

AKTIFITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR ALGA COKLAT
(*Sargassum fillipendula*) DENGAN VARIASI KADAR AIR BAHAN DAN
FERMENTASI DENGAN STARTER JAMUR *Aspergillus niger*

LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

Oleh:

SATRIO PAMUNGKAS

NIM. 0710830025

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

AKTIFITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR ALGA COKLAT
(*Sargassum fillipendula*) DENGAN VARIASI KADAR AIR BAHAN DAN
FERMENTASI DENGAN STARTER JAMUR *Aspergillus niger*

LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

Oleh:
SATRIO PAMUNGKAS
NIM. 0710830025

Dosen Penguji I

(Eko Waluyo S.Pi, M.Sc)
NIP. 19800424 200501 1 001
Tanggal :

**Menyetujui
Dosen Pembimbing I**

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

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Hardoko, MS)
NIP. 19620108198802 1 001
Tanggal :

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 1960032219860 1 1001
Tanggal :

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, Juli 2012

Mahasiswa,

Satrio Pamungkas

NIM. 0710830025



RINGKASAN

SATRIO PAMUNGKAS. Skripsi dengan judul Aktifitas Antioksidan Ekstrak Kasar Alga Coklat (*Sargassum fillipendula*) Dengan Variasi Kadar Air Bahan Dan Fermentasi Dengan Starter Jamur *Aspergillus niger* (di bawah bimbingan **Ir. Bambang Budi Sasmito, MS.** dan **Dr.Ir Hardoko, MS**)

Alga coklat termasuk salah satu sumber potensial senyawa bioaktif yang mengandung antioksidan alami, diantaranya jenis *Sargassum fillipendula* yang banyak ditemukan di perairan Indonesia. salah satunya di Pantai Ponjuk Padike Kecamatan Talango Kabupaten Sumenep Pulau Madura. Antioksidan dapat menetralkan adanya radikal bebas, melindungi bahan pangan dari oksidasi penyebab ketengikan. Untuk mendapatkan zat antioksidan dari alga coklat diperlukan metode inkubasi sampel yang tepat. Penambahan metode fermentasi dan pengaturan pH yang tepat pada saat inkubasi sampel berpengaruh terhadap zat antioksidan yang akan didapatkan.

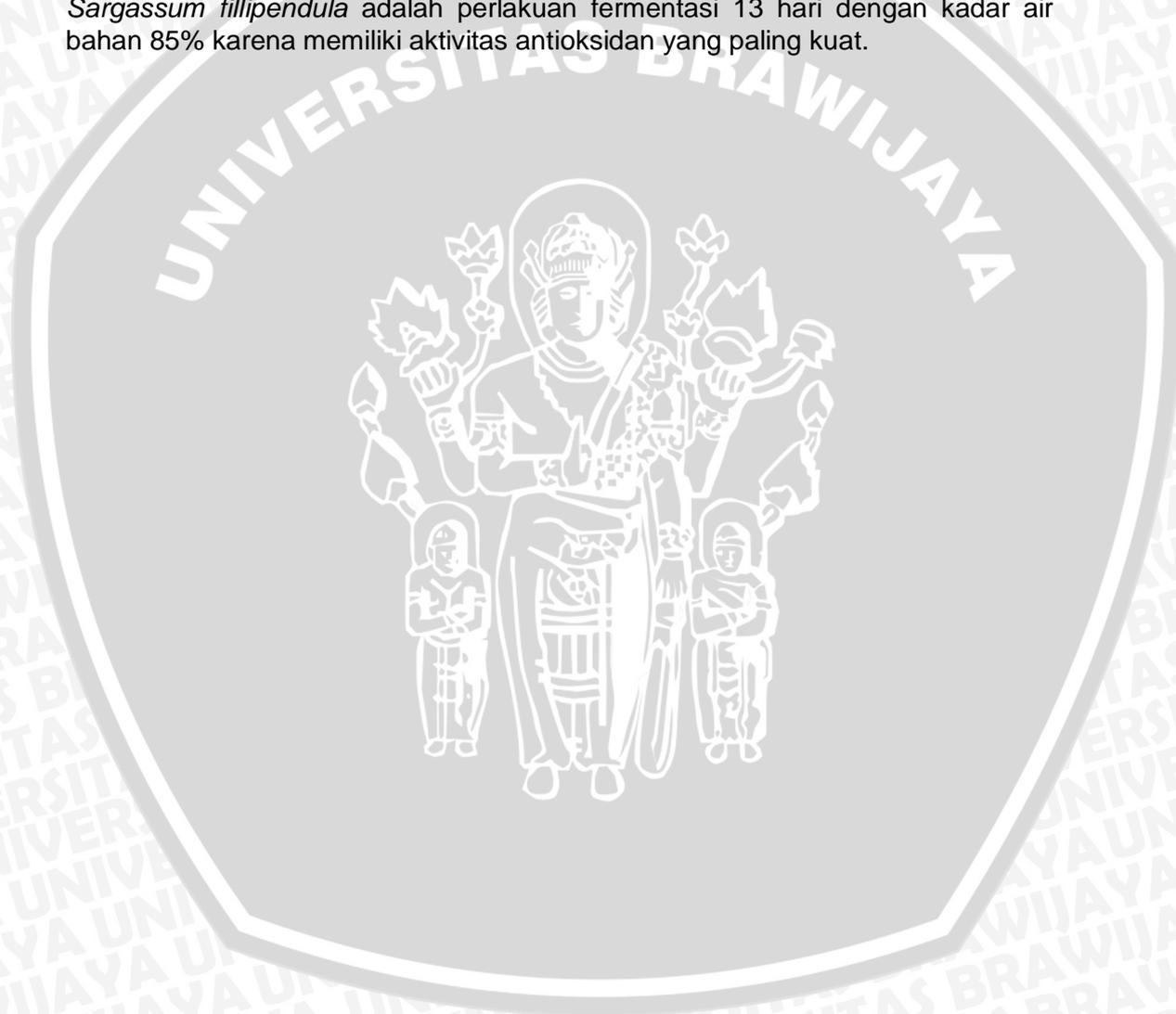
Tujuan penelitian secara umum adalah untuk mengetahui pengaruh kadar air bahan dan lama waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Sedangkan tujuannya secara khusus untuk menentukan kadar air bahan, lama fermentasi dan kombinasi antara kadar air bahan dan lama fermentasi yang terbaik untuk mengekstrak komponen antioksidan ekstrak kasar *Sargassum fillipendula*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Fakultas Pertanian Universitas Muhamadiyah Malang.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk menentukan kadar air bahan yang berbeda dan menentukan lama fermentasi yang tepat untuk inkubasi sampel dan penelitian utama untuk mengetahui perlakuan terbaik dari sampel yang ditambah jamur *Aspergillus niger*. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor, 3 level dan 2 kali ulangan. Parameter uji yang digunakan ada dua yaitu kuantitatif dan kualitatif. Parameter kuantitatifnya yaitu uji senyawa fitokimia sedangkan parameter kualitatifnya yaitu jumlah rendemen, kadar air, dan nilai IC_{50} , dimana nilai IC_{50} berarti senyawa antioksidan memberikan penghambat 50% karakter radikal bebas yang diekstrak dari sampel. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter uji, dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1% dan jika terdapat hasil yang berbeda sangat nyata maka dilakukan uji BNT pada taraf 1% untuk mengetahui perlakuan terbaik.

Hasil penelitian pendahuluan pada tahap pertama menentukan kadar air bahan menunjukkan bahwa kadar air bahan 50% memberikan nilai IC_{50} lebih rendah daripada kontrol yaitu sebesar 131.02 ppm. Pada tahap kedua penelitian pendahuluan menentukan lama fermentasi menunjukkan bahwa lama fermentasi 13 hari memberikan nilai IC_{50} yang lebih rendah daripada kontrol yaitu sebesar 134.96 ppm. Semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Kadar air bahan 50% dan lama fermentasi 13 hari kemudian dijadikan titik acuan untuk penelitian utama. Hasil penelitian utama meliputi 4 parameter yaitu persen rendemen, kadar air, aktivitas antioksidan dan uji fitokimia. Persen rendemen tertinggi terdapat pada perlakuan fermentasi 13 hari kadar air bahan 85% sebesar 4.61% sedangkan persen rendemen terendah terdapat pada perlakuan fermentasi 15 hari kadar air bahan 35% sebesar 2.02%.

Person kadar air tertinggi terdapat pada perlakuan fermentasi 11 hari kadar air bahan 85% sebesar 87.15% sedangkan kadar air terendah terdapat pada perlakuan fermentasi 15 kadar air bahan 35% sebesar 83.86%. Hasil uji BNT 1% menunjukkan besarnya nilai rendemen dan kadar air dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan kadar air bahan sedangkan perlakuan waktu fermentasi tidak berpengaruh secara nyata.

Uji aktivitas antioksidan menunjukkan hasil perlakuan yang memberikan nilai IC_{50} terendah adalah perlakuan fermentasi 13 hari kadar air bahan 85% dengan nilai IC_{50} sebesar 81.18 ppm, sedangkan nilai IC_{50} tertinggi pada perlakuan kadar air bahan 35% memberikan nilai tertinggi yaitu sebesar 125.13 ppm. Hasil uji fitokimia dari perlakuan yang terbaik menunjukkan bahwa ekstrak Alga coklat *Sargassum fillipendula* positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan fenolik. Perlakuan yang terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari Alga coklat *Sargassum fillipendula* adalah perlakuan fermentasi 13 hari dengan kadar air bahan 85% karena memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat.



KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT, karena berkat rahmat dan ridho-Nya, laporan Skripsi dengan judul “Aktifitas Antioksidan Ekstrak Kasar Alga Coklat (*Sargassum fillipendula*) Dengan Variasi Kadar Air Bahan Dan Fermentasi Dengan Starter Jamur *Aspergillus niger*”. Laporan Skripsi ini disusun sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Laporan skripsi ini kami hadirkan dengan harapan agar dapat dijadikan pegangan belajar mengenai dunia perikanan, sekaligus menamba khasanah keilmuan bagi pembaca terutama untuk mengetahui aktifitas antioksidan pada ekstrak kasar alga coklat (*Sargassum fillipendula*) dengan variasi kadar air bahan dan fermentasi. Sehingga diharapkan penelitian ini dapat dilanjutkan oleh peneliti yang lain.

Adapun ucapan terima kasih yang kami persembahkan kepada pihak-pihak yang telah ikut serta dalam penyelesaian Skripsi ini, diantaranya:

1. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang yang telah memberikan fasilitas kuliah untuk dapat menunjang proses kegiatan Skripsi ini.
2. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS dan Dr. Ir. Hardoko, MS selaku dosen pembimbing atas bimbingan serta nasehat yang telah diberikan.
3. Eko Waluyo S.Pi, M.Sc selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang telah diberikan.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis dalam penyusunan laporan ini dirasakan masih banyak kekurangan, oleh sebab itu segala kritik dan saran yang membangun kami terima dengan senang hati. Semoga laporan ini dapat menambah pengetahuan dan bermanfaat bagi yang membacanya. Amin.

Malang, 16 Juli 2012

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Hipotesis.....	6
1.5. Kegunaan Penelitian.....	6
1.6. Tempat dan Waktu	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Alga coklat.....	8
2.2. <i>Sargassum fillipendula</i>	10
2.3. Pengeringan.....	11
2.4. Fermentasi	12
2.5. <i>Aspergillus Niger</i>	12
2.6. Radikal Bebas	14
2.7. Antioksidan.....	15
2.7.1. Mekanisme Kerja Antioksidan	17
2.8. Ekstraksi.....	19
2.9. Pelarut.....	20
3. METODE PENELITIAN	
3.1. Materi Penelitian	23
3.1.1. Bahan Penelitian.....	23
3.1.2. Alat Penelitian	24

3.2. Metode penelitian.....	24
3.2.1. Penelitian Pendahuluan.....	25
3.2.1.1. Penelitian Pendahuluan Tahap Pertama	25
3.2.1.2. Penelitian Pendahuluan Tahap Kedua.....	27
3.2.2. Penelitian Utama.....	28
3.2.2.1. Perlakuan dan Rancangan Percobaan	28
3.2.3. Parameter Uji.....	29
3.3. Prosedur Penelitian Utama	30
3.3.1. Pembuatan Media dan Pembiakan Kultur Starter <i>Aspergillus niger</i>	30
3.3.2. Pengaturan Kadar Air Bahan.....	31
3.3.3. Fermentasi Alga Coklat <i>Sargassum fillipendula</i> (Sasmito,2011)	33
3.3.4. Ekstraksi <i>Sargassum fillipendula</i> (Suryaningrum <i>et al.</i> , 2006) .	33
3.3.5. Prosedur Analisis Parameter.....	34
3.3.5.1. Uji Fitokimia (Harbone, 1987).....	34
3.3.5.2. Uji Aktifitas Antioksidan (Blois, 1958).....	34
3.3.5.3. Uji Kadar Air (Sudarmadji <i>et al.</i> , 1997).....	35
3.4. Analisis Data	36
4. PEMBAHASAN	
4.1. Penelitian Pendahuluan.....	37
4.2. Penelitian Utama.....	40
4.3. Rendemen dan Kadar Air	41
4.3.1. Rendemen.....	41
4.3.2. Kadar Air	43
4.4. Aktifitas Antioksidan.....	44
4.5. Perlakuan Terbaik.....	50
4.6. Analisis Fitokimia	51
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	54
5.2. Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55

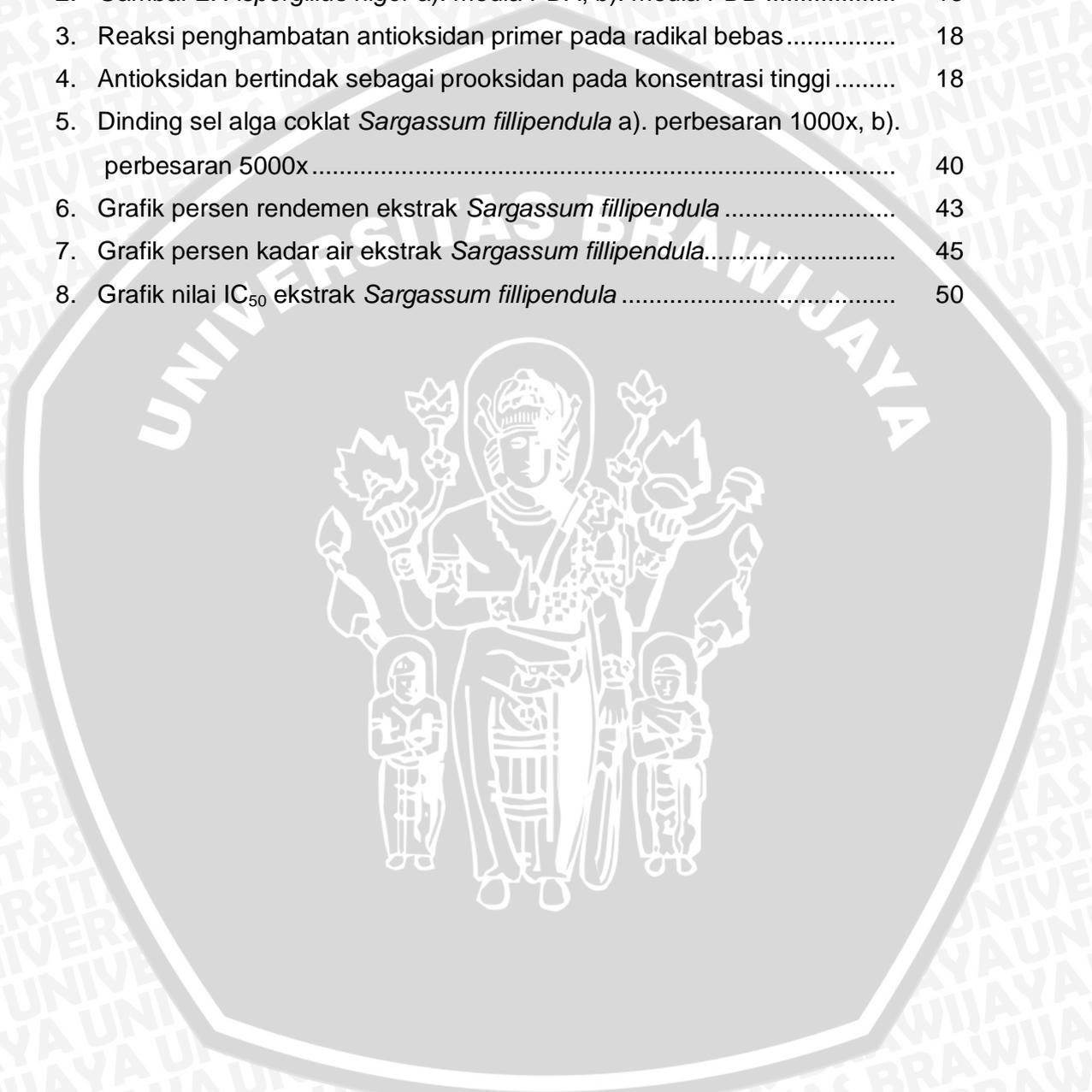
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Kimia Alga Coklat.....	10
2. Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat	10
3. Konstanta dielektrik beberapa pelarut.....	20
4. Sifat –sifat pelarut umum	21
5. Desain Rancangan Penelitian	29
6. Nilai IC 50 ekstrak kasar <i>Sargassum fillipendula</i> dengan kadar air bahan yang berbeda	37
7. Nilai IC ₅₀ ekstrak kasar <i>Sargassum fillipendula</i> dengan fermentasi	37
8. Notasi BNT 1% rendemen ekstrak alga coklat <i>Sargassum fillipendula</i>	41
9. Notasi BNT 1% kadar air ekstrak alga coklat <i>Sargassum fillipendula</i>	44
10. Notasi BNT 1% IC ₅₀ ekstrak alga coklat <i>Sargassum fillipendula</i>	47
11. Hasil uji fitokimia ekstrak ethanol <i>Sargassum fillipendula</i>	51



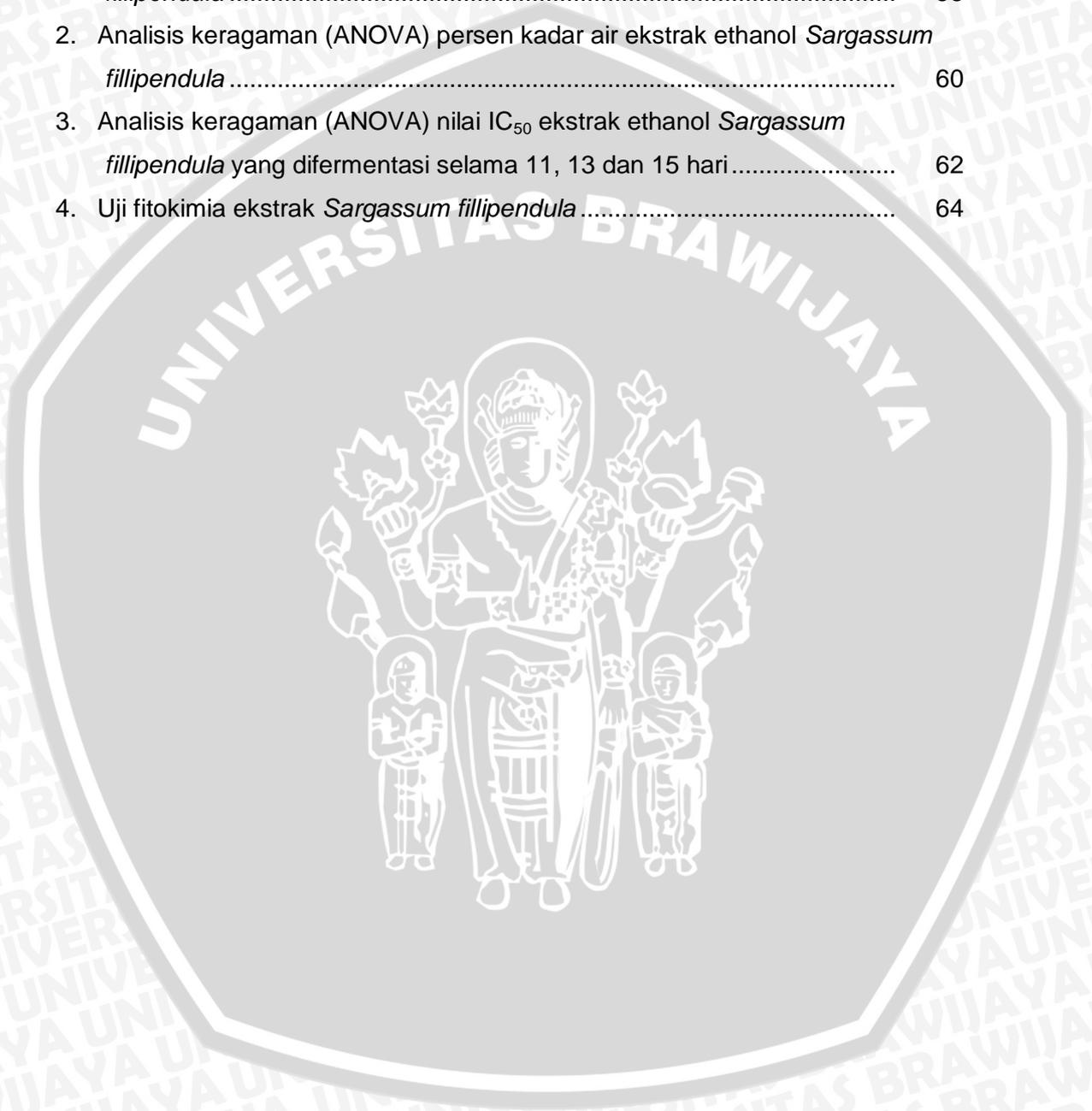
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum fillipendula</i>	11
2. Gambar 2. <i>Aspergillus niger</i> a). media PDA, b). media PDB	13
3. Reaksi penghambatan antioksidan primer pada radikal bebas.....	18
4. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi.....	18
5. Dinding sel alga coklat <i>Sargassum fillipendula</i> a). perbesaran 1000x, b). perbesaran 5000x.....	40
6. Grafik persen rendemen ekstrak <i>Sargassum fillipendula</i>	43
7. Grafik persen kadar air ekstrak <i>Sargassum fillipendula</i>	45
8. Grafik nilai IC ₅₀ ekstrak <i>Sargassum fillipendula</i>	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis keragaman (ANOVA) persen rendemen ekstrak ethanol <i>Sargassum fillipendula</i>	58
2. Analisis keragaman (ANOVA) persen kadar air ekstrak ethanol <i>Sargassum fillipendula</i>	60
3. Analisis keragaman (ANOVA) nilai IC ₅₀ ekstrak ethanol <i>Sargassum fillipendula</i> yang difermentasi selama 11, 13 dan 15 hari.....	62
4. Uji fitokimia ekstrak <i>Sargassum fillipendula</i>	64



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Rumput laut coklat banyak dijumpai di perairan Indonesia terutama untuk jenis *Sargassum sp.* Rumput laut coklat mengandung pigmen klorofil a dan c; beta karoten; violasantin dan flukosantin. Ciri-ciri *Sargassum filipendula* adalah berbentuk thallus yang umumnya silinder atau gepeng, tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat, berukuran relatif besar, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter dan warna thallus umumnya coklat (Nurhasanah, 2011).

Potensi *Sargassum sp* yang berasal dari kelas Phaeophyta di Indonesia pada tahun 1999 adalah 52 juta ton, pada tahun 2000 adalah 76,53 juta ton, sedangkan pada tahun 2004 adalah 139,74 juta ton (Statistik Kelautan dan Perikanan Indonesia, 2005). Potensi *Sargassum* di Kepulauan Madura pada tahun 2005 menurut data DKP Sumenep adalah 7,1 juta ton per tahun (DKP Sumenep, 2007).

Alga coklat dapat tumbuh subur bila hidup dilaut panas pada daerah tropis seperti *Sargassum sp.* (Winarno, 1996). Keunggulan dari alga coklat adalah mempunyai sifat sebagai zat antioksidan yang cukup potensial karena mengandung senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran yang tinggi. Antioksidan merupakan salah satu bahan aditif yang dapat melindungi bahan pangan dari kerusakan oksidasi penyebab ketengikan (Januar *et al.*, 2004).

Alga coklat merupakan sumber potensi senyawa bioaktif yang mengandung antioksidan alami. Kandungan metabolit sekunder dalam alga coklat sudah mulai diteliti antara lain kandungan steroid, alkaloid, phenol dan

vitamin (Rachmaniar *et al.*, 1999). Alga coklat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai reversal agent dan industri agrokimia terutama untuk antioksidan, fungisida dan herbisida. Dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi pemanfaatan alga dalam bentuk olahan semakin meluas. Penelitian yang semakin maju memungkinkan mengetahui kandungan kimia dari berbagai alga sehingga dapat diisolasi dan diidentifikasi yang selanjutnya dimanfaatkan dalam bentuk hasil olahan atau dalam bentuk substansi (Simanjuntak, 1995).

Alga coklat merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang sangat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai reversal agent dan industri agrokimia terutama untuk antifeedant, fungisida dan herbisida. Kemampuan alga untuk memproduksi metabolit sekunder terhalogenasi yang bersifat sebagai senyawa bioaktif dimungkinkan terjadi, karena kondisi lingkungan hidup alga yang ekstrem seperti salinitas yang tinggi atau akan digunakan untuk mempertahankan diri dari ancaman predator. Dalam dekade terakhir ini, berbagai variasi struktur senyawa bioaktif yang sangat unik dari isolat alga merah telah berhasil diisolasi. Namun pemanfaatan sumber bahan bioaktif dari alga belum banyak dilakukan. Berdasarkan proses biosintesisnya, alga laut kaya akan senyawa turunan dari oksidasi asam lemak yang disebut oxylipin. Melalui senyawa ini berbagai jenis senyawa metabolit sekunder diproduksi (Wikipedia, 2011^a)

Pada beberapa penelitian, ditemukan bahwa dalam ekstrak *Sargassum* sp banyak ditemukan zat yang berpotensi sebagai antioksidan, diantaranya xanthofil, karotenoid, dan fukosanthin. Antioksidan merupakan sebagai senyawa yang dapat menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh, sehingga dapat mencegah atau mengurangi terjadinya kerusakan sel (Abdul, 2003). Antioksidan merupakan salah satu bahan aditif yang dapat melindungi bahan pangan dari

kerusakan oksidasi penyebab ketengikan. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi atas antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami dianggap lebih aman daripada antioksidan sintetis. Hasil penelitian Fujimoto *et al.* (1985), dan Cahyana *et al.* (1992), telah membuktikan adanya senyawa bioaktif pada alga laut yang berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Suryaningrum *et al.* (2006), kelemahan dari antioksidan adalah sifatnya yang mudah rusak bila terpapar oksigen, cahaya, suhu tinggi dan pengeringan. Penggunaan bahan pelarut yang tidak tepat juga dapat merusak aktivitas antioksidan yang ada.

Dalam menghasilkan antioksidan pada *Sargassum sp*, dapat dilakukan dengan proses ekstraksi. Sejauh ini jumlah antioksidan yang didapat jumlahnya hanya sedikit. Dari hal itu diduga karena pada saat proses maserasi, pada dinding sel rumput laut tersebut tidak terpecahkan secara maksimal. Bahwa pada dinding sel rumput laut ini mengandung zat algin, selulosa dan pektin dimana dari zat tersebut termasuk dalam golongan polisakarida jenis serat pangan. Agar hasil antioksidan yang didapat bisa lebih banyak, pada saat proses maserasi ditambah suatu metode dengan cara pengeringan dan fermentasi pada algae coklat tersebut kemudian dilakukan proses ekstraksi dengan pelarut .

Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air suatu bahan, sehingga dengan adanya penurunan kadar air maka bahan pangan akan mempunyai daya simpan yang lebih lama (Susanto dan Widyaningsih, 2004).

Dengan fermentasi, maka diharapkan pemecahan dinding sel *Sargassum sp* dapat berjalan sempurna karena dibantu oleh pektinase. Pektinase adalah enzim yang digunakan dalam proses degradasi molekul pektin (sejenis kompleks polisakarida). Terdapat beberapa jenis molekul pektin yang dapat didegradasi oleh pektinase, antara lain protopektin, pektin, asam pektinat, asam pektik, dan rhamnogalakturonan (Wikipedia, 2011^b). Ditambahkan Septa (2011), Pektinase merupakan enzim yang mendegradasi pektin yang umumnya

terdapat pada dinding sel. Pektinase biasanya ditemukan pada jamur atau mikroorganisme yang tumbuh pada buah-buah yang mulai mengalami pembusukan misalnya *Aspergillus sp.* Menurut Pujaningsih (2005), Fermentasi adalah suatu proses pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan melibatkan peran mikroorganisme, atau bisa dikatakan fermentasi adalah segala macam proses metabolisme (enzim, jasad renik secara oksidasi maupun reduksi, hidrolisa atau reaksi kimia lainnya) yang melakukan perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk akhir.

Proses ekstraksi merupakan isolasi senyawa yang terdapat dalam campuran larutan dengan menggunakan pelarut yang cocok. Salah satu ekstraksi adalah maserasi. Maserasi merupakan proses dimana simplisa yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat mudah larut akan melarut (Ansel, 1989). Hasil penelitian mengenai alga coklat telah banyak dilaporkan, yaitu: pada penelitian yang dilakukan oleh Suryaningrum *et al.* (2006), yang menggunakan pelarut metanol, etil asetat dan heksan untuk mengekstrak antioksidan dari *Halymenia harveyana* dan *Euclima cottoni*, aktivitas antioksidan yang tinggi terhadap radikal bebas DPPH ditunjukkan pada fraksi metanol (pelarut bersifat polar) pada alga jenis *H. Harveyana* dengan nilai IC_{50} sebesar 176,50 ppm.

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada alga laut dapat digunakan metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal

hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah, dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang (Blois, 1958; Suratmo, 2009).

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk memanfaatkan salah satu biota laut yang jumlahnya cukup banyak di perairan Indonesia, khususnya mengenai metode ekstraksi dengan penambahan proses kadar air bahan yang berbeda dan lama waktu fermentasi. Pemilihan penurunan kadar air berbeda dan difermentasi agar dapat mengoptimalkan proses ekstraksi dan senyawa antioksidan yang akan didapatkan. Diharapkan senyawa antioksidan dari *Sargassum fillipendula* dapat menjadi zat antioksidatif baku yang dapat diterapkan pada produk pangan maupun nonpangan.

1.2. Rumusan masalah

Rumput laut coklat jenis *Sargassum fillipendula* mengandung pigmen klorofil a dan c; beta karoten; *violasantin* dan *flukosantin*; *pirenoid* dan *filakoid* (Wikipedia, 2011^a). Hasil penelitian terbaru menunjukkan bahwa karotenoid pada rumput laut merupakan antioksidan yang dapat berfungsi melindungi berbagai macam penyakit dan stress (Burtin, 2006). Untuk mengekstrak antioksidan akan lebih mudah jika dilakukan degradasi selulosa terlebih dahulu. Degradasi komponen dinding sel dapat dilakukan dengan fermentasi menggunakan mikroba, diantaranya jamur *Aspergillus niger*. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap fermentasi diantaranya waktu fermentasi dan kadar air bahan yang berbeda. Dari paragraf diatas dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah kadar air bahan yang berbeda berpengaruh terhadap rendemen dan mutu antioksidan dari ekstrak kasar *Sargassum filipendula*?

2. Apakah lama fermentasi berpengaruh terhadap rendemen dan kualitas antioksidan dari ekstrak kasar *Sargassum fillipendula*?
3. Apakah kadar air bahan yang berbeda dan lama fermentasi berpengaruh terhadap rendemen dan kualitas antioksidan dari ekstrak kasar *Sargassum fillipendula*?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian secara umum adalah untuk mengetahui pengaruh kadar air bahan dan lama waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Sedangkan tujuannya secara khusus untuk menentukan kadar air bahan, lama fermentasi dan kombinasi antara kadar air bahan dan lama fermentasi yang terbaik untuk mengekstrak komponen antioksidan ekstrak kasar *Sargassum fillipendula*.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Kadar air bahan yang berbeda berpengaruh terhadap daya antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum fillipendula*.
2. Lama fermentasi berpengaruh terhadap daya antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum fillipendula*.
3. Kadar air bahan dan lama fermentasi berpengaruh terhadap daya antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum fillipendula*.

1.5. Kegunaan Penelitian

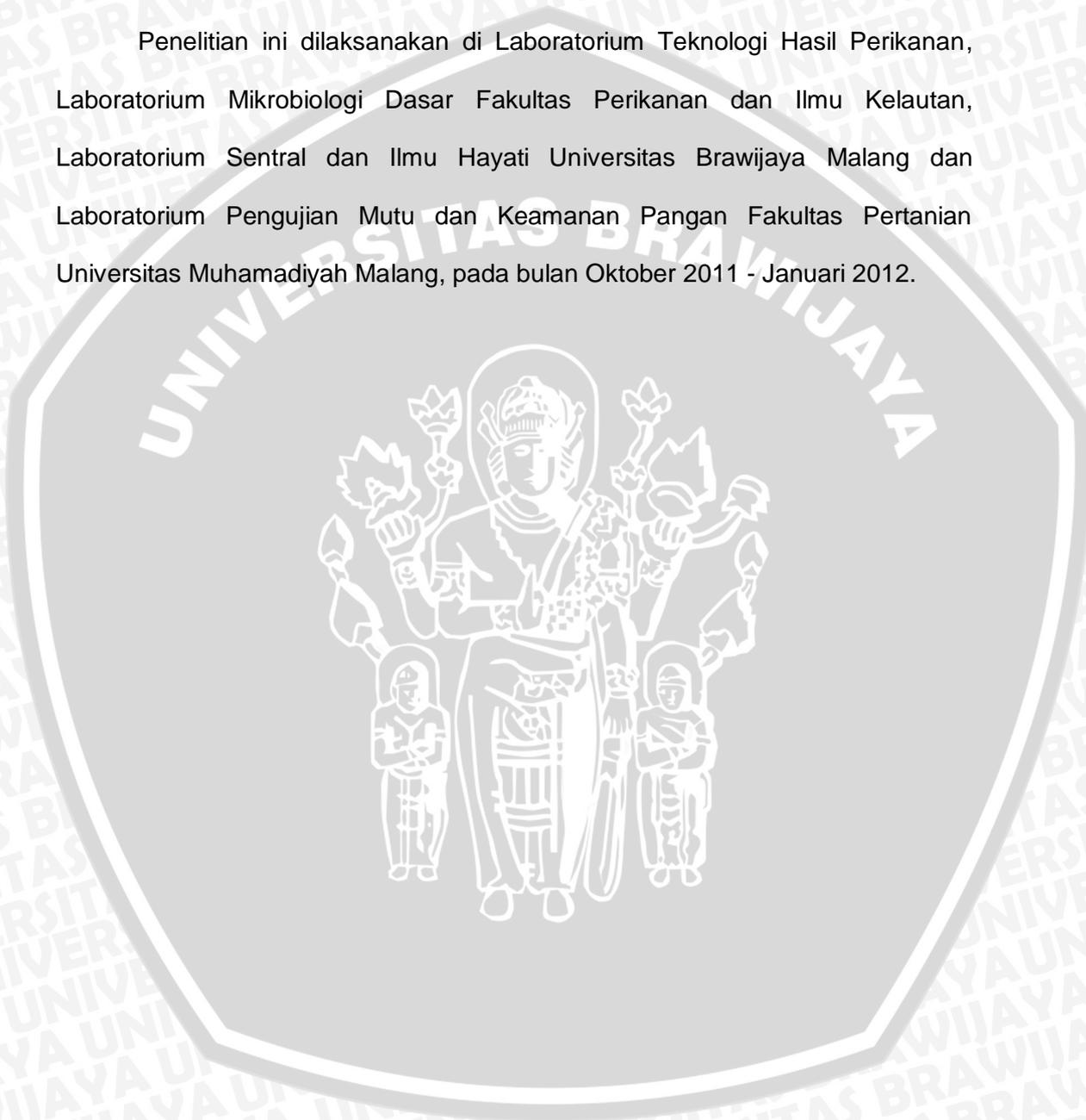
Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga dan institusi lain mengenai manfaat senyawa antioksidan yang ada

repository.ub.ac.id

pada *Sargassum filipendula* dan masyarakat dapat memanfaatkan *Sargassum filipendula* sebagai alternatif antioksidan alami yang sangat potensial.

1.6. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Sentral dan Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Malang, pada bulan Oktober 2011 - Januari 2012.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alga Coklat

Pada umumnya rumput laut dapat dikelompokkan menjadi empat kelas yaitu rumput laut hijau (Chlorophyceae), rumput laut hijau biru (Cyanophyceae), rumput laut coklat (Phaeophyceae), rumput laut merah (Rhodophyceae). Pembagian ini berdasarkan pigmen yang dikandungnya. Namun rumput laut merah dan coklat merupakan jenis yang komersil, dan rumput laut coklat merupakan rumput laut yang memiliki potensi untuk dikembangkan. Rumput laut coklat banyak dijumpai di perairan Indonesia terutama untuk jenis *Sargassum sp* (Wikipedia, 2011^b).

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

Potensi *Sargassum* yang berasal dari kelas Phaeophyta di Indonesia pada tahun 1999 adalah 52 juta ton, pada tahun 2000 adalah 76,53 juta ton, sedangkan pada tahun 2004 adalah 139,74 juta ton (Statistik Kelautan dan Perikanan Indonesia, 2005). Potensi *Sargassum* di Kepulauan Madura pada tahun 2005 menurut data DKP Sumenep adalah 7,1 juta ton per tahun

(DKP Sumenep, 2007). Komposisi kimia alga coklat dan kadar mineralnya dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Komposisi kimia alga coklat

Komposisi Kimia	Persentase (%)
Karbohidrat	19,06
Protein	5,53
Lemak	0,74
Air	11,71
Abu	34,57
Serat kasar	28,39

Sumber : Yunizal (1999).

Tabel 2. Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat

Unsur	Kadar
Chlor	9,8 – 15,00
Kalium	6,4 – 7,8
Natrium	2,6 – 3,8
Magnesium	1,0 – 1,9
Belerang	0,7 – 2,1
Silikon	0,5 – 0,6
Fosfor	0,3 – 0,6
Kalsium	0,2 – 0,3
Besi	0,1 – 0,2
Yodium	0,1 – 0,8
Brom	0,003 – 0,14

Sumber : Yunizal (1999).

2.2. *Sargassum Fillipendula*

Ciri-ciri *Sargassum fillipendula* adalah berbentuk thallus yang umumnya silinder atau gepeng, tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat, berukuran relatif besar, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter), dan warna thallus umumnya coklat. *Sargassum sp* tersebar luas di Indonesia, tumbuh di perairan yang terlindung maupun yang berombak besar pada habitat batu. *Sargassum fillipendula* ini hidup melekat pada batu karang dan dapat terlepas dari substratnya apabila ada ombak besar dan hanyut

dipermukaan laut atau terdampar di permukaan pasir pantai. Jenis *Sargassum fillipendula* pemanfaatannya sangat terbatas, bahkan masih dianggap sebagai sampah laut karena pada musim tertentu hanyut dipermukaan laut dan terdampar di pantai karena tercabut atau patah akibat ombak yang besar atau karena perubahan musim (Crayonpedia, 2011). Gambar dari *Sargassum fillipendula* dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasinya sebagai berikut (Wikipedia, 2009^a) :

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



Gambar 1. *Sargassum fillipendula*

2.3. Fermentasi

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor elektron eksternal. Fermentasi dibagi menjadi 3 macam yaitu

fermentasi alkohol dengan menghasilkan ethanol dan karbondioksida, fermentasi asam laktat dengan mengubah asam laktat menjadi asam piruvat dan fermentasi asam cuka dengan menghasilkan asam asetat (Wikipedia, 2012^a). Sedangkan menurut Pujaningsih (2005), Fermentasi adalah suatu proses pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan melibatkan peran mikroorganisme, atau bisa dikatakan fermentasi adalah segala macam proses metabolisme (enzim, jasad renik secara oksidasi maupun reduksi, hidrolisa atau reaksi kimia lainnya) yang melakukan perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk akhir. Tujuan dari fermentasi adalah menghasilkan suatu produk yang kandungan nutrisi, tekstur, biological availability lebih baik dari sebelumnya.

Menurut Nurhidayat (2008), mikrobia yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir dan kapang. Contoh bakteri yang digunakan dalam fermentasi adalah *Acetobacter xylinum* pada pembuatan nata decoco, *Acetobacter aceti* pada pembuatan asam asetat. Contoh khamir dalam fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan alkohol sedang contoh kapang adalah *Rhizopus* sp pada pembuatan tempe, *Monascus purpureus* pada pembuatan angkak dan sebagainya. Fermentasi dapat dilakukan menggunakan kultur murni ataupun alami serta dengan kultur tunggal ataupun kultur campuran. Contoh penggunaan kultur murni tunggal adalah *Lactobacillus casei* pada fermentasi susu sedang contoh campuran kultur murni adalah pada fermentasi kecap, yang menggunakan *Aspergillus oryzae* pada saat fermentasi kapang dan saat fermentasi garam digunakan bakteri *Pediococcus* sp dan khamir *Saccharomyces rouxii*. Proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu mikroba, bahan dasar, sifat-sifat proses, pilot plant dan faktor sosial ekonomi.

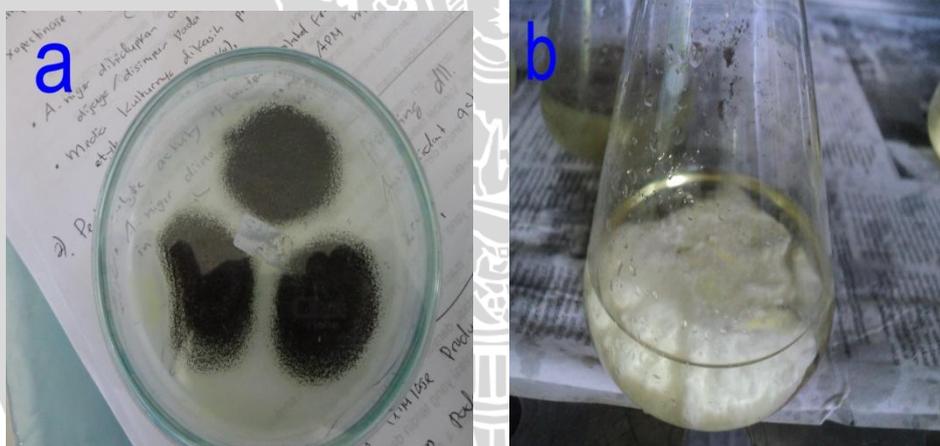
2.4. *Aspergillus Niger*

Aspergillus niger merupakan fungi dari filum ascomycetes yang berfilamen, mempunyai hifa bersepta, dan dapat ditemukan melimpah di alam. Koloninya berwarna putih pada *Agar Dekstrosa Kentang* (PDA) 25 °C dan berubah menjadi hitam ketika konidia dibentuk. Kepala konidia dari *Aspergillus niger* berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur. *Aspergillus niger* dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37 °C, dengan suhu minimum 6-8 °C, dan suhu maksimum 45-47 °C. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan oksigen yang cukup (*aerobik*). *Aspergillus niger* memiliki warna dasar berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam. Dalam metabolismenya *Aspergillus niger* dapat menghasilkan asam sitrat sehingga fungi ini banyak digunakan sebagai model fermentasi karena fungi ini tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan. *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat, oleh karena itu *Aspergillus niger* banyak digunakan secara komersial dalam produksi beberapa enzim seperti amilase, pektinase, amiloglukosidase, dan selulase. Selain itu, *Aspergillus niger* juga menghasilkan *gallic acid* yang merupakan senyawa fenolik yang biasa digunakan dalam industri farmasi dan juga dapat menjadi substrat untuk memproduksi senyawa antioksidan dalam industri makanan. Klasifikasi dari *Aspergillus niger* yaitu :

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Subphylum	: Pezizomycotina
Class	: Eurotiomycetes
Order	: Eurotiales
Family	: Trichocomaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Species	: <i>A. niger</i> (Wikipedia, 2012 ^b).

Aspergillus niger merupakan salah satu jenis jamur yang tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan. Produk fermentasi ini mempunyai kandungan protein kasar dan protein sejati yang lebih tinggi dari bahan asalnya. Pertumbuhannya mudah dilihat karena penampaknya yang berserabut seperti kapas yang mulanya berwarna putih, tetapi jika spora telah timbul akan terbentuk berbagai warna tergantung dari jenis kapangnya. *Aspergillus niger* mempunyai konidi yang besar, dipak secara padat, bulat, dan berwarna hitam coklat atau ungu coklat. Kapang ini mempunyai bagian yang khas yaitu hifanya berseptata, spora yang bersifat aseksual dan tumbuh memasing di stigma (Urip Santoso, 2009).

Gambar dari koloni *Aspergillus niger* dalam media PDA dan PDB dapat dilihat pada Gambar 2 :



Gambar 2. *Aspergillus niger* a). media PDA, b). media PDB

2.5. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung koroner,

katarak, penuaan dini. Oleh karena itu, tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Andayani *et al.*, 2008).

Tanpa disadari, dalam tubuh kita secara terus menerus terbentuk radikal bebas melalui peristiwa metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi dan akibat respons terhadap pengaruh dari luar tubuh seperti polusi lingkungan, asap rokok. Lingkungan yang tercemar justru merangsang tumbuhnya radikal bebas (*free radical*) yang dapat merusak tubuh. Penelitian bidang gizi membuktikan bahwa antioksidan mampu melindungi jaringan tubuh dari efek negatif radikal bebas (Mega dan dewa, 2010).

Radikal bebas secara umum dapat dihambat oleh antioksidan tertentu baik alami maupun sintetis. Sebagian besar antioksidan alami berasal dari tanaman antara lain berupa senyawa tokoferol, karotenoid, asam askorbat, fenol dan flavonoid (Juniarti *et al.*, 2009).

2.6. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas seperti enzim SOD (superoxide dismutase), glutathione, dan katalase. Antioksidan juga dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan betakaroten serta senyawa fenolik. Biasanya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus $-OH$ dan $-OR$ (Andayani *et al.*, 2008).

Antioksidan digolongkan dalam dua golongan yaitu antioksidan alami dan sintetis. Antioksidan sintetis seperti BHA (*butylated hydroxy-anisole*) dan BHT (*butylated hydroxyl-toluene*) sangat efektif dalam menghambat reaksi oksidasi. Akan tetapi penggunaan BHT dan BHA banyak menimbulkan keawatiran akan

efek sampingnya. BHA dapat menyebabkan pembengkakan hati dan mempengaruhi aktivitas enzim dalam hati. Selain itu, BHA juga menyebabkan pendarahan fatal pada rongga *pleural* dan *peritoneal* dan juga pada testis. BHT juga menyebabkan perubahan hormon tiroid tikus, stimulasi sintesis DNA dan induksi enzim. Antioksidan alami dapat dijumpai pada rempah-rempah, biji-bijian, kacang-kacangan, sayur dan buah. Antioksidan alami dianggap lebih aman untuk dikonsumsi (Andarwulan *et al.*, 1996).

Sumber-sumber antioksidan secara umum dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok (Wikipedia, 2011^o) :

- Antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia). Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan penggunaannya untuk makanan dan penggunaannya telah sering digunakan, yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan-antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial.
- Antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Di dalam makanan dapat berasal dari senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992).

Peranan antioksidan sangat penting dalam meredam efek radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif seperti tekanan darah tinggi, jantung koroner, diabetes dan kanker yang didasari oleh proses biokimiawi dalam tubuh (Juniarti *et al.*, 2009). Konsumsi antioksidan yang memadai dapat

mengurangi terjadinya berbagai penyakit seperti kanker, kardiovaskuler, katarak, masalah pencernaan dan penyakit degeneratif lain. Senyawa antioksidan diantaranya adalah asam fenolik, flavonoid, β -karoten, vitamin E (tokoferol), vitamin C, asam urat, bilirubin, dan albumin. Zat gizi mineral seperti mangan, seng, tembaga juga berperan sebagai antioksidan (Mega dan dewa, 2010).

Menurut Larson (1988), senyawa antioksidan didalam tanaman tingkat tinggi selain senyawa protein, senyawa bernitrogen dan senyawa karotenoid dan vitamin C, adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan primer dalam tanaman bersifat polar, dapat berupa vitamin E, flavonoid, asam fenolat dan senyawa fenol yang lain. Senyawa fenol tersebut larut dalam pelarut polar seperti methanol maupun etanol.

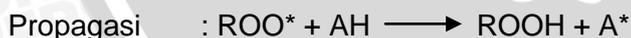
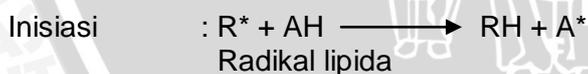
Senyawa fenol dapat berfungsi sebagai antioksidan apabila tidak berdiri sendiri. Keteraktifan senyawa fenol dengan radikal-radikal lemak disebabkan karena adanya substitusi grup grup alkil pada posisi 2,4,atau 6 meningkatkan densitas elektron pada grup hidroksil. Faktor faktor yang mempengaruhi keefektifan antioksidan terhadap kecepatan/ tingkat otoksidasi adalah struktur antioksidan, kondisi oksidasi dan sampel yang teroksidasi (Andarwulan *et al.*, 1996).

Antioksidan berfungsi untuk menetralisasi radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang tidak berpasangan mendapatkan pasangan elektron dan menjadi stabil. Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit degeneratif dan kanker. Selain itu antioksidan juga membantu menekan proses penuaan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan atau meredam radikal bebas, serta menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh,sehingga dapat mencegah atau mengurangi terjadinya kerusakan sel (Abdul, 2003).

2.6.1. Mekanisme kerja antioksidan

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

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



Gambar 3. Reaksi Penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida (Gordon 1990).

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



Gambar 4. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi (Gordon 1990).

2.7. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Prinsip dasar ekstraksi adalah berdasarkan kelarutan. Untuk memisahkan zat terlarut yang diinginkan atau menghilangkan komponen zat terlarut yang tidak diinginkan dari fasa padat, maka fasa padat dikontakkan dengan fasa cair. Pada kontak dua fasa tersebut, zat terlarut terdifusi dari fasa padat ke fasa cair sehingga terjadi pemisahan dari komponen padat (Utami *et al.*, 2009).

Proses ekstraksi merupakan isolasi senyawa yang terdapat dalam campuran larutan atau campuran padat dengan menggunakan pelarut yang cocok. Salah satu ekstraksi adalah maserasi. Maserasi merupakan proses dimana simplisia yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat mudah larut akan melarut. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam dalam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan yang terpekat akan didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Ansel, 1989).

Maserasi sering digunakan dalam proses ekstraksi karena cara ini merupakan metode yang mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana cukup dengan merendam sampel dalam pelarut, pelarut yang digunakan adalah ethanol karena pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun senyawa non polar. ethanol mudah menguap sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak, sebagai tambahan ethanol cenderung lebih murah dibandingkan dengan organik pelarut yang lain. (Andayani *et al.*, 2008).

2.8. Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor utama yang menentukan keberhasilan dalam proses ekstraksi. Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non polar (Vogel, 1987). Adapun konstanta dielektrik bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 3 dan sifat pelarut umum dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut

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

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

Tabel 4. Sifat-Sifat Pelarut Umum

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

Sumber: Wikipedia, (2009^b).

Larutan pengekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa yang diinginkan. Larutan pengekstraksi yang digunakan saat proses ekstraksi yaitu ethanol. Ethanol, disebut juga etil alkohol adalah sejenis cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna. Etanol termasuk ke dalam alkohol rantai tunggal, dengan rumus kimia $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ dan rumus empiris $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. Ia merupakan isomer konstitusional dari dimetil eter. Etanol sering disingkat menjadi EtOH, dengan "Et" merupakan singkatan dari gugus etil (C_2H_5). Sifat kimia dari ethanol banyak dipengaruhi dari gugus hidroksilnya (Vogel, 1987).

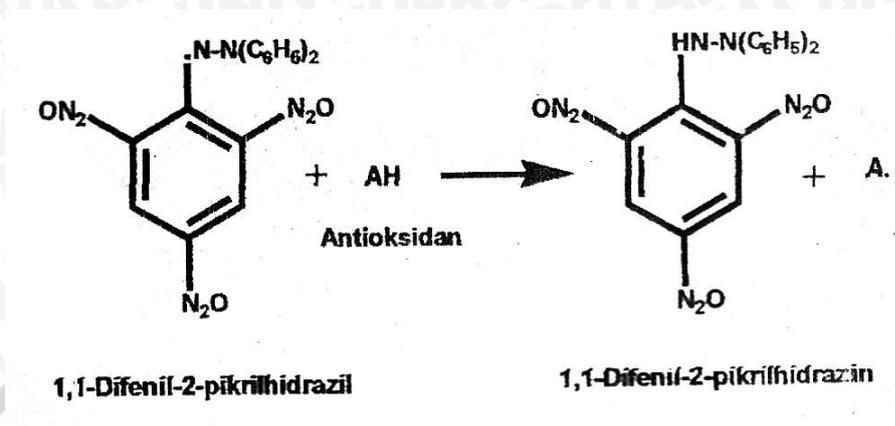
2.9. Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikan keseimbangannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein atau jaringan lemak (Praptiwi *et al.*, 2006).

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazil) (Blois, 1958). Radikal bebas yang umumnya digunakan sebagai model dalam penelitian antioksidan atau peredam radikal bebas adalah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat, dan mudah untuk menguji aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa, selain itu mereka ini terbukti akurat, handal dan praktis (Pratimasari, 2009).

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

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



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

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena merupakan metode yang sederhana, murah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (hanani E, 2005).

Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persentase inhibisinya terhadap radikal DPPH. Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi DPPH dengan absorbansi sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Aktivitas antioksidan dikatakan kuat jika IC₅₀ kurang dari 200 µg/ml (Andayani *et al.*, 2008).

Pengukuran antioksidan secara "efek peredaman radikal bebas DPPH" merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode yang lain (xanthin-xanthin oxidase, metode tiosianat, antioksidan total). Pada metode ini, DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana

DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut dan membentuk 1,1-difenil-2-pikril hidrazil. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga aktivitas peredaman dapat ditentukan. Jika absorbansi sampel lebih besar daripada absorbansi blanko, maka sampel tidak aktif sebagai antioksidan (Juniarti *et al.*, 2009).

Pengujian antiradikal bebas senyawa senyawa alam dapat dilakukan dengan metode DPPH sebagai senyawa radikal bebas yang stabil dengan melihat proses peredaman panjang gelombang maksimumnya pada spektrofotometer UV-Vis. Peredaman warna ungu merah (absorbansi pada 517-520 nm) dikaitkan dengan kemampuan sebagai antiradikal bebas (*free radical scavenger*). Jika persen peredaman bernilai 0%, berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas, jika 100% berarti peredaman total dan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Suatu bahan dikatakan aktif sebagai antiradikal bebas bila persentase peredamannya lebih dari atau sama dengan 50% (Mega dan Dewa, 2010).

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak etanol dari *Sargassum fillipendula* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode Blois (1958), ekstrak etanol dari *Sargassum fillipendula* dilarutkan dalam etanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5ml. Ke dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 0,5 mL larutan DPPH 1mM dalam etanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus :

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

Absorbansi blanko

Nilai konsentrasi dan hambatan ekstrak diplot masing-masing pada sumbu x dan y. Persamaan garis yang diperoleh dalam bentuk $y = b \ln(x) + a$ digunakan untuk mencari nilai IC (*inhibition concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀ menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Aktivitas antioksidan dapat dikatakan kuat apabila mempunyai IC₅₀ kurang dari 200 µg/ml Blois (1958).

2.10. Kandungan Alga Coklat *Sargassum filipendula* yang Berpotensi Sebagai Antioksidan

1. Senyawa Fenol

Fenol adalah senyawa dengan gugus OH yang terikat pada cincin aromatik. Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang memiliki ciri-ciri yang sama, yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena sering berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harbone, 1987).

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

2. Alkaloid

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

3. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa polifenolik yang biasa ditemukan secara luas dalam buah-buahan dan sayur-sayuran dari hampir semua tumbuhan dari bangsa alga. Senyawa terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, bunga dan biji (sastrohamidjojo, 1996).

Flavonoid memberikan kontribusi keindahan dan kesemarakkan pada buah-buahan di alam. Flavon memberikan warna kuning atau jingga, antosianin memberikan warna merah, ungu atau biru, yaitu semua warna yang terdapat pada pelangi kecuali hijau (sastrohamidjojo, 1996). Flavonoid pada tumbuhan berfungsi dalam pengaturan tumbuh, pengaturan fotosintesis, kerja antimikroba dan antivirus dan kerja terhadap serangga (Robinson, 1995).

2.11. **Scanning Electron Microscope (SEM)**

Scanning electron microscope (SEM) adalah jenis mikroskop elektron yang mampu menampilkan gambar permukaan sampel secara jelas dengan menggunakan sinar elektron berenergi tinggi. SEM adalah mikroskop yang menggunakan hamburan elektron dalam membentuk bayangan. Elektron berinteraksi dengan atom-atom yang membentuk sampel menghasilkan sinyal yang berisi informasi tentang topografi permukaan sampel, komposisi dan sifat-sifat lain seperti konduktivitas listrik. Mikroskop ini banyak digunakan untuk studi

detail arsitektur permukaan sel (atau struktur jasad renik lainnya), dan obyek diamati secara tiga dimensi (Wikipedia, 2012^c).

Scanning electron microscope (SEM) memiliki banyak keuntungannya jika dibandingkan dengan menggunakan mikroskop cahaya. SEM menghasilkan bayangan dengan resolusi yang tinggi, yaitu dalam jarak yang sangat dekat tetap dapat menghasilkan perbesaran yang maksimal tanpa memecahkan gambar. Kelebihan dari SEM diantaranya tidak memerlukan persiapan sampel secara khusus. Ketebalan sampel tidak berpengaruh terhadap hasil seperti halnya pada TEM (*Transmission Electron Microscope*) (Muller, D .2008).

Cara terbentuknya gambar pada SEM berbeda dengan apa yang terjadi pada mikroskop optik dan TEM. Pada SEM, gambar dibuat berdasarkan deteksi elektron baru (elektron sekunder) atau elektron pantul yang muncul dari permukaan sampel ketika permukaan sampel tersebut dipindai dengan sinar elektron. Elektron sekunder atau elektron pantul yang terdeteksi selanjutnya diperkuat sinyalnya, kemudian besar amplitudonya ditampilkan dalam gradasi gelap-terang pada layar monitor CRT (*cathode ray tube*). Di layar CRT inilah gambar struktur obyek yang sudah diperbesar bisa dilihat. Pada proses operasinya, SEM tidak memerlukan sampel yang ditipiskan, sehingga bisa digunakan untuk melihat obyek dari sudut pandang 3 dimensi (Wikipedia, 2012^d).

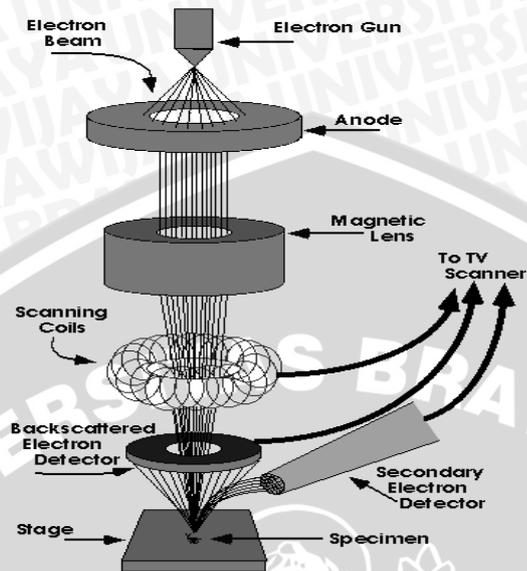
Teknik yang digunakan dalam pembuatan preparat SEM diantaranya (Dharma A, 2012):

- Fiksasi yaitu suatu metode untuk menyiapkan suatu preparat agar tampak realistik (seperti kenyataannya) dengan menggunakan glutaraldehid dan osmium tetroksida

- Dehidrasi yaitu suatu metode persiapan preparat dengan cara menggantikan air dengan bahan pelarut organik seperti ethanol atau aceton
- Pembelahan (Sectioning) yaitu suatu metode persiapan preparat untuk mendapatkan potongan tipis dari spesimen sehingga menjadikannya semi transparan terhadap elektron. Pemotongan ini bisa dilakukan dengan untramikrotom dengan menggunakan pisau berlian untuk menghasilkan potongan yang tipis sekali atau bisa juga menggunakan pisau kaca
- Pewarnaan (Staining) yaitu suatu metode persiapan preparat dengan menggunakan logam berat seperti timah atau uranium untuk menguraikan elektron sehingga menghasilkan gambar kontras antara struktur yang berlainan.

Beberapa peralatan utama *Scanning electron microscope* (SEM) yaitu yang pertama adalah pistol elektron, alat ini biasanya berupa filamen yang terbuat dari unsur yang mudah melepas elektron misal tungsten, kedua adalah lensa untuk elektron, lensa ini berupa lensa magnetis karena elektron yang bermuatan negatif dapat dibelokkan oleh medan magnet, dan yang ketiga adalah sistem vakum, karena elektron sangat kecil dan ringan maka jika ada molekul udara yang lain elektron yang berjalan menuju sasaran akan terpecah oleh tumbukan sebelum mengenai sasaran sehingga menghilangkan molekul udara menjadi sangat penting. Prinsip kerja dari *Scanning electron microscope* (SEM) yaitu yang pertama sebuah pistol elektron memproduksi sinar elektron dan dipercepat dengan anoda, kemudian lensa magnetik memfokuskan elektron menuju ke sampel, selanjutnya sinar elektron secara focus memindai keseluruhan sampel dengan diarahkan oleh koil pemindai. Ketika elektron mengenai sampel maka sampel akan mengeluarkan elektron baru yang akan

diterima oleh detektor dan dikirim ke monitor (CRT) (Jim S, 2012). Prinsip kerja SEM dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Prinsip kerja *Scanning electron microscope* (SEM) (Jim S, 2012).

3. METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

Pada bahan penelitian ini menggunakan alga coklat pada jenis *Sargassum fillipendula* segar diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Rumpun laut yang dipanen dari daerah budidaya dan pada saat pemanenan bahan langsung dicuci dengan air laut. Sampel dicuci dengan air laut dengan tujuan untuk membersihkan sisa-sisa lumpur, pasir dan kotoran lainnya yang masih melekat pada rumput laut.

Kemudian sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik warna hitam untuk menghindari kontak dengan sinar matahari agar tidak terjadi pigmentasi (pencoklatan). Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam *coolbox* lalu diberi dengan es balok dan bagian luar *coolbox* disegel dengan lakban untuk mempertahankan suhu rendah dalam *coolbox* selama proses transportasi dan agar *coolbox* tidak rusak sampai tujuan. Selang waktu pengangkutan dari tempat pemanenan ke laboratorium adalah sehari semalam.

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi antioksidan alga coklat *Sargassum filipendula* yaitu pelarut etanol teknis. Digunakan pelarut etanol karena etanol memiliki kepolaran yang hampir sama dengan karakteristik antioksidan *Sargassum filipendula*. Bahan lain yang digunakan adalah aquadest yang digunakan pada *waterbath* pada saat proses pengentalan ekstraksi (pemisahan pelarut dari ekstrak) dengan *vacum rotary evaporator*.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji DPPH adalah serbuk DPPH, bahan ini dapat diperoleh di Laboratorium THP Fakultas Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang.

3.1.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada proses maserasi (ekstraksi) senyawa antioksidan pada alga coklat *Sargassum filipendula* adalah baskom, gunting, pisau, timbangan analitik, spatula, erlenmeyer 300ml, *beaker glass* 300 ml, gelas corong, gelas ukur, dan shaker. Peralatan yang digunakan pada kadar air bahan ialah menggunakan nampan seng, timbangan analitik, *crushable tank*, desikator dan botol timbang. Sedangkan pada peralatan yang digunakan pada saat pemisahan pelarut dari ekstrak adalah 1 unit *rotary vacum evaporator* dan botol vial. Dan pada peralatan yang digunakan untuk uji dpph adalah botol vial, *beaker glass* 100 ml, erlenmeyer 250 ml, bola hisap, pipet volume 5 ml dan pipet volume 10 ml. Untuk mengidentifikasi pada senyawa fitokimia menggunakan alat *beaker glass* 100 ml, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan gelas ukur.

3.2. Metode Penelitian

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

Eksperimen yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pengaturan kadar air bahan dan lama waktu fermentasi dengan starter jamur *Aspergillus niger* terhadap aktifitas antioksidan ekstrak kasar alga coklat *Sargassum fillipendula*.

Pelaksanaan penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

3.2.1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini dibagi menjadi dua tahap, tahap yang pertama bertujuan untuk menentukan kadar air bahan yang berbeda. Sedangkan pada tahap yang kedua ialah bertujuan untuk menentukan lama fermentasi yang tepat untuk inkubasi sampel. Penelitian pendahuluan ini tidak menggunakan ulangan sehingga data yang diperoleh berupa data primer. Penelitian terbaik dari tahap pendahuluan ini selanjutnya akan digunakan pada penelitian utama.

3.2.1.1 Penelitian Pendahuluan Tahap Pertama

Pada tahap pertama penelitian pendahuluan ini untuk menentukan kadar air bahan berbeda untuk digunakan pada penelitian utama. Prosedur penelitian pendahuluan tahap pertama untuk menentukan kadar air bahan yang berbeda:

- Disiapkan alat berupa timbangan analitik 0,001 gram, loyang besi, desikator.
- Dimasukan botol timbang kedalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam
- Diangkat botol timbang dan dimasukan kedalam desikator selama 15 menit
- Botol timbang ditimbang dengan timbangan analitik, lalu diambil sampel sebanyak 10 gram dan dimasukan kedalam botol timbang kemudian ditimbang. Dihitung sebagai berat awal (A)
- Dimasukan botol timbang yang telah berisi sampel kedalam oven dan ditunggu selama 24 jam
- Diangkat botol timbang dengan *crushable tank* dan dimasukan desikator selama 15 menit
- Ditimbang botol timbang sebagai berat akhir (B)
- Dihitung kadar air dengan rumus :

$$\frac{\text{Berat Akhir (B)} - \text{Berat Awal (A)}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

Setelah diketahui kadar air bahan segar, kemudian dilanjutkan prosedur untuk menentukan kadar air bahan 20%, 35% dan 50%. Prosedur penelitian pendahuluan dengan kadar air bahan 20%, 35% dan 50% sebagai berikut:

- Sampel *Sargassum fillipendula* segar dicuci bersih dan direndam dengan air garam selama 5 menit
- Sampel ditiriskan lalu dipotong kecil-kecil menggunakan gunting untuk mempermudah proses maserasi bahan
- Ditimbang dengan timbangan digital sebanyak 525 gram lalu dikeringkan sampai kadar air 20%, ditimbang sebanyak 450 gram lalu dikeringkan sampai kadar air 35%, ditimbang sebanyak 300 gram lalu dikeringkan sampai kadar air 50%, dan 100 gram sebagai kadar air segar 85% (kontrol). Tujuan berat sampel berbeda untuk mempermudah pada proses maserasi agar berat sampel yang telah dikeringkan 100 gram.
- Cara menghitung kadar air bahan agar sesuai yang diinginkan :
Dari 100 gram dengan kadar air bahan segar 85% agar didapatkan 20% ialah :

$$100\text{gram} \times \frac{85}{100} = 85 \text{ gram (air)}$$

$$15 \text{ gram (bahan baku)}$$

$$\frac{20}{100} = \frac{A-bk}{A}$$

$$\frac{20}{100} = \frac{A - 15}{A}$$

$$20A = 100A - 1500$$

$$80 A = 1500$$

$$A = 18.75 \text{ gram}$$

Keterangan : A = Berat rumput laut telah dikeringkan

bk = Bahan baku

- Tiap sampel dimasukkan ke dalam Beaker glass 500ml, ditutup dengan alufo yang telah diberi lubang-lubang kecil
- Sampel dimaserasi dengan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 48 jam
- Disaring dengan kertas saring kasar lalu dipisahkan antara pelarut dan sampel menggunakan *vacuum rotary evaporator* selama 3 jam
- Diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Sunarni *et al.*, 2005)

3.2.1.2 Penelitian Pendahuluan Tahap Kedua

Prosedur penelitian pendahuluan tahap kedua untuk menentukan lama fermentasi :

- Sampel *Sargassum fillipendula* segar dicuci bersih dan direndam dengan air garam, perendaman ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran dan mineral pengotor yang masih menempel pada bahan
- Sampel ditiriskan lalu dipotong kecil-kecil menggunakan gunting untuk memperluas permukaan bahan dan mempermudah proses maserasi bahan
- Ditimbang dengan timbangan digital sebanyak 100 gram untuk tiap perlakuan
- Tiap sampel dimasukkan ke dalam Beaker glass 500ml, ditutup dengan alufo yang telah diberi lubang-lubang kecil lalu difermentasi selama 9, 11 dan 13 hari dan 0 hari sebagai kontrol
- Sampel dimaserasi dengan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 48 jam
- Disaring dengan kertas saring kasar lalu dipisahkan antara pelarut dan sampel menggunakan *vacuum rotary evaporator* selama 3 jam
- Diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Sunarni *et al.*, 2005)

3.2.2. Penelitian Utama

Penelitian utama mengambil standar acuan dari perlakuan terbaik penelitian pendahuluan. Penelitian utama ini bertujuan untuk mengetahui aktifitas antioksidan terbaik dari semua perlakuan dengan penambahan starter jamur *Aspergillus niger*.

3.2.2.1. Perlakuan dan Rancangan Percobaan

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

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan yang digunakan. Perlakuan yang pertama yaitu faktor waktu fermentasi (W) dengan level 11 hari (W1), 13 hari (W2), dan 15 hari (W3). Perlakuan kedua yaitu faktor perbedaan kadar air bahan (K) dengan level 35% (K1), 50% (K2) dan 85% (K3). Variabel terikat penelitian ini adalah parameter yang diamati, yaitu nilai inhibition concentration (IC₅₀) dari sampel dengan perlakuan yang berbeda-beda.

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

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

μ adalah rata-rata umum, w_i adalah faktor w dengan level i, k_j adalah faktor p dengan level j, $(w_i k_j)$ adalah korelasi antara faktor w_i dan k_j , dan ξ_{ijk} adalah galat dari semua faktor. Desain rancangan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Desain Rancangan Penelitian

	Perlakuan		
	K		
	K1	K2	K3
W1	(W1K1) ₁	(W1K2) ₁	(W1K3) ₁
	(W1K1) ₂	(W1K2) ₂	(W1K3) ₂
W2	(W2K1) ₁	(W2K2) ₁	(W2K3) ₁
	(W2K1) ₂	(W2K2) ₂	(W2K3) ₂
W3	(W3K1) ₁	(W3K2) ₁	(W3K3) ₁
	(W3K1) ₂	(W3K2) ₂	(W3K3) ₂

Keterangan :

K1 : Kadar air 35%

K2 : Kadar air 50%

K3 : Kadar air 85%

W1 : Waktu fermentasi 11 hari

W2 : Waktu fermentasi 13 hari

W3 : Waktu fermentasi 15 hari

3.2.3. Parameter Uji

Parameter uji yang digunakan dalam penelitian yaitu kapasitas antioksidan, total senyawa fenolat, uji fitokimia dan uji kadar air. Uji kapasitas antioksidan berdasarkan metode Sunarni *et al.* (2005), menggunakan radikal bebas DPPH sebagai penangkap senyawa antioksidan. Uji total senyawa fenolat berdasarkan metode Folin ciocalteau yaitu dengan menggunakan reagen folin-ciocalteau. Uji kualitatif senyawa fitokimia berdasarkan metode Harbone (1987). Uji ini dibagi menjadi tiga yaitu uji alkaloid, uji flavonoid dan uji fenol. Uji kadar air berdasarkan metode thermogravimetri dari Sudarmadji *et al.*,(1997).

3.3. Prosedur Penelitian Utama

3.3.1. Pembuatan media dan pembiakan kultur jamur *Aspergillus niger*

- Cawan petri, labu erlenmeyer 250ml dan jarum ose dicuci bersih kemudian dioven dengan suhu 35^oC untuk menghilangkan air
- Untuk penanaman pertama, diambil serbuk media PDA (*Potatoes dextrose agar*) sebanyak 5.85 gram untuk dilarutkan ke dalam 150ml aquadest lalu dimasukkan kedalam labu erlenmeyer 250ml
- Cawan petri, jarum ose dan labu erlenmeyer direbus dalam panci selama 10 menit dengan suhu 100^oC
- Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 15 menit dengan tekanan 0.1 MPa
- Media PDA lalu dituang kedalam cawan petri yang telah disterilisasi lalu dibiarkan dingin agar menjadi gel
- Lalu jamur *Aspergillus niger* diambil dari stok menggunakan jarum ose lalu ditanam pada media PDA dengan posisi terbalik
- Diinkubasi dalam incase dan ditunggu selama 1 minggu
- Setelah jamur tumbuh merata, disiapkan media PDB (*Potatoes dextrose broth*) untuk penanaman kedua sebanyak 21,6 gram dan dilarutkan dalam 900ml aquadest
- Pisau dan labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci kemudian disterilisasi untuk mencegah dari kontaminan
- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan jamur *Aspergillus niger* yang telah tumbuh dimedia PDA untuk ditanam ke media PDB dengan menggunakan pisau

- Lalu diinkubasi dalam incase selama 12 hari agar jamur tumbuh secara merata sambil tiap hari digoyang-goyang labunya agar nutrient yang mengendap bisa tercampur merata.

3.3.2. Pengaturan Kadar Air Bahan

Pengaturan kadar air bahan dibagi menjadi 2 tahap yaitu, pengukuran kadar air segar dan pengaturan kadar air bahan 35% dan 50%.

- Pengukuran kadar air bahan segar :
 - Disiapkan alat berupa timbangan analitik 0,001 gram, loyang besi, desikator
 - Dimasukan botol timbang kedalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam
 - Diangkat botol timbang dan dimasukan kedalam desikator selama 15 menit
 - Botol timbang ditimbang dengan timbangan analitik, lalu diambil sampel sebanyak 10 gram dan dimasukan kedalam botol timbang kemudian ditimbang. Dihitung sebagai berat awal (A)
 - Dimasukan botol timbang yang telah berisi sampel kedalam oven dan ditunggu selama 24 jam
 - Diangkat botol timbang dengan *crushable tank* dan dimasukan desikator selama 15 menit
 - Ditimbang botol timbang sebagai berat akhir (B)
 - Dihitung kadar air dengan rumus :

$$\frac{\text{Berat Akhir (B)} - \text{Berat Awal (A)}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

- Pengaturan kadar air bahan 35% dan 50% yaitu :
 - Sampel ditimbang sebanyak 250 gram dan 300 gram, kemudian dimasukkan kedalam loyang besi dan dijemur bawah sinar matahari selama 3 jam
 - Kemudian ditimbang dengan timbangan analitik dan dihitung kadar airnya. Apabila masih lebih dari 35% dan 50% maka dijemur kembali hingga didapatkan kadar air 35% dan 50%
 - Dari 450 gram dengan kadar air 85% agar didapatkan 35% ialah :

$$450\text{gram} \times \frac{85}{100} = 382,5 \text{ kadar air}$$

67,5 gram (bahan baku)

$$\frac{35}{100} = \frac{A - \text{bk}}{A}$$

$$\frac{35}{100} = \frac{A - 67,5}{A}$$

$$35A = 100A - 6750$$

$$65 = 6750$$

$$A = 103 \text{ gram}$$

- Dari 450 gram dengan kadar air 85% agar didapatkan 50% ialah :

$$450\text{gram} \times \frac{85}{100} = 297,5 \text{ kadar air}$$

52,5 gram (bahan baku)

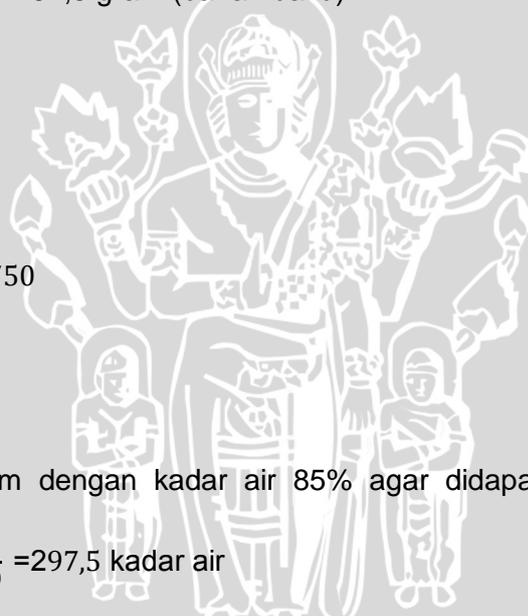
$$\frac{50}{100} = \frac{A - \text{bk}}{A}$$

$$\frac{50}{100} = \frac{A - 52,5}{A}$$

$$50A = 100A - 5250$$

$$50A = 5250$$

$$A = 105 \text{ gram}$$



3.3.3. Fermentasi Alga Coklat *Sargassum fillipendula* (Sasmito, 2011)

- Alga coklat *Sargassum fillipendula* segar dicuci menggunakan air lalu ditambahkan garam secukupnya
- Setelah dicuci, kemudian diangin-anginkan hingga kering beralaskan koran
- Kemudian *Sargassum fillipendula* dipotong kecil-kecil menggunakan gunting
- Setelah dipotong kemudian ditimbang 100 gram, 350 gram dan 450 gram dan diulangi lagi masing-masing sebanyak 6 kali
- Dari sampel 350 gram dijemur bawah sinar matahari sampai 105 gram dengan kadar air bahan 35% dan pada sampel 450 gram sampai 103 gram dengan kadar air bahan 50%
- Semua sampel lalu ditambahkan dengan jamur *Aspergillus niger* sebanyak 5 gram untuk mempercepat proses fermentasi lalu difermentasi selama 11,13 dan 15 hari.

3.3.4. Ekstraksi *Sargassum fillipendula* (Suryaningrum et al., 2006)

- Semua sampel dimaserasi menggunakan pelarut ethanol 96% selama 24 jam dan dishaker menggunakan *waterbath shaker*. Perbandingan antara sampel dan pelarut yaitu 1:3
- Setelah dimaserasi sampel disaring menggunakan kertas saring kasar
- Sisa residu diambil untuk dianalisa kadar alginatnya sedangkan filtratnya di rotary dengan rotary vacuum evaporator suhu 40°C untuk memisahkan antara pelarut dengan sampel
- Setelah terpisah, ekstrak sampel diambil sedikit untuk dianalisa kadar airnya.

3.3.5. Prosedur Analisis Parameter

3.3.5.1. Uji Fitokimia (Harbone, 1987)

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

- a. **Uji Alkaloid:** Larutan ekstrak sebanyak 3 ml ditambahkan dengan 1 ml HCL 2N, dan 6 ml aquadest, kemudian filtrat diperiksa adanya senyawa alkaloid dengan terdapatnya endapan berwarna putih.
- b. **Uji Fenol:** Sebanyak 20 ml etanol 96% dimasukan 1 gr sampel ditambahkan 2 tetes larutan $FeCl_3$. Senyawa fenol ditunjukkan dengan pembentukan warna hijau tua atau hitam.
- c. **Uji Flavonoid:** Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan dengan sedikit serbuk magnesium (Mg) dan 2 ml HCL 2N. Senyawa flavonoid ditunjukkan dengan pembentukan warna jingga hingga merah.

3.3.5.2. Uji Aktivitas Antioksidan (Sunarni *et al.*, 2005)

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak kasar ethanol dari *Sargassum fillipendula* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode (Sunarni *et al.*, 2005). Ekstrak ethanol dari *Sargassum fillipendula* dilarutkan dalam ethanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5ml. Kedalam tiap tabung reaksi ditambahkan 0,5 ml larutan DPPH 1mM dalam ethanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus:

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

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

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

Analisa kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah air bebas ekstrak sampel dalam ethanol 96%. Uji yang dilakukan berdasarkan metode Thermogravimetri (Sudarmadji *et al.*, 1997) yaitu dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105-110°C selama 3 jam atau didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Kadang-kadang pengurangan dilakukan tanpa pemanasan. Bahan dimasukkan dalam desikator dengan H₂SO₄ pekat sebagai pengering sehingga mencapai berat yang konstan. Besarnya kadar air dapat dirumuskan :

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

Keterangan :

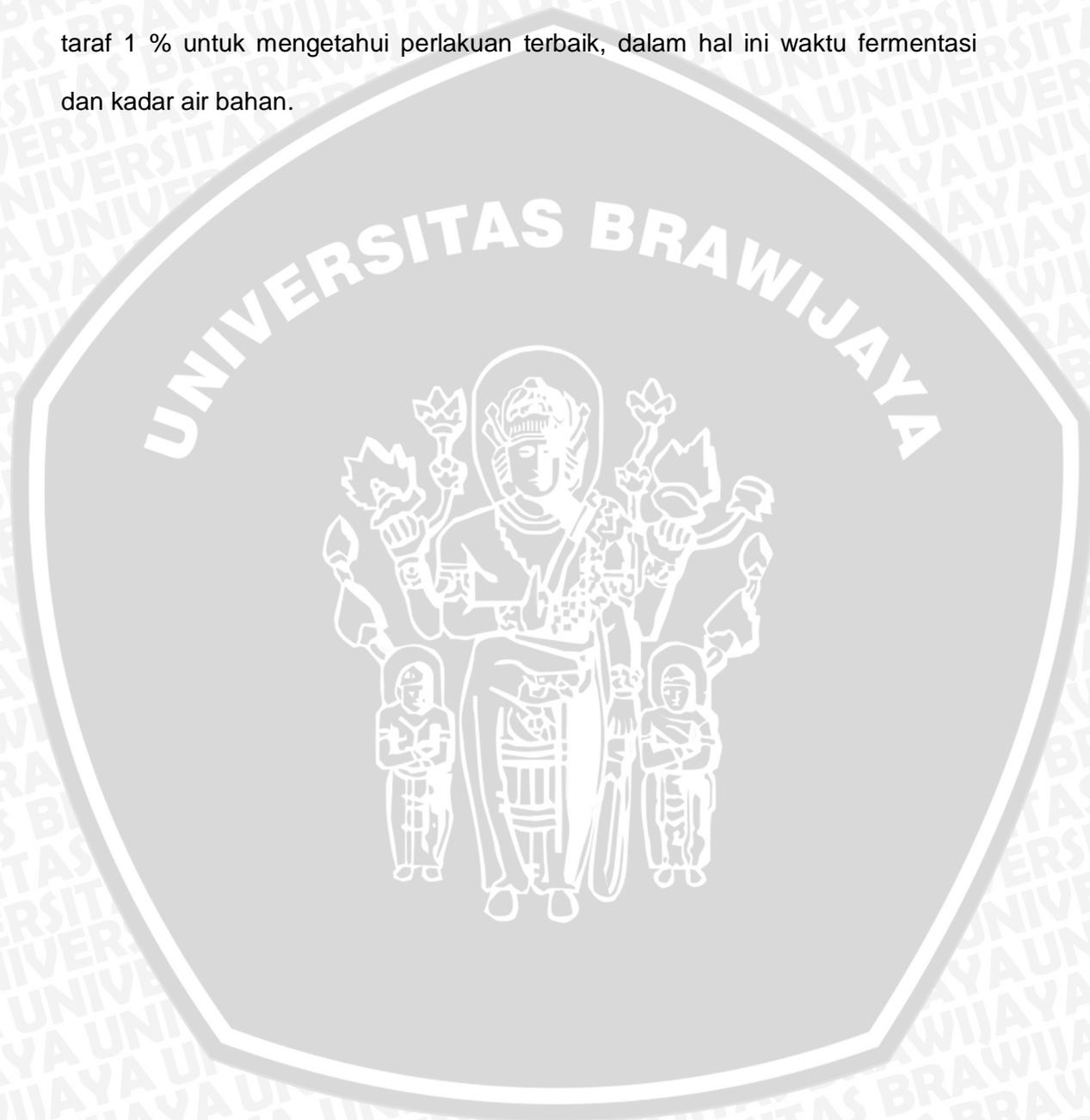
A = Berat botol timbang

B = Berat sampel

C = Berat akhir (Botol timbang + sampel)

3.4. Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1% dan jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNT pada taraf 1 % untuk mengetahui perlakuan terbaik, dalam hal ini waktu fermentasi dan kadar air bahan.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Penelitian Pendahuluan

Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan suatu bahan adalah nilai IC_{50} . Menurut Suryaningrum *et al.*, (2006), IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*) adalah konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Penelitian pendahuluan ini dibagi menjadi dua tahap, pada tahap pertama untuk menentukan kadar air bahan yang berbeda. Sedangkan pada tahap kedua untuk menentukan lama fermentasi yang tepat untuk inkubasi sampel. Nilai IC_{50} ekstrak kasar *Sargassum fillipendula* dari hasil penelitian pendahuluan dengan perbedaan kadar air bahan berbeda tanpa terfermentasi dapat dilihat pada Tabel 6 dan *Sargassum fillipendula* dengan terfermentasi secara alami dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 6. Nilai IC_{50} ekstrak kasar *Sargassum fillipendula* dengan kadar air bahan berbeda tanpa fermentasi

No.	Perlakuan	IC_{50} (ppm)
1	Kontrol (kadar air 85%)	168.74
2	Kadar air 20%	149.90
3	Kadar air 35%	143.39
4	Kadar air 50%	131.02

Tabel 7. Nilai IC_{50} ekstrak kasar *Sargassum fillipendula* dengan fermentasi secara alami

No	Perlakuan	IC_{50} (ppm)
1	Kontrol perlakuan (0 hari)	167.24
2	Fermentasi 9 hari	145.90
3	Fermentasi 11 hari	143.97
4	Fermentasi 13 hari	134.96

Dari tabel 6 diatas, didapatkan hasil yaitu nilai IC_{50} terendah pada sampel kadar air 50% sebesar 131.02 ppm dan nilai tertinggi pada sampel kadar air 20%

sebesar 149.90 ppm. Secara keseluruhan, aktivitas antioksidan ekstrak *Sargassum filiiipendula* yang terfermentasi berada diatas sampel kontrol. Dari hasil ini, maka dapat diketahui bahwa kadar air bahan sebesar 50% dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari sampel. Sedangkan dari tabel 7 di atas, didapatkan hasil yaitu nilai IC_{50} terendah pada sampel fermentasi 9 hari sebesar 145.90 ppm dan nilai tertinggi pada sampel fermentasi 13 hari sebesar 134.96 ppm. Aktivitas antioksidan ekstrak *Sargassum filiiipendula* yang terfermentasi berada di atas sampel kontrol. Dari hasil ini, maka dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan perlakuan fermentasi pada sampel *Sargassum fillipendula* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari sampel.

Dari hasil penelitian pendahuluan tahap pertama, didapatkan hasil kadar air yang terbaik ialah 50% kadar air bahan sehingga persentase ini yang dipakai sebagai acuan dasar pemilihan kadar air bahan untuk penelitian utama. Sedangkan pada hasil penelitian pendahuluan tahap kedua dengan terfermentasi secara alami, didapatkan hasil waktu fermentasi yang terbaik untuk menginkubasi sampel adalah waktu fermentasi 13 hari sehingga waktu ini yang dipakai sebagai acuan dasar pemilihan waktu fermentasi untuk penelitian utama. Aktivitas antioksidan ketiga sampel masih tergolong lemah karena nilai IC_{50} -nya sekitar 140-171 ppm (Zuhra *et al.*, 2008). Oleh karena itu, dalam penelitian utama ditambahkan perlakuan untuk meningkatkan nilai IC_{50} yaitu dengan perlakuan penambahan starter jamur *Aspergillus niger* dan kadar air bahan.

Kadar air bahan adalah jumlah air bebas yang terkandung di dalam bahan yang dapat dipisahkan dengan cara fisis seperti penguapan dan destilasi (Sudarmadji *et al.*, 1992). Air dalam bahan pangan berperan sebagai pelarut dari beberapa komponen disamping ikut sebagai bahan pereaksi. Sedang bentuk air dapat ditemukan sebagai air bebas dan air terikat. Pengurangan air baik secara pengeringan atau penambahan bahan penguap air bertujuan mengawetkan

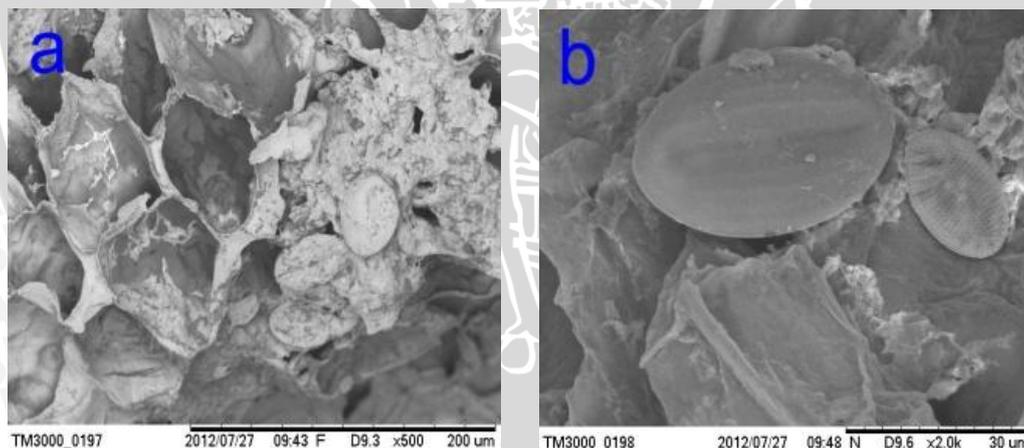
bahan pangan, kriteria ikatan air, konsentrasi larutan, tekanan osmotik, kelembaban relatif berimbang dan aktivitas air (Purnomo, 1995).

Fermentasi adalah segala macam proses metabolisme (enzim, jasad renik secara oksidasi maupun reduksi, hidrolisa atau reaksi kimia lainnya) yang melakukan perubahan kimia pada suatu substrat organik yang bertujuan menghasilkan suatu produk yang kandungan nutrisi, *biological availability*, dan teksturnya lebih baik dari sebelumnya (Pujaningsih, 2005). Dengan difermentasi terlebih dahulu, senyawa-senyawa kompleks penyusun dinding sel alga terurai dan menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga bisa didapatkan lebih banyak senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan. Secara teori, nilai IC_{50} dari keseluruhan sampel termasuk kategori lemah. Menurut Suryaningrum *et al.* (2006), IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*) adalah konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Ditambahkan Zuhra *et al.* (2008), senyawa antioksidan dikategorikan dalam empat golongan yaitu sangat kuat (IC_{50} antara 1-50ppm), kuat (IC_{50} antara 50-100ppm), sedang (IC_{50} antara 100-150ppm) dan lemah (IC_{50} antara 150-200ppm). Jika IC_{50} lebih dari 200ppm maka tidak berpotensi sebagai senyawa antioksidan.

IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*) adalah konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Suryaningrum *et al.*, 2006). Aktivitas antioksidan ketiga sampel masih tergolong lemah. Oleh karena itu, dilanjutkan dengan penelitian utama untuk meningkatkan aktivitas antioksidannya dengan perlakuan penambahan starter jamur *Aspergillus niger* dan lama fermentasi pada tahap inkubasi sampel.

4.2. Penelitian Utama

Penelitian utama mengambil acuan dasar dari hasil terbaik penelitian pendahuluan tahap pertama dan tahap kedua. Pada tahap penelitian utama ditambahkan starter berupa jamur *Aspergillus niger* untuk mempercepat proses fermentasi. Sampel yang telah terfermentasi secara struktur telah berubah bentuk yaitu dari sampel kasar dan kenyal menjadi sampel yang lebih halus. Hal ini mengindikasikan bahwa jamur *Aspergillus niger* telah berhasil menghasilkan enzim pektinase yang berfungsi mendegradasi komponen dinding sel alga coklat *Sargassum fillipendula*. Kemudian sampel yang terfermentasi selanjutnya diekstraksi. Proses ekstraksi menghasilkan sampel berwarna hijau tua dan coklat kehitaman. Sampel alga coklat dalam kondisi segar, bentuk dan struktur dinding selnya dapat dilihat menggunakan *scanning electron microscope* (SEM). Gambar permukaan dinding sel alga coklat *Sargassum fillipendula* segar dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Dinding sel alga coklat *Sargassum fillipendula* a). perbesaran 1000 kali, b). perbesaran 5000x

4.3. Rendemen dan kadar air

4.3.1. Rendemen

Hasil ekstraksi yang berbeda kadar air bahan dan lama waktu fermentasi, menunjukkan nilai rendemen yang berbeda pula. Rendemen ekstrak merupakan

perbandingan antara bobot ekstrak kasar yang dihasilkan dengan bobot awal yang digunakan. Nilai rendemen ekstrak dinyatakan dalam bentuk persen. Persen rendemen menunjukkan seberapa banyak ekstrak yang dapat diambil dari sampel. Semakin besar persen rendemen maka akan semakin banyak ekstrak senyawa bioaktif yang didapatkan.

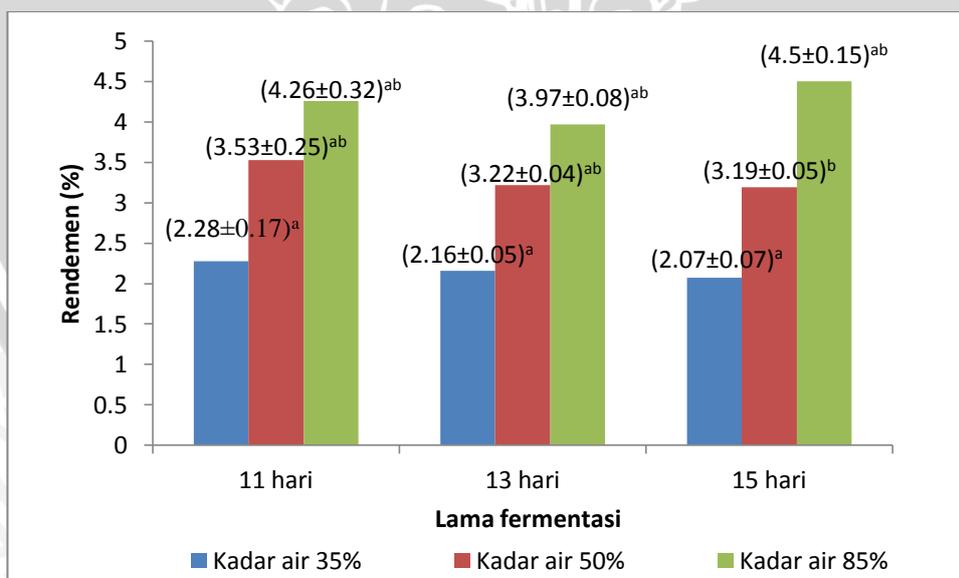
Perhitungan analisis terhadap rendemen ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula* dapat dilihat pada Lampiran 1. Dari hasil Anova rendemen menunjukkan bahwa rendemen antioksidan dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan kadar air bahan ($P < 0.05$), tetapi jumlah rendemen tidak dipengaruhi oleh perlakuan lama fermentasi dan interaksi kedua perlakuan ($P > 0.05$). Notasi BNT 1% persen rendemen dengan masing-masing perlakuan kadar air bahan dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Notasi BNT 1% rendemen ekstrak alga coklat *Sargassum fillipendula*

Perlakuan	Rerata ekstrak rendemen (%)	Notasi
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 35%	2.28	a
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 50%	3.53	ab
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 85%	4.26	ab
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 35%	2.16	a
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 50%	3.22	ab
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 85%	3.97	ab
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 35%	2.07	a
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 50%	3.19	b
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 85%	4.5	ab

Hasil dari uji rendemen menunjukkan bahwa rendemen ekstrak dipengaruhi secara nyata oleh kadar air bahan dan interaksi keduanya, akan tetapi tidak dipengaruhi oleh waktu fermentasi. Berdasarkan uji BNT 1%, persen rendemen terendah terdapat pada perlakuan fermentasi 15 hari kadar air bahan 35% yaitu sebesar 2.07% dengan notasi a, sedangkan persen rendemen

tertinggi terdapat pada perlakuan fermentasi 15 hari kadar air bahan 85% yaitu sebesar 4.5% dengan notasi ab. Pada masing masing perlakuan memberikan notasi yang berbeda sehingga dapat diketahui bahwa tiap perlakuan memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah rendemen sampel. Perlakuan 15 hari kadar air bahan 35% memiliki nilai persen rendemen yang rendah dalam waktu 15 hari, karena fase pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* memasuki fase stasioner (fase tetap) menuju fase kematian sehingga substrat yang diuraikan menjadi berkurang sehingga saat diekstraksi hasil rendemen yang didapat sedikit. Rendemen tertinggi terdapat pada perlakuan fermentasi 15 hari kadar air bahan 85% karena waktu 15 hari merupakan waktu optimum jamur *Aspergillus niger* menguraikan pada substrat yang ada pada sampel. Menurut Dwijoseputro (1984), jamur *Aspergillus niger* akan tumbuh optimum pada suhu ruang (30°C) dan pada substrat yang banyak mengandung polisakarida dan karbohidrat kompleks seperti selulosa, hemiselulosa dan pectin. Grafik dari hasil uji lanjut BNT 1% persen rendemen dan notasinya dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik persen rendemen Ekstrak *Sargassum fillipendula*

4.3.2. Kadar air

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

Perhitungan analisis terhadap kadar air ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula* dapat dilihat pada Lampiran 2. Dari analisis sidik ragam (ANOVA), menunjukkan bahwa kadar air ekstrak dipengaruhi secara nyata oleh kadar air bahan ($P < 0.05$), tetapi kadar air tidak dipengaruhi oleh perlakuan fermentasi dan interaksi kedua perlakuan ($P > 0.05$). Notasi BNT 1% persen kadar air dengan masing-masing perlakuan kadar air bahan dapat dilihat pada Tabel 9.

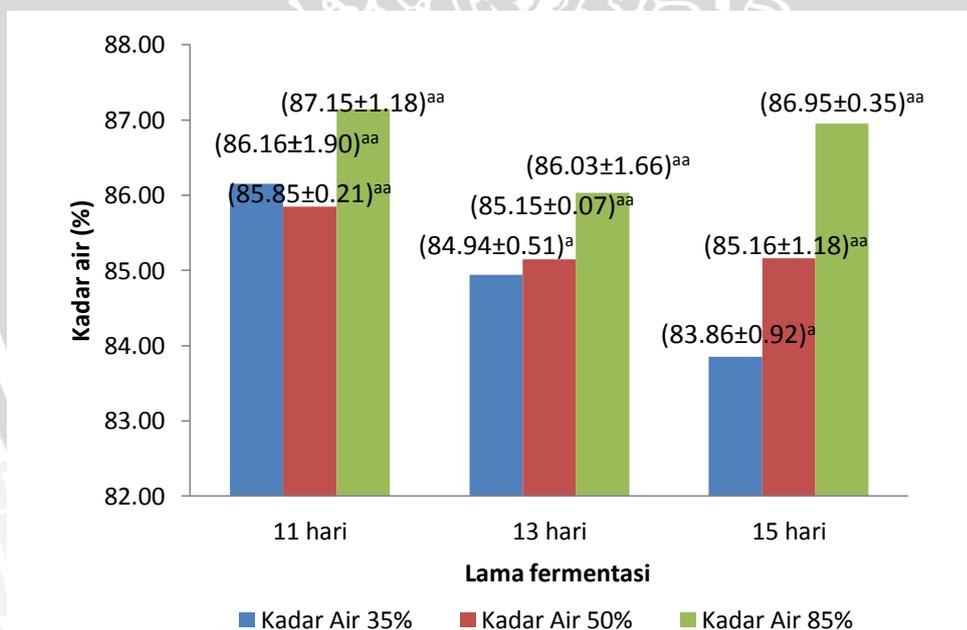
Tabel 9. Notasi BNT 1% kadar air ekstrak alga coklat *Sargassum fillipendula*

Perlakuan	Rerata ekstrak kadar air (%)	Notasi
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 35%	84.81	a
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 35%	86.00	a
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 35%	86.31	a
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 35%	85.30	a
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 35%	85.20	a
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 35%	87.21	a
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 35%	83.20	a
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 35%	84.32	a
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 35%	86.70	a

Hasil dari uji kadar air menunjukkan kadar air ekstrak dipengaruhi oleh kadar air bahan dan interaksi keduanya, tetapi kadar air ekstrak tidak dipengaruhi oleh perlakuan waktu fermentasi. Berdasarkan uji lanjut BNT 1%, diketahui bahwa persen kadar air terendah terdapat pada perlakuan fermentasi 15 hari kadar air 35% yaitu sebesar 83.86% dengan notasi a, dan sedangkan persen kadar air tertinggi terdapat pada perlakuan fermentasi 11 hari 85% yaitu sebesar

87.15% dengan notasi a. Pada perlakuan 15 hari kadar air 35% memiliki kadar air yang rendah karena pada kadar air 35% sampel dijemur dibawah sinar matahari sedangkan perlakuan fermentasi 11 hari kadar air 85% memiliki kadar air yang tinggi karena sampel tanpa perlakuan penjemuran. Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar air dalam sampel yaitu kondisi sampel.

Persen kadar air dan persen rendemen sampel saling berhubungan. Nilai rendemen tinggi belum tentu berkualitas tinggi dan lebih banyak senyawa bioaktif yang dihasilkan karena jika kadar airnya juga tinggi maka konsentrasi ekstrak yang didapatkan rendah. Perlakuan yang berbeda waktu fermentasi dan kadar air bahan memberikan hasil persen rendemen dan persen kadar air yang berbeda-beda juga. Grafik dari hasil uji lanjut BNT 1% persen kadar air dan notasinya dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Grafik persen kadar air Ekstrak *Sargassum fillipendula*

4.4. Aktivitas Antioksidan

Prinsip uji dengan metode ini yaitu DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi

dengan antioksidan tersebut membentuk 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning atau kuning gelap yang dapat diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 517 nm, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Sunarni *et al.*, 2005). Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena metode ini merupakan metode yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu singkat (Hanani E, 2005). Aktivitas antioksidan dihitung melalui nilai IC_{50} , semakin kecil nilai IC_{50} yang dihasilkan maka semakin besar aktivitas antioksidan yang dimiliki (Panjaitan *et al.*, 2003). IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Suryaningrum *et al.*, 2006). Prinsip uji dengan metode ini yaitu DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin. Reaksi ini dapat menyebabkan perubahan dari warna dari ungu pekat menjadi kuning atau kuning gelap yang dapat diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 517 nm, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Sunarni *et al.*, 2005). Antioksidan pembanding pada penelitian ini menggunakan Vitamin C.

Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi warna kekuningan. Tingkat diskolorisasi warna ungu DPPH mengindikasikan aktivitas penghambatan radikal bebas oleh sampel antioksidan (Abdille *et al.*, 2004). Reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh ekstrak *Sargassum fillipendula* diindikasikan dengan berubahnya warna ungu menjadi warna kuning. Perubahan warna ini membuktikan bahwa ekstrak

memiliki aktivitas antioksidan. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Molyneux, (2004).

Perubahan warna yang terjadi pada ekstrak *Sargassum fillipendula* disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas DPPH dengan satu atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa yang terkandung dalam sampel untuk membentuk senyawa 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl yang berwarna kuning. Senyawa yang bereaksi sebagai penangkap radikal bebas akan mereduksi DPPH yang dapat diamati dengan adanya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning ketika elektron ganjil dari radikal DPPH telah berpasangan dengan hidrogen dari senyawa penangkap radikal bebas yang akan membentuk DPPH-H tereduksi (Molyneux, 2004). Berdasarkan mekanisme tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa antioksidan mempunyai sifat yang relatif stabil dalam bentuk radikalnya. Senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dapat diprediksi dari golongan fenolat, flavonoid dan alkaloid.

Nilai IC_{50} ekstrak *Sargassum fillipendula* yang difermentasi dengan starter jamur *Aspergillus niger* selama 11, 13, dan 15 hari serta kadar air 35%, 50% dan 85% diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari nilai konsentrasi dan % inhibisi tersebut, maka dengan model LR (*Linear Regresion*) diperoleh persamaan garis.

Perhitungan analisis sidik ragam (ANOVA) nilai IC_{50} ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula* yang difermentasi selama 11, 13 dan 15 hari disajikan pada Lampiran 3. Hasil Anova nilai IC_{50} menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak sampel dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan kadar air bahan ($P < 0.05$), sedangkan perlakuan lama fermentasi sampel dan interaksi kedua perlakuan tidak memengaruhi secara nyata ($P > 0.05$). Notasi BNT 1% nilai IC_{50} dengan masing-masing perlakuan lama fermentasi disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Notasi BNT 1% IC₅₀ ekstrak alga coklat *Sargassum fillipendula*

Perlakuan	Rerata ekstrak IC ₅₀ (%)	Notasi
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 35%	125.13	cd
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 50%	106.29	bc
Lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 85%	92.49	ab
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 35%	121.52	d
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 50%	112.55	bc
Lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 85%	81.18	a
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 35%	110.72	bc
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 50%	103.25	c
Lama fermentasi 15 hari kadar air bahan 85%	88.32	b

Berdasarkan uji lanjut BNT 1%, perlakuan dengan nilai IC₅₀ terendah terdapat pada perlakuan lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 85% sebesar 81.18 ppm dengan notasi a, sedangkan nilai IC₅₀ tertinggi pada perlakuan lama fermentasi 11 hari kadar air bahan 35% yaitu sebesar 125.13 ppm dengan notasi cd. Nilai IC₅₀ berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidannya semakin rendah. Hasil penelitian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH tersebut menunjukkan bahwa ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula* dengan perlakuan lama fermentasi 13 hari kadar air bahan 85% memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi yaitu sebesar 81.18 ppm dengan notasi a. Secara keseluruhan aktivitas antioksidan ekstrak *Sargassum fillipendula* masih di bawah aktivitas antioksidan vitamin C sebagai kontrol pembandingan dalam penelitian ini. Hal ini dikarenakan ekstrak *Sargassum fillipendula* bukan merupakan senyawa murni, tetapi masih berupa ekstrak kasar yang mengandung senyawa-senyawa lain yang kemungkinan tidak mempunyai aktivitas antioksidan. Menurut Wikanta *et al.* (2005), Kadar senyawa antioksidan dalam ekstrak sangat rendah akibat banyaknya komponen lain yang merupakan pengotor atau komponen pengotor yang terdapat didalam ekstrak masih sangat tinggi. Produk alam dari laut secara umum mengandung kadar garam yang

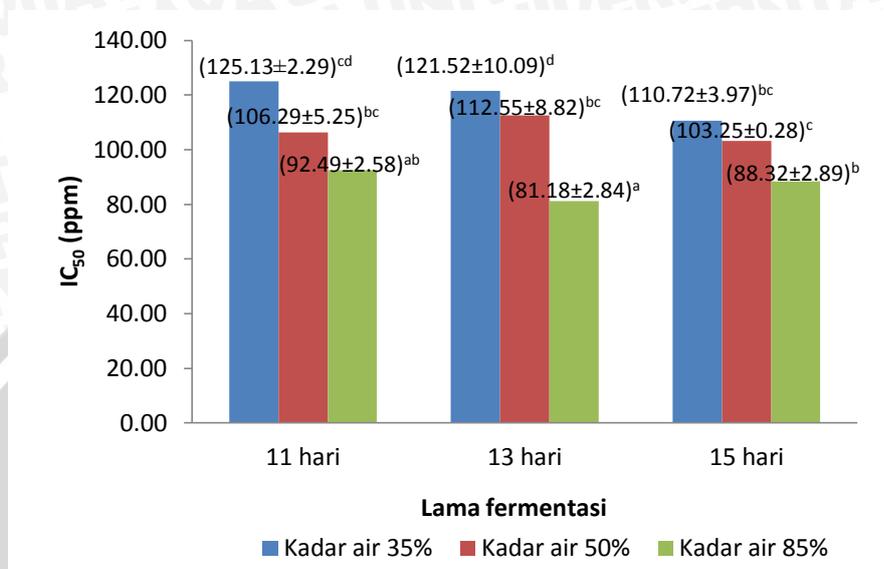
tinggi. Apabila komponen pengotor paling utama yang terdapat dalam ekstrak tersebut adalah garam, maka perlu upaya desalting lebih dahulu agar didapatkan bahan aktif yang lebih murni dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

Penggunaan waktu fermentasi yang berbeda berpengaruh terhadap aktivitas senyawa antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum fillipendula*. Hal ini diduga karena dengan semakin lama waktu fermentasi yang digunakan maka semakin besar kemampuan jamur *Aspergillus niger* untuk menguraikan substrat *Sargassum fillipendula*. Menurut Santoso (2009), Jamur *Aspergillus niger* adalah salah satu jamur penghasil enzim yang dapat memecah komponen senyawa selulosa, hemiselulosa dan pektin. Kita ketahui bahwa dinding sel alga coklat secara umum mengandung senyawa selulosa, hemiselulosa dan pektin yang terikat kuat. Apabila struktur dinding sel tersebut dapat dihancurkan, maka komponen senyawa bioaktif yang dihasilkan akan meningkat jumlah dan aktivitasnya.

Aktivitas antioksidan ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula* memiliki nilai IC_{50} yang masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan vitamin C, hal ini diduga akibat sampel *Sargassum fillipendula* masih berupa ekstrak kasar dan belum melalui proses pemurnian. Akan tetapi dari hasil penelitian telah diketahui bahwa ekstrak *Sargassum fillipendula* yang difermentasi dengan starter jamur *Aspergillus niger* selama 13 hari dengan kadar air 85% memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar 81.18 ppm. Menurut Blois (1958), suatu senyawa antioksidan dikatakan kuat apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 200ppm.

Berdasarkan hasil penelitian, aktivitas antioksidan tidak meningkat sejajar dengan peningkatan jumlah rendemen yang dihasilkan. Rendemen terbaik adalah pada perlakuan kadar air bahan sedangkan aktivitas antioksidan terbaik pada perlakuan kadar air bahan. Diduga karena aktivitas antioksidan tidak hanya

dipengaruhi oleh 1 faktor saja, akan tetapi dipengaruhi oleh semua faktor yang ada pada lingkungan sampel yang diuji. Grafik dari hasil uji lanjut BNT 1% nilai IC_{50} dan notasinya dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik nilai IC_{50} Ekstrak kasar *Sargassum fillipendula*

4.5. Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik dari penelitian ini ditentukan dengan perhitungan aktivitas antioksidan sampel yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Perlakuan yang pertama yaitu perbedaan waktu fermentasi dengan starter jamur *Aspergillus niger* selama 11, 13 dan 15 hari. Sedangkan pada perlakuan yang kedua yaitu menggunakan kadar air bahan 35%, 50% dan 85%. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali ulangan. Berdasarkan data penelitian yang diperoleh, perlakuan yang terbaik adalah perlakuan fermentasi selama 13 hari dengan kadar air bahan 85% dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar 81.18 ppm. Menurut Zuhra *et al.* (2008), IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang

jika IC_{50} bernilai 100-150 ppm dan lemah jika nilai IC_{50} sebesar 151-200 ppm. Hal ini menunjukkan ekstrak *Sargassum fillipendula* yang difermentasi selama 13 hari dengan kadar air bahan 85% dapat menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50% pada konsentrasi tersebut.

Menurut Suratmo (2009), DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak daun alam. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang.

4.6. Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa-senyawa fitokimia di dalam sampel *Sargassum fillipendula*. Analisis fitokimia dilakukan terhadap hasil terbaik dari semua perlakuan yaitu ekstrak kasar sampel yang difermentasi selama 13 hari dengan kadar air bahan 85%. Prosedur uji fitokimia dapat dilihat pada Lampiran 4 sedangkan hasil dari uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula*

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

Hasil uji fitokimia ini menunjukkan bahwa *Sargassum fillipendula* yang difermentasi selama 13 hari dengan kadar air bahan 85% positif mengandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid dan fenol. Alkaloid adalah senyawa alami amina, baik pada tanaman, hewan, ataupun jamur dan merupakan produk yang dihasilkan dari proses metabolisme sekunder, dimana saat ini diketahui sebanyak 5500 jenis alkaloid (Harbone, 1987). Pada umumnya basa bebas alkaloida hanya larut dalam pelarut organik meskipun beberapa pseudoalkaloida dan protoalkaloida larut dalam air (Sastrohamidjojo, 1996).

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau. Flavonoid merupakan turunan fenol yang memiliki struktur dasar fenilbenzopiron (tokoferol), dicirikan oleh kerangka 15 karbon (C₆-C₃-C₆) yang terdiri dari satu cincin teroksigenasi dan dua cincin aromatis. Substitusi gugus kimia pada flavonoid umumnya berupa hidroksilasi, metoksilasi, metilasi dan glikosilasi. Klasifikasi flavonoid sangat beragam, di antaranya ada yang mengklasifikasikan flavonoid menjadi flavon, flavanon, isoflavon, flavanol, flavanon, antosianin, dan kalkon. Lebih dari 6467 senyawa flavonoid telah diidentifikasi dan jumlahnya terus meningkat. Kebanyakan flavonoid berbentuk monomer, tetapi terdapat pula bentuk dimer (biflavonoid), trimer, tetramer, dan polimer (Mifta, 2010). Menurut Harbone (1987), terbentuknya endapan berwarna merah, kuning atau jingga dikarenakan penambahan H₂SO₄ sehingga

menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antoksidan meliputi flavon, isoflavon, katekin, flavonol dan kalkon.

Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya senyawa ini seringkali berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Adanya senyawa fenol dalam suatu bahan ditandai dengan terbentuknya warna hijau, biru hingga ungu pekat saat dilakukan uji fitokimia karena bahan bereaksi dengan pereaksi FeCl_3 (Harbone, 1987). Peranan beberapa golongan fenol sudah diketahui, misalnya lignin sebagai bahan pembangun dinding sel, antosianin sebagai pigmen bunga. Selain itu, dengan mengkonsumsi fenol dipercaya dapat mengurangi resiko beberapa penyakit kronis karena bersifat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan antikolesterol (Chen dan Blumberg, 2007).



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan penelitian tentang uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Sargassum fillipendula* dengan metode DPPH serta kandungan senyawa aktifnya adalah :

- Lama waktu fermentasi tidak berpengaruh terhadap mutu antioksidan yang diekstrak dari alga coklat *Sargassum fillipendula* maupun rendemen ekstrak yang didapatkan
- Kadar air bahan berpengaruh terhadap mutu antioksidan yaitu dengan nilai IC_{50} sebesar 81.18 ppm dan kadar air bahan berpengaruh terhadap persen rendemen ekstrak yang dihasilkan yaitu sebesar 4.61 % dengan kadar air sebesar 83.86%
- Kombinasi antara perlakuan waktu fermentasi dan kadar air bahan berpengaruh terhadap persen rendemen maupun mutu antioksidan dengan perlakuan terbaik pada perlakuan waktu fermentasi 13 hari kadar air bahan 85% dan positif mengandung senyawa-senyawa flavonoid, alkaloid dan fenolik.

5.2. Saran

Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan analisa yang lebih lengkap terhadap ekstrak alga coklat *Sargassum fillipendula* terkait dengan potensi dan prospeknya yang memiliki peranan sebagai antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul, M. 2003. **Peranan Radikal Bebas dan Antioksidan Dalam Kesehatan dan Penyakit**. [Http://www.Intisari.com/radikal.html](http://www.Intisari.com/radikal.html). Diakses tanggal 30 Maret 2011.
- Andarwulan, N., Hany W., dan Didik T.C. 1996. **Aktivitas Antioksidan dari Daun Sirih (Piper Betle L.)**. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Andayani, R., Yovita, L., dan Maimunah. 2008. **Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)**. Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang, Sumatra Barat.
- Blois, M.S. 1958. **Antioxidant Determinations by The Use of a Stable Free Radical**, Nature, 181:199-1200.
- Crayonpedia. 2012. ***Sargassum fillipendula***. [Http://www.Crayonpedia.org/Sargassumfillipendula/hm](http://www.Crayonpedia.org/Sargassumfillipendula/hm). Diakses tanggal 15 Januari 2012.
- Chen, C.Y.O. dan Blumberg. 2007. **Phytochemical Composition of Nuts**. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. Halaman 329-332.
- Day, R. A. dan A. L. Underwood. 1999. **Analisa Kimia Kuantitatif**. Edisi Kelima. Alih Bahasa: A. H. Pudjaatmaka. Erlangga. Jakarta.
- Gandjar, I.G. dan Rohman A. 2007. **Kimia Farmasi Analisis**. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Gheldol, N., Wang X. H., and Engeseth N. J. 2002. **Identification and Quantification of Antioxidant Component of Honeys from Various Floral Sources**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 : 5870-5877.
- Hanani, E. 2005. **Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callispongia* Sp, Dari Kepulauan Seribu**. Majalah Ilmu Kefarmasian Vol.II, No.3. Desember 2005, 127 – 133, ISSN : 1693-9883.
- Harborne, J.B. 1987. **Metode Fitokimia**. Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediso, penerbit ITB, Bandung.
- Harborne, J.B. 2006. **Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**. Diterjemahkan oleh: Padmawinata, K dan I, Soediro. Penerbit ITB. Bandung
- Hoog, D.G.S. and Guerra. 2011. **Aspergillus Niger Genomics, Past Present and into The Future**. Fungal Biotechnology Team, Pacific Northwest National Library, Washington, USA

Juniarti, D., Osmeli. dan Yuhernita. 2009. **Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius L.*)**. Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta, Indonesia.

Mifta. 2010. **Pengertian Senyawa Flavonoid**. [Http://www. Artikelkimia.info/htm](http://www.Artikelkimia.info/htm). Diakses tanggal 10 April 2012.

Nazir, M. 1989. **Metode Penelitian**. PT. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Pujaningsih, R. 2005. **Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas Pakan**. Laboratorium Teknologi Makanan Ternak, Universitas Diponegoro, Semarang.

Rahayu, D. S., Dewi. K dan Enny, F. 2009. **Penentuan Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang. (*Terminalia catapa L*) Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH)**. Jurusan Kimia. MIPA Universitas Diponegoro.

Santoso, U. 2009. **Jamur *Aspergillus Niger* dan Peranannya**. [Http://www.U.Santoso.blogspot.com](http://www.U.Santoso.blogspot.com). Diakses tanggal 20 Januari 2012.

Sastrohamidjojo, H. 1996. **Sintesis Bahan Alam**. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

Septa, A. 2011. **Pektinase Dalam Industri Vanili**. [Http://www.Septa.blogspot.com](http://www.Septa.blogspot.com). Diakses tanggal 15 April 2011.

Sudarmadji. S., Haryono dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Liberty. Yogyakarta.

Susanto, T. dan Sucipta. 1994. **Teknologi Pengemasan Bahan Makanan**. CV.Family. Blitar.

Suryaningrum, T. D., Thamrin Wikanta dan Hendy Kristini . 2006. **Uji aktivitas Senyawa Antioksidan Dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euचेuma Cottoni***. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. VOL.1.No.1.Juni 2006

Trilaksani, W. 2003. **Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan**. <http://fa.lib.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbfa-gdl-s2-1992-marlina-63> ITB. Diakses 19 Februari 2008

Ummah, M. K. 2010. **Ekstraksi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Belimbi L*)**. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang

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**. Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok.

Vogel, A. I. 1987. **Textbook of Practical Organic Chemistry. Revised by Furnies B.S.** 4nd Edition. New York.

Wasetiawan. 2010. **Algae**. [Http://www.blog.unila.ac.id](http://www.blog.unila.ac.id). Diakses tanggal 30 Maret 2011.

Wikipedia. 2009^a. **Klasifikasi *Sargassum fillipendula***. [Http://www.Wikipedia.org/klasifikasisargassumfillipendula/wiki/htm](http://www.Wikipedia.org/klasifikasisargassumfillipendula/wiki/htm). Diakses Tanggal 20 Agustus 2011.

_____. 2009^b. **Sifat Pelarut Umum**. [Http://www.wikipedia.org/sifat_pelarut_umum/wiki.htm](http://www.wikipedia.org/sifat_pelarut_umum/wiki.htm). Diakses Tanggal 30 September 2011.

_____. 2011^a. **Rumput Laut Coklat**. [Http://www.wikipedia.org/Rmput_laut_coklat/wiki.htm](http://www.wikipedia.org/Rmput_laut_coklat/wiki.htm). Diakses Tanggal 30 September 2011.

_____. 2011^b. **Sumber Antioksidan**. [Http://www.Wikipedia.org/sumber_antioksidan/wiki.htm](http://www.Wikipedia.org/sumber_antioksidan/wiki.htm). Diakses Tanggal 05 Oktober 2011.

_____. 2012^a. **Fermentasi**. [Http://www.Wikipedia.org/fermentasi/wiki.htm](http://www.Wikipedia.org/fermentasi/wiki.htm). Diakses tanggal 15 Januari 2012.

_____. 2012^b. ***Aspergillus Niger***. [Http://www.Wikipedia.org/Aspergillus_niger/wiki/htm](http://www.Wikipedia.org/Aspergillus_niger/wiki/htm). Diakses tanggal 15 Januari 2012.

Yunizal. 2004. **Teknologi Pengolahan Alginat. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan**. Jakarta.

Zhao, X., Yujie Z., and Guangjian Z. 2009. **Microwave Pretreatment of Substances for Cellulose Production by Solid-State Fermentation**. Department of Chemical engineering, Institute of Applied Chemistry, Tsinghua, Beijing, China.

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

Lampiran 1. Analisis Keragaman (ANOVA) persen rendemen ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula*

1. Data Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial

Perlakuan		Ulangan		Total	Rata-Rata
		1	2		
W1	K1	2.15	2.40	4.55	2.28
	K2	3.35	3.71	7.06	3.53
	K3	4.03	4.49	8.52	4.26
W2	K1	2.20	2.12	4.32	2.16
	K2	3.19	3.25	6.44	3.22
	K3	3.91	4.03	7.94	3.97
W3	K1	2.02	2.12	4.14	2.07
	K2	3.15	3.22	6.37	3.19
	K3	4.61	4.39	9.00	4.50
Total		28.61	29.73	58.34	

2. Tabel 2 arah

Waktu fermentasi	Kadar air ekstraksi			Total	Rata-rata
	K1	K2	K3		
W1	2.28	3.53	4.26	10.07	3.36
W2	2.16	3.22	3.97	9.35	3.12
W3	2.07	3.19	4.5	9.76	3.25
Total	6.51	9.94	12.73	29.18	

Keterangan :

W1 = Fermentasi 11 hari

W2 = Fermentasi 13 hari

W3 = Fermentasi 15 hari

K1 = Kadar air 35%

K2 = Kadar air 50%

K3 = Kadar air 85%

3. ANOVA persen rendemen ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula*

Sumber	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	8	155.21	19.402	710.679		
Perlakuan W	2	0.04	0.022	0.796	4.46	8.65
Perlakuan K	2	3,235	1,618	59.257	4.46	8.65
WXK	4	104.63	26.157	3.388	3.64	7.01
Galat	9	0.25	0.027			
Total	17	155.458	9.145			

* Perlakuan kadar air bahan (K) :

$F_{hitung} > F_{tabel}$: terima H_1 dan tolak H_0 , artinya terdapat perbedaan yang sangat nyata pada perlakuan kadar air bahan.

4. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%)

Rerata	2.07	2.16	2.28	3.19	3.22	3.53	3.97	4.26	4.5	KTG	BNT 0.01
2.07	0	tn	tn	*	*	*	*	*	*	0.250	0.5
2.16		0	tn	*	*	*	*	*	*		
2.28			0	*	*	*	*	*	*		
3.19				0	tn	tn	*	*	*		
3.22					0	tn	*	*	*		
3.53						0	tn	*	*		
3.97							0	tn	*		
4.26								0	tn		
4.5									0		
Notasi	a	A	a	b	ab	ab	ab	ab	ab		
Perlakuan	T7	T4	T1	T8	T5	T2	T6	T3	T9		

Kesimpulan yang dapat diambil yaitu untuk mendapatkan kadar rendemen yang banyak dari sampel yaitu menggunakan perlakuan kadar air bahan 85%.

Lampiran 2. Analisis Keragaman (ANOVA) persen kadar air ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula*

3. Data Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial

Perlakuan		Ulangan		Total	Rata-Rata
		1	2		
W1	K1	84.81	87.5	172.31	86.16
	K2	86	85.7	171.70	85.85
	K3	86.31	87.98	174.29	87.15
W2	K1	85.3	84.58	169.88	84.94
	K2	85.2	85.1	170.30	85.15
	K3	87.21	84.85	172.06	86.03
W3	K1	83.2	84.51	167.71	83.86
	K2	84.32	86	170.32	85.16
	K3	86.7	87.2	173.90	86.95
Total		769.05	773.42	1542.47	

4. Tabel 2 arah

Waktu fermentasi	Kadar Air ekstraksi			Total	Rata-rata
	K1	K2	K3		
W1	86.16	85.85	87.15	259.16	86.39
W2	84.94	85.15	86.03	256.12	85.37
W3	83.86	85.16	86.95	255.97	85.32
Total	254.96	256.16	260.13	771.25	

Keterangan :

W1 = Fermentasi 11 hari

W2 = Fermentasi 13 hari

W3 = Fermentasi 15 hari

K1 = Kadar air 35%

K2 = Kadar air 50%

K3 = Kadar air 85%

3. ANOVA persen kadar air ekstrak etanol *Sargassum fillipendula*

Sumber	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	8	99149.75	12393.72	10623.19		
Perlakuan W	2	1.08	0.54	0.46	4.46	8.65
Perlakuan K	2	2.44	1.22	1.05	4.46	8.65
WXK	4	66100.31	16525.08	14164.35	3.64	7.01
Galat	9	10.50	1.17			
Total	17	99160.25	5832.96			

* Perlakuan pH inkubasi (P) :

$F_{hitung} > F_{tabel}$: terima H_1 dan tolak H_0 , artinya terdapat perbedaan yang sangat nyata pada perlakuan kadar air bahan.

5. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%)

Rerata	83.86	84.94	85.15	85.16	85.85	86.03	86.16	86.95	87.15	KTG	BNT 0.01
83.86	0	tn	*	*	*	*	*	*	*	1.050	1.08
84.94		0	tn	tn	tn	*	*	*	*		
85.15			0	tn	tn	tn	*	*	*		
85.16				0	tn	tn	tn	*	*		
85.85					0	tn	tn	*	*		
86.03						0	tn	tn	*		
86.16							0	tn	tn		
86.95								0	tn		
87.15									0		
Notasi	a	a	a	a	a	a	a	a	a		
Perlakuan	T7	T4	T5	T8	T2	T6	T1	T9	T3		

Kesimpulan yang dapat diambil yaitu untuk mendapatkan kadar air yang banyak dari sampel yaitu menggunakan perlakuan kadar air bahan 85%.

Lampiran 3. Analisis Keragaman (ANOVA) Nilai IC_{50} *Sargassum fillipendula* yang difermentasi selama 11, 13 dan 15 hari

5. Data Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial

Perlakuan		Ulangan		Total	Rata-rata
		1	2		
W1	K1	123.51	126.75	250.26	125.13
	K2	102.57	110.01	212.58	106.29
	K3	94.32	90.66	184.99	92.49
W2	K1	128.66	114.38	243.05	121.52
	K2	118.79	106.31	225.10	112.55
	K3	79.17	83.20	162.37	81.18
W3	K1	113.53	107.91	221.44	110.72
	K2	103.05	103.46	206.51	103.25
	K3	86.27	90.36	176.63	88.32
Total		949.88	933.04	1882.92	

6. Tabel 2 arah

Waktu Fermentasi	Kadar Air Ekstraksi			Total	Rata-rata
	K1	K2	K3		
W1	123.13	106.29	92.49	323.91	107.97
W2	121.52	112.55	81.18	315.25	105.08
W3	110.72	103.25	88.32	302.29	100.76
Total	357.37	322.09	261.99	941.45	

Keterangan :

W1 = Fermentasi 11 hari

W2 = Fermentasi 13 hari

W3 = Fermentasi 15 hari

K1 = Kadar air 35%

K2 = Kadar air 50%

K3 = Kadar air 85%

3. ANOVA Daya Hambat Antioksidan *Sargassum fillipendula*

Sumber	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel 5%	F Tabel 1%
Perlakuan	8	151271.44	18908.93	600.86		
Perlakuan W	2	39.47	19.73	0.63	4.46	8.65
Perlakuan K	2	775.22	387.61	12.32	4.46	8.65
W x K	4	101216.30	25304.08	804.07	3.64	7.01
Galat	8	251.76	31.47			
Total	17	151523.2	8913.13			

* Perlakuan waktu fermentasi (W) :

$F_{hitung} > F_{tabel}$: terima H_1 dan tolak H_0 , artinya terdapat perbedaan yang sangat nyata pada perlakuan kadar air bahan.

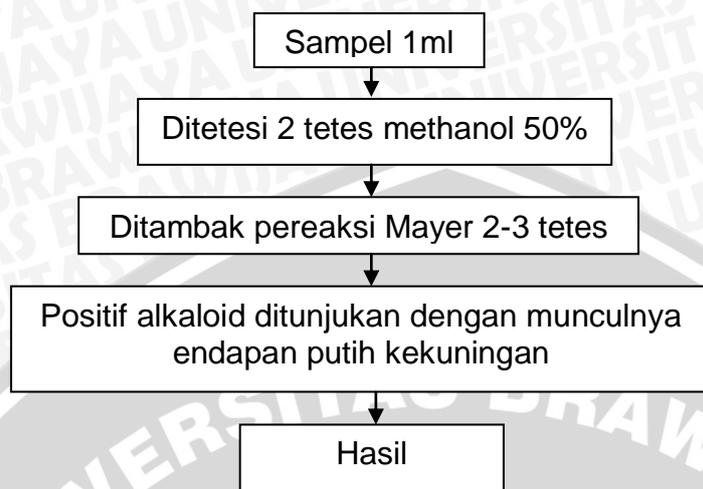
6. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%)

Rerata	81.18	88.32	92.49	103.25	106.29	110.72	112.55	121.52	125.13	KTG	BNT 0.01
81.18	0	*	*	*	*	*	*	*	*	31.470	5.61
88.32		0	tn	*	*	*	*	*	*		
92.49			0	*	*	*	*	*	*		
103.25				0	tn	*	*	*	*		
106.29					0	tn	*	*	*		
110.72						0	tn	*	*		
112.55							0	*	*		
121.52								0	tn		
125.13									0		
Notasi	a	b	ab	c	bc	bc	bc	d	cd		
Perlakuan	T6	T9	T3	T8	T2	T7	T5	T4	T1		

Kesimpulan yang dapat diambil yaitu perlakuan yang terbaik untuk mengekstrak senyawa antioksidan sampel *Sargassum fillipendula* yaitu kadar air bahan 85%.

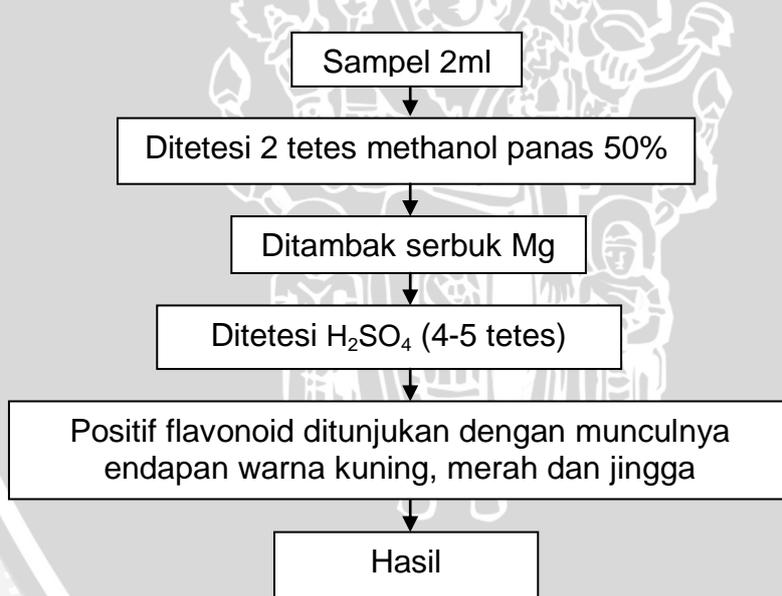
Lampiran 4. Uji Fitokimia ekstrak *Sargassum fillipendula*

1. Skema kerja uji Alkaloid dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 8. Skema Uji Alkaloid (Hanani *et al.*, 2005)

2. Skema kerja uji flavonoid dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 9. Skema Uji Flavonoid (Hanani *et al.*, 2005)