

repository.ub.ac

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANALISA TOTAL FENOL  
KLOROFIL *a* PADA RUMPUT LAUT COKLAT *Sargassum filipendula***

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

Oleh :  
**ARIK MARFU'AH**  
NIM. 105080301111020



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANALISA TOTAL FENOL  
KLOROFIL *a* PADA RUMPUT LAUT COKLAT *Sargassum filipendula***

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

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

Oleh :  
**ARIK MARFU'AH**  
NIM. 105080301111020



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANALISA TOTAL FENOL  
KLOROFIL *a* PADA RUMPUT LAUT COKLAT *Sargassum filipendula***

Oleh :  
**ARIK MARFU'AH**  
NIM. 105080301111020

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 7 Agustus 2014  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
SK Dekan No: \_\_\_\_\_  
Tanggal: \_\_\_\_\_

**Dosen Penguji I**

(Dr. Ir. Yahya, MP.)  
NIP. 19630706 199003 1 003  
Tanggal :

**Dosen Penguji II**

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

**Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I**

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

**Dosen Pembimbing II**

(Prof. Ir. Sukoso, M.Sc., Ph.D.)  
NIP. 19640919 198903 1 002  
Tanggal :

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan**

(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)  
NIP. 19620805 198603 2 001  
Tanggal :

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Agustus 2014

Mahasiswa

Arik Marfu'ah

105080301111020

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan skripsi ini.
2. Sujud dan terimakasih yang sangat dalam saya persembahkan kepada Ibu (Aminarsih) dan Bapak (Markaban) tercinta, serta kakak perempuan satu-satunya (Siti Alimah) atas dorongan yang kuat baik materiil ataupun immaterial, kebijaksanaan dan doa yang tiada henti.
3. Ibu Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS dan Bapak Prof. Ir. Sukoso, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan wawasan selama penyelesaian skripsi ini.
4. Bapak Dr. Ir. Yahya, MP dan Bapak Eko Waluyo, S.Pi., M.Sc selaku dosen penguji yang telah membantu dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Teman-teman THP 2010, teman-teman kost Kertoleksono 12 dan Taman Bunga Merak No. 35, dan teman-teman yang tidak dapat saya sebut namanya satu-persatu yang telah memberikan bantuan dan do'a dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Dwi yuli Pujiastuti (Tutut), Seto Windarto (Otes), Nuzul Yoga Hapsari (Mbok) teman seperjuangan dari awal kuliah sampai kapanpun yang selalu memberikan dukungan dan semangat selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
7. Ucapan terima kasih secara khusus saya sampaikan kepada Rifan Ardyansyah (Kemping), teman hidup saya yang selalu memberikan do'a, dukungan, bantuan dan semangatnya demi terselesainya skripsi ini.

Malang, Agustus 2014

Penulis

## RINGKASAN

**ARIK MARFU'AH.** Skripsi. Uji Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol Klorofil *a* pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula*. (Dibawah Bimbingan **Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS** dan **Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D**).

Rumput laut merupakan salah satu tumbuhan yang banyak mengandung senyawa – senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat antioksidan, salah satunya yaitu kandungan senyawa fenol. Rumput laut coklat telah banyak dimanfaatkan sebagai sumber bahan pangan dan kesehatan. *Sargassum filipendula* adalah salah satu spesies dari rumput laut coklat (*phaeophyta*) yang terdapat di perairan pantai Talango, Madura. Klorofil dan karotenoid merupakan pigmen yang melimpah pada rumput laut coklat. Pada beberapa penelitian menyatakan klorofil dapat berfungsi sebagai obat karena dapat memperbaiki kondisi kesehatan. Klorofil menarik untuk diteliti sebagai senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Antioksidan dapat mencegah dampak negatif yang diakibatkan oleh radikal bebas (Julyasih, et al., 2009). Oleh karena itu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*.

Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas antioksidan dari klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*. Selain itu, hubungan antara kandungan total fenol dan aktivitas antioksidannya juga ditentukan.

Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* yang diukur nilai aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolnya. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) dengan parameter uji IC<sub>50</sub> (Inhibition Concentration). Pengukuran kadar total fenol menggunakan reagen Folin-Ciocalteu yang didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode yang bersifat eksploratif (non hipotesis). Metode eksploratif dilakukan untuk mencapai tujuan utama yakni mengetahui aktivitas antioksidan dan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*. Metode eksploratif dilakukan karena pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* memiliki aktivitas antioksidan. Pengujian aktivitas antioksidan dengan DPPH menunjukkan nilai aktivitas IC<sub>50</sub> sebesar 111,748 ppm. Total fenol yang didapatkan dari klorofil *a* sebesar 0,010815 mg GAE/g sampel. Hal ini dapat dikatakan aktivitas antioksidan dari klorofil *a* tidak memiliki korelasi positif dengan kandungan total fenolnya, dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan yang cukup baik, namun kandungan total fenol yang relatif rendah. Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tidak hanya bersumber dari golongan fenol. Klorofil *a* memiliki kandungan senyawa yang lain yang juga memiliki aktivitas antioksidan.

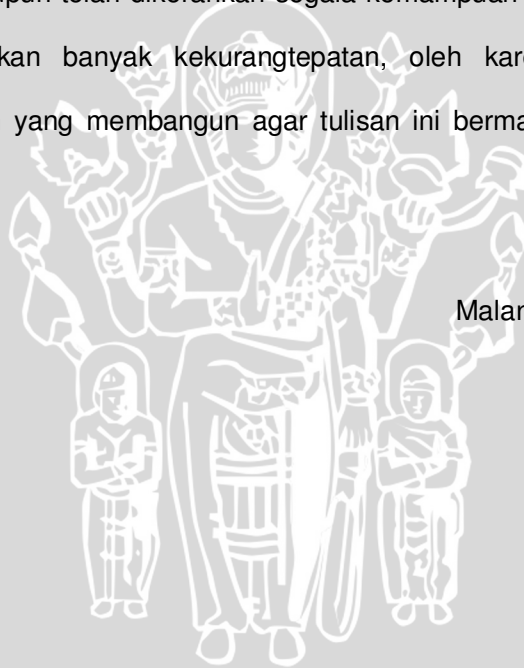
## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Antioksidan dan Analisa Total Fenol Klorofil a pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula*”**. Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi isolasi pigmen, identifikasi pigmen, uji aktivitas antioksidan dan uji total fenol.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Agustus 2014

Penulis

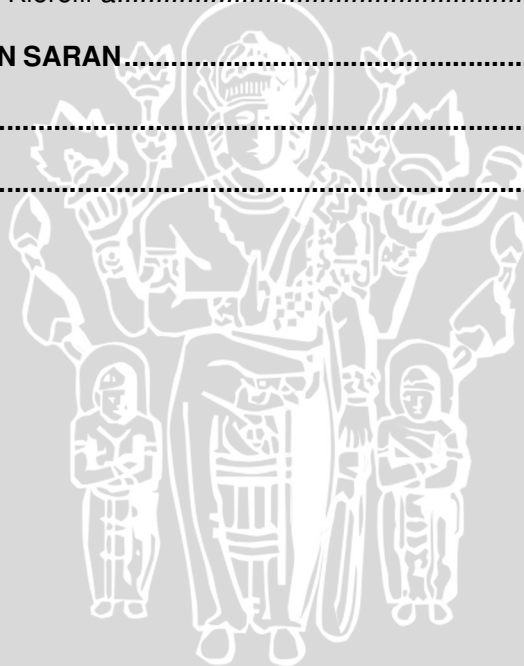


## DAFTAR ISI

|   | Halaman   |
|---|-----------|
| COVER.....  | i         |
| HALAMAN JUDUL.....  | ii        |
| HALAMAN LEMBAR PENGESAHAN.....                                  | iii       |
| RINGKASAN.....  | vi        |
| KATA PENGANTAR.....   | vii       |
| DAFTAR ISI.....   | viii      |
| DAFTAR TABEL.....   | x         |
| DAFTAR GAMBAR.....  | xi        |
| DAFTAR LAMPIRAN.....  | xii       |
| <br>  |           |
| <b>1. PENDAHULUAN.....</b>                                      | <b>1</b>  |
| 1.1. Latar Belakang.....  | 1         |
| 1.2. Rumusan Masalah.....                                       | 3         |
| 1.3. Tujuan Penelitian.....                                     | 4         |
| 1.4. Kegunaan Penelitian.....                                   | 4         |
| 1.5. Tempat dan Waktu Penelitian.....                           | 5         |
| <br>  |           |
| <b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>                                 | <b>6</b>  |
| 2.1. Rumput Laut.....   | 6         |
| 2.1.1. Rumput Laut Coklat ( <i>Phaeopyceae</i> ).....           | 6         |
| 2.1.2. <i>Sargassum filipendula</i> .....                       | 8         |
| 2.1.3. Pigmen pada Rumput Laut.....                             | 8         |
| 2.1.4. Klorofil <i>a</i> .....                                  | 9         |
| 2.2. Isolasi Pigmen Klorofil <i>a</i> .....                     | 11        |
| 2.2.1. Ekstraksi.....   | 11        |
| 2.2.2. Fraksinasi (Partisi).....                                | 12        |
| 2.2.3. Pelarut.....   | 13        |
| 2.2.3.1. Metanol.....   | 14        |
| 2.2.3.2. Aseton.....  | 15        |
| 2.2.3.3. Dietil eter.....                                       | 16        |
| 2.2.3.4. Heksan.....  | 16        |
| 2.2.3.5. Etil asetat.....                                       | 17        |
| 2.2.4. Kromatografi Kolom.....                                  | 18        |
| 2.3. Analisa Kualitatif Klorofil <i>a</i> .....                 | 20        |
| 2.3.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....                      | 20        |
| 2.3.2. Spektrofotometer <i>UV-Vis</i> .....                     | 21        |
| 2.4. Radikal Bebas.....   | 23        |
| 2.5. Aktivitas Antioksidan.....                                 | 24        |
| 2.6. Uji Aktivitas Antioksidan.....                             | 25        |
| 2.7. Fenol.....   | 26        |
| <br>  |           |
| <b>3. METODE PENELITIAN.....</b>                                | <b>28</b> |
| 3.1. Metode Penelitian.....                                     | 28        |
| 3.1.1. Bahan Penelitian.....                                    | 28        |
| 3.1.2. Alat Penelitian.....                                     | 28        |
| 3.2. Metode Penelitian.....                                     | 29        |
| 3.3. Prosedur Penelitian.....                                   | 29        |
| 3.3.1. Persiapan Sampel.....                                    | 29        |
| 3.3.2. Ekstraksi dan Partisi Klorofil <i>a</i> .....            | 30        |
| 3.3.3. Isolasi Klorofil <i>a</i> dengan Kromatografi Kolom..... | 32        |

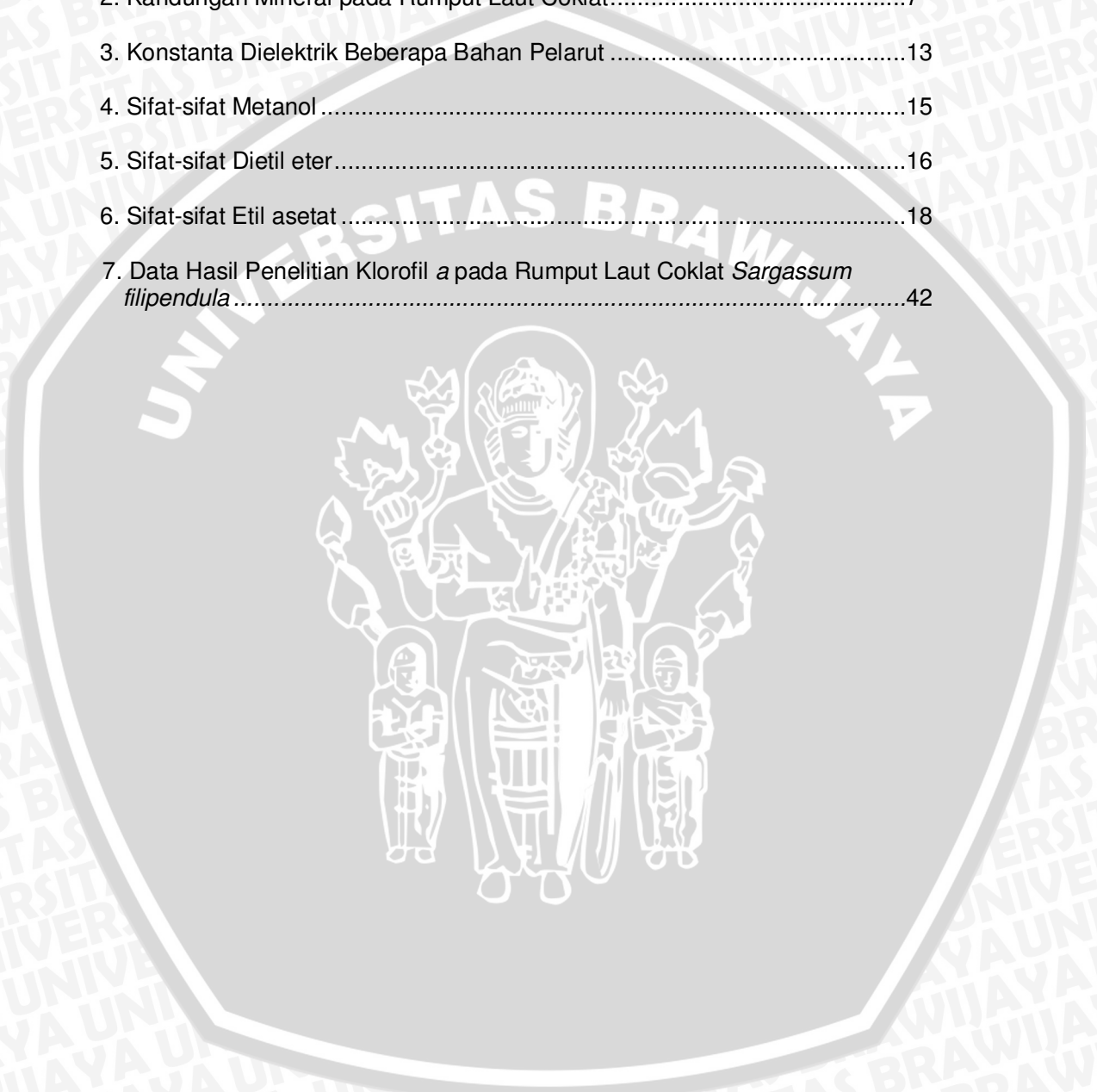


|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.4. Identifikasi Klorofil <i>a</i> .....   | 35        |
| 3.3.4.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....  | 35        |
| 3.3.4.2. Spektrofotometer <i>UV-Vis</i> .....   | 36        |
| 3.3.5. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH ( <i>2,2-difenil-1-2-pikrilhidrazil</i> ).....  | 38        |
| 3.3.6. Uji Total Fenol Klorofil <i>a</i> dengan Metode <i>Folin-ciocalteou</i> .....  | 39        |
| 3.3.7. Pengukuran Rendemen .....  | 41        |
| <b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>   | <b>42</b> |
| 4.1. Hasil Penelitian.....  | 42        |
| 4.2. Pembahasan.....  | 43        |
| 4.2.1. Kromatografi Kolom .....   | 43        |
| 4.2.2. Kromatografi Lapis Tipis.....  | 45        |
| 4.2.3. Hasil Uji Absorbansi Klorofil <i>a</i> dengan Spektrofotometer <i>UV-Vis</i> .....   | 47        |
| 4.2.4. Uji Antioksidan Klorofil <i>a</i> dengan Metode DPPH .....   | 49        |
| 4.2.5. Uji Total Fenol dengan Metode <i>Folin-Ciocalteou</i> .....  | 52        |
| 4.2.6. Analisis Korelasi Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol Klorofil <i>a</i> pada Rumput Laut Coklat <i>Sargassum filipendula</i> ..... | 54        |
| 4.2.7. Rendemen Klorofil <i>a</i> .....   | 55        |
| <b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>  | <b>65</b> |



DAFTAR TABEL

| Tabel   | Halaman |
|---|---------|
| 1. Komposisi Kimia Rumput Laut Coklat.....  | 7       |
| 2. Kandungan Mineral pada Rumput Laut Coklat.....   | 7       |
| 3. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut .....  | 13      |
| 4. Sifat-sifat Metanol.....   | 15      |
| 5. Sifat-sifat Dietil eter.....   | 16      |
| 6. Sifat-sifat Etil asetat.....   | 18      |
| 7. Data Hasil Penelitian Klorofil <i>a</i> pada Rumput Laut Coklat <i>Sargassum filipendula</i> ..... | 42      |

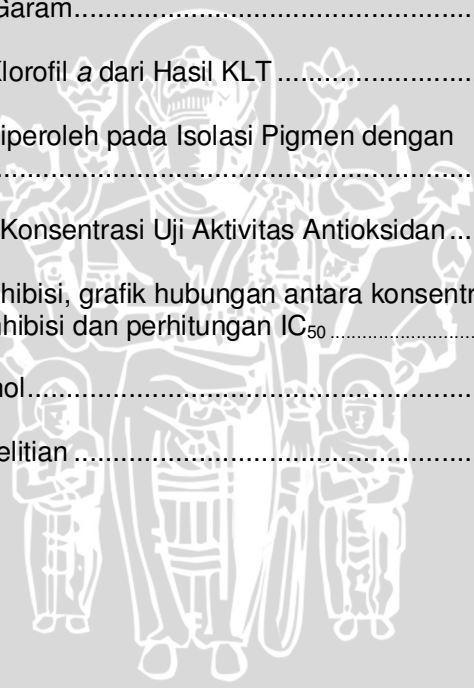


## DAFTAR GAMBAR

| Gambar   | Halaman |
|--|---------|
| 1. <i>Sargassum filipendula</i> .....  | 8       |
| 2. Struktur Kimia Klorofil <i>a</i> dan <i>b</i> .....   | 10      |
| 3. Struktur Hemoglobin dengan Fe pada Atom Pusat, dan Struktur Klorofil dengan Mg .....  | 11      |
| 4. Kromatografi Kolom .....  | 19      |
| 5. Metode Kromatografi Lapis Tipis .....   | 21      |
| 6. Spektrofotometri <i>UV-Vis</i> .....  | 22      |
| 7. Mekanisme Oksidasi pada Minyak atau Lemak .....   | 25      |
| 8. Mekanisme Reaksi Senyawa Antioksidan dengan DPPH .....  | 25      |
| 9. Struktur Fenol (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) .....  | 27      |
| 10. Ekstraksi dan Partisi Klorofil <i>a</i> pada Rumput Laut Coklat <i>Sargassum filipendula</i> .....   | 32      |
| 11. Isolasi Klorofil <i>a</i> pada Rumput Laut Coklat <i>Sargassum filipendula</i> dengan Kromatografi Kolom .....   | 34      |
| 12. Identifikasi Klorofil <i>a</i> pada Rumput Laut Coklat <i>Sargassum filipendula</i> dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....  | 36      |
| 13. Prosedur Analisa menggunakan Spektrofotometer <i>UV-Vis</i> .....  | 37      |
| 14. Uji Aktivitas Antioksidan Klorofil <i>a</i> <i>Sargassum filipendula</i> dengan metode DPPH .....  | 39      |
| 15. Uji Total Fenol Klorofil <i>a</i> dengan Metode <i>Folin-ciocalteou</i> .....  | 41      |
| 16. Struktur <i>silica gel</i> F <sub>254</sub> .....  | 43      |
| 17. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Klorofil <i>a</i> <i>Sargassum filipendula</i> .....  | 46      |
| 18. (a) Pola Spektra Pigmen Klorofil <i>a</i> Hasil Isolasi dalam Pelarut Aseton ....48<br>(b) Pola Spektra Klorofil <i>a</i> dalam Pelarut Aseton (Jeffrey, <i>et al.</i> , 1997)....48 |         |
| 19. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi (ppm) Klorofil <i>a</i> dan % inhibisi .....  | 49      |
| 20. Nilai IC <sub>50</sub> Aktivitas Antioksidan Klorofil <i>a</i> <i>Sargassum filipendula</i> .....  | 50      |
| 21. Total Fenol Klorofil <i>a</i> pada Rumput Laut Coklat <i>Sargassum filipendula</i> ...53   |         |

**DAFTAR LAMPIRAN**

| <b>Lampiran</b>   | <b>Halaman</b> |
|---|----------------|
| 1. Prosedur Penelitian.....   | 65             |
| 2. Data Absorbansi .....  | 66             |
| 3. Kadar Klorofil <i>a</i> .....  | 66             |
| 4. Perhitungan Kadar Klorofil <i>a</i> .....  | 66             |
| 5. Data Rendemen.....   | 68             |
| 6. Perhitungan Kadar Rendemen Klorofil <i>a</i> .....   | 68             |
| 7. Pembuatan Larutan .....  | 68             |
| 8. Pembuatan Saturasi Garam.....  | 70             |
| 9. Perhitungan Nilai Rf Klorofil <i>a</i> dari Hasil KLT .....  | 70             |
| 10. Daftar Warna yang diperoleh pada Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom .....   | 71             |
| 11. Contoh Perhitungan Konsentrasi Uji Aktivitas Antioksidan.....   | 73             |
| 12. Data absorbansi %inhibisi, grafik hubungan antara konsentrasi klorofil <i>a</i> dengan %inhibisi dan perhitungan IC <sub>50</sub> ..... | 74             |
| 13. Penentuan Total Fenol.....  | 76             |
| 14. Gambar Proses Penelitian .....  | 77             |



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Antioksidan merupakan komponen yang dapat melindungi sel dari kerusakan akibat reaktif oksigen spesies seperti oksigen singlet, superoksida, radikal hidroksil, radikal peroksil, dan peroksi nitrit. Antioksidan dapat mencegah dampak negatif yang diakibatkan oleh radikal bebas (Julyasih, *et al.*, 2009). Berdasarkan sumbernya antioksidan terdiri dari antioksidan sintetis dan antioksidan alami. Antioksidan alami berasal dari tanaman seperti akar, daun, bunga, biji, batang dan sebagainya. Senyawa - senyawa yang terkandung dalam antioksidan alami adalah fenol, polifenol, dan yang paling umum adalah flavonoid. Sedangkan antioksidan sintetis misalnya BHA, BHT dan TBHQ (Kumalaningsih, 2006).

Radikal bebas merupakan suatu molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga menyebabkan sifat yang sangat reaktif terhadap molekul lain untuk mencari pasangan elektron agar kondisinya stabil (Gutteridge dan Halliwell, 1996). Radikal bebas merupakan senyawa asing yang masuk ke dalam tubuh dalam jumlah berlebih yang dapat mengganggu sistem imunitas tubuh sehingga memicu efek patologis (Selawa, *et al.*, 2013). Menurut Desmiati, *et al.*, (2008) salah satu pemicu terjadinya kanker adalah radikal bebas yang menimbulkan reaksi berantai dan menyebabkan kerusakan hingga kematian sel. Oleh karena itu pembentukan radikal bebas harus dihambat dengan senyawa - senyawa yang mampu menstabilkan radikal tersebut yaitu dengan antioksidan.

Rumput laut disebut juga dengan *sea weed* merupakan tanaman fotosintetik tingkat rendah yang tidak memiliki perbedaan susunan kerangka seperti akar, batang dan daun (Winarno, 1990). Djapiala, *et al.*, (2014) rumput

laut mengandung senyawa fenol yang berfungsi sebagai antioksidan, ditambahkan oleh Fithriani (2009) rumput laut juga mengandung senyawa - senyawa fitokimia lainnya yang penting untuk kesehatan dan mempertahankan mutu pangan. Rumpaut laut coklat telah banyak dimanfaatkan sebagai sumber bahan pangan dan kesehatan. Firdaus, *et al.*, (2010) telah memanfaatkan *Sargassum echinocarpum* sebagai agen *antihiperlipidemik*. Polifenol dan tanin yang terkandung dalam *Sargassum sp.* tergolong florotanin.

Warna rumput laut coklat dipengaruhi oleh komposisi dan kandungan pigmen yang tersusun didalamnya. Limantara dan Heriyanto (2010), pigmen penyusun pada rumput laut coklat berasal dari golongan klorofil,  $\beta$ -karoten, fukosantin, dan golongan karotenoid polar (santofil). Klorofil *a*, pigmen berwarna hijau kebiruan, merupakan pigmen utama dalam proses fotosintetik dari tumbuhan, termasuk didalamnya rumput laut coklat, sedangkan karotenoid hanya sebagai pigmen pelengkap. Klorofil menarik untuk diteliti karena bermanfaat bagi kesehatan manusia. Mardaningsih, *et al.*, (2012); Limantara (2007), klorofil telah banyak dimanfaatkan sebagai suplemen makanan yang dapat membantu meningkatkan fungsi metabolik dalam tubuh, sistem imunitas, detoksifikasi, meredakan radang (inflamatorik) dan menyeimbangkan sistem hormonal.

Rumput laut merupakan bahan pangan bernilai ekonomis tinggi dalam dunia obat-obatan dengan senyawa metabolit yang dikandungnya. Sejauh ini belum banyak penelitian mengenai kandungan klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* sebagai antioksidan. Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* yang diukur nilai aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolnya. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil), karena merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat, peka, serta hanya memerlukan sedikit contoh. Menurut Hanani, *et al.*, (2005) Metode DPPH

menggunakan 2,2 – difenil – 1 - pikrilhidrazil sebagai sumber radikal bebas. Prinsipnya adalah reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan. Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration*). IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas penangkapan atom hidrogen pada DPPH sebesar 50%. Oleh karena itu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dan analisa total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*. Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas antioksidan dari klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*. Selain itu, hubungan antara kandungan total fenol dan aktivitas antioksidannya juga ditentukan.

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumput laut coklat (*phaeophyta*) mempunyai kelimpahan yang sangat tinggi, namun pigmen yang terkandung didalamnya belum dimanfaatkan secara optimal (Handayani, *et al.*, 2004). *Sargassum filipendula* adalah salah satu spesies dari alga coklat (*phaeophyta*) (Indriani dan Sumarsih, 1992). Klorofil dan karotenoid merupakan pigmen yang melimpah pada alga coklat (Nurdiana, *et al.*, 2008). Limantara dan Puji Rahayu (2008), menyatakan klorofil dapat berfungsi sebagai obat karena dapat memperbaiki kondisi kesehatan.

Antioksidan dapat mencegah terjadinya proses oksidasi akibat sifat reaktif dari radikal bebas yang dapat merugikan bagi tubuh. Senyawa – senyawa antioksidan dapat berasal dari senyawa bioaktif pada berbagai tumbuhan. Rumput laut merupakan salah satu tumbuhan yang banyak mengandung senyawa – senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat antioksidan, salah satunya yaitu kandungan senyawa fenol. Rumput laut coklat *Sargassum filipendula* memiliki pigmen klorofil yang mempunyai manfaat bagi kesehatan

manusia. Penelitian mengenai aktivitas antioksidan dan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat khususnya *Sargassum filipendula* belum banyak dilakukan dan sangat terbatas. Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai aktivitas antioksidan dan analisa total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*. Berdasarkan uraian di atas didapatkan permasalahan:

1. Apakah klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* memiliki aktivitas antioksidan dan mengandung senyawa fenol?
2. Apakah daya aktivitas antioksidan klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* berkorelasi dengan kandungan total fenolnya?

### 1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan dan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*.
2. Untuk mengetahui hubungan antara aktivitas antioksidan dengan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*.

### 1.4. Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah:

1. Memberi informasi kepada masyarakat, lembaga dan institusi lain mengenai adanya aktivitas antioksidan dan kandungan fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*.
2. Secara umum, digunakan untuk menambah nilai guna rumput laut coklat *Sargassum filipendula* bagi masyarakat.
3. Memberikan informasi keilmuan dan pedoman untuk mengadakan penelitian lebih lanjut bagi lembaga akademis mengenai aktivitas antioksidan dan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*.



### 1.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia, Universitas Muhammadiyah, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Maret – Mei 2014.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Rumput Laut

Rumput laut termasuk kedalam tumbuhan berklorofil, merupakan tanaman fotosintetik tingkat rendah yang tidak memiliki perbedaan susunan kerangka seperti akar, batang dan daun sejati yang disebut *thallus* (Saptasari, 2010). Rumput laut keberadaannya sangat melimpah dan tumbuh secara alami di perairan pantai Indonesia khususnya di perairan Madura, namun potensi ini belum dimanfaatkan secara optimal (Limantara dan Heriyanto, 2010). Sebagian besar rumput laut digunakan sebagai makanan dan obat-obatan secara tradisional oleh masyarakat di wilayah pesisir (Palallo, 2013).

Rumput laut dapat dikonsumsi karena kandungan serat dan kandungan iodium yang cukup tinggi, serta kandungan senyawa-senyawa fitokimia lainnya yang penting untuk kesehatan dan mempertahankan mutu pangan (Santoso, 2004). Rumput laut kaya akan senyawa-senyawa organik yang bersifat bioaktif. Rumput laut mengandung senyawa fenol yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan pada rumput laut dapat melawan radikal bebas dalam tubuh (Fithriani, 2009).

#### 2.1.1. Rumput Laut Coklat (*Phaeopyceae*)

Rumput laut coklat diklasifikasikan kedalam divisi *Phaeophyta* dengan ciri khas coklat pada bagian *thallus*. *Thallus* berbentuk filamen bercabang dan berbentuk seperti lembaran daun. Contoh rumput laut coklat adalah *Fucus sp*, *Turbinaria sp*, *Padina*, *Dictyota*, *Laminaria*, dan *Sargassum sp* (Bachtiar, 2007). Rumput laut coklat banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai sumber serat pangan untuk melancarkan proses pencernaan. Disamping itu rumput laut coklat

mengandung senyawa bioaktif dan kandungan pigmen sebagai sumber antioksidan dan antikanker (Mori, *et al.*, 2004).

Rumput laut coklat mengandung pigmen klorofil (klorofil *a* dan klorofil *c*) dan kaya akan pigmen karotenoid (fukosantin,  $\beta$ -karoten) (Agustina, *et al.*, 2007). Ditambahkan oleh Pangestuti, *et al.*, (2007), fukosantin merupakan pigmen dominan yang dimiliki alga coklat yang memberikan warna coklat pada seluruh bagian *thallus*. Pigmen klorofil terdapat dalam kloroplas bersama-sama dengan karotenoid dan santofil (Anis, E. 2008). Karena memiliki klorofil, maka rumput laut dikatakan bersifat autotrop yaitu dapat hidup sendiri tanpa harus tergantung pada makhluk lainnya (Junaedi, 2004).

Dinding sel rumput laut coklat juga tersusun atas lapisan luar dan lapisan dalam, lapisan luar yaitu selulosa dan lapisan dalam yaitu polisakarida (Anonymous, 2014)<sup>a</sup>. Komposisi kimia dan kandungan mineral pada rumput laut coklat dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 sebagai berikut:

**Tabel 1.** Komposisi Kimia Rumput Laut Coklat

| Komposisi Kimia | Jumlah (%) |
|-----------------|------------|
| Karbohidrat     | 19,06      |
| Protein         | 5,53       |
| Lemak           | 0,74       |
| Air             | 11,71      |
| Serat kasar     | 28,39      |

Sumber : Yunizal (1999)

**Tabel 2.** Kandungan Mineral pada Rumput Laut Coklat

| Unsur     | Kadar dalam % Berat Kering |
|-----------|----------------------------|
| Chlor     | 9,8 – 15,00                |
| Kalium    | 6,4 – 7,8                  |
| Natrium   | 2,6 – 3,8                  |
| Magnesium | 1,0 – 1,9                  |
| Belerang  | 0,7 – 2,2                  |
| Silicon   | 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 (1996)

### 2.1.2. *Sargassum filipendula*

*Sargassum sp* merupakan jenis rumput laut yang termasuk dalam kelas *Phaeophyceae*. *Sargassum sp* mengandung pigmen fukosantin yang merupakan golongan karotenoid. Fukosantin merupakan pigmen coklat yang ada pada kloroplas dari rumput laut coklat. Pigmen ini memberi warna coklat dan berfungsi membantu fotosintesis pada perairan yang dalam (Sanjoto, *et al.*, 2014).

*Sargassum sp* memiliki ciri-ciri sebagai berikut: bentuk *thallus* umumnya silindris, percabangan rimbun, daun melebar, lonjong atau menyerupai pedang, mempunyai gelembung udara (*bledder*) yang umumnya soliter, dan warna *thallus* umumnya coklat (Atmadja, 1988). *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 1.

Klasifikasi dari *Sargassum filipendula* adalah sebagai berikut (Anonymous, 2014)<sup>b</sup>:

Kingdom : Chromista  
Phylum : Ochrophyta  
Class : Phaeophyceae  
Order : Fucales  
Family : Sargassaceae  
Genus : *Sargassum*  
Species : *Sargassum filipendula*



Gambar 1. *Sargassum filipendula*

### 2.1.3. Pigmen pada Rumput Laut

Pigmen pada rumput laut dibedakan menjadi tiga yaitu klorofil, karotenoid dan fikobilin. Setiap jenis rumput laut mempunyai kandungan dan komposisi pigmen yang berbeda. Biopigmen rumput laut mempunyai banyak potensi terutama di bidang pangan dan obat-obatan. Pigmen mempunyai berbagai

manfaat untuk kesehatan diantaranya mampu berperan sebagai antioksidan (Merdekawati dan Susanto, 2014). Jenis – jenis pigmen pada rumput laut antara lain:

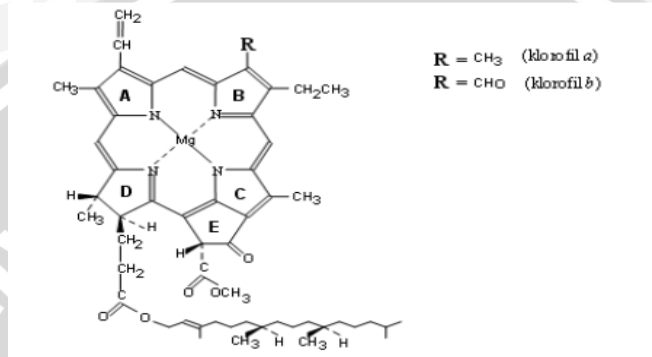
- a. Klorofil merupakan pigmen utama yang mampu menyerap cahaya tampak dan mengubahnya menjadi energi kimia dalam proses fotosintesis.
- b. Karotenoid adalah pigmen berwarna kuning hingga merah yang biasanya terikat dengan klorofil di dalam kloroplas. Produksi terbesar karotenoid berada pada jaringan fotosintesis, tetapi keberadaannya seringkali tertutup oleh klorofil dan hanya dapat terlihat ketika klorofil terdegradasi. Berdasarkan strukturnya karotenoid dibedakan menjadi 2 kelas utama yaitu karoten dan xantofil.
- c. Fikobilin merupakan protein, mempunyai cincin tetrapirrol dan termasuk dalam gugus kromofor. Fikobilin merupakan pigmen yang khas pada rumput laut merah. Pigmen ini dapat larut dalam air tetapi tidak dapat larut dalam lemak. Ada dua jenis fikobilin yaitu fikosianin dan fikoeritrin.

Limantara dan Heriyanto (2010), pigmen penyusun pada rumput laut coklat berasal dari golongan klorofil dan turunannya, golongan karotenoid polar (santofil), serta golongan karotenoid non polar (karoten). Klorofil *a*, pigmen berwarna hijau kebiruan, merupakan pigmen utama dalam proses fotosintetik dari tumbuhan, termasuk didalamnya rumput laut coklat, sedangkan karotenoid hanya sebagai pigmen pelengkap.

#### 2.1.4. Klorofil *a*

Klorofil merupakan molekul yang sangat besar dan terdiri dari empat cincin pirol yang dihubungkan satu dengan yang lainnya oleh gugus metana ( $\text{CH}=\text{}$ ) membentuk sebuah molekul yang pipih. Perbedaan antara klorofil *a* ( $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_6$ ) dan klorofil *b* ( $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{MgN}_4\text{O}_5$ ) terletak pada atom C nomor tiga

metil pada klorofil *a*, aldehid pada klorofil *b*. Sifat kimia dari klorofil dipengaruhi oleh karbon ketujuh yang mengandung residu propionate dan teresterifikasi dengan fitol sehingga klorofil bersifat non polar, tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkohol, eter dan aseton (Hutajulu, *et al.*, 2008). Struktur kimia klorofil *a* dan *b* dapat dilihat pada Gambar 2.



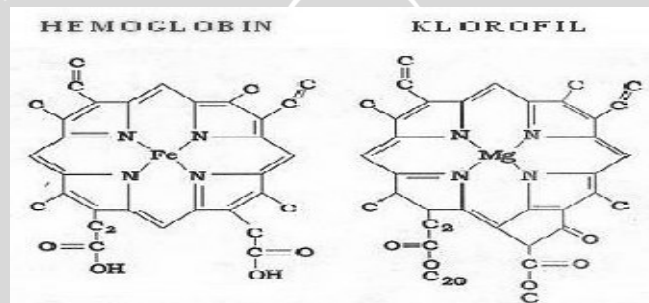
**Gambar 2.** Struktur kimia klorofil *a* dan *b* (Kusmita dan Limantara, 2009)

Klorofil *a* merupakan Mg-tetrapirrol yang tersebar luas di organisme fotosintetik tingkat rendah maupun tingkat tinggi. Pigmen fotosintetik berwarna hijau biru ini memiliki peran yang sangat penting dalam proses fotosintesis, baik sebagai penangkap cahaya, transfer energi maupun dalam konversi energi cahaya. Klorofil *a* memiliki serapan maksimum di daerah 380-430 nm dan 530-665 nm dalam pelarut organik. Serapan klorofil *a* yang luas serta kemampuannya sebagai penyerap cahaya membuat molekul ini cenderung tidak stabil terhadap cahaya atau mudah mengalami fotodegradasi (Christiana, *et al.*, 2008). Klorofil bersifat labil dan mudah mengalami proses degradasi menjadi molekul-molekul turunannya. Proses degradasi klorofil dapat terjadi karena pengaruh cahaya, suhu dan oksigen. Struktur kimianya sama dengan heme, suatu senyawa cincin pada haemoglobin, dimana poros Fe pada heme digantikan oleh Mg (Arrohmah, 2007).

Menurut Mardaningsih, *et al.*, (2012) klorofil telah banyak dimanfaatkan sebagai suplemen makanan yang dapat membantu meningkatkan fungsi

metabolik dalam tubuh. Astawan (2008), klorofil dapat menghambat reaksi pengikatan senyawa karsinogen (penyebab kanker) dengan DNA, dan menangkal reaksi senyawa radikal. Klorofil juga dapat melindungi sistem kekebalan tubuh melalui kemampuannya meredam reaktivitas senyawa radikal.

Menurut Limantara (2007), molekul klorofil memiliki kesamaan struktur dengan hemoglobin, pigmen merah dalam darah manusia. Karena itu klorofil menjadi nutrisi vital bagi tubuh manusia dan merupakan molekul yang dapat diterima oleh tubuh secara alamiah sehingga potensial meningkatkan ketahanan tubuh. Kesamaan struktur klorofil *a* dengan hemoglobin dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Struktur Hemoglobin dengan Fe pada Atom pusat, dan Struktur Klorofil dengan Mg (Ariffaizal, 2008)

## 2.2. Isolasi Pigmen Klorofil *a*

### 2.2.1. Ekstraksi

Prinsip dasar ekstraksi berdasarkan kelarutan. Untuk memisahkan zat terlarut yang diinginkan atau menghilangkan komponen zat terlarut yang tidak diinginkan dari fase padat, maka fase padat dikontakkan dengan fase cair. Pada kontak dua fase tersebut, zat terlarut terdifusi dari fase padat ke fase cair sehingga terjadi pemisahan dari komponen padat (Tamat *et al.*, 2007). Ekstraksi adalah memisahkan komponen yang ada dalam bahan yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut. Pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi harus memperhatikan senyawa yang akan diisolasi. Sifat yang penting adalah polaritas

dan gugus polar dari suatu senyawa. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut seperti metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), etil asetat ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), heksana ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) dan air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) mampu memisahkan senyawa – senyawa yang penting dalam suatu bahan. Metode ekstraksi yang digunakan diduga mempengaruhi sifat fisikokimia dari ekstrak tersebut. Ekstraksi dapat dilakukan dengan satu tahap ataupun bertingkat. Pada ekstraksi satu tahap digunakan satu pelarut, sedang ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut (Septiana dan Asnani, 2012).

Salah satu ekstraksi adalah maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan 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).

### **2.2.2. Fraksinasi (Partisi)**

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah fraksi, dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien tertentu (Anonymous, 2014)<sup>c</sup>. Istilah partisi atau fraksinasi (pemisahan) atau distribusi (penyebaran) sering dipakai untuk menggambarkan bagaimana suatu senyawa memisah diantara dua medium yang tak saling melarutkan (Sudarmadji, 1996).

Metode partisi pelarut biasanya menggunakan dua pelarut yang tidak campur didalam corong pisah. Pada metode ini komponen terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi. Metode partisi juga disebut penyarian cair-cair, yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010). Ditambahkan oleh Widjayanti



(2010), pemisahan yang diinginkan dapat terjadi karena adanya perbedaan dalam sifat yaitu dapat larutnya antara bagian-bagian campuran zat pada bahan pelarut dan tingkat kepolarannya.

### 2.2.3. Pelarut

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair atau gas, yang menghasilkan sebuah larutan. Sedangkan larutan adalah campuran homogen antara dua komponen / zat atau lebih. Dua komponen tersebut adalah pelarut (*solvent*) dan zat terlarut (*solute*). Sifat penting pelarut adalah kecenderungan membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen adalah harga tetapan dielektriknya dalam hubungan dengan momen dwi kutubnya. Terbentuknya sejumlah besar ikatan hidrogen menyebabkan tetapan dielektrika yang sangat tinggi. Beberapa nilai konstanta atau tetapan dielektrik bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut

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

Keterangan : Misibel = dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi

Sumber : Sudarmadji, *et al.*, (1996)

Dalam **Joshua (2010)**, pelarut harus memenuhi beberapa fungsi dalam reaksi kimia, dimana pelarut melarutkan reaktan dan reagen agar keduanya bercampur, sehingga hal ini akan memudahkan penggabungan antara reaktan dan reagen yang seharusnya terjadi agar dapat merubah reaktan menjadi produk. Pelarut juga bertindak sebagai kontrol suhu, Salah satunya untuk meningkatkan energi dari tubrukan partikel sehingga partikel-partikel tersebut

dapat bereaksi lebih cepat, atau untuk menyerap panas yang dihasilkan selama reaksi eksotermik. Sehingga pada umumnya pelarut yang baik mempunyai kriteria sebagai berikut :

1. Pelarut harus tidak reaktif (inert) terhadap kondisi reaksi.
2. Pelarut harus dapat melarutkan reaktan dan reagen.
3. Pelarut harus memiliki titik didih yang tepat.
4. Pelarut harus mudah dihilangkan pada saat akhir dari reaksi.

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 (Vogel, 1987). Penggunaan pelarut harus memiliki kepolaran sesuai dengan kepolaran senyawa yang akan diekstrak (Dewi, *et al.*, 2007).

#### 2.2.3.1. Metanol

Metanol dahulu dibuat dari kayu melalui penyulingan dan kadang dinamakan alkohol kayu. Kata metil berasal dari bahasa Latin (*methy* = anggur, *yl* = kayu). Tetapi sekarang metanol dibuat dari karbon monoksida dan oksigen. Metanol memiliki titik didih 65°C dan larut sempurna dalam air pada suhu 20°C (Hart, 1983).

Metanol dikenal dengan nama metil alkohol atau alkohol kayu, merupakan senyawa kimia dengan rumus kimia CH<sub>3</sub>OH. Metanol adalah alkohol yang paling sederhana, ringan, volatil, tidak berwarna, mudah terbakar, cairan yang beracun dengan bau yang sangat tajam. Metanol banyak digunakan untuk anti pembekuan, pelarut, dan bahan bakar (Wikipedia, 2010)<sup>a</sup>. Sifat-sifat metanol dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Sifat-sifat Metanol

| No. | Karakteristik        | Metanol  |
|-----|----------------------|--|
| 1.  | Nama lain            | Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol  |
| 2.  | Rumus molekul        | CH <sub>3</sub> OH<br>$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$ |
| 3.  | Sifat                | mudah terbakar, tidak berwarna   |
| 4.  | Titik leleh          | -97 °C   |
| 5.  | Titik didih          | 64.7 °C  |
| 6.  | Massa molar          | 32.04 g/mol  |
| 7.  | Densitas             | 0,7918 g/cm <sup>3</sup> , cair  |
| 8.  | Titik nyala          | 11 °C  |
| 9.  | Konstanta dielektrik | 33   |

Sumber : Wikipedia (2010)<sup>a</sup>

### 2.2.3.2. Aseton

Aseton, juga dikenal sebagai propanon, dimetil keton, 2-propanon, propan-2-on, dimetilformaldehida, dan β-ketopropana, adalah senyawa berbentuk cairan yang tidak berwarna dan mudah terbakar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010). Karakteristik aseton :

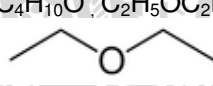
|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| Rumus molekul    | : CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> |
| Berat molekul    | : 50,1 kg/mol                       |
| Melting point    | : - 94,6 °C                         |
| Spesifik gravity | : 0,7863 ( 25 °C)                   |

Sedjati, *et al.*, (2012) ekstraksi dengan aseton murni akan mengekstrak pigmen yang bersifat non polar, yaitu : klorofil dan karotenoid, termasuk juga senyawa lipid. Pengukuran serapan atau absorbansi pada kisaran panjang gelombang tertentu pada masing-masing ekstrak menghasilkan spektra yang khas dan proses identifikasi lebih detil terhadap pigmen yang terkandung dalam bahan.

### 2.2.3.3. Dietil Eter

Dietil eter, yang juga dikenal sebagai eter dan etoksi etana, adalah cairan mudah terbakar yang jernih, tak berwarna, dan bertitik didih rendah serta berbau khas. Anggota paling umum dari kelompok campuran kimiawi yang secara umum dikenal sebagai eter ini merupakan sebuah isomernya butanol (Wikipedia, 2010)<sup>b</sup>. Dietil eter digunakan sebagai pelarut karena pelarut ini memiliki kelarutan yang tinggi terhadap minyak, lemak, resin selain itu dietil eter mudah menguap pada kondisi atmosferik yakni suhu 38<sup>o</sup>C (Savitri dan Veronica, 2007). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Sifat-sifat Dietil Eter

| No. | Karakteristik        | Dietil Eter  |
|-----|----------------------|--|
| 1.  | Nama lain            | Eter dan etoksi etana,   |
| 2.  | Rumus molekul        | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub><br> |
| 3.  | Sifat                | Mudah menguap, tidak berwarna  |
| 4.  | Titik leleh          | -116.3 °C (156.85 K)   |
| 5.  | Titik didih          | 34.6 °C (307.75 K)   |
| 6.  | Titik nyala          | -45 °C   |
| 7.  | Massa molar          | 74.12 g/mol  |
| 8.  | Densitas             | 6.9 g/100 ml (20 °C)   |
| 9.  | Viskositas           | 0.224 pada 25 °C   |
| 10. | Konstanta dielektrik | 4.3  |

Sumber : Wikipedia (2010)<sup>b</sup>

### 2.2.3.4. Heksan


Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (isomer utama *n*-heksana memiliki rumus CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>. Awalan *heks-* merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran *-ana* berasal dari *alkana*, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. *N* Hexana merupakan jenis pelarut non polar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010). Karakteristik *n* – heksana :

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Nama lain                      | : caproyl hydride, hexyl hydride          |
| Rumus molekul                  | : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ |
| Berat molekul                  | : 86,17 kg/mol                            |
| Warna                          | : berwarna                                |
| Melting point                  | : - 94 °C                                 |
| Boiling point                  | : 69 ( P = 1 atm)                         |
| Spesific gravity               | : 0,659                                   |
| Kelarutan dalam 100 bagian air | : 0,014 ( 15°C )                          |

#### 2.2.3.5. Etil Asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ . Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tak berwarna, memiliki aroma khas (Wikipedia, 2010)<sup>c</sup>. Penamaan ester hampir menyerupai dengan penamaan basa, walaupun tidak benar-benar mempunyai kation dan anion, namun memiliki kemiripan dalam sifat lebih elektropositif dan keelektronegatifan. Suatu ester dapat dibuat sebagai produk dari suatu reaksi pemadatan pada suatu asam (pada umumnya suatu asam organik) dan suatu alkohol (atau campuran zat asam karbol), walaupun ada cara-cara lain untuk membentuk ester. Pemadatan adalah suatu jenis reaksi kimia di mana dua molekul bekerja sama dan menghapuskan suatu molekul yang kecil, dalam hal ini dua gugus OH yang merupakan hasil eliminasi suatu molekul air (Clark, 2002). Sifat – sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Sifat-sifat Etil asetat

| No. | Karakteristik        | Etil asetat   |
|-----|----------------------|---|
| 1.  | Nama lain            | Ester asetat, ester etanol, etil ester  |
| 2.  | Rumus molekul        | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub><br> |
| 3.  | Sifat                | Cairan tidak berwarna   |
| 4.  | Titik lebur          | -83.6 °C (189.55 K)   |
| 5.  | Titik didih          | 77.1 °C (350.25 K)  |
| 6.  | Massa molar          | 88.12 g/mol   |
| 7.  | Densitas             | 0.897 g/cm <sup>3</sup> pada 30C  |
| 8.  | Konstanta dielektrik | 6.0   |

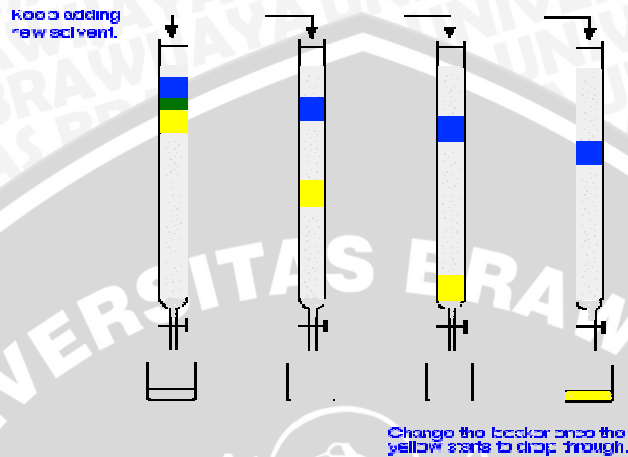
Sumber; (Wikipedia, 2010)<sup>6</sup>

#### 2.2.4. Kromatografi Kolom

Kromatografi merupakan cara pemisahan yang mendasarkan partisi cuplikan antara fasa bergerak (*mobile*) dan fasa diam (*stationary*). Fasa bergerak dapat berupa gas atau cairan dan fasa diam dapat berupa cairan atau padatan. Cara-cara kromatografi dapat digolongkan sesuai dengan sifat-sifat dari fasa diam. Jika fasa diam berupa zat padat maka cara tersebut dikenal sebagai kromatografi serapan, jika zat cair dikenal sebagai kromatografi partisi. Semua pemisahan dengan kromatografi tergantung pada kenyataan bahwa senyawa-senyawa yang dipisahkan terdistribusi sendiri di antara fasa-fasa bergerak dan diam dalam perbandingan yang sangat berbeda-beda dari suatu senyawa terhadap senyawa lain (Sastrohamidjojo, 1985).

Untuk memisahkan suatu campuran, kolom dapat digunakan dengan mengisi penyerap zat padat seperti alumina fasa diam dan dialiri dengan pelarut seperti benzene – fasa gerak. Sejumlah kecil cuplikan dari campuran dimasukkan melalui sebelah atas dari kolom yang kemudian membentuk jalur-jalur serapan senyawa. Kecepatan bergerak suatu komponen tergantung pada berapa besarnya ia terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi

suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat (Sastrohamidjojo, 1985). Kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Kromatografi Kolom (Chemistry, 2009)

Menurut Ardianingsih (2009), prinsip pemisahan kromatografi yaitu adanya distribusi komponen-komponen dalam fase diam dan fase gerak berdasarkan perbedaan sifat fisik komponen yang akan dipisahkan. Persyaratan utama kromatografi adalah:

- Ada fase diam dan fase gerak. Fase diam tidak boleh bereaksi dengan fase gerak.
- Komponen sampel (contoh) harus larut dalam fase gerak dan berinteraksi dengan fase tetap (diam).
- Fase gerak harus bisa mengalir melewati fase diam, sedangkan fase diam harus terikat kuat di posisinya.

Dalam kromatografi partisi, ekstraksi terjadi berulang dalam satu kali proses. Contoh khas kromatografi partisi adalah kromatografi kolom yang digunakan luas karena sangat efisien untuk pemisahan senyawa organik.

### 2.3. Analisa Kualitatif Klorofil a

#### 2.3.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi awal untuk mengetahui komponen pigmen adalah dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu contoh kromatografi serapan. Fase diam berbentuk lapis tipis yang melekat pada gelas kaca atau plastik, alumunium sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut dengan perbandingan tertentu (Sastrohamidjojo, 1985). Selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) juga dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika dari hasil eluen (dua arah) dan telah divariasasi jenis eluen diperoleh satu noda maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni (Warsito, 2007).

Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *Retardation factor* (Rf) (Jeffrey, *et al.*, 1997). Pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna. Nilai Rf untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus:

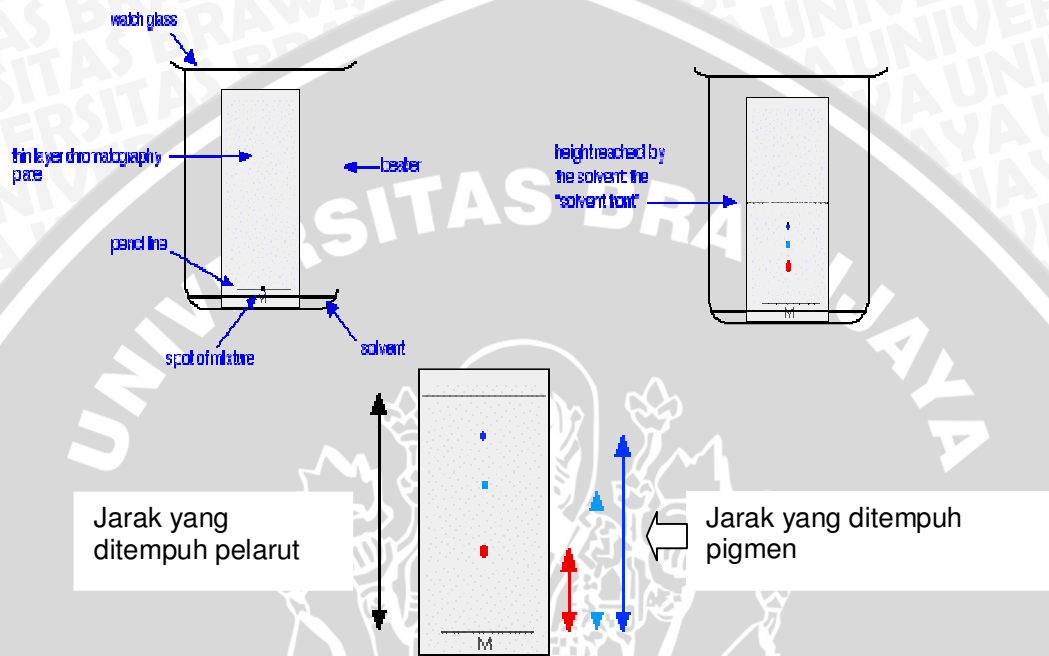
$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Identifikasi secara visual dapat dilakukan dengan melihat warna total pada pelat Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ketebalan warna total menunjukkan kuantitas pigmen sedangkan banyak noda menunjukkan jumlah pigmen minimal yang terdapat dalam ekstrak. Proses identifikasi pigmen dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada Gambar 5.

Clark (2002), menyatakan bahwa rangkaian alat pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terdiri dari pelat KLT yang ditotol ekstrak pada garis awal pelat, lalu



pelat dimasukkan dalam *beaker glass* berisi sedikit pelarut kemudian ditutup dengan cawan petri. Pelarut akan merambat melalui pelat dan terbentuk pemisahan warna pada totol tersebut. Setelah pelarut mencapai garis akhir pelat maka jarak total dapat nilai  $R_{fny}$ .



**Gambar 5.** Metode Kromatografi Lapis Tipis (Clark, 2002)

### 2.3.2. Spektrofotometer UV-Vis

Prinsip dari Spektrofotometer UV-Vis adalah menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer UV-Visible adalah alat yang umum digunakan di laboratorium kimia. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia semi kualitatif (Huda, 2001).

Riyadi (2009), spektrofotometri menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Untuk sistem spektrofotometri, UV-Vis paling banyak tersedia dan paling populer digunakan.

Kemudahan metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sample berwarna juga untuk sample tak berwarna. Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer sangat berhubungan dengan pengukuran jauhnya pengabsorbansian energi cahaya oleh suatu sistem kimia sebagai fungsi panjang gelombang dengan absorban maksimum dari suatu unsur atau senyawa. Spektrum absorban selain bergantung pada sifat dasar kimia, juga bergantung pada faktor-faktor lain. Perubahan pelarut sering menghasilkan pergeseran dari pita absorbansi. Larutan perbandingan dalam spektrofotometri pada umumnya adalah pelarut murni atau suatu larutan blanko yang mengandung sedikit zat yang akan ditetapkan atau tidak sama sekali (Day dan Underwood, 2008).

Pergeseran panjang gelombang ke arah lebih pendek atau ke daerah merah (hipsokromik) maupun ke arah yang lebih panjang / ke daerah merah (batokromik) menunjukkan terjadinya degradasi (Limantara, 2007). Ditambahkan Nurcahyanti dan Limantara (2007), penurunan absorbansi (pergeseran hypokromik) menunjukkan terjadinya pembentukan produk degradasi yang lebih kecil dari molekul awal sedangkan (pergeseran hyperkromik) adalah kenaikan absorbansi. Kenaikan absorbansi dapat disebabkan karena laju penguapan pelarut pada larutan fukosantin lebih cepat dibandingkan dengan laju degradasinya.

#### 2.4. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang kehilangan pasangan elektronnya di permukaan kulit luarnya. Ada 2 (dua) kelompok radikal bebas yaitu kelompok non logam dan kelompok logam. Dari kelompok logam yang paling berbahaya adalah radikal bebas Hg (merkuri). Radikal bebas dapat masuk dan terbentuk ke dalam tubuh melalui pernafasan, kondisi lingkungan yang tidak sehat dan makanan berlemak. Radikal bebas yang masuk dalam tubuh kita mulai merusak sel, lalu protein, enzim dan kemudian inti sel dimana DNA dibentuk yang menyebabkan kerusakan-kerusakan pada sel-sel yang berakibat timbulnya penyakit jantung koroner, kanker, katarak dan penyakit degeneratif (Kumalaningsih, 2006). 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).

Setiap molekul yang berkontak langsung dengan radikal bebas mengalami penarikan elektron dan membentuk radikal bebas yang baru dalam reaksi berantai oksidatif sitotoksik. Oksigen reaktif yang sangat berpotensi dan mungkin menjadi inisiator pembentuk radikal organik adalah radikal hidroksil (Marks, *et al.*, 2000).

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).

## 2.5. Aktivitas Antioksidan

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 (Tamat, *et al.*, 2007). Terdapat tiga macam antioksidan menurut Kumalaningsih (2006) yaitu:

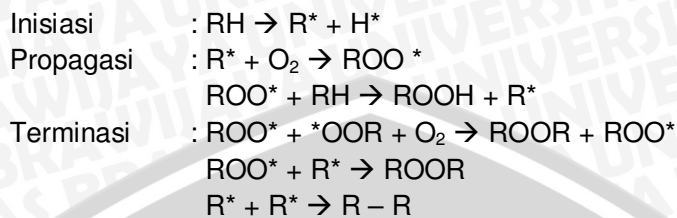
- 1). Antioksidan yang dibuat oleh tubuh kita sendiri yang berupa enzim antara lain superoksida dismutase, glutathione peroxidase, perhidasi dan katalase.
- 2). Antioksidan alami yang dapat diperoleh dari tanaman atau hewan yaitu tokoferol, vitamin C, betakaroten, flavonoid dan senyawa fenolik.
- 3). Antioksidan sintetik yang dibuat dari bahan-bahan kimia yaitu BHA, BHT, TBHQ dan PG yang ditambahkan dalam makanan untuk mencegah kerusakan lemak.

Menurut Ketaren (1986), mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi, dapat disebabkan oleh 4 macam mekanisme reaksi, yaitu :

- 1). Pelepasan hidrogen dari antioksidan,
- 2). Pelepasan elektron dari antioksidan,
- 3). Addisi lemak kedalam cincin aromatik dari antioksidan, dan
- 4). Pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan.

Barus (2009), antioksidan dalam bahan makanan berlemak berperan sebagai inhibitor atau pemecah peroksida. Mekanisme oksidasi pada lemak atau minyak pada prinsipnya merupakan proses pemecahan yang terjadi di sekitar ikatan rangkap dalam molekul gliserida. Proses oksidasi ini terjadi dalam satu

seri tahap reaksi yaitu tahap inisiasi, diikuti oleh tahap propagasi dan tahap terminasi pada Gambar 7.

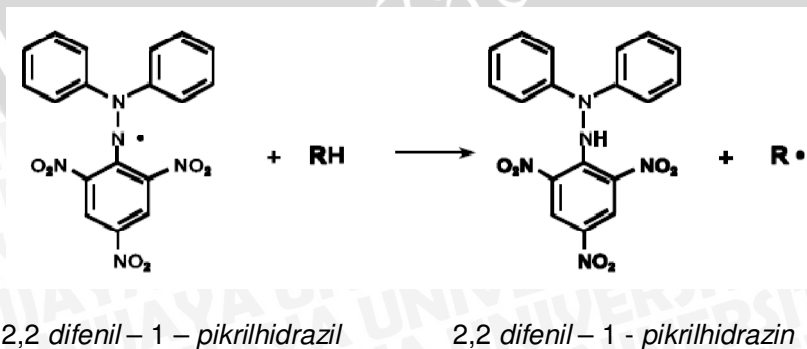


**Gambar 7.** Mekanisme Oksidasi pada Minyak atau Lemak  
 Sumber: Barus (2009)

### 2.6. Uji Aktivitas Antioksidan

Keberadaan senyawa antioksidan dalam suatu bahan dapat diketahui melalui uji aktivitas antioksidan. Terdapat berbagai metode pengukuran aktivitas antioksidan. Pada prinsipnya metode tersebut digunakan untuk mengevaluasi adanya aktivitas penghambatan proses oksidasi oleh senyawa antioksidan yang terdapat dalam bahan pangan atau contoh ekstrak bahan alam (Setyaningsih, 2003).

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode, salah satunya adalah metode DPPH. Metode DPPH menggunakan 2,2 difenil – 1 - pikrilhidrazil sebagai sumber radikal bebas. Prinsipnya adalah reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan dapat dilihat pada Gambar 5 dengan reaksi sebagai berikut:



**Gambar 9.** Mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH  
 (Widyastuti, 2010)

Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal yang stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Kuncahyo dan Sunardi, 2007). Berdasarkan Apriandi (2011), larutan DPPH yang berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan senyawa antioksidan, sehingga DPPH akan berubah menjadi *diphenilpicrylhydrazine* yang bersifat non-radikal yang tidak berbahaya. Meningkatnya jumlah *diphenilpicrylhydrazine* akan ditandai dengan berubahnya warna pada larutan menjadi warna kuning pucat.

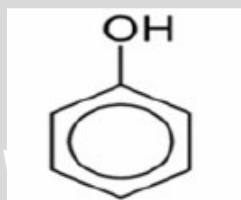
Antioksidan dalam tubuh bekerja mengikat radikal-radikal bebas yang akan merusak sel-sel tubuh sehingga mendorong terjadinya pertumbuhan sel-sel tidak normal (kanker). Penetapan aktivitas antioksidan diperoleh dari perhitungan *Inhibition Concentration* ( $IC_{50}$ ) pada masing-masing sampel uji.  $IC_{50}$  adalah konsentrasi suatu zat antioksidan yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Zat antioksidan yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi akan mempunyai nilai  $IC_{50}$  yang rendah (Kuntorini, *et al.*, 2011).

## 2.7. Fenol

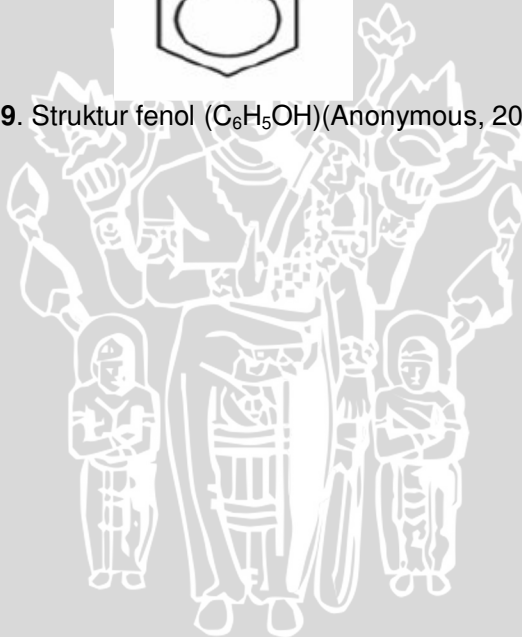
Antioksidan yang termasuk dalam golongan fenol biasanya mempunyai intensitas warna yang rendah atau kadang-kadang tidak berwarna dan banyak digunakan karena tidak beracun. Antioksidan golongan fenol meliputi sebagian besar antioksidan yang dihasilkan oleh alam dan sejumlah kecil antioksidan sintetis, serta banyak digunakan dalam lemak atau bahan pangan berlemak. (Ketaren, 1986). Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap

aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenolnya maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Hardiana, et al., 2012).

Fenol atau asam karbolat merupakan senyawa dengan gugus hidroksil (OH) yang terikat pada cincin aromatik. Komponen fenolik dapat menghambat oksidasi lipid dengan menyumbangkan atom hidrogen kepada radikal bebas. Pada umumnya senyawa fenolik lebih mudah diekstrak oleh pelarut organik yang bersifat semi polar (Septiana dan Asnani, 2012). Struktur fenol dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Struktur fenol ( $C_6H_5OH$ )(Anonymous, 2014)<sup>d</sup>



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Materi Penelitian

##### 3.1.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama, bahan kimia dan bahan pembantu lainnya. Bahan utama yang digunakan adalah rumput laut coklat *Sargassum filipendula* yang didapatkan dari desa Pedike, pulau Talango, Sumenep, Madura. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), dietil eter ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), heksan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), etil asetat ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ),  $\text{CaCO}_3$ , *silica gel* F<sub>254</sub>, akuades, pereaksi *Folin Ciocalteu*,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%, larutan asam galat, dan pereaksi DPPH. Selain itu digunakan bahan pembantu lainnya yaitu air, garam grosok, aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) teknis, kain saring, gas nitrogen, pasir laut (*seasand*), *cling wrap*, kapas, aluminium foil, tisu dan kertas label.

##### 3.1.2. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi, isolasi pigmen klorofil, uji aktivitas antioksidan dan uji total fenol. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, nampan, *rotary vacuum evaporator*, gunting, *beaker glass* (ukuran 1000ml, 500ml, dan 50 ml), *erlenmeyer* 1000ml, gelas ukur 100ml, corong, spatula, botol sampel, pipet volume 1ml dan 10ml, pipet tetes, bola hisap, mortar, *hot plate*, *magnetic stirrer* dan corong pisah. Peralatan yang digunakan untuk isolasi pigmen klorofil adalah statif, kolom kromatografi, plat KLT, *microsyringe*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan *beaker glass* 100ml dan 10ml. Peralatan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan dan uji total fenol antara lain botol vial, spektrofotometer *UV-Vis* 1700 merk Shimadzu, pipet volume 1ml dan 10 ml dan bola hisap.



### 3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode yang bersifat eksploratif (non hipotesis). Metode eksploratif dilakukan untuk mencapai tujuan utama yakni mengetahui aktivitas antioksidan dan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula*. Metode eksploratif merupakan penelitian yang dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali.

Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam (Singarimbun dan Effendi, 1989).

Amirin (2009) menyatakan bahwa penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian. Metode eksploratif berupaya menemukan informasi umum mengenai sesuatu topik atau masalah yang belum dipahami sepenuhnya oleh seseorang peneliti. Jadi, penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan penelitian yang digunakan untuk meneliti sesuatu (yang menarik perhatian) yang belum diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik.

### 3.3. Prosedur Penelitian

#### 3.3.1. Persiapan Sampel

Sampel rumput laut coklat *Sargassum filipendula* diambil dari desa Padike, pulau Talango, Sumenep, Madura, kemudian sampel dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Kemudian sampel segar dicuci bersih dengan air tawar untuk

menghilangkan kotoran yang menempel pada rumput laut juga menghilangkan sebagian garam. Sampel kemudian ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.

### 3.3.2. Ekstraksi dan Partisi Klorofil a

Prinsip dasar ekstraksi berdasarkan kelarutan (Tamat *et al.*, 2007). Ekstraksi adalah memisahkan komponen yang ada dalam bahan yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut. Sifat yang penting adalah polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa (Septiana dan Asnani, 2012).

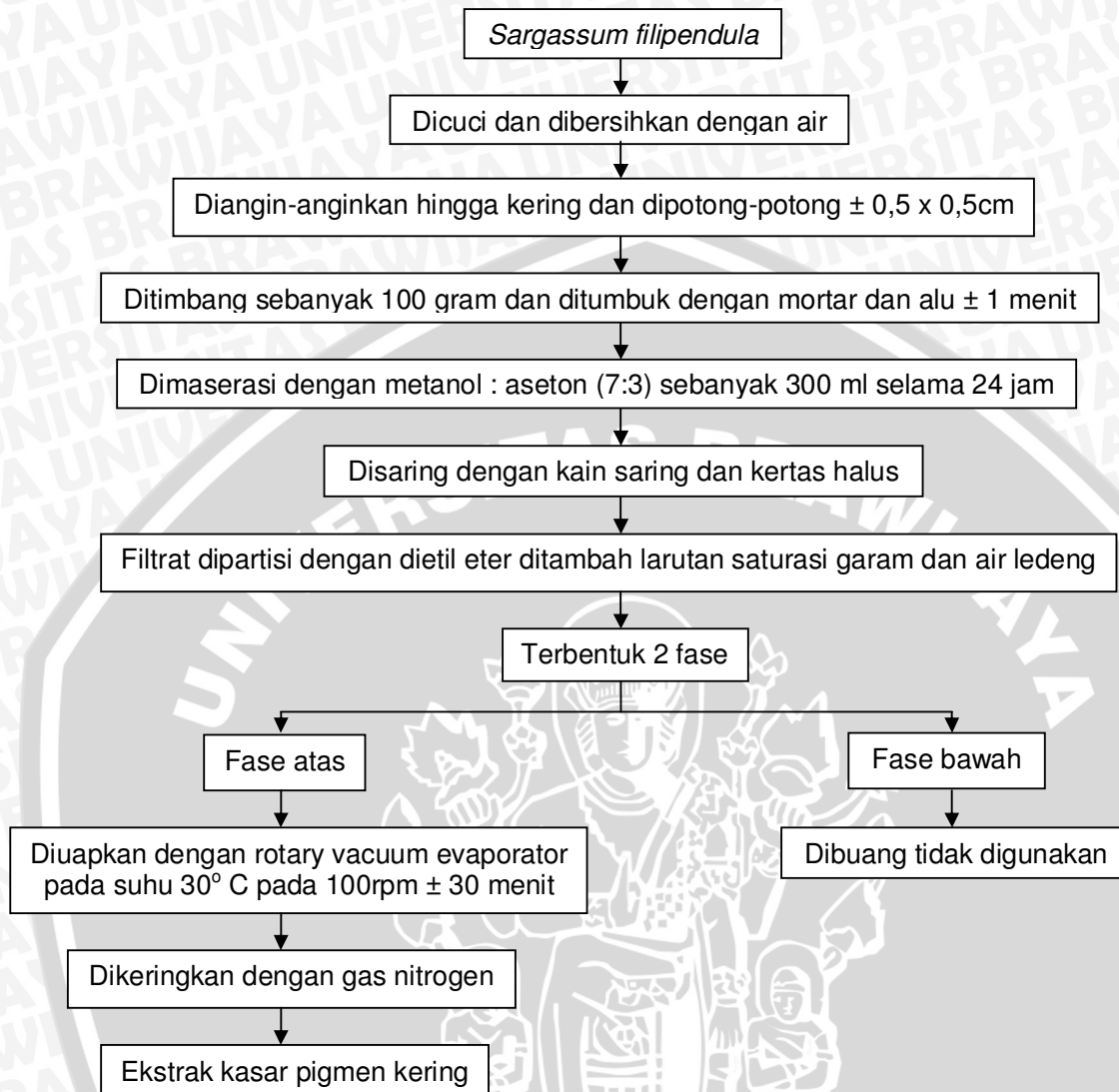
Ekstraksi rumput laut coklat pada penelitian ini menghasilkan *crude* klorofil. Ekstraksi rumput coklat dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti, *et al.*, (2007) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009). Rumput laut coklat *Sargassum filipendula* segar dicuci dengan air sampai bersih dari kotoran-kotoran yang menempel. Kemudian dipotong kecil-kecil ukuran 0,5 cm x 0,5 cm pada seluruh bagian baik *stipe*, *blade* maupun *holdfast* untuk memperluas permukaan. *Sargassum filipendula* segar ditimbang sebanyak 200 gram dengan timbangan digital. Kemudian ditumbuk perlahan dengan ditambahkan bubuk  $\text{CaCO}_3$  sebagai agen penetral kurang lebih sebanyak 0,5 gram.

Kemudian dilakukan penarikan senyawa-senyawa bioaktif yaitu dengan maserasi. Maserasi merupakan proses dimana rumput laut yang sudah halus direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat mudah larut akan terlarut (Septiana dan Asnani, 2012). *Sargassum filipendula* yang telah sedikit halus dimaserasi dengan menambahkan pelarut metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) dan aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) perbandingan 7:3 sebanyak 300 ml selama kurang lebih 24 jam pada suhu kamar. Tujuan dari penggunaan pelarut metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) untuk melarutkan semua senyawa organik yang terkandung dalam bahan. Sedangkan penggunaan pelarut aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) untuk mengangkat pigmen yang bersifat semi polar.

Setelah dilakukan maserasi, selanjutnya sampel disaring menggunakan kain saring dan kertas saring halus untuk memperoleh filtrat. Penyaringan ini bertujuan untuk mengambil senyawa dalam bahan yang mengandung pigmen dan sisa-sisa penyaringan (residu) dibuang. Kemudian filtrat yang diperoleh dipartisi untuk memperoleh fraksi-fraksi yang diinginkan. Filtrat dipartisi dengan corong pisah menggunakan larutan dietil eter ( $C_4H_{10}O$ ), saturasi garam dan air. Penggunaan pelarut dietil eter ( $C_4H_{10}O$ ) bertujuan untuk mengikat seluruh senyawa yang bersifat non polar sehingga senyawa tersebut berada fase atas. Sedangkan menggunakan saturasi garam dan air bertujuan untuk mengikat senyawa polar serta agar pelarut lebih tertarik mengikat larutan saturasi garam dan air yang memiliki keelektronegatifan dan keelektropositifan yang lebih tinggi dari senyawa target sehingga pelarut metanol ( $CH_3OH$ ) dan aseton ( $CH_3COCH_3$ ) terikat pada larutan saturasi garam dan air berada di bawah.

Menurut Shriner, *et al.*, (1980), pelarut polar akan melarutkan zat terlarut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat terlarut yang non polar juga atau disebut "*like dissolves like*". Fase yang digunakan dalam partisi adalah fase atas karena pigmen bersifat non polar, dan hasil fase bawah tidak digunakan karena merupakan campuran dari metanol ( $CH_3OH$ ), aseton ( $CH_3COCH_3$ ) dan air.

Hasil dari fase atas kemudian di *rotary vacuum evaporator* pada suhu  $30^{\circ}C$  kecepatan 100 rpm selama 30 menit. Hal ini bertujuan untuk menguapkan pelarut sehingga diperoleh ekstrak kasar pigmen klorofil. Ekstrak kemudian dipindahkan kedalam botol sampel dan dikeringkan dengan gas nitrogen supaya pigmen tidak rusak dan ditutup dengan aluminium foil dan disimpan di *freezer*. Ekstraksi dan partisi *Sargassum filipendula* untuk isolasi pigmen dapat dilihat pada Gambar 10.



**Gambar 10. Ekstraksi dan Partisi Klorofil a pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula***

### 3.3.3. Isolasi Klorofil a dengan Kromatografi Kolom

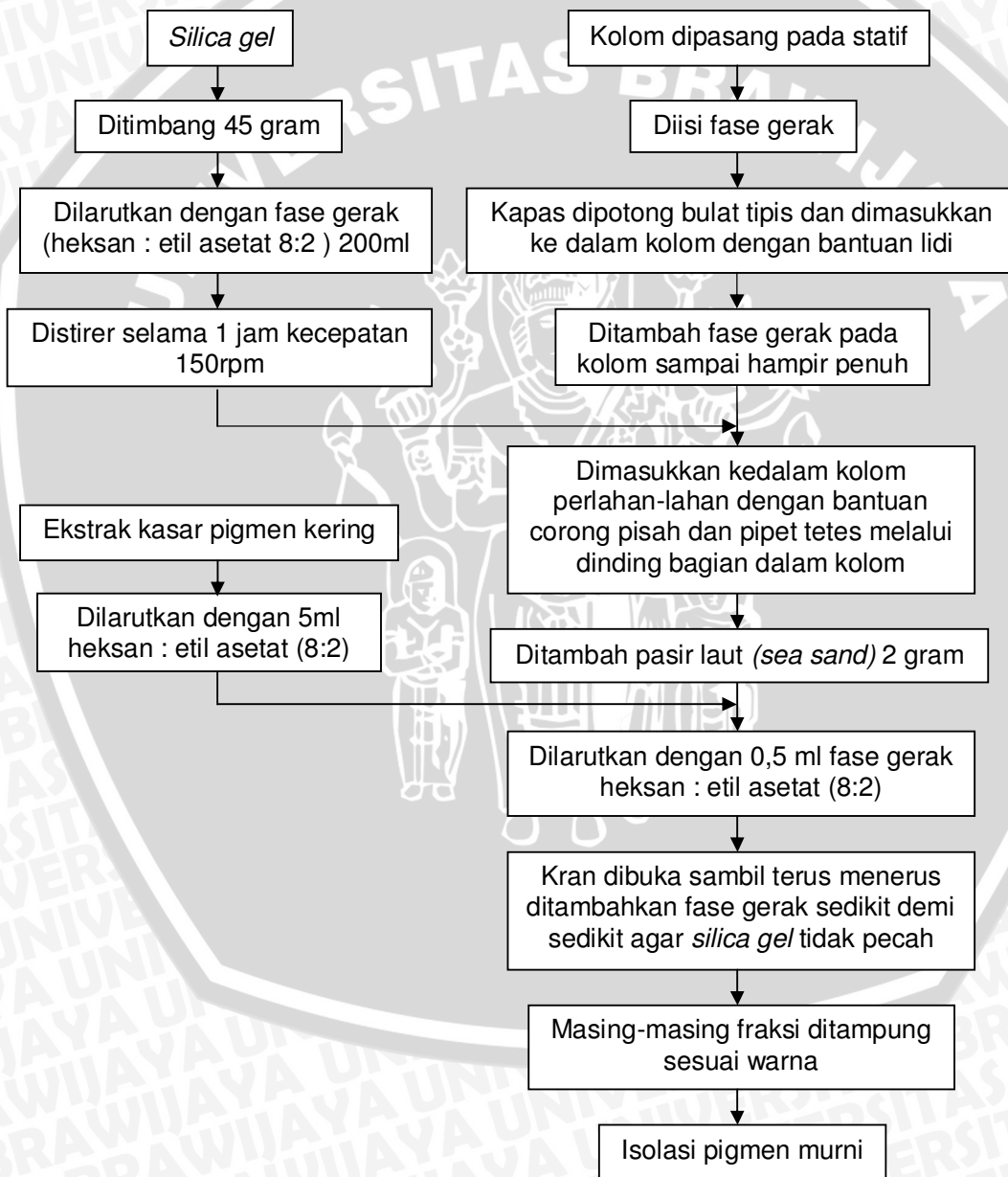
Kromatografi merupakan cara pemisahan yang berdasarkan partisi cuplikan antara fasa bergerak (*mobile*) dan fasa diam (*stationary*). Kecepatan bergerak suatu komponen tergantung pada berapa besarnya ia terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat (Sastrohamidjojo, 1985).

Isolasi klorofil dilakukan dengan kromatografi kolom, dimana menggunakan fase diam *silica gel* dan fase gerak menggunakan heksan ( $C_6H_{14}$ ) : etil asetat ( $C_4H_8O_2$ ). Untuk preparasi fase diam *silica gel* yaitu dengan menggunakan *beaker glass* dimana sebanyak kurang lebih 45 gram *silica gel* dilarutkan dalam heksan : etil asetat (8:2 v/v) 200 ml dan distirer kurang lebih selama 1 jam kecepatan 150 rpm. Hal ini bertujuan untuk ekuilibrisasi antara fase gerak dan fase diam yang *dipacking* dalam kolom supaya tidak pecah.

Selanjutnya kolom dipasang pada statif dan dimasukkan sedikit fase gerak untuk membasahi kapas. Kapas tipis dimasukkan dalam kolom dengan bantuan lidi dan ditambahkan fase gerak sampai penuh. Bubur *silica gel* dimasukkan kedalam kolom dengan pipet tetes. *Silica gel* yang akan dimasukkan diaduk terus menerus agar tidak terdapat rongga udara di tengah-tengah kolom. Timbunan bubuk *silica gel* akan mencapai  $\frac{3}{4}$  tinggi kolom. Pada proses tersebut kolom yang telah berisi fase diam didiamkan kurang lebih selama 12 jam untuk mengetahui apakah *silica gel* pecah atau tidak, jika pecah sebaiknya diulang lagi dari proses awal untuk memperoleh hasil yang terbaik yaitu penyerapan *silica gel* terhadap senyawa dengan sempurna, karena jika fase diam pecah tidak dapat melakukan penyerapan dengan baik. Selanjutnya ditambahkan *seasand* (pasir laut) agar pelarut tidak mengenai *silica gel* dan sebagai penyaring saat sampel dimasukkan.

Ekstrak kasar klorofil dari *Sargassum filipendula* kering yang telah dilarutkan dalam 10 ml fase gerak heksan ( $C_6H_{14}$ ) : etil asetat ( $C_4H_8O_2$ ) (8:2 v/v), kemudian dimasukkan kedalam kolom. Kran kolom yang berada di bawah dibuka, agar ekstrak akan meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Kemudian dimasukkan fase gerak sambil kran kolom dibuka. Fase gerak akan mengalir terus menerus, sehingga perlu menambahkan fase gerak baru agar kolom tidak menjadi kering. Fase gerak yang ditambahkan kedalam

kolom ditingkatkan tingkat kepolarnya dengan menaikkan konsentrasi etil asetat ( $C_4H_8O_2$ ) secara bertingkat dimana komposisinya untuk heksan ( $C_6H_{14}$ ) : etil asetat ( $C_4H_8O_2$ ) 8:2 v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v. selanjutnya fraksi yang keluar dari kolom ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warnanya, untuk klorofil ditunjukkan dengan warna hijau. Isolasi pigmen murni dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Isolasi Klorofil a pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula* dengan Kromatografi Kolom

### 3.3.4. Identifikasi Klorofil a

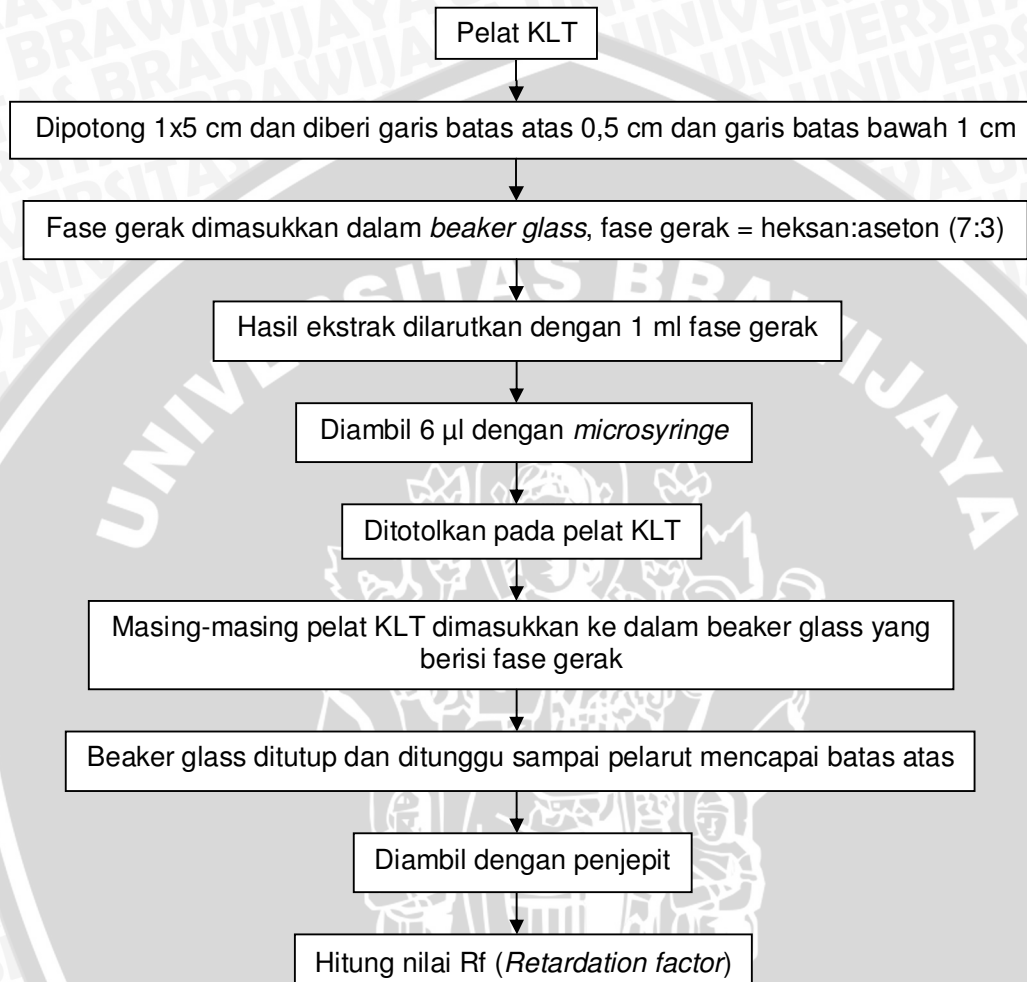
#### 3.3.4.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode pemisahan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk mengetahui kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika dari hasil eluen (dua arah) dan telah divariasikan jenis eluen diperoleh satu noda maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni (Warsito, 2007). Rangkaian alat pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terdiri dari pelat KLT yang ditotol ekstrak pada garis awal pelat, lalu pelat dimasukkan dalam *beaker glass* berisi sedikit pelarut kemudian ditutup dengan cawan petri. Pelarut akan merambat melalui pelat dan terbentuk pemisahan warna pada totol tersebut. Setelah pelarut mencapai garis akhir pelat maka jarak totol dapat nilai  $R_{fny}$  (Clark, 2002).

Penelitian ini menggunakan fase diam *silica gel* F<sub>254</sub> dan fase gerak heksan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) : aseton (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>) dengan perbandingan (7:3 v/v). Tahapan pertama dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil pada kedua ujung pelat. Bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika ditotolkan, sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh pelarut.

Fraksi dari kolom yang ditampung dalam tabung reaksi diambil secukupnya menggunakan pipa kapiler dan ditotolkan pada pelat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sambil ditiup-tiup. Setelah bercak tersebut mengering, pelat dimasukkan dalam *beaker glass* berisi fase gerak dan kertas saring. Fase gerak yang dimasukkan dalam *beaker glass* jumlahnya tidak terlalu banyak sekitar 4ml dan tujuan dari pemberian kertas saring adalah untuk mengetahui apakah kehomogenan larutan didalam *beaker glass*. Selanjutnya *beaker glass* ditutup dengan cawan petri dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas. Kemudian diambil dengan pinset tanpa menyentuh garis atas pelat. Totol yang

terbentuk pada pelat diamati dan dihitung nilai Rf-nya (*retardation factor*). Identifikasi klorofil *a* dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dapat dilihat pada Gambar 12.



**Gambar 12. Identifikasi Klorofil *a* pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula* dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

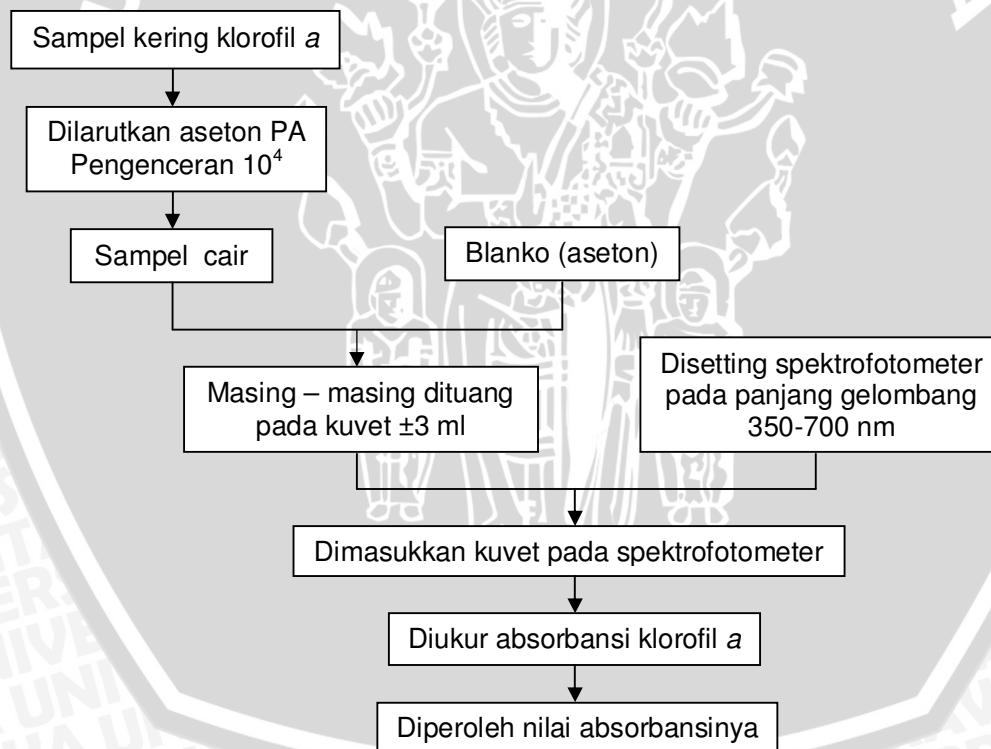
#### 3.3.4.2. Spektrofotometer UV-Vis

Prinsip dari Spektrofotometer UV-Vis adalah menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi (Huda, 2001).

Spektrofotometer ini digunakan untuk mengetahui absorbansi klorofil *a* pada *Sargassum filipendula*. Fraksi hasil dari kromatografi kolom dan



Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah diyakini sebagai klorofil dikeringkan dengan diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan dikeringkan dengan gas nitrogen. Pigmen yang sudah dikeringkan kemudian ditambahkan aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) PA 100% hingga pengenceran  $10^4$  dan larutan pigmen dituang ke dalam kuvet  $\pm 3$  ml. Selanjutnya spektrofotometer dinyalakan dan panjang gelombang diatur pada kisaran 350 – 700 nm, lalu kuvet dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis 1700 merk Shimadzu dan dilakukan pengujian. Hasil dari pengujian yang berupa serapan maksimum yang dibentuk oleh pigmen klorofil *a* kemudian dibandingkan dengan serapan maksimum spektra klorofil menurut Jeffrey, *et al.*, (1997). Prosedur analisa spektrofotometri dapat dilihat pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Prosedur analisa klorofil *a* menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Jenie, *et al.*, 1997)

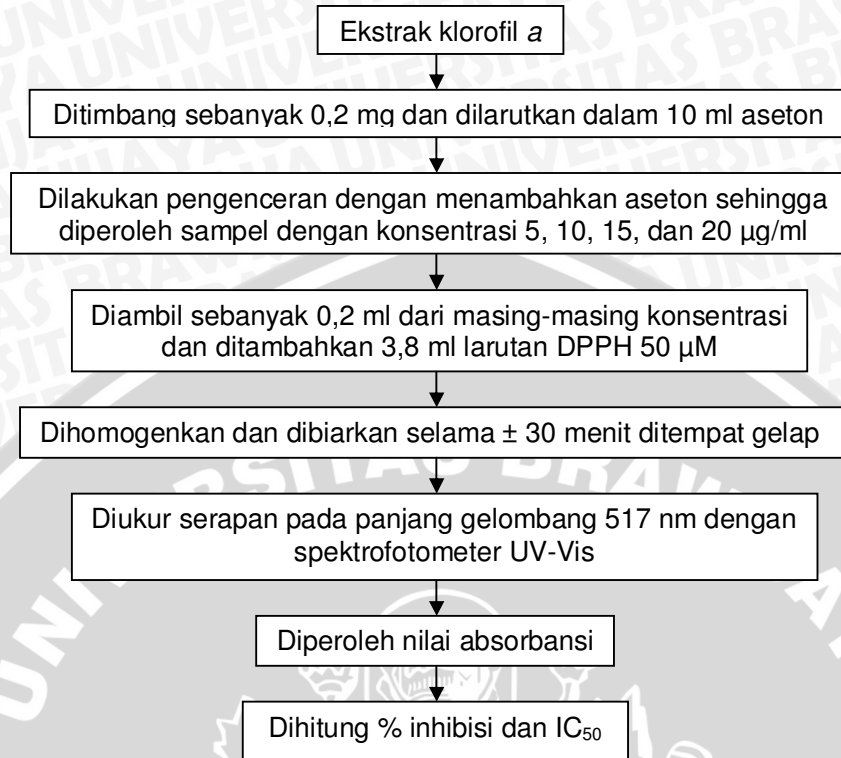
### 3.3.5. Uji Aktivitas Antioksidan Klorofil *a* dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Prinsip kerja metode DPPH berdasarkan adanya senyawa antioksidan akan mendonorkan atom hidrogen pada DPPH sehingga merubah radikal bebas. DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk 1,3-difenil-2-pikrilhidrazil. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna ungu menjadi berwarna kuning pucat (Andayani *et al.*, 2008). Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm.

#### Prosedur analisis

Ekstrak klorofil *a* ditimbang sebanyak 0,2 mg. Kemudian dilarutkan dengan 10 ml aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) dalam labu ukur maka didapatkan konsentrasi 1 mg/ml. Kemudian lakukan pengenceran dengan menambahkan aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (5,10,15,20  $\mu\text{g/ml}$ ). Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 ml larutan sampel dengan pipet mikro dan masukan ke dalam botol vial. Kemudian tambahkan 3,8 ml larutan DPPH 50  $\mu\text{M}$ . Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer UV - Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Aktivitas penangkapan radikal bebas ditetapkan sebagai persentase penghambatan yang dapat dihitung berdasarkan persamaan % Inhibisi =  $[(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1)/\text{Abs}_0] \times 100\%$ , dimana  $\text{Abs}_0$  merupakan absorbansi blanko dan  $\text{Abs}_1$  adalah absorbansi sampel. Kemudian, nilai konsentrasi sampel dari masing-masing dan hambatan radikal bebas (% inhibisi) diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan  $y = a + bx$  yang digunakan untuk mencari nilai  $\text{IC}_{50}$  (*inhibitor concentration 50%*). Uji aktivitas antioksidan klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dengan metode DPPH dapat dilihat pada Gambar 14.



**Gambar 14. Uji Aktivitas Antioksidan Klorofil *a* *Sargassum filipendula* dengan Metode DPPH**

### 3.3.6. Uji Total Fenol Klorofil *a* dengan Metode *Folin-Ciocalteu*

Djapiala, *et al.*, (2014), Pengujian aktivitas total fenol merupakan dasar dilakukan pengujian aktivitas antioksidan, karena diketahui bahwa senyawa fenolik berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Pengukuran total antioksidan bahan pangan asal tanaman dapat dilakukan dengan mengukur kadar total fenolik menggunakan reagen *Folin Ciocalteu*. Hal ini karena sebagian besar antioksidan dalam bahan asal tanaman merupakan senyawa polifenol.

Prinsip metode *Folin Ciocalteu* adalah oksidasi gugus fenolik hidroksil. Perekasi ini mengoksidasi fenolat mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten (Mo-W). Selama reaksi berlangsung gugus fenolik-hidroksil bereaksi dengan pereaksi *Folin Ciocalteu*, membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru. Warna biru yang terbentuk akan

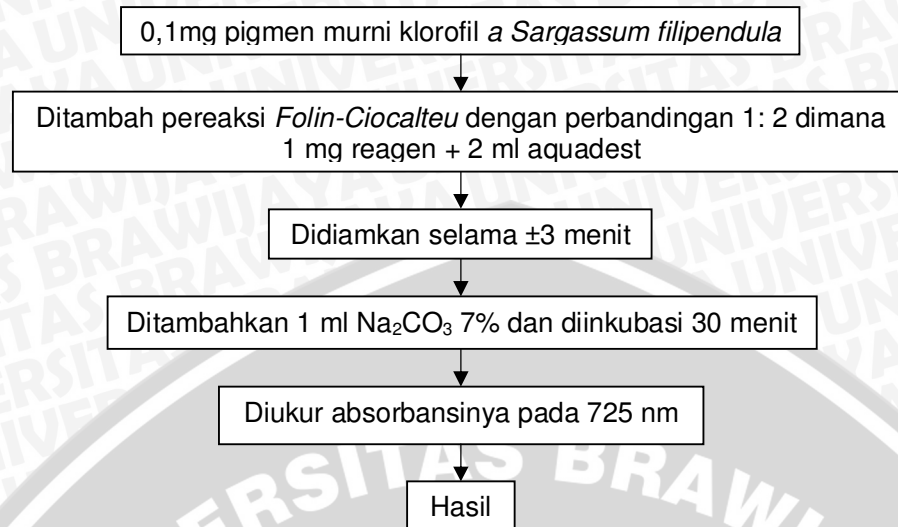
semakin pekat setara dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk, artinya semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Sambada, 2011).

#### **Pembuatan larutan induk asam galat**

Ditimbang 0,1 g asam galat tambahkan 1 ml etanol 96% tambahkan aquades sampai 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan induk dipipet 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 dan 1 ml dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 ml. sehingga dihasilkan konsentrasi 1,2,3,4,5,6,7,8,9 dan 10 µg/g asam galat. Dari masing-masing konsentrasi dipipet 1 ml ditambah 1 ml etanol 96%, ditambah 5 ml aquades, ditambah 0,5 ml reagen Folin 50%. Diamkan selama 5 menit tambah 1 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. Diamkan selama 1 jam di ruang gelap. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 725 nm. Kemudian buat persamaan dari kurva standar hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan serapan.

#### **Prosedur analisis**

Analisa total fenol diukur dengan spektrofotometer menggunakan pereaksi *Folin Ciocalteu*. Ekstrak klorofil *a* rumput laut *Sargassum filipendula* diambil sebanyak 0,1 mg kemudian di tambahkan Folin ciocalteu dengan perbandingan (1:2) dimana ( 1 mg reagen + 2 ml aquadest). Kemudian diforteks lalu didiamkan selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% dan diinkubasi selama 30 menit. Lalu dibaca pada absorbansi dengan panjang gelombang 725 nm.. Serapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar asam galat. Total fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg equivalen asam galat (mg GAE/g sampel). Untuk uji total fenol klorofil *a* dapat dilihat pada Gambar 15.



**Gambar 15. Uji Total Fenol Klorofil a dengan Metode Folin-Ciocalteu**

### 3.3.7. Pengukuran Rendemen

Untuk mengetahui kandungan klorofil a yang dapat digunakan maka dilakukan perhitungan rendemen. Rendemen adalah presentase produk yang didapatkan dari membandingkan berat awal bahan dengan berat akhirnya, sehingga dapat diketahui kehilangan beratnya pada proses pengolahan. Rendemen didapatkan dengan cara (menghitung) menimbang berat akhir bahan yang dihasilkan dari proses dibandingkan dengan berat bahan awal sebelum mengalami proses (Pereira, 2009). Pigmen yang telah diketahui nilai absorbansinya dikonversi menggunakan hukum "Lambert-Beer" yaitu  $A = \epsilon bc$ .

Keterangan: A = Absorbansi

$\epsilon$  = Absorptifitas molar (Molar extinction coefficient)

b = Lebar bagian kuvet dalam

c = Konsentrasi (molar)

dan dihasilkan kadar klorofil a. Hasil kadar klorofil a kemudian dibagi jumlah total alga yang digunakan dikali seratus persen.

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

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil Penelitian

Uji aktivitas Antioksidan dan Analisa Total Fenol Klorofil *a* pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula* dengan parameter hasil kolom, uji identifikasi klorofil *a* dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan Spektrofotometer UV-Vis, uji aktivitas antioksidan, uji total fenol dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada Tabel 7 dibawah ini:

**Tabel 7.** Data Hasil Penelitian Klorofil *a* pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula*

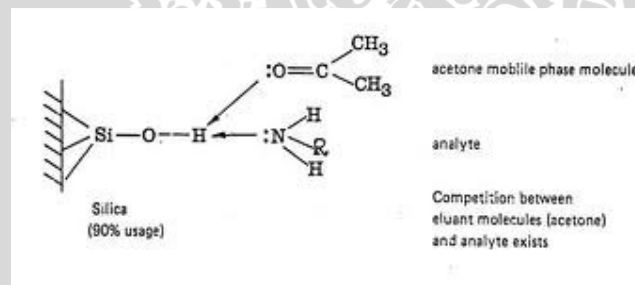
| Uji Identifikasi          | Alat / Bahan                      | Hasil   | Literatur  |
|---------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Kromatografi kolom        | Kromatografi Kolom                | 69 isolat pigmen dalam botol vial. Diperoleh 16-22 adalah klorofil <i>a</i> berwarna hijau biru | Gross (1991), menyatakan bahwa klorofil <i>a</i> berwarna hijau biru, klorofil <i>b</i> hijau kuning dan karotenoid berwarna kuning.             |
| Kromatografi Lapis Tipis  | Kromatografi Lapis tipis          | Hasil kolom: satu titik spot warna hijau biru dengan Rf = 0,42                                  | Manule (2010), nilai Rf klorofil <i>a</i> pada <i>Sargassum filipendula</i> didapatkan Rf sebesar 0,42 dan terbentuk satu spot warna hijau biru. |
| Pola Spektra              | Spektrofotometer UV-VIS tipe-1601 | Panjang gelombang klorofil <i>a</i> :<br>B (soret) : 429nm<br>Qx : 614,5 nm<br>Qy : 661,5 nm    | Jeffrey, <i>et al.</i> , (1997) panjang gelombang klorofil <i>a</i> :<br>B (soret) : 430,3 nm<br>Qx : 616,5 nm<br>Qy : 662,1 nm                  |
| Uji Aktivitas Antioksidan | Reagen DPPH                       | IC <sub>50</sub> = 111,748ppm   | Swantara, <i>et al.</i> , (2014), uji DPPH rumput laut <i>Sargassum ringgoldianum</i> didapatkan nilai IC <sub>50</sub> sebesar 92,19 ppm        |
| Uji Total Fenol           | Pereaksi Follin Ciocealteu        | 0,010815 mg GAE/g sampel  | Tuarita (2013), total fenol <i>Sargassum cristaefolium</i> berkisar antara 0,068 – 0,167 mg/g  |
| Rendemen                  |                                   | 0,293% ± 0,0000335  |  |

## 4.2. Pembahasan

### 4.2.1. Kromatografi Kolom

Kromatografi merupakan cara pemisahan yang berdasarkan partisi cuplikan antara fasa bergerak (*mobile*) dan fasa diam (*stationary*). Kecepatan bergerak suatu komponen tergantung pada berapa besarnya ia terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat (Sastrohamidjojo, 1985).

Pemisahan suatu campuran dengan kromatografi kolom dimana kolom diisi dengan fase diam (*silica gel* F<sub>254</sub>) sebagai penahan senyawa sementara bersifat polar (karena gugus H) dan dialiri dengan pelarut (heksan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) : etil asetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)) sebagai fase gerak. Adapun struktur *silica gel* F<sub>254</sub> dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Struktur *silica gel* F<sub>254</sub>

Ekstrak pigmen kering yang telah dilarutkan dengan sedikit fase gerak dimasukkan melalui sebelah atas dari kolom kemudian membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa tersebut. Fase diam akan mengikat terlebih dahulu senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang sama, kemudian pelarut (fase gerak) dialirkan kedalam kolom sedikit demi sedikit yang akan mengangkut pigmen. Pigmen  $\beta$ -karoten akan keluar lebih dulu, kemudian klorofil dan terakhir fukosantin. Dilihat dari sifat masing-masing pigmen yang bersifat polar akan diserap terlebih dahulu oleh fase diam dan yang bersifat non polar akan keluar mengikuti fase gerak terlebih dahulu. Selanjutnya fase gerak dinaikkan tingkat

kepolarannya yaitu heksan ( $C_6H_{14}$ ) : etil aasetat ( $C_4H_8O_2$ ) 8:2 v/v, 7:3 v/v dan 6:4 v/v untuk mengelurkan pigmen klorofil dan fukosantin. Senyawa-senyawa yang lebih larut akan bergerak lebih lambat turunnya dalam kolom daripada yang kurang kelarutannya.

Isolasi klorofil *a* rumput laut coklat *Sargassum filipendula* pada penelitian ini menggunakan kromatografi kolom dengan kolom berukuran panjang 40 cm dan diameter 3,5 cm. Teknik kromatografi kolom dipilih karena dapat memisahkan antara senyawa pigmen satu dengan yang lainnya sesuai tingkatan kepolaran (warna). Kromatografi kolom memiliki keuntungan selain dapat digunakan analisa kualitatif juga dapat digunakan analisa kuantitatif. Kromatografi kolom memiliki kekurangan yaitu memiliki waktu yang relatif cukup lama karena panjang dan diameter kolom, fase gerak (jenis dan jumlah pelarut yang digunakan), dan kecepatan aliran (Sastrohamidjojo, 1985).

Isolasi pigmen rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dengan kromatografi kolom didapatkan 3 jenis pigmen yaitu  $\beta$ -karoten ditunjukkan dengan warna kuning, klorofil *a* ditunjukkan dengan warna hijau biru, dan fukosantin ditunjukkan dengan warna kuning orange. Sesuai dengan deskripsi Gross (1991) yang menyatakan bahwa klorofil *a* berwarna hijau biru, klorofil *b* hijau kuning dan karotenoid berwarna kuning, orange, merah. Ditambahkan oleh Putnarubun dan Dangeubun (2009), pigmen yang pertama kali keluar dalam isolasi dengan kromatografi kolom adalah karoten ditandai dengan warna kuning tua bersifat hidrofob juga bersifat non polar. Pigmen kedua adalah klorofil *a* ditandai dengan warna hijau biru yang bersifat semi polar.

Isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom dilakukan dengan dua fase, dimana *silica gel* sebagai fase diam dan pelarut sebagai fase gerak. Pelarut yang digunakan adalah heksan ( $C_6H_{14}$ ) : etil aasetat ( $C_4H_8O_2$ ) dengan perbandingan yang berbeda yaitu 8:2 v/v, 7:3 v/v dan 6:4 v/v dikarenakan



perbedaan tingkat kelarutan pigmen tersebut. Sastrohamidjojo (1985), kecepatan bergerak dari suatu komponen dari campuran tergantung pada kelarutannya dalam fasa tetap, sehingga senyawa-senyawa yang lebih larut akan bergerak lebih lambat turunnya dalam kolom daripada yang kurang kelarutannya. Selama mereka bergerak senyawa-senyawa mengalami partisi di antara dua fasa. Untuk menurunkan pigmen tersebut menggunakan sifat kelarutan dimana pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar.

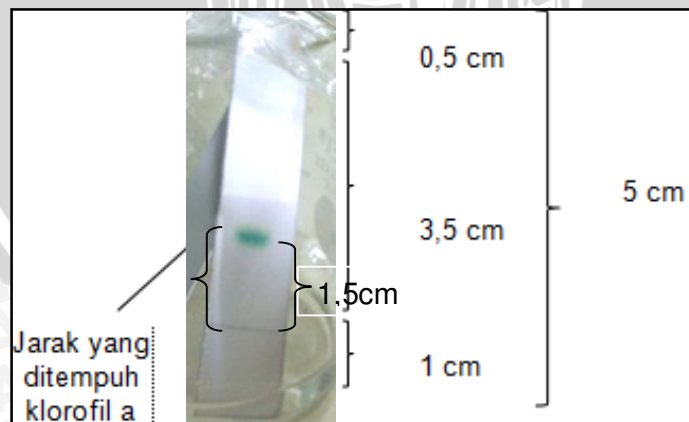
Pigmen yang dihasilkan sebanyak 69 isolat pada ulangan 1 dan 83 isolat pada ulangan 2 yang ditampung pada botol-botol vial berdasarkan warnanya. Pada ulangan 1 fraksi yang diduga klorofil *a* terdapat pada botol 16-22, sedangkan untuk ulangan 2 terdapat pada botol 21-27 dengan ciri khas warna pigmen klorofil *a* yang berwarna hijau biru. Penelitian oleh Manule (2010), memperlihatkan pemisahan pigmen menggunakan kromatografi kolom dihasilkan sebanyak 136 fraksi yang ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warnanya dengan fase gerak yang sama (heksan : etil asetat 8:2 v/v). Fraksi yang diduga klorofil *a* terdapat pada tabung 13-49 berwarna hijau biru, warna tersebut merupakan ciri khas dari pigmen klorofil *a* (Jeffrey, *et al.*, 1997; Gross, 1991). Perbedaan jumlah fraksi yang didapatkan diduga karena jenis sampel, jumlah sampel, diameter dan tinggi kolom yang berbeda.

Pigmen klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* yang didapatkan dari kromatografi kolom selanjutnya diidentifikasi kemurniannya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

#### 4.2.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui kemurnian pigmen pada ekstrak kasar berdasarkan jumlah serta warna total yang terbentuk

(Merdekawati dan Susanto, 2014). Untuk menentukan kemurnian pigmen klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dari kromatografi kolom dilakukan uji total warna pada kromatografi lapis tipis (KLT). Identifikasi kemurnian pigmen klorofil *a* ini menggunakan plat KLT dengan fase gerak heksan ( $C_6H_{14}$ ) : aseton ( $CH_3COCH_3$ ) (7:3 v/v) sebanyak 10 ml. Nilai  $R_f$  yang didapatkan sebesar 0,42 dan terbentuk satu spot warna hijau biru, dimana warna yang terbentuk tersebut merupakan ciri khas klorofil *a*. Sesuai dengan deskripsi Gross (1991) yang menyatakan bahwa klorofil *a* berwarna hijau biru, klorofil *b* hijau kuning dan karotenoid berwarna kuning, orange, merah. Total warna yang dihasilkan membuktikan bahwa pigmen yang dihasilkan murni. Nilai  $R_f$  yang didapatkan juga tidak jauh beda dengan penelitian yang dilakukan oleh Pangestuti, *et al.*, (2008), nilai  $R_f$  klorofil *a* berkisar 0,38 – 0,42 dengan fase diam dan fase gerak yang sama. Penelitian sebelumnya oleh Manule (2010), nilai  $R_f$  klorofil *a* pada *Sargassum filipendula* dengan fase gerak heksan ( $C_6H_{14}$ ) : aseton ( $CH_3COCH_3$ ) (7:3 v/v) juga didapatkan  $R_f$  sebesar 0,42 dan terbentuk satu spot warna hijau biru. Hasil identifikasi kemurnian klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada Gambar 17.



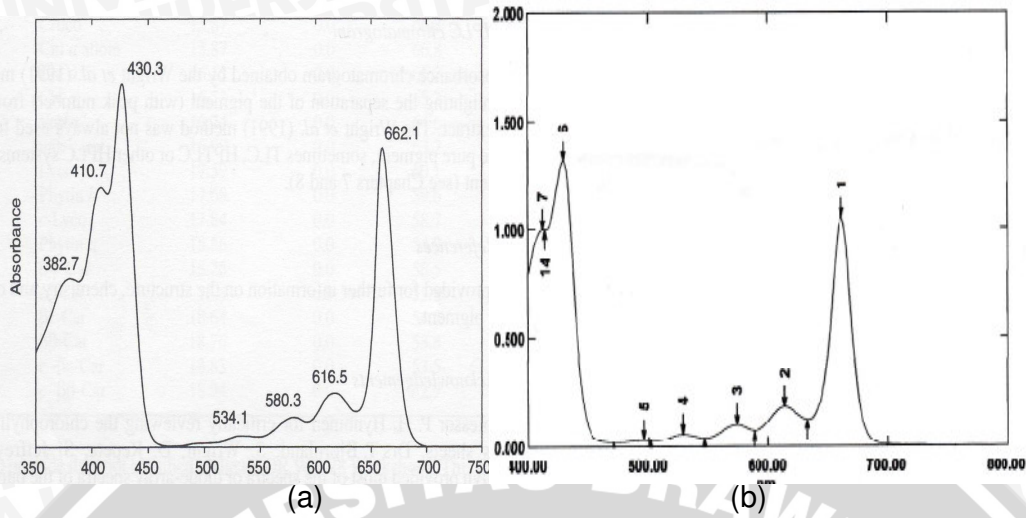
**Gambar 17.** Hasil Kromatografi Lapis Tipis Klorofil *a* *Sargassum filipendula*

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fase diam polar dan fase gerak dominan nonpolar akan menyebabkan klorofil *a* bergerak mengikuti fase geraknya, sehingga memiliki nilai  $R_f$  yang lebih tinggi (Ati, *et al.*, 2006). Mekanisme terbentuknya total warna disebabkan oleh komponen kimia yang bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama, sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya, hal inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan. Noda-noda yang terbentuk terpisah berdasarkan kepolarannya. Noda yang mempunyai nilai  $R_f$  lebih rendah cenderung memiliki kepolaran yang lebih tinggi karena lebih terdistribusi ke fase diam yang bersifat polar, dibandingkan noda yang mempunyai harga  $R_f$  lebih besar karena lebih terdistribusi ke dalam fase gerak (Wikipedia, 2014<sup>d</sup>).

#### 4.2.3. Hasil Uji Absorbansi Klorofil *a* dengan Spektrofotometri UV-VIS

Hasil isolasi yang diyakini sebagai klorofil *a* dan telah dianalisis kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), selanjutnya dianalisis kualitatif menggunakan spektrofotometer yang bertujuan untuk mengetahui pola spektra dan serapan maksimum. Klorofil dan turunannya memiliki karakteristik spesifik yang memungkinkan dilakukannya identifikasi secara spektroskopi. Molekul yang berwarna hijau tersebut memiliki serapan khas pada daerah biru dan merah dari spektrum tampak (Gross, 1991).

Pengukuran pola spektra dan absorbansi klorofil *a* diidentifikasi menggunakan pelarut aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ). Selanjutnya pola spektra dan serapan maksimum hasil isolasi dibandingkan dengan pola spektra dan serapan maksimum pada literatur Jeffrey, *et al.*, (1997) dengan pelarut yang sama. Hasil pola spektra dalam pelarut aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) dapat dilihat pada Gambar 18.



| No. | P/V | Wavelength | Abs.  | Description |
|-----|-----|------------|-------|-------------|
| 1   | ●   | 661.50     | 0.908 |             |
| 2   | ●   | 614.50     | 0.176 |             |
| 3   | ●   | 573.50     | 0.095 |             |
| 4   | ●   | 529.00     | 0.054 |             |
| 5   | ●   | 496.00     | 0.028 |             |
| 6   | ●   | 429.00     | 0.871 |             |

**Gambar 18 (a).** Pola spektra pigmen klorofil *a* hasil isolasi dalam pelarut aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ).

**(b).** Pola spektra klorofil *a* dalam pelarut aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )(Jeffrey, *et al.*, 1997).

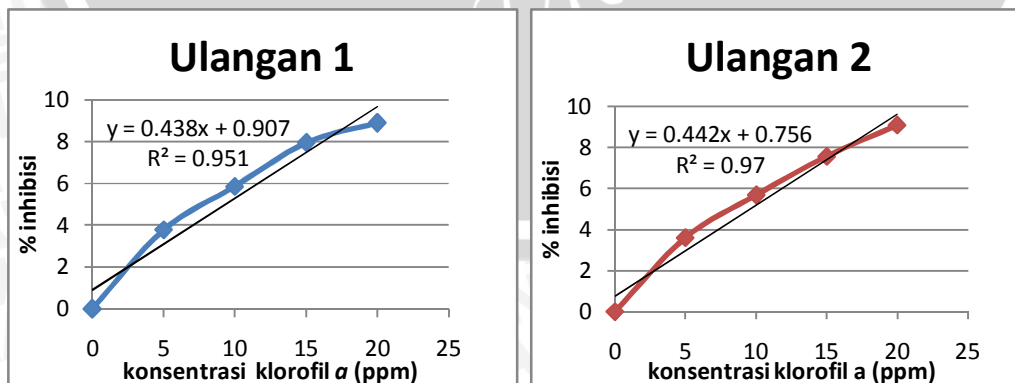
Isolasi memiliki kemiripan dengan pola spektra klorofil *a* menurut Jeffrey, *et al* (1997), yang ditunjukkan pada Gambar 18 (b). Serapan maksimum klorofil *a* hasil isolasi pada pita Qy dan Qx berturut-turut 661,5 ; 614,5 dan 429,5. Hal ini mendekati dengan serapan maksimum klorofil *a* menurut Jeffrey, *et al* (1997) yaitu 662.1, 616.5 dan 430.1 nm. Costa, *et al* (2008), menyatakan bahwa berdasarkan urutan tingkatan energinya, pola spektra klorofil memiliki tiga pita utama yang dinyatakan dengan pita Qy, pita Qx dan pita B (soret). Ditambahkan oleh Gross (1991) yang menyatakan bahwa klorofil *a* mempunyai serapan maksimum pada daerah biru soret (B) 400-450 nm dan daerah merah (Qy) pada 650-700 nm. Meskipun terdapat pergeseran panjang gelombang yang tidak terlalu jauh. Menurut Toto, *et al.*, (2006) menyatakan bahwa pergeseran yang terjadi diduga karena adanya interaksi antara zat terlarut (pigmen) dan pelarut

yang sangat ditentukan oleh kualitas pelarut atau kemurnian pelarut yang digunakan untuk analisa.

#### 4.2.4. Uji Antioksidan Klorofil a dengan Metode DPPH

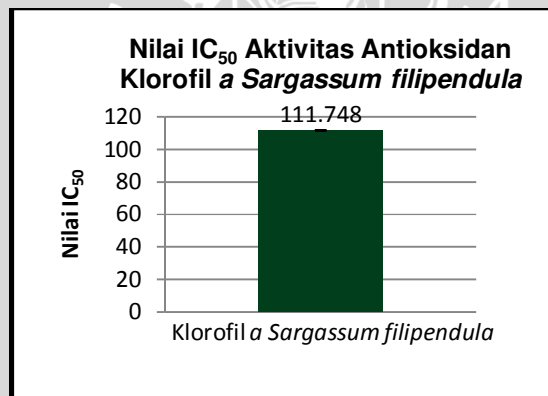
Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl*). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Kuncahyo, 2007).

Pengukuran aktivitas antioksidan pigmen klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Nilai  $IC_{50}$  menyatakan sebagai besarnya konsentrasi yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50%. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari suatu persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi klorofil *a* rumput laut coklat *Sargassum filipendula* (sumbu x) dengan prosentase inhibisi radikal DPPH (sumbu y). Perhitungan prosentase inhibisi dan  $IC_{50}$  dapat dilihat pada Lampiran 12. Grafik hubungan antara konsentrasi (ppm) dan prosentase inhibisi dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Grafik hubungan antara konsentrasi (ppm) klorofil *a* dan % inhibisi

Dari Gambar 19 dapat dilihat grafik hubungan antara konsentrasi klorofil *a* dengan %inhibisi dalam penghambatan radikal DPPH. Berdasarkan Gambar 19 dapat diketahui bahwa persentase penghambatan radikal bebas oleh klorofil *a* semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi yang digunakan. Hal ini dapat dikatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi klorofil *a* juga semakin tinggi dalam peredaman radikal DPPH. Persamaan regresi yang didapatkan pada ulangan 1 yaitu  $Y = 0,438x + 0,907$  dengan  $r^2 = 0,951$ , dan ulangan 2 yaitu  $Y = 0,442x + 0,756$  dengan  $r^2 = 0,97$ . Kemudian nilai  $IC_{50}$  dimasukkan sebagai faktor *y* sehingga didapatkan nilai  $IC_{50}$  penghambatan klorofil *a* terhadap radikal DPPH. Nilai  $IC_{50}$  aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas DPPH dapat dilihat pada Gambar 20.



**Gambar 20.** Nilai  $IC_{50}$  Aktivitas Antioksidan Klorofil *a* *Sargassum filipendula*

Dari Gambar 20 memperlihatkan nilai  $IC_{50}$  yang dimiliki oleh klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* sebesar 111,748 ppm. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Swantara, *et al.*, (2014), hasil uji DPPH rumput laut *Sargassum ringgoldianum* didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 92,19 ppm. Dari hal tersebut dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan klorofil *a* *Sargassum filipendula* lebih rendah dari pada *Sargassum ringgoldianum* dengan ditunjukkannya nilai  $IC_{50}$  yang lebih besar. Menurut Molyneux (2004) yang diacu oleh Tuarita (2013), nilai  $IC_{50}$  yang semakin kecil menunjukkan aktivitas

antioksidan pada bahan yang diuji semakin tinggi. Nilai  $IC_{50}$  dapat dikatakan berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan.

Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas pada klorofil *a* dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 111,748 ppm tersebut dapat dikatakan memiliki potensi yang cukup baik sebagai antiradikal bebas. Menurut Mardawati, et al., (2008), secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan kuat jika nilai  $IC_{50}$  bernilai 51-100, sedang jika  $IC_{50}$  bernilai 101-150, dan lemah jika  $IC_{50}$  bernilai 151-200.

Perbedaan aktivitas antioksidan pada klorofil *a* *Sargassum filipendula* dengan *Sargassum ringgoldianum* diduga disebabkan klorofil *a* yang memiliki kelarutan yang tinggi di dalam pelarut organik (bersifat semipolar) sehingga dapat mengganggu fungsi senyawa fenol yang cenderung mampu dalam menangkal radikal bebas. Swantara, et al., (2014), ekstrak kasar *Sargassum ringgoldianum* mengandung isolat aktif bersifat antiradikal bebas seperti fenol dan turunannya, yaitu: etil miristat, dibutil ftalat, etil palmitat, metil isostearat, dioktil ftalat, dan  $3\beta$ -bromo-kolest-5-ena. Menurut Dhiwandita (2009) dan Putram (2013), pada umumnya antioksidan mengandung struktur inti yang sama yaitu mengandung cincin benzena tidak jenuh disertai gugus hidroksi atau gugus amino. Banyaknya gugus hidroksil maka semakin besar kemampuan mendonorkan atom hidrogen sehingga semakin kuat menangkap radikal bebas.

Pada penelitian ini digunakan BHT (*buthylated hydroxytoluene*) sebagai pembanding karena BHT termasuk antioksidan sintesis yang biasa digunakan dalam bahan pangan dan memiliki keaktifan yang cukup tinggi sebagai zat antioksidan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Dhiwandita (2009) hasil nilai absorbansi dari larutan BHT dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50 dan 100 ppm nilai  $IC_{50}$  untuk BHT sebesar 13,90 ppm sehingga sifat antioksidannya tergolong sangat aktif karena batasan maksimum  $IC_{50}$  suatu bahan dapat disebut memiliki aktivitas antioksidan adalah 200 ppm. Batasan penggunaan BHT pada bahan

pangan juga sebesar 200 ppm (Ketaren 1986). Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan BHT sekitar 8 kali lebih besar dari klorofil *a*. Jika melihat keberadaan klorofil yang jauh melimpah di alam dan dari segi keamanan dalam konsumsi bagi manusia dibandingkan BHT maka klorofil *a* dapat dijadikan salah satu sumber zat antioksidan yang potensial.

Pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan radikal bebas DPPH merupakan pengujian secara kuantitatif, dimana parameter yang digunakan adalah IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> semakin kecil, maka semakin tinggi aktivitas antioksidan yang terkandung dalam klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dalam menangkap radikal DPPH. Sebaliknya, jika nilai IC<sub>50</sub> semakin besar maka semakin rendah aktivitas antioksidan yang terkandung di dalam klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dalam menangkap radikal DPPH.

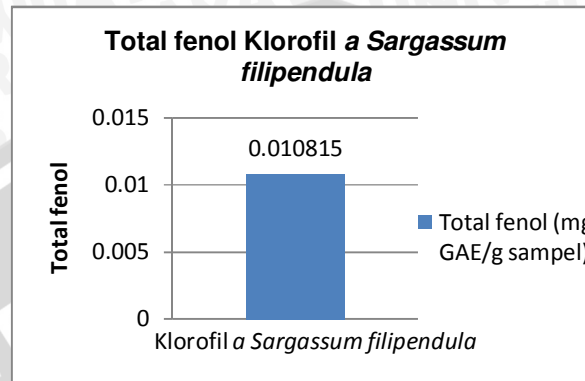
#### 4.2.5. Uji Total Fenol dengan Metode *Folin-Ciocalteu*

Kandungan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* diuji dengan menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu*. Folin-Ciocalteu adalah pereaksi anorganik yang dapat membentuk larutan kompleks dengan senyawaan fenol. Pengukuran total fenol dengan metode *Folin-Ciocalteu* didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi. Menurut Widyastuti (2010), senyawa fenol sebagai metabolit sekunder dalam tanaman berpotensi sebagai zat antioksidan. Hal ini disebabkan oleh keberadaan gugus hidroksil dalam senyawaan fenol. Gugus hidroksil dapat berfungsi sebagai penyumbang atom hidrogen ketika bereaksi dengan senyawa radikal melalui mekanisme transfer elektron sehingga proses oksidasi dihambat.

Persamaan kurva standart fenol yang diperoleh adalah  $y = 0,027x - 0,026$  dengan nilai  $R^2 = 0,972$ . Total fenol sampel tersebut dihitung berdasarkan kurva



standar asam galat yang diperoleh. Hasil pengukuran total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* disajikan pada Gambar 21. Analisis data total fenol dapat dilihat pada Lampiran 13.



**Gambar 21. Total Fenol Klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula***

Dari Gambar 21 memperlihatkan kandungan total fenol (dengan standart asam galat) klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* sebesar 0,010815 (mg GAE/g sampel). Hasil kadar total fenol yang didapatkan lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian oleh Tuarita (2013), dimana kandungan total polifenol *Sargassum cristaefolium* berkisar antara 0,068 – 0,167 mg/g dan Sanjaya (2011), kandungan total fenol dari rumput laut *Caulerpa racemosa* segar, layu dan kering menunjukkan kisaran 2,16 – 17,77 mg/g (basis kering).

Rendahnya kandungan total fenol diduga karena sifat klorofil *a* yang cenderung semipolar, sehingga fenol yang bersifat polar tidak seluruhnya terdapat di dalam klorofil *a*. Diduga hanya sebagian kecil senyawa fenol seperti aglikon flavonoid dan senyawa lainnya yang bersifat semipolar yang terdapat dalam klorofil *a*. Menurut Hardiana, *et al.*, (2012) senyawa golongan fenol dapat bersifat polar atau semi polar. Flavonoid yang merupakan golongan terbesar dari senyawa golongan fenol bersifat polar sehingga akan banyak terdapat pada

ekstrak dengan pelarut polar. Sementara pada ekstrak dengan pelarut semi polar dimungkinkan banyak terdapat aglikon flavonoid yang bersifat kurang polar.

#### **4.2.6. Analisis Korelasi Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol Klorofil *a* pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula***

Analisis korelasi antara aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan total fenol klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* bertujuan untuk menentukan kedekatan hubungan antara aktivitas antioksidan dan total fenol. Dari hasil didapatkan nilai aktivitas antioksidan ( $IC_{50}$ ) klorofil *a* rumput laut coklat *Sargassum filipendula* sebesar 111,748 ppm dan total fenol sebesar 0,010815 mg GAE/g sampel. Sanjaya (2011) kadar fenol *Caulerpa racemosa* kering sebesar 17,70 mg/g sampel ekuivalen asam galat dengan aktivitas antioksidan  $IC_{50}$  bernilai 24,54 ppm.

Klorofil *a* memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik, namun total fenol yang terkandung dalam klorofil *a* relatif rendah. Diduga senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan tidak seluruhnya dari senyawa fenol, klorofil mengandung senyawa yang lain dan juga struktur klorofil ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ) memiliki banyak atom hidrogen yang juga berpotensi dalam mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas. Menurut Khamsah, *et al.*, (2006) senyawa fenol adalah senyawa kimia yang berpotensi sebagai antioksidan, tetapi aktivitas antioksidan tidak hanya disebabkan oleh senyawa fenol. Senyawa triterpena pentasiklik, vitamin C, zat warna seperti klorofil, senyawa sulfur, ataupun nitrogen dapat berperan sebagai zat antioksidan. Ditambahkan oleh Prangdimurti, *et al.*, (2006), klorofil terdapat dalam jumlah banyak dalam tanaman yaitu rata-rata 1% berat kering dengan kadar total sebesar 2540 mg/10 ml dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.

Senyawa fenol yang terkandung dalam klorofil *a* tersebut juga mempunyai aktivitas antioksidan, namun relatif kecil. Senyawa fenol dalam klorofil *a* diduga dari golongan fenol yang bersifat semi polar atau non polar (dilihat dari klorofil yang bersifat semipolar) seperti aglikon flavonoid dan turunannya. Menurut Naufalin dan Rukmini (2010), golongan senyawa-senyawa fenolik, flavonoid dan alkaloid yang berpotensi sebagai antioksidan yang merupakan senyawa-senyawa polar diduga lebih terekstrak oleh senyawa polar. Komponen bioaktif yang dominan pada fraksi semi polar adalah flavonoid, sedangkan pada fraksi polar adalah fenol. Flavonoid yang berikatan dengan gula cenderung larut dalam air, sedangkan aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol cenderung lebih mudah larut dalam pelarut semi polar. Flavonoid diduga mempunyai kemampuan untuk merubah atau mereduksi radikal bebas sehingga memiliki potensi sebagai antioksidan.

#### 4.2.7. Rendemen Klorofil *a*

Untuk mengetahui kandungan klorofil *a* yang dapat digunakan maka dilakukan penghitungan rendemen. Rendemen adalah perhitungan efektivitas prosedur, dihitung dengan membagi jumlah produk yang didapatkan dibagi dengan jumlah produk semula (Anonymous, 2014<sup>9</sup>).

Nilai rendemen klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* sebesar  $0,293\% \pm 0,0000335$ . Menurut Nurdiana dan Limantara (2008), kandungan klorofil *a* pada *Sargassum muticum* sebesar 0,6319 (g/kg) dan *Laminaria saccharina* sebesar 0,538 (g/kg) membuktikan bahwa kandungan klorofil *a* dalam *Sargassum filipendula* lebih rendah dibandingkan dengan jenis alga coklat yang lain. Perbedaan jenis yang diteliti, perbedaan kondisi lingkungan tempat hidup, seperti cahaya matahari serta kandungan oksigen dan nitrogen dapat mempengaruhi perbedaan tersebut. Menurut Nurdiana, *et al.*, (2008), total

klorofil pada kedalaman 3 meter lebih rendah dibandingkan kedalaman 6 meter. Cahaya yang masuk pada kedalaman 3 meter akan lebih banyak dibandingkan dengan cahaya yang masuk pada kedalaman 6 meter. Intensitas cahaya tinggi pada klorofil a dapat menyebabkan pigmen mengalami fotodegradasi.



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan dan Analisa Total Fenol Klorofil *a* pada Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula*” ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* memiliki aktivitas antioksidan. Pengujian aktivitas antioksidan dengan DPPH menunjukkan nilai aktivitas IC<sub>50</sub> sebesar 111,748 ppm. Total fenol yang didapatkan dari klorofil *a* sebesar 0,010815 mg GAE/g sampel.
2. Aktivitas antioksidan dari klorofil *a* tidak memiliki korelasi positif dengan kandungan total fenolnya. Aktivitas antioksidan tidak hanya bersumber dari golongan fenol. Klorofil *a* memiliki kandungan senyawa lain yang bersifat antiradikal dan struktur klorofil *a* (C<sub>55</sub>H<sub>72</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>Mg) memiliki banyak atom hidrogen yang juga berpotensi dalam mendonorkan atom hidrogennya pada radikal bebas yang reaktif.

### 5.2. Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan mengenai senyawa yang terkandung dalam klorofil *a* pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* sehingga dapat ditentukan senyawa yang paling berperan dalam aktivitas antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amirin, T.M. 2009. Penelitian Eksploratori (Eksploratif). [www.tatangmanguny.wordpress.com](http://www.tatangmanguny.wordpress.com) diakses pada tanggal 7 Juni 2014 pukul 15.32.
- Andayani,R; Maimunah; Yovita, L. 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, **Vol.13, No.1**: 31-37.
- Anis, E. 2008. Pigmen Sebagai Zat Pewarna dan Antioksidan Alami. UMM Press. Malang.
- Anonimous<sup>a</sup>. 2014. Dinding Sel Rumput Laut. <http://id.scribd.com./2014/03/dekstrin.html>. Diakses pada tanggal 24 Mei 2014 pukul 13.03 WIB.
- <sup>b</sup>. 2014. Klasifikasi *Sargassum filipendula*. <http://id.scribd.com./2014/02/dekstrin.html>. Diakses pada tanggal 24 Mei 2012 pukul 13.09 WIB.
- <sup>c</sup>. 2014. Fraksinasi. <http://id.scribd.com./2010/03/dekstrin.html>. Diakses pada tanggal 25 Mei 2012 pukul 18.56 WIB.
- <sup>d</sup>. 2014. Struktur Fenol. <http://id.scribd.com./2010/03/dekstrin.html>. Diakses pada tanggal 25 Mei 2012 pukul 19.07 WIB.
- <sup>e</sup>. 2014. Rendemen. <http://id.scribd.com./2010/03/dekstrin.html>. Diakses pada tanggal 25 Mei 2012 pukul 19.41 WIB.
- Ansel, H.C. 1989. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Jakarta: UI Press.
- Apriandi, A. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Keong Ipong-pong (*Fasciolaria salmo*). IPB: Bogor.
- Ardianingsih, R. 2009. Penggunaan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam Proses Analisa Deteksi Ion. *Berita Dirgantara* **Vol. 10, No. 4**: 101-104.
- Ariffaizal. 2008. Kesamaan Struktur Hemoglobin dengan Klorofil. <http://www.kesamaan-struktur-hemoglobin-klorofil.org> diakses pada tanggal 14 Juni 2014 pukul 14.04.
- Arrohmah. 2007. Studi Karakteristik Klorofil pada Daun sebagai material *Photodetector Organic*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret: Surakarta.
- Astawan, M., Muchtadi, D., dan Tutik, W. 2008. Pemanfaatan Rumput laut pada Berbagai makanan Jajanan untuk Mencegah Timbulnya Defisiensi Iodium dan Penyakit Degeneratif. [Laporan Penelitian]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

- Ati, N. H, Rahayu, P., Notosoedarmo, S., dan Limantara, L. Komposisi dan Kandungan Pigmen Tumbuhan Pewarna Alami Tenun Ikat di Kabupaten Timor Tengan Selatan, Propinsi Nusa Tenggara Timur. *Indo J.Chem* **Vol 6 (3)**: 325-331.
- Atmadja, K. 1988. Peranan Rumput Laut sebagai Salah Satu Bahan Baku Industri Penunjang Kesehatan, Makalah Seminar Nasional Obat Pangan dari Laut LON-LIPI: Jakarta.
- Bachtiar, E. 2007. Penelusuran Sumber Daya Hayati Laut (Alga) sebagai Biotarget Industri, Makalah. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Uiversitas Padjadjaran Jatinangor: Bandung.
- Barus, P. 2009. Pemanfaatan Bahan Pengawet dan Antioksidan Alami Pada Industri Bahan Makanan. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Chemistry. 2009. Kromatografi Kolom. <http://www.Chem-is-try.org>. diakses pada tanggal 1 Juni 2014 pukul 12.45.
- Christiana, R., Kristopo, H. dan Limantara, L. 2008. Photodegradation and Antioxidant Activity of Chlorophyll a from Spirulina (*Spirulina sp.*) Powder. *Indo. J. Chem.*, **8 (2)**: 236-241.
- Clark, J. 2002. The Mecanism for Esterification Reaction. <http://www.Chemguide.co.uk/organicprops/estermenu.html1#top>.
- Costa, J.F., Karwur, F.F. dan Limantara, L. 2008. Efek Betakaroten dan Agregasi Klorofil pada Fotostabilitas Klorofil a dalam pelarut Aseton. *Jurnal Natur Indonesia* **11(2)**.
- Day, Jr and Underwood, Al. 2008. Analisis Kimia Kuantitatif. Penerbit Erlangga: Jakarta.
- Desmiati, Y., R. Julia dan R. Ika. 2008. Uji Aktivitas penangkap Radikal Bebas Daun Cerme (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels)). *Jurnal Farmasi Indonesia* **Vol. 4 No. 2** Juli 2008: 70-74.
- Dewi, J.r., Estiasih, T. dan Murtini, E.S. 2007. Aktivitas Antioksidan Dedak Sorgum Lokal Varietas Coklat (*Sorghum bicolor*) Hasil Ekstraksi Berbagai Pelarut. *Jurnal Teknologi Pertanian*. **Vol. 8 No. 3** Desember 2007.
- Dhiwandita, N. 2009. Perubahan Kandungan Antioksidan Anggur Laut (*Caulerpa racemosa*) Akibat Pengolahan. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB: Bogor.
- Djapiala, F.Y., Montolalu, L.A.D.Y. dan Mentang, F. 2014. Kandungan Total Fenol dalam Rumput Laut *Caulerpa racemosa* yang Berpotensi sebagai Antioksidan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT.
- Fithriani, D. 2009. Potensi Antioksidan *Caulerpa racemosa* di Perairan Teluk Hurun Lampung. Tesis. Sekolah Pascasarjana. IPB: Bogor.

- Firdaus, M. Aktivitas Antioksidan Rumput Laut Coklat (*Sargassum echinocarpum*) sebagai Pencegah Disfungsi Sel Endotelium Aorta Tikus Diabetes Mellitus. <http://repository.ipb.ac.id>.
- Gross, J. 1991. *Pigments In Vegetables Chlorophylls and Carotenoids*. An Avi Book. New York.
- Gutteridge, J.M.C. dan Halliwell, B. 1996. *Antioxidant in Nutrition, Health, and Disease*. Oxford University Press Inc., New York.
- Hanani, E., Mun'im, A. dan Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **Vol. 2 No.3** Desember 2005. 127-133.
- Handayani, T., Sutarno dan Setyawan, A.D. 2004. Analisis Komposisi Nutrisi Rumput Laut *Sargassum crassifolium* J. Agardh. *Biofarmasi* **2 (2)**: 45-52.
- Hardiana, R., Rudiyanasyah dan Zaharah, T.A. 2012. Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Fenol dari Beberapa Jenis tumbuhan Famili Malvaceae. *JKK*, tahun 2012, volume **1 (1)**, halaman 8-13.
- Hart, H. 1983. *Kimia Organik*. Houghton Mifflin Co. Michigan State University. USA. Alih Bahasa Dr. Suminar Achmadi Ph.D. Erlangga: Jakarta.
- Hart, H., Craine, L.E and Hart, D.J. 2003. *Organic Chemistry (Kimia Organik)*. Achmadi S.S. penerjemah. Erlangga: Jakarta.
- Huda, N. 2001. Pengaruh Pemberian *Crude Fucoidan* Rumput Laut *Sargassum filipendula* terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Wistar (*Rattus novergicus*). *Thpi student journal*, vol. **1** no. **1** pp 21-30 Universitas Brawijaya.
- Hutajulu, T.F., Hartanto, E.S. dan Subagia. 2008. Proses Ekstraksi Zat Warna Hijau Klorofil Alami untuk Pangan dan Karakterisasinya. *Jurnal Riset Industri* **Vol.2, No. 1**: 44-55.
- Indriani, H. dan Sumarsih. 1992. *Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut*. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Jeffrey, S.N., Mantoura, R.F.C., dan Wright, S.W. 1997. *Phytoplankton Pigment In Oceanography Guidelines to Modern Methods*. Paris. UNESCO.
- Joshua, M. 2010. *Pelarut Organik*. <http://marnalajoshua.wordpress.com> diakses pada tanggal 23 Mei 2014 pukul 08.57.
- Julyasih, K.S.M., Wirawan, I.G.P., Harijani, W.S. dan Widajati, W. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (*Seaweeds*) Komersial di Bali. Seminar Nasional oleh Fak. Pertanian & LPPM UPN "Veteran": Surabaya.
- Juniarti. 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (DPPH) dari Ekstrak Daun Saga.



- Ketaren, S. 1986. Minyak dan Lemak Pangan. UI-Press: Jakarta.
- Khamsah S.M., Akowah G., dan Zhari, I. 2006. Antioxidant activity and Phenolic Content of *Orhosiphon stamineus* Benth from Different Geographical Origin. *J Sust Sci Management* **1**:14-20.
- Kumalaningsih, S. 2006. Antioksidan Alami: Penangkal Radikal Bebas (Sumber, Manfaat, Cara Penyediaan dan Pengolahan). Trubus Agrisrana: Surabaya.
- Kuncahyo, I. dan Sunardi. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*, L.) terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH). Seminar Nasional Teknologi (SNT 2007). Universitas Setia Budi: Yogyakarta.
- Kuntorini, E.M., Astuti, M.D. dan Milina, N. 2011. Struktur Anatomi dan Kerapatan Sel Sekresi serta Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) asal Kecamatan Pengaron Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan. *Bioscientic* **Vol. 8 No.1**.
- Kusmita, L. dan Limantara, L. 2009. The Influence of Strong and Weak Acid upon Aggregation and Pheophytinization of Chlorophyll a dan b. Indo. *J. Chem.*, 2009, **9 (1)**, 70-76.
- Limantara, L. 2007. Buku Panduan Praktikum. Widya Sari: Salatiga.
- Limantara, L. dan Puji Rahayu. 2008. Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami Hal. : 2-42.
- Limantara, L. dan Heriyanto. 2010. Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Cokelat dari Perairan Madura dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Ilmu Kelautan*. **Vol. 15 (1)**: 23-32.
- Luning, K. 1990. Seaweed; The Enveronmet, Biogeography and Ecophysiology. Jhon Willey and Sons. Inc. New York.
- Maulida, D. dan Zulkarnaen, N. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran, n-Heksana, Aseton dan Etanol. Skripsi. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Manule, S. 2010. Isolasi Identifikasi Klorofil a dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada Alga Coklat (*Sargassum filipendula*). Skripsi. FPIK UB: Malang.
- Mardaningsih, F., Andriani, M.A.M. dan Kawiji. 2012. Pengaruh Konsentrasi Etanol dan Suhu *Spray Dryer* terhadap Karakteristik Bubuk Klorofil Daun Alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan Menggunakan Binder Maltodekstrin. *Jurnal Teknosains Pangan* **Vol. 1. No. 1** Oktober 2012.
- Marks, A. dan Smitch. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach (Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinik). Pendit B. Penerjemah. Buku Kedokteran: Jakarta.

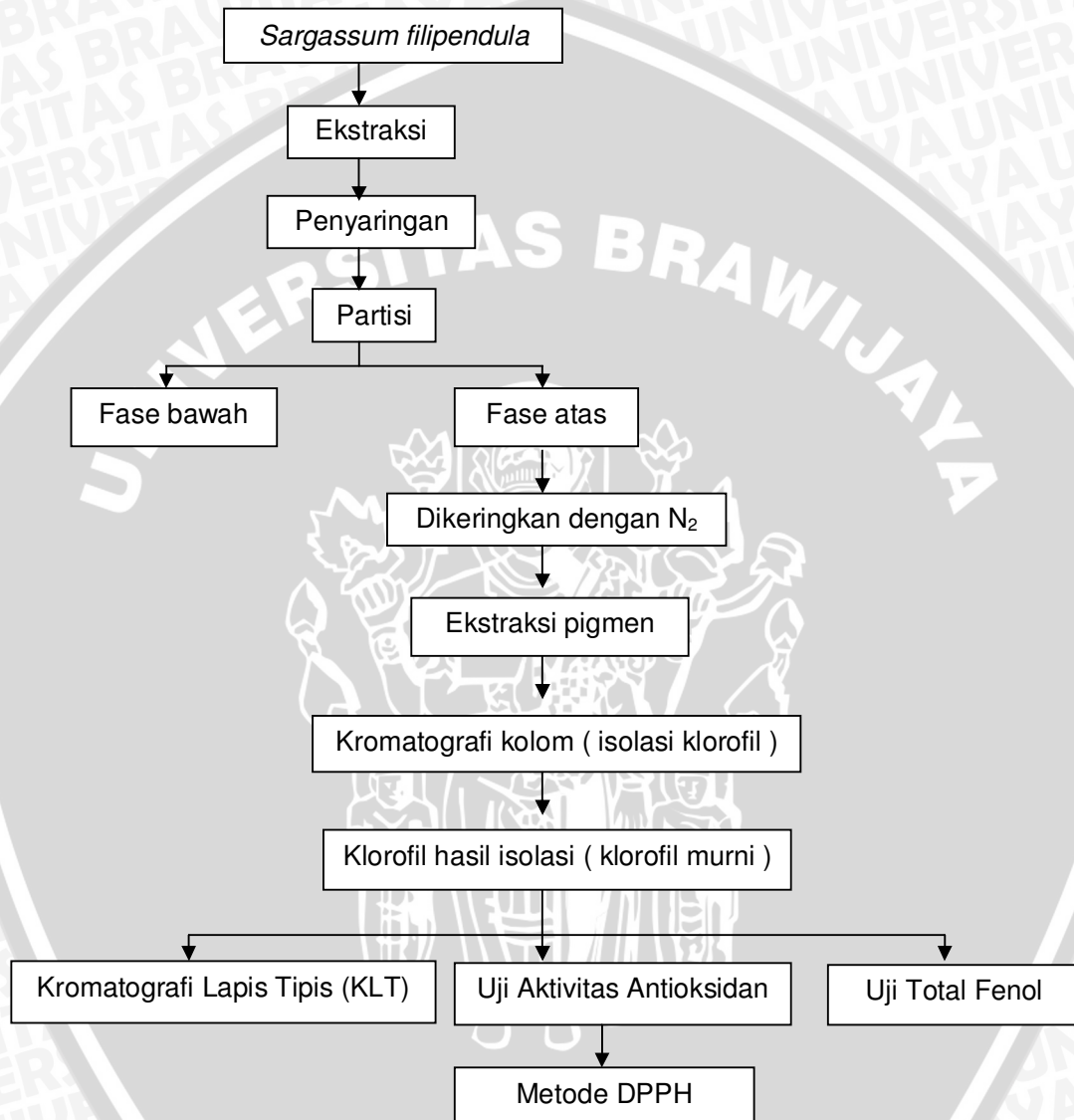
- Merdekawati, W. dan Susanto, A.B. 2014. Biopigmen Rumput Laut: Beberapa Penelitian di Indonesia serta Prospeknya.
- Mori K., Ooi, T., Hiraoka, M., Oka, N., Hamada H., Tamura, M., and Kusumi, T. 2004. Fucoxanthin and its Metabolites in Edible Brown Algae Cultivated in Deep Seawater. *Marine Drugs*. **2**:63-72.
- Muamar, H. A. 2009. Termostabilitas Pigmen Fukosantin, Klorofil a dan Ekstrak Kasar *Padina australis* dan *Sargassum polycystum* Terhadap Suhu dan Lama Pemanasan yang Berbeda. Skripsi. Program Studi THP. FPIK UB: Malang.
- Naufalin, R dan Rukmini, H.S. 2010. Potensi Antioksidan Hasil Ekstraksi Tanaman Kecombrang (*Nicolaia Speciosa horan*) selama Penyimpanan. Seminar Nasional Membangun Daya Saing Produk Pangan Berbasis Bahan Baku Lokal di Surakarta 8 Juni 2010.
- Nurchayanti, A.D.R. dan Limantara, L. 2007. Fotodegradasi Ekstrak Kasar, Klorofil a dan Focoxantin *Padina australis* dan *Dictyota crenulata*. Prosiding Seminar Nasional Pigmen, Universitas Kristen Atya Wacana, Salatiga 243-260.
- Nurdiana, D.N. dan Limantara, L. 2008. Ragam Pigmen Rumput Laut Cokelat: Potensi dan Aplikasi. Departemen Biologi. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Palallo, A. 2013. Distribusi Makroalga pada Ekosistem Lamun dan Terumbu Karang di Pulau Bonebatang, Kecamatan Ujung Tanah, Kelurahan Barrang Lompo, Makassar. Skripsi. FIKP. Universitas Hasanudin: Makassar.
- Pangestuti, R., Limantara, L. dan Susanto. 2007. Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystum* C.A. Agardh. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami, Hal : 201-209.
- Pereira, A.L.F, T. F Vidal; M. C. Teixeira; P F Oliveira; R. C F. F. Pompeu; M. M. M. Vieira; J. F. F. Z. 2009. Antioxidant effect of mango seed extract and butylated hydroxytoluene in bologna-type mortadella during storage. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol.31 no.1 Campinas Jan./Mar. 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000100019>.
- Prangdimurti, E., Mughtadi, E., Astawan, M. dan Zakaria, F.R. 2006. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Suji (*Pleomele angustifolia N.E Brown*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **Vol. 8 No. 2** Tahun 2006.
- Putnarubun, C. dan Dangeubun, J.L. 2009. Isolasi dan Karakterisasi Pigmen Plastida dari Rumput Laut. *Percikan*: **Vol. 104** Edisi September 2009.
- Putram, N.M. 2013. Pengaruh Lama Ekstraksi Alga Cokelat (*Sargassum echinocarpum*) dan Konsentrasi Dekstrin Terhadap Aktivitas Antioksidan Serbuk *Effervescent* Ekstrak Kasar Alga Cokelat (*Sargassum echinocarpum*). Skripsi. FPIK UB: Malang.

- Riyadi D. 2009. Pemanfaatan Rumput Laut (*Euचेuma cottonii*) dalam Pembuatan Manisan dengan Penambahan Kayu Manis. [Skripsi]. Bogor: Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Sambada, E. 2011. Antioksidan dan Radikal Bebas. (on line) [http:// Antioksidan dan Radikal Bebas\\_edhisambada.html](http://Antioksidan%20dan%20Radikal%20Bebas_edhisambada.html) diakses pada tanggal 24 Januari 2014 3:42 AM.
- Sanjaya, Y.A. 2011. Proses Ekstraksi dan Karakterisasi Ekstrak Antioksidan dari Rumput Laut Hijau (*Caulerpa racemosa*) menggunakan Teknik Ultrasonik (Kajian Lama Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan dan Pelarut). Thesis. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. UB: Malang.
- Sanjoto, P., Z. Nurdiana dan Juniarta, I.P. 2014. Efek Ekstrak Alga Coklat (*Sargassum sp.*) terhadap Densitas Protein Caspace 9 pada Kultur Sel Hela (Suatu Pengamatan dengan Menggunakan Metode Pewarnaan Imunositokimia). FKUB: Malang.
- Santoso D; Utama S; Mahrus Z; Fauzan F; Oktavia R; Supriyadi S; Kartawijaya W. 2004. Manfaat dan Bahaya Bahan Tambahan Pangan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Saptasari, M. 2010. Variasi Ciri Morfologi dan Potensi Makroalga Jenis *Caulerpa* di Pantai Kondang Merak Kabupaten Malang. *El-Hayah Vol. 1, No. 2:* 19-22.
- Sastrohamidjojo, H. 1985. Kromatografi. Liberty : Yogyakarta.
- Savitri, H.D. dan Veronica. 2007. Proses Produksi Dietil Eter dengan Dehidrasi Etanol pada Fase Cair. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro: Semarang.
- Sedjati, S., Yudiati, E. dan Suryono. 2012. Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut *Spirulina sp.* dan Potensinya sebagai Pewarna Alami. *Ilmu Kelautan Vol. 17 (3):* 176-181.
- Selawa, W., Runtuwene, M.R.J. dan Citraningtyas, G. 2013. Kandungan Flavonoid dan Kapasitas Antioksidan total Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis.). *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT Vol. 2 No. 01.*
- Septiana, A.T. dan Asnani, A. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *AGROINTEK Vol.6, No. 1* Maret 2012.
- Setyaningsih. 2003. Pengaruh Perendaman Buah Nangka dalam Larutan Garam Kalsium terhadap Tekstur Buah Setelah Pembekuan. *Agrosains 17 (3):* 379-387.
- Shriner. A.I., Fuson, R.C., Curtin, D.Y., Herman, C.K.F., and Morili, T.C. 1980. The Systematic Identification of Organic Compound 6<sup>nd</sup> Edition. John Willey and Sons Inc. Singapore.

- Sholihah, Q. dan Widodo, M.A. 2010. Pembentukan Radikal Bebas Akibat Gangguan Ritme Sirkadian dan Paparan Debu Batubara. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, **Vol.4, No. 2**: 89-100.
- Singarimbun, M. dan Effendi, S. 1989. Metode Penelitian Survei. Edisi Revisi. LP3ES: Jakarta.
- Sudarmadji S.B; Haryono; Suhardi. 1996. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Sumich, L. 1992. An Introduction to the Biology of Marine Life. Wmc. Brown. Dubuqne. Iowa.
- Swantara, D., Putra, A.A.B. dan Udayana, S. 2014. Identifikasi Senyawa Antiradikal Bebas pada Rumput Laut *Sargassum ringgoldianum*. *Jurnal Kimia* **6 (1)**: 23-28.
- Tamat, S.R., Wikanta, T. dan Maulina, L.S. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *ULva reticulate* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **Vol. 5, No. 1** Hal. 31-36.
- Toto, Z.A.D., Rahayu, P., Karwur, F.F., dan Limantara, L. 2006. Identifikasi dan Isolasi Pigmen Karotenoid Berbagai Jenis Kuning Telur Unggas. *Organisme*, **Vol I (2)** : 100-110.
- Tuarita, M. Z. 2013. Karakteristik Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Polifenol Teh Alga Coklat (*Sargassum cristafolium*) dengan pelarut Metanol. Skripsi. FPIK UB: Malang.
- Vogel, A.I. 1987. Textbook of Practical Organic Chemistry, Revised by Furnies, B.S. Fourth Edition. New York.
- Warsito. 2007. Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder dari Tanaman. Workshop Skrining Senyawa Bioaktif.
- Widyastuti, N. 2010. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC, DPPH, dan FRAP serta Korelasinya dengan Fenol dan Flavonoid pada Enam Tanaman. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. IPB: Bogor.
- Widjayanti, L. 2010. Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin *Padina australis* dan *Turbinaria conoides*. Skripsi. FPIK. UB: Malang.
- Winarno F.G. 1990. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia. Jakarta.
- Winarno F.G. 1996. Ilmu Gizi. Gramedia. Jakarta.
- Yunizal. 2004. Teknik Pengolahan Alginat. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Penelitian



**Lampiran 2.** Data Absorbansi

| Alga Coklat                  | Ulangan | Pengenceran | Absorbansi |
|------------------------------|---------|-------------|------------|
| <i>Sargassum filipendula</i> | 1       | $10^4$      | 1,054      |
|                              | 2       | $10^4$      | 1,059      |
|                              | 3       | $10^4$      | 1,054      |

**Lampiran 3.** Kadar Klorofil a

| Alga Coklat                  | Ulangan | Kandungan Klorofil a |
|------------------------------|---------|----------------------|
| <i>Sargassum filipendula</i> | 1       | 0,29 gram            |
|                              | 2       | 0,3 gram             |
|                              | 3       | 0,29 gram            |

**Lampiran 4.** Perhitungan Kadar Klorofil a

Hukum *Lambert-Beer*, yaitu:

$$A = \epsilon Lc$$

Keterangan:

A= absorbansi

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

L= lebar bagian dalam kuvet

c= konsentrasi (molar)

Ulangan 1:

Kadar Klorofil a

Absorbansi 1,054 pengenceran  $10^4$

$$A = \epsilon Lc$$

$$1,054 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$1,054 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}) \times c$$

$$C = \frac{1,054}{78,75 \times 10^3} (1 \text{ mol})$$

$$C = \frac{1,054}{78750} (1 \text{ mol})$$

$$C = 1,33 \times 10^{-5} (1 \text{ mol})$$

mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{v}$$

$$1,33 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{893,5} \times \frac{1000}{25 \text{ L}}$$

$$1,33 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{893,5} \times \frac{1}{25}$$

$$1,33 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{22337,5}$$

$$= 0,29893$$

Kadar klorofil a = 0,29 gr

Ulangan 2:

Kadar Klorofil a

$$1,059 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$1,059 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}) \times c$$

$$C = \frac{1,059}{78,75 \times 10^3} (1 \text{ mol})$$

$$C = \frac{1,059}{78750} (1 \text{ mol})$$

$$C = 1,34 \times 10^{-5} (1 \text{ mol})$$

mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{v}$$

$$1,34 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{893,5} \times \frac{1000}{25 \text{ L}}$$

$$1,34 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{893,5} \times \frac{1}{25}$$

$$1,34 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{22337,5}$$

$$= 0,3 \text{ gr}$$

Kadar klorofil a = 0,3 gr

Ulangan 3:

Kadar Klorofil a

Absorbansi 1,054 pengenceran  $10^4$

$$A = \epsilon Lc$$

$$1,054 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$1,054 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}) \times c$$

$$C = \frac{1,054}{78,75 \times 10^3} (1 \text{ mol})$$

$$C = \frac{1,054}{78750} (1 \text{ mol})$$

$$C = 1,33 \times 10^{-5} (1 \text{ mol})$$

mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{mr}} \times \frac{1000}{v}$$

$$1,33 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{893,5} \times \frac{1000}{25 \text{ L}}$$

$$1,33 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{893,5} \times \frac{1}{25}$$

$$1,33 \times 10^{-5} = \frac{\text{gr}}{22337,5}$$

$$= 0,29893 \text{ gr}$$

Kadar klorofil a = 0,29 gr

**Lampiran 5.** Data Rendemen

| Alga Coklat        | Ulangan | Gram Sampel | Rendemen (%) | Standart deviasi |
|--------------------|---------|-------------|--------------|------------------|
| <i>Sargassum</i>   | 1       | 100 gram    | 0,293 %      | 0,0000335        |
| <i>filipendula</i> | 2       | 100 gram    |              |                  |

**Lampiran 6.** Perhitungan Kadar Rendemen Klorofil a

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

$$\text{Ulangan 1} = \frac{0,29}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,29 \%$$

$$\text{Ulangan 2} = \frac{0,3}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,3 \%$$

$$\text{Ulangan 3} = \frac{0,29}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,29 \%$$

$$\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) = \frac{0,29+0,3+0,29}{3}$$

$$= 0,293 \%$$

Standart deviasi :

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

$$= \frac{(0,29 - 0,293)^2 + (0,3 - 0,293)^2 + (0,29 - 0,293)^2}{3 - 1}$$

$$= \frac{9^{-6} + 49^{-6} + 9^{-6}}{2}$$

$$= \frac{67^{-6}}{2}$$

$$S = 3,35^{-5}$$

Nilai rendemen = 0,293% ± 0,0000335

**Lampiran 7.** Pembuatan LarutanLarutan Ekstraksi

Metanol : Aseton (7:3 v/v) → membuat 300ml

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

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



Larutan Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom

- Heksan : Etil Asetat (8:2 v/v) → 200 ml

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

$$\text{Etil Asetat} = \frac{2}{10} \times 200 \text{ ml} = 40 \text{ ml}$$

- Heksan : Etil Asetat (7:3 v/v) → 200 ml

$$\text{Heksan} = \frac{7}{10} \times 200 \text{ ml} = 140 \text{ ml}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{3}{10} \times 200 \text{ ml} = 60 \text{ ml}$$

- Heksan : Etil Asetat (6:4 v/v) → 200 ml

$$\text{Heksan} = \frac{6}{10} \times 200 \text{ ml} = 120 \text{ ml}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{4}{10} \times 200 \text{ ml} = 80 \text{ ml}$$

- Heksan : Etil Asetat (5:5 v/v) → 200 ml

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

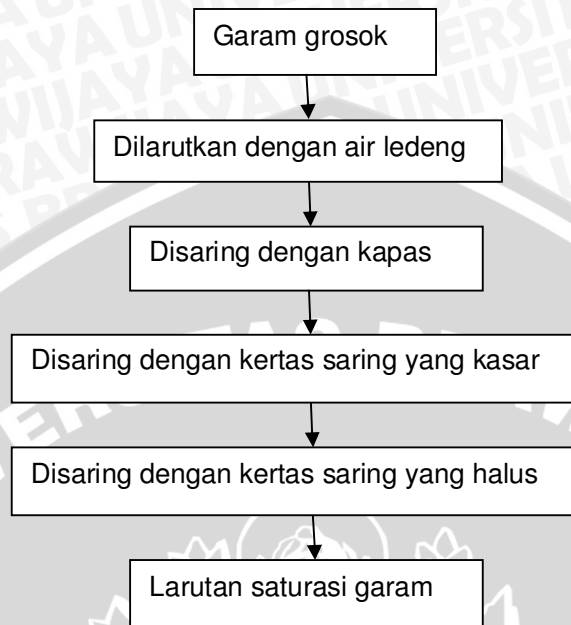
$$\text{Etil Asetat} = \frac{5}{10} \times 200 \text{ ml} = 100 \text{ ml}$$

Larutan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- Heksan : Aseton (7:3 v/v) → 10 ml

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

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

**Lampiran 8.** Pembuatan Saturasi Garam**Lampiran 9.** Perhitungan Nilai Rf Klorofil a dari hasil KLT

$$R_f \text{ (Retardation factor)} = \frac{\text{Jarak yang di tempuh pigmen}}{\text{panjang KLT}}$$

$$= \frac{1,5}{3,5}$$
$$= 0,42$$

**Lampiran 10.** Daftar warna yang diperoleh pada isolasi pigmen dengan kromatografi kolom  
Ulangan 1

| Botol | Waktu | Keterangan                 |    |       |                     |
|-------|-------|----------------------------|----|-------|---------------------|
| 1     | 07.45 | Fase gerak (pelarut)       | 35 | 11.39 | -                   |
| 2     | 08.00 | -                          | 36 | 11.49 | -                   |
| 3     | 08.05 | Kuning ( $\beta$ -karoten) | 37 | 11.58 | -                   |
| 4     | 08.10 | Kuning ( $\beta$ -karoten) | 38 | 12.10 | -                   |
| 5     | 08.15 | Fase antara                | 39 | 12.21 | -                   |
| 6     | 08.23 | -                          | 40 | 12.33 | -                   |
| 7     | 08.30 | -                          | 41 | 12.43 | -                   |
| 8     | 08.33 | -                          | 42 | 12.49 | -                   |
| 9     | 08.40 | -                          | 43 | 12.54 | -                   |
| 10    | 08.48 | -                          | 44 | 13.04 | -                   |
| 11    | 08.55 | -                          | 45 | 13.16 | -                   |
| 12    | 09.01 | -                          | 46 | 13.20 | -                   |
| 13    | 09.06 | -                          | 47 | 13.24 | -                   |
| 14    | 09.10 | -                          | 48 | 13.28 | Hijau kuning bening |
| 15    | 09.16 | -                          | 49 | 13.35 | Hijau kuning bening |
| 16    | 09.22 | Biru (Klorofil a)          | 50 | 13.42 | Kuning              |
| 17    | 09.27 | Biru (Klorofil a)          | 51 | 13.52 | Kuning              |
| 18    | 09.30 | Biru (Klorofil a)          | 52 | 13.57 | Kuning              |
| 19    | 09.33 | Biru (Klorofil a)          | 53 | 14.04 | Kuning              |
| 20    | 09.38 | Biru (Klorofil a)          | 54 | 14.12 | Kuning              |
| 21    | 09.43 | Biru (Klorofil a)          | 55 | 14.18 | Kuning orange       |
| 22    | 09.45 | Biru (Klorofil a)          | 56 | 14.25 | Kuning orange       |
| 23    | 09.50 | Hijau bening               | 57 | 14.31 | Kuning orange       |
| 24    | 10.00 | -                          | 58 | 14.38 | Kuning orange       |
| 25    | 10.07 | -                          | 59 | 14.46 | Kuning orange       |
| 26    | 10.15 | -                          | 60 | 14.52 | Kuning orange       |
| 27    | 10.23 | -                          | 61 | 14.59 | Kuning orange       |
| 28    | 10.30 | -                          | 62 | 15.07 | Kuning orange       |
| 29    | 10.40 | -                          | 63 | 15.16 | Kuning orange       |
| 30    | 10.53 | -                          | 64 | 15.25 | Kuning orange       |
| 31    | 11.05 | -                          | 65 | 15.36 | Kuning orange       |
| 32    | 11.13 | -                          | 66 | 15.44 | Kuning              |
| 33    | 11.22 | -                          | 67 | 15.53 | Kuning              |
| 34    | 11.31 | -                          | 68 | 15.58 | Kuning              |
|       |       |                            | 69 | 16.04 | Kuning              |

Ulangan 2

| Botol | Waktu | Keterangan                 |
|-------|-------|----------------------------|
| 1     | 11.13 | Kuning ( $\beta$ -karoten) |
| 2     | 11.20 | Kuning ( $\beta$ -karoten) |
| 3     | 11.26 | Fase antara                |
| 4     | 11,34 | -                          |
| 5     | 11.41 | -                          |
| 6     | 11.49 | -                          |
| 7     | 11.57 | -                          |
| 8     | 12.05 | -                          |
| 9     | 12.13 | -                          |
| 10    | 12.26 | Bening kehitaman           |
| 11    | 12.37 | -                          |
| 12    | 12.43 | Fase antara                |
| 13    | 12.51 | -                          |
| 14    | 12.55 | -                          |
| 15    | 13.00 | -                          |
| 16    | 13.08 | -                          |
| 17    | 13.15 | -                          |
| 18    | 13.23 | -                          |
| 19    | 13.30 | -                          |
| 20    | 13.34 | Biru kehijauan bening      |
| 21    | 13.37 | Biru (Klorofil a)          |
| 22    | 13.42 | Biru (Klorofil a)          |
| 23    | 13.46 | Biru (Klorofil a)          |
| 24    | 13.50 | Biru (Klorofil a)          |
| 25    | 13.54 | Biru (Klorofil a)          |
| 26    | 13.59 | Biru (Klorofil a)          |
| 27    | 14.04 | Biru (Klorofil a)          |
| 28    | 14.09 | Biru hijau                 |
| 29    | 14.14 | Biru hijau                 |
| 30    | 14.20 | Hijau                      |
| 31    | 14.26 | Hijau                      |
| 32    | 14.33 | Hijau bening               |
| 33    | 14.40 | Hijau bening               |
| 34    | 14.45 | Hijau bening               |
| 35    | 14.55 | Fase antara                |
| 36    | 14.58 | -                          |
| 37    | 15.02 | -                          |
| 38    | 15.06 | -                          |
| 39    | 15.10 | -                          |
| 40    | 15.14 | -                          |
| 41    | 15.18 | -                          |
| 42    | 15.21 | -                          |
| 43    | 15.25 | -                          |
| 44    | 15.29 | -                          |
| 45    | 15.33 | -                          |
| 46    | 15.36 | -                          |
| 47    | 15.41 | -                          |
| 48    | 15.46 | -                          |
| 49    | 15.50 | -                          |

|    |       |               |
|----|-------|---------------|
| 50 | 15.54 | -             |
| 51 | 15.57 | -             |
| 52 | 16.01 | -             |
| 53 | 16.05 | -             |
| 54 | 16.09 | -             |
| 55 | 16.13 | -             |
| 56 | 16.17 | -             |
| 57 | 16.20 | -             |
| 58 | 16.24 | -             |
| 59 | 16.28 | -             |
| 60 | 16.32 | -             |
| 61 | 16.37 | -             |
| 62 | 16.41 | -             |
| 63 | 16.54 | -             |
| 64 | 16.58 | -             |
| 65 | 17.04 | -             |
| 66 | 17.12 | -             |
| 67 | 17.04 | -             |
| 68 | 17.12 | Kuning bening |
| 69 | 17.20 | Kuning bening |
| 70 | 17.26 | Kuning orange |
| 71 | 17.33 | Kuning orange |
| 72 | 17.39 | Kuning orange |
| 73 | 17.47 | Kuning orange |
| 74 | 17.54 | Kuning orange |
| 75 | 17.59 | Kuning orange |
| 76 | 18.05 | Kuning orange |
| 77 | 18.11 | Kuning orange |
| 78 | 18.18 | Kuning orange |
| 79 | 18.24 | Kuning        |
| 80 | 18.32 | Kuning        |
| 81 | 18.38 | -             |
| 82 | 18.46 | -             |
| 83 | 18.54 | -             |

**Lampiran 11.** Contoh perhitungan konsentrasi uji aktivitas antioksidan

• DPPH

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{1000}{V}$$

$$0,001 M = \frac{g}{394,33} \times \frac{1000}{50}$$

$$0,001 \times 394,33 = 20 \text{ g}$$

$$0,01971 = \text{g}$$

$$19,71 = \text{mg}$$

DPPH sebanyak 19,71 mg dilarutkan dalam etanol sampai 50 ml

- Perhitungan pembuatan larutan stok sampel klorofil *a* *Sargassum filipendula* dan pengenceran larutan stok sampel klorofil *a* *Sargassum filipendula*

| Konsentrasi (ppm) | Volume stok sampel produk klorofil <i>a</i> <i>S.filipendula</i> yang diambil | Volume aseton p.a yang ditambahkan |
|-------------------|---|------------------------------------|
| 5                 | 1 ml  | 3ml                                |
| 10                | 2ml   | 2ml                                |
| 15                | 3ml   | 1ml                                |
| 20                | 4ml   | 0                                  |

Perhitungan:

- Volume yang akan dibuat untuk stok sampel klorofil *a* *Sargassum filipendula* = 10ml
- Volume total campuran dalam kuvet untuk uji spektrofotometer = 4ml

$$\text{Stok sampel } 20\text{ppm} = \frac{20 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000\text{ml}} \times 10\text{ml} = 0,2 \text{ mg}$$

Ekstrak sebanyak 0,2 mg dilarutkan dalam aseton p.a sampai 10ml.

Pengenceran larutan stok klorofil *a*:

Konsentrasi 5 ppm

$$V1 \times M2 = V2 \times M1$$

$$V1 \times 20 \text{ ppm} = 4 \text{ ml} \times 5 \text{ ppm}$$

$$20 V1 = 20 \text{ ml}$$

$$V1 = 1\text{ml}$$

Konsentrasi 10 ppm

$$V1 \times M2 = V2 \times M1$$

$$V1 \times 20 \text{ ppm} = 4 \text{ ml} \times 10 \text{ ppm}$$

$$20 V1 = 40 \text{ ml}$$

$$V1 = 2\text{ml}$$

Konsentrasi 15 ppm

$$V1 \times M2 = V2 \times M1$$

$$V1 \times 20 \text{ ppm} = 4 \text{ ml} \times 15 \text{ ppm}$$

$$20 V1 = 60 \text{ ml}$$

$$V1 = 3\text{ml}$$

Konsentrasi 20 ppm

$$V1 \times M2 = V2 \times M1$$

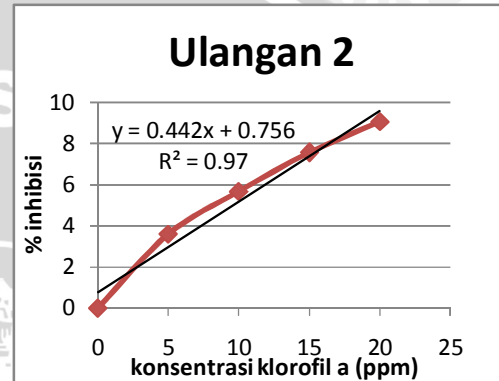
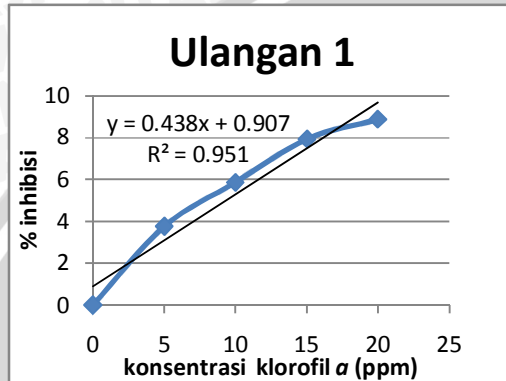
$$V1 \times 20 \text{ ppm} = 4 \text{ ml} \times 20 \text{ ppm}$$

$$20 V1 = 80 \text{ ml}$$

$$V1 = 4\text{ml}$$

**Lampiran 12.** Data absorbansi, %inhibisi, grafik hubungan antara konsentrasi klorofil a dengan % inhibisi dan perhitungan IC<sub>50</sub>

| No. | Konsentrasi (ppm) | Absorbansi |       | % Inhibisi |       | IC <sub>50</sub> |              | Rata-rata   |
|-----|-------------------|------------|-------|------------|-------|------------------|--------------|-------------|
|     |                   | 1          | 2     | 1          | 2     | 1                | 2            |             |
| 1.  | 0                 | 0,529      | 0,529 | 0          | 0     |                  |              |             |
| 2.  | 5                 | 0,509      | 0,51  | 3,781      | 3,592 | 112,0845 ppm     | 111,4118 ppm | 111,748 ppm |
| 3.  | 10                | 0,498      | 0,499 | 5,86       | 5,671 |                  |              |             |
| 4.  | 15                | 0,487      | 0,489 | 7,94       | 7,561 |                  |              |             |
| 5.  | 20                | 0,482      | 0,481 | 8,885      | 9,074 |                  |              |             |



$$y = 0,438x + 0,907$$

$$R^2 = 0,951$$

$$50 = 0,438x + 0,907$$

$$50 - 0,907 = 0,438x$$

$$49,093 = 0,438x$$

$$x = 112,0845$$

$$y = 0,442x + 0,756$$

$$R^2 = 0,97$$

$$50 = 0,442x + 0,756$$

$$50 - 0,756 = 0,442x$$

$$49,244 = 0,442x$$

$$x = 111,4118$$

Pengukuran spektrofotometer UV-Vis menghasilkan nilai absorbansi untuk sampel klorofil a. Nilai absorbansi masing-masing sampel dimasukkan ke dalam 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  $y = a + bx$  digunakan untuk mencari nilai IC<sub>50</sub> (*inhibitor concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC<sub>50</sub> menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%.

Perhitungan %inhibisi:

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

Ulangan 1 :

Abs blanko = 0,529

Konsentrasi 5 ppm

Abs sampel = 0,509

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,509}{0,529} \times 100\% = 3,781$$

Konsentrasi 10 ppm

Abs sampel = 0,498

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,498}{0,529} \times 100\% = 5,86$$

Konsentrasi 15 ppm

Abs sampel = 0,487

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,487}{0,529} \times 100\% = 7,94$$

Konsentrasi 20 ppm

Abs sampel = 0,482

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,482}{0,529} \times 100\% = 8,885$$

Ulangan 2 :

Abs blanko = 0,529

Konsentrasi 5 ppm

Abs sampel = 0,51

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,51}{0,529} \times 100\% = 3,592$$

Konsentrasi 10 ppm

Abs sampel = 0,499

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,499}{0,529} \times 100\% = 5,671$$

Konsentrasi 15 ppm

Abs sampel = 0,489

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,489}{0,529} \times 100\% = 7,561$$

Konsentrasi 20 ppm

Abs sampel = 0,481

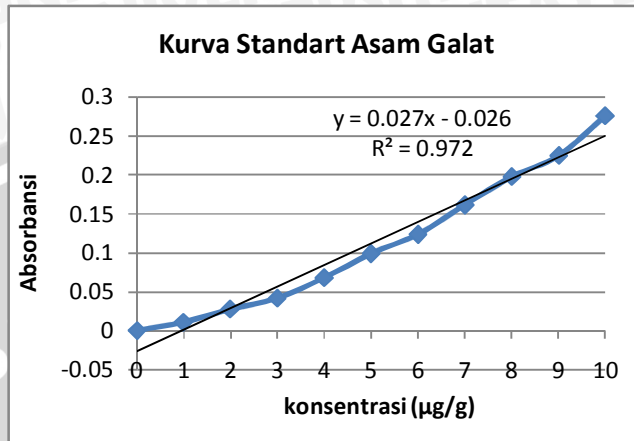
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{0,529 - 0,481}{0,529} \times 100\% = 9,074$$



**Lampiran 13. Penentuan Total Fenol**

Larutan Asam Galat

| Konsentrasi (µg/g) | Absorbansi |
|--------------------|------------|
| 0                  | 0          |
| 1                  | 0,011      |
| 2                  | 0,028      |
| 3                  | 0,042      |
| 4                  | 0,068      |
| 5                  | 0,099      |
| 6                  | 0,124      |
| 7                  | 0,162      |
| 8                  | 0,198      |
| 9                  | 0,225      |
| 10                 | 0,276      |



Kandungan Total Fenol Klorofil a Sargassum filipendula

| No. | Ulangan | ml sampel | Absorbansi | Total Fenol (mg GAE/g sampel) | Rata-rata Total Fenol (mg GAE/g sampel) |
|-----|---------|-----------|------------|-------------------------------|---|
| 1.  | 1       | 2ml       | 0,264      | 0,01074                       | 0,010815                                |
| 2.  | 2       | 2ml       | 0,268      | 0,01089                       |   |

Perhitungan:

- Ulangan 1

Y absorbansi = 0,264

$$Y = 0,027x - 0,026$$

$$0,264 = 0,027x - 0,026$$

$$0,264 + 0,026 = 0,027x$$

$$0,29 = 0,027x$$

$$x = 10,74 \text{ mg GAE/mg} \rightarrow x = 0,01074 \text{ mg GAE/g}$$
- Ulangan 2

Y absorbansi = 0,268

$$Y = 0,027x - 0,026$$

$$0,268 = 0,027x - 0,026$$

$$0,268 + 0,026 = 0,027x$$

$$0,294 = 0,027x$$

$$x = 10,89 \text{ mg GAE/mg} \rightarrow x = 0,01089 \text{ mg GAE/g}$$



**Lampiran 14. Gambar Proses Penelitian**



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Keterangan: Proses ekstraksi

- (a). Pencucian alga coklat
- (b). Pengeringan dan pemotongan
- (c). Penimbangan alga coklat
- (d). Penambahan  $\text{CaCO}_3$
- (e). Penambahan pelarut
- (f). Proses ekstraksi (maserasi)



(g) Proses penyaringan



(h)



(i)



(j)

Keterangan: Proses Fraksinasi

- (h). 2 fase yang terbentuk (fase atas dan fase bawah)
- (i). Fase atas yang digunakan
- (j). Fase bawah yang tidak digunakan



(k)



(l)

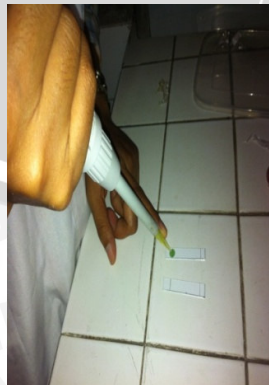
Keterangan:

(k). Proses evaporasi

(l). Pengeringan sampel dengan gas N<sub>2</sub>



(m). Proses kromatografi kolom



(n). Proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

