

**PENGARUH SUHU PEMBEKUAN TERHADAP RENDEMEN DAN
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN YANG DIEKSTRAK DARI ALGA COKLAT**

Sargassum filipendula

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**OLEH:
STEVANUS ADE AFianto
NIM. 0710830010**



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

**PENGARUH SUHU PEMBEKUAN TERHADAP RENDEMEN DAN
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN YANG DIEKSTRAK DARI ALGA COKLAT**

Sargassum filipendula

LAPORAN SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana
pada Fakultas Perikana dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya Malang**

Oleh:

STEVANUS ADE AFIANTO

NIM. 0710830010

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal:.....

Dosen Penguji II

(Dr. Ir. Hardoko, MS)

NIP. 19620108 198802 1 001

Tanggal:.....

**Menyetujui,
Dosen Pembimbing I**

(Ir. Bambang Budi Sasmito, MS)

NIP. 19570119 198601 1 001

Tanggal:.....

Dosen Pembimbing II

(Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP)

NIP. 19581231 198601 2 002

Tanggal:.....

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)

NIP. 19600322198601 1 001



RINGKASAN

STEVANUS ADE AFianto. Pengaruh Suhu Pembekuan Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Yang Diekstrak dari Alga Coklat *Sargassum filipendula* (di bawah bimbingan Ir. Bambang Budi Sasmito, MS dan Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP)

Rumput laut, termasuk alga coklat *Sargassum filipendula* merupakan salah satu sumberdaya hayati perairan laut Indonesia yang secara potensial memiliki nilai ekonomis dan komoditi ekspor yang tinggi. Hal tersebut salah satunya dikarenakan memiliki kandungan senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan. Ekstraksi senyawa bioaktif dari alga coklat jenis ini pada umumnya masih sederhana dengan menggunakan metode maserasi. Oleh karena itu, pembekuan digunakan sebagai salah satu alternatif untuk menyingkat waktu maserasi yang mencapai waktu hingga 3 x 24 jam, agar kualitas senyawa bioaktif terjaga dan senyawa bioaktif dapat terekstrak optimal.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh suhu pembekuan yang berbeda terhadap kerusakan jaringan alga coklat *Sargassum filipendula*, serta rendemen dan aktivitas antioksidan dari ekstrak *Sargassum filipendula*.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Biologi Dasar Fakultas MIPA Universitas Brawijaya pada bulan Mei–Agustus 2012.

Metode yang digunakan adalah metode deskriptif dengan parameter kuantitatifnya yaitu laju pembekuan, nilai rendemen, nilai kadar air, nilai IC₅₀ melalui penghambatan radikal bebas DPPH dengan spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan parameter kualitatifnya yaitu pengamatan kerusakan jaringan secara makroskopis dan uji senyawa fitokimia (alkaloid, flavonoid dan fenolat).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa grafik pembekuan yang terbagi menjadi tiga tahapan dengan laju A (-18°C) sebesar 0,292±0,013 cm/jam; B (-27°C) sebesar 0,741±0,034 cm/jam; dan C (-30°C) sebesar 0,919±0,041 cm/jam termasuk ke dalam laju pembekuan lambat.

Suhu pembekuan dengan menggunakan lempeng (plat) sentuh pembeku mempengaruhi kerusakan yang serius di bagian permukaan jaringan epidermis dan parenkim batang sampel perlakuan A (-18°C). Jaringan batang sampel perlakuan B (-27°C) dan C (-30°C) hanya mengalami pengkerutan. Hancurnya jaringan (*freezing injury*) diduga akibat sel-sel yang pecah atau robek oleh kristal es saat pembekuan. Komponen dari sel yang diduga senyawa bioaktif yang bersifat non polar yang dimungkinkan muncul akibat perlakuan pembekuan pada suhu -30°C yang ditunjukkan pada bagian (*spot*) warna kuning pada gambar irisan melintang batang. Jaringan daun sampel perlakuan A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) juga mengalami pengkerutan di bagian tengah (berkas pembuluh) dan mesofilnya. Pengkerutan terjadi diduga akibat sel mengalami dehidrasi. Saat pencairan (*thawing*) sebagian cairan tidak dapat diserap kembali, dan sel-sel menjadi mengkerut karena dinding sel kehilangan rigiditas.

Nilai rendemen (%) *crude* ekstrak perlakuan Kontrol, A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) masing-masing sebesar 1,446±0,310; 1,521±0,227; 1,638±0,514; dan 1,569±0,302. Pada perlakuan A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) nilai rendemen didapati lebih besar dibanding kontrol. Hal ini disebabkan perlakuan pembekuan yang mempengaruhi kerusakan sel dan

posisi cairan pada sampel *S. filipendula* yang dibekukan yang mana dapat mengoptimalkan kandungan senyawa polar, yaitu senyawa bioaktif dan air, terlarut dalam pelarut etanol saat proses maserasi terjadi.

Nilai IC_{50} (ppm) aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas DPPH perlakuan Kontrol, A ($-18^{\circ}C$), B ($-27^{\circ}C$), C ($-30^{\circ}C$) dan Vitamin C (sebagai pembanding) masing-masing sebesar $21,593 \pm 6,097$; $14,272 \pm 2,490$; $16,078 \pm 3,743$; $18,619 \pm 7,720$ dan $2,876 \pm 0,141$. Keseluruhan sampel dapat dikatakan sebagai antioksidan yang tergolong sangat kuat. Pada perlakuan A ($-18^{\circ}C$), B ($-27^{\circ}C$) dan C ($-30^{\circ}C$) nilai IC_{50} didapati lebih kecil dibanding kontrol. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa suhu perlakuan pembekuan yang semakin rendah meningkatkan nilai IC_{50} , diduga berhubungan dengan bagian (*spot*) berwarna kuning yang terjadi pada hasil pengamatan irisan melintang batang sampel C ($-30^{\circ}C$) yang diduga merupakan komponen sel (senyawa bioaktif) yang bersifat nonpolar yang menghambat senyawa bioaktif yang bersifat polar terekstrak oleh pelarut etanol. Hal ini mengakibatkan berkurangnya jumlah senyawa bioaktif yang dapat terekstrak yang justru memiliki peran sebagai antioksidan potensial.

Hasil *screening* fitokimia menunjukkan bahwa komponen bioaktif yang terkandung dalam *crude* ekstrak etanol Alga Coklat *Sargassum filipendula* keseluruhan perlakuan meliputi golongan alkaloid, flavonoid dan fenol.

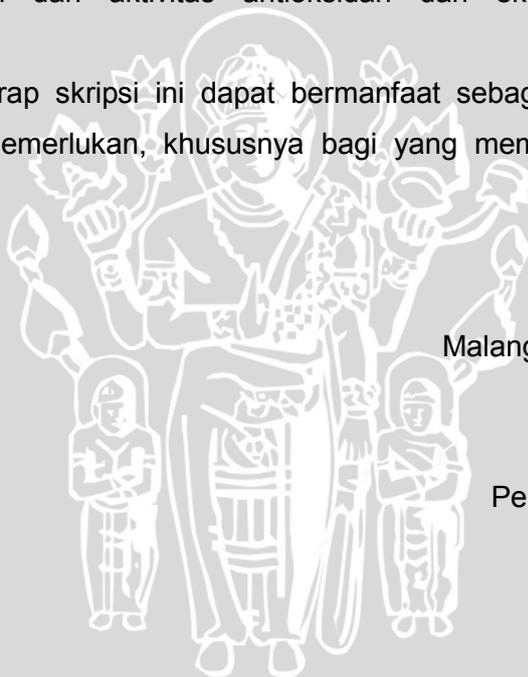


KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kami panjatkan kehadirat Tuhan YME, atas kasih karunia-Nya penulis bisa menyelesaikan laporan skripsi dengan judul "Pengaruh Suhu Pembekuan Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Yang Diekstrak dari Alga Coklat *Sargassum filipendula*". Laporan ini telah disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Strata 1 pada program studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh suhu pembekuan yang berbeda terhadap kerusakan sel alga coklat jenis *Sargassum filipendula*, rendemen dan aktivitas antioksidan dari ekstrak *Sargassum filipendula*.

Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat sebagai informasi bagi semua pihak yang memerlukan, khususnya bagi yang membacanya. Terima kasih.



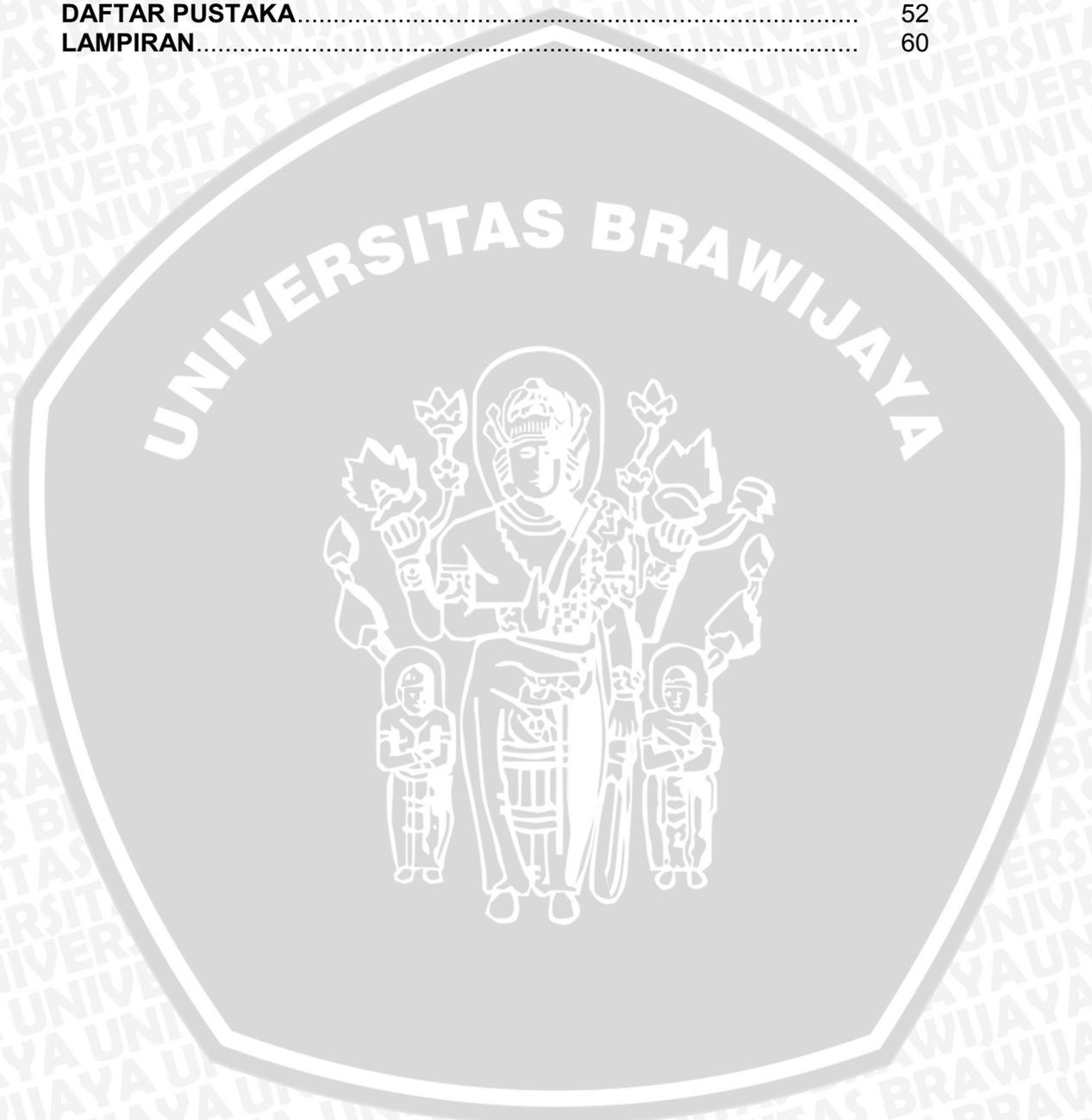
Malang, 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	5
1.4 Tempat dan Waktu	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Coklat (<i>Phaeophyceae</i>)	6
2.2 <i>Sargassum filipendula</i>	8
2.3 <i>Freezing Injury</i> dan Pembekuan	9
2.4 Antioksidan	12
2.5 Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan (DPPH)	16
2.6 Ekstraksi	17
2.7 Pelarut	18
2.8 Spektrofotometer UV-Vis	20
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	22
3.1.1 Alat	22
3.1.2 Bahan	22
3.2 Metode Penelitian	22
3.3 Variabel Penelitian	23
3.4 Prosedur Penelitian	23
3.4.1 Pembekuan Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	23
3.4.2 Pembuatan Preparat Mikroskopis	24
3.4.3 Ekstrak Etanol Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	25
3.4.4 Parameter Uji	25
3.4.3.1 Rendemen	25
3.4.3.2 Kadar Air	26
3.4.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan (DPPH)	26
3.4.3.4 Uji Fitokimia	27
3.5 Skema Kerja Penelitian	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Karakteristik Pembekuan Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	31
4.2 Pengamatan Mikroskopis Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	35
4.3 Ekstraksi <i>Sargassum filipendula</i> dengan Pelarut Etanol	40

4.4 Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	43
4.5 Skrining Fitokimia	46
4. PENUTUP	
4.1 Kesimpulan	51
4.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	60



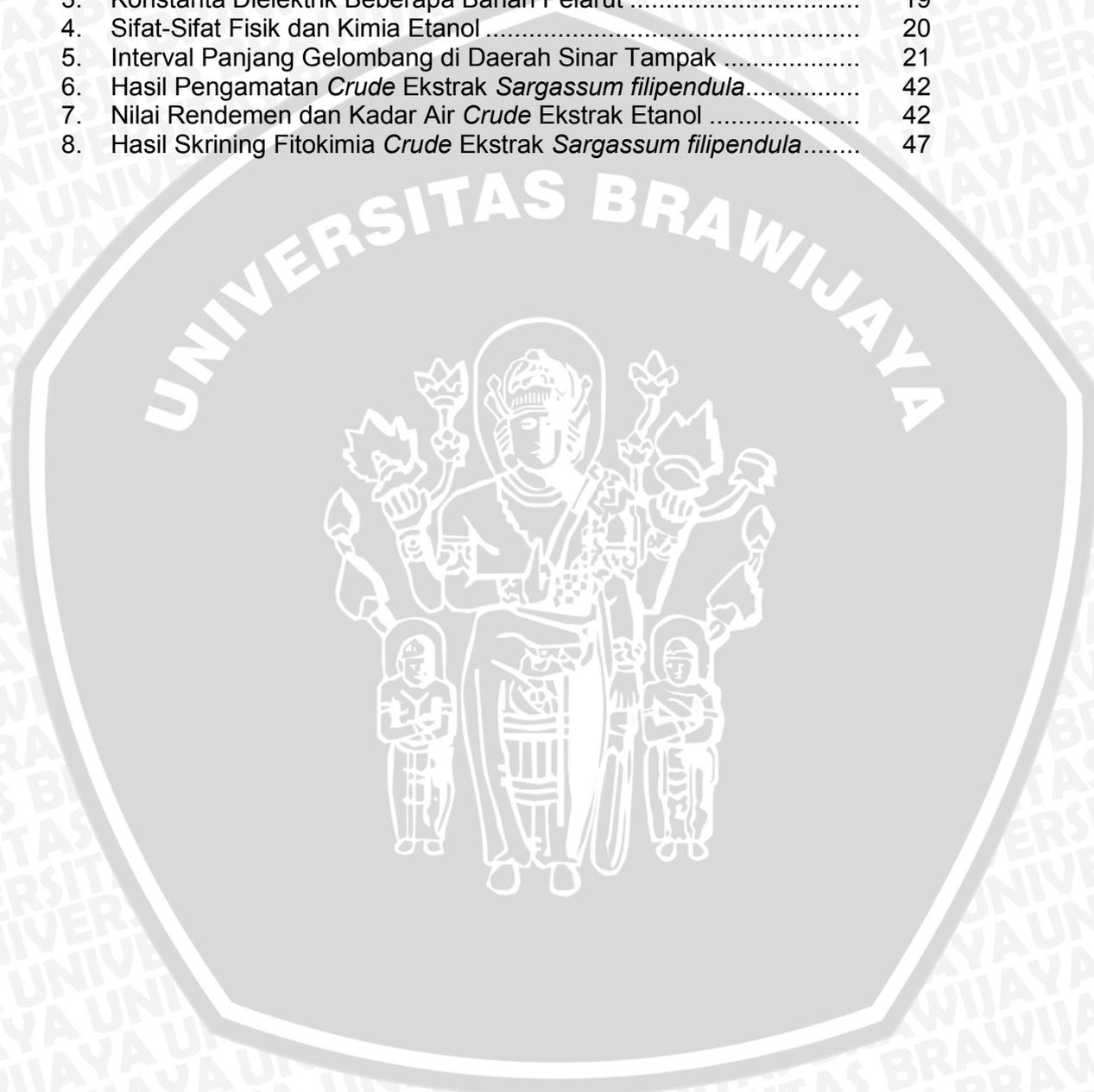
DAFTAR GAMBAR

No.	Gambar	Halaman
1.	Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	9
2.	Grafik Penurunan Suhu Selama Pembekuan.....	10
3.	Reaksi Umum Oksidasi Lemak.....	15
4.	Reaksi Penangkapan Radikal Bebas DPPH dengan Antioksidan ...	17
5.	Wadah Sampel.....	24
6.	Skema Kerja Tahap Perlakuan Pembekuan.....	29
7.	Skema Kerja Tahap Ekstraksi.....	30
8.	Grafik Penurunan Suhu Selama Proses Pembekuan.....	31
9.	Grafik Perbandingan Laju Pembekuan.....	33
10.	Hasil Pengamatan Mikroskopis Irisan Melintang Batang (<i>Thallus</i>) Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	36
11.	Perubahan Fisika Kimia Bahan Pangan Selama Pembekuan dan Peleburan (<i>Thawing</i>).....	37
12.	Hasil Pengamatan Mikroskopis Irisan Melintang Daun (<i>Blade</i>) Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	38
13.	Kejadian Fisik Secara Skematis di dalam Sel Pada Waktu Pembekuan.....	39
14.	Nilai IC ₅₀ Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas DPPH...	44
15.	Ciri-Ciri Struktur dari Flavonoid.....	49



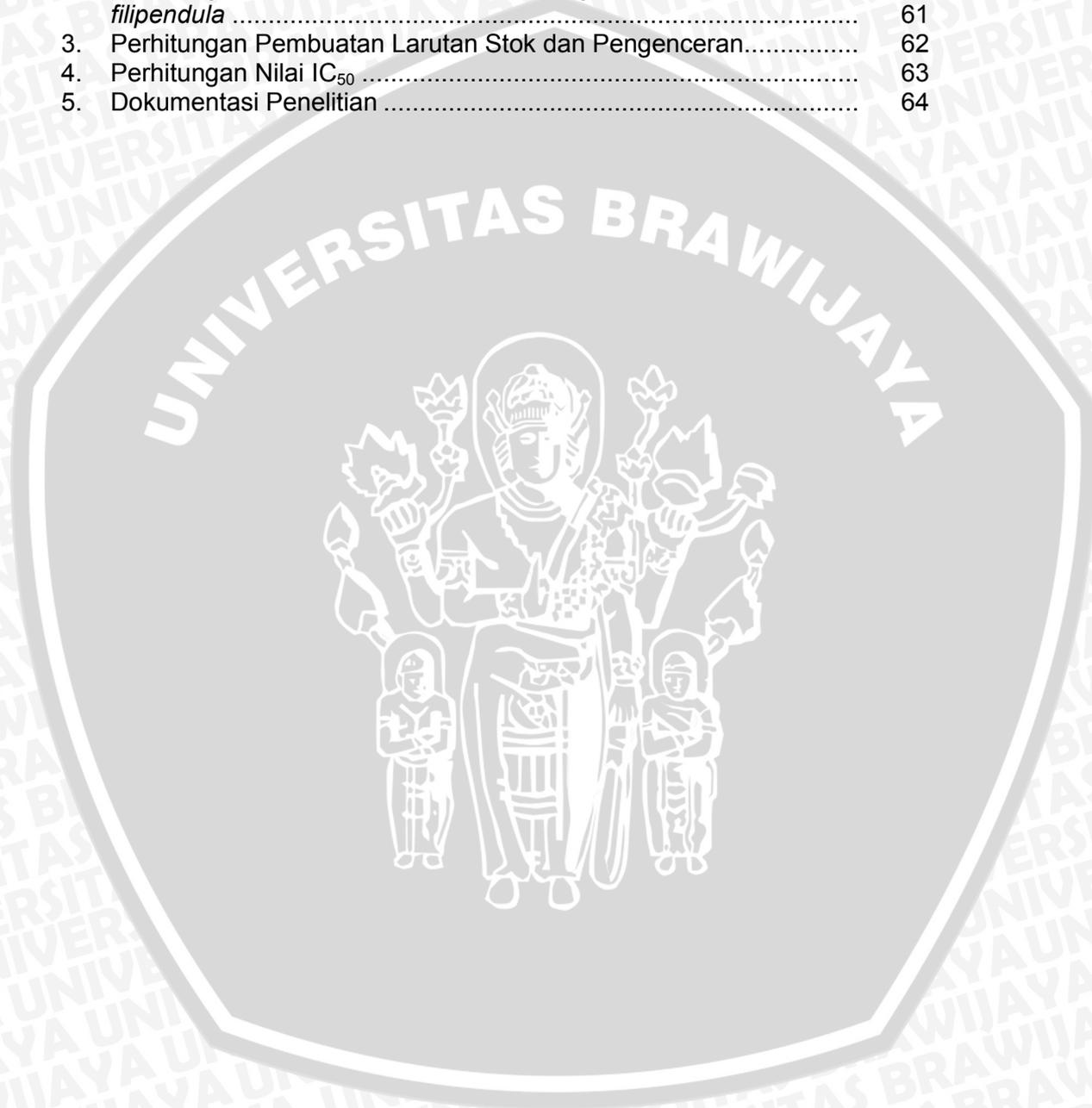
DAFTAR TABEL

No.	Tabel	Halaman
1.	Komposisi Kimia Alga Coklat	6
2.	Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat <i>Sargassum</i> sp.....	7
3.	Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut	19
4.	Sifat-Sifat Fisik dan Kimia Etanol	20
5.	Interval Panjang Gelombang di Daerah Sinar Tampak	21
6.	Hasil Pengamatan <i>Crude</i> Ekstrak <i>Sargassum filipendula</i>	42
7.	Nilai Rendemen dan Kadar Air <i>Crude</i> Ekstrak Etanol	42
8.	Hasil Skrining Fitokimia <i>Crude</i> Ekstrak <i>Sargassum filipendula</i>	47



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Lampiran	Halaman
1.	Data Hasil Pembekuan Alga Coklat <i>Sargassum filipendula</i>	60
2.	Perhitungan Rendemen <i>Crude Ekstrak Alga Coklat Sargassum filipendula</i>	61
3.	Perhitungan Pembuatan Larutan Stok dan Pengenceran.....	62
4.	Perhitungan Nilai IC ₅₀	63
5.	Dokumentasi Penelitian	64



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut (*seaweed*) termasuk dalam kelompok tanaman laut yang dikenal sebagai alga (ganggang). Estimasi jumlah rumput laut yang tersebar di dunia adalah sekitar 45.000 jenis (Ismail dan Hong, 2002). Makroalga laut ini dikategorikan berdasarkan pigmentasinya, morfologi, anatomi, dan komposisi nutrisinya, yaitu alga merah (*Rhodophyta*), alga coklat (*Phaeophyta*), dan alga hijau (*Chlorophyta*) (Dawczynski *et al.*, 2007).

Alga coklat mempunyai kelimpahan dan sebaran yang sangat tinggi, dimana terdapat hampir di seluruh wilayah laut Indonesia (Handayani *et al.*, 2004). Beberapa marga alga coklat antara lain *Sargassum*, *Dictyota*, *Hydroclathrus*, *Padina* dan *Turbinaria*. Pada khususnya, daerah penyebaran alga coklat *Sargassum* sp. antara lain di Jawa, Sulawesi, Pulau Kei, Sumatera Utara, Lombok, kepulauan Aru dan Irian (Indriani dan Sumarsih, 1992). Salah satu jenis *Sargassum* yaitu *Sargassum filipendula* yang dapat ditemukan di daerah perairan utara Pulau Madura.

Rumput laut, termasuk alga coklat merupakan salah satu sumberdaya hayati perairan laut Indonesia yang secara potensial memiliki nilai ekonomis dan komoditi ekspor yang tinggi. Makroalga yang biasa tumbuh secara liar tersebut memiliki kandungan polisakarida dalam jumlah besar pada dinding selnya. Alginat adalah salah satu jenis polisakaridanya, yang secara luas digunakan oleh industri makanan dan kosmetik (Rasyid, 2010; Camara *et al.*, 2011). Namun, rumput laut ternyata juga memiliki senyawa bioaktif sebagai sumber unggulan seperti pigmen karotenoid dan klorofil a, serat pangan, protein, asam lemak esensial, vitamin (B, C dan E) dan mineral penting untuk metabolisme tubuh

seperti iodin, calcium dan selenium, serta mengandung turunan fenol dan polifenol yang merupakan senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan (Patra *et al*, 2008; Vijayabaskar dan Shiyamala, 2011).

Minat khusus telah difokuskan pada kegunaan dari antioksidan yang mana dapat menghilangkan radikal bebas, yang menyebabkan bermacam penyakit, karsinogenesis dan penuaan (Isfahlan *et al.*, 2010). Banyak tanaman herbal mengandung senyawa antioksidan dan senyawa tersebut melindungi sel terhadap pengaruh bahaya jenis-jenis oksigen reaktif (ROS), seperti *singlet oxygen*, superoksida, radikal peroksil, radikal hidroksil dan peroksinitrit. Antioksidan dapat menetralkan pengaruh yang melemahkan dari radikal bebas dengan menghambat atau memutuskan rantai (seperti vitamin A, C, beta karoten, dll) atau berberapa mekanisme aksi lain. Antioksidan ini harus secara konstan terisi ketika mereka terpakai dalam proses penetralan radikal bebas (Shah *et al.*, 2010).

Keinginan besar timbul dalam menemukan antioksidan alami dari bahan tumbuh-tumbuhan untuk menggantikan antioksidan sintetik (Chanwitheesuk *et al.*, 2005). Antioksidan sintetik seperti BHA (*Butylated Hidroxy Anisole*), BHT (*Butylated Hydroxy Toluene*), *tertiary butylated hydroquinon* dan ester asam galat, telah diduga menyebabkan atau mendorong pengaruh negatif bagi kesehatan. Sebab itu, batasan kuat telah ditetapkan dalam penggunaannya dan ada kecenderungan menggantikannya dengan antioksidan alami. Selain itu, antioksidan sintetik tersebut juga menunjukkan daya larut yang rendah dan aktivitas antioksidan sedang (Pourmorad *et al.*, 2006).

Sebagai sumber baru antioksidan alami di dalam penelitian yang dapat digunakan dalam industri makanan, alga diusulkan sebagai bahan atau material mentah yang tepat. Organisme ini telah secara umum diketahui dan dikonsumsi di beberapa negara dan banyak manfaat kesehatan yang berhubungan dengan

kegunaannya. Oleh karena itu, alga adalah sumber besar kandungan alami yang potensial dengan aktivitas antioksidan yang dapat digunakan sebagai bahan untuk kegunaan makanan fungsional, salah satu kandungannya adalah senyawa antioksidatif polifenol (Mendiola *et al.*, 2008).

Penelitian yang telah dilakukan yang berhubungan dengan alga coklat khususnya jenis *Sargassum filipendula* masih bersifat eksploratif, sehingga belum diperoleh teknik ekstraksi yang efektif atau tepat. Ekstraksi senyawa bioaktifnya masih banyak menggunakan cara maserasi saja. Kelebihan ekstraksi dengan cara ini adalah peralatan yang digunakan sederhana, namun kelemahannya adalah waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama hingga lebih dari 24 jam.

Pada penelitian Suryaningrum *et al.* (2006), maserasi sampel rumput laut membutuhkan waktu hingga 3 hari (3 x 24 jam). Jika waktu yang dibutuhkan untuk mengekstraksi lama dengan kondisi suhu ruang, dapat mengakibatkan kemungkinan antioksidan yang terekstrak banyak terjadi kerusakan dan menurunkan kualitasnya. Oleh sebab itu, perlu adanya alternatif lain untuk menyingkat lama maserasi agar kualitas antioksidan tetap terjaga, yaitu dengan cara pelukaan pada sel alga coklat melalui pembekuan atau disebut dengan *freezing injury*.

Pembekuan pada umumnya digunakan untuk mengawetkan atau memperpanjang masa simpan bahan pangan, khususnya bahan dan produk hasil perikanan yang cepat rusak. Ini berhubungan dengan rumput laut yang merupakan bahan hasil perikanan yang cepat rusak dikarenakan memiliki kadar air yang tinggi.

Namun, pembekuan juga dapat merusak bahan pangan yang memiliki kadar air yang tinggi secara mekanis. Pembekuan menyebabkan perubahan struktur karena pembentukan kristal es di dalam sel. Bahkan struktur bahan

setelah pencairan kembali kemungkinan berubah sangat besar (Fellow, 1988). Kristal es yang terbentuk selama pembekuan pada sel akan merusak dinding sel, sehingga setelah dilelehkan cairan di dalam sel sebagian keluar (Setyaningsih *et al.*, 2004). Oleh sebab itu, pembekuan yang dilakukan diduga akan menimbulkan *freezing injury* yang diharapkan dapat merusak dinding sel alga coklat *Sargassum filipendula*, sehingga senyawa bioaktif yang terkandung di dalam sel tersebut dapat dipercepat dan dimudahkan untuk tertarik keluar oleh pelarut saat maserasi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas maka perumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah suhu pembekuan mempengaruhi kerusakan sel alga coklat *Sargassum filipendula*?
2. Apakah suhu pembekuan berpengaruh terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan alga coklat *Sargassum filipendula*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini dilakukan untuk:

- Mengetahui adanya pengaruh suhu pembekuan yang berbeda terhadap kerusakan sel alga coklat *Sargassum filipendula*.
- Mengetahui adanya pengaruh suhu pembekuan yang berbeda terhadap rendemen, kadar air dan aktivitas antioksidan dari *crude* ekstrak alga coklat *Sargassum filipendula*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan kepada lembaga, institusi dan masyarakat terhadap kemajuan penelitian rumput laut di Indonesia serta dapat memanfaatkan *Sargassum filipendula* sebagai bahan baku dan sumber antioksidan alami yang potensial di masa mendatang.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Laboratorium Biologi Dasar Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang pada bulan Mei sampai Agustus 2012.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat (*Phaeophyceae*)

Alga dimasukkan dalam divisi Thallophyta karena mempunyai struktur kerangka tubuh yang tidak berdaun, berakar dan berbatang, semuanya terdiri dari thallus. Penentuan divisi dan ciri-ciri hubungan filogenetik di antara kelas alga dipakai komposisi plastida pigmen, persediaan karbohidrat dan komposisi dinding sel. Alga coklat mempunyai ukuran dan bentuk thalli beragam dari yang berukuran kecil sebagai epifit, sampai yang berukuran besar, bercabang banyak, berbentuk pita atau lembaran, cabangnya ada yang sederhana dan ada pula yang tidak bercabang (Aslan, 1991).

Setiap jenis rumput laut (alga) mempunyai pigmen khlorofil a dan beta-karoten, serta pigmen khasnya. Pada rumput laut coklat terdapat pigmen santofil, violasantin, fukosantin, flavosantin, neosantin A dan B. Keberadaan pigmen fukosantin pada rumput laut coklat menutupi pigmen lainnya dan memberikan warna coklat (Yunizal, 2004). Komposisi kimia alga coklat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Alga Coklat

Komposisi Kimia	Kadar (%)
Karbohidrat	19.06
Protein	5.53
Lemak	0.74
Air	11.71
Abu	34.57
Serat Kasar	28.39

Sumber: Yunizal (2004).

Dinding sel dari alga coklat terdiri dari komposisi polisakarida, asam alginat, alginat (polisakarida karboksilase, garam dari asam alginat) dan *fucans* (polisakarida sulfat) yang meliputi hingga 40% bagian dari berat thallus kering (Koivikko *et al.*, 2004). Jenis dan kadar mineral alga coklat *Sargassum* sp dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat *Sargassum* sp.

Jenis Mineral	Kadar (%)
Chlor	9.8 – 15.0
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: Winarno (1990).

Kelompok alga coklat memiliki bentuk yang bervariasi tetapi hampir sebagian besar jenisnya berwarna coklat atau pirang. Warna tersebut tahan atau tidak berubah walaupun alga ini mati atau kekeringan. Hanya pada beberapa jenis misalnya *Sargassum* sp. warnanya akan sedikit berubah menjadi hijau kebiru-biruan apabila mati kekeringan (Atmaja *et al.*, 1996).

Sargassum sp. Adalah salah satu jenis alga laut dari kelompok alga coklat (Phaeophyceae). Alga coklat ini biasanya dicirikan oleh 3 sifat yaitu (1) adanya pigmen coklat, yaitu fukosantin yang menutupi warna hijau dari pigmen klorofil a dan c, (2) hasil fotosintesis terhimpun dalam bentuk laminarin dan (3) adanya flagel (Tjondronegoro *et al.*, 1989).

Sargassum sp. memiliki ciri-ciri tergolong dalam bentuk thallus yang umumnya silindris atau gepeng, cabangnya rimbun menyerupai pohon di darat, bentuk daun melebar, lonjong atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara, panjangnya mencapai 7 meter dan warna thallus umumnya coklat (Aslan, 1991).

2.2 *Sargassum filipendula*

Karakteristik dari *Sargassum filipendula* diantaranya: mempunyai thallus bercabang seperti jari, merupakan tanaman perairan berwarna coklat, berukuran relatif besar, tumbuh, dan berkembang pada substrat dasar yang berbentuk simetris bilateral atau radial serta dilengkapi dengan bagian untuk pertumbuhan (Fateha, 2007). Thallus mencapai panjang 25 cm, tegak, melekat pada bagian substrat (dasar) karang, pangkal berlekuk. Cabang utama bercabang bergantian, hingga 5 cm panjangnya. Pilloid bergantian, berbentuk tangkai, 1–4 cm panjangnya, 1–3 mm lebarnya, linear–oval, sederhana, di bagian bawah dari tumbuhan, tidak jarang bercabang dua, bagian tepi bergerigi. Kriptostomata banyak, tersebar sekitar tulang daun. Gelembung berbentuk bulat, diameter 2–4 mm, bertangkai hingga sepanjang 4 mm. *Receptacles* (organ reproduksi) biasa atau bercabang dua, hingga lebar 1 mm dan panjang 6 mm (Abdel-Kareem, 2009). Alga Coklat *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 1.

Klasifikasi ilmiah *Sargassum filipendula* menurut Silva *et al.* (1996), adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisio : Phaeophyta
Kelas : Phaeophyceae
Ordo : Fucales
Famili : Sargassaceae
Genus : *Sargassum*
Spesies : *Sargassum filipendula*



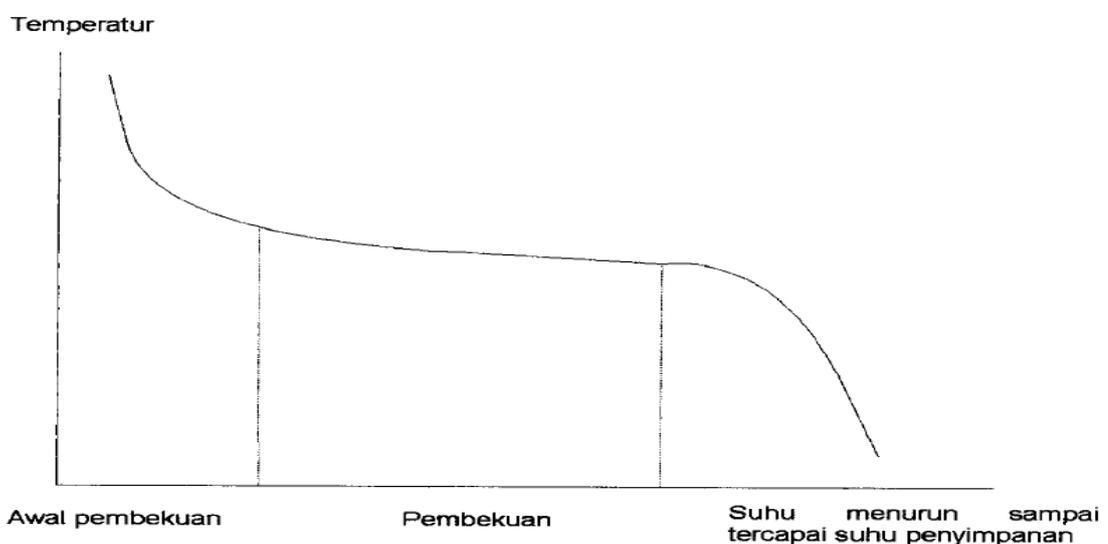
Gambar 1. Alga Coklat *Sargassum filipendula* (Guiry dan Guiry, 2011)

2.3 Freezing Injury dan Pembekuan

Sel tanaman terluka saat suhu turun di bawah tingkat kritis jenis tanaman tersebut. Luka yang terjadi pada atau di bawah titik beku (32°F , 0°C) disebut *frost injury* atau *freezing injury*. *Frost injury* dan *freezing injury* berhubungan dekat. Kerusakan *frost* terjadi pada waktu pembekuan secara radiasi; kerusakan *freeze* terjadi pada waktu pembekuan secara adveksi. Keduanya menyebabkan terbentuknya kristal es dalam jaringan tanaman, dehidrasi sel dan gangguan membran (Costello *et al.*, 2003). *Freezing injury* terjadi ketika kristal es terbentuk di dalam jaringan. Jaringan yang terluka oleh pembekuan pada umumnya kehilangan rigiditas dan menjadi lembut ketika dicairkan. Gejala *Freezing injury* yang paling umum adalah munculnya *water-soaked* atau resapan air (Shudheer dan Indira, 2007).

Secara umum, tanaman daerah iklim sedang tidak peka terhadap terjadinya gangguan karena pendinginan pada temperatur di atas 0°C dan cenderung memperlihatkan tanda-tanda kerusakan hanya sesudah es terbentuk di dalam jaringannya. Sebagai contoh, telah diperlihatkan bahwa fotosintesis pada beberapa spesies pohon tidak terhenti sama sekali sampai es ekstraseluler terbentuk (pada umumnya pada -3 sampai -5°C) dan bahkan kemudian perhentian awal aktivitas mungkin disebabkan oleh pengaruh fisik murni-terjadinya pemblokiran difusi CO_2 oleh es (Fitter dan Hay, 1991).

Proses pelepasan panas atau penurunan suhu selama pembekuan, berlangsung dalam tiga tahap (Gambar 2). Tahap pertama, penurunan suhu yang berlangsung cepat hingga sedikit di bawah 0°C , yakni saat air mulai membeku. Tahap kedua, yakni tahap penahanan panas. Artinya pelepasan panas dari bahan berlangsung lambat dan sukar, berhubung bagian terbesar dari air bahan harus diubah menjadi kristal es. Hal ini berlangsung pada wilayah suhu antara 0°C sampai -5°C . tahap ketiga, yakni pembekuan selanjutnya air yang tersisa mencapai suhu operasi penyimpanan bekunya (Heldman dan Taylor, 1997). Grafik penurunan suhu selama pembekuan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik Penurunan Suhu Selama Pembekuan (Heldman dan Taylor, 1997)

Proses kristalisasi es memiliki dua tahap: pembentukan inti (nukleus) dan pertumbuhan berikutnya dari inti ke ukuran kristal yang khusus, dengan ukuran akhir kristal menjadikan sebuah kegunaan dari derajat pengintian dan pertumbuhan kristal dan juga suhu akhir. Pengintian adalah tahap penentu pertama dalam pembentukan kristal, dimulai dengan tumbukan (tubrukan) antar molekul oleh karena gerakan acaknya dalam larutan, yang mengarah pada pembentukan kelompok-kelompok pra-inti. Jika populasi dari kelompok tersebut meningkat, kelompok tersebut mulai berasosiasi kebentuk embrio. Beberapa embrio, melalui tubrukan (tumbukan) lanjutan, bertumbuh menjadi inti (kristalit kecil sekali dari ukuran terkecil mampu berdiri sendiri), berperan pada pembentukan kristal ukuran makroskopis dalam proses yang idiistilahkan sebagai pertumbuhan kristal (Sun, 2012).

Ketika air dibekukan pada tekanan atmosfer, air memuai mendekati 9%. Perubahan derajat pemuaiian menurut Sun (2012), berhubungan dengan faktor yang mengikutinya yaitu:

- Kandungan cairan, dengan semakin tinggi kandungan cairan menghasilkan perubahan volume yang semakin besar.
- Susunan sel, yaitu, ruang udara antar intersel, yang mana umumnya pada jaringan tanaman. Pada bagian tersebut dapat memungkinkan menampung pertumbuhan kristal, dan dengan demikian meminimalkan perubahan ukuran luar sampel. Sebagai contoh, strawberi utuh bertambah volume sebesar 3%, sebaliknya strawbery yang digilas bertambah volume sebesar 8.2%, ketika keduanya dibekukan pada suhu -20°C .
- Kosentrasi bahan terlarut, kosentrasi yang tinggi menurunkan titik beku dan tidak membeku atau memuai pada suhu pembekuan komersial.

- Suhu alat pembekuan, yang mana menentukan jumlah air yang tidak beku dan derajat pemuaiannya.
- Komponen pembentuk kristal, termasuk es, lemak, dan bahan terlarut, yang mana mengkerut ketika didinginkan; ini menurunkan volume bahan pangan.

Laju pembekuan menurut King (1971), dibagi ke dalam 3 golongan yaitu,

1) Laju pembekuan lambat, jika waktu pembekuan adalah 30 menit atau lebih per sentimeter bahan yang dibekukan, 2) Laju pembekuan sedang, jika waktu pembekuan adalah 20–30 menit per sentimeter bahan yang dibekukan, dan 3) Laju pembekuan cepat, jika waktu pembekuan adalah kurang dari 20 menit per sentimeter bahan yang dibekukan.

Pembekuan lambat disebut juga dengan pembekuan tajam (*sharp freezing*). Di dalam metode ini, bahan ditempatkan dalam ruang pembekuan pada suhu antara -4°C hingga -29°C . Pembekuan membutuhkan waktu 3 hingga 72 jam di bawah kondisi yang demikian (Srilakshmi, 2005). Kemampuan jaringan bertahan hidup lebih baik pada pembekuan cepat dibandingkan dengan pembekuan lambat karena air tidak memiliki waktu untuk bermigrasi membentuk kristal besar (Vaclavik dan Christian, 2008). Pembekuan lambat menghasilkan kristal-kristal es di ruang antar sel dan kristal tersebut berukuran besar. Kristal-kristal es tersebut dapat mengakibatkan dehidrasi dan kerusakan sel, sehingga jaringan menjadi lunak setelah bahan dilelehkan (Fellow, 1988).

2.4 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga reaksi radikal bebas tersebut dapat terhambat. Antioksidan juga dapat diartikan sebagai bahan atau senyawa yang dapat menghambat atau mencegah terjadinya oksidasi pada substrat atau

bahan yang dapat teroksidasi, walaupun memiliki jumlah yang sedikit dalam makanan atau tubuh jika dibandingkan dengan substrat yang akan teroksidasi. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul yang kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi 2007).

Senyawa-senyawa antioksidan yang berkaitan dengan fungsinya menurut Kochar dan Tossel dalam Hudson (1990), dapat diklasifikasikan dalam 5 tipe antioksidan yaitu:

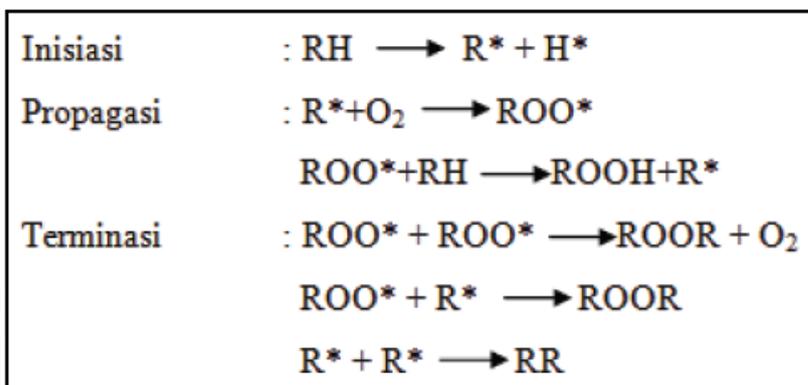
- 1) *Primary Antioxidant* yaitu senyawa-senyawa, terutama senyawa-senyawa fenol yang mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak. Dalam hal ini memberikan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksi senyawa fenol sehingga terbentuk senyawa yang stabil. Senyawa antioksidan yang termasuk kelompok ini misalnya: BHA, BHT, TBHQ, PG dan tokoferol. Fungsi paling efektif dari antioksidan dalam menghambat terjadinya oksidasi menurut Hudson (1990) adalah dengan menghentikan reaksi berantai dari radikal-radikal bebas (*primary antioxidant*).
- 2) *Oxygen Scavengers* yaitu senyawa-senyawa yang berperan sebagai pengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Dalam hal ini, senyawa tersebut akan mengadakan reaksi dengan oksigen yang berada dalam sistem sehingga jumlah oksigen akan berkurang. Contoh dari senyawa-senyawa kelompok ini adalah vitamin C (asam askorbat) askorbil palmitat, asam eritorbat dan sulfit.

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

Mekanisme kerja antioksidan pada umumnya dapat dipahami setelah mekanisme proses oksidasi lemak dalam bahan makanan atau pada sistem biologis dipahami dengan baik. Oksidasi lemak terdiri dari 3 tahapan utama, yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat hilangnya satu atom hidrogen. Pada tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi. Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang asam lemak baru (Winarsi 2007). Pada tahap terminasi terjadi reaksi antara radikal bebas membentuk kompleks nonradikal. Reaksi umum oksidasi asam lemak dapat dilihat pada Gambar 3.

Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi menurut Ketaren (2005), dapat disebabkan oleh 4 macam mekanisme reaksi yaitu (1) pelepasan

hydrogen dari antioksidan, (2) pelepasan elektron dari antioksidan, (3) addisi lemak ke dalam cincin aromatik dari antioksidan dan (4) pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan.



Gambar 3. Reaksi Umum Oksidasi Lemak (Siagian, 2002).

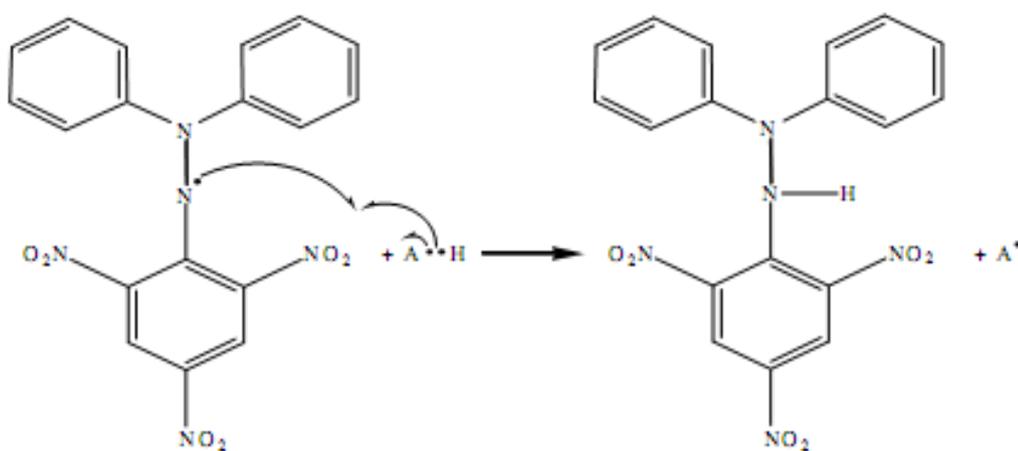
Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberi atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipid. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju antioksidan dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai oksidasi dengan mengubah radikal lipida ke bentuk lebih stabil. Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (Gordon, 1993).

2.5 Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan (DPPH)

Radikal bebas yang umumnya digunakan sebagai model dalam penelitian antioksidan atau peredam radikal bebas adalah 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat, dan mudah untuk *screening* aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa, selain itu mereka ini terbukti akurat dan praktis (Pratimasari, 2009). Radikal DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada λ_{maks} 517 nm dan berwarna ungu gelap (Asih, 2012). Radikal bebas DPPH bersifat peka terhadap cahaya, oksigen dan pH, tetapi bersifat stabil dalam bentuk radikal sehingga memungkinkan untuk dilakukan pengukuran antioksidan (Molyneux 2004).

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. Perubahan ini dapat diukur secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan (Suratmo, 2009).

Antioksidan dapat menonaktifkan (menghambat atau meredam) radikal bebas dengan dua mekanisme utama: dengan reduksi melewati transfer elektron atau dengan transfer atom hidrogen yang mungkin juga terjadi secara paralel (Huang *et al.*, 2005). Reaksi penangkapan radikal bebas DPPH dengan antioksidan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi Penangkapan Radikal Bebas DPPH dengan Antioksidan (Widono *et al.*, 2003)

Berdasarkan reaksi tersebut, senyawa antioksidan (AH) melepas atom hidrogen menjadi radikal senyawa antioksidan (A^*). DPPH merupakan radikal bebas yang direaksikan dengan senyawa antioksidan dan menjadi DPPH bentuk tereduksi ($DPPH_2$). Mekanisme penangkapan radikal DPPH, yaitu melalui donor atom H dari senyawa antioksidan yang menyebabkan peredaman warna radikal pikrilhidrazil yang berwarna ungu menjadi pikrilhidrazil berwarna kuning yang nonradikal (Molyneux, 2004).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu cara untuk memisahkan campuran beberapa zat menjadi komponen-komponen yang terpisah (Winarno *et al.*, 1973). Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu. Pemikiran metode ekstraksi senyawa bukan atom dipergunakan oleh beberapa faktor yaitu sifat jaringan tanaman, sifat kandungan zat aktif dan kelarutan dalam pelarut yang digunakan (Utami *et al.*, 2009).

Metode ekstraksi yang digunakan tergantung dari beberapa faktor, antara lain tujuan ekstraksi, skala ekstraksi, sifat-sifat komponen yang akan diekstrak

dan sifat-sifat pelarut yang digunakan. Metode umum ekstraksi yang dapat dilakukan terdiri dari ekstraksi dengan pelarut, destilasi, *supercritical fluid extraction* (SFE), pengepresan mekanik dan sublimasi. Diantara metode-metode yang telah dilakukan, metode yang banyak digunakan adalah destilasi dan ekstraksi menggunakan pelarut (Houghton dan Raman, 1998). Ekstraksi menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueous phase* dilakukan dengan menggunakan air, sedangkan *organic phase* menggunakan pelarut organik (Winarno *et al.*, 1973).

Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut non polar (n-heksan) lalu pelarut yang kepolarannya menengah (diklor metan atau etil asetat) kemudian pelarut yang bersifat polar (metanol atau etanol). Prinsip dasar ekstraksi adalah berdasarkan kelarutan, untuk memisahkan zat terlarut yang diinginkan atau menghilangkan komponen zat terlarut yang tidak diinginkan dari fase padat, maka fase padat dikontakkan dengan fase cair. Pada kontak dua fase tersebut, zat terlarut terdifusi dari fase padat ke fase cair sehingga terjadi pemisahan dari komponen padat (Utami *et al.*, 2009).

2.7 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 beberapa bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 3.

Sifat penting lainnya dari pelarut adalah kecenderungan membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen adalah harga tetapan dielektriknya dalam hubungan dengan momen dwi kutubnya. Terbentuknya sejumlah besar ikatan hidrogen menyebabkan tetapan dielektriknya yang sangat tinggi. Dalam setiap larutan, pelarut memainkan peranan yang sangat penting. Molekul-molekul pelarut saling mempengaruhi dengan molekul-molekul bukan air. Saling pengaruh ini disebut pengaruh pelarutan atau *salvation effect*. Kadang-kadang pengaruh ini sangat lemah, tetapi dalam hal ini pelarutan dapat menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks yang terikat secara kimia (Day dan Underwood, 1999).

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).

Etanol termasuk golongan alkohol yang merupakan senyawa organik yang mengandung gugus hidroksil dengan rumus umum : R-OH atau $C_nH_{2n+1}OH$. Alkohol dapat dianggap sebagai turunan alkana, dimana atom H diganti oleh gugus hidroksil. Penamaan jenis alkohol tergantung dari jumlah n pada alkilnya, jika n = 1 diberi nama metanol dan bila n=2 dikenal dengan nama etanol yang merupakan kependekan dari etil alkohol. Etanol dengan formula

C₂H₅OH merupakan larutan jernih, tidak berwarna, volatil dengan bau khas, mendidih pada suhu 78,5°C, larut dalam air, eter, kloroform dan aseton (Basri, 1996). Sifat-sifat fisik dan kimia etanol dapat dilihat pada Tabel 4.

Etanol biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif yang bersifat antioksidan dan antibakteri pada suatu bahan. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa pelarut etanol lebih baik daripada air, metanol maupun pelarut lain dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa *et al.*, 1999). Meminum atau menghisap methanol dapat menimbulkan kebutaan bahkan kematian. Terdapat laporan yang menjelaskan bahwa terjadi kematian yang disebabkan meminum methanol kurang dari 30 ml (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Tabel 4. Sifat-Sifat Fisik dan Kimia Etanol

No.	Karakteristik	Etanol
1.	Nama lain	Etanol, metil karbinol, etil alkohol, ansol
2.	Rumus bangun	C ₂ H ₅ OH $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	Mudah menguap, berbau khas, tidak beresidu
4.	Berat molekul	46,7
5.	Titik leleh	-117,3 sampai -112°C
6.	Titik didih	78,4°C
7.	Berat jenis	6,6 lbs/gal pada 20°C
8.	Kelarutan	Dalam air, eter, kloroform dan metil alkohol
9.	Densitas	1,59

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

2.8 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Visible adalah alat yang umum digunakan di laboratorium kimia. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia semi kualitatif. Prinsip kerja

spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia tertentu di daerah ultra lembayung (ultra violet) dan sinar tampak (*visible*) (Huda, 2001).

Spektrofotometri ultraviolet-tampak adalah salah satu teknik analisis yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dengan panjang gelombang (λ) 190-380 nm dan sinar tampak pada panjang gelombang (λ) 380-780 nm. Serapan cahaya oleh suatu molekul dalam daerah spektrum UV-vis sangat bergantung pada struktur elektronik dari molekul (Hardjono, 1991).

Sesuai dengan namanya, spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari, spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer mengukur intensitas sinar. Suatu spektrofotometer tersusun dari sumber spektrum yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk sampel serta blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dengan blanko tersebut (Khopkar, 1990). Interval panjang gelombang di daerah sinar tampak dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Interval Panjang Gelombang di Daerah Sinar Tampak

Pajang Gelombang (nm)	Warna Yang Dihasilkan	Warna Komplemen
400-435	Violet	Kuning Hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau Biru	Orange
490-500	Biru Hijau	Merah
500-560	Hijau	Merah Violet
560-580	Kuning Hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Orange	Hijau Biru
610-680	Merah	Biru Hijau
680-700	Merah Violet	Hijau

Keterangan: Sampel yang tampak berwarna kuning berarti menyerap sinar violet dan biru.

Sumber: Huda (2001).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain timbangan digital, Electrolux frizer EMC 5200 WA – XE, *rotary vacuum evaporator (rotavapor)*, *shaker*, spektrofotometer UV-Vis, erlenmeyer 500 ml, *beaker glass* 600 ml, spatula, gelas ukur 100 ml, corong kaca, pipet volume, botol plastik, botol vial, bola hisap, gunting, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas obyek, gelas penutup, pinset, mikroskop cahaya Olympus CX31, kamera digital, termometer, nampan, dan *thermocouple*.

3.1.2 Bahan

Bahan uji yang digunakan adalah alga coklat *Sargassum filipendula* segar yang diperoleh dari perairan pantai Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan yaitu pelarut etanol teknis (96%), aquades, larutan safranin 10%, gliserin, cutex, wortel, larutan uji fitokimia, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), vitamin C (Merck.), kain kasa, kertas saring, plastik, *aluminium foil* dan kertas label.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Metode deskriptif dapat digunakan untuk memberikan, menggambarkan, menguraikan, dan menjelaskan fenomena objek penelitian. Metode ini menjelaskan data atau objek secara alami, objektif, dan apa adanya (faktual) (Junaiyah dan Arifin, 2010). Sifat-sifat metode deskriptif adalah sebagai berikut:

1. Menjelaskan setiap langkah penyelidikan dengan teliti dan terperinci, baik mengenai dasar-dasar metodologinya maupun mengenai detail teknis secara khusus.
2. Menjelaskan prosedur pengumpulan data, serta pengawasan dan penilaian terhadap data tersebut.
3. Memberi alasan yang kuat mengapa dalam metode deskriptif tersebut penyidik menggunakan teknik tertentu dan bukan teknik lainnya.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang digunakan adalah variabel terikat dan variabel bebas. Variabel terikatnya (variabel yang menjadi titik pusat penelitian) adalah aktivitas antioksidan dari *crude* ekstrak alga coklat *Sargassum filipendula*. Variabel bebas (variabel yang diselidiki pengaruhnya terhadap variabel terikat) adalah suhu pembekuan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembekuan Alga Coklat *Sargassum filipendula*

Alga coklat *Sargassum filipendula* segar dicuci dan dihancurkan, diambil sebanyak 190 gram, dimasukkan ke dalam wadah berbentuk tabung. Wadah sampel dapat dilihat pada Gambar 5. Sampel diberikan perlakuan suhu sebagai berikut:

Sampel A : dibekukan dalam freezer dengan suhu rata-rata -18°C

Sampel B : dibekukan dalam freezer dengan suhu rata-rata -27°C

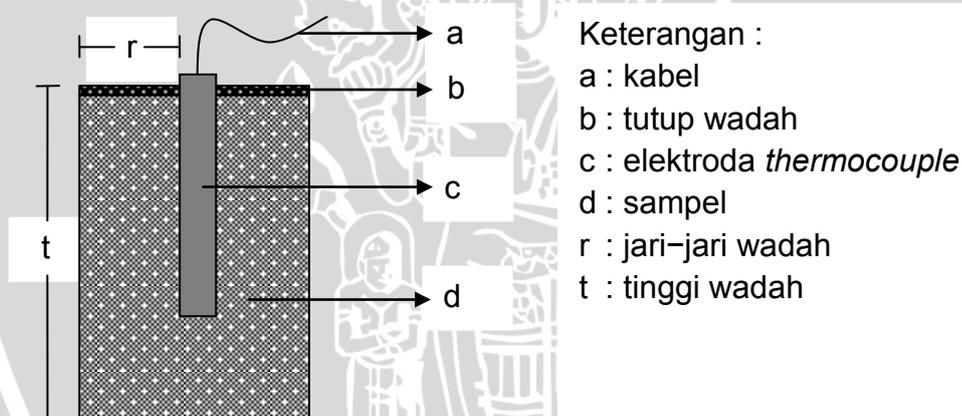
Sampel C : dibekukan dalam freezer dengan suhu rata-rata -30°C

Sampel K : kontrol (tanpa perlakuan pembekuan)

Penentuan suhu pembekuan yang diberikan berdasarkan pada suhu penyimpanan produk pangan (terutama produk perikanan) dalam *cold storage*

secara komersial dan pada suhu -18°C air dalam bahan pangan hampir 90% berubah menjadi es (Johnston *et al.*, 1994; Thomas, 2006).

Sampel A, B dan C dihitung waktu pembekuan tiap 5 menit hingga suhu pusat sampel di dalam wadah mencapai suhu $\geq -18^{\circ}\text{C}$ dan dihitung laju pembekuannya. Laju pembekuan berdasarkan Lembaga Refrigerasi Internasional ditentukan dengan menggunakan konsep TAR (*Thermal Arrest Time*) yaitu waktu yang dibutuhkan oleh titik yang paling lambat membeku pada produk untuk menurunkan suhu dari 0°C sampai -5°C (Heldman dan Singh, 1981). Sampel *dithawing* pada suhu ruang dengan air mengalir. Keseluruhan sampel dibuat preparat mikroskopis dan diamati di bawah mikroskop untuk mengamati kerusakan sel yang terjadi akibat pembekuan lambat.



Gambar 5. Wadah Sampel

3.4.2 Pembuatan Preparat Mikroskopis

Potongan sampel diambil dengan pinset kecil, dipindahkan pada larutan aquades (pencucian), dijepit dengan wortel, diiris tipis dengan mikrotom, dicuci kembali dengan aquades, dan direndam dalam larutan safranin $10\% \pm 5$ menit. Sampel dicuci dengan aquades selama ± 5 menit, diletakkan pada gelas objek dan diberi sedikit gliserin, ditutup dengan gelas penutup, dan diberi cutex di sekeliling gelas penutup. Irisan sampel diamati di bawah mikroskop cahaya

Olympus CX31 dengan perbesaran 40 kali (40X) dan 100 kali (100X) dan diambil gambar foto hasil pengamatan.

3.4.3 Ekstrak Etanol Alga Coklat *Sargassum filipendula*

Sampel hasil *thawing* diekstraksi dalam *beaker glass*. Ekstraksi alga coklat *Sargassum fillipendula* didasarkan pada hasil penelitian Suryaningrum *et al.* (2006), yang telah dimodifikasi. Keseluruhan sampel dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 5 jam yang bersamaan dengan *dishaker* menggunakan *waterbath shaker* pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Perbandingan antara sampel dan pelarut yaitu 1:3 b/v. Setelah dimaserasi, sampel disaring menggunakan kain kasa dan dilanjutkan dengan kertas saring. Hasil penyaringan (filtrat) di dievaporasi pelarutnya dengan *rotavapor* pada kondisi vakum suhu $40^{\circ}\text{C} \pm 2$ jam untuk memisahkan antara pelarut dengan sampel sehingga diperoleh *crude* ekstrak etanol, dibungkus dengan aluminium foil. *Crude* ekstrak etanol dihitung nilai rendemen, kadar air, uji aktivitas antioksidan dan identifikasi fitokimianya.

3.4.4 Parameter Uji

3.4.4.1 Rendemen

Rendemen yang dihasilkan ditentukan berdasarkan perbandingan relatif antara berat *crude* ekstrak *Sargassum filipendula* yang dihasilkan dengan berat sampel awal. Hal ini dapat diformulasikan dengan rumusan sebagai berikut :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak (gram)}}{\text{Berat Sampel Awal (gram)}} \times 100\%$$

3.4.4.2 Kadar Air

Uji kadar air yang dilakukan berdasarkan metode Thermogravimetri (Sudarmadji *et al.*, 1997) yaitu dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105–110°C selama 3 jam atau didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Prosedurnya yaitu sampel ditimbang 2 gram dimasukkan dalam botol timbang yang juga telah diukur beratnya lalu dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Ditimbang berat akhir sampel setelah dikeringkan lalu dihitung persen kadar air dengan rumus :

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

Keterangan :

A = Berat botol timbang (gram)

B = Berat sampel (gram)

C = Berat akhir (Botol timbang + sampel) (gram)

3.4.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan (DPPH)

Analisis aktivitas antioksidan *crude* ekstrak *Sargassum filipendula* menangkap radikal bebas diukur dengan DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dilakukan berdasarkan metode Blois *et al.*(1958) dalam Vijayabaskar dan Shiyamala (2012), yang telah dimodifikasi. 1ml larutan DPPH 0.1mM dalam etanol dimasukkan ke dalam 3ml larutan ekstrak (konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm), dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Selanjutnya absorbansinya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm, dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C (asam askorbat) (konsentrasi 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm). Persentase penangkapan oleh 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 $y=bx + a$ (regresi linear) 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).

3.4.4.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada *crude* ekstrak *Sargassum filipendula*. Uji fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, fenol, dan flavonoid. 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 diuji adanya senyawa alkaloid dengan dua pereaksi alkaloid yaitu, pereaksi Meyer dan pereaksi Wagner. Hasil uji dinyatakan positif bila dengan pereaksi Meyer terbentuk endapan putih kekuningan dan dengan pereaksi Wagner terbentuk endapan coklat.

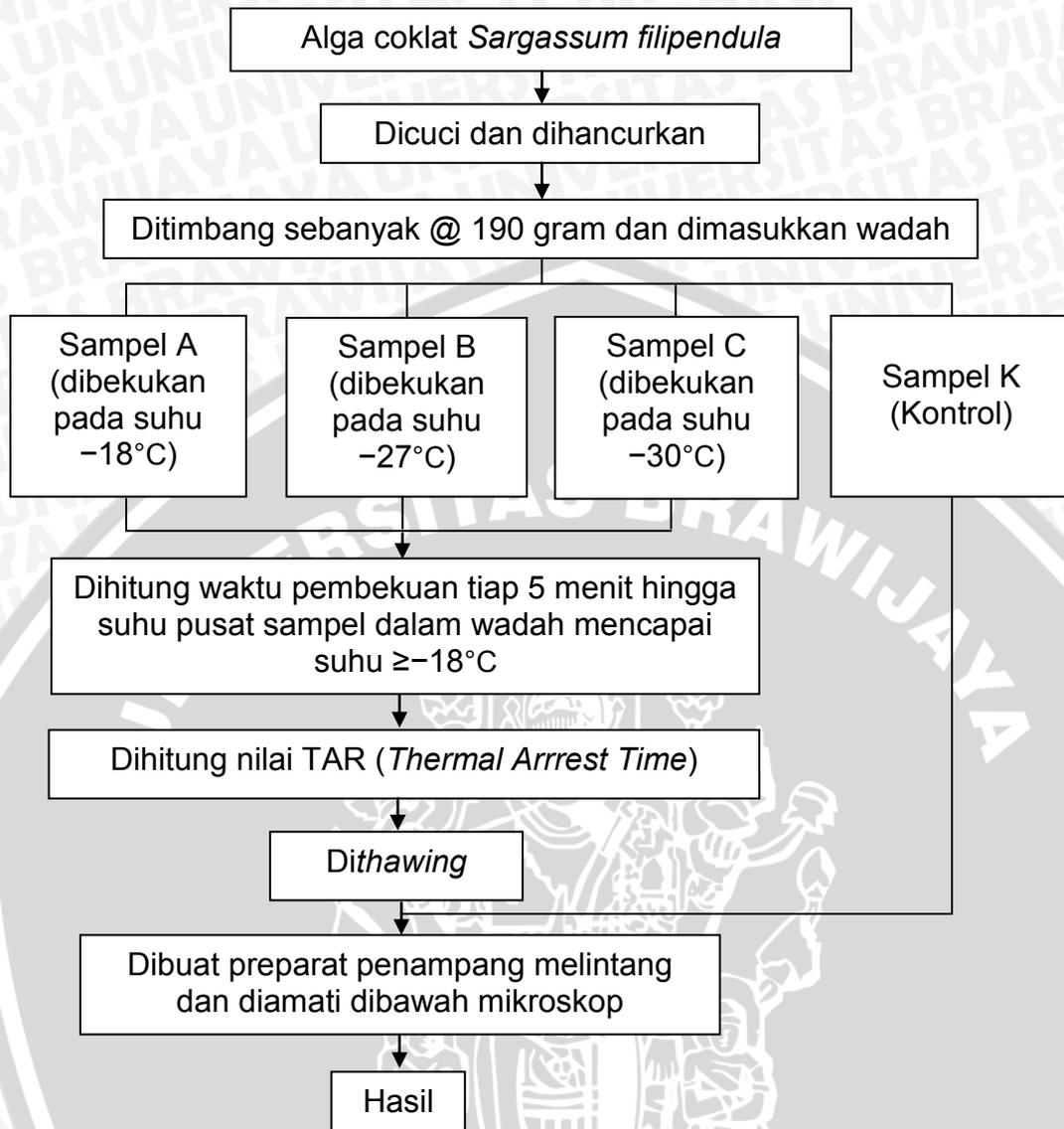
Pereaksi Meyer dibuat dengan cara menambahkan 1 ml HgCl₂ dengan 0,5 gram KI lalu dilarutkan dan diencerkan dengan aquadest menjadi 100 ml dengan labu takar. Pereaksi ini tidak berwarna. Pereaksi Wagner dibuat dengan cara 10 ml aquadest dipipet kemudian ditambahkan 2,5 gram Iodin dan 2 gram Kalium Iodida lalu dilarutkan dan diencerkan dengan akuades menjadi 200 ml dalam labu takar. Pereaksi ini berwarna coklat.

- b. **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.
- c. **Uji Fenol:** Sebanyak 20 ml etanol 96% dimasukan 1 gram sampel ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Senyawa fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau hijau biru.

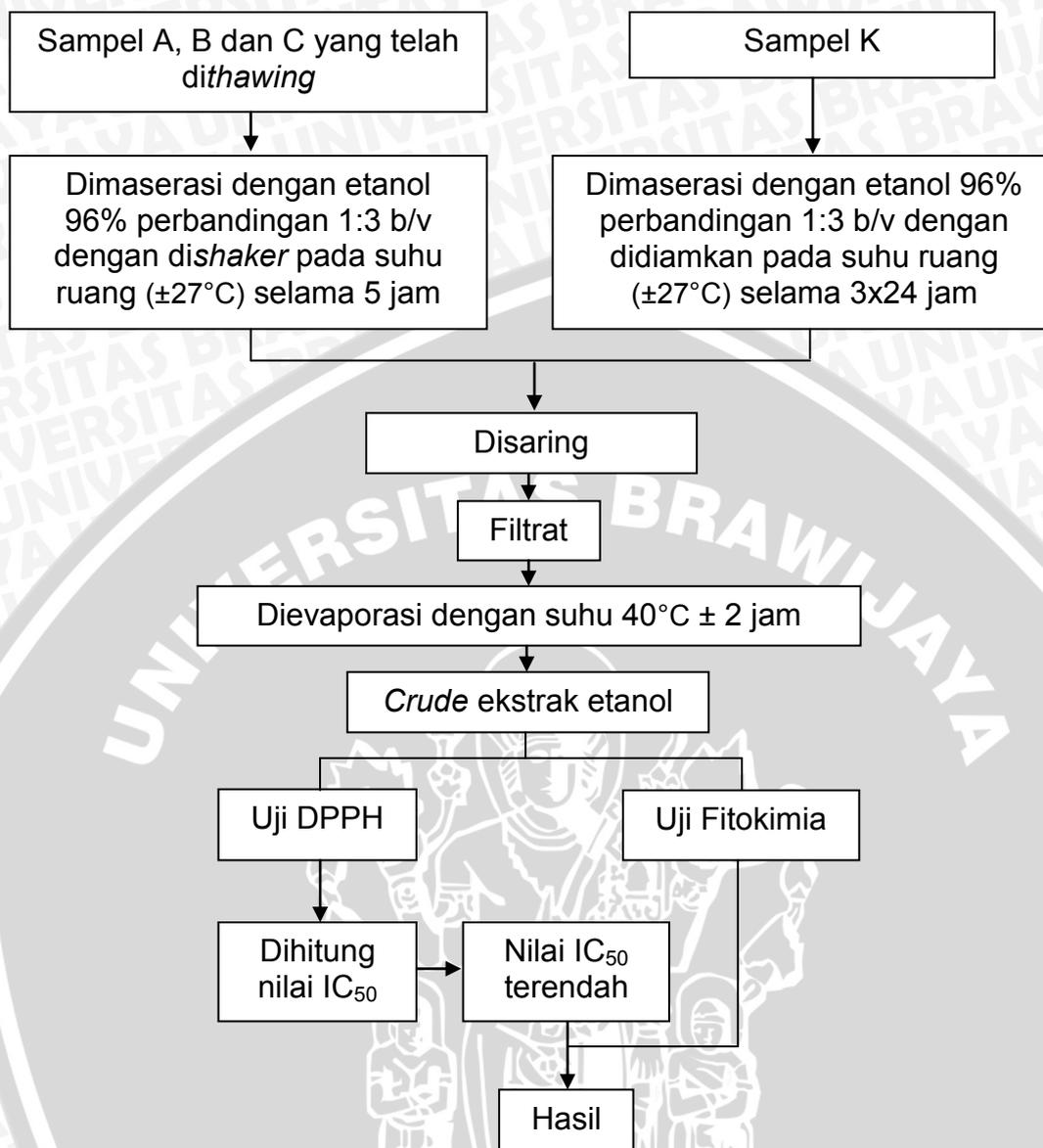
3.5 Skema Kerja Penelitian

Skema kerja pembekuan alga coklat *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 6. Sedangkan skema kerja ekstrak etanol alga coklat *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 7.





Gambar 6. Skema Kerja Pembekuan Alga Coklat *Sargassum filipendula*

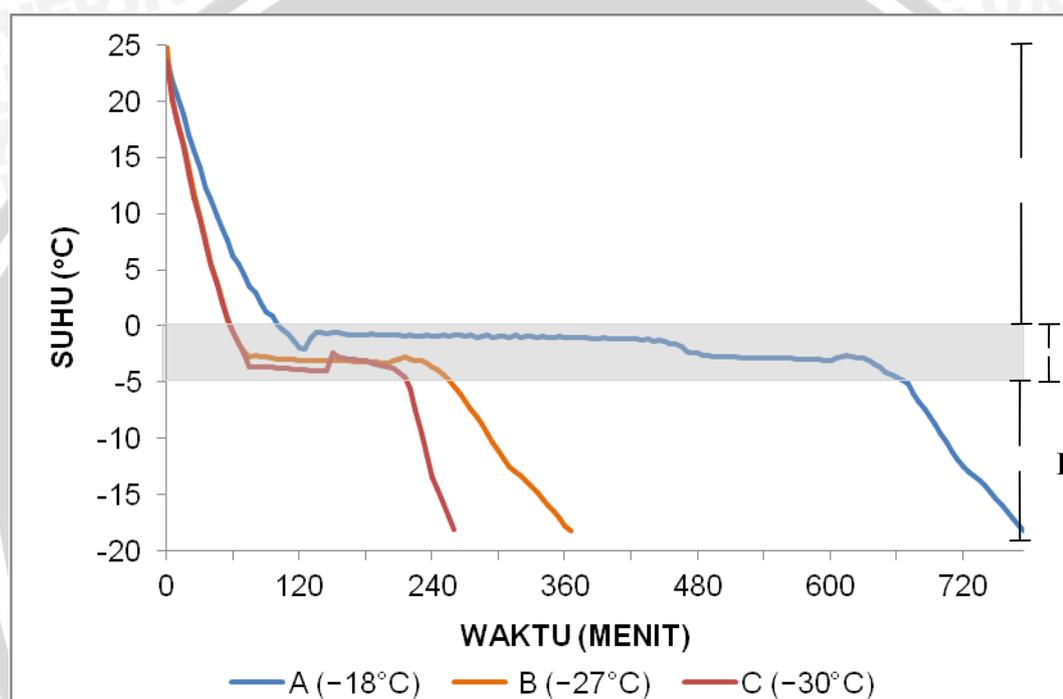


Gambar 7. Skema Kerja Ekstrak Etanol Alga Coklat *Sargassum filipendula*

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Pembekuan Alga Coklat *Sargassum filipendula*

Karakteristik pembekuan meliputi grafik penurunan suhu selama proses pembekuan dan grafik perbandingan laju pembekuan. Grafik penurunan suhu selama proses pembekuan dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik Penurunan Suhu Selama Proses Pembekuan. I adalah daerah Tahap Pertama; II adalah daerah Tahap Kedua (*critical zone*) atau disebut daerah TAR (*Thermal Arrest Time*); dan III adalah daerah Tahap Ketiga.

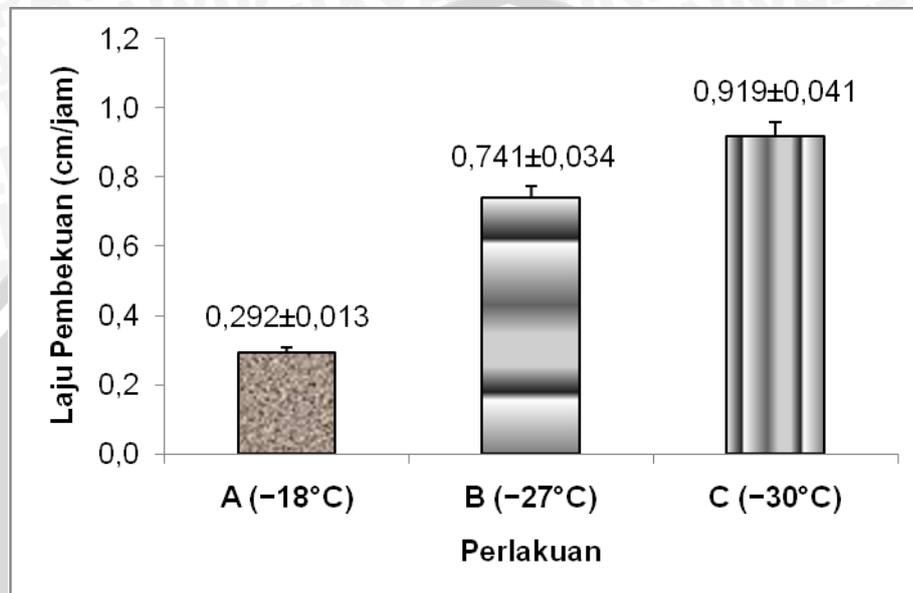
Gambar 8 menunjukkan bahwa penurunan suhu selama proses pembekuan sampel dibagi tiga tahap. Pada tahap pertama (I), suhu sampel diturunkan melalui proses pendinginan hingga mencapai titik bekunya. Posisi titik beku sampel keseluruhan perlakuan didapati berada di bawah suhu 0°C atau di bawah titik beku air murni. Hal tersebut dikarenakan air dalam sampel merupakan suatu larutan yang sangat dipengaruhi oleh sifat koligatif larutan

tersebut. Saat proses pembekuan larutan, sebagian air yang berperan sebagai pelarut membeku dan konsentrasi bahan terlarut (solut) menjadi meningkat dan akibatnya titik beku akan menurun. Profil suhu pada tahap ini relatif mengalami penurunan dengan cepat (curam) dan pada interval tersebut sampel melepas panas sensibel untuk menurunkan suhunya.

Pada tahap kedua (**II**), merupakan daerah kritis (*critical zone*) atau disebut daerah TAR (*Thermal Arrest Time*), di mana merupakan daerah yang sangat menentukan kerusakan jaringan sampel. Rentang lama waktu TAR dari panjang ke pendek yang dibutuhkan untuk menurunkan suhu sampel dari 0°C hingga -5°C secara berturut-turut adalah A (-18°C)>B (-27°C)>C (-30°C). Perbedaan suhu perlakuan pembekuan yang telah ditetapkan, yaitu A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) diduga mempengaruhi durasi waktu TAR, bahwa semakin rendah suhu perlakuan pembekuan yang digunakan maka semakin singkat waktu TAR begitu juga sebaliknya, semakin tinggi suhu perlakuan pembekuan yang digunakan maka semakin lama waktu TAR. Dapat dikatakan bahwa hubungan suhu perlakuan pembekuan dan waktu TAR adalah berbanding lurus.

Pada tahap kedua, panas laten dalam sampel dilepaskan bersamaan dengan pembentukan air dalam bahan menjadi kristal es (perubahan cair ke padat), yang mengakibatkan perubahan ini berlangsung pada suhu konstan hingga penetrasi suhu mencapai pusat sampel. Menurut JICA (2008), tahap kedua disebut periode penahanan panas karena terjadi perubahan suhu sangat sedikit selama tahap ini. Kristal es terbentuk dari permukaan sampel dalam wadah hingga pusat sampel, kemudian sampel akan menurun suhunya memasuki tahap ketiga (**III**) hingga mencapai suhu yang diinginkan, yaitu hingga $\pm -18^{\circ}\text{C}$.

Hasil dari perlakuan pembekuan yang berbeda menghasilkan grafik penurunan suhu yang berbeda. Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan cepat lambatnya laju pembekuan. Perbandingan laju pembekuan dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik Perbandingan Laju Pembekuan. Batang menunjukkan nilai Rata-Rata±Standar Deviasi (SD) dengan 3 kali ulangan.

Urutan laju pembekuan hasil perhitungan dari TAR adalah A (-18°C)<B (-27°C)<C (-30°C). Hubungan antara laju pembekuan dan lama waktu TAR adalah berbanding terbalik, artinya jika semakin lama waktu TAR maka semakin lambat laju pembekuannya, jika semakin singkat waktu TAR maka semakin cepat laju pembekuannya. Perbedaan laju pembekuan juga disebabkan suhu akhir plat pembeku yang ditetapkan berbeda, semakin rendah suhu akhir plat pembeku maka semakin cepat penurunan suhu mencapai suhu akhir, serta perpindahan panas dan laju pembekuan juga akan semakin cepat.

Berdasarkan pembagian laju pembekuan oleh King (1971), laju pembekuan pada keseluruhan perlakuan dengan menggunakan lempeng (plat) sentuh pembeku adalah termasuk ke dalam laju pembekuan lambat, yaitu jika

waktu pembekuan adalah 30 menit atau lebih per sentimeter bahan yang dibekukan atau kurang dari dua centimeter per jam (<2 cm/jam). Laju pembekuan lambat menurut Desrosier (1988) akan menghasilkan ukuran kristal es yang besar yang dapat menyebabkan rusaknya dinding sel sampel, metabolisme terganggu dan memberi kesempatan terjadinya pertumbuhan kristal.

Beberapa faktor teknis yang diduga mempengaruhi laju pembekuan menurut Afrianto dan Liviawaty (1989) yaitu cara perambatan panas; perbedaan suhu awal produk dan suhu yang diinginkan; ukuran produk; dan wadah yang digunakan. Setiap teknik pembekuan memiliki cara perambatan panas yang khas sehingga akan mempengaruhi kecepatan pembekuan. Pada penelitian ini, alat pembekuan yang digunakan adalah alat pembekuan lempeng (plat) sentuh (*plate (contact) freezer*), dimana perambatan panas terjadi secara konveksi dengan distribusi suhu yang berbeda. Bagian yang mengalami penurunan suhu paling awal adalah pada bagian yang paling dekat dengan plat pembeku. Sedangkan bagian yang paling lama melepas kalor atau yang paling lama mengalami penurunan suhu dianggap sebagai titik pusat panas.

Perbedaan antara suhu sampel awal dengan suhu yang diinginkan juga mempengaruhi laju pembekuan. Semakin besar perbedaan suhu, semakin banyak waktu yang diperlukan dalam proses pembekuan, karena proses pembekuan merupakan proses pemindahan panas.

Ukuran sampel yang semakin besar menyebabkan semakin banyak waktu yang dibutuhkan untuk mencapai titik bekunya. Berbeda dengan ketebalan sampel dalam wadah, jika semakin tebal sampel maka penetrasi panas hingga ke titik pusat wadah membutuhkan waktu yang semakin lama. Sifat sampel yang memiliki kandungan zat terlarut menurunkan titik beku atau titik kristalisasi air.

Jenis wadah yang digunakan. Wadah yang terbuat dari bahan yang kurang baik untuk menghantarkan panas (insulator) mampu menghalangi terjadinya kontak dengan udara di luar sehingga suhu di dalam wadah menjadi lebih lambat menurun dan sampel lebih lambat membeku karena penetrasi panas oleh plat pembeku dan panas yang dilepaskan oleh sampel terhalang oleh wadah.

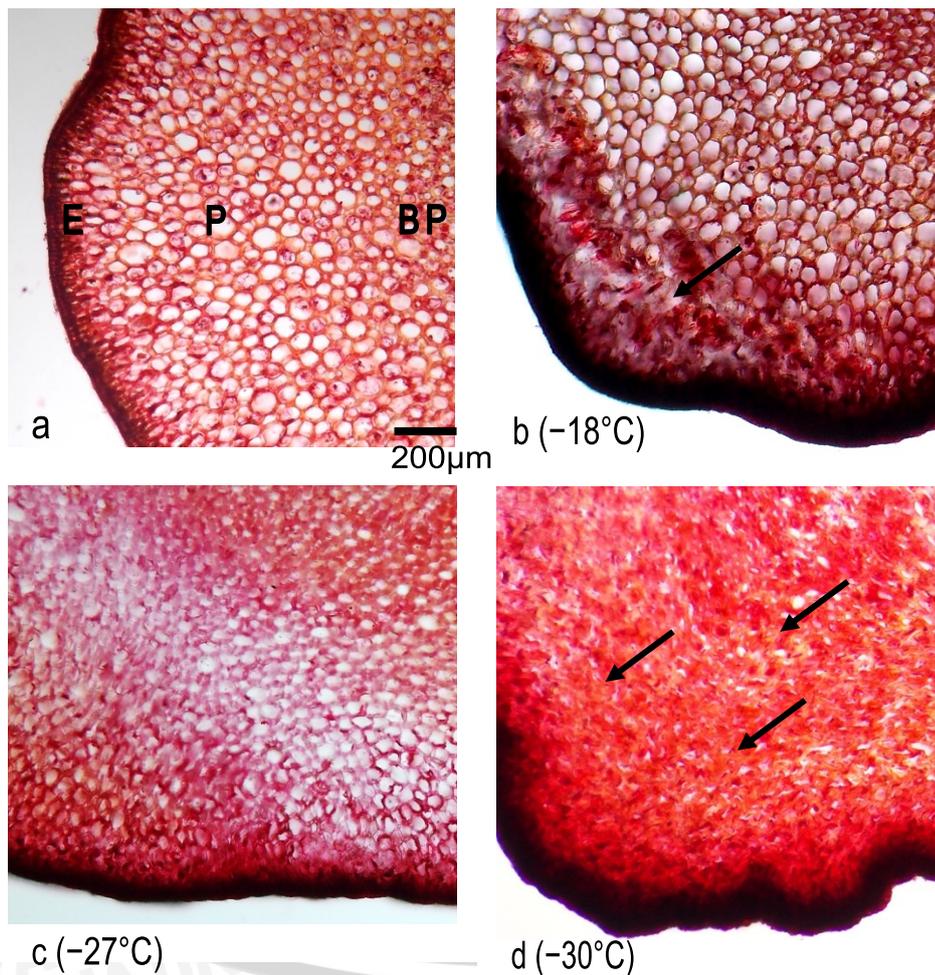
4.2 Pengamatan Mikroskopis Alga Coklat *Sargassum filipendula*

Sampel yang telah diberi perlakuan pembekuan yang berbeda dithawing pada suhu $\pm 23^{\circ}\text{C}$ dengan air mengalir dan dibuat irisan melintang untuk diamati di bawah mikroskop. Ketebalan irisan yang dihasilkan oleh mikrotom adalah $\pm 10\mu\text{m}$. Hasil pengamatan mikroskopis irisan melintang batang (*thallus*) alga coklat *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 10. Sedangkan, hasil pengamatan mikroskopis irisan melintang daun (*blade*) alga coklat *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 12.

Pada sampel perlakuan A (-18°C) terjadi kerusakan jaringan sel yang serius atau hancur di bagian permukaan jaringan epidermis dan parenkim batang (ditandai dengan tanda panah pada Gambar 10b). Pada sampel perlakuan B (-27°C) pada Gambar 10c dan C (-30°C) pada Gambar 10d hanya mengalami pengkerutan. Irisan melintang batang sampel pada Gambar 10b, 10c dan 10d dapat dikatakan telah terjadi *freezing injury* atau pelukaan sel oleh sebab pembekuan. *Freezing injury* terjadi ketika kristal es terbentuk di dalam jaringan. Jaringan yang terluka oleh pembekuan pada umumnya kehilangan rigiditas dan menjadi lembut ketika dicairkan. Gejala *Freezing injury* yang paling umum adalah munculnya *water-soaked* atau resapan air (Shudheer dan Indira, 2007).

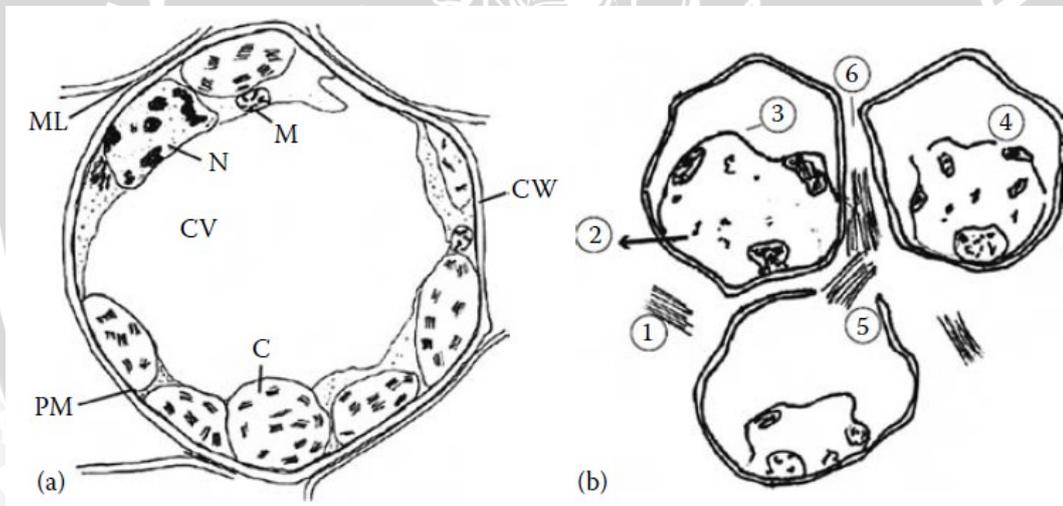
Kandungan air dalam sel sampel yang tinggi diduga penyebab kerusakan sel. Permukaan jaringan epidermis dan parenkim batang sampel A (-18°C)

mengalami kerusakan yang serius atau hancur. Kerusakan yang ditimbulkan diduga dapat terjadi karena pemuaihan ukuran es dalam sel yang kemudian membengkak dan merobek membran bahkan dinding sel. Pada suhu di bawah pembekuan, kristal es mulai terbentuk pada sebagian besar tumbuhan. Jika es terbatas hanya pada dinding sel dan ruangan antar sel, tumbuhan kemungkinan akan bertahan hidup. Namun demikian, jika es mulai terbentuk di dalam protoplas, kristal es yang tajam itu akan merobek membran dan organel, yang dapat membunuh sel tersebut (Campbell *et al.*, 2003).



Gambar 10. Hasil Pengamatan Mikroskopis Irisan Melintang Batang (Thallus) Alga Coklat *Sargassum filipendula*. (a) Sampel Kontrol (Sampel Segar); (b) Sampel A (-18°C), tanda panah menunjukkan kerusakan; (c) B (-27°C); dan (d) C (-30°C), tanda panah menunjukkan adanya warna kuning. E, Epidermis; P, Parenkim; dan BP, Berkas Pembuluh. Perbesaran 100x.

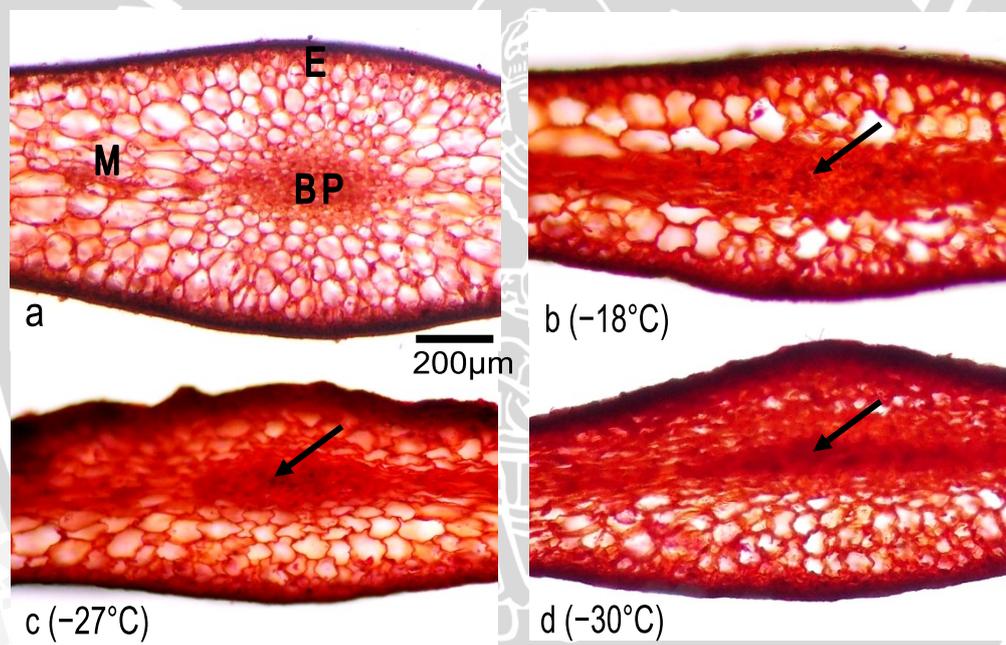
Laju pembekuan yang lambat juga diduga mengakibatkan terjadinya kristal es yang besar pada bagian interselular (ekstraselular) sel. Kristal es yang terbentuk meningkatkan kepekatan dan terjadi perbedaan tekanan, dengan terpaksa cairan dari dalam sel dikeluarkan untuk menyeimbangkan kekekatannya (terjadi proses osmosis), cairan yang keluar dari dalam sel perlahan-lahan membeku dan bergabung membentuk kristal es yang semakin besar dan tajam, pembengkakan dan ketajaman kristal es tersebut dapat merobek dinding sel dan memisahkan sel satu dengan yang lain. Perubahan fisika kimia bahan pangan selama pembekuan dan peleburan (*thawing*) dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Perubahan Fisika Kimia Bahan Pangan Selama Pembekuan dan Peleburan (*Thawing*). (a) Struktur dari sel tanaman dan (b) pengaruh dari pembentukan es ekstraselular pada struktur sel. PM, membran sel; CW, dinding sel; C, Kloroplas; M, mitokondria; N, Nukleus; CV, vakuola pusat; ML, lamela tengah. 1) Pergerakan air, 2) Penyusutan PM; 3) Kosentrasi bahan terlarut; 4) Gangguan membrane; 5) Kerusakan CW; 6) Pemisahan antar sel. (Sun, 2012).

Gambar 11 dapat diamati bahwa pembentukan es ekstraselular menyebabkan pergerakan air dari sel, hasil kerutan dari plasma membran dan konsentrasi bahan terlarut internal sama dengan gangguan pada membran. Es memungkinkan juga menusuk CW atau memisahkan batasan sel pada lamela tengah (Sun, 2012).

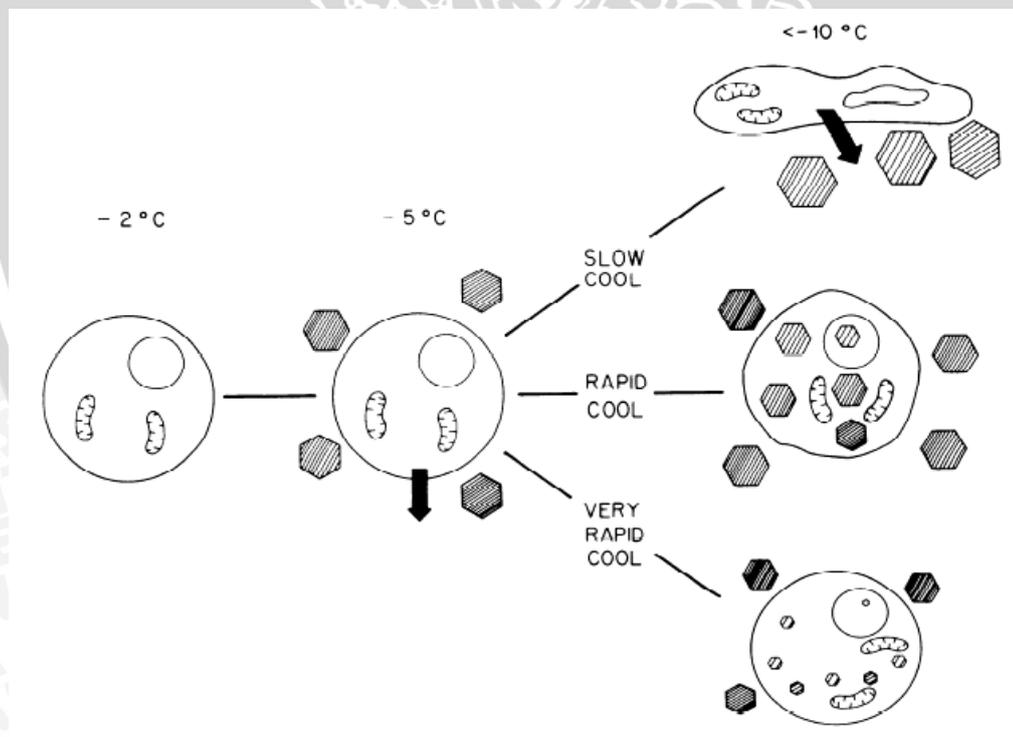
Pada sampel C (-30°C) (Gambar 10d), tanda panah menunjukkan adanya warna kuning. Bagian (*spot*) yang berwarna kuning pada bagian sel-sel yang telah mengalami pengkerutan merupakan komponen dari sel yang diduga senyawa bioaktif yang bersifat non polar yang dimungkinkan muncul akibat perlakuan pembekuan pada suhu -30°C .



Gambar 12. Hasil Pengamatan Mikroskopis Irisan Melintang Daun (*Blade*) Alga Coklat *Sargassum filipendula*. (a) Sampel Kontrol; (b) Sampel A (-18°C); (c) Sampel B (-27°C); dan (d) Sampel C (-30°C). E, Epidermis; M, Mesofil; dan BP, Berkas Pembuluh. Tanda panah menunjukkan kerusakan. Perbesaran 100x.

Pengkerutan yang terjadi pada sampel batang B (-27°C), C (-30°C) (Gambar 10) dan daun A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) (Gambar 12) diduga disebabkan karena sel mengalami dehidrasi. Saat kristal es terbentuk di bagian

interselular sel, terjadi perbedaan kepekatan dan tekanan antara bagian interselular sel dan intraselular sel (bagian dalam sel). Proses osmosis terjadi dengan keluarnya cairan dari dalam sel melewati membran semipermeabel dan dinding sel untuk menyeimbangkan konsentrasi. Namun, cairan yang telah keluar mulai membeku dan menjadi kristal es. Proses migrasi cairan ke luar sel tersebut diduga terjadi karena laju pembekuan yang lambat. Saat proses pencairan (*thawing*), kristal es mencair. Sebagian cairan yang telah keluar dari dalam sel tidak dapat kembali masuk ke dalam sel (*irreversible*), menjadikannya sebagai air bebas dan merembes melewati ruang antar sel keluar jaringan, yang biasa disebut *drip loss*. Sel-sel menjadi mengkerut karena dinding sel kehilangan rigiditas. Kejadian fisik secara skematis di dalam sel pada waktu pembekuan dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Kejadian Fisik Secara Skematis di dalam Sel Pada Waktu Pembekuan. Bentuk heksagonal yang diarsir miring adalah Kristal es. *Slow cool* (pembekuan lambat); *rapid cool* (pembekuan cepat); dan *very rapid cool* (pembekuan sangat cepat). (Mazur, 1984).

Kerusakan tekstur terjadi karena terbentuknya kristal-kristal es di bagian sitoplasma maupun di ruang-ruang antar sel yang dapat mengakibatkan kerusakan dinding sel (Reid dalam Somogyi *et al.*, 1996). Disamping kerusakan secara mekanis pada jaringan tanaman, proses ini mengakibatkan dehidrasi secara cepat dari isi sel dan suatu peningkatan konsentrasi cairan sel. Pencairan yang cepat dapat juga mempunyai pengaruh mematikan pada tanaman yang membeku karena gangguan dalam hubungan metabolisme sel dan air yang lebih jauh (Fitter dan Hay, 1991).

Menurut Desrosier (1988), sel-sel daging unggas, ikan, kerang, buah-buahan, dan sayuran semuanya mengandung protoplasma yang menyerupai selai. Jika produk dibekukan dengan lambat atau dalam suhu yang berfluktuasi selama pembekuan, maka akan memberi kesempatan pertumbuhan kristal es. Oleh karenanya sel-sel menjadi rusak dan jaringan yang dicairkan tidak dapat kembali seperti keadaan menyerupai selai yang asli. Sebagian cairan yang dihasilkan dari pencairan tidak dapat diserap kembali dan terlihat seperti air bebas.

4.3 Ekstraksi *Sargassum filipendula* dengan Pelarut Etanol

Ekstraksi merupakan suatu proses selektif yang dilakukan untuk mengambil zat-zat yang terkandung dalam suatu campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode pemisahan ini bekerja berdasarkan prinsip kelarutan *like dissolve like*, yaitu pelarut polar akan melarutkan zat polar, dan sebaliknya. Dengan demikian, hasil ekstraksi yang diperoleh bergantung pada kandungan ekstrak yang terdapat dalam sampel dan jenis pelarut yang digunakan (Khopkar, 1990). Perendaman suatu bahan dalam pelarut atau disebut maserasi dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel dalam 3

tahapan, yaitu masuknya pelarut ke dalam dinding sel tanaman dan membengkakkan sel, kemudian senyawa yang terdapat dalam dinding sel akan terlepas dan masuk ke dalam pelarut, diikuti oleh difusi senyawa yang terekstraksi oleh pelarut keluar dari dinding sel tanaman (Supriadi, 2008).

Maserasi sampel A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) dilakukan bersamaan dengan *dishaker* selama 5 jam dan digunakan pembanding kontrol dengan maserasi tanpa *dishaker* selama 3 hari (3x24 jam). Sebelumnya, sampel *Sargassum filipendula* dihancurkan dahulu dengan *blender* dengan tujuan untuk menghaluskan jaringan alga sebelum diekstraksi. Sampel dihancurkan dan *dishaker* juga bertujuan untuk memperluas permukaan sampel sehingga mempercepat kontak atau tumbukan dengan pelarut.

Sampel hasil maserasi, disaring dengan kertas saring. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan sampel dengan senyawa bioaktif yang telah larut dalam pelarut etanol. Filtrat yang dihasilkan dari keseluruhan perlakuan didapati berwarna hijau kecoklatan, diduga warna ini disebabkan oleh kandungan pigmen fukosantin yang didapati dominan di dalam sampel alga coklat tersebut. Kemudian filtrat dievaporasi untuk memisahkan senyawa bioaktif dengan pelarutnya.

Evaporasi dilakukan secara vakum dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C selama ± 2 jam untuk mencegah kerusakan senyawa pada suhu tinggi. Prinsip kerja *Rotary vacuum evaporator* menurut Orsat dan Raghavan (2006) berdasarkan prinsip diagram fase air, yaitu ketika tekanan udara diturunkan, maka titik didih akan turun. Tekanan yang digunakan adalah tekanan *vacuum* (500 mmHg), sehingga suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ dapat digunakan untuk menguapkan pelarut. Kondisi demikian merupakan kondisi yang diinginkan. Hal ini karena pada saat kondisi tersebut lebih dari 95% kandungan nutrisi, vitamin,

ferment, dan komponen bioaktif lainnya dapat terselamatkan. Pemanasan dengan suhu rendah ini dapat mengurangi terjadinya proses oksidasi.

Hasil evaporasi berupa *crude* ekstrak diamati sifat fisiknya (warna, bau dan bentuk), diukur nilai rendemen dan kadar airnya. Hasil pengamatan *crude* ekstrak dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Pengamatan *Crude* Ekstrak *Sargassum filipendula*

No.	Perlakuan	Hasil
1.	Kontrol, A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C)	Warna: hijau kecoklatan Bau: khas rumput laut Bentuk: cair, ada endapan

Rendemen merupakan perbandingan berat *crude* ekstrak dengan berat awal sampel yang dinyatakan dalam persen (%). Nilai rendemen *crude* ekstrak etanol dapat dilihat pada Tabel 7 dan contoh perhitungannya pada Lampiran 3.

Tabel 7. Nilai Rendemen *Crude* Ekstrak Etanol

Perlakuan	Berat Awal (gram)	Berat <i>Crude</i> Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Kontrol (K)	190	2,747±0,590	1,446±0,310
A (-18°C)	190	2,889±0,431	1,521±0,227
B (-27°C)	190	3,111±0,977	1,638±0,514
C (-30°C)	190	2,982±0,574	1,569±0,302

Keterangan: Data menunjukkan nilai Rata-Rata±Standar Deviasi (SD) dengan 3 kali ulangan.

Hasil pengukuran rendemen menunjukkan bahwa nilai rendemen pada perlakuan B (-27°C)>C (-30°C)>A (-18°C)>Kontrol. Hasil ekstrak yang diperoleh akan tergantung pada beberapa faktor antara lain kondisi ilmiah senyawa tersebut, metode ekstraksi yang digunakan, ukuran partikel sampel, kondisi dan waktu penyimpanan, lama waktu ekstraksi, dan perbandingan jumlah pelarut terhadap jumlah sampel (Darusman *et al.*, 1995).

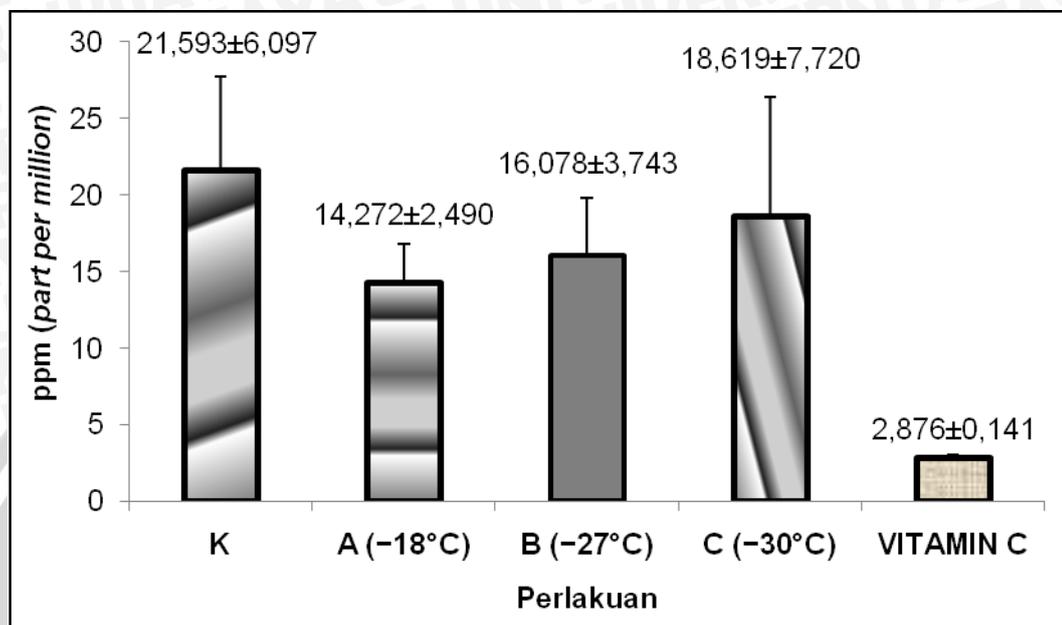
Pada perlakuan A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) nilai rendemen didapati lebih besar dibanding kontrol. Hal ini disebabkan perlakuan pembekuan yang mempengaruhi kerusakan sel dan posisi cairan pada sampel *S. filipendula* yang dibekukan. Beberapa karakteristik hasil dari kerusakan oleh pembekuan dalam sistem jaringan tanaman menurut Mallet (1993) termasuk transfer permanen dari cairan intraselular ke ekstraselular melewati osmosis, yang mana tidak dapat dibalikkan saat pencairan (*thawing*) oleh karena terjadi kerusakan membran. Saat proses *thawing*, cairan yang membeku di wilayah interselular melebur (terlihat seperti air bebas) dan merembes keluar jaringan (*drip loss*). Hal tersebut dapat mengoptimalkan kandungan senyawa polar, yaitu senyawa bioaktif dan air, terlarut dalam pelarut etanol saat proses maserasi terjadi.

4.4 Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Penangkapan radikal bebas DPPH merupakan salah satu metode uji untuk menentukan aktivitas antioksidan (Pokorni *et al.*, 2001). Metode uji DPPH merupakan metode pengujian aktivitas antioksidan yang paling cocok bagi komponen bioaktif yang bersifat polar. Kristal DPPH hanya dapat larut dan memberikan absorbansi maksimum pada pelarut metanol maupun etanol (Molyneux 2004). Kemampuan suatu senyawa atau sampel uji untuk menangkap radikal DPPH merupakan suatu indikasi bahwa senyawa atau sampel uji tersebut memiliki aktivitas antioksidan (Rohman *et al.*, 2009). Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian dengan metode DPPH adalah IC_{50} (*Inhibition concentration*).

Nilai IC_{50} dapat didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas, yaitu menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dari suatu persamaan regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi *crude* ekstrak *Sargassum*

filipendula (sumbu x) dengan persen penangkapan radikal DPPH (% inhibisi) (sumbu y). Nilai IC_{50} penangkap radikal bebas DPPH dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Nilai IC_{50} Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas DPPH. Batang menunjukkan nilai Rata-Rata ± Standar Deviasi (SD) dengan 3 kali ulangan.

Berdasarkan hasil penelitian pada Gambar 14 didapati urutan nilai IC_{50} adalah Vitamin C (asam askorbat) < A (-18°C) < K < B (-27°C) < C (-30°C). Pengujian dengan menggunakan radikal bebas DPPH merupakan pengujian secara kuantitatif yang menunjukkan jika nilai IC_{50} semakin kecil, maka semakin tinggi aktivitas senyawa antioksidan yang terkandung dalam *crude* ekstrak menangkap radikal DPPH begitu juga sebaliknya jika nilai IC_{50} semakin besar maka semakin rendah aktivitas senyawa antioksidan yang terkandung di dalam *crude* ekstrak menangkap radikal DPPH. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa nilai IC_{50} yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin tinggi juga (Molyneux 2004). Nilai IC_{50} dapat dikatakan berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan.

Senyawa antioksidan yang terkandung dalam *crude* ekstrak etanol *Sargassum fillipendula* 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). Menurut Nikhat *et al.* (2009), reaksi penghambatan antara (DPPH^{*}) dan sebuah antioksidan (H-A) dapat dituliskan sebagai berikut:



Antioksidan bereaksi dengan DPPH^{*}, yang mana adalah radikal bebas yang stabil dan tereduksi menjadi DPPH-H dan sebagai akibatnya nilai absorbansinya menurun dari radikal DPPH^{*} ke bentuk DPPH-H. Derajat perubahan warna mengindikasikan potensial penghambatan dari kandungan senyawa antioksidan atau ekstrak dalam istilah kemampuan mendonasi (menyumbangkan) hidrogen.

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 0,05 mg/ml (ppm), kuat apabila nilai IC₅₀ antara 0,05-0,10 mg/ml (ppm), sedang apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 0,10-0,15 mg/ml (ppm), dan lemah apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 0,15-0,20 mg/ml (ppm) (Blois, 1958 dalam Molyneux, 2004). Jadi, keseluruhan sampel dapat dikatakan sebagai antioksidan yang tergolong sangat kuat.

Nilai IC₅₀ *crude* ekstrak sampel Kontrol yang paling tinggi dibanding sampel A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C). Sampel yang diuji masih berupa *crude* ekstrak, sehingga memungkinkan masih mengandung senyawa-senyawa lain yang bukan senyawa antioksidan dan atau mengandung senyawa murni dengan aktivitas antioksidan lebih kuat dan aktif dibandingkan ekstraknya. Kadar

senyawa antioksidan dalam *crude* ekstrak menurut Wikanta *et al.* (2005) memiliki banyak 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. Kadar air juga mempengaruhi tingkat efektivitas senyawa antioksidan saat pengujian DPPH.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa suhu perlakuan pembekuan yang semakin rendah meningkatkan nilai IC_{50} , diduga hal tersebut berhubungan dengan fenomena yang terjadi pada hasil pengamatan irisan melintang batang sampel C ($-30^{\circ}C$) (Gambar 10d). Tandan panah pada Gambar 10d menunjukkan bagian (*spot*) bewarna kuning yang diduga merupakan komponen sel (senyawa bioaktif) yang bersifat nonpolar yang menghambat senyawa bioaktif yang bersifat polar terekstrak oleh pelarut etanol. Hal ini mengakibatkan berkurangnya jumlah senyawa bioaktif yang dapat terekstrak yang justru memiliki peran sebagai antioksidan potensial.

4.5 Skrining Fitokimia

Fitokimia adalah cabang ilmu yang mempelajari senyawa organik yang dibentuk dan ditimbun oleh tumbuhan, yaitu mencakup struktur kimia, biosintesis, perubahan serta metabolisme, penyebaran secara alami dan fungsi biologis (Astawan dan Kasih, 2008). Metode fitokimia digunakan untuk mengetahui kandungan sekunder, makromolekul serta penggunaan data yang diperoleh untuk menggolongkan tumbuhan (Harborne, 1987).

Skринing fitokimia merupakan uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui komponen bioaktif yang terkandung dalam *crude* ekstrak yang terlarut pada pelarut etanol. Menurut Houghton dan Raman (1998), ekstraksi dengan pelarut etanol dapat mengekstrak fenolik, terpenoid, alkaloid dan glikosida. Hasil Skринing Fitokimia *Crude* Ekstrak *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Skринing Fitokimia *Crude* Ekstrak *Sargassum filipendula*

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

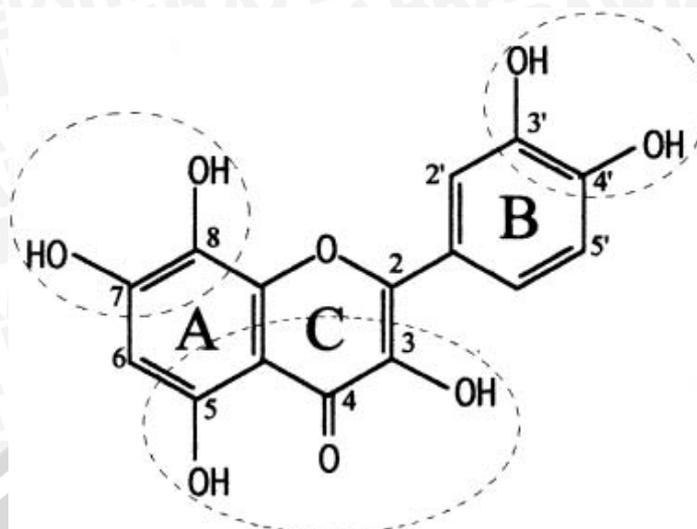
Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa senyawa kimia (bioaktif) yang positif terkandung dalam *crude* ekstrak etanol *Sargassum filipendula* adalah golongan alkaloid, flavonoid dan fenolik. Senyawa-senyawa tersebut diduga berkontribusi dalam penangkapan radikal DPPH.

Hasil positif alkaloid pada uji Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion I⁻ dari kalium iodida menghasilkan ion I₃⁻ yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K⁺ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana *et al.*, 2005).

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder terbesar yang bersifat basa dan mengandung satu atau lebih atom nitrogen, sering kali beracun bagi manusia, mempunyai fungsi fisiologis yang menonjol dan digunakan secara luas dalam bidang pengobatan (Minarti *et al.*, 2002). Pada umumnya basa bebas alkaloida hanya larut dalam pelarut organik meskipun beberapa pseudoalkaloida dan protoalkaloida larut dalam air (Sastrohamidjojo, 1996).

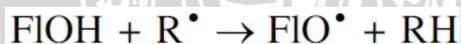
Senyawa fenolik telah dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan karena sifat redoksnya. Senyawa fenolik bereaksi sebagai agen pereduksi, pemberi hydrogen, peredam oksigen singlet, dan sebagai pengkelat logam yang potensial (Kahkonen *et al.*, 1999). Kandungan fenolik umumnya memperlihatkan pengaruh penghambatan yang signifikan terhadap radikal bebas DPPH (Michael *et al.*, 2002). Senyawa fenol mempunyai gugus hidroksi yang terdistribusi pada pada posisi ortho dan para terhadap gugus -OH dan -OR. Perubahan warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hydrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (Purwaningsih, 2012).

Flavonoid merupakan golongan terbesar diantara senyawa fenol alami yang telah diketahui lebih dari seribu struktur (Subeki, 1998). Flavonoid terbagi menjadi 7 kelompok, yaitu antosianin, proantosianin, isoflavon, flavanon, flavonol, flavanol dan flavon. Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan di dalam tubuh sehingga disebut bioflavonoid (Apak, 2007). Sejumlah gugus hidroksil yang tak terganti atau suatu gula menyebabkan flavonoid bersifat polar sehingga larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan lain-lain (Harborne, 1987). Ciri-ciri struktur dari flavonoid dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Ciri-Ciri Struktur dari Flavonoid (Amić *et al.*, 2002).

Flavonoid berperan sebagai penangkap spesies oksigen reaktif (seperti anion superoksida dan radikal bebas) (Aniagu *et al.*, 2005). Menurut Amić *et al.* (2002), sebagai senyawa polifenol, flavonoid memiliki kemampuan bereaksi sebagai antioksidan melalui mekanisme penghambatan radikal bebas dengan membentuk radikal fenoksil flavonoid yang kurang reaktif. Potensial yang tinggi dari senyawa flavonoid (FIOH) dalam menghambat radikal bebas (R^\bullet) mungkin dapat dijelaskan melalui kemampuannya mendonasikan sebuah atom hidrogen dari kelompok hidroksilnya dan dengan demikian menghambat radikal bebas:

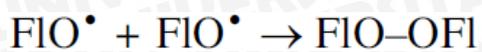


Reaksi penghambatan

Reaksi tersebut membentuk radikal fenoksil flavonoid (FIO^\bullet) dan sebuah molekul stabil (RH). Sesudah itu FIO^\bullet mengalami perubahan struktur resonansi dengan mendistribusikan kembali elektron tidak berpasangan pada cincin aromatik. Maka radikal fenolik flavonoid memperlihatkan reaktivitas yang lebih rendah menyamakan dengan R^\bullet . FIO^\bullet akan bereaksi lebih lanjut membentuk senyawa tidak reaktif, kemungkinan oleh terminasi radikal-radikal.



Reaksi penggabungan radikal-radikal



Reaksi penggabungan radikal-radikal



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan penelitian ini adalah :

- Suhu pembekuan dengan menggunakan lempeng (plat) sentuh pembeku mempengaruhi kerusakan yang serius di bagian permukaan jaringan epidermis dan parenkim batang sampel perlakuan A (-18°C). Jaringan batang sampel perlakuan B (-27°C) dan C (-30°C) serta jaringan daun sampel perlakuan A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) mengalami pengkerutan. Komponen dari sel yang diduga senyawa bioaktif yang bersifat non polar yang dimungkinkan muncul akibat perlakuan pembekuan pada suhu -30°C yang ditunjukkan pada bagian (*spot*) warna kuning pada gambar irisan melintang batang.
- Nilai rendemen perlakuan permbekuan didapati lebih besar dibanding kontrol. Keseluruhan sampel dapat dikatakan sebagai antioksidan yang tergolong sangat kuat. Pada perlakuan A (-18°C), B (-27°C) dan C (-30°C) nilai IC_{50} didapati lebih kecil dibanding kontrol. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa suhu perlakuan pembekuan yang semakin rendah meningkatkan nilai IC_{50} .

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa pemurnian ekstrak kasar, pengujian aktivitas antioksidan ekstrak murni tersebut dengan metode DPPH, serta indentifikasi senyawa bioaktif lainnya dalam ekstrak *Sargassum filipendula* menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Kareem, M.S.M. 2009. **Phenetic Studies and new Records of *Sargassum* Species (Fucales, Phaeophyceae) from the Arabian Gulf Coast of Saudi Arabia.** *Academic Journal of Plant Sciences* 2 (3) : 173-181.
- Afrianto, E. dan Liviawati, E. 1989. **Pengolahan dan Pengawetan Ikan.** Kanisinus. Yogyakarta. Hal. 43.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešli, D. dan Trinajstić, N. 2002. **Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids.** *CCACAA* 76 (1) : 55-61.
- Aniagu, S.O., Binda, L.G., Nwinyi, F.C. dan Oridasipe, A. 2005. **Anti-diarrhoeal and Ulcer-protective Effects of The Aqueous Root Extract of *Guiera senegalensis* in Rodents.** *J. Ethnopharmacology* 97: 549-554.
- Apak, R. 2007. **Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assay Applied to Phenolic Compounds with The CUPRAC Assay.** *Molecules* 12: 1496-1547.
- Asih, I.A.R.A., Ratnayani, K. dan Swardana, I.B. 2012. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid dari Madu Kelengkeng (*Nephelium longata* L.).** *Jurnal Kimia* 6 (1) : 72-78.
- Aslan, L.M. 1991. **Rumput Laut.** Kanisinus. Yogyakarta.
- Astawan, M. dan Kasih, A.L. 2008. **Khasiat Warna-Warni Makanan.** PT. Gramedia. Jakarta.
- Atmaja, W., Kadi, A., Sulistijo dan Rachmaniar. 1996. **Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia.** Puslitbang Oseanografi-LIPI. Jakarta.
- Ayas, D., dan Y. Ozugul. 2011. **The chemical composition of carapace meat of sexually mature blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun 1896) in the Mersin Bay.** *J. Fisheries Sci.* 38 : 645-650.
- Basri, S. 1996. **Kamus Kimia.** Rineka Cipta. Jakarta.
- Blois, M.S. 1958. **Antioxidant Determinations by The Use of A Stable Free Radikal.** *Nature* 181 : 1199-1200.

- Camara, B.G.C., Costa, L.S., Fidelis, G.P., Nobre, L.T.D.B., Dantas-Santos, N., Cordeiro, S.L., Costa, M.S.S.P., Alves, L.G. dan Rocha, H.A.O. 2011. **Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities.** *Mar. Drugs* 9: 124–138.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. dan Mitchell, L. G. 2003. **Biologi.** Penerjemah W. Manalu. Penerbit Erlangga. Jakarta. Hal 399.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A. dan Rakariyatham, N. 2005. **Screening of Antioxidant Activity and Antioxidant Compounds of Some Edible Plants of Thailand.** *Food Chemistry* 92 : 491–497.
- Costello, L.R., E.J. Perry, N.P. Matheny, J.M. Henry dan P.M. Geisel. 2003. **Abiotic Disorders of Landscape Plants A Diagnostic Guide.** University of California. Canada. Hal. 133–138.
- Darusman LK, Sajuthi D, Sutriah K, dan Pamungkas D. 1995. Naskah Seminar: **Ekstraksi Komponen Bioaktif Sebagai Bahan Obat Dari Karang-Karangan, Bunga Karang dan Ganggang Laut di Perairan Pulau Pari Kepulauan Seribu.** Buletin Kimia. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dawczynski, C., Scubert, R., Jahreis, G. 2007. **Jurnal Amino Acids, Fatty Acids, and Dietary Fibre in Edible Seaweed Product.** *Food Chemistry* 103 : 891–899.
- Day, R.A. dan Underwood. 1999. **Analisis Kimia Kualitatif.** Penerjemah Pudjaatmaka. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Desrosier, N.W. 1988. **Teknologi Pengawetan Pangan.** Terjemahan M. Muljohadjo. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Fateha. 2007. **Teknik Penanganan Pascapanen Rumput Laut Coklat, *Sargassum filipendula* Sebagai Bahan Baku Alginat.** *Bul. Tek. Lit. Akuakultur* 6 (1) : 69–73.
- Fellow, P. 1988. **Food Processing Technology Principles and Practice.** Department Catering management. Oxford Polytechnic. Oxford.
- Fessenden, J.R. dan Fessenden, S.L. 1982. **Kimia Organik.** Penerjemah Pudjaatmaka A.H. Penerbit ITB. Bandung.
- Fitter, A.H. dan R.K.M. Hay. 1991. **Fisiologi Lingkungan Tanaman (*Environmental Physiology of Plantnna*).** Penerjemah Andani, S. dan E. D. Purbayanti. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 421 Hal.
- Gordon, M.H. 1993. **The Mechanism of Antioxidants Action In Vitro.** Applied Science. New York.

Guiry, M.D. dan Guiry, G.M. 2011. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Diakses pada tanggal 27 Juni 2012.

Guthrie H.A. dan Mary F.P. 1995. **Human Nutrition**. Mosby A Times Mirror Company -Year Book Inc, St. Louis Missouri.

Handayani, T., Sutarno dan Setyawan, A.D. 2004. **Analisis Komposisi Nutrisi Rumput Laut *Sargassum crassifolium* J. Agardh**. Biofarmasi 2 (2) : 42-52.

Harborne, J.B. 1987. **Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**. Penerjemah Padmawinata, K. dan Soediro, I. Penerbit ITB. Bandung. Hal 69-94, 142-158, 234-238.

Hardjono, S. 1991. **Spektroskopi**. Liberty. Yogyakarta

Heldman, D.R. dan R.P. Singh. 1981. **Food Process Engineering**. The AVI Pub. Co. Inc. Westport.

Heldman, D.R. dan T.A. Singh. 1997. **Modeling of Food Freezing**. Di dalam Erickson, M.C dan Y.C. Hung (Editor). **Quality in Food Freezing**. Chapman Hall. New York. Hal. 51-64.

Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K. dan Tanada, K. 1999. **Three Kinds of Antibacterial Substances From *Lentinus edobes* (Berk) Sing. (Shiintake, an Edible Mushroom)**. *International Journal of Antimicrobial Agent* 11 (2) : 151-157.

Houghton, P.J. dan Raman, A. 1998. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natutal Extracts**. Chapman and Hall. London.

Huang, D., Ou, B., dan Prior, R. L. 2005. **The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1841-1856

Huda, N. 2001. **Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis, GBC 911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CL 19140**. Bulletin Ilmiah Teknologi Keselamatan Nuklir No. 20-21.

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

Indriani, H. dan Sumarsih. 1992. **Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut**. Penebar Swadaya. Jakarta.

Isfahlan, A.J., Adeh, A.M., Hassanzadeh, A., Heidari, R. dan Jamei, R. 2010. **Antioxidant and Antiradical Activities of Phenolic Extracts from Iranian Almond (*Prunus amygdalus* L.) Hulls and Shells.** *Turk. J. Biol.* 34 : 165-173.

Ismail, A. Dan Hong, T.S. 2002. **Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds.** *Mal. J. Nutr.* 8 (2) : 167-177.

JICA. 2008. **Bantuan Teknis untuk Industri Ikan dan Udang Skala Kecil dan Menengah di Indonesia.** Ministry of Marine Affairs and Fisheries. Jakarta Pusat. Hal. 22.

Johnston, W.A., F.J. Nicholson, A. Roger dan G.D. Stroud. 1994. **Freezing and Refrigerated Storage in Fisheries.** FAO Fisheries Technical paper 340. Roma.

Junaiyah H.M. dan E.Z. Arifin. 2010. **Keutuhan Wacana.** Grasindo. Jakarta. Hal. 113.

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., dan Heinonen, M. 1999. **Antioxidant Activity of Extract Containing Phenolic Compounds.** *J. Agric Food Chem.* 47 : 3954-3962.

Ketaren, S. 1986. **Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan.** UI Press. Jakarta.

King, C.J. 1971. **Freeze Drying of Food.** CRC, The Chemical Rubber Co. Cleveland-Ohio.

Khopkhar, S.M. 1990. **Konsep Dasar Kimia Analitik.** Penerjemah Saptoraharjo. UI Press. Jakarta.

Koivikko, R., Lojonen, J., Honkanen, T. and Jormalainen, N. 2004. **Contents of Soluble, Cell-Wall-Bound and Exuded Phlorotannins in the Brown Alga *Fucus vesiculosus*, With Implication on Their Ecological Function.** *Journal of Chemical Ecology* 31 (1) : 195-212.

Mallet, C.P. 1993. **Frozen Food Technology.** Chapman & Hall. England. Hal. 11.

Marliana SD, Suryanti V, Suyono. 2005. **Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis komponen kimia buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz) dalam ekstrak etanol.** *Biofarmasi* 3 (1) : 26-31.

Mazur, P. 1984. **Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications.** *Am. J. Physiol.* 247 (*Cell Physiol.* 16) : C125-C142.

- Mendiola, J.A., Rodriguez–Meizoso, I., Señoráns, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A. dan Ibáñez, E. 2008. **Antioxidant in Plant Food and Microalgae Extracted Using Compressed Fluids.** *EJEAFChe.* 7 (8) : 3301–3309.
- Michael, A., Paul, D.P., Emilios, P., Suzanne, M. dan Kevin, R. 2002. **Methods of Testing Antioxidant Activity.** *The Analyst* 127 (1) : 183–198.
- Minarti, P. Dewi N.L., L.B.S. Kardono dan B. Wahyudi. 2002. **Penapisan Kimia Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk).** Pusat Penelitian Kimia LIPI Kawasan PUSPIPTEK. Serpong.
- Molyneux, P. 2004. **The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity.** *Songklanakarín J.Sci. Technol.* 26 (2) : 211–219.
- Nazir, M. 1988. **Metode Penelitian.** PT. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Nikhat, F., D. Satynarayana dan Subhramanyam, EVS. 2009. **Isolation, Charectrisation and Screening of Antioxddant Activity of The Roots of *Syzygiumcumini* (L) Skeel.** *Asian J. Research Chem.* 2 (2): 218–221.
- Orsat V., dan Raghavan G.S.V. 2006. **Dehydration Technologies to Retain Bioactive Components.** Di dalam: Shi J, editor. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies.* CRC Press. Boca Raton. Hal. 173-191.
- Patra, J.K., Rath, S.K., Jena, K., Rathod, V.K. dan Thatoi, H. 2008. **Evaluation of Antioxidant and Antimikrobal Activity of Seaweed (*Sargassum sp.*) Extract, A Study on Inhibition of Glutathione–S–Transferase Activity.** *Turk. J. Biol.* 32 : 119–125.
- Pokorni, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. 2001. **Antioxidant in Food; Practical Applications.** CRC Press. New York.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. dan Shahabimajd, N. 2006. **Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Selected Iranian Medicinal Plants.** *African Journal of Biotechnology* 5 (11): 1142–1145.
- Pratimasari, D. 2009. **Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah *Carica papaya* L dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik serta Flavonoid Totalnya.** Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta. 17 halaman.
- Rasyid, A. 2010. **Ekstraksi Natrium Alginat dari Alga Coklat (*Sargassum echinocharphum*).** *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia* 26 (3) : 393–400.

Rohman, A., Riyanto, S., Dahliyanti, R., dan Pratomo, D. B. 2009. **Penangkapan Radikal 2,2-Difenil-1-Pikril Hidrazil oleh Ekstrak Buah *Psidium guajava* L dan *Averrhoa carambola* L.** Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia 7(1) : 1-5.

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

Setyaningsih, S., Suparmo dan Retno I. 2004. **Pengaruh Perendaman Buah Nangka dalam Larutan Garam Kalsium Terhadap Tekstur Buah Setelah Pembekuan.** Agrosains 17 (3) : 379-387.

Schelfan, Leopold dan M.B. Jacobs. 1983. **The Handbook of Solvent.** D. Van Nostrand Comp. Inc. New York.

Shah, R., Karhad, H., Sheth, R. dan Sheth, N. 2010. **In Vitro Antioxidant Activity of Roots of *Tephrosia purpurea* Linn.** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2 (3) : 30-33.

Shudheer, K.P. dan Indira, V. 2007. **Post Harvest Technology of Horticultural Crop.** New India Publishing Agency. India. Hal. 132.

Siagian A. 2002. **Bahan Tambahan Makanan.** Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Sumatera Utara. Medan.

Silva, Paul C., Philip W.B. dan Richard L.M. 1996. **University of California Publications in Botany, Vol. 79.** University of California Press. Berkeley, California. 1264 Hal.

Somogyi, L.P., M.D. Barret, dan Y.H. Hui. 1996. **Major Processed Products.** Technomic Publishing Company. USA.

Srilakshmi, B. 2005. **Food Science Third Edition.** New Age International Publisher. New Delhi. Hal. 334.

Subeki. 1998. **Pengaruh Cara Pemasakan Terhadap Kandungan Antioksidan Beberapa Macam Sayuran Serta Daya Serap dan Retensinya Pada Tikus Percobaan** [tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

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

Sudheer, K.P. dan V. Indira. 2007. **Post Harvest Technology of Horticultural Crops.** Jai Bharat Printing Press. New Delhi. Hal. 132.

- Supriadi, D. 2008. **Optimalisasi Ekstrak Kurkuminoid Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb.*)**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sun, D. 2012. **Handbook of Frozen Food Processing and Packaging Second Edition**. CRC Press. Amerika Serikat. Hal. 219, 220.
- Suratmo. 2009. **Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Antioksidan**. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang. Indonesia. 5 hal.
- Suryaningrum, D., Wikanta, T., dan Kristiana, H. 2006. **Uji Aktivitas Antioksidan dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euchema cottonii***. Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan 1 (1) : 51–63.
- Thomas, M. 2006. **Frozen Fish on Reefer Vessels and in Containers**. Thomas Miller P&I Ltd. United Kingdom.
- Tjondronegoro, P.D., M. Natasaputra, T. Kusumaningrat, A.W. Gunawan, M. Djaelani dan A. Suwanto. 1989. **Botani Umum II**. Pusat Antar Universitas–Ilmu Hayati. IPB. Bogor.
- Utami, T. S., Arbianti, R., Hermansyah, H., dan Reza, A. 2009. **Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpur (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA**. Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok. 6 hal.
- Vaclavik, V.A. dan E.W. Christian. 2008. **Essentials of Food Science Third Edition**. Springer. New York.
- Vijayabaskar, P. dan Shiyamala, V. 2011. **Antioxidant Properties of Seaweed Polyphenol from *Tubinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848**. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine* : 1–9.
- Vogel, A.I. 1987. **Textbook of Practical Organic Chemistry**. Revised by Furnies B.S. 4nd Edition. New York.
- Wikanta, T., H.I. Januar, dan M. Nursid. 2005. **Uji Aktivitas Antioksidan, Toksisitas dan Sitotoksisitas Ekstrak Alga Merah *Rhodymenia palmata***. Jurnal Penelitian Perikanan indonesia 11 (4) : 41–49.
- Windono, T., Budiono, R., Sumijani, R., dan Kusuma, D. 2003. **Radical Scavenging Capacity Against 1,1-Diphenyl-2-Picryl Hydrazyl (DPPH) of Some Indonesian Medicinal Plants**. Proceedings Symposium of Biomedicines, Biopharmaca Research Center IPB. Bogor. Hal. 63–70.

Winarno, F.G. 1990. **Teknologi Pengolahan Rumput Laut**. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta. 112 Hal.

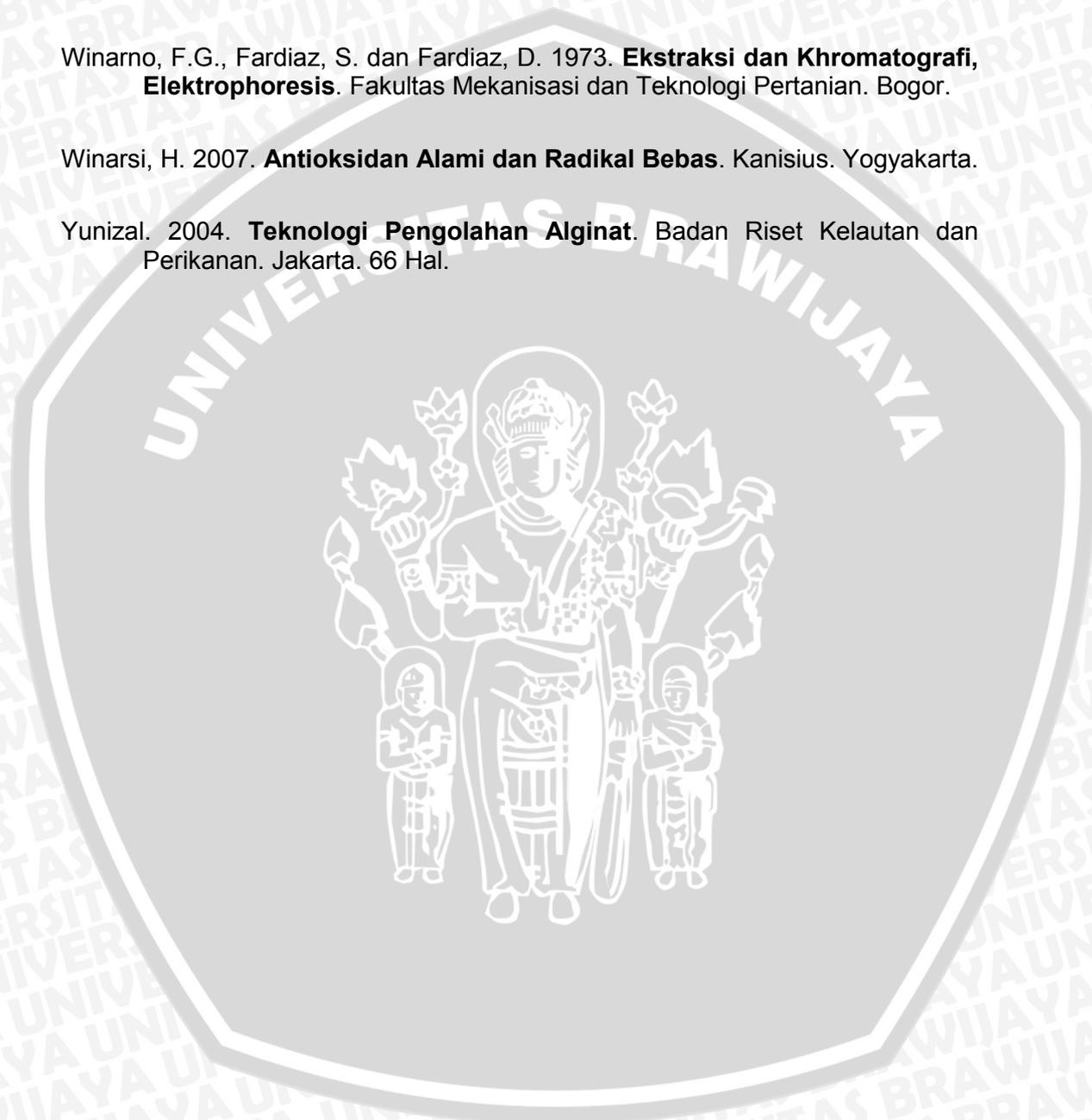
Winarno, F.G. 1997. **Kimia Pangan dan Gizi**. Sinar Pustaka Harapan. Jakarta.

Winarno, F.G. 2008. **Kimia Pangan dan Gizi**. M-Brio Press. Bogor.

Winarno, F.G., Fardiaz, S. dan Fardiaz, D. 1973. **Ekstraksi dan Khromatografi, Elektrophoresis**. Fakultas Mekanisasi dan Teknologi Pertanian. Bogor.

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

Yunizal. 2004. **Teknologi Pengolahan Alginat**. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 66 Hal.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Pembekuan Alga Coklat *Sargassum filipendula*

Sampel	A (-18°C)					B (-27°C)					C (-30°C)					
	Ulangan	1	2	3	Rerata	±SD	1	2	3	Rerata	±SD	1	2	3	Rerata	±SD
r atau jari-jari sampel (± cm)		2,65	2,65	2,65	2,650	0,000	2,65	2,65	2,65	2,650	0,000	2,65	2,65	2,65	2,650	0,000
Waktu TAR (menit)		570	520	545	545	25	205	225	215	215	10	165	175	180	173,333	7,638
Waktu TAR (jam)		9,500	8,667	9,083	9,083	0,417	3,417	3,750	3,583	3,583	0,167	2,750	2,917	3,000	2,889	0,127
Laju pembekuan (cm/menit)		0,0046	0,0051	0,0049	0,0049	0,000	0,0129	0,0118	0,0123	0,0123	0,001	0,0161	0,0151	0,0147	0,0153	0,001
Laju pembekuan (cm/jam)		0,279	0,306	0,292	0,292	0,013	0,776	0,707	0,740	0,741	0,034	0,964	0,909	0,883	0,919	0,041
Menit untuk tiap 1 cm		215,094	196,226	205,660	205,660	9,434	77,358	84,906	81,132	81,132	3,774	62,264	66,038	67,925	65,409	2,882
Jam untuk tiap 1 cm		3,585	3,270	3,428	3,428	0,157	1,289	1,415	1,352	1,352	0,063	1,038	1,101	1,132	1,090	0,048
Suhu awal (To) (°C)		23,8	23,6	24	23,800	0,200	24,8	24	24,3	24,367	0,404	23,6	23,6	23,8	23,667	0,115
Suhu akhir (Ta) (°C)		-18,2	-18,1	-18,2	-18,167	0,058	-18,2	-18,2	-18,1	-18,167	0,058	-18,1	-18,1	-18	-18,067	0,058
T beku (°C)		-1,9	-2,3	-2,2	-2,133	0,208	-2,8	-2,6	-2,8	-2,733	0,115	-4	-3,6	-3,7	-3,767	0,208
Total waktu pembekuan (menit)		775	730	755	753,333	22,546	365	385	365	371,667	11,547	260	270	275	268,333	7,638
Total waktu pembekuan (jam)		12,917	12,167	12,583	12,556	0,376	6,083	6,417	6,083	6,194	0,192	4,333	4,500	4,583	4,472	0,127
Berat sampel (gram)		190	190	190	190,000	0,000	190	190	190	190,000	0,000	190	190	190	190,000	0,000

Lampiran 2. Perhitungan Rendemen Crude Ekstrak Alga Coklat *Sargassum filipendula*

Sampel	Berat Awal (gram)	Berat Crude (gram)			kadar air (%)			Berat Kering (gram)			% Rendemen			Rata-Rata	SD
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
Kontrol	190	23,920	26,120	24,770	88,00	87,50	91,50	2,870	3,265	2,105	1,511	1,718	1,108	1,446	0,310
A (-18°C)	190	38,440	40,260	37,240	93,50	93,00	91,00	2,499	2,818	3,352	1,315	1,483	1,764	1,521	0,227
B (-27°C)	190	35,700	38,710	37,230	94,00	92,00	89,00	2,142	3,097	4,095	1,127	1,630	2,155	1,638	0,514
C (-30°C)	190	34,860	34,550	36,130	92,00	89,50	93,00	2,789	3,628	2,529	1,468	1,909	1,331	1,569	0,302

Rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Kering (gram)}}{\text{Berat Sampel Awal (gram)}} \times 100\%$$

Perhitungan:

Berat Kering (gram) perlakuan Kontrol 1

$$= 23,920 - \left(\frac{88}{100} \times 23,920\right)$$

$$= 2,870 \text{ gram}$$

Rendemen (%) perlakuan Kontrol 1

$$= \frac{2,870 \text{ (gram)}}{190 \text{ (gram)}} \times 100\%$$

$$= 1,511\%$$

Rumus:

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Perhitungan:

$$\text{SD perlakuan Kontrol} = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2}{3 - 1}}$$

$$= \sqrt{\frac{(1,511 - 1,446)^2 + (1,718 - 1,446)^2 + (1,108 - 1,446)^2}{2}}$$

$$= \sqrt{\frac{(0,065)^2 + (0,273)^2 + (-0,338)^2}{2}}$$

$$= \sqrt{\frac{0,193}{2}} = 0,310$$

Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan Stok dan Pengenceran

a) Diketahui :

- Jumlah perlakuan = 5
- Ulangan = 3
- Banyak konsentrasi = 5
- Blanko = 6
- jumlah sampel = jumlah perlakuan x ulangan x banyak konsentrasi

Banyaknya DPPH yang dibutuhkan
= (jumlah sampel x 1 ml (@sampel)) + 6
= (5 x 3 x 5 x 1) + 6
= 75 + 6
= 81 ml, dibulatkan menjadi 90 ml.

Gram DPPH 0,1 mM sebanyak 90 ml (Mr DPPH = 394 g/mol)

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Berat DPPH}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{\text{ml Volume}}$$

$$1 \times 10^{-3} \text{ M} = \frac{\text{Berat DPPH}}{394 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{90 \text{ ml}}$$

$$\text{Berat DPPH} = \frac{0,0001 \times 394 \times 90}{1000} = 3,546 \times 10^{-3} \text{ gram}$$

b) Larutan ekstrak 1000 ppm sebanyak 50 ml.

$$\text{Stok ekstrak 1000 ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 50 \text{ ml} = 50 \text{ mg} = 0,05 \text{ gram}$$

Ekstrak sebanyak 0,05 g dilarutkan dalam etanol 96% hingga 50 ml.

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

- Ekstrak 200 ppm = $10 \text{ ml} \times 200 \text{ ppm} = V_2 \times 1000 \text{ ppm}$
$$= \frac{10 \times 200}{1000} = 2 \text{ ml}$$

Jadi, 2 ml ekstrak 1000 ppm ditambah etanol 96% hingga 10 ml.

- Ekstrak 100 ppm = $10 \text{ ml} \times 100 \text{ ppm} = V_2 \times 1000 \text{ ppm}$
$$= \frac{10 \times 100}{1000} = 1 \text{ ml}$$

Jadi, 1 ml ekstrak 1000 ppm ditambah etanol 96% hingga 10 ml.

- Ekstrak 50 ppm = 10 ml x 50 ppm = $V_2 \times 1000$ ppm

$$= \frac{10 \times 50}{1000} = 0,5 \text{ ml}$$

Jadi, 0,5 ml ekstrak 1000 ppm ditambah etanol 96% hingga 10 ml.

- Ekstrak 25 ppm = 10 ml x 25 ppm = $V_2 \times 1000$ ppm

$$= \frac{10 \times 25}{1000} = 0,25 \text{ ml}$$

Jadi, 0,25 ml ekstrak 1000 ppm ditambah etanol 96% hingga 10 ml.

Lampiran 4. Perhitungan Nilai IC₅₀

Sampel	IC 50 (ppm)			Rata-Rata	SD
	1	2	3		
K	26,877	22,980	14,922	21,593	6,097
A (-18°C)	12,098	13,730	16,988	14,272	2,490
B (-27°C)	12,239	16,276	19,718	16,078	3,743
C (-30°C)	13,882	27,528	14,447	18,619	7,720
VITAMIN C	2,785	3,039	2,805	2,876	0,141

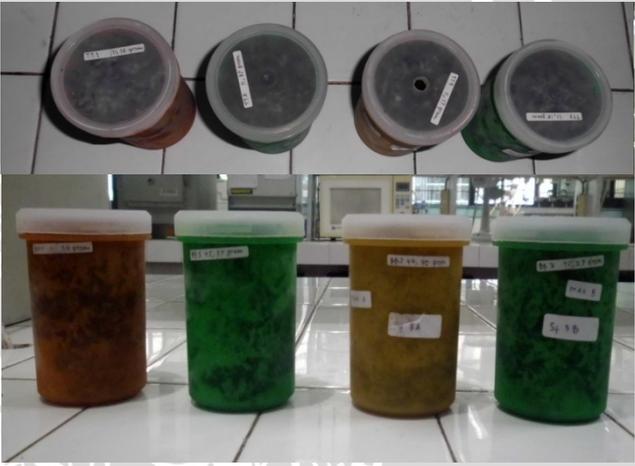
Rumus:

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Perhitungan:

$$\begin{aligned} \text{SD perlakuan Kontrol} &= \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2}{3 - 1}} \\ &= \sqrt{\frac{(26,887 - 21,539)^2 + (22,980 - 21,539)^2 + (14,922 - 21,539)^2}{2}} \\ &= \sqrt{\frac{(5,284)^2 + (1,387)^2 + (-6,671)^2}{2}} = \sqrt{\frac{74,342}{2}} = 6,097 \end{aligned}$$

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

No.	Keterangan	Gambar
1	Penerimaan Bahan Baku <i>Sargassum filipendula</i>	
2	Perlakuan Sampel	
3	Proses Thawing	

<p>4</p>	<p>Pembuatan Preparat mikroskopis</p>	
<p>5</p>	<p>Proses Maserasi di atas shaker</p>	
<p>6</p>	<p>Proses Penyaringan</p>	

7	Proses Evaporasi dengan Rotavapor	
8	Hasil Uji DPPH	