Rendemen

Ulangan	Pengenceran	Absorbansi	Kadar Pigmen	Rendemen (%)	Rata-rata rendemen	Standar deviasi nilai rendemen
1	$10^3$	1,756	0,01061	0,01061		0,0189 %
2	$10^4$	0,435	0,02629	0,02629	0,0189	±
3	$10^4$	0,328	0,01982	0,01982		0,0240145

- Perhitungan kadar pigmen

Hukum *Lambert-Beer*, yaitu:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan : A = absorbansi

$\epsilon$  = absorptifitas molar (*Molar extinction coefficient*)

b = lebar bagian dalam kuvet

c = konsentrasi (molar)

– Ulangan 1

$$A = \epsilon bc$$

$$1,756 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{1,756}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 16,11 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

$$\text{Mencari massa : Mol} = \frac{g}{M_r} \times \frac{1000}{V (\text{mL})}$$

$$16,11 \times 10^{-6} = \frac{x}{658,92} \times \frac{1000}{1000}$$

$$16,11 \times 10^{-6} = \frac{x}{658,92}$$

$$x = 658,92 \times 16,11 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,01061 \text{ g}$$

## – Ulangan 2

$$A = \epsilon bc$$

$$0,435 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,435}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 3,991 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa : 
$$\text{Mol} = \frac{G}{M_r} \times \frac{1000}{V (\text{mL})}$$

$$3,991 \times 10^{-6} = \frac{x}{658,92} \times \frac{1000}{1000}$$

$$3,991 \times 10^{-6} = \frac{10 x}{6589,2}$$

$$x = 6589,2 \times 3,991 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,02629 \text{ g}$$

## – Ulangan 3

$$A = \epsilon bc$$

$$0,328 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,328}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 3,009 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa : 
$$\text{Mol} = \frac{G}{M_r} \times \frac{1000}{V (\text{mL})}$$

$$3,009 \times 10^{-6} = \frac{x}{658,92} \times \frac{1000}{1000}$$

$$3,009 \times 10^{-6} = \frac{x}{6589,2}$$

$$x = 6589,2 \times 3,009 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,01982 \text{ g}$$

- Perhitungan kadar rendemen pigmen

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

$$\text{Ulangan 1} = \frac{0,01061 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% = 0,01061 \%$$

$$\text{Ulangan 2} = \frac{0,02629 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% = 0,02629 \%$$

$$\text{Ulangan 3} = \frac{0,01982 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% = 0,01982 \%$$

$$\text{Rata-rata rendemen} = \frac{0,01061 + 0,02629 + 0,01982}{3} = 0,0189 \%$$

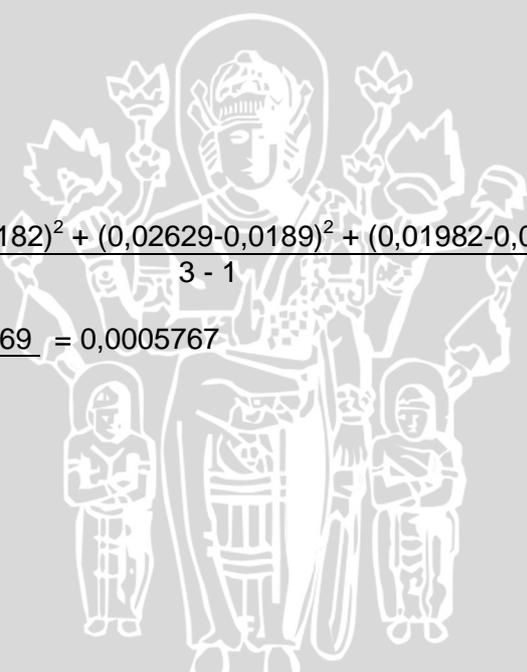
- Standar Deviasi:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$$= \frac{(0,01061-0,0189)^2 + (0,02629-0,0189)^2 + (0,01982-0,0189)^2}{3-1}$$

$$= \frac{0,00115350569}{2} = 0,0005767$$

$$S = 0,0240145$$



**Lampiran 11. Uji BSLT**

- Tabel % Probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Keterangan :  = Kisaran angka (+) 1-9 % kematian

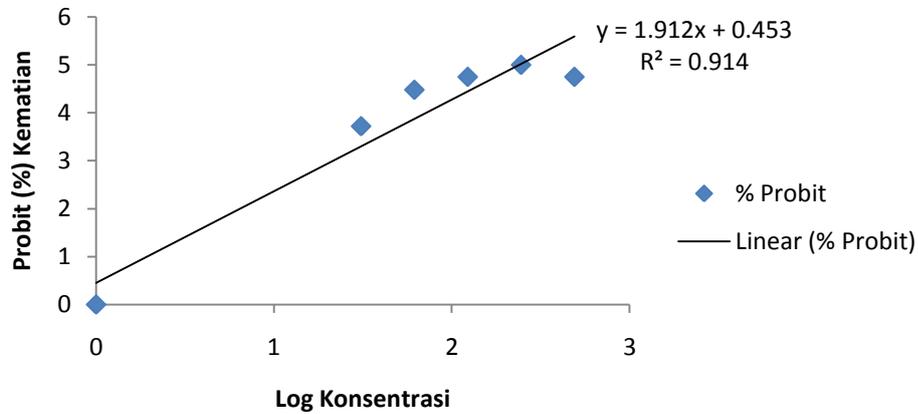
= Kematian (%)

- Tabel Kematian *Artemia salina*

Konsentrasi (µg/ml)	I	II	III	Total	Rata-rata
0	0	0	0	0	0
31,2	1	1	2	4	1,33
62,5	3	2	1	6	2
125	4	4	4	12	4
250	5	4	3	12	4
500	4	5	5	14	4,67

- Regresi Linier % Probit Ulangan 1

### Regresi % probit kematian dengan log konsentrasi Ulangan 1



Uji toksisitas ditentukan berdasarkan analisa probit melalui tabel probit dan dibuat regresi linier :

$$y = bx + a$$

y = angka probit (5 karena 50% kematian)

x = log konsentrasi

$$y = 1,912x + 0,453$$

$$5 = 1,912x + 0,453$$

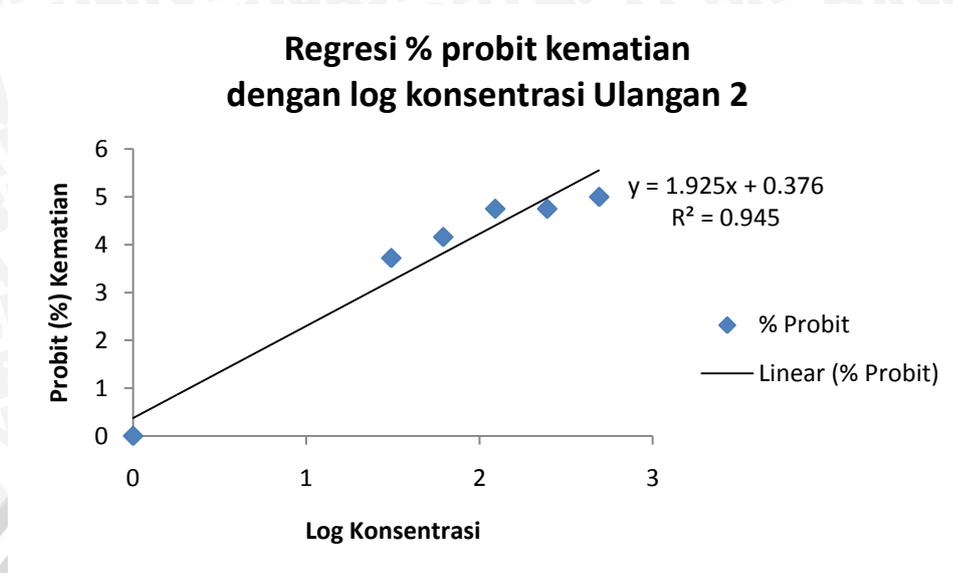
$$1,912 x = 5 - 0,453$$

$$x = \frac{4,547}{1,912} = 2,3871$$

Anti logaritma dari 2,3871 = 238,857

LC<sub>50</sub> = 238,857 µg/mL

- Regresi Linier % Probit Ulangan 2



Uji toksisitas ditentukan berdasarkan analisa probit melalui tabel probit dan dibuat regresi linier :

$$y = bx + a$$

y = angka probit (5 karena 50% kematian)

x = log konsentrasi

$$y = 1,925x + 0,376$$

$$5 = 1,925x + 0,376$$

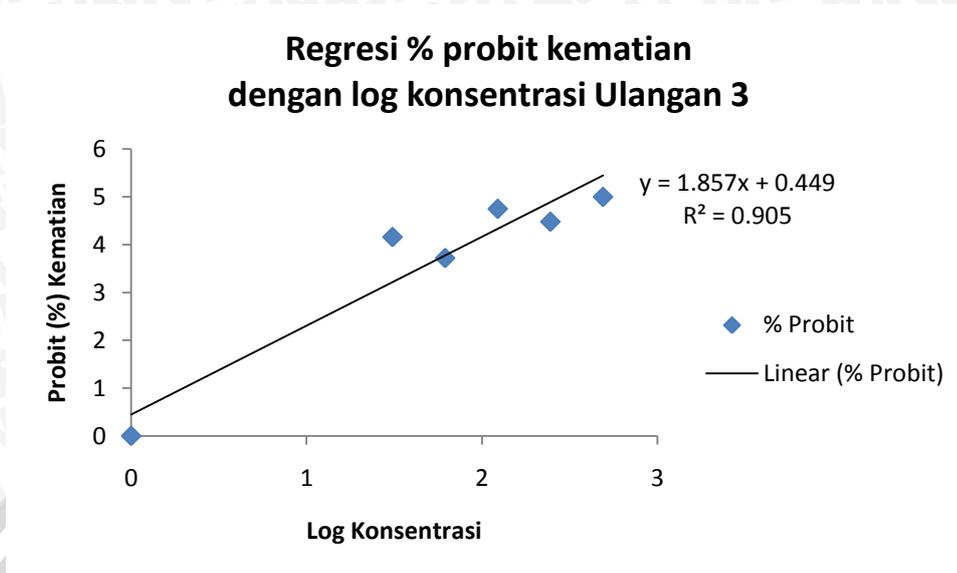
$$1,925x = 5 - 0,376$$

$$x = \frac{4,624}{1,925} = 2,4021$$

Anti logaritma dari 2,4021 = 252,393

LC<sub>50</sub> = 252,393 µg/mL

- Regresi Linier % Probit Ulangan 3



Uji toksisitas ditentukan berdasarkan analisa probit melalui tabel probit dan dibuat regresi linier :

$$y = bx + a$$

y = angka probit (5 karena 50% kematian)

x = log konsentrasi

$$y = 1,857x + 0,449$$

$$5 = 1,857x + 0,449$$

$$1,857 x = 5 - 0,449$$

$$x = \frac{4,551}{1,857} = 2,4507$$

Anti logaritma dari 2,4507 = 282,31

LC<sub>50</sub> = 282,31 µg/mL