

**PENGARUH pH DAN LAMA INKUBASI ALGA COKLAT SEGAR *Sargassum fillipendula*
DENGAN *Trichoderma viride* TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN**

Oleh:

ANITA EKA PRATIWI

NIM. 0810830043



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2013

**PENGARUH pH DAN LAMA INKUBASI ALGA COKLAT SEGAR *Sargassum fillipendula*
DENGAN *Trichoderma sp* TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN**

Oleh:
ANITA EKA PRATIWI
NIM. 0810830043

Menyetujui,

Dosen Penguji I

(Dr.Ir. Kartini Zaelani, MS)

NIP :

Tanggal :

Dosen Penguji II

(Dr.Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)

NIP : 19640726 198903 2 004

Tanggal :

Dosen Pembimbing I

(Ir. Bambang Budi Sasmito, MS)

NIP : 19570119 198601 1 001

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Dr.Ir. Hardoko, MS)

NIP : 19620108 198802 1 001

Tanggal :

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP: 19600322 198601 1 001

Tanggal:

RINGKASAN

ANITA EKA PRATIWI 0810830043. Pengaruh pH dan Lama Inkubasi Alga Coklat Segar *Sargassum filipendula* dengan *Trichoderma viride* terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar (dibawah bimbingan **Ir. BAMBANG BUDI SASMITO, Msi.** Dan **Dr. Ir. HARDOKO, MS.**).

Rumput laut adalah tumbuhan tingkat rendah yang tidak dapat dibedakan antara bagian akar, batang dan daun. Semua bagian tumbuhannya disebut *thallus*. Alga coklat adalah salah satu kelompok makroalga yang diketahui sebagai sumber yang kaya akan senyawa bioaktif dan potensial untuk diteliti dan dikembangkan. *Sargassum filipendula* pemanfaatannya sangat terbatas, bahkan masih dianggap sebagai sampah laut karena pada musim tertentu hanyut dipermukaan laut dan terdampar di pantai karena tercabut atau patah akibat ombak yang besar atau karena perubahan musim.

Trichoderma viride adalah kapang berfilamen yang sangat dikenal sebagai organisme selulolitik dan menghasilkan enzim-enzim selulolitik, termasuk enzim selobiohidrolase, endoglukanase dan β -glukosidase yang berfungsi dalam membantu proses fermentasi untuk mendegradasi komponen dinding sel alga coklat *Sargassum filipendula*. Senyawa bioaktif yang ada didalam dinding sel dapat keluar dengan maksimal dengan proses fermentasi.

Penelitian ini dilakukan dilaboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari 2012-Maret 2013. Tujuan penelitian ini secara umum adalah untuk mengetahui pH dan lama inkubasi yang terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari *Sargassum filipendula*. Sedangkan secara khusus yaitu 1.) untuk menentukan pengaruh pH terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula* dengan penambahan konsentrasi biakkan *Trichoderma viride*, 2) untuk memperoleh pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*, 3) untuk menentukan pengaruh pH dan lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan utama. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mencari waktu yang tepat untuk menginkubasi sampel dan penelitian utama untuk mengetahui perlakuan terbaik dari sampel yang ditambah jamur *Trichoderma viride*. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor, 3 level dan 2 kali ulangan. Parameter uji yang digunakan ada dua yaitu kuantitatif dan kualitatif. Parameter kualitatifnya yaitu uji senyawa fitokimia sedangkan parameter kuantitatifnya yaitu jumlah rendemen, kadar air, total senyawa fenolat dan nilai. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter uji, dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dan jika terdapat hasil yang berbeda sangat nyata maka dilakukan uji duncan untuk mengetahui perlakuan interaksi terbaik.

Hasil penelitian menunjukkan waktu fermentasi dan pH inkubasi yang efektif untuk mengekstrak komponen antioksidan dari *Sargassum fillipendula* adalah waktu fermentasi selama 7 hari dengan perlakuan konsentrasi pH 4 dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar 41,98 ppm dan nilai rerata total fenol 48,25 mg GAE/1000g sampel serta pengujian fotokimia memeberikan hasil positif

mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan fenolik. Rendemen terbaik didapat pada perlakuan fermentasi selama 7 hari pH 4 sebesar 26,47% dengan kadar air 94,18%.



KATA PENGANTAR

Atas berkat dan kasih karunia Tuhan YME, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Pengaruh pH dan Lama Inkubasi Alga Coklat Segar *Sargassum filipendula* dengan *Trichoderma viride* terhadap aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Tuhan YME, yang telah memberikan kelancaran, kemudahan serta berkat.
2. Ir. Bambang Budi Sasmita, MS, selaku dosen pembimbing I dan Dr. Ir. Hardoko, MS selaku dosen pembimbing II yang telah dengan sabar membimbing serta kedua dosen penguji.
3. Ayah , Ibu, Etris dan Vera, serta sahabatku Agni dan teman spesial Nico atas doa dan seluruh dukungannya.
4. Para Howokers tercinta, Tito, Putra, Bryan, Nando, Yeri, Mbak Titis, Ce Meme, Ce Dita, Yani, Cindy, Winda, Hesty, Palupi, serta Bapak komseleq tersayang Mas Yosua dan Mom Riris yang selalu memberikan nasehat.
5. Teman-teman tim antioksidan yang selalu bersama-sama Agus, Dewi, Ester dan Mas Harris terima kasih atas semangat dan kerja keras kalian.
6. Teman, sahabat, saudara-saudaraku yang sudah membantu,.

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

Malang, Mei 2013

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN.....	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Kegunaan Penelitian.....	5
1.6 Tempat dan Waktu	5

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat.....	6
2.2 <i>Sargassum filipendula</i>	7
2.3 Fermentasi	8
2.4 <i>Trichoderma viride</i>	10
2.5 Mekanisme Kerja <i>Trichoderma viride</i>	12
2.6 Radikal bebas	14
2.7 Antioksidan	15
2.8 Mekanisme Kerja Antioksidan	16
2.9 Ekstraksi	18
2.10 Pelarut	19
2.11 Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan.....	21
2.12 Kandungan <i>Sargassum filipendula</i> yang berpotensi sebagai senyawa antioksidan.....	24

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi penelitian.....	27
3.1.1. Bahan penelitian	27
3.1.2. Alat penelitian.....	28
3.2 Metode penelitian.....	28
3.2.1. Penelitian pendahuluan.....	29
3.2.1.1. Pembuatan kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	29
3.2.1.2. Perlakuan dan rancangan penelitian	29
3.2.1.3. Prosedur penelitian.....	30
3.2.1.4. Parameter uji.....	31
3.2.2. Penelitian Utama.....	32

3.2.2.1. Perlakuan dan rancangan penelitian.....	31
3.2.2.2. Parameter Uji	33
3.2.2.3. Analisis Data	34
3.2.3. Prosedur penelitian utama.....	34
3.2.3.1. Pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur <i>Trichoderma viride</i>	34
3.2.3.2. Fermentasi <i>Sargassum filipendula</i>	35
3.2.3.3. Ekstraksi <i>Sargassum filipendula</i>	36
3.2.4. Prosedur analisis parameter.....	36
3.2.4.1. Perhitungan koloni jamur dengan <i>haemacytometer</i>	36
3.2.4.2. Uji antioksidan (DPPH).....	37
3.2.4.3. Uji fitokimia.....	37
3.2.4.4. Uji kadar air.....	38
3.2.4.5. Uji total fenol.....	39
 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Fase pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	40
4.2 Penelitian pendahuluan.....	42
4.3 Penelitian utama.....	45
4.4 Kadar air dan rendemen.....	45
4.4.1 Kadar air.....	45
4.4.2 Rendemen.....	47
4.5 Aktivitas antioksidan.....	49
4.6 Total fenol.....	53
4.7 Perlakuan terbaik.....	56
4.8 Analisa fitokimia.....	58
 5. PENUTUP	
5.1. Kesimpulan	59
5.2. Saran	59
 DAFTAR PUSTAKA	60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia alga coklat	7
2. Konstanta dielektrik beberapa bahan pelarut	19
3. Sifat-sifat pelarut umum	19
4. RAL (Rancangan Acak Lengkap) Penelitian Pendahuluan.....	30
5. Desain Faktorial	33
6. Hasil Uji Fitokimia ekstrak ethanol <i>Sargassum filipendula</i>	58

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum filipendula</i>	8
2. Koloni <i>Trichoderma viride</i>	11
3. Mekanisme kerja selulase.....	13
4. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida.....	17
5. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi.....	17
6. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH.....	23
7. Kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	41
8. Grafik nilai IC_{50} dengan perlakuan lama inkubasi	42
9. Grafik nilai IC_{50} dengan perlakuan pH	43
10. Grafik persen kadar air	46
11. Grafik persen rendemen	48
12. Grafik nilai IC_{50} dengan perlakuan lama inkubasi.....	50
13. Grafik nilai IC_{50} dengan perlakuan pH.....	51
14. Grafik nilai total fenol.....	55



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan koloni jamur <i>Trichoderma viride</i> dengan <i>Haemacytometer</i> ...	66
2. Analisis Keragaman (ANOVA) nilai IC_{50} <i>Sargassum filipendula</i> pada penelitian pendahuluan.....	69
3. Analisis Keragaman (ANOVA) persen kadar air dan rendemen ekstrak ethanol <i>Sargassum filipendula</i>	75
4. Analisis Keragaman (ANOVA) Nilai IC_{50} <i>Sargassum filipendula</i> penelitian utama	83
5. Analisis Keragaman (ANOVA) total fenol ekstrak ethanol <i>Sargassum filipendula</i>	89
6. Gambar Proses Penelitian.....	95
7. Flowchart Prosedur Penelitian.....	101



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Perairan Indonesia memiliki sumberdaya rumput laut yang berlimpah. Sebagian dari rumput laut tersebut mempunyai nilai ekonomi yang penting. Sebagian komoditi hasil perikanan yang terutama sebagai sumber untuk industri agar-agar, karaginan dan alginat (Sulistyo,1998). Rumput laut disebut juga dengan *seaweed* merupakan tanaman fotosintetik tingkat rendah yang tidak memiliki perbedaan susunan kerangka seperti akar, batang dan daun. Wujudnya tampak seperti ada perbedaan, tetapi sesungguhnya merupakan bentuk *thallus* saja (Winarno, 1990).

Rumput laut coklat merupakan salah satu komoditas laut yang melimpah dan memiliki potensi tinggi terhadap kandungannya, namun sedikit upaya yang dilakukan untuk memanfaatkan potensi rumput laut *Sargassum sp* yang potensial untuk obat-obatan. Rumput laut coklat jenis *Sargassum* ini mengandung iodium, protein, vitamin C dan mineral seperti Ca, K, Mg, Fe, Cu, Zn, S, P dan Mn, anti kanker, anti kuman dan lain-lain, serta zat yang dapat mengontrol polusi logam berat (Yuwanita, 2011)

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

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

Pada beberapa penelitian, ditemukan bahwa dalam ekstrak *Sargassum sp* banyak ditemukan zat yang berpotensi sebagai antioksidan, diantaranya xanthofil, karotenoid, dan fukosanthin. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan atau menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh, sehingga dapat mencegah atau mengurangi terjadinya kerusakan sel (Abdul, 2003). Antioksidan merupakan salah satu bahan aditif yang dapat melindungi bahan pangan dari kerusakan oksidasi penyebab ketengikan. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi atas antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami dianggap lebih aman daripada antioksidan sintetis. Hasil penelitian Fujimoto *et al.* (1985) dan Cahyana *et al.* (1992) telah membuktikan adanya senyawa bioaktif pada alga laut yang berfungsi sebagai antioksidan.

Fermentasi adalah suatu proses pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan melibatkan peran mikroorganisme, atau bisa dikatakan fermentasi adalah segala macam proses metabolisme (enzim, jasad renik secara oksidasi maupun reduksi, hidrolisa atau reaksi kimia lainnya) yang melakukan perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk akhir (Pujaningsih, 2005). Fungsi fermentasi pada penelitian ini, agar *Trichoderma viride* mampu memecah dinding sel pada *Sargassum filipendula*.

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana, maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyarian

ini akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Simplisa yang akan diekstraksi ditempat pada wadah atau bejana yang bermulut lebar bersama larutan penyari yang telah ditetapkan. Bejana ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan simplisa. Rendaman disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalis oleh cahaya atau perubahan warna), waktu maserasi umumnya 5 hari, setelah waktu tersebut keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan luar sel telah tercapai. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Indraswari, 2008).

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (*1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (Blois, 1958). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap (Sunarni, 2005).

Penelitian ini bertujuan untuk eksplorasi pemanfaatan biota laut yang banyak terdapat di Indonesia salah satunya rumput laut *Sargassum sp.* Selain itu mengetahui mengenai metode ekstraksi dengan penambahan fermentasi dan efektifitasnya. Pemilihan tenggang waktu fermentasi yang tepat dapat mengoptimalkan proses ekstraksi dan senyawa antioksidan yang didapatkan. Kedepannya, diharapkan senyawa antioksidan dari *Sargassum sp* dapat menjadi zat antioksidatif baku yang dapat diterapkan pada produk pangan maupun nonpangan.

1.2. Rumusan masalah

Rumput laut coklat jenis *Sargassum sp* mengandung pigmen klorofil a dan c; beta karoten; violasantin dan flukosantin; pirenoid dan filakoid. Hasil

penelitian terbaru menunjukkan bahwa karotenoid pada rumput laut merupakan antioksidan yang dapat berfungsi melindungi berbagai macam penyakit dan stress (Burtin, 2006). Rumput laut coklat jenis *Sargassum sp* mengandung senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa polifenol sebagai metabolit sekunder terdapat dalam vakuola tumbuhan (bagian dari sitoplasma) yang terbungkus oleh dinding sel. Dinding sel alga terdiri dari selulosa dan algin. Oleh karena itu, untuk mengekstrak antioksidan akan lebih mudah jika dilakukan degradasi selulosa terlebih dahulu. Degradasi komponen dinding sel tersebut dapat dilakukan dengan fermentasi menggunakan mikroba, diantaranya jamur *Trichoderma sp*. Pemilihan lama waktu fermentasi dan pH substrat yang tepat sangat menentukan jumlah antioksidan yang akan didapatkan. Dari paragraf diatas dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

- Apa pH dari sampel berpengaruh terhadap hasil rendemen dan aktivitas antioksidan dari *Sargassum filipendula*
- Apa lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap hasil rendemen dan aktivitas antioksidan dari *Sargassum filipendula*
- Apa pH dan lam waktu fermentasi berpengaruh terhadap hasil rendemen dan aktivitas antioksidan dari *Sargassum filipendula*

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini secara umum adalah untuk mengetahui pH dan lama inkubasi yang terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari *Sargassum filipendula*. Sedangkan secara khusus yaitu 1.) untuk menentukan pengaruh pH terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula* dengan penambahan konsentrasi biakkan *Trichoderma viride*, 2) untuk memperoleh pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari

Sargassum filipendula, 3) untuk menentukan pengaruh pH dan lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

- Derajat pH yang digunakan berpengaruh terhadap rendemen dan daya antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula*
- Lama waktu fermentasi yang digunakan pada sampel berpengaruh terhadap rendemen dan daya antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula*
- Derajat pH dan lama waktu fermentasi yang digunakan pada sampel berpengaruh terhadap rendemen dan daya antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula*

1.5. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga dan institusi lain mengenai manfaat senyawa antioksidan yang ada pada *Sargassum filipendula* dan masyarakat dapat memanfaatkan *Sargassum filipendula* sebagai alternatif antioksidan alami yang sangat potensial.

1.6. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari 2012-Maret 2013.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alga Coklat

Rumput laut adalah tumbuhan tingkat rendah yang tidak dapat dibedakan antara bagian akar, batang dan daun. Semua bagian tumbuhannya disebut *thallus*. Secara keseluruhan, tumbuhan ini mempunyai morfologi yang mirip, walaupun sebenarnya berbeda. Makroalga bentuknya yang seperti rumput terutama yang berukuran besar dan hidupnya dilaut, sehingga orang awam terutama kaum usahawan menyebutnya rumput laut. Sedangkan di kalangan ilmuwan atau akademisi, rumput laut dikenal dengan nama alga (Susanto, 2003)

Pada umumnya rumput laut dapat dikelompokkan menjadi empat kelas yaitu rumput laut hijau (*Chlorophyceae*), rumput laut hijau biru (*Cyanophyceae*), rumput laut coklat (*Phaeophyceae*), rumput laut merah (*Rhodophyceae*). Pembagian ini berdasarkan pigmen yang dikandungnya. Namun rumput laut merah dan coklat merupakan jenis yang komersil, dan rumput laut coklat merupakan rumput laut yang memiliki potensi untuk dikembangkan. Rumput laut coklat banyak dijumpai di perairan Indonesia terutama untuk jenis *Sargassum sp* (Hamid, 2009).

Phaeophyta disebut juga alga coklat, warna ini disebabkan xantofil yang dihasilkan melebihi karoten dan klorofil. Alga ini mempunyai pigmen fotosintetik yang terdiri atas klorofil a dan c, karoten, fukoxantin dan xantofil. Cadangan makanan di dalam selnya berupa laminarin dan manitol, dengan dinding sel tersusun dari selulosa, asam alginat, dan mukopolisakarida sulfat. Alga ini mempunyai dua flagela yang tidak sama panjang dengan letak lateral. Anggota kelompok ini terdiri lebih dari 200 genus dan 1500 spesies. Anggota alga ini yang banyak hidup di laut adalah genus *Sargassum sp*, *Macrocystis sp*, *Nereocystis sp*, dan *Laminaria sp*. Alga coklat ini dapat tumbuh dengan sangat cepat,

misalnya *Nereocystis sp* dapat mencapai panjang 40 meter dalam satu musim. Kebanyakan cara perkembangbiakan algae coklat sama dengan alga hijau *Ulva* (Wasetiawan, 2010).

Adapun komposisi kimia alga coklat dan kadar mineralnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia alga coklat

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

Sumber : Yunizal (1999).

2.2. *Sargassum Filipendula*

Ciri-ciri umum dari marga ini adalah bentuk *thallus* umumnya silindris atau gepeng, cabangnya rimbun menyerupai pohon didarat, bentuk daun melebar, lonjong, atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, panjang umunya mencapai 7 meter, warna *thallus* umumnya coklat. Komponen utama dari alga adalah karbohidrat (*sugars or vegetable gums*), sedangkan komponen lainnya yaitu protein, lemak, abu (sodium dan potassium) dan air 80-90% (Putri, 2011). *Sargassum* tersebar luas di Indonesia, tumbuh di perairan yang terlindung maupun yang berombak besar pada habitat batu. *Sargassum filipendula* ini hidup melekat pada batu karang dan dapat terlepas dari substratnya apabila ombak besar dan hanyut dipermukaan laut atau terdampar di permukaan pasir pantai. Jenis *Sargassum filipendula* pemanfaatannya sangat terbatas, bahkan masih dianggap sebagai sampah laut karena pada musim tertentu hanyut dipermukaan laut dan terdampar di pantai

karena tercabut atau patah akibat ombak yang besar atau karena perubahan musim (Crayonpedia, 2011)

Sargassum adalah salah satu genus dari kelompok rumput laut cokelat yang merupakan genera terbesar dari family *Sargassaceae*. Klasifikasi *Sargassum* menurut Bold dan Wayne (1985) adalah sebagai berikut :

Divisi	: Thallophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucalus
Famili	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>Sargassum filipendula</i>



Gambar 1. Alga Coklat (*Sargassum filipendula*)

2.3. Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan melibatkan peran mikroorganisme, atau bisa dikatakan fermentasi adalah segala macam proses metabolisme (enzim, jasad renik secara oksidasi maupun reduksi, hidrolisa atau reaksi kimia lainnya) yang melakukan perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk akhir. Tujuan dari fermentasi adalah menghasilkan suatu produk yang kandungan nutrisi, tekstur, *biological availability* lebih baik dari sebelumnya (Pujaningsih, 2005).

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

1. mikrobia
2. bahan dasar
3. sifat-sifat proses
4. *pilot-plant*
5. faktor sosial ekonomi

Fermentasi adalah segala macam proses metabolik dengan bantuan enzim dari mikroba (jasad renik) untuk melakukan oksidasi, reduksi, hidrolisa dan reaksi kimia lainnya sehingga terjadi perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk tertentu (Saono, 1976) dan menyebabkan terjadinya perubahan sifat bahan tersebut (Winarno *et al.*, 1979). Mikroba yang banyak digunakan sebagai inoculum fermentasi adalah kapang, bakteri, khamir dan ganggang. Pemilihan inokulum yang akan digunakan lebih berdasarkan pada komposisi media, teknik proses, aspek gizi dan aspek ekonomi

(Tannenbeum *et al.*,1975). Bahkan dewasa ini mikroba sebagai probiotik dengan berbagai merk dagang dapat diperoleh dengan mudah.

2.4. *Trichoderma viride*

Menurut Wahyudi (2008), *Trichoderma* adalah salah satu genus kapang yang sangat umum ditemui di biosfer Indonesia. Peranannya yang besar telah lama dikenal dalam dekomposisi bahan organik di hutan tropis. *Trichoderma* juga dapat digunakan dalam pengendalian hama jamur seperti *Fusarium sp.* Yang merusak tanaman budidaya. Selain dapat dimanfaatkan sebagai bahan biofungisida, *Trichoderma* juga dapat menghasilkan enzim komersial *Trichoderma* merupakan fungi multiseluler berbentuk filamen sehingga masuk kelompok kapang (*molds*). *Trichoderma* adalah genus dari Hypocreaceae yang mempunyai warna koloni hijau tua atau abu-abu.

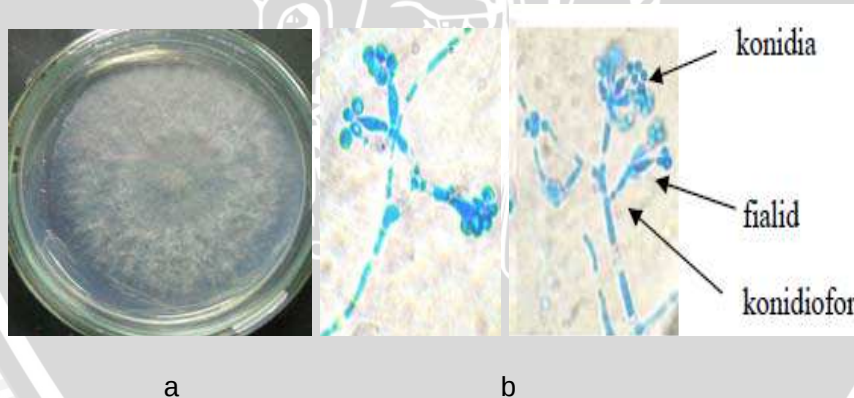
Trichoderma mempunyai koloni yang berwarna hijau muda sampai hijau tua. Konidia kapang tersebut bulat dan terusun seperti buah anggur. Tingkat pertumbuhannya cepat sehingga dalam empat atau lima hari koloninya sudah memenuhi cawan petri. *Trichoderma* termasuk kapang yang mudah ditemukan diberbagai substrat tanah. *Trichoderma* umum ditemukan sebagai komponen yang dominan pada mikroflora tanah terutama lapisan humus hutan maupun pertanian. *Trichoderma* merupakan biokontrol jamur fitopatogen genus tersebut menghasilkan enzim-enzim yang mampu melisiskan dinding sel jamur, seperti kitinase dan β -glukanase. Kitin dan glukan merupakan penyusun utama dinding sel jamur fitopatogen. Enzim kitinase dan glukanase menghidrolisis kitin dan glukan, sehingga hifanya mengalami lisis.

Trichoderma viride adalah kapang berfilamen yang sangat dikenal sebagai organisme selulolitik dan menghasilkan enzim-enzim selullolitik,

termasuk enzim selobiohidrolase, endoglukanase dan β -glukosidase (Deacon, 1997). Kelebihan dari *Trichoderma viride* selain menghasilkan enzim selulolitik yang lengkap, juga menghasilkan enzim xyloglukanolitik (Tribak *et al*; 2002). Keberadaan enzim ini akan semakin mempermudah enzim selulolitik dalam memecah selulosa. Secara lebih lengkap, klasifikasi *Trichoderma viride* adalah sebagai berikut :

Divisio : Mycophita
Classis : Deuteromycetes
Sub classis : Ascomycetes
Ordo : Hypocreales
Familia : Hypocreaceae
Genus : *Trichoderma*
Species : *Trichoderma viride*

Gambar dari koloni *Trichoderma viride* dan konidianya dapat dilihat pada Gambar 2 (Samingan, 2009) :



Gambar 2. *Trichoderma viride* a). koloni dalam cawan petri, b). konidia

Pada media PDA koloni yang berumur tujuh hari pada suhu ruang berdiameter 7 cm, berwarna putih, tekstur *felty cottony*, tepi koloninya tidak rata. Hifa *septat* berdiameter $\pm 2.5 \mu\text{m}$, konidiofor *hialin*, tegak dan panjangnya $\pm 7.85 \mu\text{m}$, fialid pendek dan tebal, konidium *globus* berdiameter $2.5 \times 3 \mu\text{m}$.

Pada medium agar dan pembiakan sintetik, suhu optimum adalah 20-28°C. Pada suhu 6°C dan 32°C kapang terlihat masih tumbuh dengan baik. Kisaran pH pertumbuhan kapang adalah selang pH 1,5 hingga 9 dengan pH optimum antara 5 dan 5,5 (Domsch dan Gams, 1972). Kisaran pH 3,0 – 7,0 adalah ideal bagi kebanyakan kapang. Untuk mengurangi kemungkinan tumbuhnya bakteri lebih disukai penggunaan pH 5,0 atau lebih rendah sebagai pH awal media. Kisaran suhu terbaik adalah pada 25-36°C dan laju pertanaman berkurang diatas kisaran ini (Lichfied, 1984).

2.5 Mekanisme Kerja *Trichoderma viride*

Menurut Martina (2002), jamur *Trichoderma viride* dari genus *Trichoderma* ini dikenal sebagai penghasil enzim hidrolitik, selulase, pektinase dan xilanase yang mampu mendegradasi polisakarida kompleks seperti selulosa, pektin, hemiselulosa dan xilan. Fungsi enzim selulase pada alga coklat yaitu untuk mendegradasi selulosa, hemiselulosa dan pektin. Selulase merupakan enzim kompleks yaitu bekerja secara sinergis satu sama lain.

Selulase yang diperoleh dari *Trichoderma viride* menunjukkan aktivitas yang optimum pada kisaran pH 4,5-5,5. Selanjutnya dikatakan bahwa pH optimum enzim yang sama dapat bervariasi, tergantung pada substratnya. Bahkan pada substrat yang sama, pH optimum dipengaruhi tipe assay yang digunakan (Kulp, 1975).

Menurut Miyamoto (1997) selulase terdiri dari tiga komponen enzim yang penting yaitu endoglukanase, selobiohidrolase dan β -glukosidase, yaitu :

1. Endoglukanase

Enzim ini berfungsi memotong secara acak ikatan selulosa menjadi selooligosakarida. Enzim ini aktif menyerang pada bagian selulosa yang tersubstitusi seperti CMC.

2. Selobiohidrolase/Eksoglukanase

Enzim ini menyerang ujung rantai selulosa non-pereduksi dan membebaskan selobiosa dari rantai selulosa.

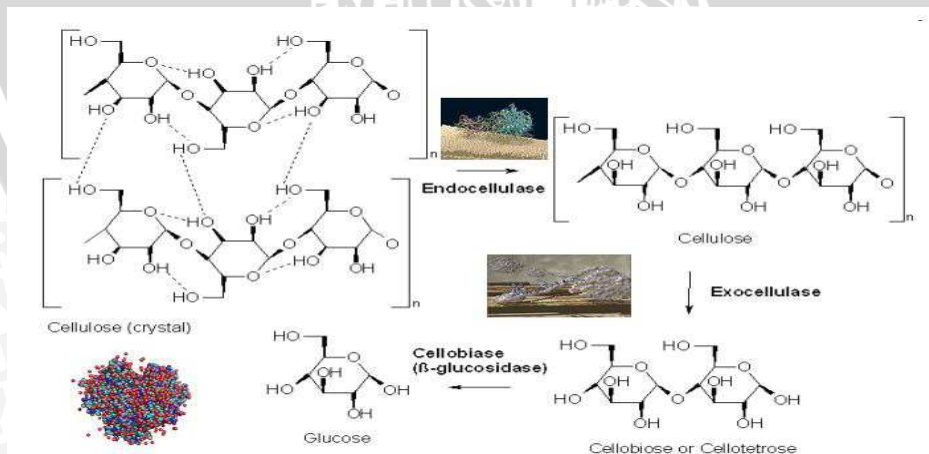
3. β -glukosidase

Enzim ini menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa.

Mekanisme kerja selulase adalah sebagai berikut :

1. Endoglukanase menyerang bagian selulosa yang amorf, membuka jalan bagi eksoglukanase.
2. Eksoglukanase (Selobiohidrolase) menyerang bagian selulosa yang telah terbuka oleh endoglukanase membebaskan selobiosa dari serat selulosa.
3. Terjadi kerjasama antara endoglukanase dan eksoglukanase merombak selulosa menjadi selo-oligosakarida dan selobiosa.
4. β -glukosidase mengubah selobiosa yaitu hasil kerjasama antara endoglukanase dan eksoglukanase menjadi glukosa.

Gambar berikut adalah mekanisme kerja selulase pada degradasi komponen selulosa menjadi glukosa (Anil 2008).



Gambar 3. Mekanisme kerja selulase (Anil 2008)

Hidrolisis enzim selulase ditentukan oleh struktur substrat. Struktur kristal lebih sulit dihidrolisis dibandingkan dengan struktur amorf maka hidrolisis

dilakukan oleh enzim endoselulase atau endoglukanase (Coughlan 1985). Pengukuran aktivitas selulase lengkap dilakukan untuk mengukur aktivitas campuran enzim yang menghidrolisis bahan yang mengandung selulosa dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhirnya (Darwis et al.,1995).

2.6. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung koroner, katarak, penuaan dini. Oleh karena itu, tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Andayani et al., 2008).

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

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

2.7. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik). Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dan antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan (Kuncahyo dan Sunardi, 2007).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat oksidasi radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Senyawa fenolik dan flavonoid merupakan sumber antioksidan alami yang biasanya terdapat dalam tumbuhan. Adanya kandungan flavonoid mendorong untuk melakukan pengujian aktivitas antioksidan sehingga dapat digunakan sebagai antioksidan alami (Oktariana, 2008).

Antioksidan dapat didefinisikan sebagai suatu senyawa yang dapat menunda, memperlama dan mencegah kerusakan atau ransiditas makanan yang dikarenakan proses oksidasi. Antioksidan dapat menghambat atau memperlambat oksidasi melalui 2 jalur, yaitu (1) melalui penangkapan radikal bebas (*free radikal-scavenging*). Antioksidan jenis ini disebut dengan antioksidan primer. Termasuk dalam jenis ini adalah senyawa-senyawa fenolik seperti galat dan flavonoid, (2) tanpa melibatkan penangkapan radikal bebas. Antioksidan ini disebut dengan antioksidan sekunder yang mekanismenya melalui pengikatan logam, menyerap sinar ultraviolet dan mendeaktivasi oksigen *single*. Antioksidan dapat menghambat atau menunda proses oksidasi dengan konsentrasi yang rendah (Pribadi, 2009).

Antioksidan adalah zat penghambat reaksi oksidasi akibat radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan asam lemak tak jenuh, membran dinding sel, pembuluh darah, basa DNA, dan jaringan lipid sehingga menimbulkan penyakit. Suatu tanaman dapat memiliki aktivitas antioksidan apabila mengandung senyawa yang mampu menangkal radikal bebas seperti fenol dan flavonoid. Radikal bebas dalam jumlah normal bermanfaat bagi kesehatannya misalnya memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah serta organ-organ dalam tubuh. Sementara dalam jumlah berlebih mengakibatkan stress oksidatif (Widyastuti, 2010).

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

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

2.8. Mekanisme Kerja Antioksidan

Mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai

antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil (Gordon,1990).

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi (Gambar 4). Menurut Gordon (1990), radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru .

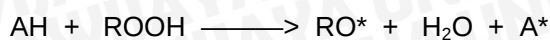


Radikal lipida



Gambar 4. Reaksi Penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida (Gordon 1990).

Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan (Gambar 5). Pengaruh jumlah konsentrasi pada laju oksidasi tergantung pada struktur antioksidan, kondisi dan sampel yang akan diuji.



Gambar 5. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi (Gordon 1990)

2.9. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyari tertentu. Ada beberapa metode ekstraksi yaitu, cara dingin yang meliputi maserasi dan perkolasi. Sedangkan cara panas meliputi refluks, digesti, infuse, dekok dan sokletasi (Simanjuntak, 2008).

Menurut Maulida dan Naufal (2010), ekstraksi adalah suatu metoda operasi yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah massa bahan (*solven*) sebagai tenaga pemisah. Apabila komponen yang akan dipisahkan (*solute*) berada dalam fase padat, maka proses tersebut dinamakan pelindihan atau *leaching*. Proses pemisahan dengan cara ekstraksi terdiri dari tiga langkah dasar, yaitu (1) proses pencampuran sejumlah massa ke dalam larutan yang akan dipisahkan komponen-komponennya, (2) proses pembentukan fase seimbang, (3) proses pemisahan kedua fase seimbang.

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

2.10. 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 dan sifat-sifat bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut

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

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

Tabel 3. Sifat-Sifat Pelarut Umum

Solvent	Rumus kimia	Titik didih	Konstanta Dielektrik	Massa jenis
Pelarut Non-Polar				
Heksana	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69 °C	2.0	0.655 g/ml
Benzena	C_6H_6	80 °C	2.3	0.879 g/ml
Toluena	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$	111 °C	2.4	0.867 g/ml
Dietil eter	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35 °C	4.3	0.713 g/ml
Kloroform	CHCl_3	61 °C	4.8	1.498 g/ml

Etil asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	77 °C	6.0	0.894 g/ml
Pelarut Polar Aprotik				
1,4-Dioksana	$\text{/ -CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$	101 °C	2.3	1.033 g/ml
Tetrahidrofuran (THF)	$\text{/ -CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	66 °C	7.5	0.886 g/ml
Diklorometana (DCM)	CH_2Cl_2	40 °C	9.1	1.326 g/ml
Asetona	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	56 °C	21	0.786 g/ml
Asetonitril (MeCN)	$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$	82 °C	37	0.786 g/ml
Dimetilformamida (DMF)	$\text{H-C(=O)N(CH}_3)_2$	153 °C	38	0.944 g/ml
Dimetil sulfoksida (DMSO)	$\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$	189 °C	47	1.092 g/ml
Pelarut Polar Protik				
Asam asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118 °C	6.2	1.049 g/ml
<i>n</i> -Butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118 °C	18	0.810 g/ml
Isopropanol (IPA)	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_3$	82 °C	18	0.785 g/ml
<i>n</i> -Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	97 °C	20	0.803 g/ml
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79 °C	30	0.789 g/ml
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65 °C	33	0.791 g/ml
Asam format	H-C(=O)OH	100 °C	58	1.21 g/ml
Air	H-O-H	100 °C	80	1.000 g/ml

Pengertian dari polar protik dan aprotik adalah Protik menunjukkan atom hidrogen yang menyerang atom elektronegatif yang dalam hal ini adalah oksigen. Dengan kata lain pelarut protik polar adalah senyawa yang memiliki rumus umum ROH. Contoh dari pelarut protik polar ini adalah air H_2O , metanol CH_3OH , dan asam asetat (CH_3COOH). Aprotik menunjukkan molekul yang tidak mengandung ikatan O-H. Pelarut dalam kategori ini, semuanya memiliki ikatan yang memiliki ikatan dipol besar. Biasanya ikatannya merupakan ikatan ganda antara karbon

dengan oksigen atau nitrogen. Contoh dari pelarut yang termasuk kategori ini adalah aseton $[(CH_3)_2C=O]$ dan etil asetat $(CH_3CO_2CH_2CH_3)$ (Iyalangkar, 2012).

Pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi harus memenuhi syarat tertentu, yaitu tidak toksik, tidak meninggalkan residu, harganya murah, tidak korosif, aman dan tidak mudah meledak. Jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi akan mempengaruhi jenis bahan yang akan terekstrak. Kelarutan suatu senyawa dalam pelarut tergantung dari gugus-gugus yang terikat pada pelarut tersebut. Pelarut yang mempunyai gugus hidroksil (alkohol) dan karbonil (keton) termasuk pelarut polar, sedangkan hidrokarbon termasuk ke dalam non polar (Nurmillah, 2009).

Larutan pengekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa yang diinginkan. Larutan pengekstraksi yang digunakan saat proses ekstraksi yaitu ethanol. Ethanol, disebut juga etil alkohol adalah sejenis cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna. Etanol termasuk ke dalam alkohol rantai tunggal, dengan rumus kimia C_2H_5OH dan rumus empiris C_2H_6O . Ia merupakan isomer konstitusional dari dimetil eter. Etanol sering disingkat menjadi EtOH, dengan "Et" merupakan singkatan dari gugus etil (C_2H_5). Sifat kimia dari ethanol banyak dipengaruhi dari gugus hidroksilnya (Vogel, 1987).

2.11. Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan

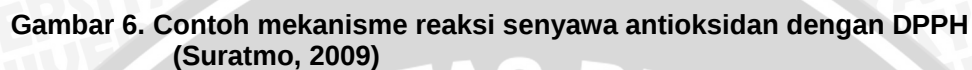
Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikan keseimbangannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh

sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein atau jaringan lemak (Praptiwi *et al.*, 2006).

Metode yang paling sering digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan tanaman obat adalah metode uji dengan menggunakan radikal bebas DPPH. Tujuan metode ini adalah mengetahui parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% efek aktivitas antioksidan (IC_{50}) (Edhisambada, 2012).

Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode *1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl* (DPPH) terhadap *edible seaweed* seperti nori, kumbu, wakame dan *hyiki* menunjukkan rumput laut tersebut mengandung antioksidan yang cukup tinggi. Kandungan antioksidan pada rumput laut terutama berupa senyawa antioksidatif polifenol (Suryaningrum, 2006).

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 satu radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH terdapat pada Gambar 6 (Suratmo, 2009).


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

23

Pengukuran antioksidan secara “efek peredaman radikal bebas DPPH” merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode yang lain (xanthin-xanthin oxidase, metode tiosianat, antioksidan total). Pada metode ini, DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut dan membentuk *1,1-difenil-2-pikril hidrazil*. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga aktivitas peredaman dapat ditentukan. Jika absorbansi sampel lebih besar daripada absorbansi blanko, maka sampel tidak aktif sebagai antioksidan (Juniarti *et al.*, 2009).

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

2.12. Kandungan *Sargassum filipendula* Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan

1. Senyawa Fenol

Fenol meliputi berbagai senyawa yang berasal dari tumbuhan dan mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatic yang mengandung satu atau dua

gugus hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya berikatan dengan gula sebagai glikosida (Putri, 2011).

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

2. Alkaloid

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

3. Flavonoid

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

Flavonoid merupakan golongan terbesar dan senyawa polifenol. Flavonoid umumnya terdapat pada tumbuhan dan terikat pada gula sebagai glikosida aglikon flavonoid. Flavonoid sangat efektif sebagai antioksidan (Putri, 2011).

Flavonoid memberikan kontribusi keindahan dan kesemarakkan pada buah-buahan di alam. Flavon memberikan warna kuning atau jingga, antosianin memberikan warna merah, ungu atau biru, yaitu semua warna yang terdapat

pada pelangi kecuali hijau (Sastrohamidjojo, 1996). Flavonoid pada tumbuhan berfungsi dalam pengaturan tumbuh, pengaturan fotosintesis, kerja antimikroba dan antivirus dan kerja terhadap serangan (Robinson, 1995).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Alga coklat *Sargassum filipendula* segar diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Rumput laut dipanen dari daerah budidaya dan pada saat pemanenan bahan dicuci dengan air laut. Sampel dicuci untuk membersihkan sisa lumpur, pasir dan kotoran lainnya yang masih melekat. Sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik warna hitam untuk menghindari kontak dengan sinar matahari agar tidak terjadi pigmentasi (pencoklatan). Sampel dimasukkan ke dalam *coolbox* lalu diberi es balok dan bagian luar *coolbox* disegel dengan lakban untuk mempertahankan suhu rendah dalam *coolbox* selama proses transportasi. Selang waktu pengangkutan dari tempat pemanenan ke laboratorium adalah sehari semalam.

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi antioksidan alga coklat *Sargassum filipendula* yaitu pelarut ethanol teknis. Digunakan pelarut ethanol karena ethanol memiliki kepolaran yang hampir sama dengan karakteristik antioksidan pada *Sargassum filipendula*. Bahan lain yang digunakan adalah air yang digunakan pada *waterbath* pada saat proses pengentalan ekstraksi (pemisahan pelarut dari ekstrak) dengan *vacuum rotary evaporator*. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji DPPH adalah serbuk DPPH (*1,1 diphenil-2-pikrilhidrazil*) sebesar 20 mg. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk uji fitokimia adalah sebagai berikut; Uji Alkaloid yaitu HCL 2N, dan 6 ml aquadest; Uji Fenol yaitu 20 ml etanol 96%, larutan FeCl_3 ; Uji Flavonoid serbuk magnesium (Mg) dan 2 ml HCL 2N.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam maserasi (ekstraksi) senyawa antioksidan dari alga coklat *Sargassum filipendula* adalah baskom, nampan, pisau, tisu, talenan, blender, timbangan analitik, beaker glass 500 ml, erlenmeyer 500ml, gelas corong, spatula, gelas ukur 100ml, pipet volume 5ml, bola hisap, pH meter dan *shaker*. Alat-alat yang digunakan pada saat pemisahan pelarut dari ekstrak adalah 1 unit *rotary vacuum evaporator* dan botol vial. Adapun alat-alat yang digunakan untuk uji DPPH adalah botol vial, erlenmeyer 250 ml, beaker glas 100 ml, bola hisap, pipet volume 10 ml dan pipet volume 5 ml. Untuk identifikasi senyawa fitokimia digunakan alat beaker glass 100 ml, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan gelas ukur.

3.2 Metode Penelitian

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

Eksperimen dalam penelitian ini yaitu pengaruh perbedaan pH (3,5; 4,5 dan 5,5) dan lama waktu (6, 9 dan 12 hari) fermentasi *Trichoderma viride* terhadap aktivitas antioksidan terhadap ekstrak kasar *Sargassum filipendula*, untuk mengetahui apakah perbedaan pH dan lama inkubasi yang berbeda

berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahapan ,yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

3.2.1.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma Viride*

Pembuatan kurva tumbuh digunakan untuk menentukan fase pertumbuhan jamur *Trichoderma viride* yang akan diinokulasi. Kurva fase pertumbuhan dibuat berdasarkan perhitungan jumlah koloni / ml PDB dengan menggunakan haemocytometer.

- Disiapkan jamur *Trichoderma viride* dan media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) untuk penanaman sebanyak 2.4 gram dan 100 ml aquadest
- Setiap labu erlenmeyer diisi 1.2 gram PDB dan dilarutkan dalam 50 ml aquadest dan diulangi sebanyak dua kali
- Dua labu *erlenmeyer* yang telah berisi media PDB direbus dalam panci lalu disterilisasi untuk membersihkan dari kontaminan
- Setelah disterilisasi, disiapkan jamur *Trichoderma viride* yang telah tumbuh di media PDA untuk ditanam ke media PDB dan *dishaker*
- Dihitung jumlah koloni (spora) / ml setiap hari selama 7 hari. Menurut Arnata (2009), kurva pertumbuhan *T. viride* ditentukan dengan diamati setiap hari selama 7 hari dengan menggunakan haemocytometer (Zubaidah, 2006)
- Diperoleh data, selanjutnya dibuat grafik kurva pertumbuhan

3.2.1.2 Perlakuan dan Rancangan Penelitian

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui lama waktu fermentasi yang tepat untuk inkubasi sampel. Perlakuan yang diberikan adalah waktu fermentasi secara alami dengan penambahan starter jamur pada fase stasioner yang telah diinkubasi pada suhu kamar selama 6 hari dan pertumbuhan maksimal ditentukan dengan membuat kurva pertumbuhan pada fase stasioner

yang diamati setiap hari selama 7 hari (Arnata, 2009), yang dilakukan selama 6, 9 dan 12 hari serta 0 hari sebagai kontrol. Penelitian pendahuluan ini menggunakan 2 ulangan sehingga data yang didapat berupa data utama dan ulangan. Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 2 faktor (faktor W dan faktor P) yang terdiri dari 3 level . Model matematika dari penelitian ini yaitu :

$$y_{ijk} = \mu + w_i + p_j + (w_i p_j) + \varepsilon_{ijk}$$

μ adalah rata-rata umum, w_i adalah faktor w dengan level i, p_j adalah faktor p dengan level j, $(w_i p_j)$ adalah korelasi antara faktor w_i dan p_j , dan ε_{ijk} adalah galat dari semua faktor. Faktor yang digunakan adalah faktor lama inkubasi (W) dan faktor konsentrasi pH (P) 3,5 (P1) ; 4,5 (P2) dan 5,5 (P3) dengan penambahan jamur *Trichoderma viride*. Level yang digunakan yaitu 6, 9 dan 12 hari. Rancangan penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. RAL (Rancangan Acak Lengkap)

No.	Lama Inkubasi (hari)	pH		
		pH 3,5 (P1)	pH 4,5 (P2)	pH 5,5 (P3)
1.	0 (W1)	(W1P1) ₁ (W1P1) ₂	(W1P2) ₁ (W1P2) ₂	(W1P3) ₁ (W1P3) ₂
2.	6 (W2)	(W2P1) ₁ (W2P1) ₂	(W2P2) ₁ (W2P2) ₂	(W2P3) ₁ (W2P3) ₂
3.	9 (W3)	(W3P1) ₁ (W3P1) ₂	(W3P2) ₁ (W3P2) ₂	(W3P3) ₁ (W3P3) ₂
4.	12 (W4)	(W4P1) ₁ (W4P1) ₂	(W4P2) ₁ (W4P2) ₂	(W4P3) ₁ (W4P3) ₂

3.2.1.3 Prosedur Penelitian

Prosedur Penelitian ini adalah :

- Sampel *Sargassum filipendula* segar dicuci bersih selama 5 menit untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran dan mineral pengotor yang masih menempel pada bahan.

- Sampel ditiriskan lalu dipotong kecil-kecil menggunakan gunting dan blender untuk memperluas permukaan bahan dan mempermudah proses maserasi bahan
- Ditimbang dengan timbangan digital sebanyak 10 gram untuk tiap perlakuan
- Tiap sampel dimasukkan ke dalam Beaker glass 50ml, ditambahkan asam asetat pada setiap sampel hingga didapatkan pH 3,5; 4,5 dan 5,5 pada masing-masing sampel
- Ditambahkan konsentrasi biakan jamur *Trichoderma viride* sebanyak 2 ml pada masing-masing sampel
- Ditutup dengan alufo yang telah diberi lubang-lubang kecil lalu difermentasi selama 6, 9, 12 hari dan 0 hari sebagai kontrol
- Sampel dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 24 jam
- Disaring dengan kertas saring kasar lalu dipisahkan antara pelarut dan sampel menggunakan *vacuum rotary evaporator* selama ± 3 jam
- Didapatkan ekstrak kasar *Sargassum filipendula* lalu diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Sunarni, 2005)

3.2.1.4 Parameter Uji

Parameter yang digunakan untuk mengetahui mutu dan aktivitas antioksidan dari sampel adalah rendemen (Suryaningrum *et al.*, 2006), nilai *inhibition concentration 50* (IC₅₀) (Suryaningrum *et al.*, 2006), uji fitokimia (Harbone, 1987), pH dan kadar air (Sudarmadji *et al.*, 2007). Hasil terbaik dari penelitian pendahuluan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan waktu lama fermentasi untuk penelitian utama.

3.2.2 Penelitian Utama

Penelitian utama mengambil standar acuan dari perlakuan terbaik pada penelitian pendahuluan. Penelitian utama ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang terbaik dengan pemberian perlakuan lama fermentasi dan perbedaan pH pada sampel dengan penambahan jamur *Trichoderma viride*.

3.2.2.1. Perlakuan dan Rancangan Penelitian

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

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan yang digunakan. Perlakuan yang pertama yaitu faktor derajat keasaman pH (P) 3 (P1) ; 4 (P2) dan 5 (P3) dengan penambahan jamur *Trichoderma viride*. Perlakuan kedua yaitu faktor lama inkubasi (W) dengan level 7 hari (W1), 9 hari (W2) dan 11 hari (W3). Variabel terikat penelitian ini adalah parameter yang diamati, yaitu nilai *inhibition concentration 50* (IC₅₀) dari sampel dengan perlakuan yang berbeda-beda.

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

$$y_{ijk} = \mu + w_i + p_j + (w_i p_j) + \varepsilon_{ijk}$$

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

Tabel 5. RAL Faktorial

No.	Lama Inkubasi (hari)	pH		
		pH 3 (P1)	pH 4 (P2)	pH 5 (P3)
1.	0 (W1)	(W1P1) ₁ (W1P1) ₂	(W1P2) ₁ (W1P2) ₂	(W1P3) ₁ (W1P3) ₂
2.	7 (W2)	(W2P1) ₁ (W2P1) ₂	(W2P2) ₁ (W2P2) ₂	(W2P3) ₁ (W2P3) ₂
3.	9 (W3)	(W3P1) ₁ (W3P1) ₂	(W3P2) ₁ (W3P2) ₂	(W3P3) ₁ (W3P3) ₂
4.	11 (W4)	(W4P1) ₁ (W4P1) ₂	(W4P2) ₁ (W4P2) ₂	(W4P3) ₁ (W4P3) ₂

Pada penelitian ini menggunakan lama inkubasi 7, 9 dan 11 hari. Menurut Arnata (2009), aktivitas selulase yang maksimal dihasilkan setelah fermentasi selama 7 hari dari jamur *Trichoderma viride*. Sedangkan perlakuan fermentasi selama 9 dan 11 hari digunakan sebagai pembanding. Selain itu, pH yang digunakan yaitu 3, 4 dan 5. pH tersebut merupakan pH terbaik dalam degradasi selulosa pada rumput laut *Sargassum filipendula* yang diperoleh dari hasil penelitian pendahuluan sebelumnya. Sedangkan pH 3 dan 5 digunakan sebagai pembanding.

3.2.2.2 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan pada penelitian utama adalah parameter kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh dari hasil perhitungan IC₅₀, yaitu senyawa antioksidan berhasil memberikan penghambatan 50% karakter radikal yang diekstraksi dari sampel. Sebagai pembanding (kontrol) dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing pelarut untuk mengetahui apakah zona hambat yang dihasilkan berasal dari daya antioksidan ekstrak itu sendiri atau berasal dari pelarutnya yang memang hakikatnya sudah memiliki daya antioksidan dan hasil identifikasi fitokimia berupa senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik. Selain itu juga, dilakukan uji kadar air untuk mengetahui kadar air ekstrak kasar *Sargassum filipendula*, total fenolat dan analisa kadar alginat dari sisa sampel hasil maserasi yang berupa supernatan.

3.2.2.3 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dilakukan analisis RAL (Rancangan Acak Lengkap). Dari parameter ini akan didapatkan grafik yang menunjukkan nilai respon optimum dari pH, lama waktu fermentasi terhadap kadar air, rendemen, aktifitas antioksidan (IC 50) dan total fenol.

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Pembuatan starter dan peremajaan jamur *Trichoderma viride*

- Cawan petri, labu erlenmeyer 250ml dan jarum ose dicuci bersih kemudian dioven dengan suhu 35°C untuk menghilangkan air
- Untuk penanaman pertama, diambil serbuk media PDA (*Potatoes dextrose agar*) sebanyak 1,755 gram untuk dilarutkan ke dalam 45ml aquadest lalu dimasukkan kedalam labu erlenmeyer 250ml
- Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 15 menit dengan tekanan 0.1 MPa
- Media PDA lalu dituang kedalam cawan petri yang telah disterilisasi lalu dibiarkan dingin agar menggejel
- Lalu jamur *Trichoderma viride* diambil dari stok menggunakan jarum ose lalu ditanam pada media PDA dengan posisi terbalik
- Diinkubasi dalam *incase* dan ditunggu selama 1 minggu
- Setelah jamur tumbuh merata, disiapkan media PDB (*Potatoes dextrose broth*) untuk penanaman kedua sebanyak 7,2 gram dan dilarutkan dalam 300ml aquadest
- Pisau dan labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci kemudian disterilisasi untuk mencegah dari kontaminan

- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan jamur *trichoderma viride* yang telah tumbuh dimedia PDA untuk ditanam ke media PDB dengan menggunakan pisau
- Lalu diinkubasi selama 6 hari pada fase stasioner agar jamur tumbuh secara merata sambil tiap hari digoyang-goyang labunya dengan menggunakan shaker agar nutrient yang mengendap bisa tercampur merata.

3.2.3.2 Fermentasi Alga coklat (*Sargassum filipendula*)

- *Sargassum filipendula* segar dicuci memakai air mengalir untuk membersihkan sampel dari sisa-sisa mineral dan pengotor yang masih menempel pada sampel
- Setelah dicuci, diangin-anginkan hingga kering
- Setelah kelihatan kering *Sargassum filipendula* dipotong kecil-kecil menggunakan gunting dan blender untuk memperluas permukaan sampel dan mempermudah proses maserasi
- Setelah dipotong kemudian ditimbang 50 gram setiap sampelnya
- Diatur pH sampel dengan ditambahkan asam asetat hingga mencapai pH 3, 4 dan 5
- Ditambahkan konsentrasi biakan *Trichoderma viride* dengan perbandingan konsentrasi biakan : substrat = 5%/50gr
- Sampel diinkubasi atau difermentasi dalam jangka waktu 7, 9 dan 11 hari

3.2.3.3 Ekstraksi *Sargassum filipendula* (Suryaningrum, et al., 2006)

- Semua sampel dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 24 jam dan dishaker. Perbandingan antara sampel dan pelarut yaitu 1:3
- Setelah dimaserasi sampel disaring menggunakan kertas saring kasar
- Sisa residu dibuang sedangkan filtratnya di rotary dengan *rotary vacuum evaporator* suhu 40°C untuk memisahkan antara pelarut dengan sampel
- Setelah terpisah, ekstrak sampel dihitung rendemennya dengan rumus :

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

- Lalu ekstrak dianalisa kadar aktivitas antioksidan dan total fenol

3.2.4 Prosedur Analisis Parameter

3.2.4.1 Perhitungan Koloni Jamur dengan Haemocytometer

Dalam metode *petroff hauser*, hitungan mikroskopik dilakukan dengan pertolongan kotak-kotak skala dimana dalam setiap ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 25 buah kotak besar dengan luas 0.04 mm² dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil. Tinggi sampel yang terletak diantara gelas obyek dan gelas penutup adalah 0.02 mm². Jumlah setiap sel dalam beberapa kotak besar dihitung, kemudian dihitung jumlah sel rata-rata dalam satu kotak besar. Jumlah sel per ml sampel dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{Jumlah sel rata - rata tiap petak} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Luas petak (mm}^2\text{)} \times \text{kedalaman petak (mm}^2\text{)}}$$

Catatan : Bila jumlah sel setiap petak terlalu banyak, maka suspensi diencerkan dengan larutan pengencer steril sampai jumlah sel setiap petak sekitar 50. (Zubaidah, 2006)

3.2.4.2 Uji Antioksidan (DPPH)

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak kasar etanol dari *Sargassum filipendula* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode Blois (1958). Ekstrak etanol dari *Sargassum filipendula* dilarutkan dalam etanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 3 ml. Kedalam tiap botol vial ditambahkan 1 ml larutan DPPH 1mM dalam etanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus:

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

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

3.2.4.3 Uji Fitokimia (Harbone, 1987)

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

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

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

Uji kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah air bebas ekstrak sampel dalam etanol 96%. Uji yang dilakukan berdasarkan metode *Thermogravimetri* (Sudarmadji *et al.*, 1997) yaitu dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu $105-110^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam atau didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Prosedurnya yaitu sampel yang telah diketahui beratnya dimasukan dalam botol timbang yang juga telah diukur beratnya lalu dimasukan 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

B = Berat sampel

C = Berat akhir (Botol timbang + sampel)

3.2.4.5 Uji Total Fenol

Kandungan total fenol diukur dengan spektrofotometer menggunakan reagen *Follin-Ciocalteau* (Yangthong *et al.*, 2009). Ekstrak rumput laut segar sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 1 ml etanol 96% dalam tabung reaksi. Ditambahkan 5 ml aquades, 0,5 ml reagen *Folin-Ciocalteau* (50% v/v) dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 ml larutan natrium karbonat (5% b/v), dihomogenasi dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dalam kondisi tanpa cahaya (gelap). Kandungan total fenol diukur dengan spektrofotometer UV-Visible (UV-Vis) pada panjang gelombang 725 nm. Standar asam galat yang digunakan menggunakan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm. Serapan standar tersebut kemudian diukur panjang gelombangnya dan dibuat kurva kalibrasi dari hubungan antara konsentrasi asam galat dengan absorbansi. Kandungan total fenol diinterpretasikan sebagai milligram ekivalen asam galat (GAE = *Galic Acid Equivalent*) per gram sampel (mg GAE/g sampel).

Cara perhitungan total fenol, dari persamaan linier standar asam galat dimasukkan absorbansi sampel

- Y = nilai absorbansi

a = 0.008 (nilai yang tertera pada grafik data asam galat dari persamaan

$$Y = 0.008x + 0.018)$$

b = 0.018 (nilai yang tertera pada grafik data asam galat dari persamaan

$$Y = 0.008x + 0.018)$$

x = nilai hasil dari persamaan regresi

- Absorbansi sampel misalnya 0.678

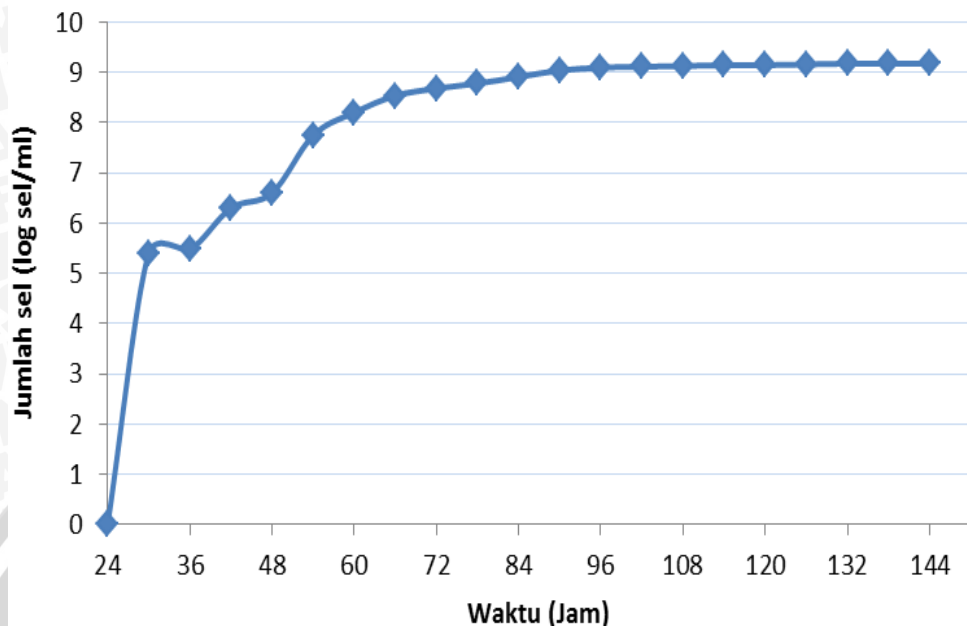
$$X = \frac{0.678 - 0.018}{0.008} = 82.5 \text{ mg GAE/g sampel}$$

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Fase Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Pertumbuhan *Trichoderma viride* dapat diketahui dengan melihat kurva fase pertumbuhan jamur *Trichoderma viride* yang akan diinokulasi. Kurva fase pertumbuhan dibuat berdasarkan perhitungan jumlah koloni / ml PDB dengan menggunakan *haemocytometer*. Menghitung jumlah koloni (spora) / ml setiap hari selama 7 hari. Menurut Arnata (2009), kurva pertumbuhan *T. viride* ditentukan dengan diamati setiap hari selama 7 hari dengan menggunakan *haemocytometer* dan diamati setiap 6 jam sekali (Zubaidah, 2006). Hasil perhitungan jumlah koloni/ ml jamur *Trichoderma viride* dapat dilihat pada Lampiran 1.

Hasil perhitungan jumlah koloni jamur *Trichoderma viride* didapatkan fase stasioner pada hari ke 5 dan ke 6. Dengan jumlah sel spora pada hari ke 5 sebesar $1,5 \times 10^9$ spora/ml dan pada hari ke 6 jumlah sel spora sebesar $1,5 \times 10^9$. Dapat disimpulkan pada hari ke 5 atau 6 jamur *Trichoderma viride* dapat digunakan dalam proses fermentasi pada *Sargassum filipendula*. Sehingga diharapkan dapat bekerja untuk memecah dinding sel dari *Sargassum filipendula* untuk memecah senyawa bioaktif yang terkandung dalam rumput laut. Menurut Arnata (2009), melaporkan bahwa aktivitas maksimal *filter paperase* diperoleh setelah fermentasi selama 7 hari. Pertumbuhan kapang *T. viride* sudah optimal, sehingga kemampuan untuk menghasilkan selulase menjadi meningkat.



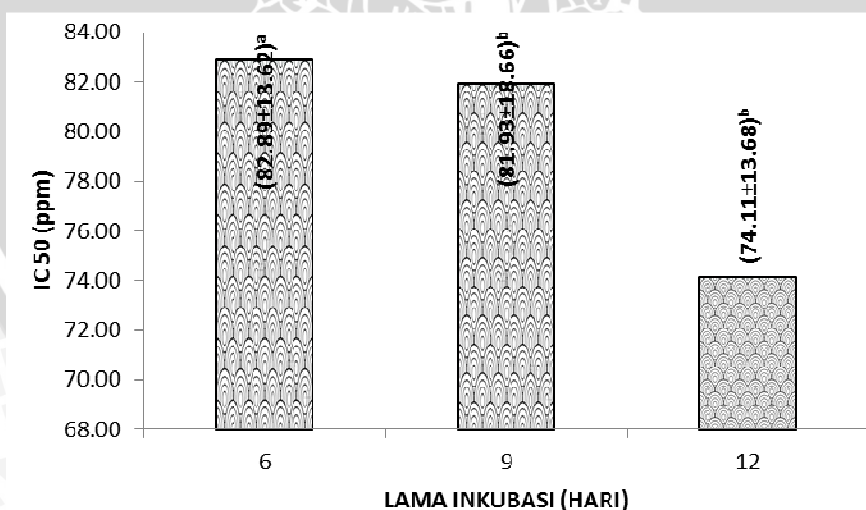
Gambar 7. Kurva pertumbuhan jamur *Trichoderma viride*

Berdasarkan kurva tersebut, hari pertama dan kedua merupakan fase adaptasi. Hari ketiga sampai hari kelima merupakan fase eksponensial yang ditandai dengan kenaikan jumlah koloni jamur dari *Trichoderma viride* signifikan, hal tersebut mengindikasikan bahwa pada range waktu tersebut *Trichoderma viride* membelah dengan cepat. Hari kelima sampai hari keenam merupakan fase stasioner. Metabolit yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* pada fase stasioner adalah metabolit sekunder. Dari hasil penelitian, fase stasioner pertumbuhan koloni *T. viride* setelah kultivasi selama 7 hari dengan jumlah koloni maksimum rata-rata $1,5 \times 10^9/\text{ml}$ atau 9.18 log/ml . Hal ini yang mendasari dilakukannya massa panen pada fase stasioner yang berada pada hari keenam. Fase stasioner berakhir pada saat jumlah sel menurun disebut fase kematian.

4.2. Penelitian Pendahuluan

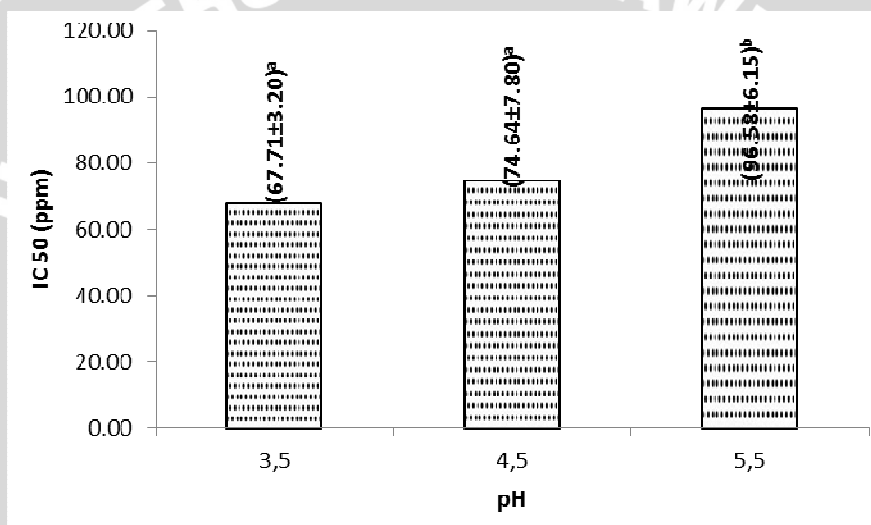
Pada penelitian pendahuluan parameter yang digunakan sebagai penentu aktivitas antioksidan suatu bahan atau simplisa adalah nilai IC_{50} . Menurut Suryaningrum *et al.*, (2006), IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*) adalah konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Nilai IC_{50} ekstrak kasar *Sargassum filipendula* yang difermentasi secara alami dari hasil penelitian pendahuluan.

Hasil perhitungan analisis terhadap IC_{50} ekstrak etanol 96% *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 2. Hasil ANOVA IC_{50} dipengaruhi secara nyata oleh ($p < 0,05$), baik perlakuan pengaruh pH maupun lama inkubasi; sedangkan interaksi kedua perlakuan tidak berpengaruh nyata ($p > 0.05$). Hasil uji lanjut IC_{50} perlakuan lama inkubasi dapat dilihat pada Gambar 8. Perlakuan dengan nilai IC_{50} terendah terdapat pada perlakuan lama inkubasi 9 hari sebesar 81.93, sedangkan nilai IC_{50} tertinggi terdapat pada perlakuan lama inkubasi 6 hari sebesar 82.89.



Gambar 8. Nilai IC_{50} perlakuan lama inkubasi ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Hasil uji lanjut IC_{50} perlakuan pH dapat dilihat pada Gambar 8. Perlakuan dengan nilai IC_{50} terendah terdapat pada perlakuan pH 3,5 sebesar 67.71, sedangkan nilai IC_{50} tertinggi terdapat pada perlakuan pH 5.5 sebesar 96.58. Salah satu faktor yang mempengaruhi berlangsungnya proses fermentasi adalah pH. Pertumbuhan *T. viride* optimal pada pH sekitar 4 sedangkan untuk produksi enzim selulase mendekati pH 3. Karakteristik dari enzim selulase adalah memiliki pH optimum 4 dan akan tetap stabil pada pH 3 – 7. Suhu optimum adalah 50°C dan aktivasinya akan menurun jika suhunya lebih dari 50°C (Waluyo, 2004).



Gambar 9. Nilai IC_{50} perlakuan pH ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Semakin tinggi nilai IC_{50} suatu sampel, maka aktivitas antioksidannya semakin kecil, karena nilai IC_{50} dan aktivitas antioksidan berbanding terbalik. Secara keseluruhan, aktivitas antioksidan ekstrak *Sargassum filipendula* yang terfermentasi berada diatas sampel kontrol. Dari hasil penelitian pendahuluan ini, maka dapat diketahui bahwa pengaruh perbedaan pH (3,5; 4,5 dan 5,5) dan lama waktu (6, 9 dan 12 hari) fermentasi *Trichoderma viride* pada masing-masing sampel *Sargassum filipendula* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari sampel.

Aktivitas antioksidan pada sampel penelitian masih tergolong antara (kuat) dan (sedang), karena nilai IC_{50} -nya sekitar 67.71-96.58 ppm. Menurut Zuhra *et al.*, (2008), senyawa antioksidan dikategorikan dalam empat golongan yaitu sangat kuat (IC_{50} antara 1-50ppm), kuat (IC_{50} antara 50-100ppm), sedang (IC_{50} antara 100-150ppm) dan lemah (IC_{50} antara 150-200ppm). Jika IC_{50} lebih dari 200ppm maka tidak berpotensi sebagai senyawa antioksidan.

Kestabilan aktivitas antioksidan terhadap pH rendah densitas ion hidrogen dalam medium meningkat sehingga menekan pelepasan ion hidrogen dari senyawa fenolik. Jadi hidrogen dalam medium sudah berfungsi sebagai donor untuk menstabilkan radikal (Tensiska *et al.*, 2003) . Pandangan yang lain dikemukakan oleh Haserhuetil dan Wan (1992), bahwa asam dapat mengakatalis dekomposisi peroksida sehingga pada emulsi dengan tingkat keasaman yang tinggi, peroksida yang terdeteksi rendah.

Dari hasil penelitian pendahuluan, didapatkan hasil waktu fermentasi yang terbaik untuk menginkubasi sampel adalah waktu fermentasi selama 9 hari dengan nilai IC_{50} sebesar 81.93 dan pH 3,5 dengan nilai IC_{50} sebesar 67.71 ppm, sehingga waktu ini yang dipakai sebagai acuan dasar pemilihan lama waktu fermentasi dan pH untuk penelitian utama. Karena sampel yang difermentasi dengan jamur *Trichoderma viride* selama 9 hari dengan pH 3,5 didalam media PDB maka mikroorganisme alami dan enzim yang ada pada alga coklat semakin banyak menguraikan komponen dinding sel alga coklat sehingga hasil yang didapatkan juga meningkat. Menurut Santoso (2009), didalam semua tanaman, baik tanaman didaratan maupun perairan, terdapat mikroorganisme alami yang menempel pada substrat. Mikroorganisme ini akan menghasilkan enzim sebagai hasil metabolisme tubuh untuk menguraikan substrat yang telah membusuk.

4.3 Penelitian Utama

Penelitian utama mengambil acuan dasar dari hasil terbaik penelitian pendahuluan sebelumnya. Pada tahap penelitian utama ditambahkan perlakuan berupa penambahan konsentrasi jamur *Trichoderma viride* dengan pengaturan pH dan perlakuan lama waktu fermentasi yang berbeda. Sampel yang telah terfermentasi secara struktur telah berubah bentuk yaitu dari sampel kasar dan kenyal menjadi sampel yang lebih halus dan agak lembek. Hal ini mengindikasikan bahwa jamur *Trichoderma viride* telah berhasil menghasilkan enzim selulase untuk mendegradasi komponen dinding sel alga coklat *Sargassum filipendula*. Sampel yang terfermentasi selanjutnya dilakukan proses ekstraksi. Hasil proses ekstraksi didapatkan warna dominan coklat tua.

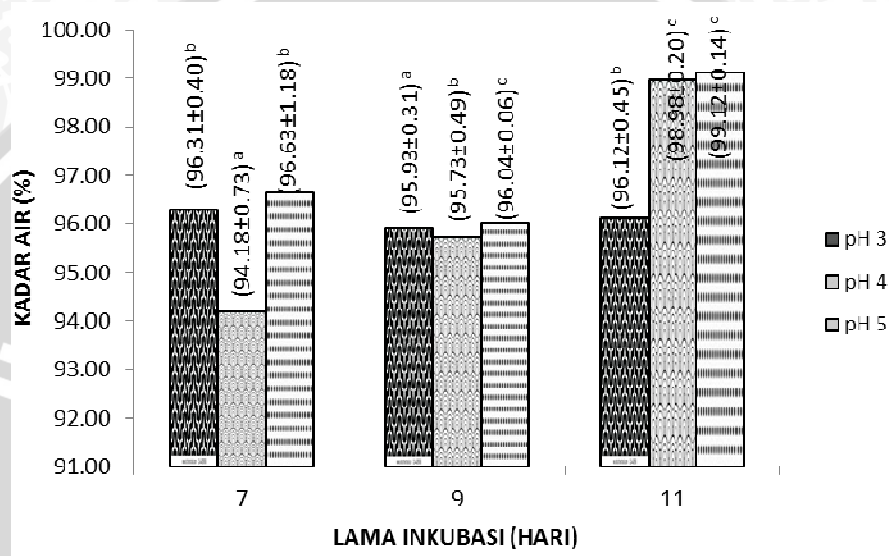
4.3.1 Kadar air dan Rendemen

4.3.1.1 Kadar air

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

Perhitungan analisis terhadap persen kadar air ekstrak etanol 96% *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 3. Hasil ANOVA kadar air *Sargassum filipendula*, dipengaruhi secara nyata oleh ($p < 0,05$), baik perlakuan pengaruh pH maupun lama inkubasi dan interaksi kedua perlakuan ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut kadar air perlakuan dapat dilihat pada Gambar 10. Perlakuan dengan persen kadar air terendah terdapat pada perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan pH 4 sebesar 94.18, sedangkan persen kadar air tertinggi terdapat pada perlakuan lama inkubasi 11 hari dengan pH 5 sebesar 99.12. Salah satu faktor yang mempengaruhi berlangsungnya proses fermentasi adalah pH. Dari hasil

yang didapat pH 4 menghasilkan persenkadar air lebih rendah dibandingkan dengan yang lain. Menurut Enari (1983), bahwa *T. viride* dapat tumbuh optimal pada suhu 32-35°C serta pH sekitar 4. Sehingga pertumbuhan sangat cocok pada substrat yang banyak mengandung polisakarida dan karbohidrat kompleks seperti selulosa, hemiselulosa dan pektin.



Gambar 10. Kadar air ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Pada persen kadar air dan persen rendemen sampel saling berhubungan. Nilai rendemen tinggi belum tentu berkualitas tinggi dan lebih banyak senyawa bioaktif yang dihasilkan, karena jika kadar airnya juga tinggi maka konsentrasi ekstrak yang didapatkan rendah. Perlakuan yang berbeda antara lama waktu inkubasi dan pengaturan pH *Trichoderma viride* memberikan hasil persen rendemen dan persen kadar air yang berbeda-beda juga. Semakin besar nilai pH maka semakin tinggi persen kadar air yang dihasilkan. Selain itu, persen kadar air tinggi juga dapat disebabkan pada waktu mengekstraksi ekstrak kasar menggunakan alat *rotary evaporator*. Hal tersebut dapat mempengaruhi jumlah persen kadar air pada ekstrak kasar sampel *Sargassum filipendula* semakin bertambah. Penggunaan suhu pada saat proses evaporasi dilakukan dibawah

titik didih pelarut (78,4⁰C). Menurut Sudarmadji, *et al.*, (2003), suhu yang digunakan untuk pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* sebaiknya dibawah titik didih pelarut, hal ini untuk mencegah terjadinya kerusakan komponen yang terkandung dalam ekstrak.

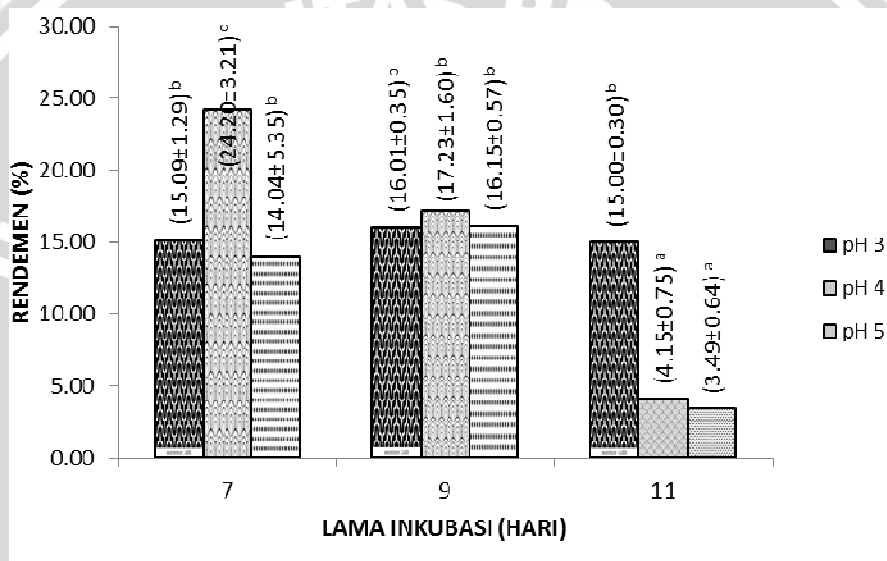
Selain itu, lama inkubasi juga mempengaruhi hasil persen kadar air. Semakin lama masa inkubasi jumlah jamur semakin menurun sehingga nutrisi yang ada tidak mencukupi sehingga jamur banyak yang mati. Maka jamur memerlukan air sedikit sehingga mengakibatkan kadar air tinggi.

4.3.1.2 Rendemen

Hasil ekstraksi yang berbeda, berupa penambahan konsentrasi jamur *Trichoderma viride* dengan pengaturan pH dan perlakuan lama waktu fermentasi yang berbeda menunjukkan nilai rendemen yang berbeda-beda. Rendemen ekstrak merupakan perbandingan antara bobot ekstrak kasar yang dihasilkan dengan bobot awal yang digunakan dan nilainya dinyatakan dalam bentuk persen. Persen rendemen menunjukkan seberapa banyak ekstrak yang bisa diambil dari sampel. Semakin besar persen rendemen maka semakin banyak ekstrak senyawa bioaktif yang didapatkan.

Perhitungan analisis terhadap persen rendemen ekstrak ethanol 96% *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 3. Hasil ANOVA rendemen antioksidan, dipengaruhi secara nyata oleh pH ($p < 0.05$), jumlah rendemen juga dipengaruhi oleh lama inkubasi dan interaksi kedua perlakuan ($p < 0.05$). Hasil uji lanjut persen rendemen dapat dilihat pada Gambar 11. Perlakuan dengan persen rendemen terendah terdapat pada perlakuan lama inkubasi 11 hari dengan pH 5 sebesar 3.50, sedangkan persen rendemen tertinggi terdapat pada perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan pH 4 sebesar 24.20. Hal tersebut diduga karena proses hidrolisis berjalan secara optimal sebab jamur telah mencapai titik

optimum dalam menghasilkan enzim selulase yang terjadi di range pH 3-4 mulai dari awal proses fermentasi sampai hari ketujuh, sehingga hidrolisis selulosa berlangsung maksimal dan menghasilkan rendemen yang lebih banyak. Hal ini sesuai dengan pernyataan Waluyo (2004), bahwa pertumbuhan *T. viride* optimal pada pH sekitar 4 sedangkan untuk produksi enzim selulase mendekati pH 3. Selama produksi enzim, pH harus dipertahankan dalam kisaran 3-4 karena inaktivasi enzim akan terjadi di bawah pH 2.



Gambar 11. Rendemen ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Rendemen dan kadar air saling berhubungan. Rendemen tinggi belum tentu berkualitas tinggi karena jika kadar airnya rendah maka konsentrasi ekstrak yang didapatkan juga rendah. Menurut Arnata (2009), melaporkan bahwa aktivitas maksimal *filter paperase* diperoleh setelah fermentasi selama 7 hari. Pertumbuhan jamur *T. viride* sudah optimal, sehingga kemampuan untuk menghasilkan selulase menjadi meningkat. Menurut Enari (1983), bahwa *T. viride* dapat tumbuh optimal pada suhu 32-35°C serta pH sekitar 4. Sehingga pertumbuhannya sangat cocok pada substrat yang banyak mengandung polisakarida dan karbohidrat kompleks seperti selulosa, hemiselulosa dan pektin.

Seperti ditunjukkan gambar grafik persen rendemen, bahwa hasil rendemen yang terbaik ditunjukkan pada lama fermentasi selama 7 hari dengan pH 4 yaitu 24,20% yang membuktikan bahwa semakin bagus sehingga dapat memecah senyawa bioaktif yang ada didalam *Sargassum filipendula*. Penentuan rendemen berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terbawa oleh pelarut tersebut namun tidak dapat menentukan jenis senyawa yang terbawa tersebut (Ukieyanna, 2012).

4.4 Aktivitas Antioksidan

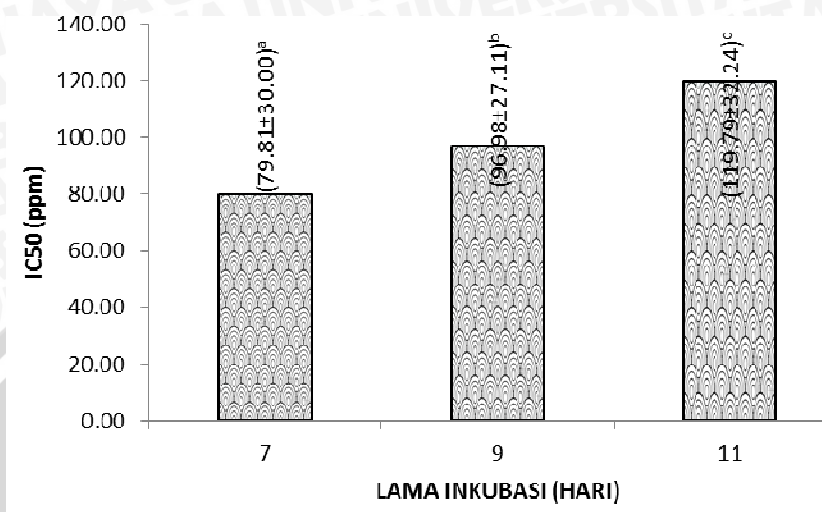
Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena merupakan metode yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu singkat (Hanani E, 2005). Hasil dari metode DPPH umumnya dibuat dalam bentuk IC_{50} (*Inhibitor Concentration 50*), yang didefinisikan sebagai konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan tereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin besar aktivitas antioksidan maka nilai IC_{50} akan semakin kecil. Molyneux (2004) menyatakan bahwa .Suatu senyawa antioksidan dinyatakan baik jika nilai IC_{50} -nya semakin kecil. IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Suryaningrum *et al.*, 2006). Prinsip uji dengan metode ini yaitu DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk *1,1-difenil-2-pikrilhidrazin*. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning atau kuning gelap yang dapat diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 517 nm, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Sunarni, *et al.*, 2005).

Indikasi terjadi perubahan warna ungu menjadi warna kuning pada reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh ekstrak *Sargassum filipendula*, membuktikan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antioksidan. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Molyneux, (2004), Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi warna kekuningan. Tingkat diskolorisasi warna ungu DPPH mengindikasi aktivitas penghambatan radikal bebas oleh sampel antioksidan Abdille *et al.*, (2004).

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

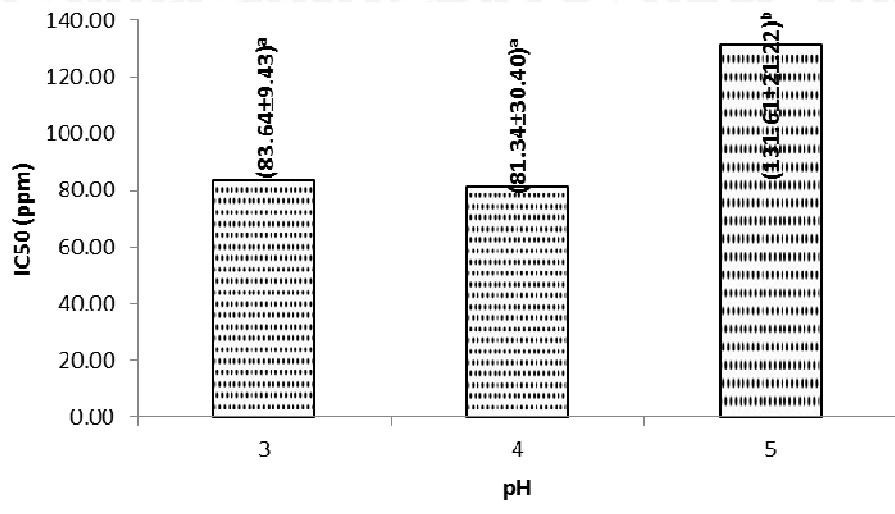
Hasil perhitungan analisis terhadap IC_{50} ekstrak etanol 96% *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 4. Hasil ANOVA IC_{50} dipengaruhi secara nyata oleh ($p < 0,05$), baik perlakuan pengaruh pH maupun lama inkubasi; sedangkan interaksi kedua perlakuan tidak berpengaruh nyata ($p > 0.05$). Hasil uji lanjut IC_{50} perlakuan lama inkubasi dapat dilihat pada Gambar 12. Perlakuan dengan nilai IC_{50} terendah terdapat pada perlakuan lama inkubasi 7 hari sebesar

79.82, sedangkan nilai IC_{50} tertinggi terdapat pada perlakuan lama inkubasi 11 hari sebesar 119.79.



Gambar 12. Nilai IC_{50} perlakuan lama inkubasi ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Hasil uji lanjut IC_{50} perlakuan pH dapat dilihat pada Gambar 13. Perlakuan dengan nilai IC_{50} terendah terdapat pada perlakuan pH 4 sebesar 81.34, sedangkan nilai IC_{50} tertinggi terdapat pada perlakuan pH 5 sebesar 131.61. Salah satu faktor yang mempengaruhi berlangsungnya proses fermentasi adalah pH. Pertumbuhan *T. viride* optimal pada pH sekitar 4 sedangkan untuk produksi enzim selulase mendekati pH 3. Karakteristik dari enzim selulase adalah memiliki pH optimum 4 dan akan tetap stabil pada pH 3 – 7. Suhu optimum adalah 50°C dan aktivasinya akan menurun jika suhunya lebih dari 50°C (Waluyo, 2004).



Gambar 13. Nilai IC₅₀ perlakuan pH ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Menurut grafik diatas, secara keseluruhan aktivitas antioksidan ekstrak *Sargassum filipendula* masih tergolong antioksidan sangat kuat karena nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm. Menurut Zuhra, *et al.*, (2008), IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC₅₀ bernilai 50-100 ppm, sedang jika IC₅₀ bernilai 100-150 ppm dan lemah jika nilai IC₅₀ sebesar 151-200 ppm. Penggunaan pengaturan pH pada *Trichoderma viride* berpengaruh terhadap aktivitas senyawa antioksidan yang diekstrak dari *Sargassum filipendula*. Menurut Enari (1983), bahwa *T. viride* dapat tumbuh optimal pada suhu 32-35°C serta pH sekitar 4. Jika pH terlalu rendah (<4) atau asam maka jamur tidak dapat mendegradasi dinding sel secara maksimal, karena lingkungan substrat sangat berpengaruh terhadap aktivitas jamur untuk menghasilkan enzim selulase. Sehingga senyawa antioksidan yang dihasilkan tidak banyak dan baik.

Kestabilan aktivitas antioksidan terhadap pH rendah densitas ion hidrogen dalam medium meningkat sehingga menekan pelepasan ion hidrogen dari senyawa fenolik. Jadi hidrogen dalam medium sudah berfungsi sebagai donor untuk menstabilkan radikal (Tensiska *et al.*, 2003). Pandangan yang lain dikemukakan oleh Haserhuetil dan Wan (1992), bahwa asam dapat mengakatalis dekomposisi peroksida sehingga pada emulsi dengan tingkat keasaman yang tinggi, peroksida yang terdeteksi rendah.

Menurut Arnata (2009), melaporkan bahwa aktivitas maksimal *filter paperase* diperoleh setelah fermentasi selama 7 hari. Pertumbuhan kapang *T. viride* sudah optimal, sehingga kemampuan untuk menghasilkan selulase menjadi meningkat. Jika fermentasi dilakukan lebih dari 7 hari maka, hasil hidrolisis semakin sedikit. Hal ini diakibatkan nutrisi pada substrat telah habis sehingga proses hidrolisis tidak berlangsung. Seperti dikemukakan Ukieyanna (2012), beberapa penelitian menunjukkan hubungan antara banyaknya fenolik total atau flavonoid total yang dikandung maka semakin efektif aktivitas antioksidan yang dihasilkan.

4.5 Total Fenol

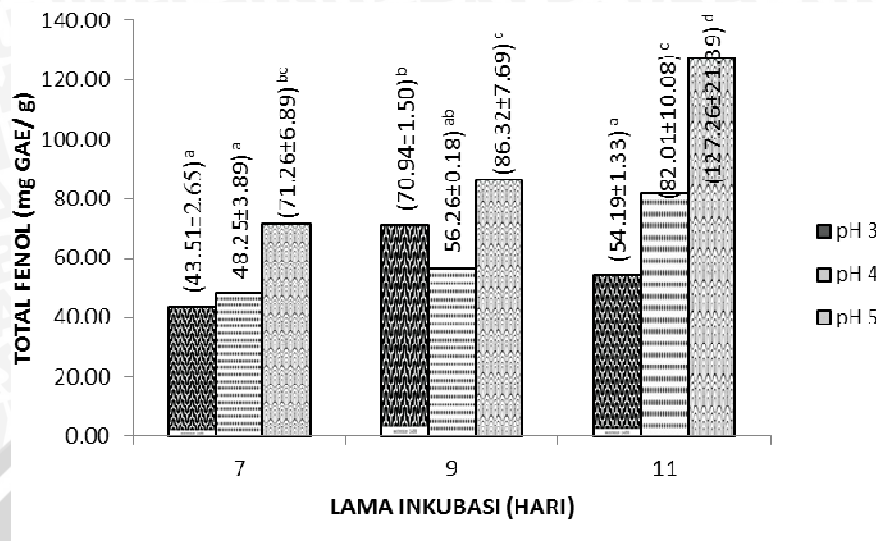
Hasil ekstraksi yang berbeda, antara penambahan konsentrasi jamur *Trichoderma viride* dengan pengaturan pH dan perlakuan lama waktu fermentasi, menunjukan nilai total fenol yang berbeda-beda. Semakin besar persen total fenol maka semakin bagus kualitas ekstrak yang dihasilkan.

Menurut Harbone (1987), Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua penyulih hidroksil. Umumnya mudah larut dalam air karena sering berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Senyawa polifenol contohnya fenil propanoid, tanin,

flavonoid, dan beberapa terpenoid. Senyawa fenol merupakan kelas utama antioksidan yang berada dalam tumbuh-tumbuhan (Marinova *et al.* 2005).

Pengujian aktivitas fenolik total merupakan dasar dilakukan pengujian aktivitas antioksidan, karena diketahui bahwa senyawa fenolik berperan mencegah terjadinya oksidasi. Pada penelitian diukur dengan menggunakan prinsip *Folin-Ciocalteu* yang didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi. Reagen Folin terdiri dari asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat akan tereduksi oleh senyawa polifenol menjadi molybdenum-tungsten (Kusumaningati, 2009). Reaksi ini membentuk kompleks warna biru. Semakin tinggi kadar fenolik pada sampel, semakin banyak molekul kromagen (biru) yang terbentuk sehingga semakin tinggi nilai absorbansi pada sampel tersebut. Intensitas warna yang dibentuk diukur pada panjang gelombang 725 nm. Asam galat digunakan sebagai standart pengukuran dikarenakan asam galat (*3,4,5-trihydroxybenzoic acid*) merupakan salah satu antioksidan alami. Asam galat termasuk dalam senyawa fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Lee *et al.*, 2003).

Perhitungan analisis terhadap persen total fenol ekstrak ethanol 96% *Sargassum filipendiula* disajikan pada Lampiran 5. Hasil ANOVA total fenol *Sargassum filipendula*, menerangkan bahwa dipengaruhi secara nyata oleh ($p < 0,05$), baik perlakuan pengaruh pH maupun lama inkubasi; dan interaksi kedua perlakuan ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut total fenol dapat dilihat pada Gambar 14. Perlakuan dengan nilai total fenol terendah terdapat pada perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan pH 3 sebesar 43.51, sedangkan nilai total fenol tertinggi terdapat pada perlakuan lama inkubasi 11 hari dengan pH 5 sebesar 127.26. Diperkuat Demirel *et al.*, (2009), total fenol pada alga coklat berkisar antara 0.4 ± 0.2 mg GAE/g sampai dengan 189.6 ± 8.6 mg GAE/g.



Gambar 14. Nilai total fenol ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride*

Salah satu faktor yang mempengaruhi berlangsungnya proses fermentasi adalah pH. pH awal substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pH 4. Menurut Enari (1983), bahwa *T. viride* dapat tumbuh optimal pada suhu 32-35°C serta pH sekitar 4. Sehingga pertumbuhannya sangat cocok pada substrat yang banyak mengandung polisakarida dan karbohidrat kompleks seperti selulosa, hemiselulosa dan pektin. Kestabilan aktivitas antioksidan terhadap pH rendah densitas ion hidrogen dalam medium meningkat sehingga menekan pelepasan ion hidrogen dari senyawa fenolik. Jadi hidrogen dalam medium sudah berfungsi sebagai donor untuk menstabilkan radikal (Tensiska *et al.*, 2003). Pandangan yang lain dikemukakan oleh Haserhuetil dan Wan (1992), bahwa asam dapat mengkatalis dekomposisi peroksida sehingga pada emulsi dengan tingkat keasaman yang tinggi, peroksida yang terdeteksi rendah.

Lama inkubasi fermentasi juga mempengaruhi jumlah fenol yang dihasilkan oleh *Sargassum filipendula*. Menurut Arnata (2009), melaporkan bahwa aktivitas maksimal *filter paperase* diperoleh setelah fermentasi selama 7 hari. Pertumbuhan kapang *T. viride* sudah optimal, sehingga kemampuan untuk

menghasilkan selulase menjadi meningkat. Jika fermentasi dilakukan lebih dari 7 hari maka, hasil hidrolisis semakin sedikit. Hal ini diakibatkan nutrisi pada substrat telah habis sehingga proses hidrolisis tidak berlangsung.

Total fenol dengan aktivitas antioksidan memiliki keterkaitan erat. Semakin tinggi nilai total fenol maka semakin tinggi kemampuan antioksidan dalam mendonorkan elektromya sehingga semakin tinggi kemampuannya dalam menekan perkembangan radikal bebas, semakin meningkat kemampuan mereduksi, dan semakin meningkat kemampuannya dalam menghambat oksidasi lipid lanjut (Sandrasari, 2008).

Namun dari hasil penelitian yang didapat hubungan aktivitas antioksidan dan nilai total fenol tidak berkorelasi, melainkan berbanding berbalik. Hal ini dapat terjadi karena ekstrak yang didapat masih tergolong ekstrak kasar sehingga diduga masih terdapat senyawa pengganggu seperti protein dan senyawa lainnya yang menghalangi proses penangkapan radikal bebas. Kemurnian suatu sampel saat proses ekstraksi mempengaruhi aktivitas antioksidan tersebut (Ukieyanna, 2012). Pernyataan juga dikemukakan Pine (1988), adanya senyawa protein atau lemak pada tumbuhan dapat mengganggu proses penangkapan radikal bebas oleh senyawa fenolik atau flavonoid. Protein atau lemak pada tumbuhan dapat memberikan atom hidrogen yang dimilikinya sehingga berikatan dengan radikal hidroksil pada DPPH.

4.6 Perlakuan Terbaik

Dasar perlakuan terbaik dari pengaruh pH dan lama inkubasi dengan penambahan *Trichoderma viride* terhadap *Sargassum filipendula* ditentukan dengan perhitungan aktivitas antioksidan sampel yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Perlakuan yang pertama yaitu perbedaan waktu fermentasi dengan starter jamur *Trichoderma viride* selama 7, 9, dan 11 hari. Sedangkan perlakuan yang

kedua yaitu penambahan pH yang berbeda yaitu pH 3, 4 dan 5 pada tiap sampel. Tiap perlakuan diulangi sebanyak 2 kali ulangan. Berdasarkan data penelitian yang diperoleh, perlakuan yang terbaik adalah perlakuan fermentasi dengan pH 4 selama 7 hari diperoleh nilai IC_{50} masing-masing sebesar 81.34 ppm dan 79.82 ppm dikatakan sebagai antioksidan kuat karena nilai IC_{50} sekitar 50-100 ppm dibandingkan perlakuan kontrol dengan nilai IC_{50} sebesar 165.96 ppm dengan perbandingan 50.99% dan 51.90%. Menurut Zuhra, *et al.*, (2008), IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang jika IC_{50} bernilai 100-150 ppm dan lemah jika nilai IC_{50} sebesar 151-200 ppm. Aktivitas antioksidan dihitung melalui nilai IC_{50} , semakin kecil nilai IC_{50} yang dihasilkan maka semakin besar aktivitas antioksidan yang dimiliki (Panjaitan, *et al.*, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *Sargassum filipendula* yang difermentasi dengan pH 4 selama 7 hari dapat menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50% pada perlakuan tersebut.

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

4.7 Analisis fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa-senyawa fitokimia di dalam sampel *Sargassum fillipendula*. Analisis fitokimia dilakukan terhadap hasil terbaik dari semua perlakuan yaitu ekstrak kasar sampel yang difermentasi selama 7 hari dengan pH 4. Hasil dari uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Fitokimia ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula*

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

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa *Sargassum fillipendula* yang difermentasi dengan pH 4 selama 7 hari, positif mengandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid dan fenol. Alkaloid adalah senyawa alami amina, baik pada tanaman, hewan, ataupun jamur dan merupakan produk yang dihasilkan dari proses metabolisme sekunder, dimana saat ini diketahui sebanyak 5500 jenis alkaloid (Harbone, 1987). Pada umumnya basa bebas alkaloida hanya larut dalam pelarut organik meskipun beberapa pseudoalkaloida dan protoalkaloida larut dalam air (Sastrohamidjojo, 1996).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- pH 4 terhadap *Trichoderma viride* meningkatkan aktivitas antioksidan yang diekstrak dari alga coklat *Sargassum filipendula* dengan nilai IC_{50} sebesar 50.99%.
- Lama inkubasi 7 hari meningkatkan aktivitas antioksidan yang diekstrak dari alga coklat *Sargassum filipendula* dengan nilai IC_{50} sebesar 51.90%.
- Perlakuan terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari alga coklat yaitu perlakuan pH 4, lama inkubasi 7 hari dan nilai total fenol 48.25 mg GAE/g sampel serta pengujian fitokimia memberikan hasil positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan fenolik

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut agar menggunakan lama waktu inkubasi dan konsentrasi pH yang tepat serta jamur yang sesuai agar ekstrak *Sargassum filipendula* yang didapatkan semakin meningkat aktivitas antioksidannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdille HMD, Singh RP, Jaya Prakasha GK, Jena BS. 2004. Antioxidant Activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Journal of Food Chemistry*. 90: 891-896.
- Abdul, M. 2003. Peranan Radikal Bebas dan Antioksidan Dalam Kesehatan dan Penyakit. <http://www.Intisari.com/radikal.html>. Diakses tanggal 30 Maret 2011.
- Andayani, R., Yovita L., dan Maimunah. 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L). Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang, Sumatra Barat.
- Andarwulan, N., Wijaya, H., Cahyono, D. T. 1996. Aktivitas Antioksidan dari Daun Sirih (*Piper betle* L). *Teknologi dan Industri Pangan*, VII. 1. 29-30.
- Anil, A. 2008. Advances in Glycosyl Hydrolases for Improved Biomass Conversion: Theory and Practice. Training Course and Summer School on Next Graduation Biofuels. Institute of Chemical Technology.
- Arnata, I. W. 2009. Pembuatan Bioetanol Dari Ubi Kayu Menggunakan Kultur Campuran *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Prosiding Seminar Nasional FTP UNUD. ISBN :978-602-8659-02-4. Hal 242.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant Determinations by The Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181, pp. 1199-1200.
- Bold dan Wayne, M. 1985. Introduction to the Algae Structure and Reproduction Second Edition. New Jepsey : Rentice Hall.
- Coughlan, M.P. 1985. The Properties of Fungal and Bacteria Cellulases With Comment on Their Production and Application. *Biotechnology Genetic Enggining*. Review 3, 39-109.
- Crayonpedia. 2012. *Sargassum fillipendula*. http://www.Crayonpedia.org/Sargassum_fillipendula/htm. Diakses tanggal 15 Juli 2012.
- Darwis, A. A., I. Sailah, T. T. Irawadi, dan Safriani. 1995. Kajian Kondisi Fermentasi Produksi Selulase dari Limbah Kelapa Sawit (Tandan Kosong dan Sabut) oleh *Neurospora sitophila*. *J. Teknol. Ind. Pert.* 5(3) : 199-207.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern Micology*. Blackwell Science. New York.
- Demirel Z., Ferda F.Y.K, Ulku N.K, Guven O. dan Atakan S. 2009. Antimicrobial And Antioxsidant Activity of Brown Algae From The Aegean Sea. *Journal the Serbian Chemical Society*. 74 (6) 619-628 (2009) JSCS-3860.

- DKP Sumenep, 2007. Potensi *Sargassum* sp di Kepulauan Madura. <http://www.DKPSumenep.com.html>. Diakses pada tanggal 1 Mei 2012 pukul 19.00.
- Domsch, K.H., dan W. Gams. 1972. Fungi in Agricultural Soils. Longman Group Limited Publishing. London.
- Edhisambada. 2012. *Antioksidan*. <http://edhisambada.wordpress.com>. Diakses pada tanggal 6 Mei 2012 Pukul 09.30 WIB.
- Fujimoto, Y., H. Uno, C. Kagen, T. Ueno dan T. Fujita. 1985. Effect of Diarachidonin on Prostaglandin Ez Synthesis in Rabbit Kidney Medulla Slices. *Biochemical Journal*. Page 625.
- Gordon, M.H 1990. The mechanism of antioxidants action in vitro. Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London
- Hamid, Huzaifah. 2009. *Phaeophyta*. <http://zaifbio.wordpress.com/2009/01/30/phaeophyta-algae-coklat/> Diakses tanggal 15 Februari 2012.
- Hanani, E., Abdul, M., Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp dari Kepulauan Seribu. Departemen Farmasi, FMIPA-UI, Kampus UI Depok. Jakarta.
- Harborne. J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediso, penerbit ITB, Bandung. 69-94, 142-158, 234-238.
- Hasenhuetti, G.L and P.J. Wan. 1992. Temperature Effects on The Determination of Oxidative Stability With the Methrom Rancimat. *JAOCS* 69: 525-527.
- Indraswari, A. 2008. Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L) Menggunakan Metode Maserasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Iyalangkar. 2012. Pelarut Polar dan Non Polar. <http://pelarut-polar-dan-non-polar.html>. Diakses pada tanggal 6 Juni 2013 pukul 19.44 WIB.
- Javanmardi, J., C. Stushnoff. E. Locke, and J.M. Vivanco. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of iranian ocimum accessions. *Elsevier. Food.Chem.* 83:547-550.
- Juniarti, Delvi O. dan Yuhernita. 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (*1,1-diphenil-2-pikrilhydrazil*) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.). Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta, Indonesia.
- Kulp, K. 1975. Carbohydrases. Di dalam G. Reed (ed.) *Enzyme in Food Processing*. academia Press. New York.

- Kuncahyo, I. dan Sunardi. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhua belimbi.L*) Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). Seminar Nasional Teknologi. ISSN 1977-1978.
- Kusumaningati, RW. 2009. Analisa Kandungan Fenol Total Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Secara In Vitro. Fakultas Kedokteran. UI. Jakarta.
- Lee, KW. Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemical and A Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. Journal Agric. Food Chem. 51 (25): 7292-7295.
- Lichfield, J. H. 1984. Single-cell Protein Di dalam Sarjoko (ed.). Bioteknologi : Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Maulida, D. dan Naufal Z. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) Dari Buah Tomat Dengan Menggunakan Solven Campuran, n-Heksana, Aseton dan Etanol. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Martina, A. 2002. Ptimasi Beberapa Faktor Fisik Terhadap Laju Degradasi Selulosa Kayu Albasia (*Paraserianthes falcataria* (L.). Jurnal Natur Indonesia 4, 2:156-163.
- Mega, I Made, dan Dewa A. 2010. Screening Fitokimia dan Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak Metanol dan Gaharu (*Gyrinops versteegii*). Jurnal Kimia 4 (2) Juli 2010.
- Miyamoto, K. 1997. Renewable Biological System For Alternative Sustainable Senergy Production. *FAO Agricultural Services Bulletin* 128.
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. Songklanakarin J.Sci. Technol. 26 (2). Halaman 211-219.
- Montgomery. 2001. Design and Analysis of Experiments. Notice of the AMS.
- Mukhopadhiay, M. 2000. Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide> CRC Press. London. New York.
- Nazir. 1988. Metode Penelitian Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Nurhasanah, 2012. Rumput Laut Coklat. <http://www.Nurhasanah.blogspot.com>. Diakses tanggal 20 Juni 2012.
- Nurhidayat. 2008. Fermentasi Pada Produk Pangan. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol XIX no 2. Thn 2008. Agroindustri.
- Nurmillah, O.Y. 2006. Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galangal*) dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). Universitas Diponegoro. Semarang.

Oktariana, E.W. 2008. Uji Aktivitas Antioksidan dan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galangal*) dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). Universitas Diponegoro. Semarang.

Pine, HS. 1988. Radikal Bebas. Bandung. ITB. Terjemahan dari: *Organic Chemistry* 2.

Praptiwi, P., Dewi, M., dan Harapini. 2006. Nilai Peroksida dan Anti Radikal Bebas Diphenyl Pycrylhydrazil Hidrate DPPH Ekstrak Methanol Knema laurina. Majalah Farmasi Indonesia. (17) 1: 32-36.

Pribadi, L. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah *Psidium guajaval* dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Serta Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Totalnya. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.

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

Putri, K.H. 2011. Pemanfaatan Rumput Laut Cokelat (*Sargassum sp*) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh. IPB. Bogor.

Robinson, P. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Diterjemahkan: Padmawinata, K. Edisi ke-6. Institut Teknologi Bandung. Bandung. 193 halaman.

Samingan. 2009. Suksesi Fungi dan Dekomposisi Serasah Daun *Acacia mangium* Wlld. dalam Kaitan dengan Keberadaan *Ganoderma* dan *Trichoderma* di Lantai Hutan Akasia. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Sandrasari, D.A. 2008. Kapasitas Antioksidan dan Hubungannya dengan Nilai Total Fenol Ekstrak Sayuran *Indigenous*. Intitut Pertanian Bogor. Bogor

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

Sastrohamidjojo, H. 1996. Kromatografi. Liberty. Yogyakarta. Halaman 6-12.

Simanjuntak, M. 2008. Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Daun Tumbuhan Senduduk (*Melastoma malabathricum L*) Serta Pengujian Efek Sediaan Krim Terhadap Penyembuhan Luka Bakar. Universitas Sumatera Utara. Medan.

Sirait. 2007. Alkaloid. <http://repository.ipb.ac.id/>. Diakses pada tanggal 17 agustus 2012 pukul 15.00 WIB.

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

Sulistyo. 1998. Pengaruh Salinitas Terhadap Pertumbuhan Zygote Rumput Laut *Sargassum*. Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia. Jakarta.

- Sunarni, T. 2005. Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae, *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 (2), 2001, 53-61.
- 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 *Euclidean cottonii*. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Vol.1 No. 1 Juni 2006.
- Susanto, A.B. 2003. Rumput Laut Bukan Sekedar Hidup di Laut. <http://nakila.rvs.uni-bielefeld.de/majlah/laut/rumput.htm>.
- Tannenbaum, S.R. dan D.LC.Wang. 1975. *Single-cell Protein IT*. London: The Massachussetts Institute of Technology Press.
- Tensiska, Wijaya C.H, dan Andarwulan N. 2003. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) dalam Beberapa Sistem Pangan dan Kestabilan Aktivitasnya terhadap Kondisi Suhu dan pH. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol XIV No. 1 th 2003. Bogor
- Tribak, M., JA. Ocampo,I. Garcia R. 2002. Production of Xyloglucanolytic Enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomycesinflatus* and *Pleurotus ostreatus*. Mycologia. 3:404-410.
- Ukieyanna, E. 2012. Aktivitas Antioksidan, Kadai Fenolik dan Flavonoid Total Tumbuhan Suruhan (*Peperomia pellucida* L.Kunth). Dep Biokimia Fak Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. IPB.Bogor.
- Vogel, A.I. 1987. Textbook of Practical Organic Chemistry. Revised by Furnies B.S. 4nd Edition. New York.
- Wahyudi, Priyo dan Moh. Hendriana. 2008. Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman *Quisqualis indica* L, dan uji Potensinya dalam Menghasilkan Senyawa Antimikroba. FMIPA Dep.Biologi UI. Depok.
- Wasetiawan, 2010. Algae. <http://www.blog.unila.ac.id>. Diakses tanggal 30 Juli 2012.
- Widyastuti, N. 2010. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC, DPPH, dan FRAP serta Korelasinya dengan Fenol dan Flavonoid Pada Enam Tanaman. IPB. Bogor.
- Waluyo, L. 2004. Mikrobiologi Umum. Universitas Muhamadiyah Press. Malang
- Winarno, FG. 1990. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F.G. dan S. Fardiaz. 1979. Biofermentasi dan Biosintesa Protein. Angkasa. Bandung.

Yangthong, M., Nongporn, H. T., Phromkuntong, W. 2009. Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods Human Nutrition*. 64 : 218-223.

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

Yuwanita, R. 2011. Pengaruh Ekstrak *Sargassum polycystum* terhadap Bakteri *Vibrio* Haveyl pada Udang Windu secara *In vitro*. Universitas Brawijaya. Malang.

Zubaidah, E., dan Widya, D. 2006. Petunjuk Praktikum mikrobiologi Pangan. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.

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

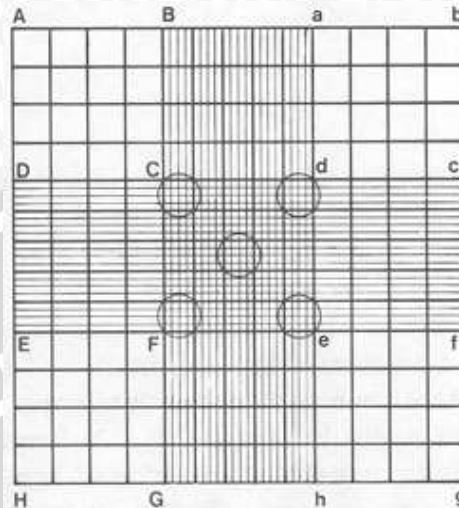


LAMPIRAN



Lampiran 1. Perhitungan dan Data Hasil Koloni Jamur *Trichoderma viride*

1. Perhitungan koloni jamur *Trichoderma viride* dengan *Haemacytometer*



Kotak c, d, e, f, dan o ditengahnya yang dilingkari adalah kotak yang dihitung jumlah koloninya. Adapun cara kerjanya sebagai berikut :

- dibersihkan *Haemacytometer* dan gelas penutupnya dengan larutan detergen, bilas dengan air suling lalu alkohol dan kemudian kering anginkan
- suspensi *Trichoderma viride* dalam media PDB yang akan ditentukan ditentukan jumlah selnya digojog dengan vortex sehingga merata
- diambil suspensi tersebut dengan pipet tetes sebanyak kira-kira 1-2 tetes dan teteskan tepat pada petak-petaknya
- ditutup dengan gelas penutupnya dan taruh pada meja mikroskop
- mula-mula diamati dengan menggunakan perbesaran lemah untuk menemukan petak-petaknya. Kemudian tentukan dari petak mana penghitungan akan dimulai,
- kemudian perbesaran mikroskop diubah keperbesaran sedang, atur fokus sampai sel-sel *Trichoderma viride* nampak jelas

- dihitung jumlah sel dalam setiap petak kecil, sel-sel yang berada pada garis batas atas atau batas kanan dihitung sebagai milik petak yang bersangkutan, tapi bila berada pada batas bawah atau batas kiri tidak dihitung
- dijumlah sel rata-rata dari 5 petak untuk menghitung jumlah sel tiap ml bahan
- hitung jumlah sel yang ada sampai 6 hari dan jumlah sel rata-rata per hari dibuat sebagai kurva fase pertumbuhan jamur dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{Jumlah sel rata-rata tiap petak} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Luas petak (mm}^2\text{)} \times \text{kedalaman petak (mm}^2\text{)}}$$



2 . Hasil Perhitungan Koloni Jamur *Trichoderma viride*

Hari ke	jam ke-	rata-rata Σ sel spora	Σ sel	faktor pengenceran	Σ sel spora/ml	Σ sel (log sel/ml)
1	24	0.00	0	1.E+00	0.00E+00	0
	30	1.00	5	1.E+00	2.50E+05	5.40
	36	1.20	6	1.E+00	3.00E+05	5.48
	42	0.80	4	1.E+01	2.00E+06	6.30
2	48	1.60	8	1.E+01	4.00E+06	6.60
	54	22.40	112	1.E+01	5.60E+07	7.75
	60	6.40	32	1.E+02	1.60E+08	8.20
	66	13.80	69	1.E+02	3.45E+08	8.54
3	72	19.20	96	1.E+02	4.80E+08	8.68
	78	24.20	121	1.E+02	6.05E+08	8.78
	84	32.60	163	1.E+02	8.15E+08	8.91
	90	44.00	220	1.E+02	1.10E+09	9.04
4	96	5.00	25	1.E+03	1.25E+09	9.10
	102	5.20	26	1.E+03	1.30E+09	9.11
	108	5.40	27	1.E+03	1.35E+09	9.13
	114	5.60	28	1.E+03	1.40E+09	9.15
5	120	5.60	28	1.E+03	1.40E+09	9.15
	126	5.80	29	1.E+03	1.45E+09	9.16
	132	0.60	3	1.E+04	1.50E+09	9.18
	138	0.60	3	1.E+04	1.50E+09	9.18
6	144	0.60	3	1.E+04	1.50E+09	9.18

contoh : 1.E+03 sama dengan 10 pangkat 3

Lampiran 2. Hasil Penelitian Pendahuluan Analisis ANOVA IC₅₀ *Sargassum filipendula*

1. Data Hasil IC₅₀

➤ IC₅₀ Perlakuan 6 hari pH 3,5

Perlakuan 6 hari pH 3,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	70.96	71.58	71.27
25	0.597	0.632	53.18	50.43			
50	0.561	0.533	56.00	58.20			
100	0.369	0.374	71.06	70.68			
200	0.312	0.310	75.53	75.69			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2864x + 29.676, R^2 = 0.564$
2.	$y = 0.29x + 29.243, R^2 = 0.5763$

➤ IC₅₀ Perlakuan 6 hari pH 4,5

Perlakuan 6 hari pH 4,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	83.12	75.96	79.54
25	0.644	0.685	49.49	46.28			
50	0.569	0.564	55.37	55.77			
100	0.472	0.378	62.98	70.35			
200	0.365	0.304	71.37	76.16			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2655x + 27.931, R^2 = 0.5628$
2.	$y = 0.3028x + 26.998, R^2 = 0.6289$

➤ IC₅₀ Perlakuan 6 hari pH 5,5

Perlakuan 6 hari pH 5,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	99.68	96.07	97.88
25	0.736	0.702	42.28	44.94			
50	0.699	0.682	45.18	46.51			
100	0.472	0.438	62.98	65.65			
200	0.425	0.437	66.67	65.73			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2666x + 23.425$, $R^2 = 0.6317$
2.	$y = 0.2579x + 25.224$, $R^2 = 0.5768$

➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari pH 3,5

Perlakuan 9 hari pH 3,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	67.08	63.04	65.06
25	0.566	0.555	55.61	56.47			
50	0.521	0.516	59.14	59.53			
100	0.400	0.353	68.63	72.31			
200	0.280	0.262	78.04	79.45			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2885x + 30.647$, $R^2 = 0.5589$
2.	$y = 0.2971x + 31.271$, $R^2 = 0.5608$

➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari pH 4,5

Perlakuan 9 hari pH 4,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	74.66	82.84	78.75
25	0.753	0.815	40.94	36.08			
50	0.52	0.625	59.22	50.98			
100	0.321	0.319	74.82	74.98			
200	0.312	0.317	75.53	75.14			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.3114x + 26.749$, $R^2 = 0.616$
2.	$y = 0.3275x + 22.871$, $R^2 = 0.6845$

➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari pH 5,5

Perlakuan 9 hari pH 5,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	105.18	98.76	101.97
25	0.708	0.824	44.47	35.37			
50	0.672	0.62	47.29	51.37			
100	0.575	0.442	54.90	65.33			
200	0.435	0.438	65.88	65.65			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2481x + 23.904, R^2 = 0.6073$
2.	$y = 0.2715x + 23.186, R^2 = 0.6166$

➤ IC₅₀ Perlakuan 12 hari pH 3,5

Perlakuan 12 hari pH 3,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	67.32	66.26	66.79
25	0.603	0.576	52.71	54.82			
50	0.483	0.516	62.12	59.53			
100	0.418	0.376	67.22	70.51			
200	0.263	0.283	79.37	77.81			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2965x + 30.041, R^2 = 0.5805$
2.	$y = 0.2904x + 30.757, R^2 = 0.5582$

➤ IC₅₀ Perlakuan 12 hari pH 4,5

Perlakuan 12 hari pH 4,5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	68.85	62.45	65.65
25	0.603	0.524	52.71	58.90			
50	0.532	0.508	58.28	60.16			
100	0.381	0.372	70.12	70.82			
200	0.28	0.283	78.04	77.81			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2966x + 29.58, R^2 = 0.5866$
2.	$y = 0.2819x + 32.396, R^2 = 0.5191$

➤ IC₅₀ Perlakuan 12 hari pH 4,5

Perlakuan 11 hari pH 5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.275	1.275	0	0	95.19	84.59	89.89
25	0.682	0.692	46.51	45.73			
50	0.652	0.662	48.86	48.08			
100	0.554	0.416	56.55	67.37			
200	0.371	0.326	70.90	74.43			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2692x + 24.376$, $R^2 = 0.6366$
2.	$y = 0.3x + 24.622$, $R^2 = 0.6658$

➤ IC₅₀ Perlakuan Kontrol (0 hari)

Perlakuan Kontrol				
Konsentrasi	Absorbansi	%Inhibisi	IC ₅₀	Rerata
0	1.275	0	165.27	165.27
25	0.806	36.78		
50	0.794	37.73		
100	0.688	46.04		
200	0.653	48.78		

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.182x + 27.293$, $R^2 = 0.3863$
2.	$y = 0.1911x + 26.761$, $R^2 = 0.4219$

2. Tabel 2 arah

pH	HARI			Rerata
	6	9	12	
3,5	71.27	65.06	66.79	67.71
4,5	79.54	78.75	65.65	74.65
5,5	97.88	101.97	89.89	96.58
Rerata	82.90	81.93	74.11	

3. Rumus Perhitungan Data Hasil IC₅₀

- Nilai Blanko Kontrol : 1.275
- Nilai Blanko : 1.275
- % inhibisi :

$$\frac{\text{Nilai Blanko} - \text{Nilai Absorbansi}}{\text{Nilai Blanko}} \times 100$$

- IC₅₀ :

$$Y = a + b$$

$$50 = a + b,$$

Keterangan :

- nilai (Y) didefinisikan sebagai konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan tereduksi aktivitas DPPH sebesar 50% (Molyneux, 2004).
- a = persamaan a pada gambar grafik $Y = a + b$
- b = persamaan b pada gambar grafik $Y = a + b$

➤ Rerata IC_{50} :

$$\frac{\text{Nilai IC 50 ulangan 1} + \text{Nilai IC 50 ulangan 2}}{2}$$

4. Hasil ANOVA IC_{50} *Sargassum filipendula*

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: IC50					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3144.990 ^a	8	393.124	20.482	.000
Intercept	114336.982	1	114336.982	5.957E3	.000
HARI	285.189	2	142.595	7.429	.012
pH	2701.791	2	1350.895	70.383	.000
HARI * pH	158.011	4	39.503	2.058	.169
Error	172.742	9	19.194		
Total	117654.715	18			
Corrected Total	3317.733	17			

Hasil ANOVA IC_{50} dipengaruhi secara nyata oleh ($p < 0,05$), baik perlakuan pengaruh pH maupun lama inkubasi, sedangkan interaksi kedua perlakuan tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$). Dari hasil penelitian pendahuluan, didapatkan hasil waktu fermentasi yang terbaik untuk menginkubasi sampel adalah waktu fermentasi selama 9 hari dengan pH 3,5 dengan nilai IC_{50} sebesar 63,04 ppm, sehingga waktu ini yang dipakai sebagai acuan dasar pemilihan lama waktu fermentasi dan pengaturan pH untuk penelitian utama.

5. Analisis Uji Lanjut

- Notasi perlakuan lama inkubasi IC_{50}

IC50				
	HARI	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^a	12	6	74.1088	
	9	6		81.9280
	6	6		83.0625
	Sig.		1.000	.896

- Notasi perlakuan pH IC_{50}

IC50				
	pH	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^a	3.5	6	67.8732	
	4.5	6	74.6473	
	5.5	6		96.5788
	Sig.		.060	1.000

Lampiran 3. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) rendemen kering ekstrak ethanol *Sargassum filipendula*

1. Data Hasil Kadar Air dan Rendemen

Perlakuan		Ulangan	Berat Botol Timbang (A)	Berat Sampel (B)	Berat Akhir (C)	Kadar Air (%)	Rerata Kadar Air (%)
7 H A R I	pH 3	1	18.54	2.20	18.61	96.59	96.31
		2	17.66	2.11	17.74	96.02	
	pH 4	1	17.70	2.06	17.81	94.70	94.18
		2	25.18	2.10	25.31	93.67	
	pH 5	1	17.41	2.02	17.46	97.47	96.63
		2	19.33	2.01	19.42	95.80	
9 H A R I	pH3	1	23.39	2.12	23.48	95.72	95.93
		2	18.23	2.13	18.32	96.15	
	pH 4	1	17.75	2.03	17.85	95.38	95.73
		2	19.77	2.11	19.85	96.08	
	pH 5	1	21.38	1.99	21.45	96.08	96.04
		2	17.10	2.17	17.19	95.99	
11 H A R I	pH 3	1	16.55	2.13	16.63	96.44	96.12
		2	22.02	2.14	22.11	95.80	
	pH 4	1	18.55	2.00	18.58	98.84	98.98
		2	24.74	2.07	24.76	99.12	
	pH 5	1	16.21	2.08	16.23	99.21	99.12
		2	19.64	2.11	19.67	99.02	
Kontrol			18.7705	2.004	18.77	2.00	18.97

- Tabel 2 arah

pH	HARI			Rerata
	7	9	11	
3	96.31	95.93	96.12	96.12
4	94.18	95.73	98.98	96.30
5	96.63	96.04	99.12	97.26
Rerata	95.71	95.90	98.07	

Perlakuan		Ulangan	Berat Sampel Awal (g)	Berat Basah Sampel Awal (g)	Berat Kering Sampel Awal (g)	Rendemen Kering (%)	Rerata Rendemen Kering (%)
7 H A R I	pH 3	1	50.18	45.18	5.00	14.18	15.09
		2	50.11	45.12	4.99	16.01	
	pH 4	1	50.00	45.02	4.98	21.93	24.20
		2	50.09	45.10	4.99	26.47	
	pH 5	1	50.13	45.14	4.99	10.25	14.04
		2	50.08	45.09	4.99	17.82	
9 H A R I	pH3	1	50.17	45.17	5.00	16.26	16.01
		2	50.10	45.11	4.99	15.77	
	pH 4	1	50.14	45.15	4.99	18.36	17.23
		2	50.04	45.06	4.98	16.10	
	pH 5	1	50.23	45.23	5.00	15.74	16.15
		2	50.26	45.25	5.01	16.55	
11 H A R I	pH 3	1	50.20	45.20	5.00	14.79	15.00
		2	50.18	45.18	5.00	15.21	
	pH 4	1	50.00	45.02	4.98	4.68	4.15
		2	50.23	45.23	5.00	3.62	
	pH 5	1	50.25	45.25	5.01	3.04	3.49
		2	50.00	45.02	4.98	3.95	

• Tabel 2 arah

pH	HARI			Rerata
	7	9	11	
3	15.09	16.01	15.00	15.37
4	24.20	17.23	4.15	15.20
5	14.04	16.15	3.49	11.23
Rerata	17.78	16.46	7.55	

2. Rumus Perhitungan Data Hasil Rendemen

- Kadar Air :

$$\frac{A+B-C}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Berat Botol Timbang (A)

B : Berat Sampel

C : Berat Botol Timbang + Sampel

- Berat Basah Ekstrak :

$$\frac{\text{Kadar Air}}{100} \times \text{Berat Ekstrak Sampel}$$

- Berat Kering Ekstrak :

Berat Ekstrak Sampel (g) – Berat Basah Ekstrak

- Berat Basah Sampel Awal :

$$\frac{\% \text{ Kadar Air Kontrol Sampel}}{100} \times \text{Berat Sampel Awal}$$

- Berat Kering Sampel Awal

Berat Sampel Awal (g) – Berat Basah Sampel Awal

- Rendemen Berat Kering

$$\frac{\text{Berat Kering Ekstrak}}{\text{Berat Kering Sampel Awal}} \times 100 \%$$

3. Hasil ANOVA Persen Kadar Air dan Rendemen

- Gambar ANOVA Persen Kadar air *Sargassum filipendula*

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	20.73184	2	10.36592	34.55722	5.98E-05	4.256495
Columns	4.526818	2	2.263409	7.545606	0.011905	4.256495
Interaction	14.07921	4	3.519803	11.73409	0.001284	3.633089
Within	2.699675	9	0.299964			
Total	42.03754	17				

Hasil ANOVA persen (%) rendemen antioksidan, dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan pH dan lama inkubasi ($p < 0.05$). Dan interaksi antara dua perlakuan berbeda nyata ($p < 0.05$).

- Gambar ANOVA Persen Rendemen *Sargassum filipendula*

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	371.7291	2	185.8645	37.45387	4.33E-05	4.256495
Columns	65.91139	2	32.95569	6.640957	0.016916	4.256495
Interaction	227.7602	4	56.94006	11.47409	0.001393	3.633089
Within	44.66243	9	4.962492			
Total	710.0631	17				

Hasil ANOVA kadar air *Sargassum filipendula*, dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan pH dan lama inkubasi ($p < 0.05$). Dan interaksi antara kedua perlakuan juga berbeda nyata ($p < 0.05$).

4. Analisis Uji Lanjut Duncan

Karena hasil interaksi dua perlakuan berbeda nyata maka diperlukan uji lanjut Duncan untuk menentukan notasi yang berbeda

➤ Kadar Air

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{Ulangan}}$$

$$= \sqrt{\frac{0.29996}{2}}$$

$$= 0.38727$$

➤ $r, p = (\text{perlakuan, galat}); RP = (r, p \times S_x)$

Banyaknya perlakuan	Selangan	r,p	RP
2	0	3.20	1.239
3	1	3.34	1.293
4	2	3.41	1.321
5	3	3.47	1.344
6	4	3.50	1.355
7	5	3.52	1.363
8	6	3.52	1.363
9	7	3.52	1.363

➤ Pembanding Duncan

	2	3	4	5	6	7	8	9
Sx	0.38727	0.38727	0.38727	0.38727	0.38727	0.38727	0.38727	0.38727
rp	3.20	3.34	3.41	3.47	3.50	3.52	3.52	3.52
RP	1.239	1.293	1.321	1.344	1.355	1.363	1.363	1.363

➤ Penentuan notasi

Mengurutkan dari nilai terendah ke nilai tertinggi, lalu dilakukan pengurangan dari nilai terendah ke tertinggi dan kemudian dibandingkan dengan pembanding Duncan sehingga didapatkan notasi

RERATA	NOTASI	Hasil pengurangan
94.18	a	-
95.73	b	1.55
95.93	b	0.20
96.04	b	0.31
96.12	b	0.39
96.31	b	0.58
96.63	b	0.70
98.98	c	3.25
99.12	c	0.14

pH	HARI		
	7	9	11
3	96.31 ^b	95.93 ^b	96.12 ^b
4	94.18 ^a	95.73 ^b	98.98 ^c
5	96.63 ^b	96.04 ^b	99.12 ^c

➤ Rendemen

$$\begin{aligned}
 S_x &= \sqrt{\frac{RT \text{ Galat}}{\text{Ulangan}}} \\
 &= \sqrt{\frac{4.96249}{2}} \\
 &= 1.5752
 \end{aligned}$$

- $r, p = (\text{perlakuan}, \text{galat}); RP = (r, p \times S_{\frac{1}{2}})$

Banyaknya perlakuan	Selangan	r, p	RP
2	0	3.20	5.04
3	1	3.34	5.26
4	2	3.41	5.37
5	3	3.47	5.47
6	4	3.50	5.51
7	5	3.52	5.55
8	6	3.52	5.55
9	7	3.52	5.55

- Pembanding Duncan

	2	3	4	5	6	7	8	9
Sx	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58
rp	3.20	3.34	3.41	3.47	3.50	3.52	3.52	3.52
RP	5.04	5.26	5.37	5.47	5.51	5.55	5.55	5.55

- Penentuan notasi

Mengurutkan dari nilai terendah ke nilai tertinggi, lalu dilakukan pengurang dari nilai terendah ke tertinggi dan kemudian dibandingkan dengan pembanding Duncan sehingga didapatkan notasi

RERATA	NOTASI	Hasil pengurangan
3.49	a	-
4.15	a	0.66
14.04	b	10.54
15.00	b	0.96
15.09	b	1.06
16.01	b	1.98
16.15	b	2.11
17.23	b	3.20
24.20	c	10.17

pH	HARI		
	7	9	11
3	15.09 ^b	16.01 ^b	15.00 ^b
4	24.20 ^c	17.23 ^b	4.15 ^a
5	14.04 ^b	16.15 ^b	3.49 ^a



Lampiran 4. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) IC₅₀ ekstrak ethanol *Sargassum filipendula*

1. Data Hasil IC₅₀

➤ IC₅₀ Perlakuan 7 hari pH 3

Perlakuan 7 hari pH 3							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	74.76	71.18	72.97
25	0.383	0.436	59.21	53.57			
50	0.371	0.432	60.49	53.99			
100	0.343	0.325	63.47	65.39			
200	0.309	0.158	67.09	83.17			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.22x + 33.552, R^2 = 0.382$
2.	$y = 0.3201x + 27.215, R^2 = 0.664$

➤ IC₅₀ Perlakuan 7 hari pH 4

Perlakuan 7 hari pH 4							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	41.98	65.69	53.83
25	0.294	0.387	68.69	58.79			
50	0.272	0.339	71.03	63.90			
100	0.236	0.305	74.87	67.52			
200	0.22	0.272	76.57	71.03			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2493x + 39.534, R^2 = 0.3633$
2.	$y = 0.2412x + 34.156, R^2 = 0.4163$

➤ IC₅₀ Perlakuan 7 hari pH 5

Perlakuan 7 hari pH 5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	111.51	113.78	112.65
25	0.498	0.492	46.96	47.60			
50	0.44	0.47	53.14	49.95			
100	0.409	0.419	56.44	55.38			
200	0.399	0.391	57.51	58.36			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.1969x + 28.043, R^2 = 0.411$
2.	$y = 0.202x + 27.106, R^2 = 0.4427$

➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari pH 3

Perlakuan 9 hari pH 3							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	81.95	92.24	87.10
25	0.43	0.464	54.21	50.59			
50	0.397	0.391	57.72	58.36			
100	0.354	0.37	62.30	60.60			
200	0.304	0.355	67.63	62.19			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.2343x + 30.799, R^2 = 0.4535$
2.	$y = 0.212x + 30.445, R^2 = 0.4066$

➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari pH 4

Perlakuan 9 hari pH 4							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	71.18	81.22	76.20
25	0.436	0.39	53.57	58.47			
50	0.432	0.364	53.99	61.24			
100	0.325	0.363	65.39	61.34			
200	0.158	0.349	83.17	62.83			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.3201x + 27.215, R^2 = 0.664$
2.	$y = 0.1973x + 33.975, R^2 = 0.3263$

➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari pH 5

Perlakuan 9 hari pH 5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	134.85	121.06	127.96
25	0.534	0.515	43.13	45.15			
50	0.506	0.48	46.11	48.88			
100	0.488	0.422	48.03	55.06			
200	0.42	0.414	55.27	55.91			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.192x + 24.108, R^2 = 0.4766$
2.	$y = 0.1954x + 26.345, R^2 = 0.4379$

➤ IC₅₀ Perlakuan 11 hari pH 3

Perlakuan 11 hari pH 3							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	81.84	99.87	90.85
25	0.408	0.453	56.55	51.76			
50	0.381	0.402	59.42	57.19			
100	0.373	0.389	60.28	58.57			
200	0.317	0.388	66.24	58.68			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.219x + 32.077, R^2 = 0.4009$
2.	$y = 0.1913x + 30.895, R^2 = 0.3531$

➤ IC₅₀ Perlakuan 11 hari pH 4

Perlakuan 11 hari pH 4							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.089	1.089	0	0	111.20	116.76	113.98
25	0.544	0.527	50.05	51.61			
50	0.505	0.526	53.63	51.70			
100	0.475	0.492	56.38	54.82			
200	0.474	0.488	56.47	55.19			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.185x + 29.428, R^2 = 0.3609$
2.	$y = 0.1758x + 29.474, R^2 = 0.3381$

➤ IC₅₀ Perlakuan 11 hari pH 5

Perlakuan 11 hari pH 5							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	1.089	0	0	151.41	157.66	154.54
25	0.542	0.631	42.28	42.06			
50	0.523	0.625	44.30	42.61			
100	0.467	0.581	50.27	46.65			
200	0.477	0.55	49.20	49.49			

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.1674x + 24.654, R^2 = 0.3948$
2.	$y = 0.1674x + 23.607, R^2 = 0.4191$

➤ IC₅₀ Perlakuan Kontrol (0 hari)

Perlakuan Kontrol				
Konsentrasi	Absorbansi	%Inhibisi	IC ₅₀	Rerata
0	1.275	0	165.27	165.27
25	0.806	36.78		
50	0.794	37.73		
100	0.688	46.04		
200	0.653	48.78		

Persamaan regresi	
1.	$y = 0.182x + 27.293, R^2 = 0.3863$
2.	$y = 0.1911x + 26.761, R^2 = 0.4219$

- Tabel 2 arah

pH	HARI			Rerata
	7	9	11	
3	72.97	87.1	90.85	83.64
4	53.83	76.2	113.98	81.34
5	112.65	127.65	154.54	131.61
Rerata	79.82	96.98	119.79	

2. Rumus Perhitungan Data Hasil IC₅₀

- Nilai Blanko Kontrol : 1.275
- Nilai Blanko : 0.939, 1.089
- % inhibisi :

$$\frac{\text{Nilai Blanko} - \text{Nilai Absorbansi}}{\text{Nilai Blanko}} \times 100$$

- IC₅₀ :

$$Y = a + b$$

$$50 = a + b,$$

Keterangan :

- nilai (Y) didefinisikan sebagai konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan tereduksi aktivitas DPPH sebesar 50% (Molyneux, 2004).
- a = persamaan a pada gambar grafik Y = a + b
- b = persamaan b pada gambar grafik Y = a + b

- Rerata IC₅₀ :

$$\frac{\text{Nilai IC 50 ulangan 1} + \text{Nilai IC 50 ulangan 2}}{2}$$

2

3. Hasil ANOVA IC₅₀ *Sargassum filipendula*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IC₅₀

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15556.733 ^a	8	1944.592	25.511	.000
Intercept	176049.912	1	176049.912	2.310E3	.000
HARI	4823.196	2	2411.598	31.638	.000
pH	9707.311	2	4853.656	63.676	.000
HARI * pH	1026.227	4	256.557	3.366	.060
Error	686.020	9	76.224		
Total	192292.666	18			
Corrected Total	16242.754	17			

Hasil ANOVA IC₅₀ dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan pH dan lama inkubasi karena ($p < 0.05$). Sedangkan interaksi antara keduanya tidak berbeda nyata ($p > 0.05$).

4. Analisis Uji Lanjut

- Notasi perlakuan lama inkubasi IC₅₀

IC ₅₀					
	HARI	N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	7	6	7.9816E1		
	9	6		9.7083E1	
	11	6			1.1979E2
	Sig.		1.000	1.000	1.000

- Notasi perlakuan pH IC₅₀

IC ₅₀				
	pH	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD ^a	4	6	8.1338E1	
	3	6	8.3640E1	
	5	6		1.3171E2
	Sig.		.893	1.000

Lampiran 5. Data, Perhitungan dan Analisis Keragaman (ANOVA) Total Fenol ekstrak ethanol *Sargassum filipendula*

1. Data Hasil Total Fenol

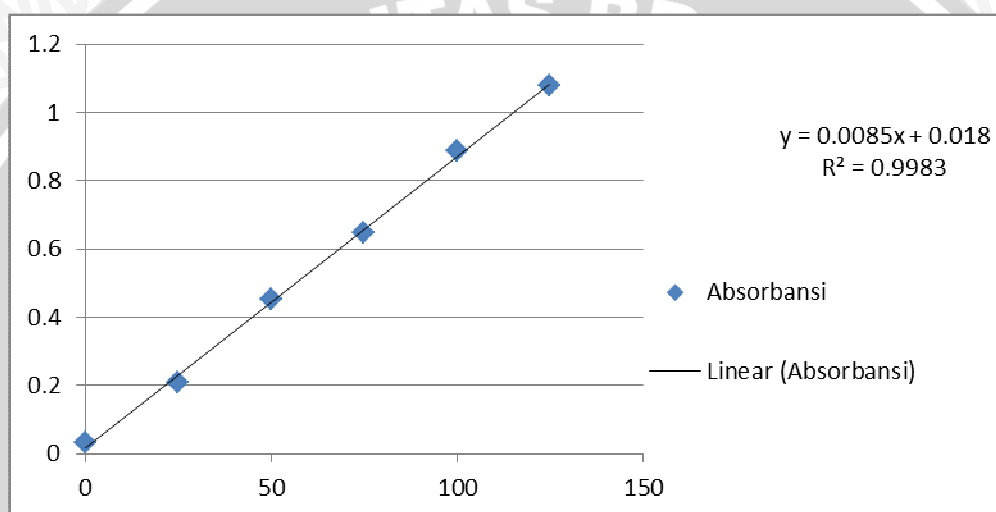
HARI	pH	ABSORBANSI	Total Fenol	Rerata
7	3	0.381	45.38	43.51
	3	0.351	41.63	
	4	0.382	45.50	48.25
	4	0.426	51.00	
	5	0.627	76.13	71.26
	5	0.549	66.38	
9	3	0.594	72.00	70.94
	3	0.577	69.88	
	4	0.467	56.13	56.26
	4	0.469	56.38	
	5	0.752	91.75	86.32
	5	0.665	80.88	
11	3	0.444	53.25	54.19
	3	0.459	55.13	
	4	0.731	89.13	82.01
	4	0.617	74.88	
	5	0.915	112.13	127.26
	5	1.157	142.38	

- Tabel 2 arah

pH	HARI			Rerata
	7	9	11	
pH 3	43.51	70.94	54.19	56.21
pH 4	48.25	56.26	82.01	62.17
pH 5	71.26	86.32	127.26	94.95
Rerata	54.34	71.17	87.82	

2. Data Asam Galat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
Asam Galat	0	0.033
	25	0.207
	50	0.453
	75	0.647
	100	0.888
	125	1.078



3. Rumus Perhitungan Data Hasil Total Fenol

➤ Total Fenol :

masing-masing nilai absorbansi dari sampel *Sargassum filipendula* dimasukkan pada persamaan regresi dari asam galat, yaitu :

$$Y = ax + b$$

Keterangan :

- Y = nilai absorbansi

a = 0.008 (nilai yang tertera pada grafik data asam galat dari persamaan

$$Y = 0.008x + 0.018)$$

b = 0.018 (nilai yang tertera pada grafik data asam galat dari persamaan

$$Y = 0.008x + 0.018)$$

x = nilai hasil dari persamaan regresi

➤ Contoh :

- Nilai (x) perlakuan (pH 3, 7 hari) ulangan 1

$$Y = ax + b$$

$$0.381 = 0.008x + 0.018$$

$$x = \frac{(0.381 - 0.018)}{0.008}$$

$$= 45.38 \text{ mg GAE/g}$$

- Nilai (x) perlakuan (pH 3, 7 hari) ulangan 2

$$Y = ax + b$$

$$0.351 = 0.008x + 0.018$$

$$x = \frac{(0.351 - 0.018)}{0.008}$$

$$= 41.63 \text{ mg GAE/g}$$

- Rerata

$$(45.38 + 41.63) / 2 = 43.51 \text{ mg GAE/g}$$

4. Hasil ANOVA Total Fenol

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	3362.766	2	1681.383	21.87168	0.00035	4.256495
Columns	5218.994	2	2609.497	33.94472	6.42E-05	4.256495
Interaction	2005.794	4	501.4486	6.522917	0.009522	3.633089
Within	691.8741	9	76.8749			
Total	11279.43	17				

Hasil ANOVA total fenol *Sargassum filipendula* menerangkan perlakuan pH dan lama inkubasi dipengaruhi secara nyata ($p < 0.05$). Dan interaksi kedua perlakuan juga berbeda nyata ($p < 0.05$).

5. Analisis Uji Lanjut Duncan

Karena hasil interaksi dua perlakuan berbeda nyata maka diperlukan uji lanjut Duncan untuk menentukan notasi yang berbeda

$$\begin{aligned}
 > S_d &= \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{Ulangan}} \\
 &= \sqrt{\frac{76.8749}{2}} \\
 &= 6.19979
 \end{aligned}$$

$$r,p=(\text{perlakuan, galat}); RP=(r,p \times S_{\text{g}})$$

Banyaknya perlakuan	Selangan	r,p	RP
2	0	3.20	19.839
3	1	3.34	20.707
4	2	3.41	21.141
5	3	3.47	21.513
6	4	3.50	21.699
7	5	3.52	21.823
8	6	3.52	21.823
9	7	3.52	21.823

➤ Pembanding Duncan

	2	3	4	5	6	7	8	9
Sx	6.19979	6.19979	6.19979	6.19979	6.19979	6.19979	6.19979	6.19979
rp	3.20	3.34	3.41	3.47	3.50	3.52	3.52	3.52
RP	19.839	20.707	21.141	21.513	21.699	21.823	21.823	21.823

➤ Penentuan notasi

Mengurutkan dari nilai terendah ke nilai tertinggi, lalu dilakukan pengurangan dari nilai terendah ke tertinggi dan kemudian dibandingkan dengan pembanding Duncan sehingga didapatkan notasi

RERATA	NOTASI	Hasil pengurangan	
43.51	a	-	-
48.25	a	4.74	-
54.19	a	10.68	-
56.26	ab	12.75	14.68
70.94	b	27.43	-
71.26	bc	15.00	10.75
82.01	c	25.75	-
86.32	c	15.06	-
127.26	d	56.00	-

pH	HARI		
	7	9	11
pH 3	43.51 ^a	70.94 ^b	54.19 ^a
pH 4	48.25 ^a	56.26 ^{ab}	82.01 ^c
pH 5	71.26 ^{bc}	86.32 ^c	127.26 ^d

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 6. Gambar Proses Penelitian

➤ Proses pembiakan starter jamur *Trichoderma viride*



stok jamur *T. Viride*



Koloni jamur dalam media PDA



T. viride dalam media PDB

➤ Perhitungan koloni jamur *Trichoderma viride* dengan *Haemacytometer*



Penanaman dalam media PDB



Jamur yang sudah tumbuh



Divortex agar homogen



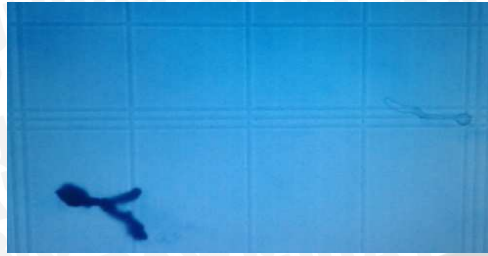
methylen blue



Perhitungan Haemacytometer



Proses pengenceran



Gambar sel yang hidup dan yang mati

➤ **Penanganan awal sampel *Sargassum fillipendula***



Sargassum fillipendula segar



Pencucian



Penirisan



Proses chopping

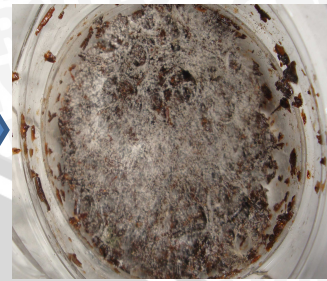
➤ Proses fermentasi sampel *Sargassum fillipendula*



Pengaturan pH



Penambahan starter *T. Viride*



Sampel yang telah terfermentasi

➤ Proses ekstraksi sampel



Proses penambahan etanol



Maserasi selama 24 jam dan dishaker



Penyaringan sampel



Hasil penyaringan



Pemisahan pelarut dengan sampel menggunakan vacuum rotary evaporator

➤ Proses perhitungan rendemen dan kadar air



Perhitungan rendemen



Perhitungan kadar air

➤ Uji aktifitas Antioksidan (Metode DPPH)



Proses pengenceran



Hasil pengenceran



Larutan DPPH



Sampel yang telah ditambah DPPH



Proses penghitungan absorbansi sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

➤ Uji Total Fenol



Reagen etanol



Reagen aquadest



Reagen follin



Na_2CO_3



Proses penghitungan absorbansi sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



Sampel yang telah diuji Total fenol



Uji Fitokimia



Reagen HgCl_2



Reagen I_2 dan KI



Uji fenolat



Uji flavonoid



Uji alkaloid meyer



Uji alkaloid wagner

Lampiran 7. Flowchart Prosedur Penelitian