

PENGARUH KONSENTRASI BIAKAN DAN LAMA INKUBASI *Trichoderma viride* TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR *Padina australis* SEGAR

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN**

Oleh:

AGUS INDARTO

NIM. 0810830001



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

**PENGARUH KONSENTRASI BIAKAN DAN LAMA INKUBASI *Trichoderma viride*
TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR
Padina australis SEGAR**

**Laporan Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**AGUS INDARTO
NIM. 0810830001**

Dosen Penguji I

**(Dr. Ir. Kartini Z, MS)
NIP. 19550503 198503 2 001
Tanggal:**

Dosen Penguji II

**(Dr. Ir. Hartati Kartika N, MS)
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal:**

**Menyetujui,
Dosen Pembimbing I**

**(Ir. Bambang Budi S., 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

AGUS INDARTO. Pengaruh Konsentrasi Biakan dan Lama Inkubasi *Trichoderma viride* Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar *Padina australis* Segar. (di bawah bimbingan Ir. Bambang Budi Sasmito, MS. dan Dr.Ir Hardoko, MS)

Alga coklat Padina australis termasuk salah satu sumber potensial yang mengandung senyawa antioksidan alami yang banyak ditemukan di perairan Indonesia. salah satunya di Pantai Ponjuk desa Padike Kecamatan Talango Kabupaten Sumenep Pulau Madura. Untuk mendapatkan senyawa tersebut diperlukan metode yang tepat. Metode perlakuan lama inkubasi (fermentasi) pada sampel dengan penambahan konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (v/b) yang berbeda, akan berpengaruh terhadap ekstrak kasar yang akan didapatkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perlakuan lama inkubasi dan konsentrasi biakan yang tepat, sehingga ekstrak yang dihasilkan optimal dan memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Laboratorium Mikrobiologi Dasar di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari 2012 – Maret 2013.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan utama. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor, 3 level dan 2 kali ulangan. Faktor yang pertama adalah lama inkubasi terdiri dari 7, 9, dan 11 hari berturut-turut adalah (W1, W2, dan W3); serta faktor kedua adalah konsentrasi *Trichoderma viride* yang terdiri dari 3% (v/b), 5% (v/b), dan 7% (v/b) berturut-turut adalah (P1, P2, dan P3).

Parameter uji yang digunakan pada kedua penelitian, ada dua yaitu kuantitatif dan kualitatif. Parameter kualitatifnya yaitu uji senyawa fitokimia sedangkan parameter kuantitatifnya yaitu jumlah rendemen, kadar air, nilai IC_{50} , dan total fenol dimana nilai IC_{50} berarti senyawa antioksidan berhasil memberikan penghambatan 50% karakter radikal bebas yang diekstrak dari sampel. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter uji, dilakukan analisis keragaman (ANOVA) jika terdapat hasil yang berbeda sangat nyata maka dilakukan uji duncan pada taraf 5 % untuk mengetahui perlakuan terbaik.

Penelitian utama mengambil titik acuan dari hasil terbaik pada penelitian pendahuluan, yaitu perlakuan lama inkubasi 9 hari dengan konsentrasi 5% (v/b), memberikan nilai IC_{50} yang lebih rendah daripada kontrol. Semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Pada penelitian utama didapat persen rendemen tertinggi terdapat pada perlakuan (W1, P1) sebesar 23.410% dan terendah terdapat pada perlakuan (W3, P3) sebesar 15.528%. Persen kadar air tertinggi terdapat pada perlakuan (W2, P3) sebesar 94.819%, dan terendah terdapat pada perlakuan (W1, P1) sebesar 92.037%. Total fenol tertinggi terdapat pada perlakuan (W1, P1) sebesar 126.44 mg GAE/g sampel, dan terendah terdapat pada perlakuan (W3, P3) sebesar 51.63 mg GAE/g sampel. IC_{50} terkuat adalah perlakuan (W1, P1) rerata sebesar 68.264 ppm, dan terlemah perlakuan (W1, P3) rerata sebesar 153.466 ppm. Hasil uji fitokimia dari perlakuan yang terbaik menunjukkan bahwa ekstrak Alga coklat *Padina australis* positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan fenolik. Perlakuan yang terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari Alga coklat *Padina australis* adalah perlakuan (W1,P1) karena memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat.

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat, rezeki, dan petunjuk-Nya penulis bisa menyelesaikan laporan Skripsi dengan judul Pengaruh Konsentrasi Biakan dan Lama Inkubasi *Trichoderma viride* Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar *Padina australis* Segar. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Strata 1 pada program studi THP, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lama waktu fermentasi dan tingkat konsentrasi biakan (ml/g) yang efektif untuk mengekstrak komponen antioksidan pada *Padina australis* sehingga dapat diketahui aktivitas antioksidannya. Segala kekurangan dalam penyusunan skripsi ini semata-mata karena kekhilafan penulis dan kelebihan yang ada hanya dari-Nya. Atas terselesaikannya laporan Skripsi, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- Bapak Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Dr. Ir. Hardoko, MS selaku dosen pembimbing kedua, serta kedua dosen penguji saya yang pertama Dr. Ir. Kartini Zaelani, MS dan kedua Dr. Ir. Hartati Kartika N, MS yang telah memberikan bimbingan serta pengarahan dalam penyusunan laporan Skripsi.
- Bapak Iskandar, S.E., Ibu Rohimah serta Mas Pulung dan keluarga yang telah memberikan dukungan materiil maupun non materiil. Teman-teman team antioksidan yaitu Dewi, Nita, Ester dan Mas Haris yang telah berjuang bersama-sama dan semua teman THP 2008 yang selalu memberikan semangat.
- Semua pihak yang banyak membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian Skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang sifatnya membangun guna perbaikan dalam skripsi ini, sehingga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis pribadi maupun bagi pembaca.

Malang, Juni 2013

Penulis

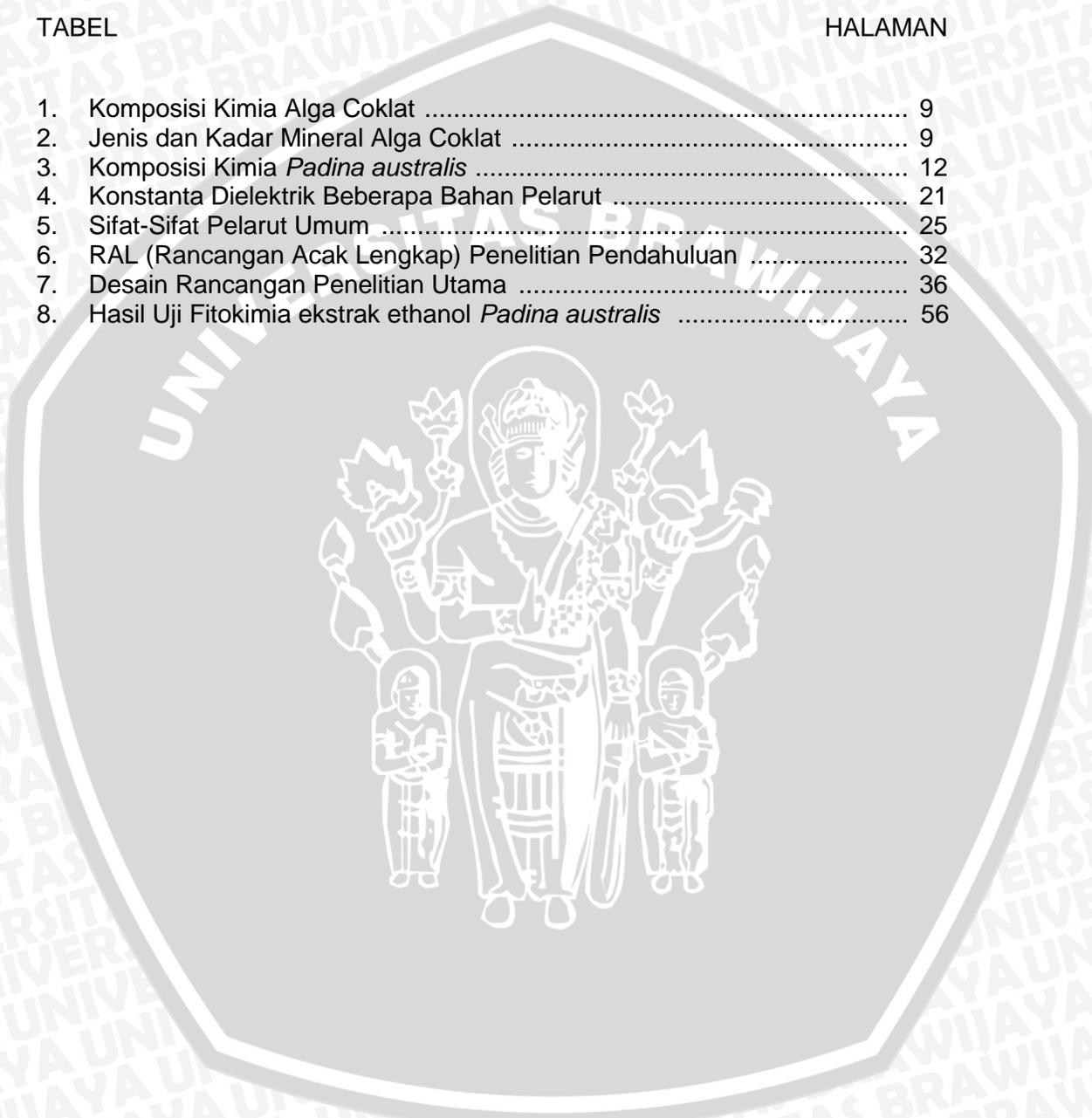
DAFTAR ISI

	HALAMAN
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Hipotesa	6
1.5 Kegunaan Penelitian	7
1.6 Tempat dan Waktu	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Alga Coklat	8
2.2 <i>Padina australis</i>	10
2.3 <i>Trichoderma viride</i>	12
2.4 Fermentasi	14
2.5 Radikal Bebas	15
2.6 Antioksidan	16
2.6.1 Mekanisme Kerja Antioksidan	18
2.7 Ekstraksi	19
2.8 Pelarut	21
2.9 Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan	22
2.10 Kandungan <i>Padina australis</i> Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan	26
3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Materi Penelitian	29
3.1.1 Bahan penelitian	29
3.1.2 Alat Penelitian	30
3.2 Metode Penelitian	30
3.2.1 Penelitian pendahuluan	31
3.2.1.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	31
3.2.1.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan	32
3.2.1.3 Prosedur Penelitian Pendahuluan	33
3.2.1.3.1 Pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur <i>Trichoderma viride</i>	33

3.2.1.3.2 Fermentasi dan ekstraksi <i>Padina australis</i>	34
3.2.1.4 Parameter Uji	35
3.2.2 Penelitian Utama	35
3.2.2.1 Perlakuan dan Rancangan Penelitian Utama	36
3.2.3 Parameter Uji	37
3.2.4 Analisis Data	37
3.3 Prosedur Penelitian Utama	38
3.3.1 Pembuatan media dan pembiakan jamur <i>Trichoderma viride</i>	38
3.3.2 Peremajaan jamur <i>Trichoderma viride</i>	38
3.3.3 Fermentasi <i>Trichoderma viride</i>	39
3.3.4 Ekstraksi <i>Padina australis</i>	39
3.4 Prosedur Analisis Parameter	40
3.4.1 Perhitungan Koloni Jamur dengan <i>Haemocytometer</i>	40
3.4.2 Uji Antioksidan (DPPH)	41
3.4.3 Uji Fitokimia	42
3.4.4 Uji Kadar Air	42
3.4.5 Uji Total Fenol	43
4. HASIL PEMBAHASAN	44
4.1 Kurva Pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	44
4.2 Penelitian Pendahuluan	45
4.3 Penelitian Utama	47
4.4 Rendemen dan Kadar Air	47
4.4.1 Rendemen	47
4.4.2 Kadar Air	49
4.5 Aktivitas Antioksidan	50
4.6 Total Fenol	54
4.7 Perlakuan Terbaik	55
4.8 Analisis Fitokimia	56
5. KESIMPULAN DAN SARAN	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60

DAFTAR TABEL

TABEL	HALAMAN
1. Komposisi Kimia Alga Coklat	9
2. Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat	9
3. Komposisi Kimia <i>Padina australis</i>	12
4. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut	21
5. Sifat-Sifat Pelarut Umum	25
6. RAL (Rancangan Acak Lengkap) Penelitian Pendahuluan	32
7. Desain Rancangan Penelitian Utama	36
8. Hasil Uji Fitokimia ekstrak ethanol <i>Padina australis</i>	56



DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	HALAMAN
1. <i>Padina australis</i>	10
2. <i>Trichoderma viride</i> a). koloni dalam cawan petri, b). konidia	13
3. Skema hidrolisis enzimatik selulosa oleh enzim seulase	14
4. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida	19
5. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi	19
6. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH	24
7. Pembentukan Radikal Fenoksi	27
8. Kotak <i>Haemocytometer</i>	41
9. Kurva Pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	44
10. Grafik IC ₅₀ ekstrak <i>Padina australis</i> penelitian pendahuluan	45
11. Grafik hasil persen rendemen ekstrak <i>Padina australis</i> perlakuan konsentrasi <i>Trichoderma viride</i>	48
12. Grafik persen kadar air ekstrak <i>Padina australis</i> perlakuan konsentrasi <i>Trichoderma viride</i>	49
13. Grafik IC ₅₀ ekstrak <i>Padina australis</i> perlakuan konsentrasi <i>Trichoderma viride</i>	52
14. Grafik IC ₅₀ ekstrak <i>Padina australis</i> perlakuan lama inkubasi dan konsentrasi <i>Trichoderma viride</i>	53
15. Total fenol <i>Padina australis</i> perlakuan lama inkubasi dengan <i>Trichoderma viride</i>	55



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	HALAMAN
1. Perhitungan koloni jamur <i>Trichoderma viride</i> dengan <i>Haemacytometer</i> ...	67
2. Data perhitungan analisis ANOVA kadar air ekstrak <i>Padina australis</i>	69
3. Data perhitungan analisis ANOVA persen rendemen kering ekstrak <i>Padina australis</i>	72
4. Data perhitungan dan analisis ANOVA IC ₅₀ ekstrak <i>Padina australis</i> pada penelitian pendahuluan.....	77
5. Data perhitungan dan analisis ANOVA IC ₅₀ ekstrak <i>Padina australis</i> pada penelitian utama	90
6. Data perhitungan dan analisis ANOVA Total Fenol ekstrak <i>Padina australis</i>	104
7. Skema kerja	108
8. Dokumentasi	115



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Rumput laut atau *seaweeds* secara ilmiah dikenal dengan istilah alga atau ganggang. Rumput laut termasuk salah satu anggota alga yang merupakan tumbuhan berklorofil. Dilihat dari ukurannya, rumput laut terdiri dari jenis mikroskopik dan makroskopik. Jenis makroskopik inilah yang sehari-hari kita kenal sebagai rumput laut (Poncomulyo, 2006).

Rumput laut tergolong tanaman tingkat rendah, umumnya tumbuh melekat pada substrat tertentu, tidak mempunyai akar, batang maupun daun sejati, tetapi hanya menyerupai batang yang disebut *thallus*. Bentuk *thallus* ini beragam, ada yang bulat seperti tabung, pipih, gepeng, bulat seperti kantong, atau ada juga yang seperti rambut. Rumput laut tumbuh di alam dengan melekatkan diri pada karang, lumpur, pasir, batu dan benda keras lainnya. Selain benda mati, rumput lautpun dapat melekat pada tumbuhan lain secara epifitik (Anggadiredjo, 2006).

Jenis rumput laut cokelat banyak ditemukan di Perairan Pulau Talango, wilayah timur pulau Madura, namun rumput laut cokelat ini belum dibudidayakan dan dikembangkan secara optimal oleh masyarakat setempat. Warna *thallus* rumput laut cokelat berasal dari campuran pigmen golongan klorofil dan pigmen golongan karotenoid. Variasi warna *thallus* setiap spesies rumput laut cokelat sangat dipengaruhi oleh komposisi serta kandungan pigmen penyusunnya. Klorofil *a* merupakan pigmen utama dalam proses fotosintetik dari tumbuhan tingkat tinggi termasuk didalamnya makroalga, sedangkan karotenoid hanya sebagai pigmen pelengkap. Fukosantin merupakan karotenoid utama yang

terdapat dalam rumput laut cokelat (Haugan *et al.*, 1995) dan diperkirakan lebih dari 10% dari total produksi karotenoid alami (Matsuno, 2001).

Ganggang coklat atau *Phaeophyceae* adalah salah satu kelas dari ganggang berdasarkan zat warna atau pigmentasinya. Pigmen yang lebih dominan adalah pigmen xantofil yang menyebabkan ganggang berwarna coklat. Pigmen lain yang terdapat dalam *Phaeophyceae* adalah klorofil dan karoten. Semua ganggang coklat berbentuk benang atau lembaran, bahkan ada yang menyerupai tumbuhan tingkat tinggi dengan bagian-bagian serupa akar, batang, dan daun. Umumnya ganggang coklat bersifat makroskopis, dan dapat mencapai ukuran lebih dari 30 meter, dan mempunyai gelembung-gelembung udara yang berfungsi sebagai pelampung (Wikipedia, 2012).

Rumput laut dapat diklasifikasikan berdasarkan pigmentasinya, menjadi empat kelas, yaitu rumput laut hijau (*Chlorophyceae*), rumput laut coklat (*Phaeophyceae*), rumput laut merah (*Rhodophyceae*) dan rumput laut keemasan (*Crysophyceae*). Selain mengandung klorofil, rumput laut juga mengandung zat warna lainnya sesuai dengan namanya, dan bersifat autotrof, yaitu dapat hidup sendiri tanpa tergantung dari makhluk lainnya. Selain karbohidrat, protein, lemak dan serat, rumput laut juga mengandung enzim, asam nukleat, asam amino, vitamin (A, B, C, D, E dan K) dan makro mineral seperti nitrogen, oksigen, kalsium dan selenium serta mikro mineral seperti zat besi, magnesium dan natrium. Kandungan asam amino, vitamin dan mineral rumput laut mencapai 10-20 kali lipat dibandingkan dengan tanaman darat (Yudhi, 2009).

Rumput laut selama ini dimanfaatkan sebagai makanan untuk manusia. Akan tetapi, dengan semakin banyaknya kemajuan ilmu pengetahuan, pemanfaatan rumput laut sudah digunakan juga sebagai bahan baku pada 7

industri obat-obatan, tekstil, minuman, kosmetik, pasta gigi dan sebagainya (Indriani *et al.*, 2003).

Padina australis, merupakan salah satu spesies alga coklat yang mempunyai potensi menghasilkan senyawa aktif antioksidan (Suryaningrum *et al.*, 2006), dalam hasil penelitiannya menyebutkan, bahwasannya dalam semua alga coklat termasuk didalamnya jenis *Padina australis* terkandung senyawa metabolit sekunder seperti fenol, flavonoid, dan alkaloid yang berfungsi sebagai senyawa antioksidan.

Untuk mendapatkan zat antioksidan dari *Padina australis*, maka dilakukan proses ekstraksi. Selama ini, jumlah antioksidan yang didapat dengan metode ini sedikit. Hal ini diduga karena saat proses maserasi, dinding sel rumput laut tidak terpecahkan secara maksimal. Untuk mendapatkan senyawa bioaktif antioksidan yang terdapat pada vakuola di sel rumput laut, harus memecah dinding sel terlebih dahulu. Kita ketahui bahwa dinding sel rumput laut mengandung zat algin, selulosa dan pektin dimana semuanya termasuk dalam golongan polisakarida jenis serat pangan. Agar hasil antioksidan yang didapat bisa lebih banyak, maka saat proses maserasi ditambah suatu metode yang dapat memecah dinding sel secara sempurna. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan cara difermentasi.

Miselium *Trichoderma* dapat menghasilkan suatu enzim yang bermacam-macam, termasuk enzim selulase (pendegradasi selulosa) dan kitinase (pendegradasi kitin). Oleh karena adanya enzim selulase, *Trichoderma* dapat tumbuh secara langsung di atas kayu yang terdiri atas selulosa sebagai polimer dari glukosa. Oleh karena adanya kitinase, *Trichoderma* dapat bersifat sebagai parasit bagi jamur yang lainnya. Secara alami seseorang dapat sering

menemukan *Trichoderma* yang menjadi parasit pada badan buah dan miselia dari jamur yang lain, seperti badan buah dari *Hydnochaete* (Volk, 2004).

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). Dengan fermentasi, maka diharapkan pemecahan dinding sel *Padina australis* dapat berjalan sempurna karena dibantu oleh enzim selulose yang dihasilkan dari kapang *Trichoderma viride*. Selulase adalah nama bagi semua enzim yang memutuskan ikatan glikosidik beta-1,4 di dalam selulosa, sedodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya (Sudaryati, 1993)

Senyawa antioksidan yang terdapat pada rumput laut coklat itu bersifat polar, maka diperlukan suatu zat pengestraksi yang bersifat polar agar antioksidan yang ada didalam sel rumput laut coklat bisa terekstraksi. Suatu ekstrak tumbuhan dapat diekstraksi secara maksimal dengan suatu seri pelarut yang meningkat kepolarannya, yaitu heksana, etil asetat dan metanol, maka fraksi bobot ekstrak yang paling besar pada umumnya adalah metanol (Munifah *et al.*, 2005). Hasil penelitian mengenai alga coklat telah banyak dilaporkan, yaitu pada penelitian yang dilakukan oleh (Suryaningrum *et al.*, 2006) yang menggunakan pelarut metanol, etil asetat dan heksan untuk mengekstrak antioksidan dari *Halymenia harveyana* dan *Euclima cottoni*, aktivitas antioksidan yang tinggi terhadap radikal bebas DPPH ditunjukkan pada fraksi metanol (pelarut bersifat polar) pada alga jenis *H. Harveyana* dengan nilai IC₅₀ sebesar 176,50 ppm.

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, selain itu metode ini lebih sering digunakan untuk melihat aktivitas antioksidan pada beberapa bahan makanan karena caranya mudah untuk digunakan. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, 2005).

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk eksplorasi pemanfaatan biota laut yang banyak terdapat di Indonesia, khususnya pengetahuan 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 *Padina australis* dapat menjadi zat antioksidatif baku yang dapat diterapkan pada produk pangan maupun nonpangan.

1.2. Rumusan masalah

Jenis rumput laut *Padina* banyak mengandung pigmen fukosantin, karotenoid, klorofil a, senyawa organik dan anorganik. Hasil penelitian terbaru menunjukkan bahwa karotenoid pada rumput laut merupakan antioksidan yang dapat berfungsi melindungi berbagai macam penyakit dan stress (Suryaningrum *et al.*, 2006). Rumput laut coklat jenis *Padina australis* selain sebagai sumber alginat juga 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 dengan fermentasi menggunakan mikroba, diantaranya jamur *Trichoderma viride*. Karena jamur ini menghasilkan enzim selulase. Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

- Apakah lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap hasil rendemen dan aktifitas antioksidan dari *Padina australis* segar ?
- Apakah tingkat konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (v/b) berpengaruh terhadap hasil rendemen dan aktifitas antioksidan dari *Padina australis* segar ?
- Apakah lama waktu dan tingkat konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (v/b) berpengaruh terhadap hasil rendemen dan aktifitas antioksidan dari *Padina australis* segar ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan secara umum yaitu 1) untuk mengetahui pengaruh konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (v/b) terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Padina australis*, 2) untuk mengetahui pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Padina australis*, 3) untuk mengetahui pengaruh konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (v/b) dan lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan yang diekstrak dari *Padina australis*.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

- Lama waktu fermentasi yang digunakan berpengaruh terhadap rendemen dan daya antioksidan ekstrak kasar *Padina australis*.

- Konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (v/b) yang digunakan berpengaruh terhadap rendemen dan daya antioksidan ekstrak kasar *Padina australis*.
- Lama Waktu fermentasi yang digunakan berpengaruh terhadap rendemen dan daya antioksidan ekstrak kasar *Padina australis*.

1.5. Kegunaan Penelitian

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

1.6. Tempat dan Waktu

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

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat

Para ahli mengklasifikasikan rumput laut berdasarkan pigmentasinya, menjadi empat kelas, yaitu rumput laut hijau (Chlorophyceae), rumput laut coklat (Phaeophyceae), rumput laut merah (Rhodophyceae) dan rumput laut keemasan (Crysophyceae). Selain mengandung klorofil, rumput laut juga mengandung zat warna lainnya sesuai dengan namanya, dan bersifat autotrop, yaitu dapat hidup sendiri tanpa tergantung dari makhluk lainnya. Pada umumnya rumput laut mengandung air antara 12,95 – 27,50 %, protein 1,60 – 10,00 %, karbohidrat 32,25 – 63,20 %, lemak 3,5 – 11,00 %, serat kasar 3,00 – 11,40 % dan abu 11,50 – 23,70 % (Winarno, 1990). Selain karbohidrat, protein, lemak dan serat, rumput laut juga mengandung enzim, asam nukleat, asam amino, vitamin (A, B, C, D, E dan K) dan makro mineral seperti nitrogen, oksigen, kalsium dan selenium serta mikro mineral seperti zat besi, magnesium dan natrium. Kandungan asam amino, vitamin dan mineral rumput laut mencapai 10-20 kali lipat dibandingkan dengan tanaman darat (Yudhi, 2009).

Selain kandungan primernya yang bernilai ekonomis, penelitian tentang kandungan metabolit sekunder dari rumput laut menunjukkan bahwa tanaman ini berpotensi sebagai produser metabolit bioaktif yang beragam dengan aktivitas yang sangat luas sebagai antibakteri, antivirus, antijamur dan sitotastik (Zainuddin dan Malina, 2009).

Phaeophyta disebut juga algae coklat, warna ini disebabkan xantofil yang dihasilkan melebihi karoten dan klorofil. Algae 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. Algae ini mempunyai dua flagela yang tidak sama panjang dengan letak lateral. Anggota kelompok ini terdiri lebih dari 200 genera dan 1500 spesies. Anggota algae ini yang banyak hidup di laut adalah genera *Sargassum sp*, *Macrocystis sp*, *Nereocystis sp*, dan *Laminaria sp*. Algae coklat ini dapat tumbuh dengan sangat cepat, misalnya *Nereocystis sp* dapat mencapai panjang 40 meter dalam satu musim. Kebanyakan cara perkembangbiakan algae coklat sama dengan algae hijau ulva (Wasetiawan, 2010).

Adapun komposisi kimia alga coklat dan kadar mineralnya dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Komposisi kimia alga coklat

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

Sumber : Yunizal (1999).

Tabel 2. Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat

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

Sumber : Winarno (1990).

2.2 *Padina australis*

Padina australis adalah salah satu jenis alga coklat (*Phaeophyta*). Umumnya alga tersebut tumbuh pada rata-rata terumbu, menempel pada batu di tempat-tempat yang terkena hempasan ombak langsung maupun terlindung dan tersebar luas di perairan Indonesia (Atmadja *et al.*, 1991).

Ciri-ciri alga coklat jenis ini adalah bentuk *thallus* seperti kipas yang memiliki ukuran daun relatif besar yang membentuk segmen-segmen lembaran tipis dengan garis-garis berambut radial dan mengandung kalsium karbonat (kapur) di bagian permukaan daun dan berwarna coklat kekuning-kuningan, tinggi mencapai 15 cm, berwarna coklat cerah dan daerah penyebaran *Padina australis* meliputi: pulau Jawa, Sumatra, Ambon, Sumba, Sulawesi, Kepulauan Seribu. Morfologi *Padina australis* dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasi *Padina australis* adalah sebagai berikut (DKP Sumenep, 1990).

Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Dictyotales
Family	: Dictyotaceae
Genus	: <i>Padina</i>
Spesies	: <i>Padina australis</i>



Gambar 1. *Padina australis*

Menurut Sastrohamidjojo (1985), senyawa metabolit sekunder dari alga coklat yang bersifat polar adalah flavonoid dan alkaloid, sedangkan senyawa yang bersifat nonpolar adalah terpenoid dan steroid. Flavonoids merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar yang terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh. Semua flavonoid, menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon yang mempunyai sejumlah sifat yang sama. Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid dalam tumbuhan umumnya terikat sebagai glikosida, baik O-glikosida maupun C-glikosida. Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid sering kali beracun bagi manusia dengan bahaya yang mempunyai aktivitas fisiologi yang menonjol sehingga digunakan secara luas dalam pengobatan. Alkaloid biasanya tak berwarna, seringkali bersifat aktif optik kebanyakan berbentuk kristal pada suhu kamar. Prazat alkaloid yang paling umum adalah asam amino, meskipun sebenarnya biosintesis kebanyakan asam amino lebih rumit. Secara kimia alkaloid merupakan suatu golongan heterogen. Banyak alkaloid bersifat terpenoid dan beberapa diantaranya dari segi biosintesis merupakan terpenoid termodifikasi alkaloid lain terutama berupa senyawa atomatik dengan gugus basa sebagai rantai samping.

Padina australis merupakan salah satu spesies alga yang berasal dari kelas Phaeophyta. Kelas Phaeophyta atau lebih dikenal sebagai alga coklat banyak mengandung berbagai komponen mineral antara lain kalsium, vitamin,

mineral, kalium, magnesium, natrium, Fe, Iod, Cu, Zn, S, P dan N) (Rahmat, 1999). Komposisi kimia *Padina australis* tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Kimia *Padina australis*

Komposisi Kimia	Jumlah (%)
Karbohidrat	15,55
Protein	3,97
Lemak	0,26
Air	8,78
Abu	26,67
Serat kasar	21,43

Sumber : Mulyo (2010)

2.3 *Trichoderma viride*

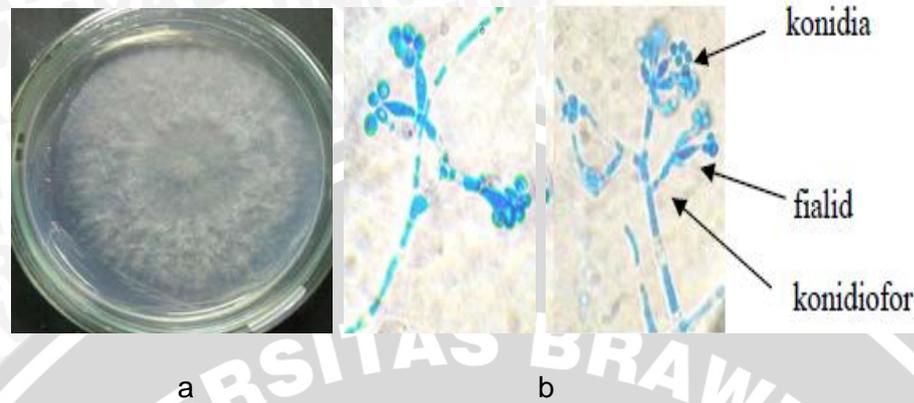
Menurut Tandion (2008), *Trichoderma sp.* diklasifikasikan dalam Kingdom Plantae, Devisio Amastigomycota, Class Deutromycetes, Ordo Moniliales, Famili Moniliaceae, Genus *Trichoderma*, Spesies *Trichoderma sp.*

Koloni *Trichoderma sp.* pada media agar pada awalnya terlihat berwarna putih. Selanjutnya miselium akan berubah menjadi kehijau-hijauan, lalu terlihat sebagian besar berwarna hijau ada ditengah koloni dikelilingi miselium yang masih berwarna putih, dan pada akhirnya seluruh medium akan berwarna hijau (Nurhayati, 2001).

Jamur *Trichoderma sp.* merupakan mikroorganisme yang mempunyai potensi selulolitik karena menghasilkan enzim selulosa pada substrat yang mengandung selulosa. Selulosa yang dihasilkan jamur *Trichoderma spp.* memiliki komponen enzim yang lengkap yaitu C1 (Selobiohidrolase) yang aktif menghidrolisis selulosa alam, Cx (Endoglukanase) yang aktif merombak selulosa terlarut seperti CMC (Carboxyl Nethyl Cellulose) dan B-glukosidase (Gunarto, 1996).

Gambar dari koloni *Trichoderma viride* dan konidiana dapat dilihat pada

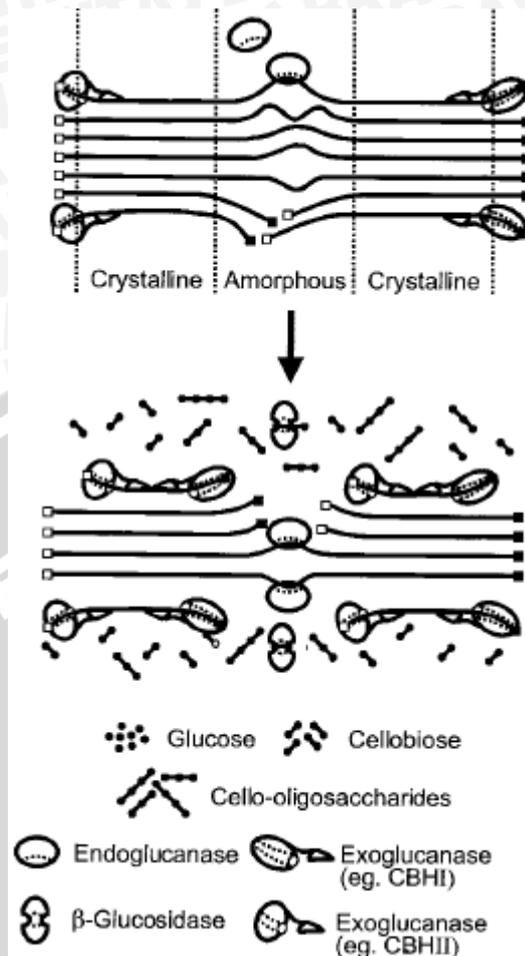
Gambar 2 (Samingan, 2009) :



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 $2.5 \times 3 \mu\text{m}$.

Trichoderma viride adalah kapang berfilamen yang sangat dikenal sebagai organisme selulolitik dan menghasilkan enzim-enzim selulolitik, 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. Karena kapang *Trichoderma viride* menghasilkan enzim selulase tersebut maka prosesnya dapat dilihat pada Gambar 3 dibawah ini.



Gambar 3. Skema hidrolisis enzimatik selulosa oleh enzim selulase (Lynd *et al.*, 2002).

Dalam gambar tersebut secara umum proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase diuraikan sampai menjadi glukosa, namun didalam penelitian ini penguraian selulosa cukup sampai pada tahap selulosa menjadi selubiosa.

2.4 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan melibatkan peran mikroorganismenya, 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).

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor elektron eksternal. Fermentasi dibagi menjadi 3 macam yaitu fermentasi alkohol dengan menghasilkan ethanol dan karbondioksida, fermentasi asam laktat dengan mengubah asam laktat menjadi asam piruvat dan fermentasi asam cuka dengan menghasilkan asam asetat (Wikipedia, 2013).

2.5 Radikal Bebas

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

Reaksi rantai radikal bebas meliputi tahap inisiasi, propagasi, dan terminasi. Inisiasi merupakan tahap pemutusan molekul halogen menjadi dua atom halogen. Tahap propagasi terjadi saat suatu radikal bereaksi dengan molekul lainnya membentuk radikal yang selanjutnya dapat bereaksi seperti reaksi sebelumnya. Proses tersebut berhenti saat dua radikal berantai bergabung, sehingga rantai terterminasi atau putus karena tidak ada radikal baru yang terbentuk (Hart, *et al.*, 2003).

2.6 Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Ardiansyah, 2009)

Antioksidan adalah zat yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya proses oksidasi. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Manfaat antioksidan bagi kesehatan dan kecantikan, misalnya untuk mencegah penyakit kanker dan tumor, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain. Dalam produk pangan, antioksidan dapat digunakan untuk mencegah

terjadinya proses oksidasi yang dapat menyebabkan kerusakan, seperti ketengikan, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lainnya (Antiooksidan, 2004).

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

Antioksidan digolongkan dalam dua golongan yaitu antioksidan alami dan sintetik. Antioksidan sintetik seperti BHA (*butylated hydroxy-anisole*) dan BHT (*butylated hydroxyl-toluene*) sangat efektif dalam menghambat reaksi oksidasi. Akan tetapi penggunaan BHT dan BHA banyak menimbulkan kekhawatiran akan efek sampingnya. BHA dapat menyebabkan pembengkakan hati dan mempengaruhi aktivitas enzim dalam hati. Selain itu, BHA juga menyebabkan pendarahan fatal pada rongga *pleural* dan *peritoneal* dan juga pada testes. BHT juga menyebabkan perubahan hormon tiroid tikus, stimulasi sintesis DNA dan induksi enzim. Antioksidan alami dapat dijumpai pada rempah-rempah, biji-bijian, kacang-kacangan, sayur dan buah. Antioksidan alami dianggap lebih aman untuk dikonsumsi (Andarwulan *et al.*, 1996).

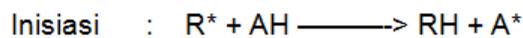
Peranan antioksidan sangat penting dalam meredam efek radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif seperti tekanan darah tinggi, jantung koroner, diabetes dan kanker yang didasari oleh proses biokimiawi dalam tubuh (Juniarti *et al.*, 2009).

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

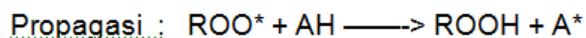
2.6.1 Mekanisme kerja antioksidan

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

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

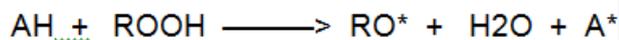
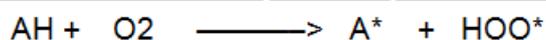


Radikal lipida



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).

2.7 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut non polar (n-heksan) lalu pelarut yang kepolarannya menengah (dikloro metan atau etilasetat) kemudian pelarut yang bersifat polar (metanol atau etanol). Prinsip dasar ekstraksi adalah berdasarkan kelarutan. Untuk memisahkan zat terlarut yang diinginkan atau menghilangkan komponen zat terlarut yang tidak diinginkan dari fasa padat, maka fasa padat dikontakkan dengan fasa cair. Pada

kontak dua fasa tersebut, zat terlarut terdifusi dari fasa padat ke fasa cair sehingga terjadi pemisahan dari komponen padat (Utami *et al.*, 2009).

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

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi karena cara ini merupakan metode yang mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana cukup dengan merendam sampel dalam pelarut, pelarut yang digunakan adalah methanol karena pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun senyawa non polar. Semua filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi diuapkan dengan menggunakan rotary vacuum evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental (Andayani *et al.*, 2008).

2.8 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor utama yang menentukan keberhasilan dalam proses ekstraksi. Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non polar (Vogel, 1987). Adapun konstanta dielektrik bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 4 dan sifat pelarut umum dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. 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 5. Sifat-Sifat Pelarut Umum

Solvent	Rumus kimia	Titik didih	Konstanta Dielektrik	Massa jenis
Pelarut Non-Polar				
heksana	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	69 °C	2.0	0.655 g/ml
benzena	C ₆ H ₆	80 °C	2.3	0.879 g/ml
toluena	C ₆ H ₅ -CH ₃	111 °C	2.4	0.867 g/ml
diethyl eter	CH ₃ CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₃	35 °C	4.3	0.713 g/ml
loroform	CHCl ₃	61 °C	4.8	1.498 g/ml
etil asetat	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	77 °C	6.0	0.894 g/ml
Pelarut Polar Aprotic				
1,4-Dioksana	/-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-\	101 °C	2.3	1.033 g/ml
Tetrahidrofuran (THF)	/-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -\	66 °C	7.5	0.886 g/ml
Diklorometana (DCM)	CH ₂ Cl ₂	40 °C	9.1	1.326 g/ml
Asetona	CH ₃ -C(=O)-CH ₃	56 °C	21	0.786 g/ml
Asetonitril (MeCN)	CH ₃ -C≡N	82 °C	37	0.786 g/ml
Dimetilformamida (DMF)	H-C(=O)N(CH ₃) ₂	153 °C	38	0.944 g/ml
Dimetil sulfoksida (DMSO)	CH ₃ -S(=O)-CH ₃	189 °C	47	1.092 g/ml
Pelarut Polar Protic				
Asam asetat	CH ₃ -C(=O)OH	118 °C	6.2	1.049 g/ml
n-Butanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	118 °C	18	0.810 g/ml
Isopropanol (IPA)	CH ₃ -CH(OH)-CH ₃	82 °C	18	0.785 g/ml
n-Propanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -OH	97 °C	20	0.803 g/ml
Etanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	79 °C	30	0.789 g/ml
Metanol	CH ₃ -OH	65 °C	33	0.791 g/ml
Asam format	H-C(=O)OH	100 °C	58	1.21 g/ml
Air	H-O-H	100 °C	80	1.000 g/ml

Sumber : (Wikipedia, 2009)

Larutan pengekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa yang diinginkan. Etanol, disebut juga etil alkohol, alkohol murni, alkohol absolut, atau *alkohol* saja, adalah sejenis cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna, dan merupakan alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Memiliki rumus kimia C₂H₅OH dan rumus empiris C₂H₆O. Ia merupakan isomer konstitusional dari dimetil eter.

(Wikipedia, 2013^a)

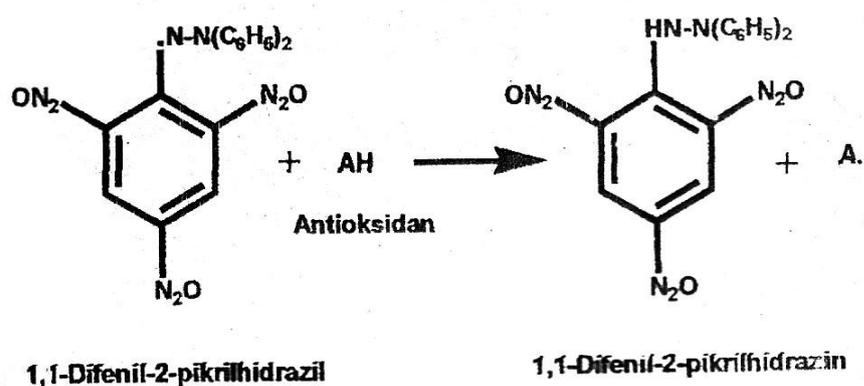
2.9 Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik,

dan untuk mengembalikannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan electron dari molekul lain atau melepas electron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein atau jaringan lemak (Praptiwi *et al.*, 2006).

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

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima electron atau radikal hydrogen akan membentuk molekul diamagnetic yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer electron atau radikal hydrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua electron 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 electron atau atom hydrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH terdapat pada Gambar 6 (Suratmo, 2009).



Gambar 6. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH (Suratmo, 2009)

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

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

Pengukuran antioksidan secara “efek peredaman radikal bebas DPPH” merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode yang lain (xanthin-xanthin oxidase, metode tiosianat, antioksidan total). Pada metode ini, DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut dan membentuk 1,1-difenil-2-pikril hidrazil. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna yang dapat

diukur dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga aktivitas peredaman dapat ditentukan. Jika absorban sampel lebih besar daripada absorban blanko, maka sampel tidak aktif sebagai antioksidan (Juniarti *et al.*, 2009).

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

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

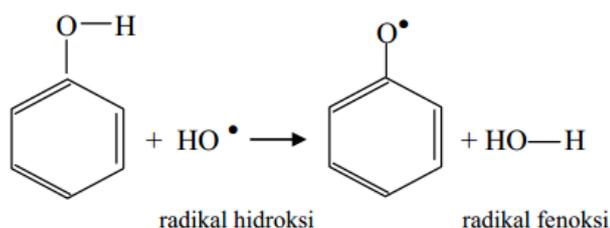
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100$$

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 IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Aktivitas antioksidan dapat dikatakan kuat apabila mempunyai IC_{50} kurang dari $200 \mu\text{g/ml}$ Blois (1958).

2.10 Kandungan *Padina australis* Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan

Senyawa Fenol adalah senyawa dengan gugus OH yang terikat pada cincin aromatik. Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang memiliki cirri-ciri yang sama, yaitu cincin aromatic yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena sering berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. 7 Senyawa polifenol contohnya fenil propanoid, tanin, flavonoid, dan beberapa terpenoid (Harbone, 1987).

Senyawa fenol merupakan kelas utama antioksidan yang berada dalam tumbuh-tumbuhan (Marinova et al. 2005). Radikal peroksi ($ROO\cdot$) dan radikal hidroksi ($HO\cdot$) mencabut atom hidrogen fenolik menghasilkan radikal fenoksi yang lebih stabil. Pembentukan radikal fenoksi dapat dilihat pada Gambar 7 (Hart, et al., 2003).



Gambar 2. Reaksi Fenol
(Hart *et al.* 2003)

Gambar 7. Pembentukan Radikal Fenoksi

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).

Alkaloid adalah senyawa kimia tanaman hasil metabolit sekunder yang terbentuk berdasarkan prinsip pembentukan campuran Alkaloid terbagi menjadi tiga bagian, yaitu elemen yang mengandung N terlibat pada pembentukan alkaloid, elemen tanpa N yang ditemukan dalam molekul alkaloid dan reaksi yang terjadi untuk pengikatan khas elemen-elemen pada alkaloid (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).

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

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

Flavonoid adalah sekelompok senyawa polifenol yang terdapat dalam tanaman. Konsumsi flavonoida dalam makanan berkisar antara 50-80 mg/hari. Flavonoida dalam makanan diantaranya yaitu quercetin, kaempferol, luteolin, morin, dan katekin. Senyawa tersebut memiliki kemampuan mencegah kanker yang diduga melalui sifat sebagai antioksidan, penangkap radikal bebas, dan kemampuannya menonaktifkan kation polivalen (Silalahi 2006).

Flavonoid memiliki kemampuan antioksidan yang mampu mentransfer sebuah elektron ke senyawa radikal bebas dan membentuk kompleks dengan logam. Kedua mekanisme itu membuat flavonoid memiliki beberapa efek, diantaranya menghambat peroksidasi lipid, menekan kerusakan jaringan oleh radikal bebas dan menghambat beberapa enzim (Harborne 1987)

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Alga coklat *Padina australis* 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 lackban 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 *Padina australis* yaitu pelarut etanol teknis. Digunakan pelarut etanol karena etanol memiliki kepolaran yang hampir sama dengan karakteristik antioksidan *Padina australis*. 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 kontrol pembanding dalam penelitian ini adalah Vitamin C (Merck p.a). Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk uji fitokimia adalah sebagai berikut :

- Uji Alkaloid: HCL 2N, dan 6 ml aquadest
- Uji Fenol: 20 ml etanol 96%, larutan FeCl₃

- 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 *Padina australis* adalah baskom, pisau, tissue, talenan, timbangan analitik, beaker glass 500 ml, erlenmayer 500ml, gelas corong, spatula, gelas ukur, 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).

Metode eksperimen yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pengaruh lama waktu inkubasi dan tingkat konsentrasi biakan *Trichoderma sp.* terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Padina australis* segar. Hipotesis ini dibuktikan dengan

melakukan uji daya penghambatan radikal bebas dari senyawa yang berhasil diekstraksi. Indikator/parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga *inhibition concentration* (IC_{50}), dimana $IC_{50} < 200$ ppm maka senyawa antioksidan berhasil memberikan penghambatan 50% karakter radikal bebas yang diekstraksi dari sampel.

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

3.2.1.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Pembuatan kurva tumbuh digunakan untuk menentukan fase pertumbuhan kapang *Trichoderma viride* yang akan diinokulasi. Kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan perhitungan berat biomassa jamur selama 7 hari. Pertumbuhan maksimal *Trichoderma viride* ditentukan dengan membuat kurva pertumbuhan jumlah spora yang diamati setiap hari selama 7 hari (Arnata, 2009)

- Disiapkan kapang *Trichoderma viride* dan media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) untuk penanaman 7,2 gram dan 300 ml aquadest
- Setiap labu erlenmeyer diisi 2,4 gram PDB dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest dan diulangi lagi sebanyak empat kali
- Empat labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci lalu disterilisasi untuk membersihkan dari kontaminan
- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan kapang *Trichoderma viride* yang telah tumbuh di media PDA untuk ditanam ke media PDB dan ditimbang.
- Dihitung jumlah koloni (spora) / ml setiap hari selama 7 hari dengan menggunakan hemacitometer (Zubaidah *et al.*, 2006)
- Ditimbang setiap 24 jam sekali selama 7 hari.

- Diperoleh data, selanjutnya dibuat grafik kurva pertumbuhan

3.2.1.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui lama waktu inkubasi yang tepat untuk inkubasi sampel dan konsentrasi biakkan yang tepat untuk starter sampel. Fase *starter* yang digunakan pada penelitian ini yaitu fase stasioner sesuai dengan kurva pertumbuhan *Trichoderma viride*. Dari hasil penelitian Arnata (2009), fase stasioner pertumbuhan *Trichoderma viride* diperoleh setelah kultivasi selama 6 hari dengan jumlah spora maksimum $1,58 \times 10^9$.

Perlakuan yang diberikan adalah waktu inkubasi selama 6, 9 dan 12 hari, dengan konsentrasi biakkan 5 %, 10 %, 20% (v/b) dari berat sampel (100 g) di dalam 2 ml PDB serta 0 hari sebagai kontrol. Rancangan penelitian pendahuluan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor (lama inkubasi dan konsentrasi biakkan) yang terdiri dari 3 level dan 2 kali ulangan. Adapun desain penelitian pendahuluannya dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. RAL (Rancangan Acak Lengkap) Penelitian Pendahuluan

No.	Lama Inkubasi	Konsentrasi		
		P1	P2	P3
1.	W1	W1		
2.	W2	(W2P1) ₁	(W2P2) ₁	(W2P3) ₁
		(W2P1) ₂	(W2P2) ₂	(W2P3) ₂
3.	W3	(W3P1) ₁	(W3P2) ₁	(W3P3) ₁
		(W3P1) ₂	(W3P2) ₂	(W3P3) ₂
4.	W4	(W4P1) ₁	(W4P2) ₁	(W4P3) ₁
		(W4P1) ₂	(W4P2) ₂	(W4P3) ₂

Keterangan :

W1 : kontrol (tanpa perlakuan)

W2 : lama waktu inkubasi 6 hari

W3 : lama waktu inkubasi 9 hari

- W4 : lama waktu inkubasi 12 hari
- P1 : konsentrasi 5% dari berat sampel (100 g) di dalam 2 ml PDB
- P2 : konsentrasi 10% dari berat sampel (100 g) di dalam 2 ml PDB
- P3 : konsentrasi 20% dari berat sampel (100 g) di dalam 2 ml PDB

3.2.1.3 Prosedur Penelitian Pendahuluan

3.2.1.3.1 Pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur *Trichoderma viride*

- Cawan petri, labu erlenmeyer 250 ml dan jarum ose dicuci bersih lalu dioven sebentar dengan suhu 35⁰C untuk menghilangkan air
- Untuk penanaman pertama, diambil serbuk media PDA (*Potatoes dextrose agar*) sebanyak 2,34 gram untuk dilarutkan ke dalam 60 ml aquadest lalu dimasukan labu erlenmeyer 250 ml
- Cawan petri, jarum ose dan labu erlenmeyer berisi media PDA direbus dalam panci selama 10 menit dengan suhu 100⁰C
- Selanjutnya dimasukan ke dalam autoklaf untuk 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 dibalik
- Diinkubasi dalam *incase* dan ditunggu 1 minggu
- Setelah jamur tumbuh merata, disiapkan media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) untuk peremajaan sebanyak 7,2 gram dan dilarutkan dalam 300 ml aquadest
- Labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci lalu disterilisasi untuk membersihkan dari kontaminan

- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan jamur *Trichoderma viride* yang telah tumbuh di media PDA untuk ditanam ke media PDB
- Lalu diinkubasi dalam *incase* selama 6 hari agar jamur tumbuh merata sambil tiap hari *dishaker* selama 6 jam sekali agar nutrient yang mengendap bisa tercampur merata. Dari hasil penelitian, fase stationer pertumbuhan *T. viride* diperoleh setelah kultivasi selama 6 hari dengan jumlah spora maksimum $1,58 \times 10^9$ (Arnata, 2009)
- Didapatkan *starter* berupa jamur *Trichoderma viride* dalam media PDB

3.2.1.3.2 Fermentasi dan ekstraksi *Padina australis*

- Sampel *Padina australis* 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 untuk memperluas permukaan bahan dan mempermudah proses maserasi bahan
- Sampel diberi asam asetat yang memiliki pH asam. Tujuannya agar memanipulasi kondisi pH antara 3-4, agar kapang *Trichoderma viride* dapat tumbuh subur untuk proses fermentasi dan menghindarkan bakteri patogen yang hidup pada sampel. 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. Suhu optimum pertumbuhan sekitar 32 – 350 C dan produksi enzim sekitar 25 – 300 C. Karakteristik dari enzim selulase adalah memiliki pH optimum 4 dan akan tetap stabil pada pH 3 – 7. Suhu optimum adalah 500 C dan aktivasinya akan menurun jika suhunya lebih dari 500C (Waluyo 2004).

- Ditimbang dengan timbangan digital sebanyak 100 gram untuk tiap perlakuan
- Tiap sampel dimasukkan ke dalam beaker glass 50 ml, ditutup dengan alufo yang telah diberi lubang-lubang kecil lalu difermentasi selama 6, 9, 12 hari dan 0 hari sebagai kontrol pada suhu ruang.
- Sampel dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 24 jam (Suryaningrum *et al.*, 2006)
- Disaring dengan kertas saring kasar lalu dipisahkan antara pelarut dan sampel menggunakan alat *vacuum rotary evaporator*.
- Didapatkan ekstrak kasar *Padina australis* lalu diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Blois, 1958)

3.2.1.4 Parameter Uji

Parameter uji yang digunakan adalah rendemen, kadar air, dan IC_{50} adalah parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan. Metode yang digunakan adalah spektrofotometri dengan reagen DPPH (1,1-*diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (Banerjee *et al.*, 2005). Hasil terbaik dari penelitian pendahuluan ini selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan waktu 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 tingkat konsentrasi biakan *Trichoderma viride*.

3.2.2.1. Perlakuan dan Rancangan Penelitian Utama

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 waktu fermentasi (W) dengan level 7 hari (W1), 9 hari (W2), dan 11 hari (W3). Perlakuan kedua yaitu faktor konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (P) dengan level P1, P2, dan P3 secara berurutan adalah 3% (v/b), 5% (v/b), 7%(v/b). 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 :

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

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 ξ_{ijk} adalah galat dari semua faktor. Desain rancangan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Desain Rancangan Penelitian Utama

	P1	P2	P3
W1	(W1P1) ₁	(W1P2) ₁	(W1P3) ₁
	(W1P1) ₂	(W1P2) ₂	(W1P3) ₂
W2	(W2P1) ₁	(W2P2) ₁	(W2P3) ₁
	(W2P1) ₂	(W2P2) ₂	(W2P3) ₂
W3	(W3P1) ₁	(W3P2) ₁	(W3P3) ₁
	(W3P1) ₂	(W3P2) ₂	(W3P3) ₂

Keterangan :

W1 : Waktu fermentasi 7 hari

W2 : Waktu fermentasi 9 hari

W3 : Waktu fermentasi 11 hari

P1 : konsentrasi 3% (v/b) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

P2 : konsentrasi 5% (v/b) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

P3 : konsentrasi 7% (v/b) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

Pada penelitian ini menggunakan lama inkubasi 7, 9 dan 11 hari. Lama waktu inkubasi terbaik pada penelitian pendahuluan adalah 9 hari, sedangkan 7 dan 11 hari adalah pembanding. Selain itu, konsentrasi biakkan yang digunakan yaitu 3% (v/b), 5% (v/b) dan 7% (v/b) dari berat sampel 50 gram. Dari hasil penelitian pendahuluan diperoleh konsentrasi biakan terbaik adalah 5% (v/b), sedangkan 3% (v/b) dan 7% (v/b) digunakan sebagai konsentrasi pembanding.

3.2.3 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh dari hasil perhitungan IC_{50} (Suryaningrum *et al.*, 2006), rendemen (Suryaningrum *et al.*, 2006), kadar air (Sudarmadji *et al.*, 2007), serta uji fitokimia yang terdiri dari uji alkaloid, fenol, dan flavonoid (Harbone, 1987). 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.

3.2.4 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh terhadap respon parameter yang diukur, dilakukan analisis dengan menggunakan software SPSS versi 1.6 dan Microsoft

office excel untuk pengolahan data dan untuk mengetahui perlakuan terbaik, dalam hal ini konsentrasi dan lama inkubasi.

3.3 Prosedur Penelitian Utama

3.3.1 Pembuatan media dan pembiakan jamur *Trichoderma viride*

- Cawan petri, labu Erlenmeyer 250ml dan jarum ose dicuci bersih lalu dioven sebentar dengan suhu 35⁰C untuk menghilangkan air
- Untuk penanaman pertama, diambil serbuk media PDA (*Potatoes dextrose agar*) sebanyak 1,755 gram untuk dilarutkan ke dalam 45 ml aquadest lalu dimasukan labu Erlenmeyer 250ml
- Cawan petri, jarum ose dan labu Erlenmeyer berisi media PDA direbus dalam panci selama 10 menit dengan suhu 100⁰C
- Selanjutnya dimasukan 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 dibalik
- Diinkubasi dalam incase dan ditunggu 1 minggu

3.3.2 Peremajaan jamur *Trichoderma viride*

- Disiapkan media PDB (*Potatoes dextrose broth*) untuk penanaman kedua sebanyak 7,2 gram dan dilarutkan dalam 300 ml aquadest.
- Pisau dan labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci lalu disterilisasi untuk membersihkan dari kontaminan.

- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan jamur *T. viride* yang telah tumbuh di media PDA untuk ditanam ke media PDB. Lalu diinkubasi selama 6 hari agar jamur tumbuh secara merata sambil di *shaker* labu erlenmeyer menggunakan mesin *shaker* agar nutrient yang mengendap bisa tercampur merata.

3.3.3. Fermentasi *Trichoderma viride*

- *Padina australis* segar dicuci memakai air ditambah garam meja untuk membersihkan sampel dari sisa-sisa mineral dan pengotor yang masih menempel pada sampel
- Setelah dicuci, diangin-anginkan hingga kering
- Setelah kelihatan kering *Padina australis* dipotong kecil-kecil menggunakan blender untuk mempermudah proses maserasi
- Setelah dipotong kemudian ditimbang sebanyak 50 gram dan dimasukkan pada erlenmeyer. Dilakukan hal yang sama sebanyak 18 kali
- Setelah itu ditambahkan konsentrasi biakan sebanyak 3% (v/b), 5% (v/b), dan 7% (v/b) dari berat sampel (50 g) *Padina australis* di dalam 3,5 ml media PDB.
- Difermentasi masing-masing erlenmeyer selama 7, 9, dan 11 hari.

3.3.4 Ekstraksi *Padina australis* (Suryaningrum *et al.*, 2006)

- Semua sampel dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 24 jam dan di *shaker* menggunakan alat *shaker*. 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 (titik didih pelarut etanol) 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 air dan kadar antioksidannya

3.4 Prosedur Analisis Parameter

3.4.1 Perhitungan Koloni Jamur dengan *Haemocytometer*

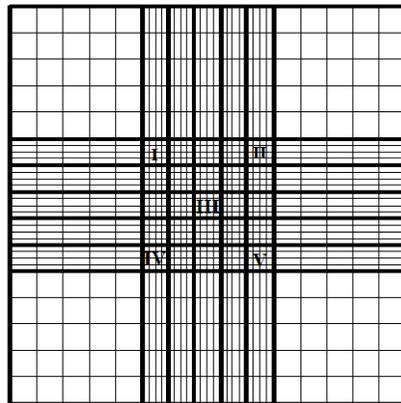
Dalam metode petroff hauser, hitungan mikroskopik dilakukan dengan pertolongan kotak-kotak skala dimana dalam setiap ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 25 buah kotak besar dengan luas 0.04 mm² dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil. Tinggi sampel yang terletak diantara gelas obyek dan gelas 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 :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{Jumlah sel rata-rata tiap petak (mewakili 5 petak)} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Luas petak (mm}^2\text{)} \times \text{kedalaman petak (mm}^2\text{)}}$$

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

Kotak I, II, III, IV, dan V adalah contoh kotak yang akan dihitung jumlah konidianya. Kotak ini terletak pada keempat sudutnya yang ditambahkan satu pada

tengahnya. Setiap kotak berisi 16 kotak kecil (Syaifuddin, 1992). Kotak Haemocytometer dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Kotak Haemocytometer

3.4.2 Uji Antioksidan (DPPH)

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak kasar etanol dari *Padina australis* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode Blois (1958). Ekstrak etanol dari *Padina australis* dilarutkan dalam etanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5 ml. Kedalam tiap tabung reaksi ditambahkan 0,5 mL larutan DPPH 1mM dalam etanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya 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:

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

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

3.4.3 Uji Fitokimia (Harbone, 1987)

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

- 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.
- Uji Fenol:** Sebanyak 20 ml etanol 96% dimasukkan 1 gram sampel ditambahkan 2 tetes larutan $FeCl_3$. Senyawa fenol ditunjukkan dengan pembentukan warna hijau tua atau hitam.
- 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.

3.4.4 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 $105-110^{\circ}C$ 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)

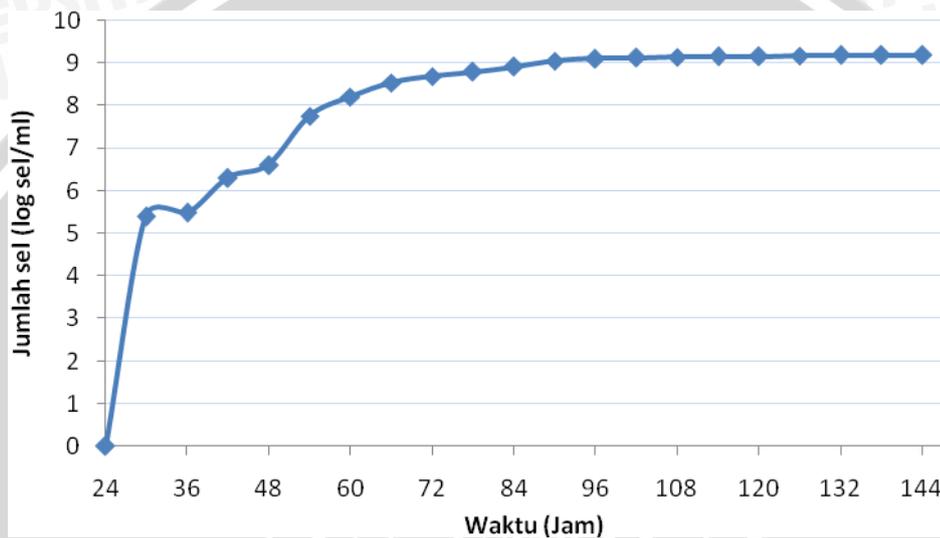
3.4.5 Uji Total Fenol

Kandungan total fenol diukur dengan spektrofotometer menggunakan reagen *Follin-Ciocalteau* (Apostolidis dan Lee, 2010). 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 absorban. Kandungan total fenol diinterpretasikan sebagai milligram ekivalen asam galat (GAE = *Galic Acid Equivalent*) per gram sampel (mg GAE/g sampel).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Perhitungan analisis kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* disajikan pada lampiran 1. Dan kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* dapat dilihat pada Gambar 9.

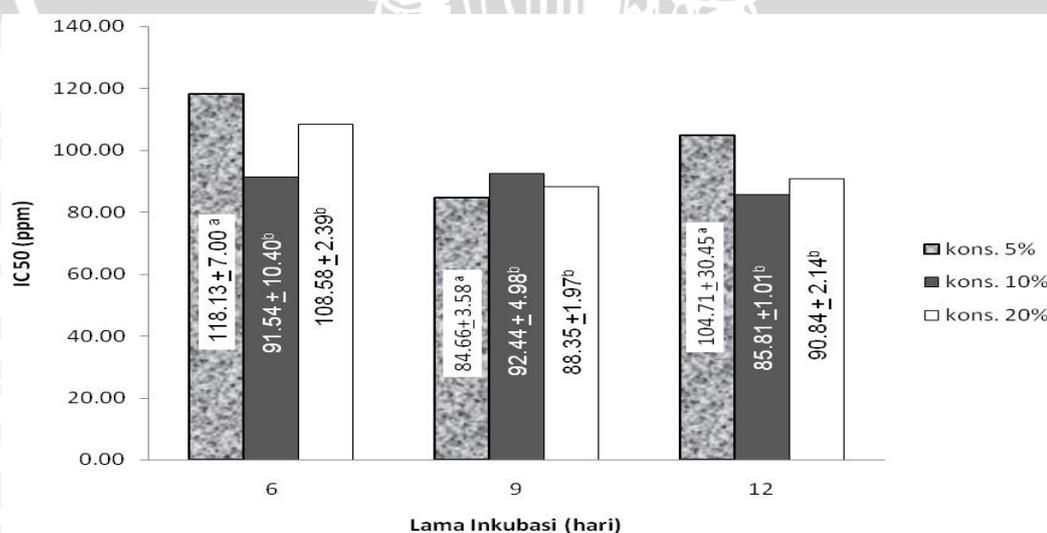


Gambar 9. Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Dari gambar 7, didapatkan hasil pertumbuhan kapang *Trichoderma viride* berada pada (fase lag) ditunjukkan pada jam ke 24 – 48, dimana pada fase ini *Trichoderma viride* dipindahkan ke dalam suatu medium, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan di sekitarnya. Dan tahap (fase log) ditunjukkan pada jam antara 48 – 126, dimana pada fase log ini *T. viride* membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Dan tahap (fase stationer) ditunjukkan pada 132 – 144 (antara hari ke 5 - 6); dimana pada fase ini jumlah populasi sel tetap, karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Jadi pada fase inilah yang cocok untuk dilakukan proses lama inkubasi (fermentasi) pada sampel *Padina australis* dengan tingkat lama inkubasi yaitu 7, 9, dan 11 hari.

4.2 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. Perhitungan analisis terhadap IC_{50} ekstrak ethanol 96% *Padina australis* disajikan pada Lampiran 2. Hasil ANOVA IC_{50} berbeda nyata oleh perlakuan lama inkubasi ($p < 0.05$), tetapi IC_{50} tidak berbeda nyata oleh perlakuan konsentrasi karena ($p > 0.05$), dan interaksi antara keduanya tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 10. Nilai IC_{50} terkuat didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 9 hari dengan konsentrasi 5% (v/b) rerata sebesar 84.659 ppm, dan nilai IC_{50} terlemah didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 6 hari dengan konsentrasi 5% (v/b) rerata sebesar 118.134 ppm. Perbandingan nilai hasil IC_{50} pada perlakuan dengan penambahan konsentrasi dan lama inkubasi yang berbeda, lebih baik daripada hasil perlakuan ekstrak menggunakan pelarut methanol yaitu sebesar 267,05 ppm (Podungge, 2012).



Gambar 10. Grafik IC_{50} ekstrak *Padina australis* hasil fermentasi dengan *Trichoderma viride* pada penelitian pendahuluan

Fermentasi adalah segala macam proses metabolisme (enzim, jasad renik secara oksidasi maupun reduksi, hidrolisa atau reaksi kimia lainnya) yang melakukan perubahan kimia pada suatu substrat organik yang bertujuan menghasilkan suatu produk yang kandungan nutrisi, *biological availability*, dan teksturnya lebih baik dari sebelumnya (Pujaningsih, 2005). Dengan difermentasi terlebih dahulu, senyawa-senyawa kompleks penyusun dinding sel alga terurai dan menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga bisa didapatkan lebih banyak senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan.

Aktivitas antioksidan kesembilan sampel masih tergolong antara (kuat dan sedang), karena nilai IC_{50} -nya sekitar 84.659-118.134 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.

Dari hasil penelitian pendahuluan, didapatkan hasil waktu fermentasi yang terbaik untuk menginkubasi sampel adalah waktu fermentasi selama 9 hari dengan konsentrasi 5% (v/b) dengan nilai IC_{50} sebesar 84.659 ppm, sehingga waktu ini yang dipakai sebagai acuan dasar pemilihan waktu fermentasi dan konsentrasi untuk penelitian utama. Karena sampel yang difermentasi selama 9 hari dengan konsentrasi 5% (v/b) 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 daratan 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. Pada tahap penelitian utama ditambahkan perlakuan berupa penambahan konsentrasi jamur *Trichoderma viride*, 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 *Padina australis*. Sampel yang terfermentasi selanjutnya diekstraksi. Proses ekstraksi menghasilkan sampel berwarna hijau muda agak kekuningan.

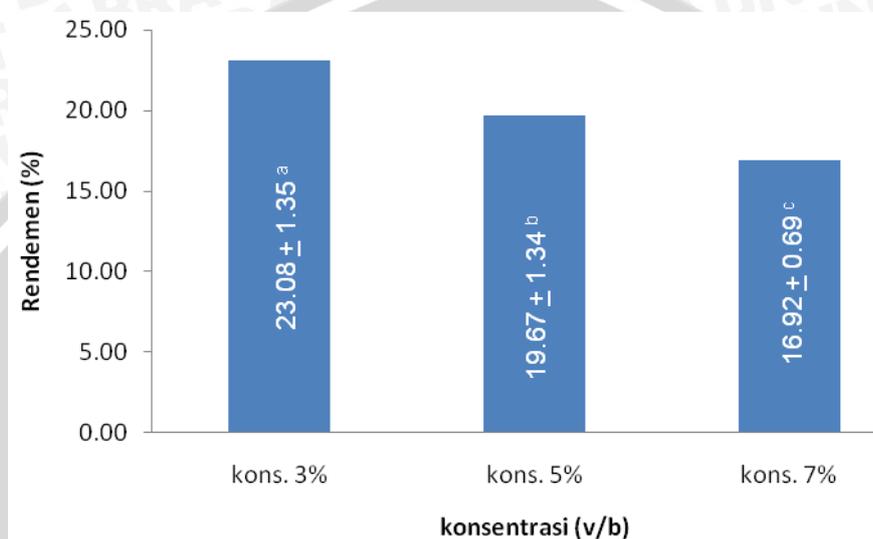
4.4 Rendemen dan kadar air

4.4.1 Rendemen

Hasil ekstraksi yang berbeda, antara waktu fermentasi dan konsentrasi biakan *Trichoderma viride*, menunjukkan nilai rendemen yang berbeda-beda. Rendemen kering ekstrak merupakan perbandingan antara berat kering ekstrak kasar yang dihasilkan dengan berat kering sampel 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% *Padina australis* disajikan pada Lampiran 1. Hasil ANOVA rendemen antioksidan, berbeda nyata oleh konsentrasi ($p < 0.05$), karena semakin tinggi tingkat konsentrasi *Trichoderma viride* yang diberikan maka semakin kecil rendemen yang dihasilkan dan begitu juga sebaliknya; akan tetapi rendemen tidak berbeda

nyata oleh lama inkubasi ($p > 0.05$). Dan interaksi antara dua perlakuan tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 11. Nilai rendemen tertinggi didapat dari sampel dengan perlakuan konsentrasi 3% (v/b) rerata sebesar 23.08%; dan nilai terendah pada konsentrasi 7% (v/b) rerata sebesar 16.92%.



Gambar 11. Grafik hasil persen rendemen *Padina australis* perlakuan konsentrasi *Trichoderma viride*

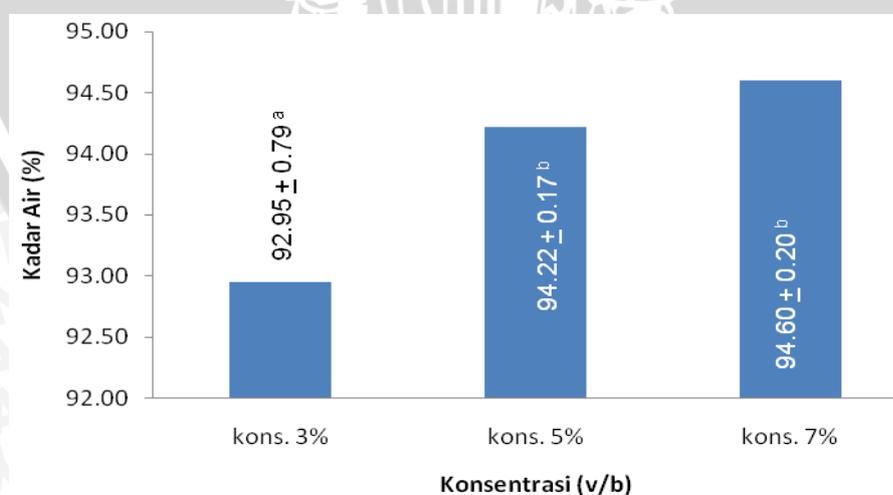
Rendemen dan kadar air saling berhubungan. Rendemen tinggi belum tentu berkualitas tinggi karena jika kadar airnya rendah maka konsentrasi ekstrak yang didapatkan juga rendah. Arnata (2009) juga melaporkan bahwa aktivitas maksimal *filter paperase* diperoleh setelah fermentasi selama 7 hari. Pertumbuhan kapang *T. viride* sudah optimal, sehingga kemampuan untuk menghasilkan selulase menjadi meningkat. Dan pada perlakuan konsentrasi 3% (v/b), memiliki kisaran pH sekitar 4,1 - 4,9. Hal ini didukung oleh (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. Hal ini diduga dengan konsentrasi yang rendah 3% (v/b), dapat mempengaruhi persaiangan yang aman didalam menguraikan

polisakarida yang terkandung pada *Padina australis*, sehingga mencukupi kelangsungan hidup *Trichoderma viride*.

4.4.2 Kadar air

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

Perhitungan analisis terhadap persen kadar air ekstrak ethanol 96% *Padina australis* disajikan pada Lampiran 1. Hasil ANOVA kadar air *Padina australis*, berbeda nyata oleh perlakuan konsentrasi biakan ($p < 0.05$), karena semakin tinggi konsentrasi *Trichoderma viride* yang diberikan maka semakin tinggi kadar air yang dihasilkan; namun tidak berbeda nyata oleh perlakuan lama inkubasi ($p > 0.05$). Dan interaksi antara kedua perlakuan tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 12. dan hasil kadar air tertinggi diperoleh pada perlakuan konsentrasi 7% (v/b) rerata sebesar 94.60% dan terendah pada perlakuan konsentrasi 3% (v/b) rerata sebesar 92.95%.



Gambar 12. Grafik hasil persen kadar air ekstrak *Padina australis* perlakuan konsentrasi *Trichoderma viride*

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 konsentrasi *T. viride* memberikan hasil persen rendemen dan persen kadar air yang berbeda-beda juga. Semakin tinggi persen kadar air maka semakin jelek nilai konsentrasi sampel dalam ekstrak kasar. Diwaktu mengekstraksi ekstrak kasar sampel menggunakan alat evaporator, hal tersebut dapat mempengaruhi jumlah persen kadar air pada ekstrak kasar sampel *Padina australis*. Karena pada waktu memberikan tekanan udara pada alat tersebut dilakukan secara manual dan bukan digital. Sehingga menghasilkan persen kadar air ekstrak kasar sampel yang berbeda-beda.

4.5 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} 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

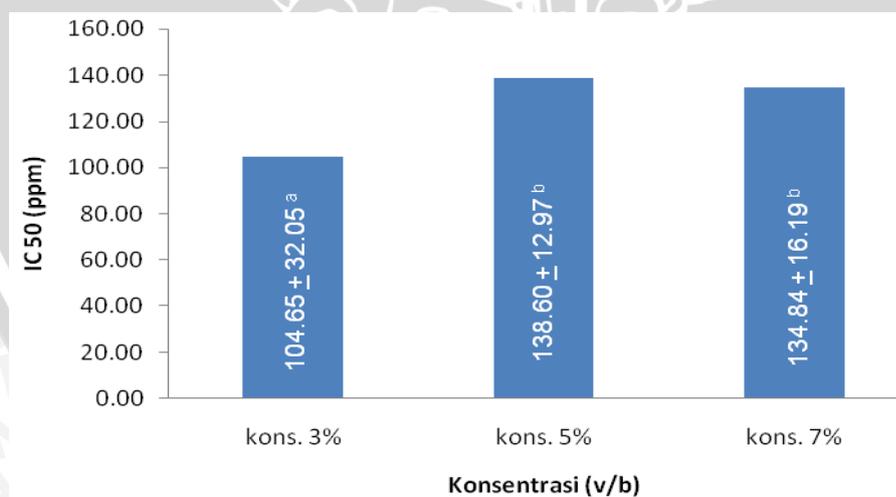
antioksidan tersebut membentuk *1,1-difenil-2-pikrilhidrazin*. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning atau kuning gelap yang dapat diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 517 nm, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Sunarni, *et al.*, 2005). Antioksidan pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah Vitamin C.

Reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh ekstrak *Padina australis* diindikasikan dengan berubahnya warna ungu menjadi warna kuning. Perubahan warna ini 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 mengindikasikan aktivitas penghambatan radikal bebas oleh sampel antioksidan Abdille *et al.*, (2004).

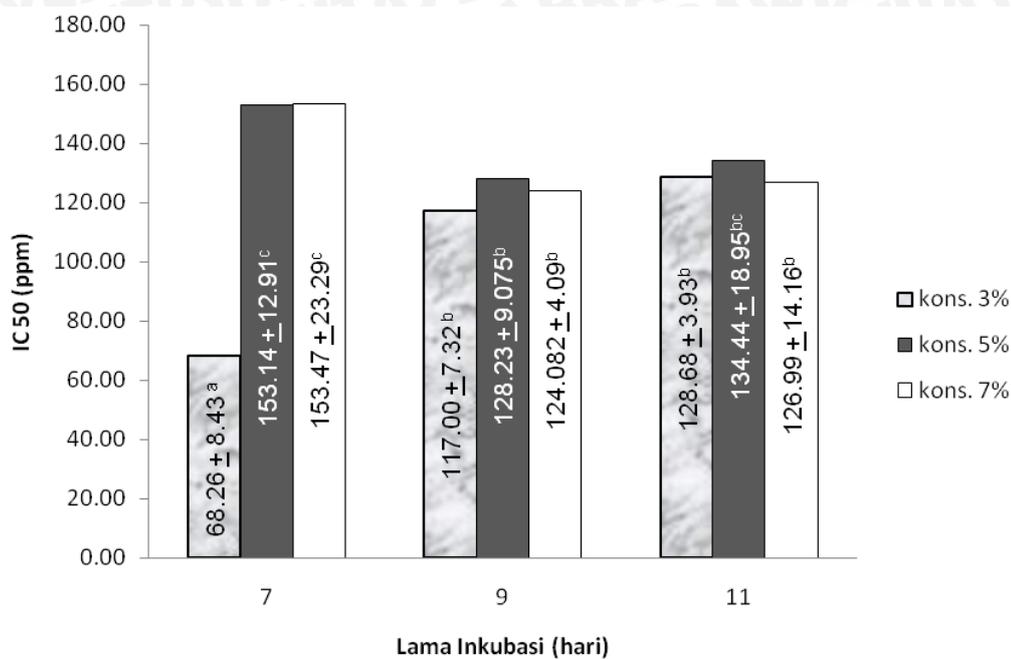
Perubahan warna yang terjadi pada ekstrak *Padina australis* disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas DPPH dengan satu atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa yang terkandung dalam sampel untuk membentuk senyawa *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* yang berwarna kuning. Senyawa yang bereaksi sebagai 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 (Molyneux, 2004). Berdasarkan mekanisme tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa antioksidan mempunyai sifat yang relatif stabil dalam bentuk radikalnya.

Senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dapat diprediksi dari golongan fenolat, flavonoid dan alkaloid.

Perhitungan analisis terhadap IC_{50} ekstrak ethanol 96% *Padina australis* disajikan pada Lampiran 2. Hasil ANOVA IC_{50} berbeda nyata oleh perlakuan konsentrasi ($p < 0.05$), karena semakin tinggi tingkat konsentrasi yang diberikan maka IC_{50} yang dihasilkan semakin lemah; tetapi IC_{50} tidak berbeda nyata oleh perlakuan lama inkubasi karena ($p > 0.05$), dan interaksi antara keduanya berbeda nyata ($p < 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 13 dan 14. Nilai IC_{50} terkuat didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan konsentrasi 3% (v/b) rerata sebesar 68.26 ppm, dan nilai IC_{50} terlemah didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan konsentrasi 7% (v/b) rerata sebesar 153.47 ppm. Perbandingan nilai hasil IC_{50} pada perlakuan dengan penambahan konsentrasi 3% (v/b) dan lama inkubasi 7 hari, lebih baik daripada hasil perlakuan ekstrak penelitian pendahuluan dan perlakuan menggunakan pelarut methanol yaitu sebesar 267,05 ppm (Podungge, 2012).



Gambar 13. Grafik IC_{50} ekstrak *Padina australis* perlakuan konsentrasi *Trichoderma viride*



Gambar 14. Grafik IC₅₀ ekstrak *Padina australis* perlakuan lama inkubasi dan konsentrasi *Trichoderma viride*

Secara keseluruhan aktivitas antioksidan ekstrak *Padina australis* masih tergolong antioksidan kuat karena berkisar antara 50-100 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 konsentrasi biakan *Trichoderma viride* berpengaruh terhadap aktivitas senyawa antioksidan yang diekstrak dari *Padina australis*. Hal ini diduga karena dengan semakin rendah tingkat konsentrasi, maka persaingan didalam menguraikan polisakarida yang terkandung pada *Padina australis* mencukupi kelangsungan hidup *Trichoderma viride*. Sehingga dalam pemecahan dinding sel *Padina australis* untuk penyerapan zat bioaktif dapat optimal.

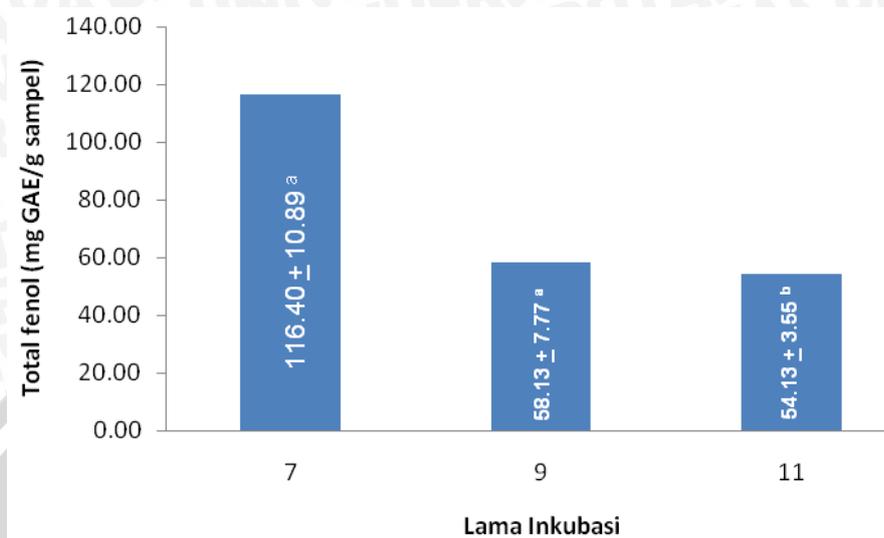
4.6 Total Fenol

Hasil ekstraksi yang berbeda, antara waktu fermentasi dan konsentrasi biakan *Trichoderma viride*, menunjukkan nilai total fenol yang berbeda-beda. Semakin besar persen total fenol maka semakin bagus kualitas ekstrak yang dihasilkan.

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 (Harborne 1987). Senyawa fenol merupakan kelas utama antioksidan yang berada dalam tumbuh-tumbuhan (Marinova, *et al.*, 2005).

Perhitungan analisis terhadap persen total fenol ekstrak etanol 96% *Padina australis* disajikan pada Lampiran 3. Hasil ANOVA total fenol *Padina australis*, menerangkan perlakuan konsentrasi tidak berbeda nyata ($p > 0.05$), namun perlakuan lama inkubasi berbeda nyata ($p < 0.05$), karena semakin lama waktu inkubasi yang diberikan maka semakin kecil total fenol yang dihasilkan. Dan interaksi kedua perlakuan tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Hasil uji lanjut dapat dilihat pada Gambar 15. Nilai total fenol tertinggi didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 7 hari dan konsentrasi 3% (v/b) rerata sebesar 126.44 mg GAE/g sampel; dan nilai terendah didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 11 hari dengan konsentrasi 7% (v/b) rerata sebesar 51.63 mg GAE/g sampel. Hasil perbandingan nilai total fenol pada perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan konsentrasi 3% (v/b) tidak lebih baik, daripada hasil pada perlakuan ekstrak menggunakan methanol yaitu sebesar 246,09 mg

GAE/1000g (Podungge, 2012). dan hubungannya dengan IC_{50} berbanding terbalik, yaitu semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi nilai total fenol.



Gambar 15. Total fenol *Padina australis* perlakuan lama inkubasi dengan *Trichoderma viride*

4.7 Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik dari penelitian ini ditentukan dengan perhitungan aktivitas antioksidan sampel yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Perlakuan yang pertama yaitu perbedaan waktu fermentasi dengan starter jamur *Trichoderma viride* selama 7, 9, dan 11 hari. Sedangkan perlakuan yang kedua yaitu penambahan konsentrasi yang berbeda (berat/volume) sebesar 3% (v/b), 5% (v/b), dan 6% (v/b). Tiap perlakuan diulangi sebanyak 2 kali ulangan. Berdasarkan data penelitian yang diperoleh, perlakuan yang terbaik adalah perlakuan fermentasi selama 7 hari konsentrasi 3% (v/b) dengan nilai IC_{50} rerata sebesar 68.26 ppm dan dikatakan sebagai antioksidan (kuat) karena berkisar antara 50-100 ppm. Menurut Zuhra, *et al.*, (2008), IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC_{50} bernilai

50-100 ppm, sedang jika IC_{50} bernilai 100-150 ppm dan lemah jika nilai IC_{50} sebesar 151-200 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *Padina australis* yang difermentasi selama 7 hari dengan konsentrasi 3% (v/b) dapat menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50% pada konsentrasi tersebut.

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

4.8 Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa-senyawa fitokimia di dalam sampel *Padina australis*. Analisis fitokimia dilakukan terhadap hasil terbaik dari semua perlakuan yaitu ekstrak kasar sampel yang difermentasi selama 7 hari dengan konsentrasi 3% (v/b). Hasil dari uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Uji Fitokimia ekstrak ethanol *Padina australis*

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 *Padina australis* yang difermentasi selama 7 hari dengan konsentrasi 3% (v/b), positif mengandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid dan fenol. Alkaloid adalah senyawa alami amina, baik pada tanaman, hewan, ataupun jamur dan merupakan produk yang dihasilkan dari proses metabolisme sekunder, dimana saat ini diketahui sebanyak 5500 jenis alkaloid (Harbone, 1987). Pada umumnya basa bebas alkaloida hanya larut dalam pelarut organik meskipun beberapa pseudoalkaloida dan protoalkaloida larut dalam air (Sastrohamidjojo, 1996).

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau. Flavonoid merupakan turunan fenol yang memiliki struktur dasar fenilbenzopiron (tokoferol), dicirikan oleh kerangka 15 karbon (C6-C3-C6) yang terdiri dari satu cincin teroksigenasi dan dua cincin aromatis. Substitusi gugus kimia pada flavonoid umumnya berupa hidroksilasi, metoksilasi, metilasi dan glikosilasi. Klasifikasi flavonoid sangat beragam, di antaranya ada yang mengklasifikasikan flavonoid menjadi flavon, flavanon, isoflavon, flavanol, flavanon, antosianin, dan kalkon. Lebih dari 6467 senyawa flavonoid telah diidentifikasi dan jumlahnya terus meningkat. Kebanyakan flavonoid berbentuk monomer, tetapi terdapat pula bentuk dimer (biflavonoid), trimer, tetramer, dan polimer (Mifta, 2010). Menurut Harborne (1987), terbentuknya endapan berwarna merah, kuning atau jingga dikarenakan penambahan H_2SO_4 sehingga menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antoksidan meliputi flavon, isoflavon, katekin, flavanol dan kalkon.

Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya senyawa ini seringkali berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Adanya senyawa fenol dalam suatu bahan ditandai

dengan terbentuknya warna hijau, biru hingga ungu pekat saat dilakukan uji fitokimia karena bahan bereaksi dengan pereaksi FeCl_3 (Harbone, 1987). Peranan beberapa golongan fenol sudah diketahui, misalnya lignin sebagai bahan pembangun dinding sel, antosianin sebagai pigmen bunga. Selain itu, dengan mengkonsumsi fenol dipercaya dapat mengurangi resiko beberapa penyakit kronis karena bersifat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan antikolesterol (Chen dan Blumberg 2007).



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- Penambahan perlakuan konsentrasi biakan *Trichoderma viride* (v/b) dan lama inkubasi, meningkatkan aktivitas antioksidan yang diekstrak dari alga coklat *Padina australis* dengan nilai IC₅₀ sebesar 19.37% dari hasil IC₅₀ kontrol sebesar 84.66 ppm menjadi 68.26 ppm.
- Penambahan perlakuan konsentrasi biakan 3% *Trichoderma viride* (v/b) dan lama inkubasi 7 hari dapat meningkatkan aktivitas antioksidan.
- Perlakuan terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari alga coklat *Padina australis* yaitu perlakuan konsentrasi biakan 3% (v/b), lama inkubasi 7 hari dengan nilai total fenol 126.44 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 tingkat konsentrasi yang tepat serta jamur yang sesuai agar ekstrak *Padina australis* yang didapatkan semakin meningkat aktivitas antioksidannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdille H. M. D., Singh, R. P., Jaya Prakarsha G. K., dan Jena B. S. 2004. **Antioxidant Activity Of The Extracts From *Dillenia indica* Fruits.** Journal of Food Chemistry. 90: 891-896.
- Andarwulan, N., Wijaya, H., Cahyono, D. T. 1996. **Aktivitas Antioksidan dari Daun Sirih (*Piper betle* L).** Teknologi dan Industri Pangan, VII. I. 29-30.
- 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.
- Anggadiredjo, J. 2006. **Rumput Laut.** Penebar Swadaya. Jakarta.
- Ansel. 1989. **Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi edisi 4.** UI Press. Jakarta.
- Antioksidan. 2004. **Radikal Bebas Dan Penuaan.** http://www.kompas.com/kompas_cetak/0305/11/fokus/306284.htm. diakses tanggal 11 Mei 2004, pada pukul 19.00 WIB.
- Apostolidis, E., dan Lee, C. M. 2010. **In Vitro Potential of *Ascophyllum nodosum* Phenolic Antioxidant-Mediated α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition.** Journal of Food Science. Vol. 75, no. 3. Hlm 97-102
- Ardiansyah. 2009. **Antioksidan Dan Peranannya Bagi Kesehatan.** <http://www.beritaiptek.com/antioksidan-dan-peranannya-bagikesehatan.html>. Di akses pada tanggal 31 January 2009, pukul 19.00 WIB.
- 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.
- Atmadja, W. S. dan Sulistijo. 1991. **Potensi dan Spesifikasi Jenis Rumput Laut di Indonesia.** Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan. Jakarta.
- Banerjee, A., Dasgupta, N. & De, B. 2005. **In Vitro Study of Antioxidant Activity of *Syzigium cumini* Fruit.** J. Food Chemistry, 90: 727-733.
- Blois, M. S. 1958. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** Nature, 1811199-1200.
- Chen, C. Y. O., & Blumberg. 2007. **Phytochemical Composition of Nuts.** Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition. Halaman 329-332.

- Deacon, J. W. 1997. **Modern Micology**. Blackwell Science. New York. 303 pp.
- DKP Sumenep. 1990. **Potensi alga coklat di Indonesia**. Madura. Jawa Timur
- Gordon, M. H. 1990. **The mechanism of antioxidants action invitro**, In: Hudson BJJ, editor. **FoodAntioksidants**. Elsvier Aplieed Science, London.
- Gunarto, L. 1996. **Aktivitas isolate Trichoderma spp. dalam perombakan selulosa**. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan 15 (1) : 43-47.
- Hanani, E., Abdul, M., dan 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.
- Hart, Harold., Leslei, E., dan Hart, D. 2003. **Organic Chemistry**. A Short Course. Eleven Edition. Houghton Mifflin Company.
- Haugan, J. A., Aakemann, T., & Liaaen, J. S. 1995. In : Britton, G; Liaaen, J. S; Fander, H. (Eds.). **Carotenoids. Vol. 1A : Isolation and Analysis**. Birkhauser, V. B. P : 215-226.
- Indriani, Heti., dan Emi, S. 2003. **Rumput Laut Budi Daya Pengolahan dan Pemasaran**. Jakarta. Penebar Swadaya. Hal. 4-8, 11-12.
- Juniarti., Delvi, O., dan Yuhernita. 2009. **Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil) dari Ekstrak Daun Saga (Abrus precatorius L.)**. Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta, Indonesia.
- Lynd, L. R., Weimer P. J., Zyl van W. H. & Pretorius, I. S. 2002. **Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):506-577.
- Matsuno, T. 2001. **Aquatic animal carotenoids**. *Fisheries Science*. 67: 771-783.
- Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. 2005. **Total Phenolic and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables**. *J. University Chem. Tech. Metallurgy*. 40(3):255-260.
- Mega, I. M., dan Dewa, A. S. 2010. **Screening Fitokimia dan Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak Metanol Daun Gaharu (Gyrinops versteegii)**. Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali.
- Mifta. 2010. **Pengertian senyawa Flavonoid**. [Http://www. Artikelkimia.info/htm](http://www.Artikelkimia.info/htm). Diakses tanggal 10 April 2012.

- Molyneux, P. 2004. **The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity.** Songklanakarin J.Sci. Technol. 26 (2). Halaman 211-219
- Mukhopadhyay, M. 2000. **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide.** CRC Press. London. New York.
- Mulyo, A. V. 2010. **Pangan Gizi dan Kesehatan.** http://biologi.ugm.ac.id/index.php?option=com_content&view=article&id=128&Itemid=154. Diakses pada tanggal 1 Juli 2012 pada pukul 19.00 WIB.
- Munifah, I., Januar, H. I. dan Wikanta, T. 2005. **Screening of Antioksidan and Antikanker Extracts From Macro Algae.** Research Center of Marine and Fisheries Product Processing and Biotechnology. Jakarta.
- Nazir, M. 1989. **Metode Penelitian.** PT. Ghalia Indonesia. Jakarta
- Nurhayati, H. 2001. **Pengaruh Pemberian Trichoderma sp. Terhadap Daya Infeksi dan Ketahanan Hidup Sclerotium rofsii pada Akar Bibit Cabai.** Skripsi Fakultas Pertanian UNTAD. Palu.
- Podungge, F. 2012. **Kandungan Fenol , Senyawa Fitokimia, dan Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Padina australis*.** Departemen Teknlogi Hasil Perairan. Skripsi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Poncomulyo, T. 2006. **Budidaya dan Pengolahan Rumput Laut.** Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Praptiwi, P., Dewi, M., dan Harapini. 2006. **Nilai peroksida dan anti radikal bebas diphenyl pycryl hidrazil hidrate DPPH ekstrak methanol *Knema laurina*.** *Majalah Farmasi Indonesia*, (17)1: 32-36.
- Pratimasari, D. 2009. **Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah *Carica papaya* L dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik serta Flavonoid Totalnya.** Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta. 17 halaman.
- Pujaningsih, R. 2005. **Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas pakan. Laboratorium Teknologi Makanan Ternak.** Universitas Diponegoro, Semarang.
- Rahmat, R. 1999. **Pemanfaatan Produk Alam Algae Laut Untuk Obat dan Kosmetik.** Puspipetek. Serpong.

- 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* Willd. Dalam Kaitan Dengan Keberadaan *Ganoderma* dan *Trichoderma* di Lantai Hutan Akasia**. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Santoso, U. 2009. **Jamur *Aspergillus Niger* dan Peranannya**. [Http/www.U.Santoso.blogspot.com](http://www.U.Santoso.blogspot.com). Diakses tanggal 20 Januari 2012.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. **Kromatografi. Liberty**. Yogyakarta. Halaman 6-12.
- Silalahi, J. 2006. **Antioksidan dalam Diet dan Karsinogenesis**. Cermin Dunia Kedokteran. 153: 42-47.
- Sudaryati, Y. dan Sastraatmadja, D. D. 1993. **Seleksi strain *Aspergillus spp.* untuk menghasilkan enzim selulase dalam media dedak**. J. Mikrob Ind. 2: 30-32.
- Sudarmadji. S. B., Haryono dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Liberty. Yogyakarta.
- Surakhmad, W. 1994. **Pengantar Penelitian Ilmiah dan Dasar Metode Teknik**. Transito. Bandung
- 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 *Eucheuma cottonii***. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Vol.1 No. 1 Juni 2006.
- Sunarni, T. 2005. **Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae**, *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 (2), 2001, 53-61.
- Syaifuddin. 1992. **Pngelolaan Laboratorium. Asosiasi Penelitian dan Pengembangan Perkebunan Indonesia (AP31)**. Pusat Penelitian Perkebunan Sungei Putih, Galang, Deli Serdang Sumatera Utara.
- Tandion, H. 2008. **Pengaruh Jamur Antagonis *Trichoderma harzianum* dan Pupuk Organik Untuk Mengendalikan Patogen Tular Tanah *Sclerotium roflsii* Sacc. Pada Tanaman Kedelai (*Glycine max L.*)**

di Rumah Kasa. <http://repository.usu.ac.id/pdf>. di akses pada tanggal 10 Agustus 2010.

Tribak, M., Ocampo, J. A. I., & Garcia, R. 2002. **Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus***. *Mycologia*. 3: 404-410.

Utami, T. S., Arbianti, R., Hermansyah, H., dan Reza, A. 2009. **Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpup (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA**. Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok. 6 hal.

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

Volk, T. J. 2004. **Trichoderma viride the dark green parasitic mold and maker of fungal digested jeans**. http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/nov2004.html.

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

Wikipedia, 2009. **Sifat pelarut umum**. [Http://www.wikipedia.org/sifat_pelarut_umum/wiki.htm](http://www.wikipedia.org/sifat_pelarut_umum/wiki.htm). Diakses tanggal 30 Maret 2011.

Wikipedia. 2012. **Alga Coklat**. http://id.wikipedia.org/wiki/Alga_cokelat. Diakses pada tanggal 18 Mei 2012, pukul 19.00 WIB.

Wikipedia. 2013^a. **Etanol**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Etanol>. Diakses tanggal 12 Februari 2013.

Wikipedia. 2013^b. **Fermentasi**. [Http://www.Wikipedia.org/fermentasi/wiki.htm](http://www.Wikipedia.org/fermentasi/wiki.htm). Diakses tanggal 12 Februari 2013.

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

Yudhi. 2009. **Khasiat dan manfaat rumput laut**. <http://www.kir-31.blogspot.com/>. Diakses pada tanggal 7 November 2010, pukul 19.00 WIB.

Yunizal. 1999. **Teknologi Pengolahan Alginat**. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

Zainuddin, E. N. dan Malina, A. C. 2009. **Skrining Rumput Laut Asal Sulawesi Selatan Sebagai Antibiotik Melawan Bakteri Patogen Pada Ikan**. Laporan Penelitian Research Grant, Biaya IMHERE-DIKTI.

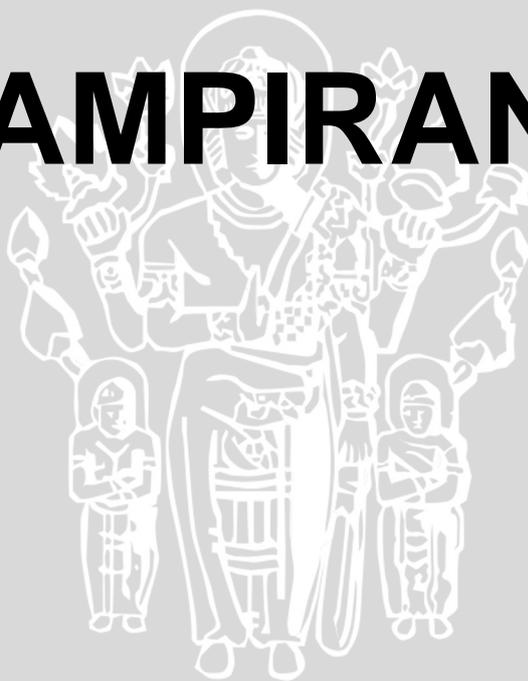
Zubaidah, E., Saparanti, E. dan Widya, D. 2006. **Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Pangan**. Jurusan THP. Brawijaya

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

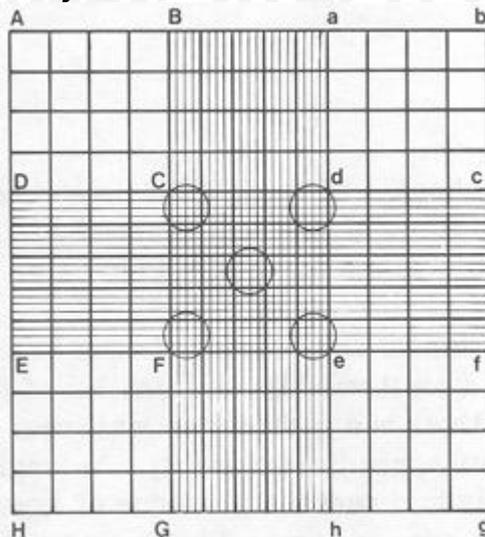


UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN



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



Kotak c, d, e, f, dan o ditengahnya yang dilingkari adalah kotak yang dihitung jumlah konidianya. 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 dishaker 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 :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{Jumlah sel rata-rata tiap petak (mewakili 5 petak)} \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Luas petak (mm}^2\text{)} \times \text{kedalaman petak (mm}^2\text{)}}$$

2. Data hasil perhitungan koloni jamur *Trichoderma viride* dengan *Haemacytometer*

Hari ke	jam ke-	rata-rata Σ sel spora	Σ sel	faktor pengenceran	Σ sel spora/ml
1	24	0.00	0	1×10^0	0.00×10^0
	30	1.00	5	1×10^0	2.50×10^5
	36	1.20	6	1×10^0	3.00×10^5
	42	0.80	4	1×10^1	2.00×10^6
2	48	1.60	8	1×10^1	4.00×10^6
	54	22.40	112	1×10^1	5.60×10^7
	60	6.40	32	1×10^2	1.60×10^8
3	66	13.80	69	1×10^2	3.45×10^8
	72	19.20	96	1×10^2	4.80×10^8
	78	24.20	121	1×10^2	6.05×10^8
	84	32.60	163	1×10^2	8.15×10^8
4	90	44.00	220	1×10^2	1.10×10^9
	96	5.00	25	1×10^3	1.25×10^9
	102	5.20	26	1×10^3	1.30×10^9
	108	5.40	27	1×10^3	1.35×10^9
5	114	5.60	28	1×10^3	1.40×10^9
	120	5.60	28	1×10^3	1.40×10^9
	126	5.80	29	1×10^3	1.45×10^9
	132	0.60	3	1×10^4	1.50×10^9
6	138	0.60	3	1×10^4	1.50×10^9
	144	0.60	3	1×10^4	1.50×10^9

Dari tabel diatas, didapatkan hasil fase stationer yang terjadi pada jam ke 132 – 144 (antara hari ke 5 menuju hari ke 6) dengan jumlah sel spora berkisar 1.5×10^9 /ml.

Lampiran 2. Data perhitungan analisis ANOVA kadar air ekstrak *Padina australis*

1. Data Hasil Kadar Air

Perlakuan	Ulangan	Berat Botol Timbang (A)	Berat Sampel (B)	Berat Botol + Berat Sampel (C)	Kadar Air (%)	Rerata Kadar Air (%)
W1	P1	1	17.03	2.13	17.20	92.02
		2	18.83	2.14	19.00	92.06
	P2	1	18.55	2.15	18.66	94.88
		2	17.00	2.15	17.13	93.94
	P3	1	19.72	2.15	19.83	94.88
		2	25.51	2.15	25.64	93.95
W2	P1	1	16.74	2.14	16.88	93.46
		2	16.58	2.13	16.72	93.42
	P2	1	16.99	2.13	17.12	93.90
		2	17.05	2.14	17.17	94.38
	P3	1	15.65	2.14	15.76	94.87
		2	17.98	2.10	18.09	94.77
W3	P1	1	33.37	2.12	33.51	93.39
		2	18.26	2.11	18.40	93.36
	P2	1	18.06	2.12	18.20	93.40
		2	30.69	2.12	30.80	94.80
	P3	1	28.87	2.11	28.99	94.32
		2	21.11	2.11	21.22	94.79
W0		26.160	2.10	26.44	86.67	

Keterangan :

W0 : Kontrol

W1 : Waktu fermentasi 7 hari

W2 : Waktu fermentasi 9 hari

W3 : Waktu fermentasi 11 hari

P1 : konsentrasi 3% (ml/g) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

P2 : konsentrasi 5% (ml/g) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

P3 : konsentrasi 7% (ml/g) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

2. Rumus Perhitungan Data Hasil Kadar air ekstrak *Padina australis*

➤ Kadar Air :

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

Keterangan :

A : Berat Botol Timbang (A)

B : Berat Sampel

C : Berat Botol Timbang + Sampel

- Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air} &= \frac{(A + B - C)}{B} \times 100\% \\ &= \frac{(17.03 + 2.13 - 17.20)}{2.13} \times 100\% \\ &= \frac{1.96}{2.13} \times 100\% \\ &= 92.02 \% \end{aligned}$$

- Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 2

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air} &= \frac{(A + B - C)}{B} \times 100\% \\ &= \frac{(18.83 + 2.14 - 19.00)}{2.14} \times 100\% \\ &= \frac{1.97}{2.14} \times 100\% \\ &= 92.06 \% \end{aligned}$$

- Rerata % kadar air

$$\begin{aligned} \text{Rerata} &= \frac{(\text{hasil \% kadar air ulangan 1} + \text{hasil \% kadar air ulangan 2})}{2} \\ &= \frac{(92.02 + 92.06)}{2} \\ &= 92.04 \% \end{aligned}$$

3. Hasil ANOVA persen kadar air ekstrak *Padina australis* dan penentuan notasi

➤ Gambar ANOVA Kadar Air *Padina australis*

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11.682 ^a	8	1.460	6.297	.006
Intercept	158783.030	1	158783.030	6.848E5	.000
LAMA_INKUBASI	.856	2	.428	1.845	.213
KONSENTRASI	8.901	2	4.451	19.193	.001
LAMA_INKUBASI * KONSENTRASI	1.925	4	.481	2.075	.167
Error	2.087	9	.232		
Total	158796.799	18			
Corrected Total	13.769	17			

KONSENTRASI	N	Subset	
		1	2
Duncan ^a	3	6	6
	5	6	6
	7	6	6
Sig.		1.000	.205

Hasil ANOVA kadar air *Padina australis*, dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan konsentrasi biakan ($P < 0.05$), namun perlakuan lama inkubasi tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Dan interaksi antara kedua perlakuan tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). dan hasil kadar air tertinggi diperoleh pada perlakuan lama inkubasi 9 hari dengan konsentrasi 7% (ml/g) sebesar 94.82%. dan kadar air terendah diperoleh pada perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan konsentrasi 3% (ml/g) sebesar 92.04%.

Lampiran 3. Data perhitungan analisis ANOVA persen rendemen kering ekstrak *Padina australis*

1. Data Hasil persen rendemen

Perlakuan	Ulangan	Berat Ekstrak Sampel (g)	Kadar Air (%)	Berat Basah Ekstrak (g)	Berat Kering Ekstrak (g)	
W1	P1	1	20.43	92.02	18.80	1.63
		2	20.85	92.06	19.19	1.66
	P2	1	21.32	94.88	20.23	1.09
		2	22.02	93.94	20.68	1.33
	P3	1	20.15	94.88	19.12	1.03
		2	22.03	93.95	20.70	1.33
W2	P1	1	22.73	93.46	21.24	1.49
		2	22.14	93.42	20.68	1.46
	P2	1	23.79	93.90	22.34	1.45
		2	23.08	94.38	21.78	1.30
	P3	1	22.37	94.87	21.22	1.15
		2	20.97	94.77	19.88	1.10
W3	P1	1	23.20	93.39	21.67	1.53
		2	22.62	93.36	21.12	1.50
	P2	1	22.85	93.40	21.34	1.51
		2	23.56	94.80	22.33	1.22
	P3	1	19.91	94.32	18.78	1.13
		2	20.27	94.79	19.21	1.06

Perhitungan hasil persen rendemen data tabel diatas ini dilanjutkan pada tabel dibawah

Perlakuan	Ulangan	Berat Sampel Awal (g)	Berat Basah Sampel Awal (g)	Berat Kering Sampel Awal (g)	Rendemen Kering (%)	Rerata Rendemen Kering (%)	
W1	P1	1	50.15	43.47	6.68	24.40	24.59
		2	50.14	43.46	6.68	24.79	
	P2	1	50.13	43.45	6.68	16.33	18.13
		2	50.19	43.50	6.69	19.94	
	P3	1	50.18	43.49	6.69	15.42	17.67
		2	50.19	43.50	6.69	19.92	
W2	P1	1	50.21	43.52	6.69	22.22	21.98
		2	50.25	43.55	6.70	21.75	
	P2	1	50.26	43.56	6.70	21.67	20.51
		2	50.22	43.53	6.69	19.36	
	P3	1	50.24	43.54	6.69	17.15	16.77
		2	50.20	43.51	6.69	16.39	
W3	P1	1	50.27	43.57	6.70	22.88	22.66
		2	50.28	43.58	6.70	22.43	
	P2	1	50.32	43.62	6.71	22.48	20.38
		2	50.29	43.59	6.70	18.27	
	P3	1	50.30	43.60	6.70	16.87	16.31
		2	50.31	43.61	6.71	15.76	

Keterangan :

W1 : Waktu fermentasi 7 hari

W2 : Waktu fermentasi 9 hari

W3 : Waktu fermentasi 11 hari

P1 : konsentrasi 3% (ml/g) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

P2 : konsentrasi 5% (ml/g) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

P3 : konsentrasi 7% (ml/g) dari berat sampel (50 g) dalam 3,5 ml PDB

2. Rumus perhitungan data hasil persen rendemen kering ekstrak *Padina australis*

➤ Berat Basah Ekstrak :

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

• Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Berat basah ekstrak} &= \frac{92.02}{100} \times 20.43 \\ &= 0.9202 \times 20.43 \\ &= 18.80 \end{aligned}$$

➤ Berat Kering Ekstrak :

Berat Ekstrak Sampel (g) – Berat Basah Ekstrak

• Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Berat kering ekstrak} &= 20.43 - 18.80 \\ &= 1.63 \end{aligned}$$

➤ Berat Basah Sampel Awal

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

• % Kadar air kontrol = 86.67%

• Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Berat basah sampel awal} &= \frac{86.67}{100} \times 50.15 \\ &= 0,8667 \times 50.15 \\ &= 43.47 \end{aligned}$$

➤ Berat Kering Sampel Awal

Berat Sampel Awal (g) – Berat Basah Sampel Awal

• Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Berat kering sampel awal} &= 50.15 - 43.47 \\ &= 6.68 \end{aligned}$$

- Rendemen Berat Kering :

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

- Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$\begin{aligned}\text{Rendemen berat kering} &= \frac{1.63}{6.68} \times 100\% \\ &= 0.244 \times 100\% \\ &= 24.40\end{aligned}$$

- Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 2

$$\begin{aligned}\text{Rendemen berat kering} &= \frac{1.66}{6.68} \times 100\% \\ &= 0.2479 \times 100\% \\ &= 24.79\end{aligned}$$

- Rerata rendemen berat kering :

$$\frac{(\text{rendemen berat kering ulangan 1} + \text{rendemen berat kering ulangan 2})}{2}$$

- Contoh perlakuan (W1,P1)

$$\begin{aligned}\text{Rerata rendemen berat kering} &= \frac{(24.40 + 24.79)}{2} \\ &= 24.59\end{aligned}$$

3. Hasil ANOVA Persen Rendemen Kering ekstrak *Padina australis* dan Penentuan notasi

➤ Gambar ANOVA Design Expert Persen Rendemen *Padina australis*

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	130.641 ^a	8	16.330	5.005	.013
Intercept	7121.416	1	7121.416	2.183E3	.000
LAMA_INKUBASI	.532	2	.266	.082	.922
KONSENTRASI	114.255	2	57.127	17.510	.001
LAMA_INKUBASI * KONSENTRASI	15.854	4	3.963	1.215	.369
Error	29.364	9	3.263		
Total	7281.421	18			
Corrected Total	160.005	17			

KONSENTRASI	N	Subset		
		1	2	3
Duncan ^a	7	6	1.69183E1	
	5	6		1.96750E1
	3	6		2.30783E1
Sig.			1.000	1.000

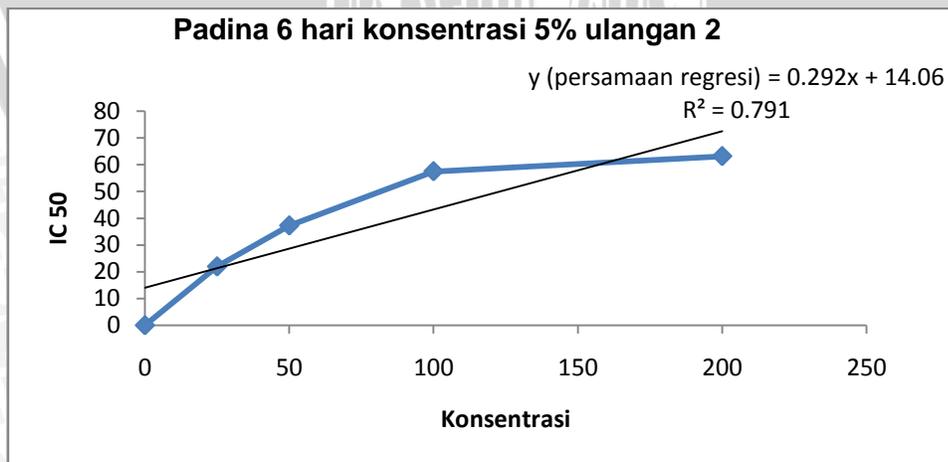
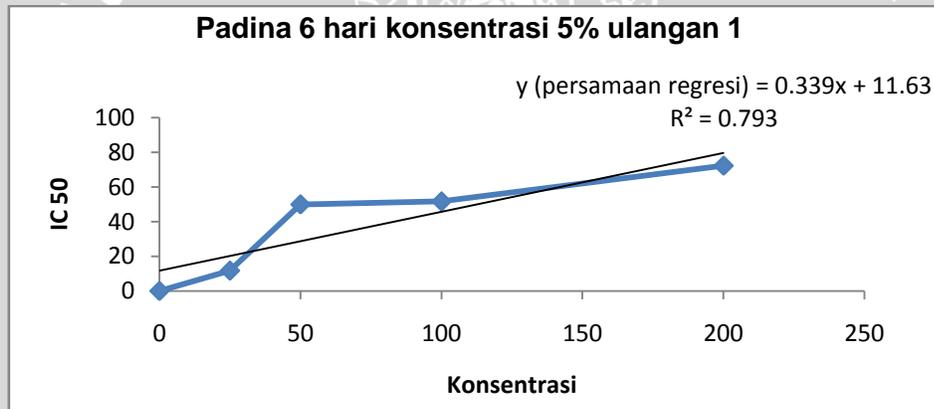
Hasil ANOVA persen (%) rendemen antioksidan, pada perlakuan lama inkubasi tidak berbeda nyata karena ($p > 0.05$), tetapi perlakuan konsentrasi berbeda nyata ($p < 0.05$). Dan interaksi antara dua perlakuan tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Dan nilai rendemen tertinggi didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 7 hari dan konsentrasi 3% (ml/g) rerata sebesar 24.59%; dan nilai rendemen terendah didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 11 hari dengan konsentrasi 7% (ml/g) rerata sebesar 16.31%.

Lampiran 4. Data perhitungan dan analisis ANOVA IC₅₀ ekstrak *Padina australis* pada penelitian pendauluan

1. Data Hasil IC₅₀

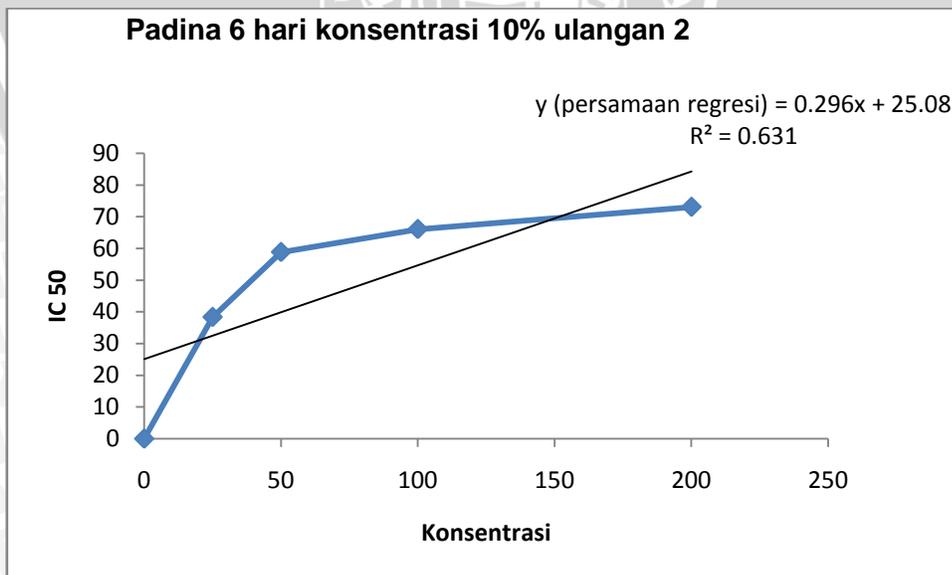
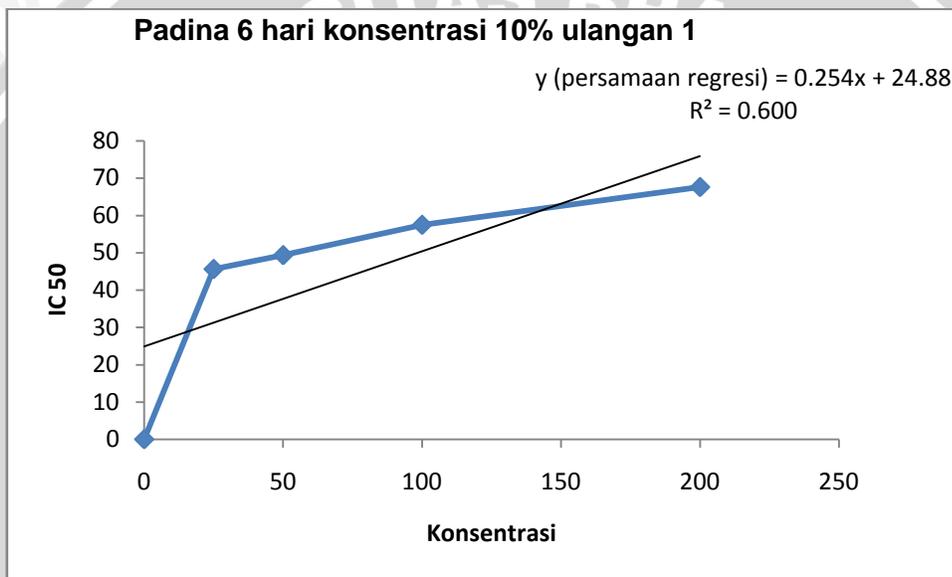
➤ IC₅₀ Perlakuan 6 hari konsentrasi 5%

Perlakuan 6 hari konsentrasi 5%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	113.186	123.082	118.13
25	1.500	1.326	11.713	21.954			
50	0.851	1.066	49.912	37.257			
100	0.822	0.722	51.619	57.504			
200	0.472	0.626	72.219	63.155			



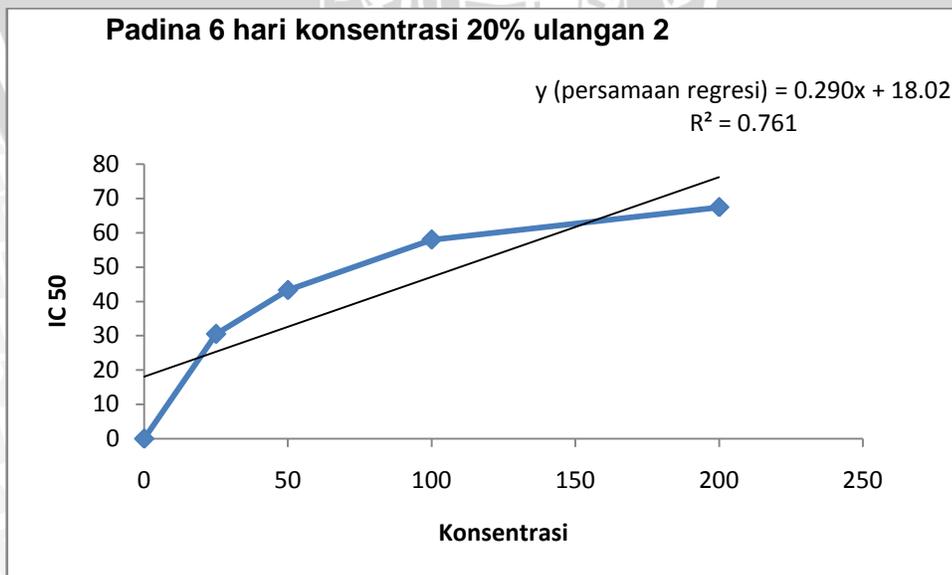
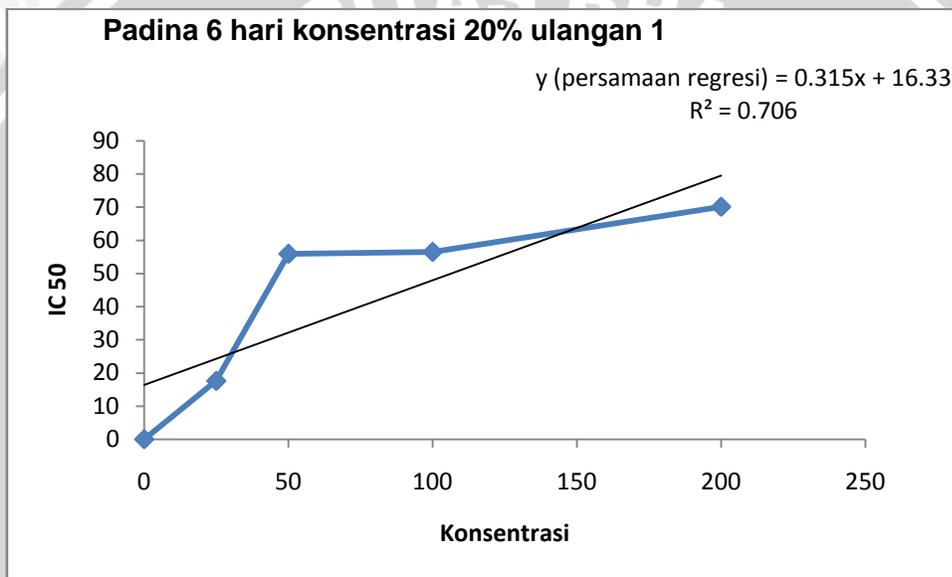
➤ IC₅₀ Perlakuan 6 hari konsentrasi 10%

Perlakuan 6 hari konsentrasi 10%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	98.898	84.189	91.54
25	0.924	1.047	45.615	38.376			
50	0.861	0.699	49.323	58.858			
100	0.723	0.576	57.446	66.098			
200	0.551	0.457	67.569	73.102			



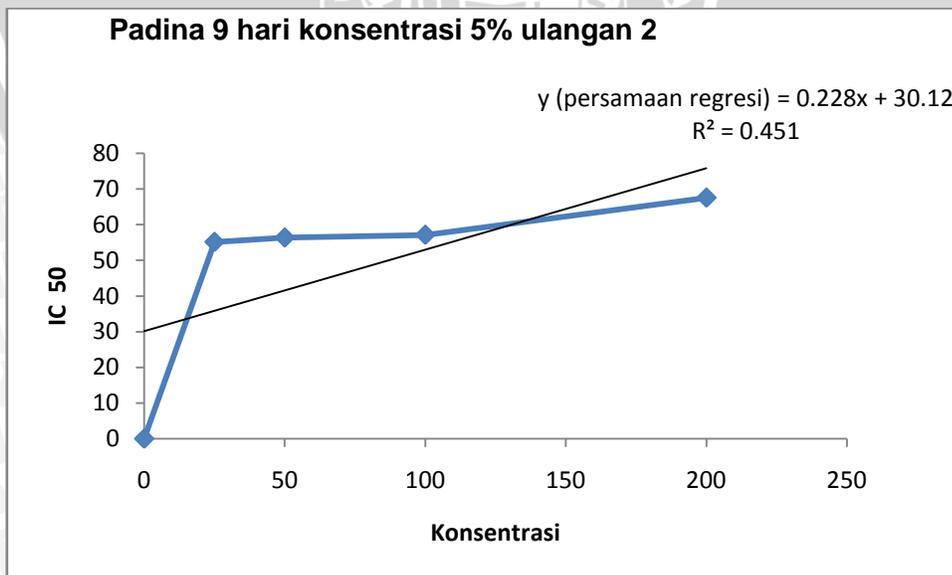
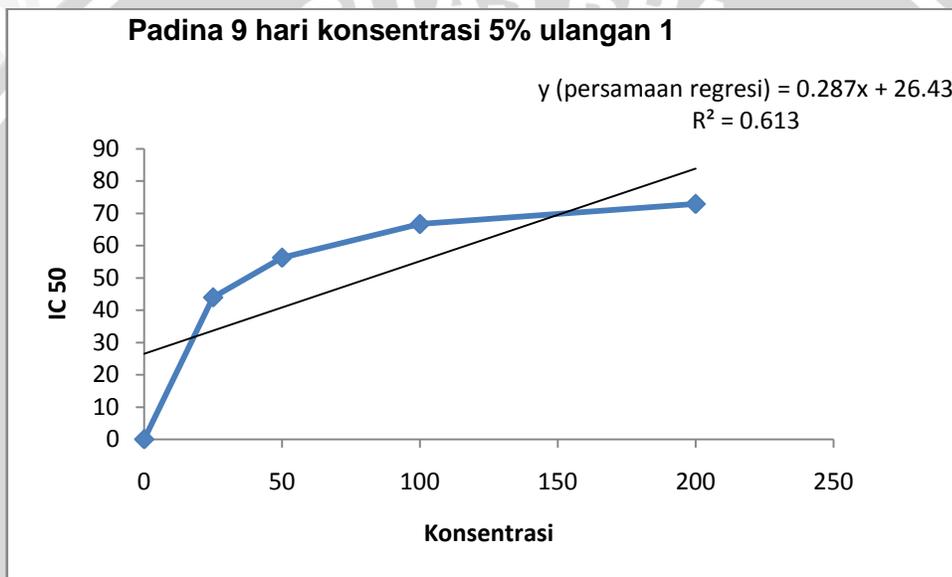
➤ IC₅₀ Perlakuan 6 hari konsentrasi 20%

Perlakuan 6 hari konsentrasi 20%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	106.889	110.276	108.58
25	1.400	1.181	17.599	30.489			
50	0.749	0.964	55.915	43.261			
100	0.739	0.714	56.504	57.975			
200	0.508	0.554	70.100	67.393			



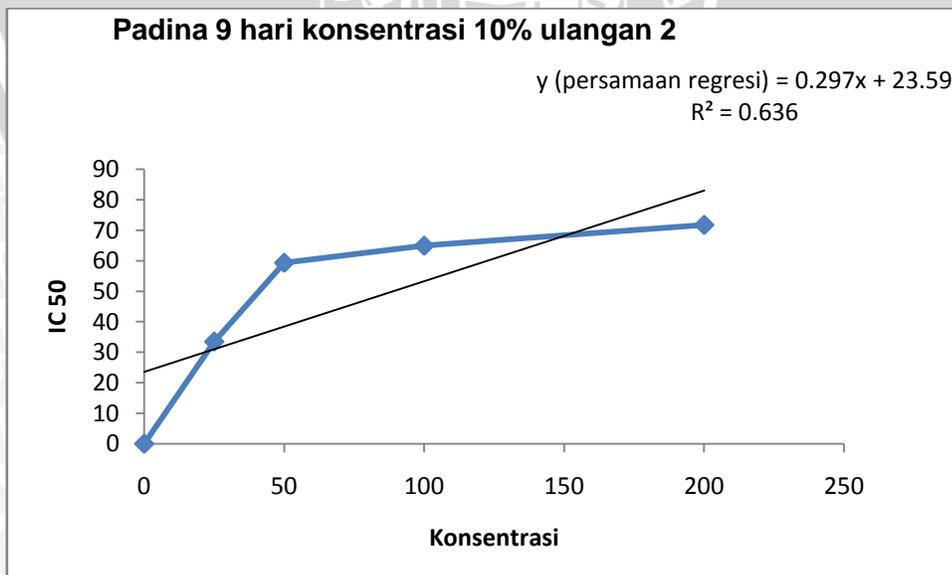
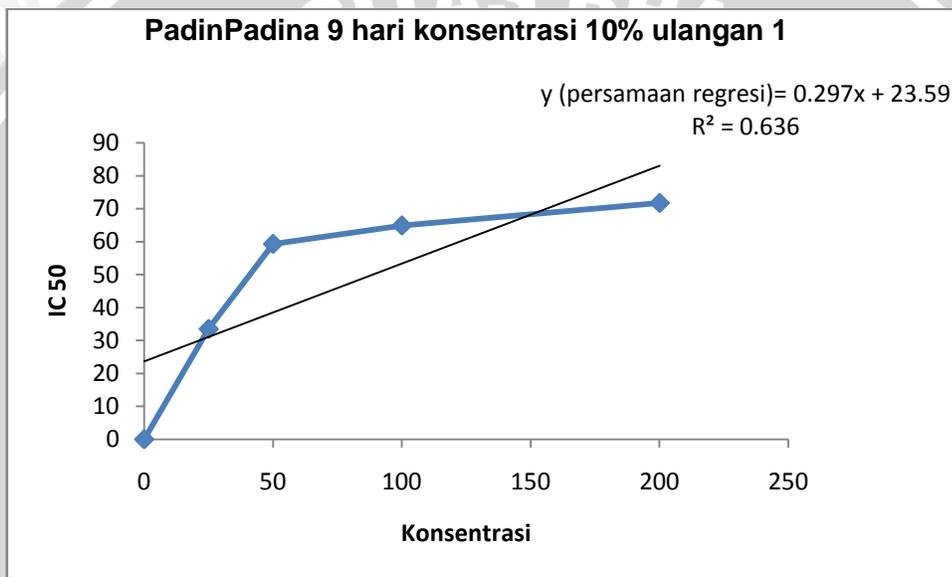
➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari konsentrasi 5%

Perlakuan 9 hari konsentrasi 5%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	82.125	87.193	84.66
25	0.952	0.762	43.967	55.150			
50	0.743	0.741	56.268	56.386			
100	0.566	0.728	66.686	57.151			
200	0.460	0.551	72.925	67.569			



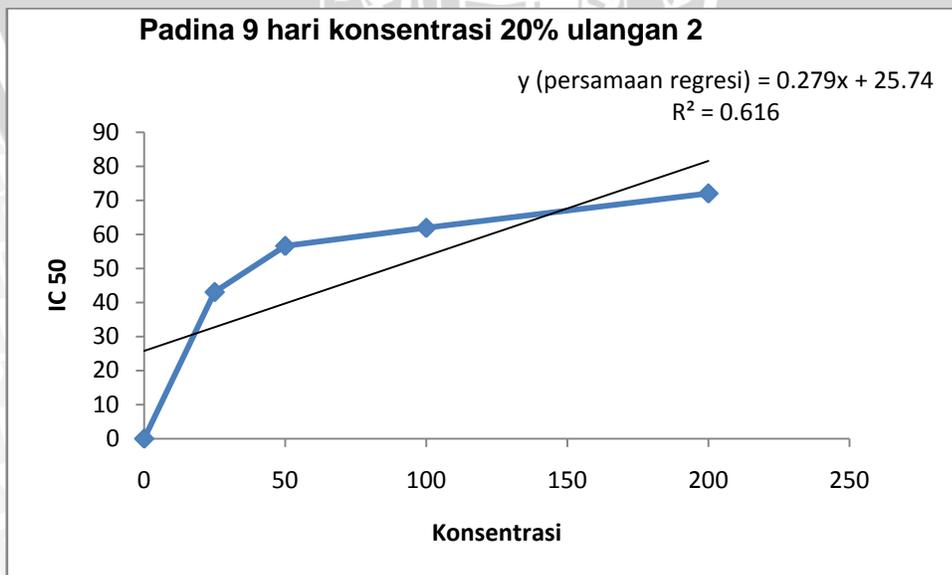
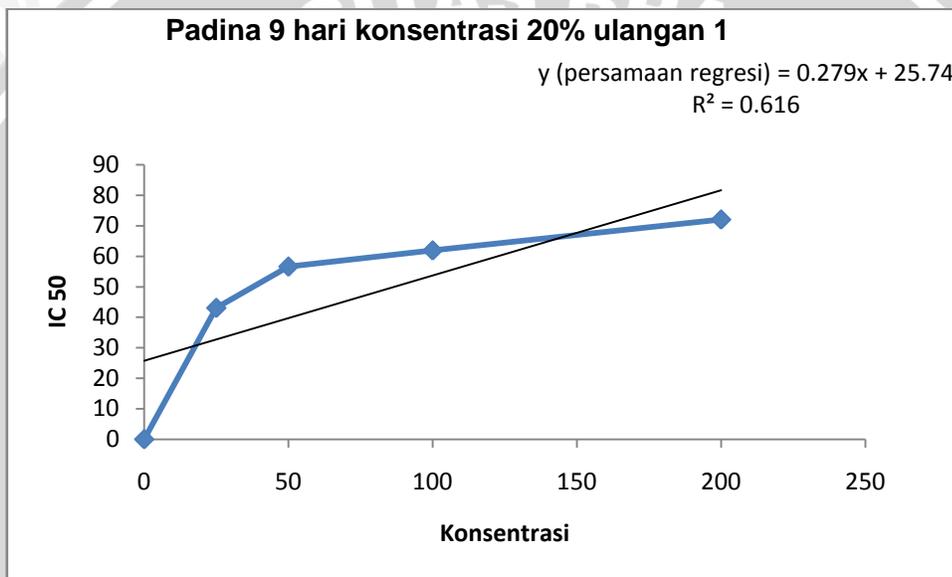
➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari konsentrasi 10%

Perlakuan 9 hari konsentrasi 10%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	88.923	88.923	88.92
25	1.010	1.130	40.553	33.490			
50	0.803	0.691	52.737	59.329			
100	0.687	0.596	59.564	64.921			
200	0.529	0.480	68.864	71.748			



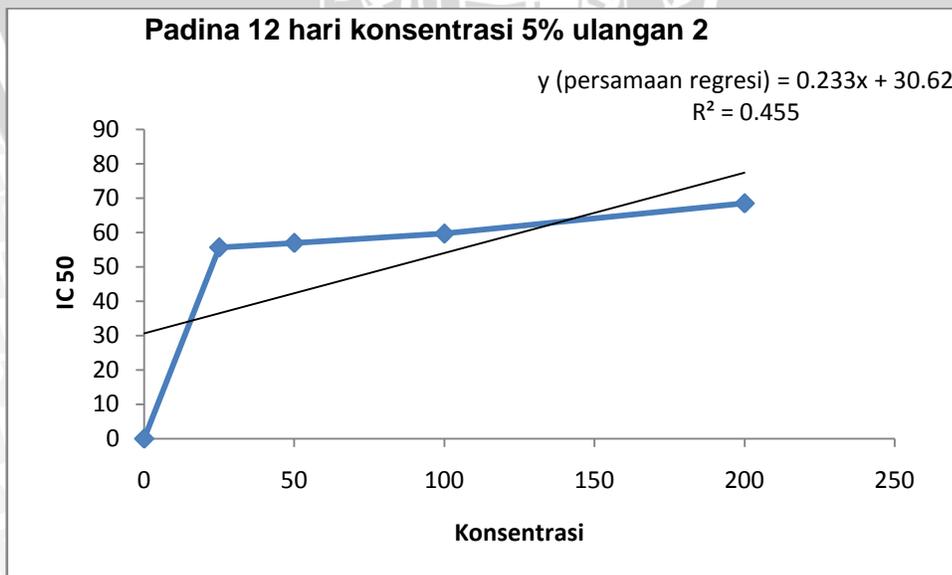
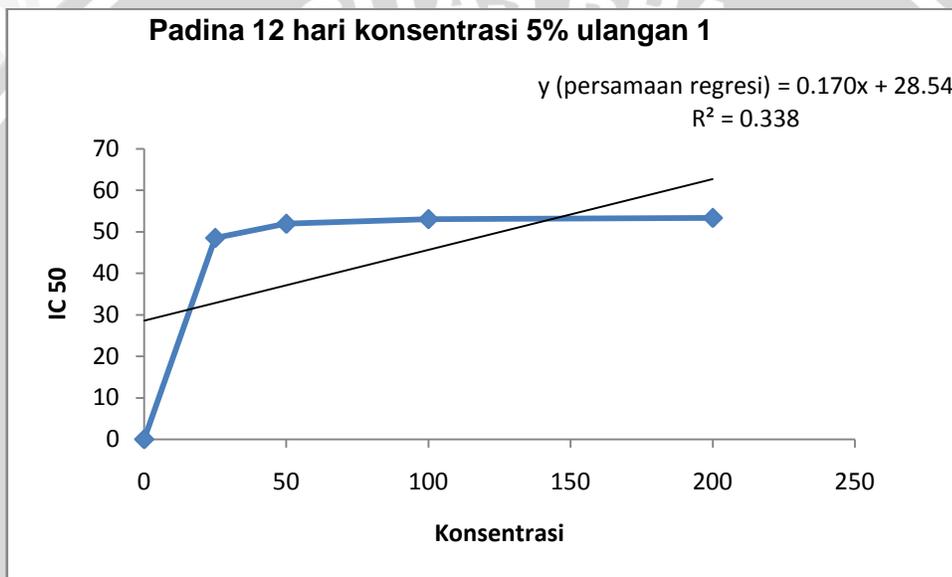
➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari konsentrasi 20%

Perlakuan 9 hari konsentrasi 20%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	86.953	86.953	86.95
25	0.977	0.968	42.496	43.025			
50	0.729	0.738	57.092	56.563			
100	0.659	0.648	61.212	61.860			
200	0.516	0.476	69.629	71.984			



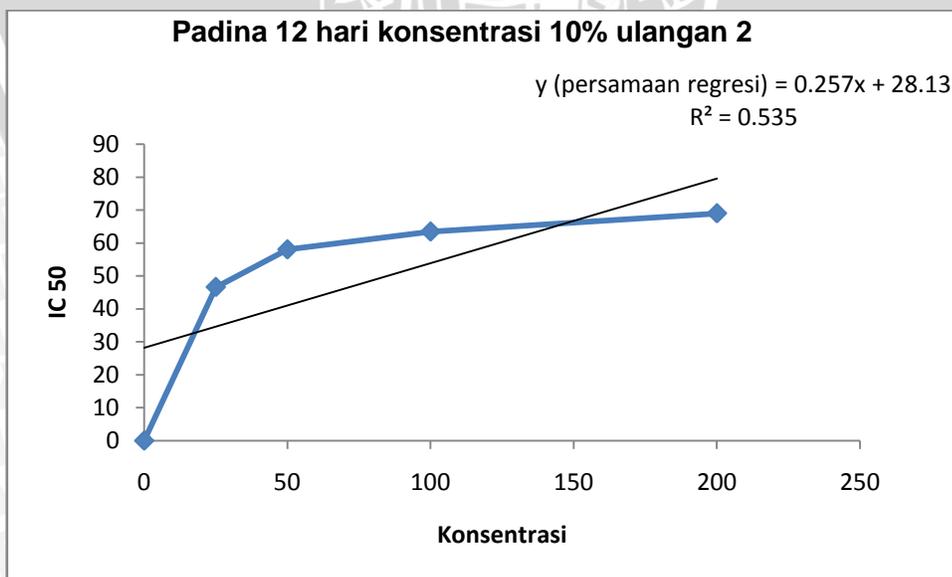
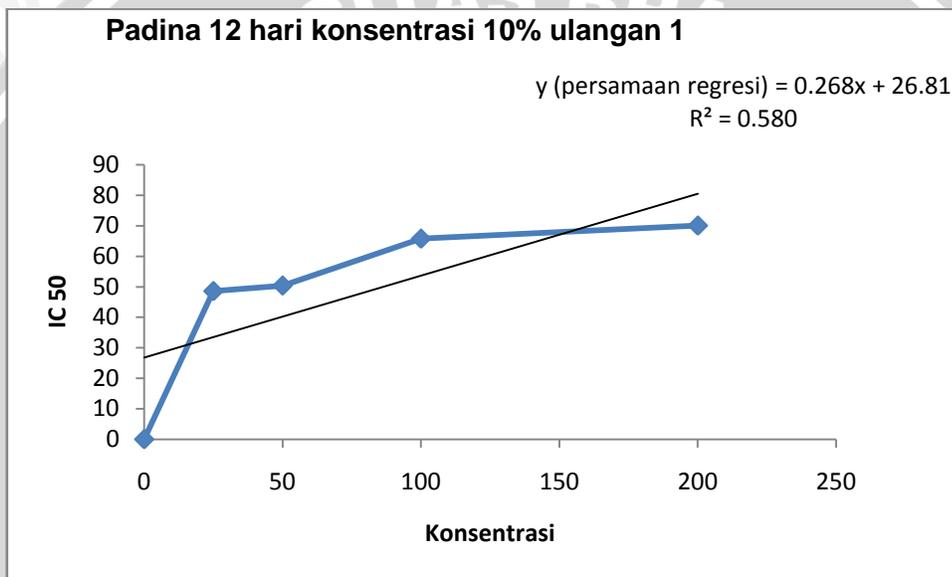
➤ IC₅₀ Perlakuan 12 hari konsentrasi 5%

Perlakuan 12 hari konsentrasi 5%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	126.235	83.176	104.71
25	0.875	0.753	48.499	55.680			
50	0.817	0.731	51.913	56.975			
100	0.798	0.685	53.031	59.682			
200	0.793	0.535	53.325	68.511			



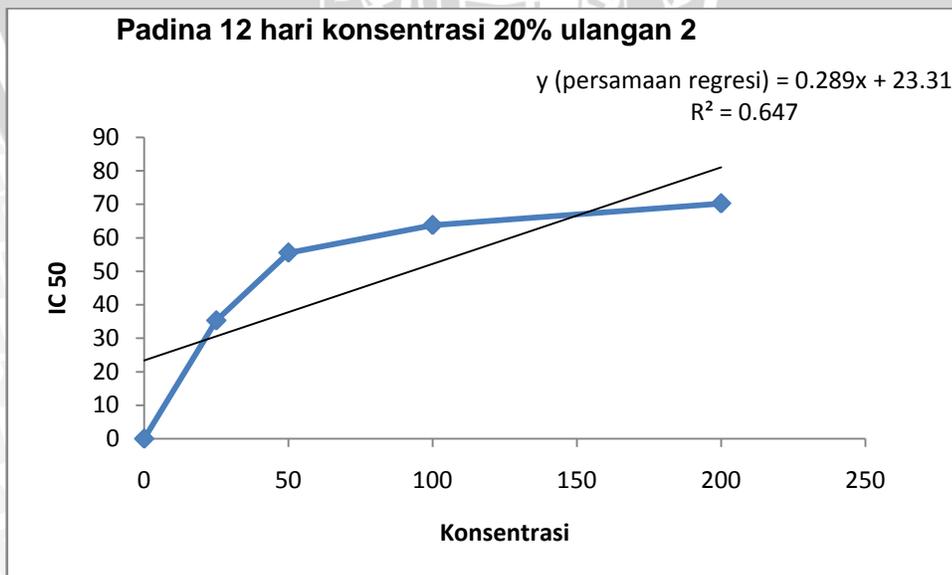
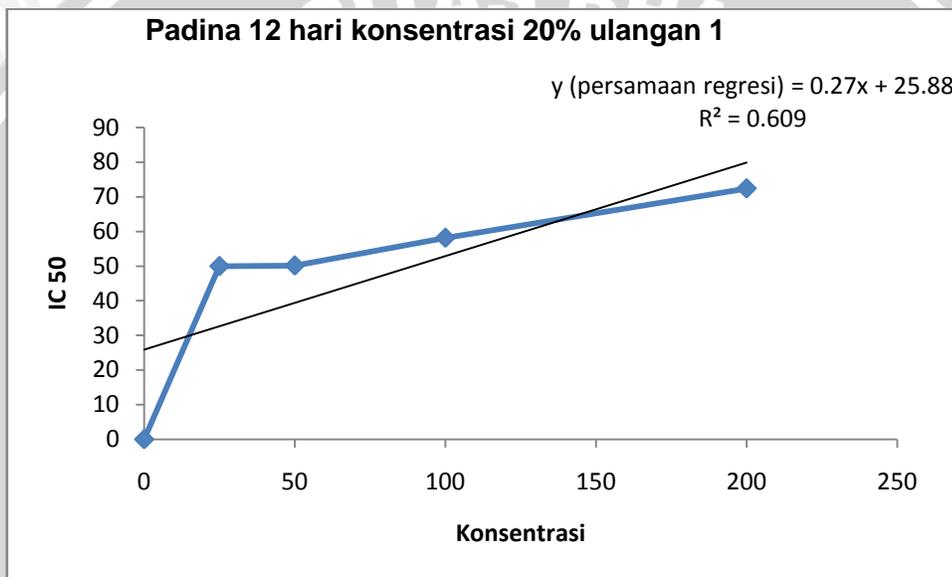
➤ IC₅₀ Perlakuan 12 hari konsentrasi 10%

Perlakuan 12 hari konsentrasi 10%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	86.530	85.097	85.81
25	0.874	0.907	48.558	46.616			
50	0.843	0.713	50.383	58.034			
100	0.582	0.621	65.745	63.449			
200	0.509	0.527	70.041	68.982			



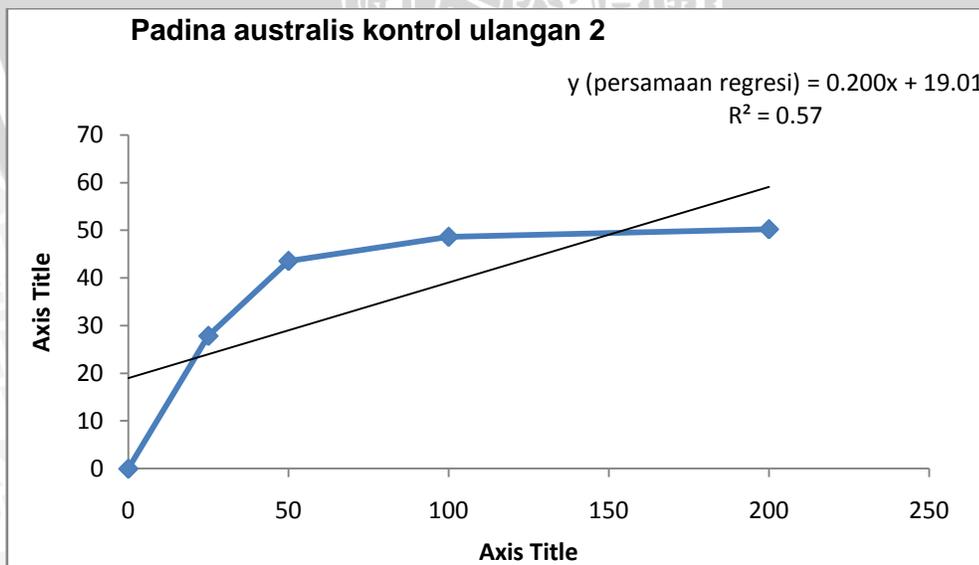
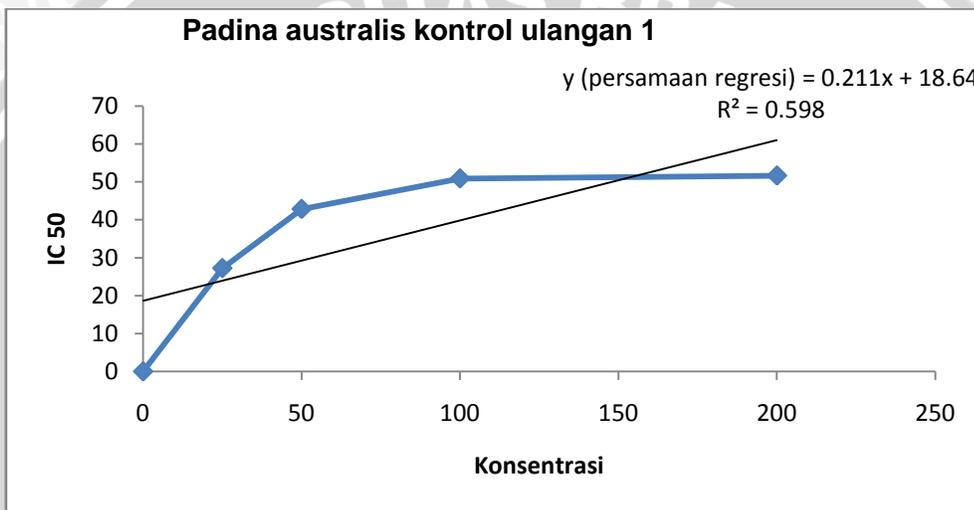
➤ IC₅₀ Perlakuan 12 hari konsentrasi 20%

Perlakuan 12 hari konsentrasi 20%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	89.333	92.353	90.84
25	0.850	1.099	49.971	35.315			
50	0.847	0.755	50.147	55.562			
100	0.711	0.615	58.152	63.802			
200	0.469	0.505	72.396	70.277			



➤ IC₅₀ Perlakuan Kontrol (0 hari)

Perlakuan 11 hari konsentrasi 7%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	1.699	1.699	0	0	148.626	154.950	151.79
25	1.236	1.226	95.056	0.809			
50	0.971	0.959	96.116	22.411			
100	0.834	0.873	96.664	29.369			
200	0.821	0.846	96.716	31.553			



2. Rumus Perhitungan Data Hasil Rendemen

- Nilai Blanko Kontrol : 1.699
- % inhibisi :

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

- Contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$\begin{aligned} \% \text{inhibisi} &= \frac{(1.699 - 1.500)}{1.699} \times 100 \\ &= 0.117127 \times 100 \\ &= 11.713 \end{aligned}$$

- IC 50 :

$$Y \text{ (persamaan regresi)} = ax + b$$

$$50 = ax + b,$$

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 $Y = a + b$
- contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$Y = 0.339x + 11.63$$

$$50 = 0.339x + 11.63$$

$$x = \frac{(50 - 11.63)}{0.339}$$

$$= 113.186$$

- contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 2

$$Y = 0.292x + 14.06$$

$$50 = 0.292x + 14.06$$

$$x = \frac{(50 - 14.06)}{0.292}$$

$$= 123.082$$

- Rerata IC 50 :

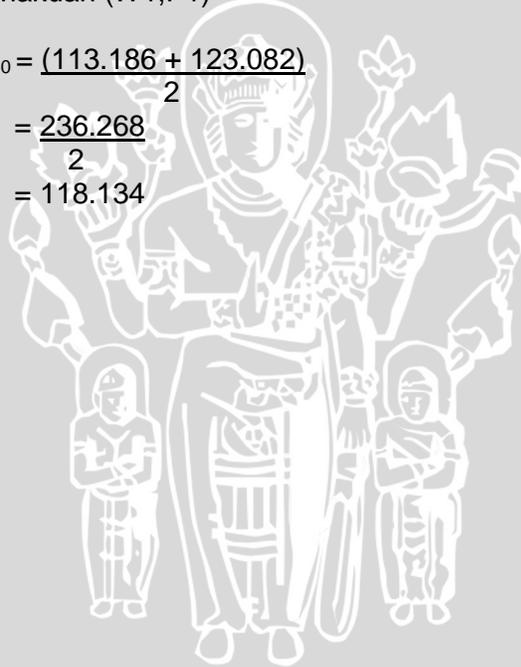
$$\frac{\text{Nilai IC 50 ulangan 1} + \text{Nilai IC 50 ulangan 2}}{2}$$

- Contoh perlakuan (W1,P1)

$$\text{Rerata IC}_{50} = \frac{(113.186 + 123.082)}{2}$$

$$= \frac{236.268}{2}$$

$$= 118.134$$



3. Hasil ANOVA IC 50 *Padina australis*

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-falve Prob > F	Significant/ not significant
model	2266.28	8	283.29	2.30	0.1182	Not significant
A = Konsentrasi	566.46	2	283.23	2.30	0.1560	Not Significant
B = Lama Inkubasi	1139.41	2	569.70	4.63	0.0415	significant
AB = konsentrasi & lama inkubasi	560.42	4	140.10	1.14	0.3982	Not significant
Pure Error	1108.35	9	123.15			
Cor. Total	3374.63	17				

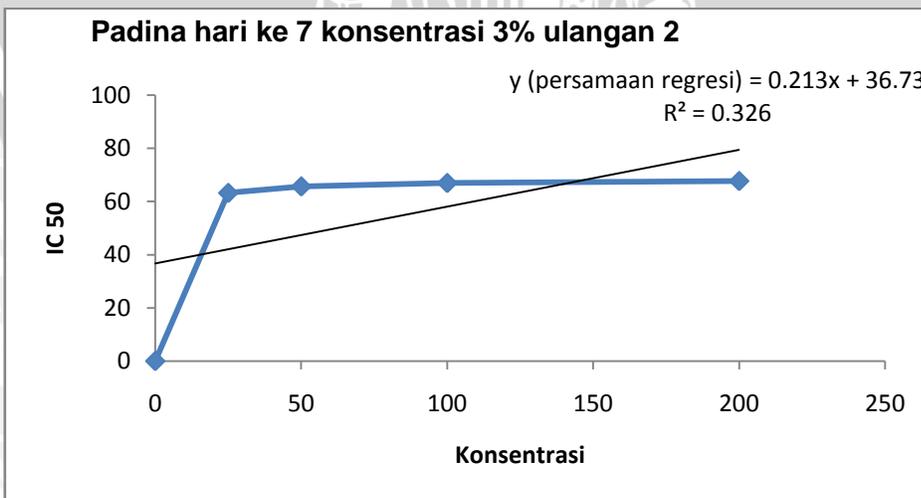
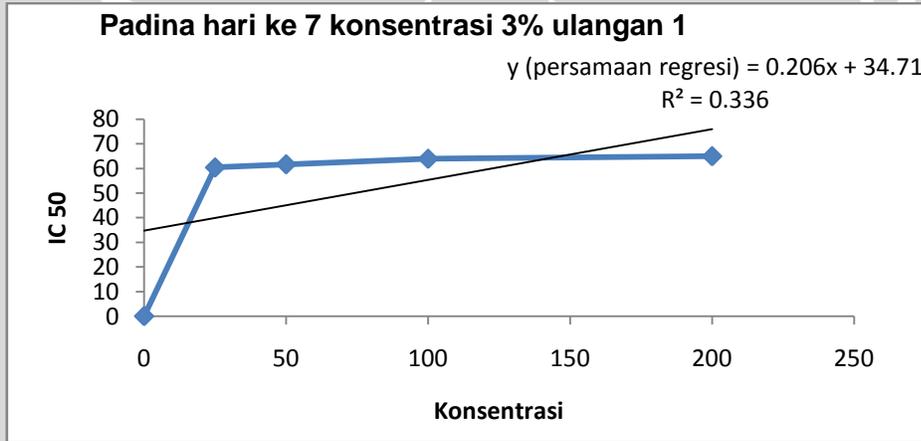
Hasil ANOVA IC₅₀ berbeda nyata oleh perlakuan lama inkubasi ($P < 0.05$), tetapi IC₅₀ tidak berbeda nyata oleh perlakuan konsentrasi karena ($P > 0.05$), dan interaksi antara keduanya tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Nilai IC₅₀ terkuat didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 9 hari dengan konsentrasi 5% (v/b) rerata sebesar 84.659 ppm, dan nilai IC₅₀ terlemah didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 6 hari dengan konsentrasi 5% (v/b) rerata sebesar 118.134 ppm.

Lampiran 5. Data perhitungan dan analisis ANOVA IC₅₀ ekstrak *Padina australis* pada penelitian utama

1. Data Hasil IC₅₀

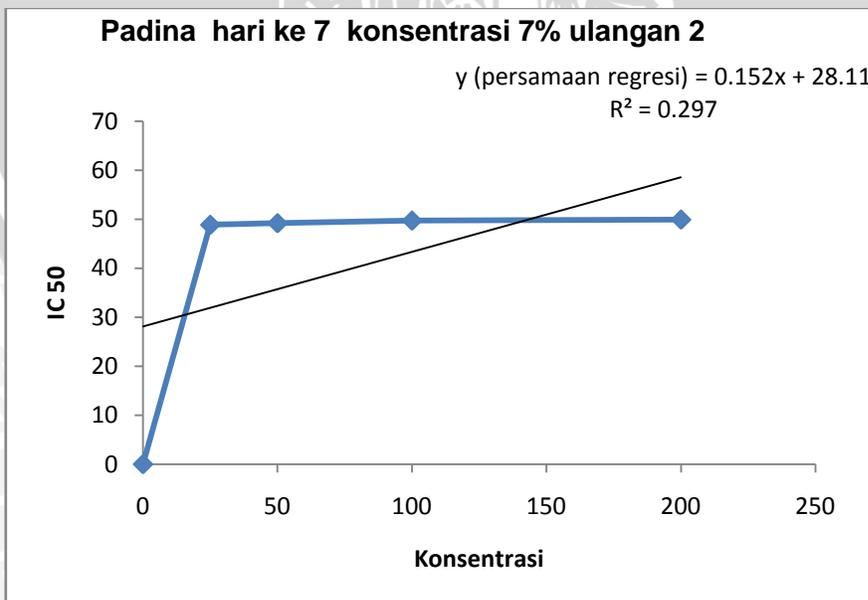
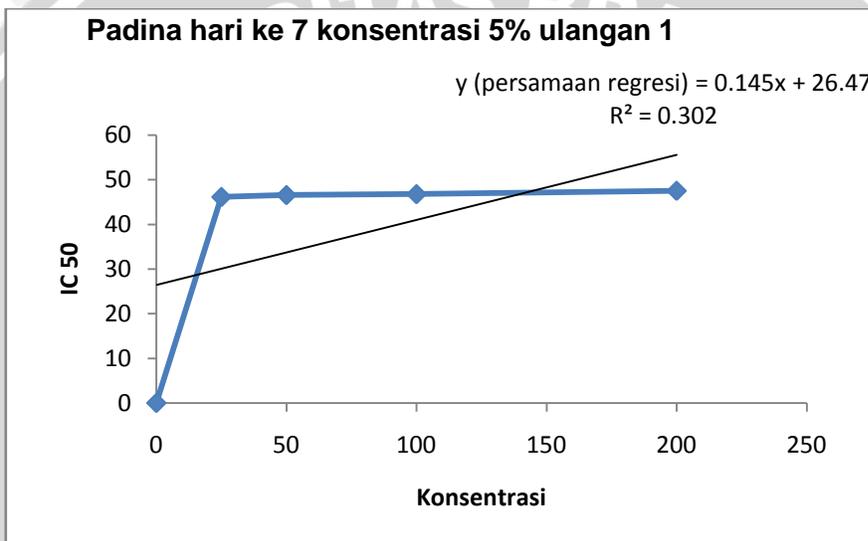
➤ IC₅₀ Perlakuan 7 hari konsentrasi 3%

Perlakuan 7 hari konsentrasi 3%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0			
25	0.372	0.345	60.383	63.259			
50	0.36	0.322	61.661	65.708	74.223	62.3	68.26
100	0.339	0.31	63.898	66.986			
200	0.329	0.303	64.963	67.732			



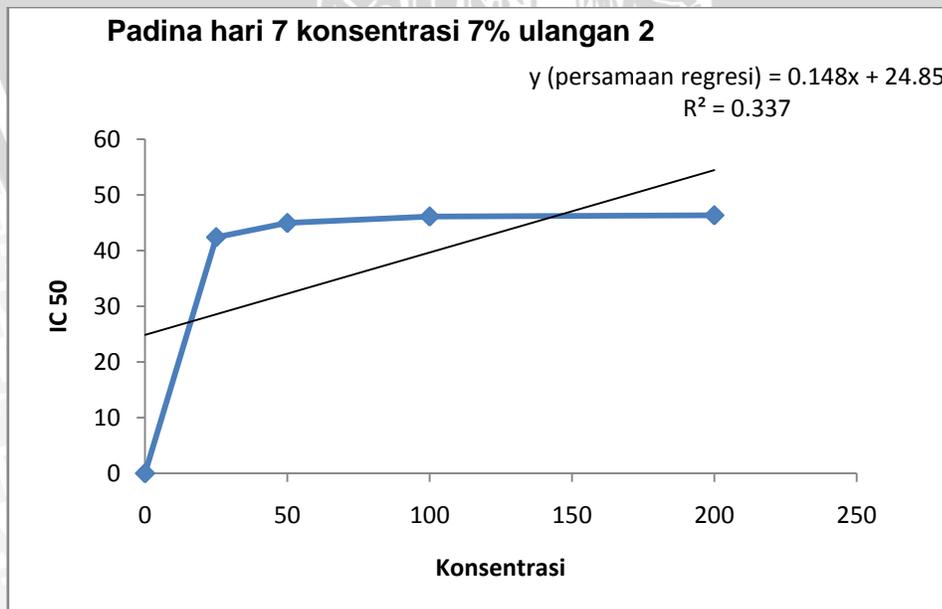
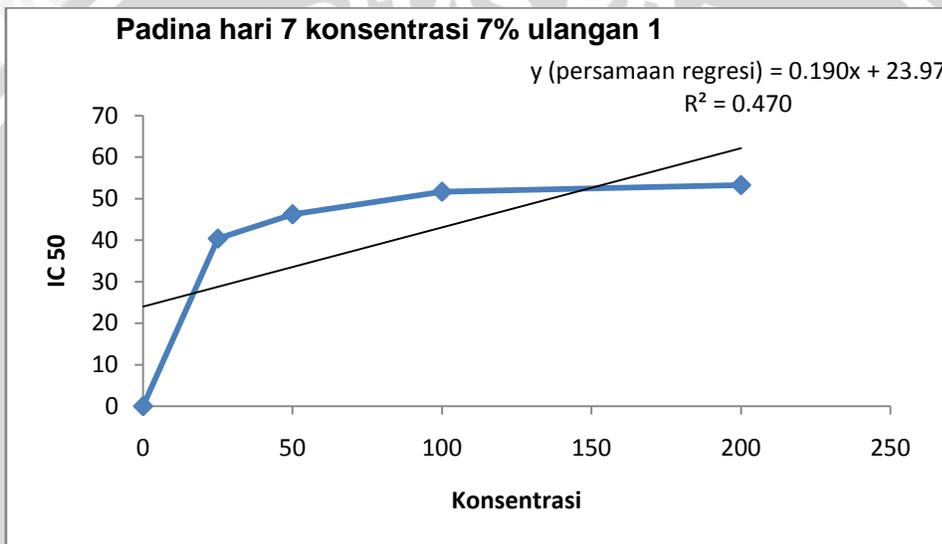
➤ IC₅₀ Perlakuan 7 hari konsentrasi 5%

Perlakuan 7 hari konsentrasi 5%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	162.276	144.013	153.15
25	0.506	0.48	46.113	48.882			
50	0.502	0.477	46.539	49.201			
100	0.5	0.472	46.752	49.734			
200	0.493	0.47	47.497	49.947			



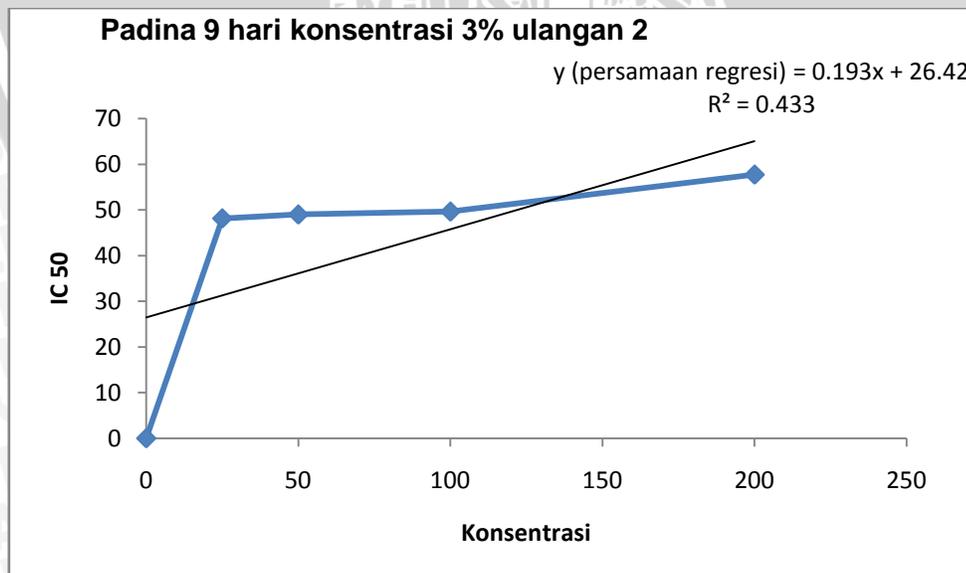
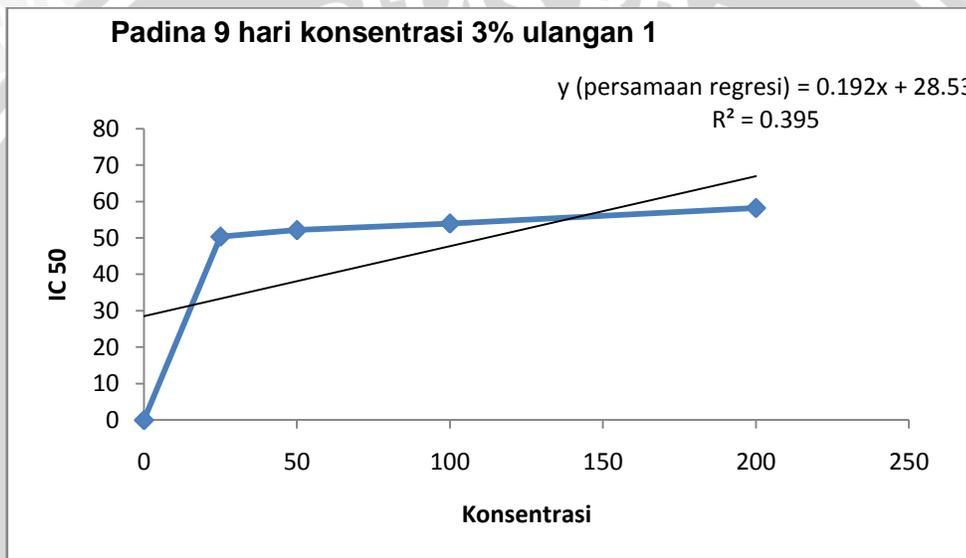
➤ IC₅₀ Perlakuan 7 hari konsentrasi 7%

Perlakuan 7 hari konsentrasi 7%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	137.000	169.932	153.47
25	0.56	0.541	40.362	42.386			
50	0.505	0.517	46.219	44.941			
100	0.454	0.506	51.651	46.113			
200	0.439	0.504	53.248	46.326			



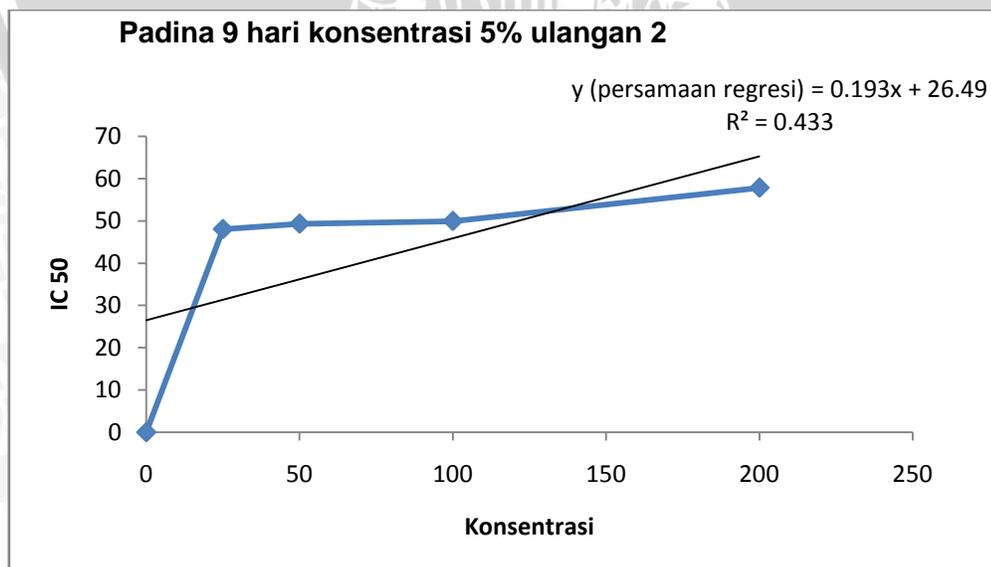
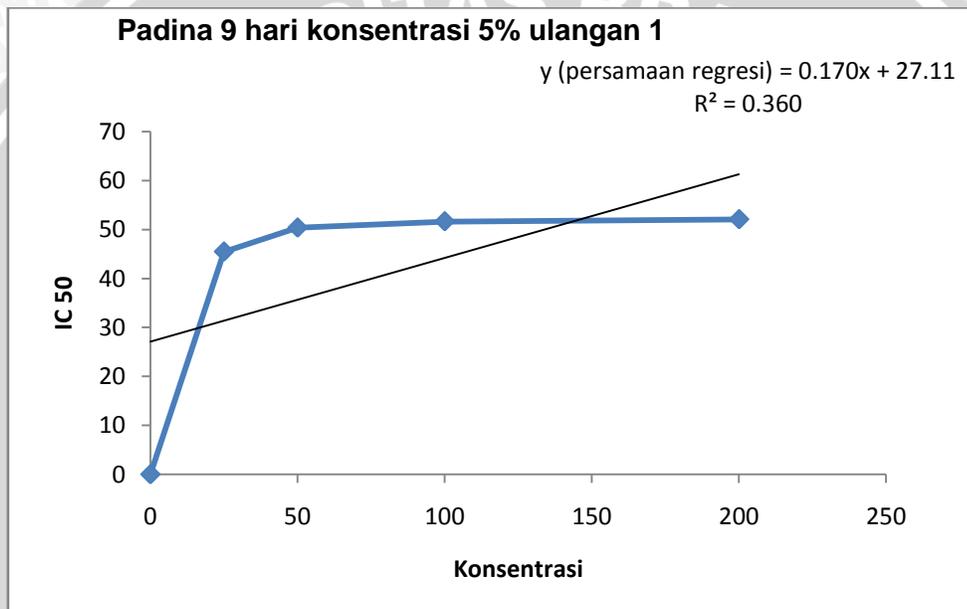
➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari konsentrasi 3%

Perlakuan 9 hari konsentrasi 3%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	111.823	122.176	117.00
25	0.466	0.487	50.373	48.136			
50	0.449	0.479	52.183	48.988			
100	0.432	0.473	53.994	49.627			
200	0.392	0.397	58.253	57.721			



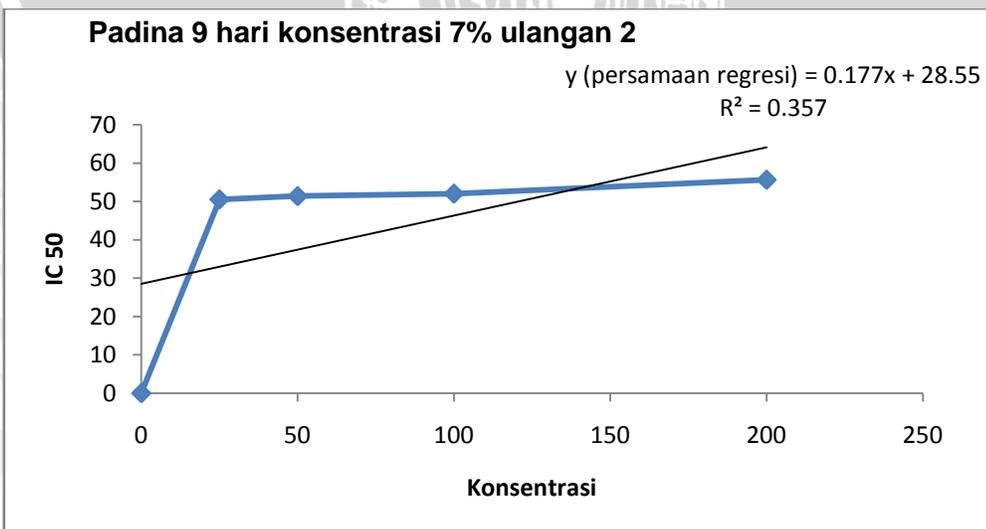
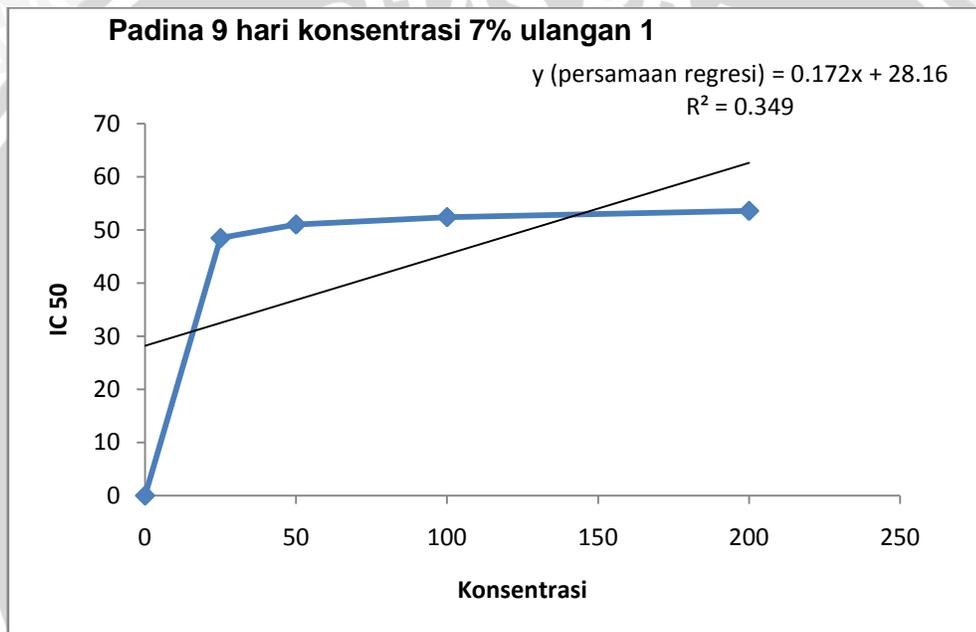
➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari konsentrasi 5%

Perlakuan 9 hari konsentrasi 5%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	134.647	121.813	128.23
25	0.512	0.488	45.474	48.030			
50	0.466	0.476	50.373	49.308			
100	0.454	0.47	51.651	49.947			
200	0.45	0.396	52.077	57.827			



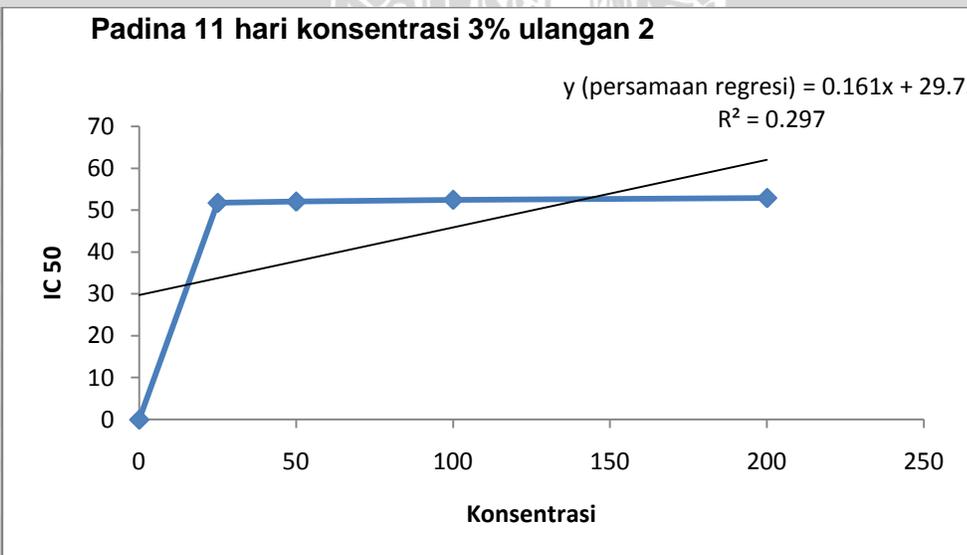
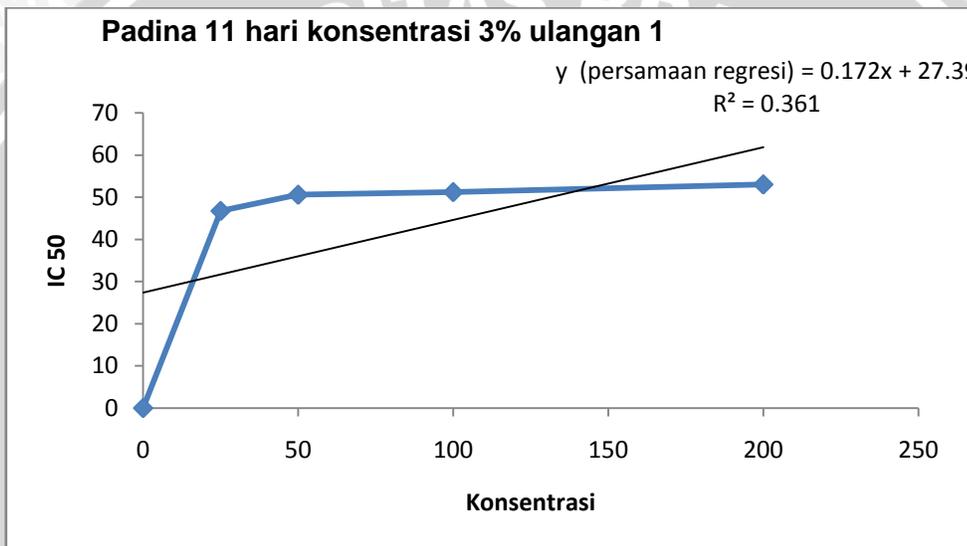
➤ IC₅₀ Perlakuan 9 hari konsentrasi 7%

Perlakuan 9 hari konsentrasi 7%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	126.977	121.186	124.08
25	0.484	0.465	48.456	50.479			
50	0.46	0.457	51.012	51.331			
100	0.447	0.451	52.396	51.970			
200	0.436	0.417	53.568	55.591			



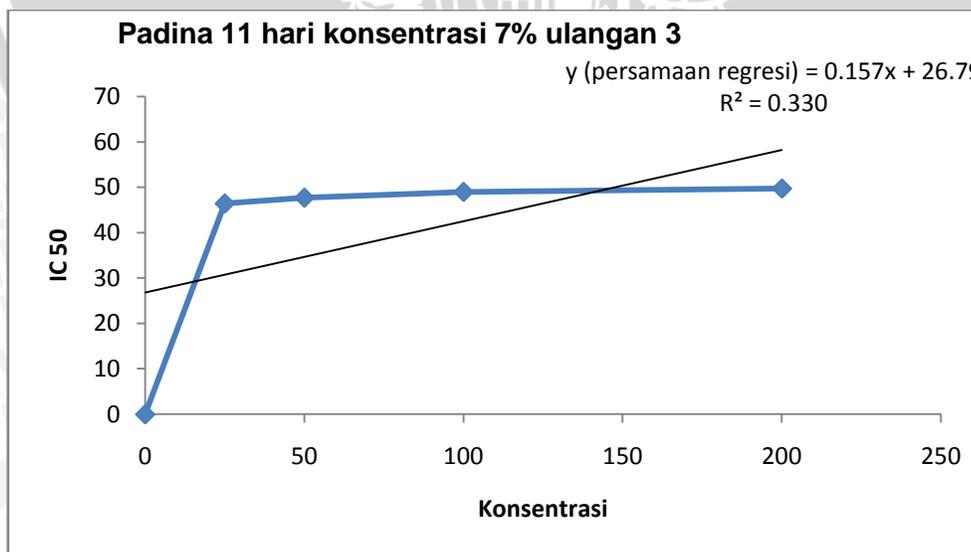
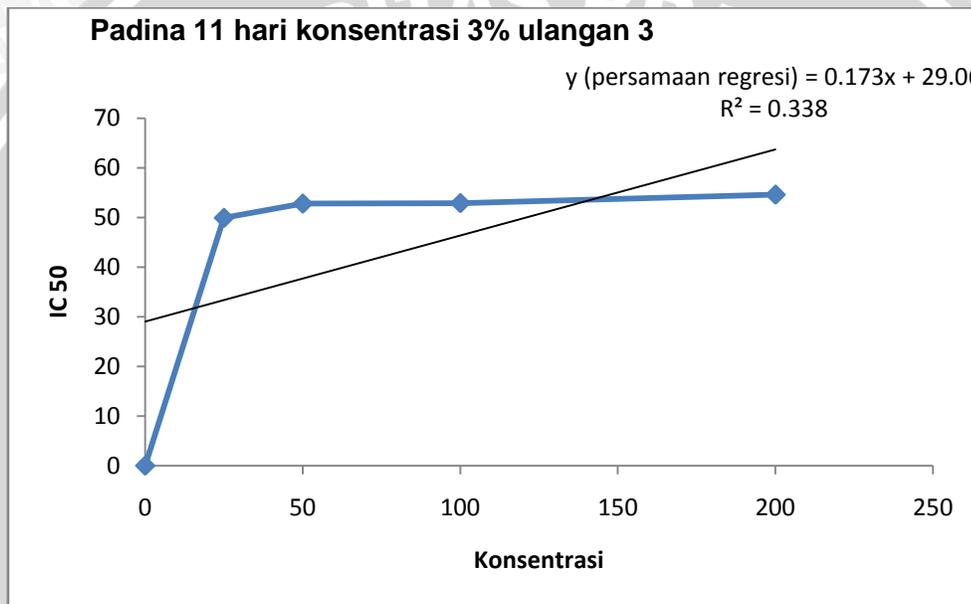
➤ IC₅₀ Perlakuan 11 hari konsentrasi 3%

Perlakuan 11 hari konsentrasi 3%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	131.453	125.901	128.68
25	0.5	0.453	46.752	51.757			
50	0.464	0.45	50.586	52.077			
100	0.458	0.446	51.225	52.503			
200	0.441	0.442	53.035	52.929			



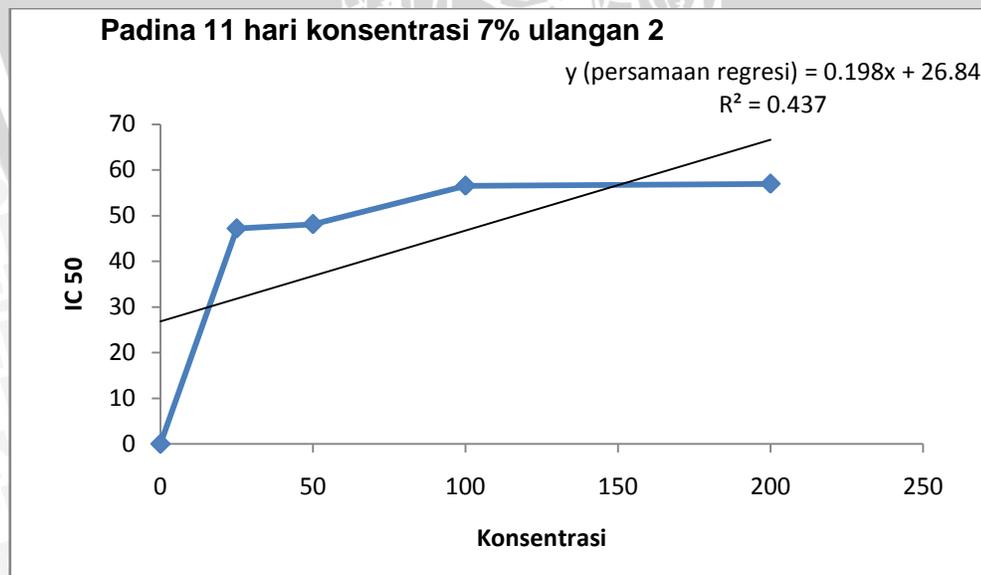
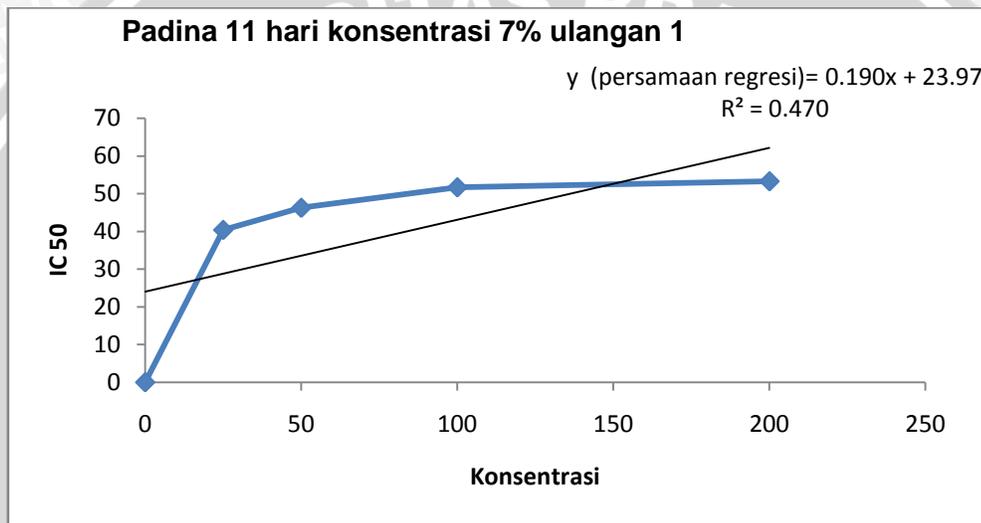
➤ IC₅₀ Perlakuan 11 hari konsentrasi 5%

Perlakuan 11 hari konsentrasi 5%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	121.040	147.834	134.44
25	0.47	0.503	49.947	46.432			
50	0.443	0.491	52.822	47.710			
100	0.442	0.479	52.929	48.988			
200	0.426	0.472	54.633	49.734			



➤ IC₅₀ Perlakuan 11 hari konsentrasi 7%

Perlakuan 11 hari konsentrasi 7%							
Konsentrasi	Absorbansi		%Inhibisi		IC ₅₀		Rerata
	1	2	1	2	1	2	
0	0.939	0.939	0	0	137	116.970	126.99
25	0.56	0.496	40.362	47.178			
50	0.505	0.487	46.219	48.136			
100	0.454	0.408	51.651	56.550			
200	0.439	0.404	53.248	56.976			



2. Rumus Perhitungan Data Hasil Rendemen

- Nilai Blanko Kontrol : 1.699
- Nilai Blanko : 0.939
- % inhibisi :

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

- IC₅₀ :

Dari persamaan regresi yg didapat ($Y = ax + b$)

Karena IC₅₀ adalah ($50 = ax + b$),

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 $Y = ax + b$
- b = persamaan b pada gambar grafik $Y = ax + b$
- contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$Y = 0.206x + 34.71$$

$$50 = 0.206x + 34.71$$

$$X = \frac{50 - 34.71}{0.206}$$

$$= \frac{15.29}{0.206}$$

$$= 74.223$$

- contoh perlakuan (W1,P1) ulangan 2

$$Y = 0.206x + 34.71$$

$$50 = 0.213x + 36.73$$

$$X = \frac{50 - 36.73}{0.213}$$

$$= \frac{13.27}{0.206}$$

$$= 62.30$$

➤ Rerata IC 50 :

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

- Contoh perlakuan (W1,P1)

$$\text{Rerata IC}_{50} = \frac{(74.223 + 62.30)}{2}$$

$$= 68.26$$



3. Hasil ANOVA IC₅₀ *Padina australis*

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9987.983 ^a	8	1248.498	7.452	.003
Intercept	285909.137	1	285909.137	1.707E3	.000
LAMA_INKUBASI	154.326	2	77.163	.461	.645
KONSENTRASI	4158.667	2	2079.333	12.411	.003
LAMA_INKUBASI * KONSENTRASI	5674.990	4	1418.747	8.468	.004
Error	1507.846	9	167.538		
Total	297404.966	18			
Corrected Total	11495.828	17			

Data analisa hasil ANOVA IC₅₀ menggunakan program SPSS versi 1.6, yaitu untuk perlakuan konsentrasi berbeda nyata karena ($p < 0.05$), tetapi IC₅₀ tidak berbeda nyata oleh perlakuan lama inkubasi karena ($p > 0.05$), dan interaksi antara keduanya berbeda nyata ($p < 0.05$). Nilai IC₅₀ terkuat didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 7 hari dengan konsentrasi 3% (v/b) rerata sebesar 68.264 ppm, dan nilai IC₅₀ terlemah didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 7 dengan konsentrasi 7% (v/b) rerata sebesar 153.467 ppm. Karena interaksi antara kedua perlakuan berbeda nyata ($p < 0.05$), maka perlu adanya analisis uji lanjut Duncan untuk menentukan notasi pada tiap perlakuan.

4. Analisis Uji Lanjut Duncan

Karena Hasil interaksi dua perlakuan berbeda nyata, maka diperlukan uji lanjut

Duncan untuk menentukan notasi yang berbeda

$$\begin{aligned}
 \text{➤ } S \bar{x} &= \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{\text{Ulangan}}} \\
 &= \sqrt{\frac{167,533}{2}} \\
 &= 9,152
 \end{aligned}$$

➤ r.p = (perlakuan , galat)

r (perlakuan)	p (db galat)	r,p	Hasil tabel nilai-nilai r,p untuk uji jarak Duncan (DMRT)
2	9	2 , 9	3.20
3	9	3 , 9	3.34
4	9	4 , 9	3.41
5	9	5 , 9	3.47
6	9	6 , 9	3.50
7	9	7 , 9	3.52
8	9	8 , 9	3.52
9	9	9 , 9	3.52

➤ R.P =

Banyaknya Perlakuan (r)	Selangan	R.P = (r,p). $S \bar{x}$
2	0	(2 , 9) x 9,152 => (3.20) x 9,152 = 29.28
3	1	(3 , 9) x 9,152 => (3.34) x 9,152 = 30.56
4	2	(4 , 9) x 9,152 => (3.41) x 9,152 = 31.20
5	3	(5 , 9) x 9,152 => (3.47) x 9,152 = 31.75
6	4	(6 , 9) x 9,152 => (3.50) x 9,152 = 32.032
7	5	(7 , 9) x 9,152 => (3.52) x 9,152 = 32.2
8	6	(8 , 9) x 9,152 => (3.52) x 9,152 = 32.2
9	7	(9 , 9) x 9,152 => (3.52) x 9,152 = 32.2

➤ Pembandingan Duncan

	2	3	4	5	6	7	8	9
$S \bar{x}$	9,152	9,152	9,152	9,152	9,152	9,152	9,152	9,152
r.p	3,20	3,34	3,41	3,47	3,50	3,52	3,52	3,52
R.P	29,28	30,56	31,20	31,75	32,032	32,2	32,2	32,2

➤ Pengurutan hasil IC_{50} dari terendah ke tertinggi untuk penentuan notasi

Nilai IC_{50}	Hasil Pengurangan	Pembandingan Dncan (R.P)	Notasi
68.26	-	-	a
117	$117 - 68.26 = 48.74$	$48.74 > 29.82$	b
124.08	$124.082 - 117 = 7.082$	$7.082 < 29.28$	b
126.985	$126.985 - 117 = 9.985$	$9.985 < 29.28$	b
128.23	$128.23 - 117 = 11.23$	$11.23 < 29.28$	b
128.677	$128.677 - 117 = 11.677$	$11.677 < 29.28$	b
134.437	$134.437 - 117 = 17.437$, jika ($153.145 - 134.437 = 18.708$)	$17.437 < 29.28$ $18.708 \leq 29.28$, maka 134.437 selain sudah diberi huruf "b" juga diberi huruf "c"	bc
153.145	$153.145 - 117 = 36.145$	$36.145 > 29.28$	c
153.466	$153.466 - 124.082 = 29.384$	> 29.28	c

➤ Pemasukan notasi pada tiap perlakuan

Konsentrasi	Lama Inkubasi		
	7 hari	9 hari	11 hari
3%	68,264 ^a	117 ^b	128,677 ^b
5%	153,145 ^c	128,23 ^b	134,437 ^{bc}
7%	153,466 ^c	124,682 ^b	126,985 ^b

Lampiran 6. Analisis Keragaman (ANOVA) Total Fenol ekstrak ethanol *Padina australis*

1. Data Hasil Total Fenol *Padina australis*

Perlakuan		Ulangan	Absorbansi	Total Fenol	Rerata
W 1	P1	1	1	122.75	126.44
		2	1.059	130.125	
	P2	1	1	122.75	117.94
		2	0.923	113.125	
	P3	1	0.778	95	104.81
		2	0.935	114.625	
W 2	P1	1	0.442	53	55.94
		2	0.489	58.875	
	P2	1	0.436	52.25	51.69
		2	0.427	51.125	
	P3	1	0.487	58.625	66.75
		2	0.617	74.875	
W 3	P1	1	0.506	61	58.19
		2	0.461	55.375	
	P2	1	0.422	50.5	52.56
		2	0.455	54.625	
	P3	1	0.416	49.75	51.63
		2	0.446	53.5	

Keterangan :

W1 : Waktu fermentasi 7 hari

W2 : Waktu fermentasi 9 hari

W3 : Waktu fermentasi 11 hari

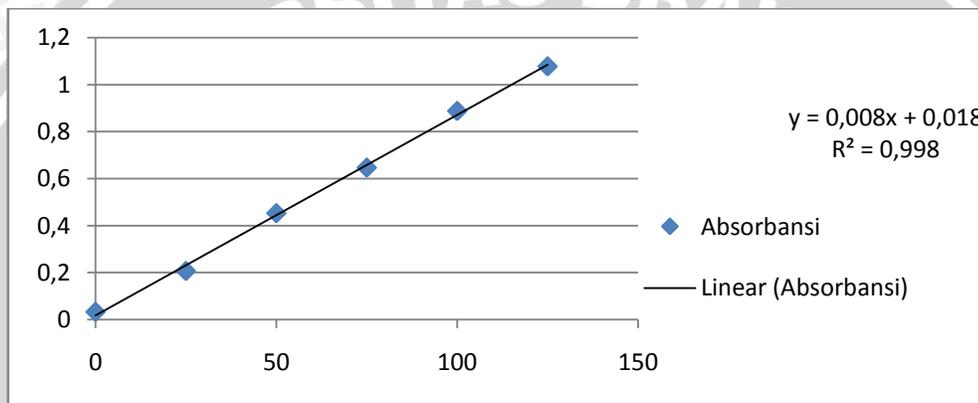
P1 : konsentrasi 3% (v/b) dari berat sampel (50 g)

P2 : konsentrasi 5% (v/b) dari berat sampel (50 g)

P3 : konsentrasi 7% (v/b) dari berat sampel (50 g)

2. Data Asam Galat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
Asam Galat	0	0.03
	25	0.21
	50	0.45
	75	0.65
	100	0.89
	125	1.08



3. Rumus Perhitungan Data Hasil Total Fenol

➤ Total Fenol :

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

$$Y = ax + b$$

Keterangan :

- Y = Total Fenol
- 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 absorbansi dari masing-masing sampel ulangan

➤ Contoh :

- Perlakuan (W1,P1) ulangan 1

$$Y = ax + b$$

$$1 = 0.008x + 0.018$$

$$x = \frac{(1 - 0.018)}{0.008}$$

$$= 122.75$$

- Perlakuan (W1,P1) ulangan 2

$$Y = ax + b$$

$$1 = 0.008x + 0.018$$

$$x = \frac{(1.059 - 0.018)}{0.008}$$

$$= 130.125$$

- Rerata

$$(122.75 + 130.125) / 2 = 126.44 \text{ ppm}$$

4. Hasil ANOVA Total Fenol *Padina australis*

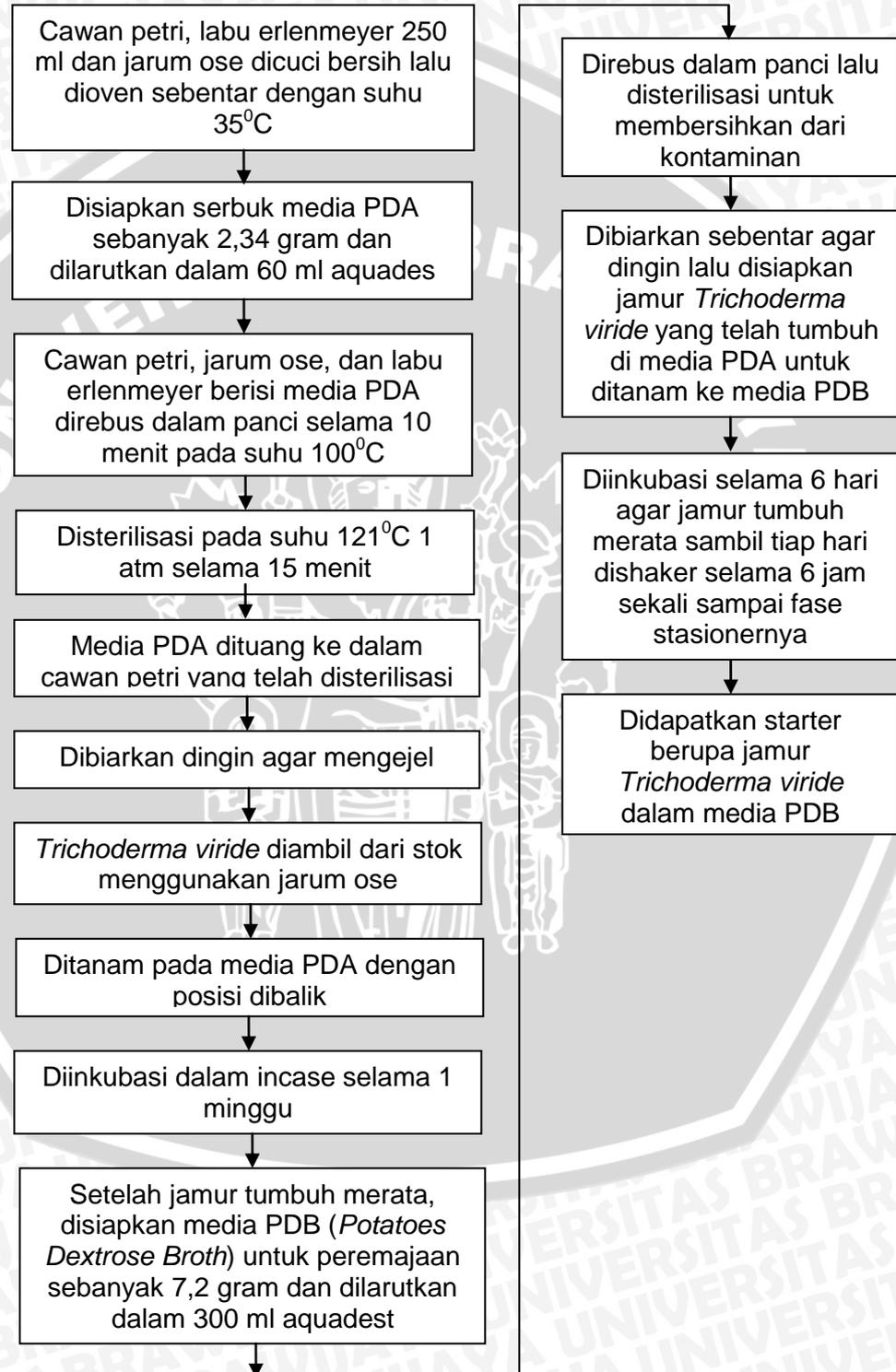
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15344.689 ^a	8	1918.086	38.587	.000
Intercept	104557.834	1	104557.834	2.103E3	.000
LAMA_INKUBASI	14578.293	2	7289.147	146.641	.000
KONSENTRASI	142.340	2	71.170	1.432	.288
LAMA_INKUBASI * KONSENTRASI	624.056	4	156.014	3.139	.071
Error	447.367	9	49.707		
Total	120349.891	18			
Corrected Total	15792.056	17			

LAMA_IN KUBASI	N	Subset	
		1	2
Duncan ^a 11	6	54.1250	
9	6	58.1250	
7	6		1.1640E2
Sig.		.351	1.000

Hasil ANOVA total fenol *Padina australis*, menerangkan perlakuan konsentrasi tidak berbeda nyata ($p > 0.05$), namun perlakuan lama inkubasi berbeda nyata ($p < 0.05$). Dan interaksi kedua perlakuan tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Nilai total fenol tertinggi didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 7 hari dan konsentrasi 3% (v/b) rerata sebesar 126.187 mg GAE/1000g; dan nilai rendemen terendah didapat dari sampel dengan perlakuan lama inkubasi 11 hari dengan konsentrasi 7% (v/b) rerata sebesar 51.625 mg GAE/1000g.

Lampiran 7. Skema Kerja

➤ Skema kerja pembuatan media dan pembiakan kultur starter jamur *Trichoderma viride*



➤ Penghitungan spora jamur *Trichoderma viride* dengan haemocytometer

Dibersihkan haemocytometer dan gelas penutupnya dengan larutan detergen, bilas dengan air suling lalu alkohol, kering dianginkan

Diambil suspensi *Trichoderma viride* dalam media PDB yang akan ditentukan jumlahnya digojog dengan vortex sehingga merata

Diambil suspensi tersebut dengan pipet sebanyak kira-kira 5-10 μl (gunakan pipetteman) dan teteskan tepat pada petak-petaknya

Ditutup dengan gelas penutupnya dan taruh pada meja mikroskop

Diamati dengan menggunakan perbesaran lemah untuk menemukan petak-petaknya. Kemudian tentukan dari petak mana penghitungan akan dimulai,

Dilakukan perbesaran fokus keperbesaran sedang, dan 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

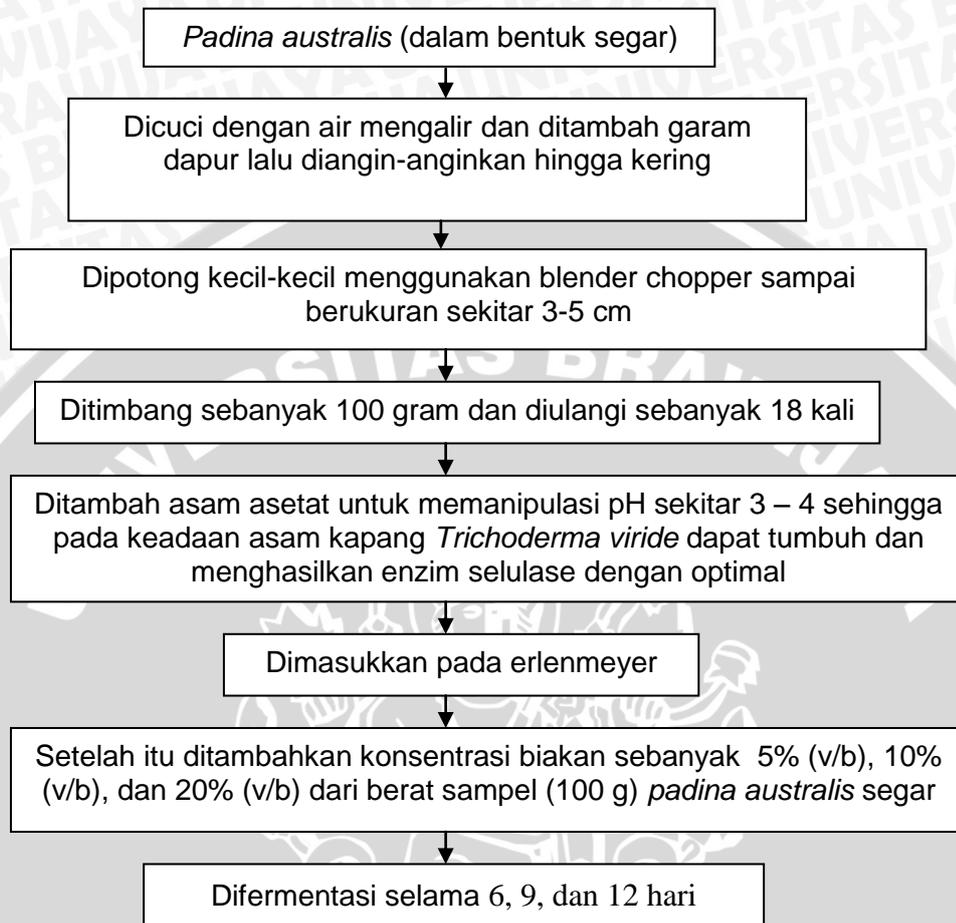
Dijumlah sel rata-rata dari 25 petak untuk menghitung jumlah sel tiap ml bahan

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

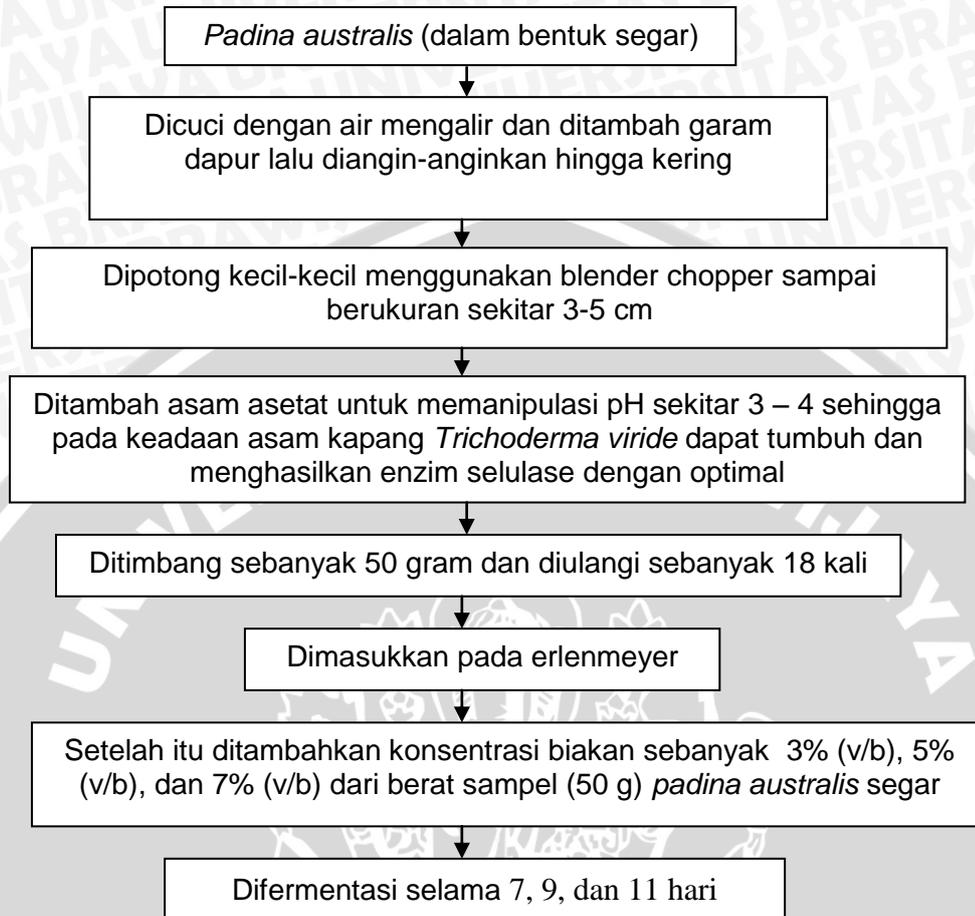
Dihitung jumlah sel dan jumlah sel rata-rata per hari dibuat sebagai kurva fase pertumbuhan jamur

Hasil

➤ **Persiapan fermentasi sampel penelitian pendahuluan**



➤ **Persiapan fermentasi sampel penelitian utama**



➤ **Maserasi sampel dan pengujian aktivitas antioksidan**

18 sampel yang telah terfermentasi dimaserasi dengan pelarut etanol konsentrasi 96% selama 24 jam pada mesin *shaker* suhu ruang (27°C)

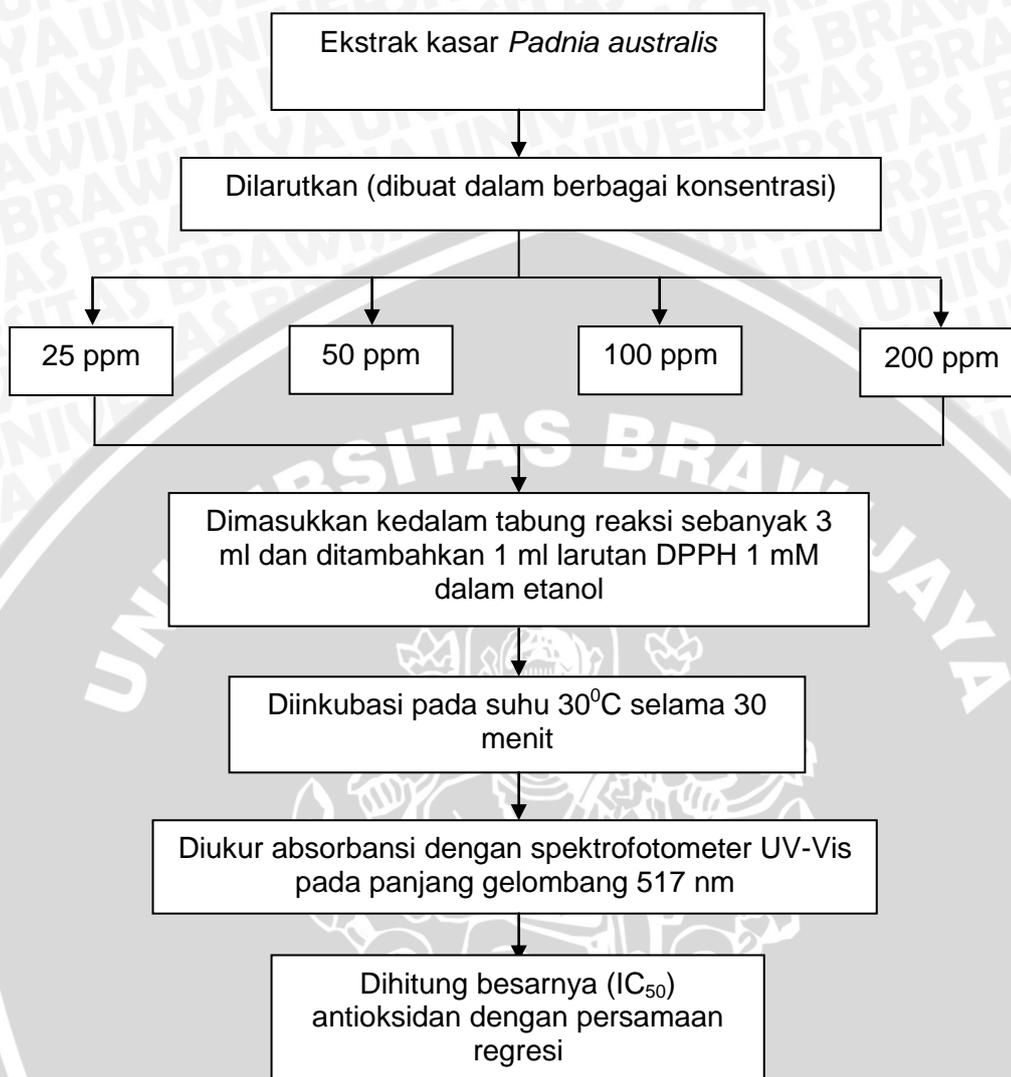
Disaring menggunakan kertas saring kasar dan didapatkan filtrat

Di *rotary evaporator* dengan suhu $40^{\circ}\text{C} \pm 3$ jam

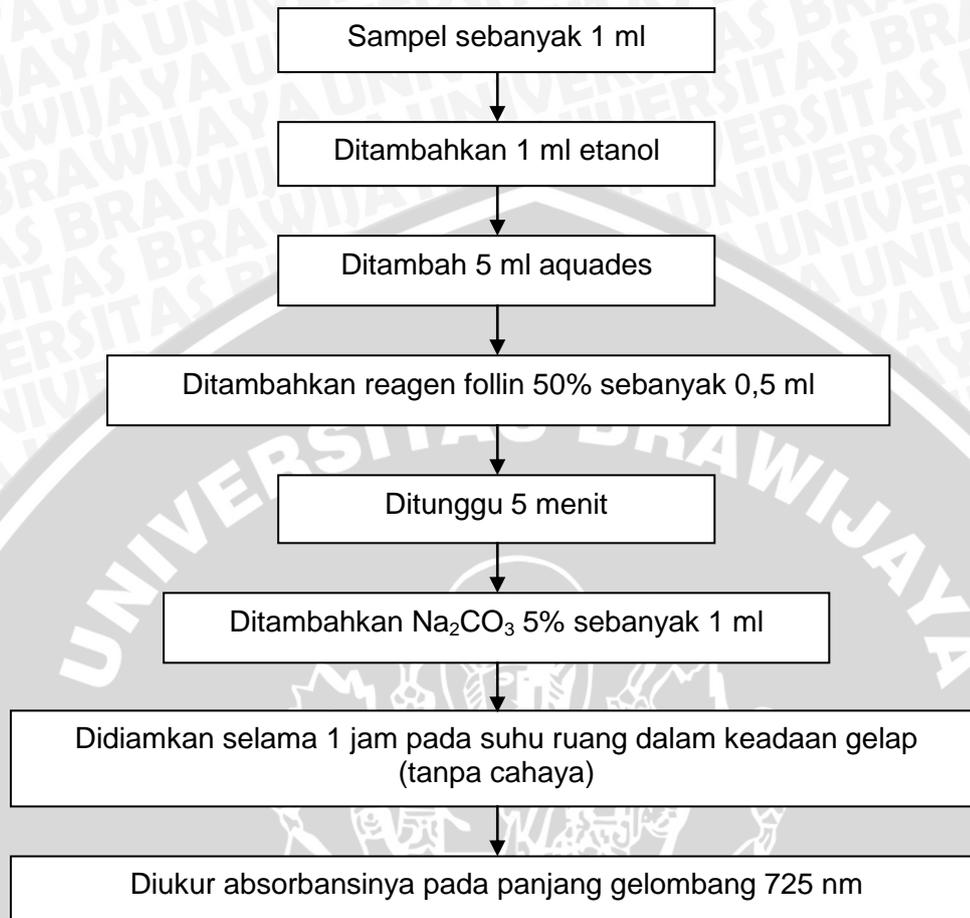
Didapatkan 18 ekstrak sampel hasil *rotary evaporator*



➤ Uji DPPH



➤ Skema Kerja Uji Total Fenol



Lampiran 8. Dokumentasi

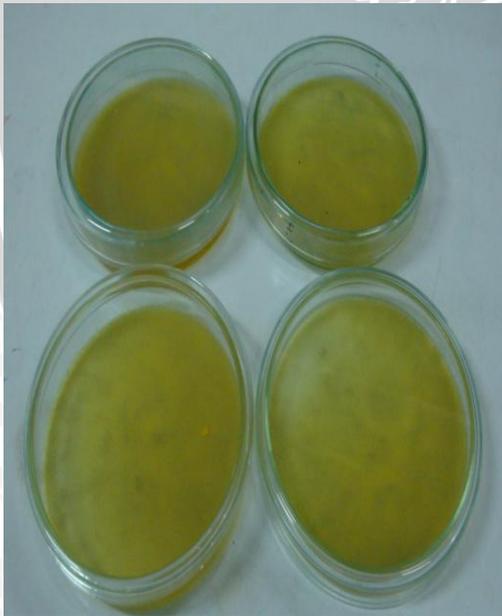
➤ Persiapan pembiakan jamur *Trichoderma viride*



1. Stok jamur *T. viride*



2. Persiapan alat dan bahan



3. Koloni jamur *T. viride* dalam media PDA

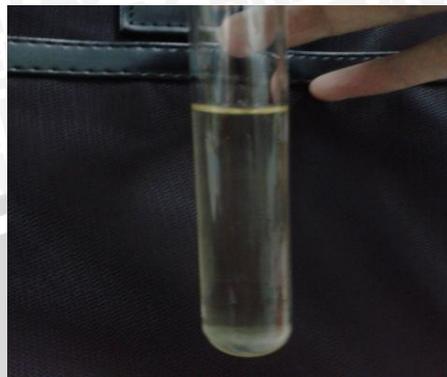


4. Starter jamur *T. viride* pada PDB

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



5. Penanaman dalam media PDB



6. Jamur yang sudah tumbuh



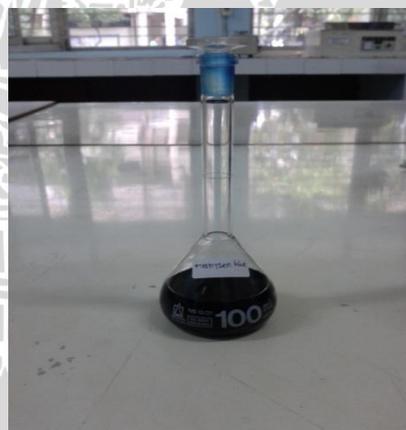
7. Divortex agar homogen



8. Proses pengenceran



9. Perhitungan dengan *Haemacytometer*



10. Reagen *methylen blue*



11. Gambar sel yang hidup dan yang mati

➤ Persiapan Fermentasi dan Uji IC₅₀



12. Sampel *Padina australis*

13. Pencucian



14. proses *chopping*



15. Penimbangan sampel



➤ Proses fermentasi sampel *Sargassum fillipendula*



15. Pengaturan pH awal substrat



16. Penambahan starter *T. viride*



17. diinkubasi pada suhu ruang

➤ Proses ekstraksi sampel



18. penambahan etanol 96%



19. Terlihat koloni jamur yang tumbuh saat diberi etanol 96%



20. Dimaserasi selama 24 jam dan di *shaker*



21. Penyaringan



22. hasil penyaringan



23. Pemisahan zat pelarut dengan zat terlarut menggunakan alat *vacuum rotary evaporator*



24. Ekstrak kasar *Padina australis*

➤ Proses perhitungan rendemen dan kadar air



25. Perhitungan rendemen



26. Perhitungan kadar air

➤ Uji aktifitas Antioksidan (Metode DPPH)



27. Proses pengenceran



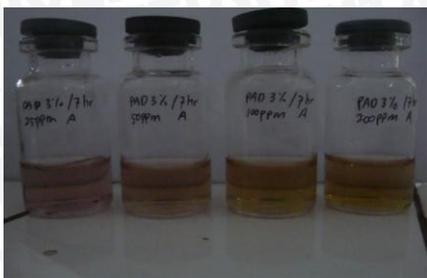
28. Hasil pengenceran



29. Larutan DPPH



30. Proses perhitungan absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis



31. Sampel yang telah ditambah DPPH

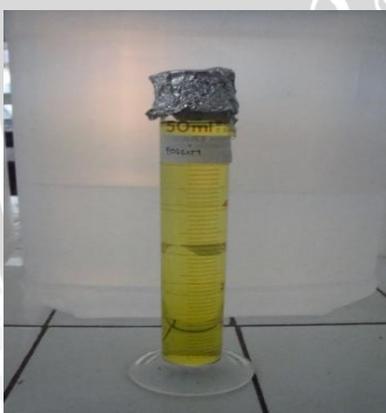
➤ Uji Total Fenol



32. Reagen etanol



33. Reagen aquades



34. Reagen follin



35. Reagen Na_2CO_3



36. Proses penghitungan absorbansi sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



37. Sampel yang telah diuji total fenol

➤ Uji Fitokimia



38. Reagen $HgCl_2$



39. Reagen I_2 dan KI



40. Uji fenolat



41. Uji flavonoid



41. Uji alkaloid meyer



42. Uji alkaloid wagner