

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN FUKOSANTIN ALGA COKLAT
Sargassum cristaefolium SEGAR DAN "TEH"**

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

Oleh :
**INTAN RISKI FEBRISARI
NIM. 105080301111035**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



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

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN FUKOSANTIN ALGA COKLAT
Sargassum cristaefolium SEGAR DAN "TEH"**

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

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

Oleh :
**INTAN RISKI FEBRISARI
NIM. 105080301111035**



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

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PIGMEN FUKOSANTIN ALGA COKLAT
Sargassum cristaefolium SEGAR DAN "TEH"

Oleh :
INTAN RISKI FEBRISARI
NIM. 105080301111035

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 13 Agustus 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. : _____
Tanggal : _____

Dosen Penguji I

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

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

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

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Arning Wilujeng E, 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,

INTAN RISKI FEBRISARI
NIM. 105080301111035

RINGKASAN

Intan Riski Febrisari.105080301111035. Laporan Skripsi Judul Aktivitas Antioksidan Pigmen Fukosantin Alga Coklat (*Sargassum cristefolium*) Segar dan "Teh". Dibawah bimbingan **Dr.Ir.HARTATI KARTIKANINGSIH,MS** dan **Dr.Ir. YAHYA, MP.**

Fukosantin merupakan pigmen berwarna oranye dapat diekstrak dan didapatkan dari rumput laut alga coklat *Sargassum cristaefolium*. Namun antioksidan yang terkandung pada rumput laut atau alga coklat belum diketahui secara pasti, maka dari itu perlu adanya penelitian seperti yang dilakukan ini agar kita dapat mengetahui secara pasti ada tidaknya aktivitas antioksidan pada alga coklat tersebut. Alga coklat sering dianggap sebagai sampah laut karena pada musim tertentu banyak yang hanyut di permukaan laut dan terdampar dipantai karena patah akibat ombak yang besar. Namun sekarang ini jenis alga coklat sudah banyak digunakan untuk keperluan manusia. Salah satunya adalah pemanfaatan rumput laut coklat dalam bidang industri, diantaranya untuk industri makanan, minuman selain itu pigmen fukosantin juga memiliki berbagai macam pengaruh yang menguntungkan dalam kesehatan manusia yaitu sebagai antioksidan dalam tubuh.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Muhammadiyah Malang, Laboratorium MRCPP (*Ma Chung Research for Photosynthetic Pigments*) Universitas *Ma chung* Malang pada bulan Maret – Juni 2014.

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan data kadar antioksidan pigmen fukosantin pada sampel *Sargassum cristefolium* segar dan "teh". Pada penelitian ini metode yang digunakan yaitu metode eksploratif-diskriptif dimana pada metode eksploratif ini pigmen fukosantin Identifikasi menggunakan KLT, Spektrofotometer dan HPLC untuk mengidentifikasi pigmen fukosantin. Sedangkan untuk mengetahui kandungan antioksidan pada fukosantin menggunakan uji DPPH serta untuk mengetahui warna pada pigmen yaitu menggunakan uji L, a, b, dan untuk metode diskriptifnya sendiri yaitu menggunakan uji T yaitu untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan atikosidan pigmen fukosantin dari alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh".

Hasil penelitian menunjukkan fukosantin pada sampel segar 446nm dan "teh" mengalami pergeseran panjang gelombang (hipsokromik) yaitu 446,6nm. Hasil uji HPLC pada sampel segar didapatkan waktuambat 6,42 menit dan sampel "teh" 6,456 menit. Sedangkan analisa DPPH didapatkan kadar kandungan IC₅₀ sampel segar 134,23 ppm dan sampel "teh" didapatkan 139,494 ppm. Berdasarkan hasil penelitian ini pada sampel pigmen fukosantin segar dan "teh" masih ditemukan adanya kandungan antioksidan.

KATA PENGANTAR

Atas berkat rahmat dan karunia Allah SWT, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Aktivitas Antioksidan Pigmen Fukosantin Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* Segar dan “Teh”. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

- 1.** Allah S.W.T atas segala kemudahan dan rahmat yang telah diberikan kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan laporan skripsi ini.
- 2.** Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS, dan Dr. Ir. Yahya,MP selaku dosen Pembimbing atas segala bimbingan, pengarahan, motivasi dan masukan yang telah diberikan kepada penulis sejak penyusunan usulan Skripsi sampai dengan selesainya penyusunan laporan Skripsi.
- 3.** Keluarga terutama Ibuk, Bapak yang selalu mendo'akan member dukungan moril maupun spiritual kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan ini dengan semangat
- 4.** Mbak Lisa, Hosnatus yang selalu membantu penelitian kami. Dan teman-teman tim pigmen yang selalu bersama-sama dari pagi sampai larut malam. Hafid dan Adiwira terima kasih atas semangat dan kerja keras kalian selama ini.
- 5.** Teman-teman seperjuangan penelitian Tim Bunda Elda, Rani, Bias, Tacik, Alin, Desty, Mbok, Desy, Tubagus, Agnes yang memberikan masukan, informasi yang sangat membantu penulis.

- 6.** Teman – teman kost Mbak tety, ana, elisa dan yitania yang selalu mendukung penulis dan mengasih supoard penululis sehingga penulis semangat dalam mengerjakan laporan ini.
- 7.** Teman-teman THP'2010 yang selalu memberikan suport kepada penulis.
- 8.** Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikanya laporan skripsi ini, saya mengucapkan banyak terimakasih.

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

Malang, 13 Juli 2014

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian.....	3
1.5 Waktu dan Tempat.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Sargassum cristaefolium</i>	4
2.2 Antioksidan.....	7
2.3 Fukosantin.....	8
2.4 Ekstrak Pigmen.....	10
2.5 Partisi.....	12
2.6 Kromatografi Kolom.....	15
2.7 Analisis Kuantitatif Fukosantin.....	16
2.7.1 Kromatografi Kolom Lapis Tipis.....	16
2.7.2 Spektrofotometer Uv-Vis.....	18
2.7.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	19
2.7.4 Derajat Hue.....	19
3. METODE PENELITIAN	
3.1. Bahan Penelitian.....	21
3.2 Alat Penelitian.....	21
3.3 Metode Penelitian.....	22
3.4 Persiapan Sampel.....	23
3.4.1 Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen.....	25
3.4.2 Isolasi Fukosantin.....	29
3.4.3 Kromatografi Kolom Lapis Tipis.....	30
3.5 Prosedur Analisis Parameter Uji.....	32
3.5.1 Spektrofotometer Uv-Vis.....	32
3.5.2 Analisa HPLC.....	33
3.5.3 DPPH.....	35
3.5.4 Intensitas Warna.....	36

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian..... 38

4.2 Pembahasan39

 4.2.1 Hasil Isolasi Fukosantin..... 39

 4.2.2 Identifikasi Fukosantin dengan KLT 40

 4.2.3 Identifikasi Fukosantin dengan Spektrofotometri UV-Vis 42

 4.2.4 Intensitas Warna (L,a,b) 45

 4.2.5 Analisis *High Pressuere Liquid Chromatography* (HPLC)..... 46

 4.2.6 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Metode DPPH..... 48

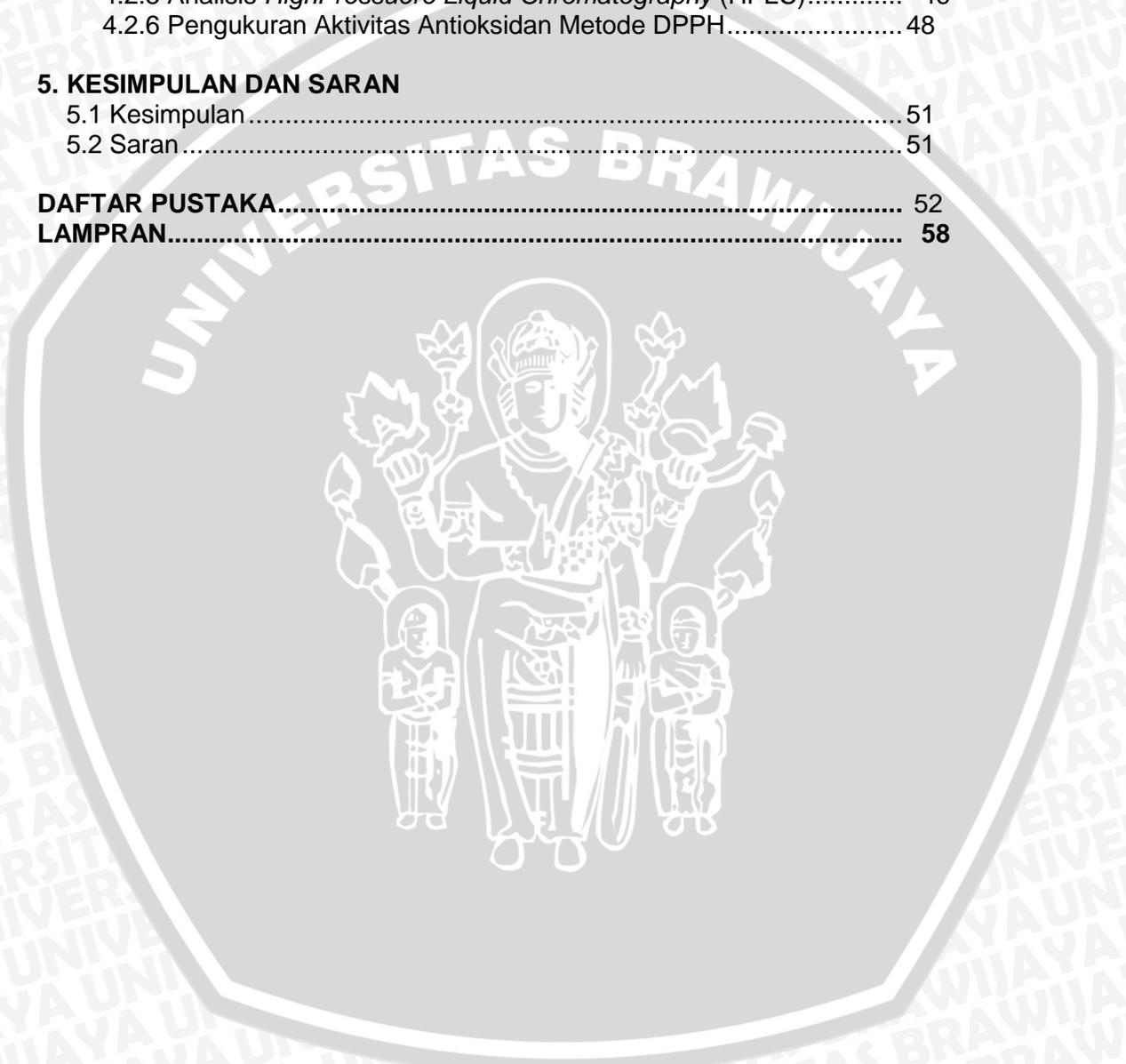
5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan 51

5.2 Saran 51

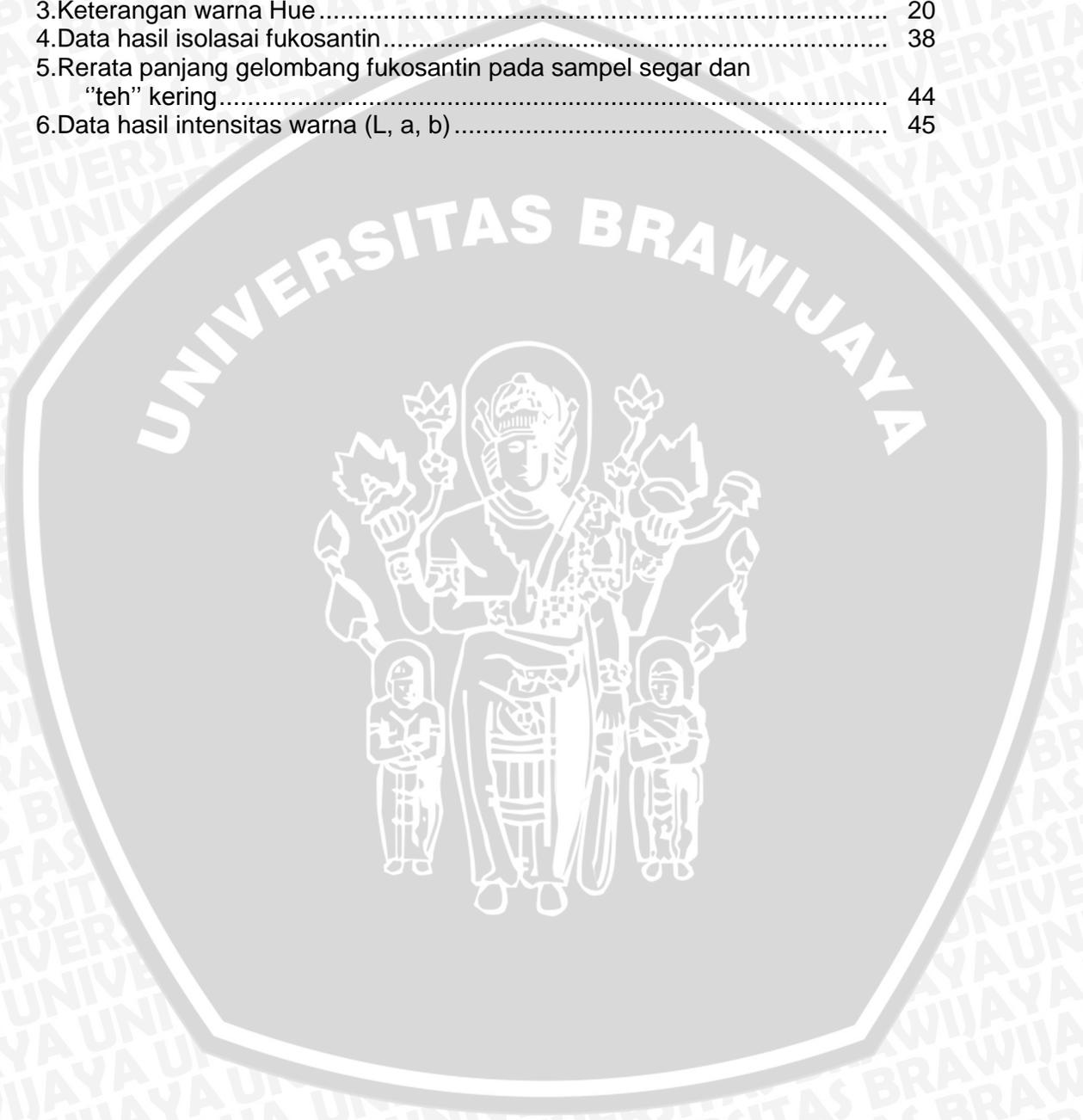
DAFTAR PUSTAKA..... 52

LAMPRAN..... 58



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1.Sifat – sifat fisik n-heksan	14
2. Syarat mutu etil asetat	15
3.Keterangan warna Hue	20
4.Data hasil isolasai fukosantin.....	38
5.Rerata panjang gelombang fukosantin pada sampel segar dan "teh" kering.....	44
6.Data hasil intensitas warna (L, a, b).....	45



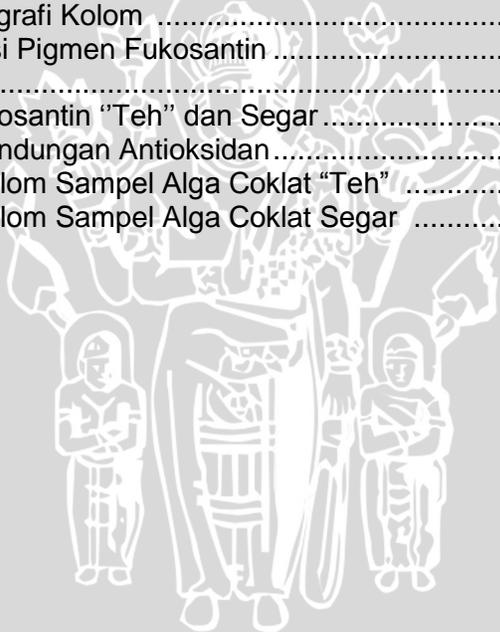
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum cristaefolium</i>	10
2. Struktur Fukosantin	16
3. Proses Kromatografi Kolom	17
4. Metode Kromatografi Lapis Tipis.....	18
5. Spektrofotometer UV-VIS.....	25
6. Persiapan Awal Sampel.....	28
7. Ekstraksi dan Fraksinasi untuk Isolasi Pigmen.....	31
8. Isolasi Fukosantin Dengan Kromatografi Kolom.....	32
9. Identifikasi Fukosantin Dengan KLT.....	33
10. Proses Analisis Dengan Spektrofotometer Uv-Vis	34
11. Analisa HPLC	36
12. Prosedur Analisa DPPH.....	37
13. Prosedur Pengukuran (L, a, b).....	39
14. Isolasi Pigmen Fukosantin	40
15. Hasil Isolasi Fukosantin	42
17. a. Pola Spektra Pigmen Fukosantin segar dalam pelarut aseton	43
b. Pola Spektra Pigmen Fukosantin "Teh" dalam pelarut aseton.....	43
c. Pola Spektra Fukosantin dalam pelarut aseton Jeffrey <i>et., al</i> (1997).....	43
18. a. Hasil HPLC waktu tambat Literatur Hegazi (1998)	47
b. Hasil HPLC waktu tambat sampel Segar Alga Coklat	47
c. Hasil HPLC waktu tambat sampel "Teh" Alga Coklat	47
19. Data Diagram batang IC_{50}	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alir Penelitian	58
2. Prosedur persiapan sampel dan pembuatan "Teh" Alga coklat	59
3. Prosedur Ekstraksi, Fraksinasi dan Pembuatan Silica Gel	61
4. Prosedur Kolom Kromatografi	64
5. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis	66
6. Prosedur Analisa Spektrofotometer dan Analisa KCKT	67
7. Prosedur Pembuatan Larutan, Fase Diam, Garam Grosok	68
8. Perhitungan Nilai Rf	70
9. Data Absorbansi	70
10. Kadar Fukosantin	70
11. Data Rendemen	70
12. Perhitungan Kadar Rendemen Fukosantin	70
13. Foto Pengolahan Teh	72
14. Foto Proses Ekstraksi	74
15. Foto Proses Partisi, Evaporator, dan Gas N ₂	75
16. Foto Proses Kromatografi Kolom	76
17. Foto Proses Identifikasi Pigmen Fukosantin	77
18. Hasil Analisa KCKT	78
19. Data Antioksidan Fukosantin "Teh" dan Segar	80
20. Data Analisa Uji T Kandungan Antioksidan	83
21. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat "Teh"	86
22. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat Segar	90



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alga coklat *Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu marga *Sargassum* dalam kelas *Phaeophyceae*. Ada 150 jenis marga *Sargassum* yang dijumpai di daerah perairan tropis, subtropis dan didaerah bermusim dingin. Habitat alga *sargassum* tumbuh diperairan pada kedalaman 0.5-10 m, ada arus dan ombak. Pertumbuhan alga ini sebagai makro alga bentik melekat pada substrat dasar perairan. Pada daerah tepi karang tumbuh membentuk rumpun besar, panjang thali utama mencapai 0,5-3 m dengan untaian cabang thali terhadap kantong udara (bladder), selalu muncul pada permukaan air (Fahri, 2010).

Selama ini dikalangan masyarakat alga coklat juga telah digunakan sebagai bahan baku berbagai jenis olahan makanan salah satunya adalah pembuatan minuman teh. Teh sebagai bahan minuman dibuat dari pucuk muda daun teh yang telah mengalami proses pengolahan seperti pelayuan, penggilingan dan pengeringan. Manfaat yang dihasilkan dari minuman teh ialah memberi rasa segar dan memulihkan kesehatan badan serta terbukti tidak menimbulkan dampak negative (Towaha, 2013).

Sargassum dalam bentuk segar dan "teh" masing – masing mengandung fukosantin dengan degradasi pada beberapa struktur isomernya akan tetapi tidak akan mengubah gugus alenik (Aminanti, 2013). Fukosantin merupakan karatenoid utama yang terdapat dalam rumput laut coklat dan di perkirakan hampir 10% dari total produksi karatenoid alami (Zailanie dan Sukoso, 2014). Pigmen fukosantin dapat ditemukan pada kloroplas rumput laut coklat, rumput laut coklat itu sendiri merupakan tanaman yang melimpah di Indonesia dan memiliki sebaran yang sangat tinggi antara lain kepulauan seribu, pulau komodo,

dan pulau ternate (Indriani dan Sumarsih, 1992). Fukosantin berwarna oranye dan termasuk kelompok santofil dan karatenoid, fukosantin memiliki aktivitas fungsional yang penting antara lain antimutagenik, antikanker dan antioksidan (Pangestuti, 2007). Fukosantin memiliki berbagai macam pengaruh yang menguntungkan dalam kesehatan manusia yaitu sebagai antioksidan dalam tubuh (Zailanie dan Sukoso, 2014). Kandungan fukosantin dalam tanaman *Sargassum polycystum* terbukti memiliki aktivitas antioksidan paling baik dengan nilai IC_{50} sebesar 562, 12 ppm (Pangestuti, 2007). Berdasarkan permasalahan yang telah disebutkan penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan antara sargassum segar dan teh.

Berberapa peneliti telah membuktikan adanya aktivitas antioksidan pada pigmen fukosantin. Menurut Sachindra et al., (2007) aktivitas antioksidan rumput laut juga dapat berasal dari pigmen fukosantin undaria pinnatifidal yang juga memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas. Fukosantin juga memiliki kemampuan sebagai anti kariogenik (Limantara dan Heriyanto, 2011). Namun sampai saat ini belum ada data atau belum diketahui adanya aktivitas antioksidan fukosantin pada rumput laut jenis *sargassum cristaefolium* segar dan "teh".

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Apakah terdapat perbedaan aktivitas antioksidan fukosantin pada *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" rumput laut ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan fukosantin pada *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” rumput laut.

1.4 Kegunaan

Kegunaan dari hasil penelitian yang didapatkan adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan pigmen fukosantin *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” rumput laut sehingga untuk kedepannya dapat memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga dan institusi untuk memanfaatkan *Sargassum cristaefolium* sebagai salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Dasar Universitas Brawijaya, Laboratorium Kimia Universitas Brawijaya, Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Universitas Brawijaya, Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium MRCPP Universitas Macung pada bulan Maret 2014 – Juni 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Sargassum cristaefolium*

Sargassum cristaefolium merupakan salah satu jenis rumput laut yang persebarannya sangat tinggi di Indonesia antara lain kepulauan seribu, pulau komodo, pulau ternate dan ambon (Indriani dan Sumarsih, 1992). *Sargassum cristaefolium* diketahui memiliki panjang mencapai 57 cm, batangnya halus dengan diameter 3 mm. Mempunyai cabang utama halus dengan diameter 2 mm, cabang sekundernya juga halus dan terletak pada setiap cabang utama. Daunnya tebal seperti kulit, tumbuh secara horizontal, panjang daunnya mencapai 27,7 mm dan lebar 15 mm (Santianez dan Trono, 2013).

Menurut Anggadiredja (2006), ciri-ciri dari *Sargassum cristaefolium* adalah tali bulat pada batang utama dan agak gepeng pada percabangan, permukaan halus atau licin, percabangan berbentuk seperti garpu (*dichotomous*) dengan daun bulat lonjong, pinggir bergerigi, tebal dan duplikasi (*double edged*), serta vesicle melekat pada batang daun, bulat telur atau elips. Taksonomi *Sargassum cristaefolium* adalah sebagai berikut:



Gambar 1. *Sargassum cristaefolium*

Domain : Eukaryota
Kingdom : Chromista
Subkingdom : Chromobiota
Infrakingdom : Heterokonta
Phylum : Ochrophyta
Subphylum : Phaeista
Infraphylum : Chrysisista
Superclass : Phaeophyceae
Ordo : Fucales
Family : Sargassaceae
Genus : Sargassum
Scientific name : *Sargassum cristaefolium*

Alga coklat di Indonesia memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena dapat dikembangkan menjadi minuman kesehatan. Jepang biasanya mengkonsumsi alga coklat ini sebagai teh atau yang disebut *kombucha*. Pemanfaatan sebagai minuman kesehatan karena kandungan vitamin dan mineralnya yang sangat mendukung sebagai minuman kesehatan. Pada minuman seperti teh, gula dan *flavor* menjadi bagian penting yang berperan dalam pemberian rasa serta aroma yang khas (Rachmat, 1999).

Menurut Kartika (2011), di Vietnam bagian selatan hingga tengah seperti Khanh Hoa, Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, dan lain-lain. Orang telah memanfaatkan *Sargassum* dan *Porphyra* sebagai minuman teh yang berkhasiat medis. Pemanfaatan teh *Sargassum* oleh masyarakat Vietnam ini telah dilakukan sejak lama. Olahan rumput laut coklat berupa teh bisa disajikan dengan dicelup (seperti teh celup), serbuk (powder), instan dalam kemasan gelas.

Menurut Wisudyawati *et al.*, (2010), *Sargassum* sp. dapat diolah menjadi produk teh *Sargassum* sp. yaitu produk yang merupakan kombinasi manfaat dari teh dan *Sargassum* sp. sebagai minuman yang berkhasiat untuk kesehatan. Ditambahkan oleh Firdhayani (2010), minuman dari *Sargassum* sp salah satunya yaitu teh rumput laut coklat (*Sargassum* sp), merupakan produk herbal efisien dan bernilai ekonomis. Karena teh rumput laut coklat (*Sargassum* sp) dengan kandungan bahan Alginate, iodine dan guluronate yang dapat membuang zat-

zat sisa dalam tubuh, seperti lemak dan sel-sel mati akibat radikal bebas. Maka dari itu rumput laut yang memiliki banyak kasiat di buatlah teh rumput laut adapun prosesnya yaitu : pada tahapan pembuatan teh yang pertama perendaman air kapur. Menurut Ahmadsoffa (2009), perendaman rumput laut dalam larutan kapur selama satu malam dapat menghilangkan garam dan mineral-mineral yang menempel pada rumput laut yang menyebabkan bau amis saat menjadi produk. Ditambahkan oleh KKP (2011), pencucian alga dengan kapur tohor atau kapur sirih bertujuan untuk pemucatan rumput laut dan menghilangkan kotoran yang melekat pada rumput laut, seperti lumpur dan garam. Teknik pencucian dapat dilakukan pada saat basah setelah dipanen atau setelah dikeringkan.

Tahapan yang ke dua yaitu pengeringan, pengeringan adalah suatu cara untuk mengeluarkan atau menghilangkan sebagian besar air yang dikandung melalui energi panas (Winarno, 1994). Ditambahkan oleh (Putra, 1994) energi panas yang dipergunakan umumnya yaitu dari energi sinar matahari dan pengeringan dengan udara atau uap panas. Pengeringan dapat berlangsung dengan baik, jika pemanasan terjadi pada setiap tempat dari bahan tersebut, dan uap air yang diambil berasal dari semua permukaan bahan tersebut. Faktor – faktor yang mempengaruhi pengeringan adalah luas permukaan bahan, suhu pengeringan, aliran udara, tekanan uap diudara dan waktu pengeringan (Winarno, 1993).

Proses pengeringan adalah keluarnya air dari dalam bahan yang dikeringkan ke lingkungannya, sedangkan cara yang ditempuh untuk mencapai hal ini amatlah bervariasi, disesuaikan dengan kebutuhan dan kemampuan. Ada yang menggunakan panas matahari, panas buatan oleh heater, sistem vakum, atau kombinasi keduanya. Mekanisme pengeringan dapat diterangkan dengan teori perpindahan massa dimana peristiwa lepasnya molekul air dari permukaan

tergantung dari bentuk dan luas permukaan. Bila suatu bahan sangat basah/lapisan air yang menyelimuti bahan itu tebal, maka akan menarik molekul-molekul air dari permukaan datar. Bila pengeringan diteruskan, kecepatan penguapan air yang lepas dari molekul akan tetap sama. Setelah molekul-molekul air yang membentuk lapisan pada permukaan datar habis, luas permukaan akan naik karena titik-titik dari permukaan butir jadi rata yang akan memperluas permukaannya sehingga dalam pengeringan ada 2 macam mekanisme yaitu mekanisme penguapan dengan kecepatan tetap (constant rate period) dan mekanisme penguapan dengan kecepatan tidak tetap (falling rate period) (Ahmad, 2011).

2.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang pada konsentrasi rendah secara signifikan dapat menghambat oksidasi dari senyawa lain. Senyawa antioksidan dapat mencegah kerusakan komponen sel sebagai konsekuensi dari reaksi kimia yang melibatkan radikal bebas. Senyawa antioksidan dapat mencegah kerusakan jaringan yang diinduksi oleh radikal bebas dengan 3 cara yaitu mencegah pembentukan radikal, membersihkan radikal dan menyebabkan dekomposisi dari radikal. Senyawa antioksidan dapat diaplikasikan dalam bidang kesehatan salah satunya dapat mencegah penyakit kronis yaitu penyakit jantung koroner (Young dan Woodside, 2001).

Senyawa karatenoid termasuk jenis senyawa antioksidan yang larut lemak (Young dan Woodside, 2001). Salah satu golongan karatenoid yang memiliki sifat antioksidan adalah fukosantin (Zaelani dan Sukoso, 2014). Sifat antioksidan dari fukosantin telah dibuktikan secara invitro dengan cara membersihkan radikal bebas. Kemampuan sifat antioksidan dari fukosantin lebih

tinggi dibandingkan dengan fukosantinol. Sifat antioksidan dari fukosantin di sebabkan adanya ikatan alenik pada struktur fukosantin (Sachindra *et al.*, 2007). Untuk mengetahui kandungan antioksidan maka perlu adanya uji aktivitas antioksidan, uji kativitas antioksidan menggunakan metodeDPPH. Metode DPPH digunakan untuk mengukur elektron tunggal, diantaranya aktivitas transfer hidrogen, yang sekaligus sebagai pengukur aktivitas penghambatan radikal bebas. Untuk menguji DPPH, penangkapan radikal bersama dengan monitoring penurunan apsobansi akibat dari reduksi radikal (Pokorni, 2001 dalam Fauziah *et al.*, 2012). Ditambahkan oleh Sunarni (2005), DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkapan radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil. Sedangkan menurut Zuhra *et al.*, (2008) senyawa antioksidan dikatagorikan dalam empat golongan yaitu sangat kuat (IC_{50} antara 1-50 ppm), kuat (IC_{50} antara 50-100 ppm), sedang (IC_{50} antara 100-150 ppm) dan lemah (IC_{50} antara 150-200 ppm). Jika IC_{50} lebih dari 200 ppm maka tidak berpotensi sebagai senyawa antioksidan.

Menurut (Astuti, 2009), penambahan senyawa yang bereaksi sebagai antiradikal akan menurunkan konsentrasi DPPH tersebut. Penurunan konsentrasi DPPH akan mengakibatkan penurunan absorbansinya. Berbeda dengan absorbansi bebas kontrol yang tidak diberi senyawa uji yang diduga mempunyai aktivitas antiradikal.

2.3 Fukosantin

Fukosantin merupakan karatenoid yang paling melimpah dan berkontribusi lebih dari 10% dari total produksi karatenoid di alam khususnya

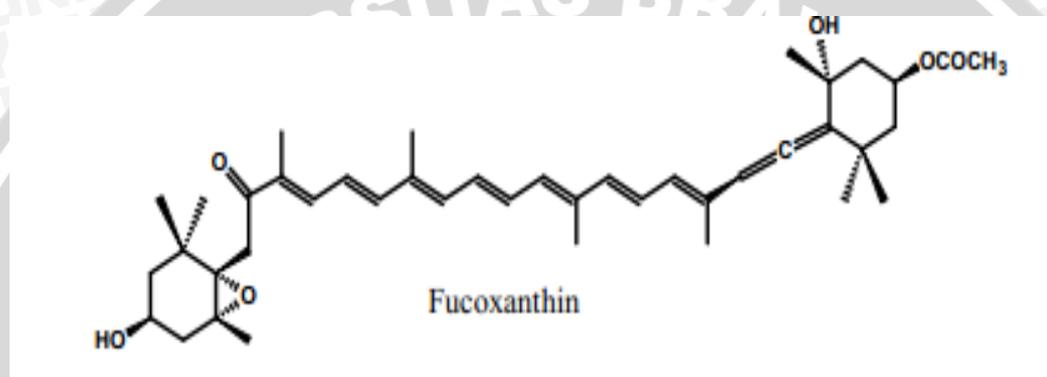
pada lingkungan perikanan. Selain pigmen klorofil dan β -karoten, pigmen fukosantin merupakan salah satu pigmen yang terdapat dalam *Chromophyta* termasuk rumput laut coklat (Peng *et al.*, 2011).

Fukosantin merupakan karotenoid utama yang terdapat pada rumput laut coklat (Limantara, 2010). Fukosantin memiliki rumus molekul $C_{42}H_{58}O_6$. Pigmen fukosantin ditemukan dalam kloroplas dalam alga coklat, yang memberikan warna coklat dan coklat kehijauan. Fukosantin terlibat secara aktif sebagai pigmen pelengkap pada reaksi fotosintesis dan menyebabkan phaeophyta berwarna coklat (Pangestuti *et al.*, 2007).

Fukosantin berwarna oranye, termasuk kelompok santofil dari karotenoid. Pigmen ini banyak ditemukan pada beberapa spesies yang sering digunakan sebagai makanan tradisional di Jepang, nori. Fukosantin juga ditemukan pada alga hijau dan merah namun tidak ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi (Ballard *et al.*, 1989). Dalam alga coklat, fukosantin merupakan karotenoid utama (Asai *et al.*, 2004) karena kandungan fukosantin dapat mencapai lebih dari 50 % dari total karotenoid. Pada jalur fotosintesis santofil, fukosantin diturunkan pertama-tama dari likopen yang disintesis menjadi β , β -karoten melalui proses siklisasi atau pembentukan cincin pada posisi β . β -karoten yang telah terbentuk mengalami hidroksilasi menjadi zeaxanthin. Dari zeaxanthin, tahap selanjutnya adalah proses epoksidasi menjadi antheraxanthin yang dilanjutkan menjadi violaxanthin. Violaxanthin yang terbentuk mengalami pengaturan struktur menjadi suatu bentuk pigmen baru yang disebut neoxanthin. Selain membentuk neoxanthin, violaxanthin juga membentuk diadinoxanthin yang selanjutnya mengarah pada pembentukan diolaxanthin dan fukosantin (Jeffrey *et al.*, 1997).

Fukosantin memiliki struktur kimia yang unik karena memiliki sebuah ikatan alenat dan 5,6-monoepoksida di dalam molekulnya. Fukosantin yang terdapat pada alga coklat berupa trans-fukosantin (Haugan dan Liaasen-jensen, 1992).

Fukosantin yang merupakan golongan karotenoid berfungsi sebagai pigmen tambahan pada proses fotosintesis. Aktivitas fukosantin tersebut ditunjukkan oleh sifat absorpsi pada panjang gelombang 400-540 nm, fukosantin bersifat lebih labil pada suasana basa, sehingga pada saat mengekstraksi pigmen tersebut, lingkungan basa harus di hindari (Britton *et al.*,1995). Struktur kimia fukosantin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 : Struktur Kimai Fukosantin (Peng *et al.*,2011).

2.4 Ekstraksi Pigmen

Ekstraksi adalah pemisahan suatu zat dari campurannya berdasarkan perbedaan koefisien distribusi zat terlarut dalam dua larutan yang berbeda fasa dan tidak saling bercampur. Prinsip metode ekstraksi adalah berdasarkan pada perbedaan koefisien distribusi zat terlarut dalam dua larutan yang berbeda fase dan tidak saling bercampur, berlaku hukum mengenai konsentrasi zat terlarut dalam kedua fase pada kesetimbangan. Peristiwa ekstraksi adalah pemisahan komponen dari suatu campuran cair dengan mengontakkan pada cairan lain. Sehingga disebut juga dengan (solvent exstrcation) ekstrak cair atau ekstrak pelarut (Setiadi, 2010).

Ekstraksi dapat didefinisikan sebagai suatu proses penarikan keluar atau proses pemisahan suatu bahan dari campurannya, biasanya dengan menggunakan pelarut. Pelarut polar hanya akan melarutkan solut polar dan pelarut non polar akan melarutkan solut non polar juga atau disebut "*like dissolves like*" (Shriner *et al.*,1980). Pemisahan yang diinginkan dapat terjadi karena adanya perbedaan dalam sifat yaitu dapat larutnya antara bagian-bagian campuran zat pada bahan pelarut (Wanto dan Romli, 1977).

Fase ekstaksi pada dasarnya dibedakan menjadi dua fase, yaitu fase pencu terjadi penyatuan cairan ekstraksi, melalui rusaknya sel-sel zat yang diekstrak atau terusakkan dengan operasi penghalusan, langsung kontak dengan bahan pelarut. Sehingga komponen sel yang terdapat dalam sel lebih mudah diambil. Sedangkan pada fase ekstraksi, yaitu suatu peristiwa yang memungkinkan terjadinya perlintasan bahan pelarut ke bagian dalam sel, yang memungkinkan bahan ekstraksi mencapai ke dalam ruang dalam sel. Dengan mengalirkan bahan pelarut ke dalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak, dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai kelarutannya (Voight, 1994).

Metode maserasi atau metode perendaman merupakan metode yang paling sederhana dan digunakan terutama jika kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam tumbuhan cukup banyak (Warsito, 2007). Ditambahkan oleh Andayani *et al.*,(2008) metode ini mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana yaitu cukup dengan merendam sampel dalam pelarut.

2.5 Partisi (Fraksinasi)

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non-polar akan masuk ke pelarut non-polar (Harbone, 1987).

Istilah partisi/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 di dalam corong pisah. Pada metode ini terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi. Metode partisi juga disebut penyarian cair-cair, yaitu proses pemisahan dimana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010). Pada proses partisi memerlukan banyak pelarut dan pengertian pelarut itu sendiri ialah salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi. Pelarut harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja dan mempunyai kelarutan yang besar (Guenther, 1987). Larutan adalah campuran homogen antara dua komponen zat atau lebih. Dua komponen tersebut adalah pelarut (*solvent*) dan zat terlarut (*solute*). Pelarut merupakan komponen zat dalam jumlah lebih besar dalam suatu larutan (Rivai, 1995). Adapun pelarut yang di gunakan dalam penelitian ini adalah Methanol, Aseton, Dietil Eter, N-heksan dan Etil asetat adapun fungsi masing – masing larutan yaitu methanol merupakan golongan alkohol dengan rumus molekul CH_3OH . Methanol berbentuk cair, mudah menguap, tidak bewarna, berbau khas, mudah terbakar dan beracun (Ching *et al.*, 2010).

Menurut Purwanti (2009), metanol termasuk dalam menstrum (agen ekstraksi) golongan alkohol. Alkohol yang biasanya digunakan sebagai menstrum dalam ekstraksi adalah golongan alkohol rendah atau yang memiliki rantai atom

C pendek seperti metanol, etanol, propanol, butanol. Metanol lebih polar dibandingkan dengan etanol karena memiliki jumlah atom C yang lebih sedikit, sehingga senyawa yang terikat oleh kedua pelarut tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda.

Aseton adalah senyawa berbentuk cairan yang tidak berwarna dan mudah terbakar. Aseton digunakan sebagai pelarut aprotik polar dalam kebanyakan reaksi organik. Oleh karena polaritas aseton yang menengah, ia melarutkan berbagai macam atau larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter (Zulviyah, 2009).

Aseton mempunyai nama lain metil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul dari aseton adalah CH_3COCH_3 . Aseton biasa digunakan sebagai pelarut karena mempunyai sifat higroskopis, sangat volatil, tidak beresidu dan mudah terbakar. Kegunaan aseton antara lain adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, campuran adesif, parfum, pembersih, bahan campuran resin dan lain sebagainya (Schelfan *et al.*, 1983).

Dietil eter merupakan salah satu dari eter komersial yang paling penting. Hal ini dikarenakan dietil eter memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Dietil eter banyak digunakan sebagai bahan pelarut untuk melakukan reaksi – reaksi organik dan memisahkan senyawa organik dari sumber alamnya (Roesyadi, 2012).

Dietil eter 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. Berformula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$, dietil eter digunakan sebagai pelarut biasa dan telah digunakan sebagai anestesi umum (Zulviah, 2009).

N- heksan mudah menguap dan mempunyai suhu didih rendah yaitu sekitar 64°C. N-heksan relatif tidak beracun, mudah dipisahkan kembali dan bahan yang dilarutkan kemampuan mengekstraksi cukup baik dan harganya tidak terlalu mahal. Namun memiliki kelemahan mudah terbakar (Unadi *et al.*,2012). Ditambahkan oleh Andaka (2008), sifat-sifat fisik n-heksan dapat dilihat pada Tabel 2 berikut :

Tabel 1. Sifat-sifat fisik n-heksan.

Sifat	Nilai
Titik didih	69°C
Indeks polaritas (synyder)	0,0
Koefisien dielektrik	18,8
Tegangan permukaan (20°)	18,4 dyne/cm
Berat jenis	0,6548 g/ml (cair)
Viskositas	0,294 CP (25°C)
Titik cair	-95°C (178 K)

Sumber : Andaka (2008)

Etil asetat adalah salah satu dari pelarut yang paling populer dan banyak digunakan. Pengenceran ini merupakan komponen penting untuk konsentrasi dan pemurnian antibiotik. Etil asetat biasanya digunakan dalam pembuatan perekat, cairan pembersih, tinta, cat kuku dan sebagainya (Dutla, 2004).

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 pepadatan pada suatu asam (pada umumnya suatu asam organik) dan suatu alkohol (atau campuran zat asam karbol), walaupun ada cara-cara lain untuk membentuk ester. Pepadatan adalah suatu jenis reaksi kimia dimana 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). Menurut SNI (1992), syarat mutu etil asetat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Syarat mutu etil asetat

Uraian Warna	Satuan Hazen	Persyaratan Maks.10
Kadar etil asetat	% b/b	Min 99,0
Bobot jenis, 20/20°C	-	0,900-0,903
Indeks bias, ND 20°C	-	1,370-1375
Jarak destilasi	°C	76,5-78,5
Sisa penguapan	% b/b	Maks 0,01
Keasaman (dihitung sebagai asam asetat)	% b/b	Maks 0,01
Kadar air	% b/b	Maks 0,1

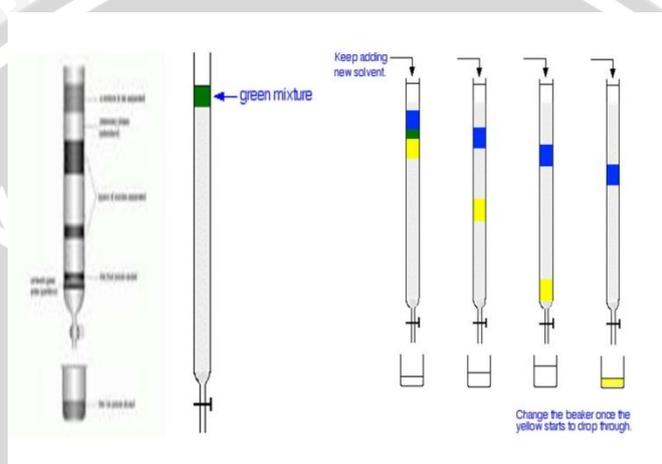
Sumber : SNI (1992)

2.6 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan suatu teknik analisis biokimia berdasarkan metode pemisahan yang memerlukan waktu relatif singkat dan tidak membutuhkan alat yang rumit dibandingkan dengan metode pemisahan lainnya. Dikenal dua fase pada kromatografi, yaitu fase mobil atau fase gerak yang membawa sampel dan fase stasioner atau fase diam yang menahan sampel. Jika fase geraknya berupa cairan maka disebut dengan kromatografi cair, jika fase geraknya berupa gas maka disebut kromatografi gas (Bintang, 2010).

Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan yang terdiri atas kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa silica atau alumina. Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik dialirkan dari bagian atas kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna sepanjang kolom gelas dan ditampung pada tempat yang berbeda. Metode pemisahan kromatografi kolom ini memerlukan bahan kimia yang banyak sebagai fase diam dan fase gerak, bergantung pada ukuran kolom gelas (Hendayana, 2006).

Kecepatan bergerak dari suatu komponen tergantung pada berapa besarnya komponen terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat. Akan terlihat bahwa jika perbedaan-perbedaan dalam serapan cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna (Sastrohamidjo, 2007). Proses Kromatografi Kolom dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3.Proses Kromatografi Kolom

(Sumber: Sulistiani, 2013)

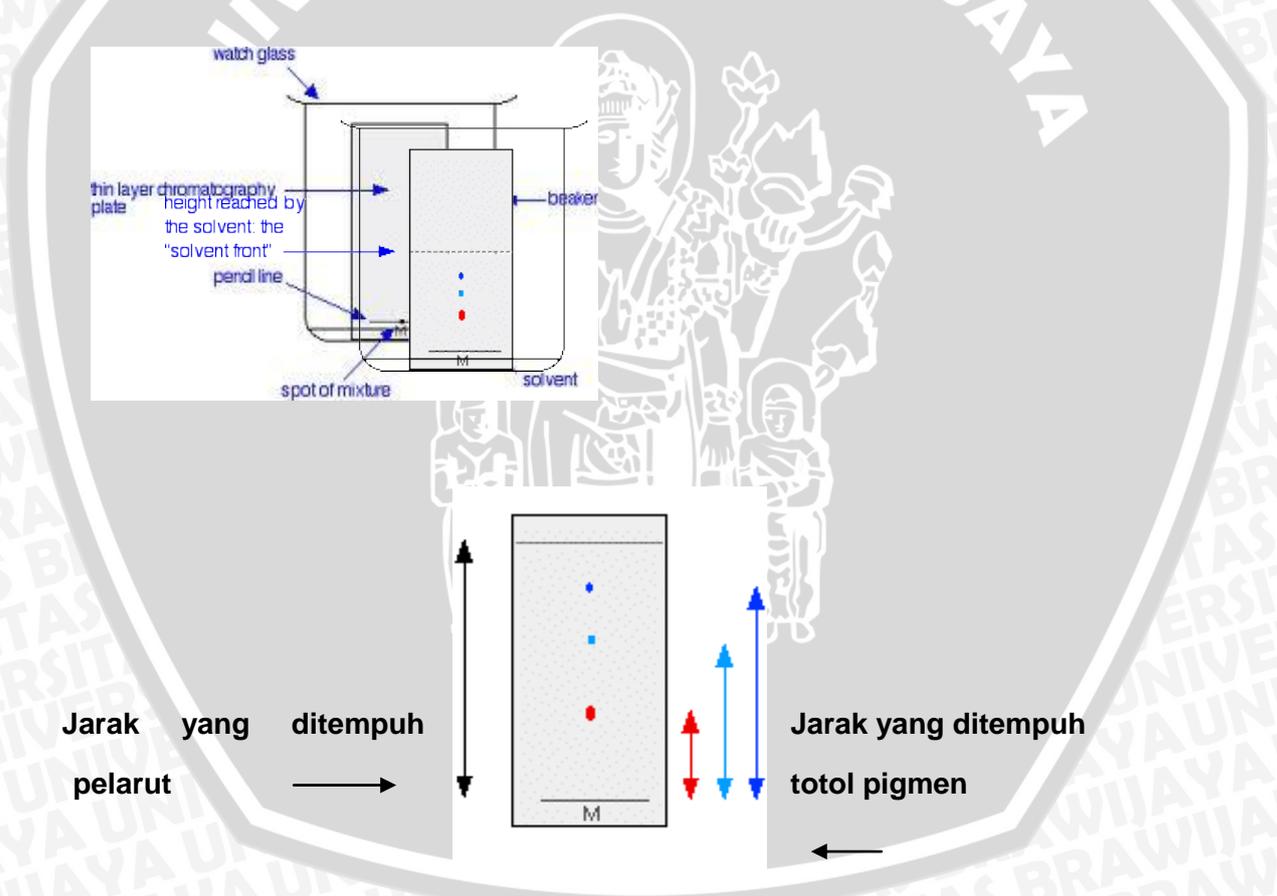
2.7 Analisa Kuantitatif Fukosantin

2.7.1 Kromatografi Kolom Lapis Tipis

Kromatografi kolom lapis tipis (KLT) merupakan cara analisis cepat yang memerlukan bahan yang sedikit (Markham, 1988). KLT termasuk kedalam kromatografi adsorpsi. Media yang digunakan berupa pelat tipis yang dilapisi oleh fase diam. Fase diam yang digunakan dapat berupa silika gel, alumenita, kieselguhr maupun selulosa bergantung pada sampel yang akan dianalisis (Bintang, 2010).

Kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Semua kromatografi memiliki fase diam (dapat berupa padatan, atau kombinasi cairan-padatan) dan fase gerak (berupa cairan atau

gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda. Pada kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silica atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Untuk pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dapat dilakukan berdasarkan pada jarak yang di tempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna masing-masing (Clark, 2007). Gambar Proses pemisahan sampel pada kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Metode kromatografi lapis tipis

(Sumber : Clark, 2007).

Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *Retardation factor* (Rf). Penentuan sistem KLT tergantung pada jenis pigmen yang akan diisolasi. Sistem KLT fase normal, fase diam yang digunakan lebih polar daripada fase geraknya sehingga pigmen non polar lebih cepat merambat. Sistem KLT fase terbalik, fase diam yang digunakan lebih non polar daripada fase geraknya sehingga pigmen polar lebih cepat merambat. Identifikasi secara manual dapat dilakukan dengan melihat warna totol pada pelat KLT. Ketebalan warna totol menunjukkan kuantitas pigmen sedangkan banyaknya noda menunjukkan jumlah pigmen yang terdapat dalam ekstrak (Jeffrey *et al.*,1997). Ditambahkan oleh Warsito (2007), selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan juga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika dalam hasil eluen (dua arah) dan telah divariasikan jenis eluen diperoleh satu noda maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni. Nilai Rf untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{jarak ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

2.7.2 Spektrofotometer UV-Vis



Gambar 5 : Spektrofotometer UV-Vis

Prinsip Spektrofotometer UV-Vis yaitu penyerapan sinar di daerah ultraviolet dan sinar tampak (visible). 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 kuantitatif. Prinsip kerja Spektrofotometer UV-Vis, didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia gugus fungsi tertentu di daerah ultra lembayung (Ultra violet) dan sinar tampak (visible) (Huda, 2001).

2.7.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Menurut Adnan (1997), keunggulan HPLC yaitu dapat menangani senyawa – senyawa yang stabilitasnya terhadap suhu terbatas, begitu juga volatilitasnya bila tanpa menggunakan derivatisasi, HPLC dapat juga memisahkan senyawa yang sangat serupa dengan resolusi baik. Waktu yang diperlukan untuk pemisahan suatu larutan dengan HPLC biasanya singkat. HPLC dapat juga digunakan untuk analisa kuantitatif dengan baik dan dengan presisi yang tinggi, dengan koefisien variansi dapat kurang dari 1%. HPLC juga merupakan teknik analisa yang peka.

HPLC juga merupakan suatu metode yang sangat baik dalam menganalisis pigmen pada tumbuhan tingkat tinggi dan alga karena dengan sampel sedikit dan analisa yang pendek dapat memisahkan klorofil, karotenoid, serta turunannya (Gross, 1991). Kandungan pigmen dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi selanjutnya diidentifikasi dengan detektor PDA yang dapat menghasilkan pola spektra dari puncak-puncak yang diperoleh secara kuantitatif (Bonora *et al.*, 2000). Penentuan jenis pigmen alga coklat dilakukan dengan membandingkan *retention time* hasil penelitian dengan literatur

yang menggunakan KCKT yang sama dengan penelitian, dan fase gerak dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang hampir sama.

2.7.4 Derajat Hue

Menurut Soekarto (1990) Pengukuran warna dilakukan dengan menggunakan alat *chromameter*. Hasil yang didapat dalam pengukuran warna diperoleh tiga nilai yang diganti dalam notasi warna yaitu L, a, b. Notasi warna L menyatakan kecerahan (light) yang mempunyai nilai dari 0 (hitam) sampai 100 (putih). Nilai L menyatakan cahaya pantul yang menghasilkan warna kromatik putih, abu-abu dan hitam. Notasi a menyatakan warna kromatik campuran hijau-merah, dengan nilai +a (positif) dari 0 sampai +60 untuk warna merah dan nilai -a (negatif) dari 0 sampai -60 untuk warna hijau. Notasi b menyatakan warna kromatik campuran biru-kuning, dengan nilai +b (positif) dari 0 sampai +60 untuk warna kuning dan nilai -b (negatif) dari 0 sampai -60 untuk warna biru.

Dari nilai a dan b dapat dihitung $^{\circ}$ Hue untuk melihat intensitas warna dengan rumus :

$^{\circ}$ Hue = $\tan^{-1}(b/a)$, dimana hasilnya dapat di lihat pada Tabel 3 :

Tabel 3. Keterangan Warna $^{\circ}$ Hue

$^{\circ}$ Hue	Keterangan warna
18-54 $^{\circ}$	Berwarna <i>red (R)</i>
54-90 $^{\circ}$	Berwarna <i>yellow red (YR)</i>
90-126 $^{\circ}$	Berwarna <i>yellow (Y)</i>
126-162 $^{\circ}$	Berwarna <i>yellow green (YG)</i>
162-198 $^{\circ}$	Berwarna <i>green (G)</i>
198-234 $^{\circ}$	Berwarna <i>blue green (BG)</i>
234-270 $^{\circ}$	Berwarna <i>blue (B)</i>
270-306 $^{\circ}$	Berwarna <i>blue purple (BP)</i>
306-342 $^{\circ}$	Berwarna <i>purple (P)</i>
342-18 $^{\circ}$	Berwarna <i>red purple (RP)</i>

Sumber: Soekarto (1990).

3. MATERI DAN METODE

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* yang diperoleh Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan adalah aseton PA (Pro analisis) dan teknis, metanol PA, etil asetat PA, dietil eter, heksan, CaCO_3 , larutan saturasi garam, silica gel, alumunium foil, cling wrap, kertas saring kasar, kertas saring halus, kertas Whatman no. 42 diameter 11, gas nitrogen HP (high pure), tisu, pasir laut (sea sand), aquades, kapas, kertas label dan DPPH (2,2 diphenyl 1-picrylhidrazil). Bahan kimia ini dengan merk Merck dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Makmur Sejati Malang, Laboratorium Panadia Malang dan Laboratorium MRCPP Universitas Macung.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan ekstraksi dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, gunting, mortar, beaker glass 1000ml, erlenmeyer 250ml, gelas ukur 25ml, 50ml dan 100ml, corong kaca, hot plate, magnetic stirrer, rotary evaporator vaccum, spatula, botol sampel, pipet volume 1ml dan 10ml, pipet tetes, statif, corong pisah, dan oven vaccum. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah spektrofotometri UV-Vis shimadzu, HPLC shimadzu, kolom kromatografi dengan panjang 28 cm dan diameter 2 cm, tabung reaksi, rak tabung

reaksi, KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dengan lebar pelat 1 cm dan panjang 5 cm, mikro pipet, penggaris, beaker glass 100ml, cawan petri dan color reader.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ialah metode eksploratif. Menurut Amirin (2009), penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian. Metode eksploratif mempunyai upaya menemukan informasi umum mengenai suatu topik ataupun 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 pernah diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik selama ini.

Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga 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).

Metode eksploratif pada penelitian ini yaitu dengan pengumpulan data melalui tahapan penelitian. Penelitian dilakukan untuk memperoleh data mengenai kadar fukosantin setelah dilakukan awal proses yang berbeda. Tahap-tahap penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel *Sargassum cristaefolium* dari Pulau Talango, Madura. Tahap kedua dilakukan proses maserasi, selanjutnya tahap ketiga dilakukan fraksinasi (partisi) dengan menggunakan dietil eter. Tahap selanjutnya yaitu evaporasi dan isolasi pigmen menggunakan kolom kromatografi. Tahap kelima yaitu identifikasi pigmen menggunakan KLT. Selanjutnya dilakukan analisa pigmen menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Tujuan analisa pigmen

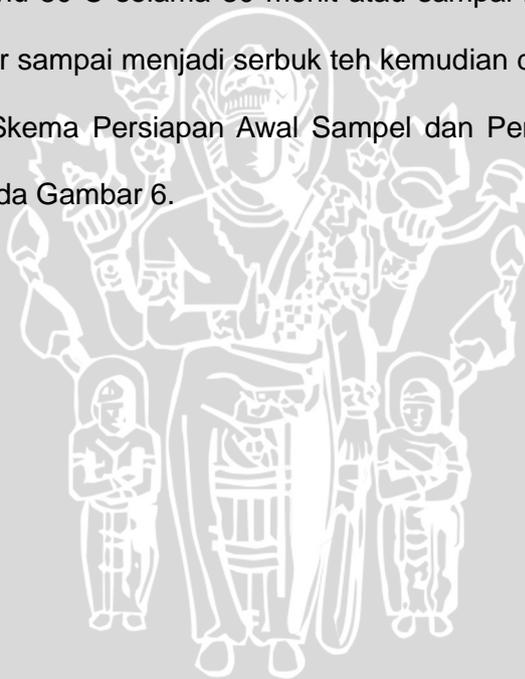
menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) adalah untuk mengetahui gugus fungsinya, setelah dilakukan analisa menggunakan spektrofotometer dilanjutkan dengan uji DPPH (*2,2 diphenyl 1-picrylhidrazil*). untuk mengetahui ada tidaknya antioksidan padaalga coklat dan yang terakhir adalah uji L,a,b. Dari hasil uji L,a,b ini kemudian ditentukan warna sampel yang diuji dengan menghitung nilai ⁰hue. Selain itu untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan pada *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" maka perlu adanya perhitungan uji T. Untuk mendapatkan perhitungan uji T maka perlu pula adanya metode eksploratif diskriptif agar dapat membedakan aktivitas antioksidan pada masing-masing perlakuan yaitu segar dan "teh". Metode eksploratif telah dijelaskan di atas dan metode diskriptif dalam penelitian ini digunakan sebagai penunjang saja dan adapun pengertian metode diskriptif merupakan suatu metode yang meneliti satatus kelompok manusia, suatu objek, suatu set kondisi, suatu sistem pemikiran ataupun suatu kelas peristiwa pada masa sekarang (Nazir, 1985). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran perbedaan aktivitas antioksidan pada *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh"

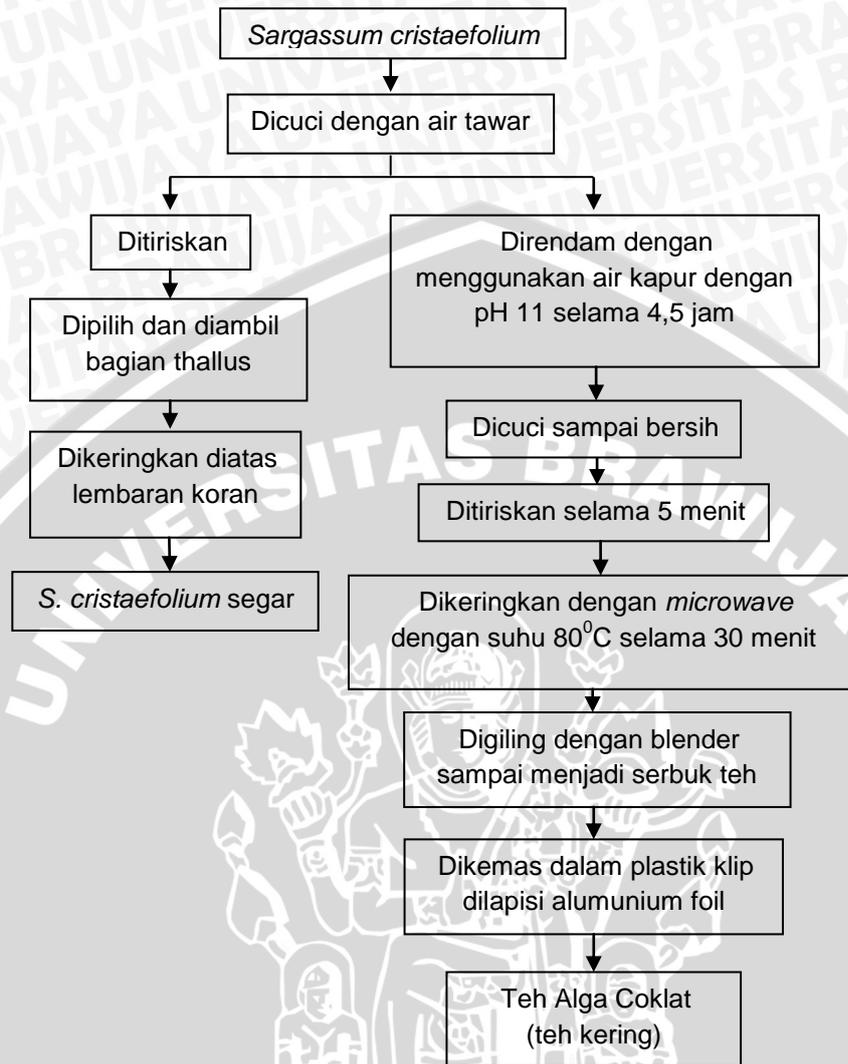
3.4 Persiapan Sampel

Alga coklat *Sargassum cristaefolium* diambil dari perairan Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. Setelah sampel datang selanjutnya sampel dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Alga coklat yang telah dicuci kemudian dimasukkan kedalam polybag dan disimpan didalam freezer. Untuk perlakuan segar sampel diambil dari freezer kemudian disortasi dan diambil bagian thallus hal ini dikarenakan pada bagian thallus diasumsikan terdapat banyak jenis pigmen, dipotong kecil-kecil ± 1 cm dan

ditimbang sebanyak 100 gram lalu dihaluskan dengan mortar dan diberi CaCO_3 kemudian di ekstraksi. Fungsi penambahan CaCO_3 pada saat penghalusan sampel adalah untuk agen penetral.

Sedangkan untuk sampel yang diberi perlakuan teh kering, sampel alga coklat *Sargassum cristaefolium* direndam dalam 20 gr CaCO_3 sampai pH 11 selama $\pm 4,5$ jam hal ini bertujuan untuk mengurangi bau amis yang ada dalam sampel, kemudian sampel dicuci sampai bersih dan ditiriskan selama 5 menit di atas koran bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga tidak dibutuhkan waktu yang terlalu lama saat pengeringan. Setelah itu dikeringkan dengan microwave dengan suhu 80°C selama 30 menit atau sampai kadar airnya 10%, digiling dengan blender sampai menjadi serbuk teh kemudian di bungkus dengan menggunakan alufo. Skema Persiapan Awal Sampel dan Pembuatan Teh Alga Coklat dapat dilihat pada Gambar 6.





Gambar 6. Persiapan Awal Sampel (Hemawan *et al.*, 2013)

3.4.1 Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen

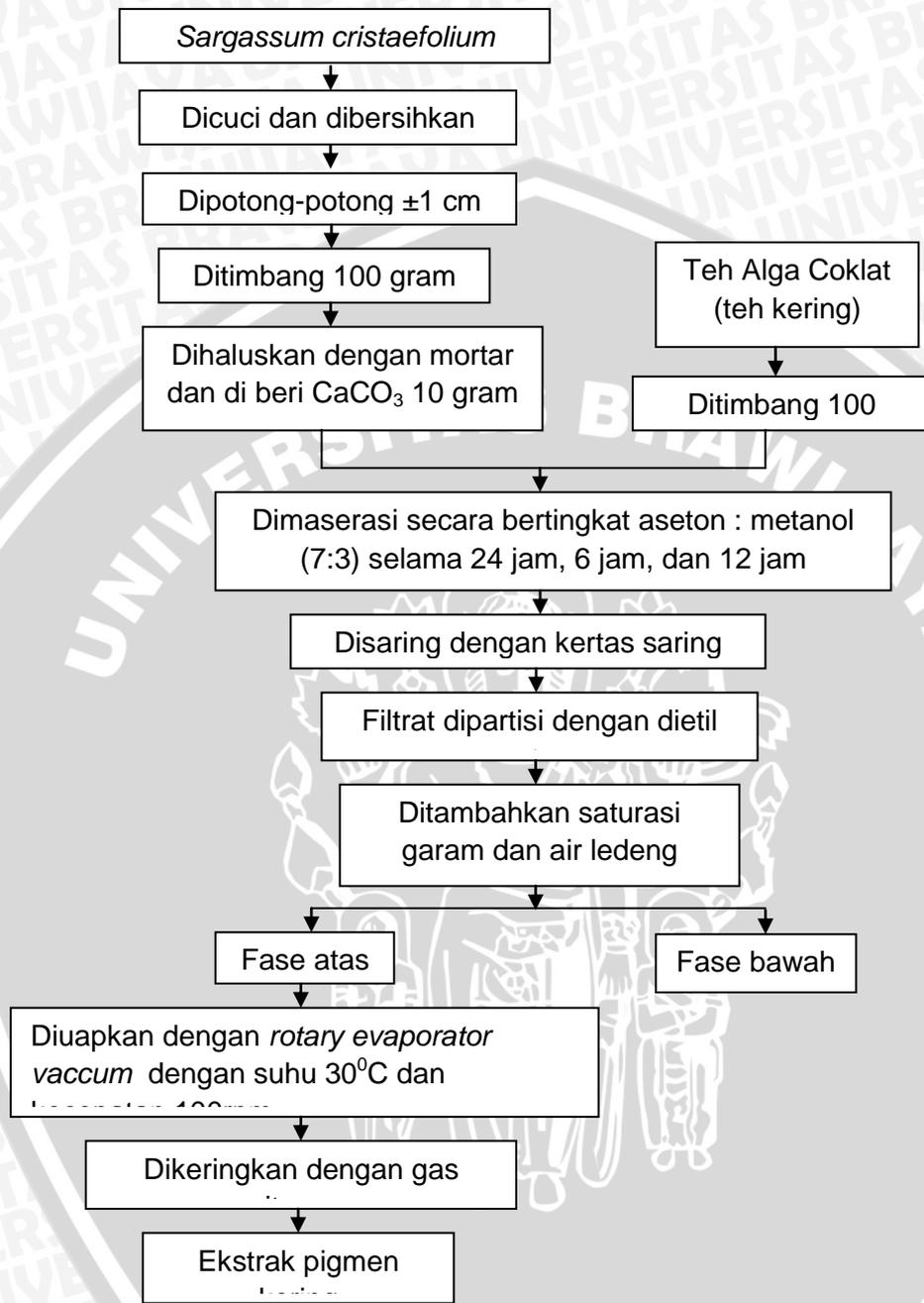
Langkah-langkah yang dilakukan untuk mendapatkan ekstrak pigmen pada sampel segar pertama-tama alga coklat dicuci dan dibersihkan untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Alga coklat selanjutnya dipotong-potong ±1cm agar sampel cepat kering dan untuk memperluas permukaan bidang sehingga pigmen dapat terekstraksi dengan maksimal, ditimbang sebanyak 100 gram, dihaluskan dengan mortar dan ditambahkan CaCO_3 yang berfungsi sebagai penetral, hal ini dikarenakan pigmen fukosantin yang

terkandung dalam alga tidak tahan pada pH basa tertentu. Alga coklat yang telah ditimbang dimaserasi secara bertingkat, yaitu selama 24 jam, 6 jam, dan 12 jam dengan pelarut metanol: aseton (7:3, v/v) sebanyak 250ml.

Sistem kerja dari proses ekstraksi adalah sel tanaman yaitu pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar. Adapun tujuan dari penggunaan metanol (CH_3OH) agar dapat melarutkan semua senyawa organik yang terkandung pada bahan. Sedangkan penggunaan pelarut aseton (CH_3COCH_3) adalah untuk mengangkat pigmen yang bersifat polar (pelarut yang cocok untuk fukosantin). Prinsip dari maserasi adalah mengambil senyawa target dengan cara merendam. Sampel yang diekstraksi dengan cara maserasi kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring halus hingga mendapatkan fitrat.

Tahapan setelah maserasi dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Filtrat selanjutnya dipartisi menggunakan dietil eter, saturasi garam, dan air ledeng dengan perbandingan 50 : 25 : 60 : 5 mL. Fungsi dietil eter adalah untuk mengikat senyawa yang bersifat semi polar sehingga senyawa tersebut berada pada fase atas, sedangkan tujuannya adalah dapat mengurangi kepadatan senyawa organik dalam sampel, memiliki titik uap yang paling rendah sehingga dapat mempermudah penghilangan pelarut pada sampel untuk proses selanjutnya. Fungsi saturasi garam adalah agar pelarut lebih tertarik mengikat larutan yang memiliki elektronegatifan dan elektropositifan yang lebih tinggi dari pada senyawa target sehingga pelarut metanol dan aseton terikat pada saturasi garam dan berada dibawah. Tujuan penambahan saturasi garam ini adalah untuk mengikat senyawa yang bersifat polar.

Fase yang diambil dalam fraksinasi (partisi) adalah fase atas karena hampir seluruh pigmen berada dalam fase ini, dan hasil dari fase bawah tidak dipergunakan karena merupakan campuran dari methanol, aseton, saturasi garam dan air. Pada tahap fraksinasi (partisi) pada penelitian ini digunakan dua perlakuan yaitu *Sargassum cristaefolium* segar dan basa kering "Teh". Hasil fase atas dari sampel *Sargassum cristaefolium* segar sebanyak 435 mL sedangkan fase atas untuk basa kering didapatkan 448 ml. Untuk hasil fase bawah dari sampel *Sargassum cristaefolium* segar didapatkan 1389 ml dan fase bawah untuk perlakuan basa kering didapat sebanyak 1451 mL. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya di *rotary evaporator vacum* dengan suhu 30°C dengan kecepatan 100rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Penguapan atau evaporasi pada ekstraksi pigmen fukosantin dengan alat *rotary evaporator vacum* dimaksudkan untuk menguapkan pelarut, sehingga didapat konsentrat pigmen. Selanjutnya filtrat yang telah berbentuk kerak kemudian dipindahkan ke dalam botol sampel dengan cara ditetesi dengan larutan DE \pm 4ml kemudian sampel dikeringkan dengan gas nitrogen sampai kering sempurna. Fungsi dari pengeringan dengan menggunakan gas nitrogen ini adalah untuk menguapkan pelarut yang ada dalam sampel sehingga untuk perlakuan selanjutnya sampel dapat ditambahkan dengan jenis pelarut yang lainnya. Kemudian ekstrak pigmen kering ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam *freezer*. Sedangkan untuk perlakuan teh kering sebelum dilakukan maserasi sampel yang telah disiapkan sebelumnya ditimbang sebanyak 100 gram kemudian dihaluskan dengan menggunakan mortar lalu ditambahkan CaCO₃ yang berfungsi sebagai agen penetral dan untuk selanjutnya dilakukan tahapan proses yang sama dengan perlakuan segar. Prosedur ekstraksi dan fraksinasi untuk isolasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Ekstraksi dan Fraksinasi untuk Isolasi Pigmen

Pangestuti *et al.*, (2008) yang dimodifikasi Mu'amar (2009)

3.4.2 Isolasi Fukosantin

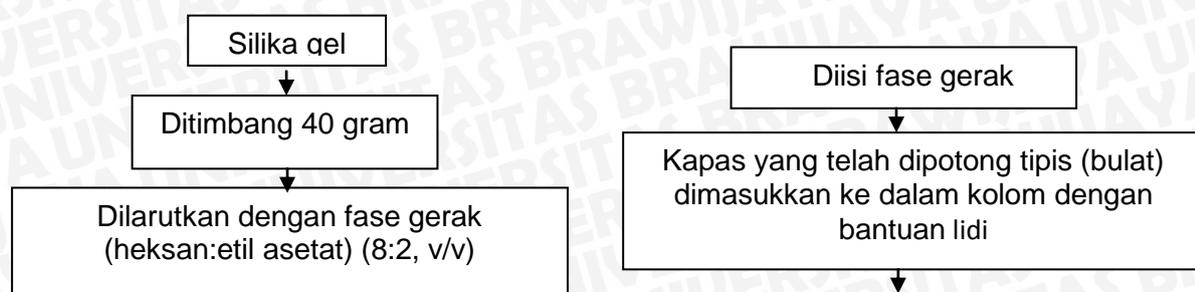
Isolasi pigmen fukosantin dari alga coklat dilakukan dengan kolom kromatografi menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak berupa heksan : etil asetat (8:2, v/v) ±100ml. Silika gel ditimbang sebanyak 30 gram dan dilarutkan dengan fase gerak heksan dan di stirrer selama total 1 jam, dengan rincian pada 45 menit pertama menggunakan kecepatan 1300 rpm, 1100 rpm dan 900 rpm yang dikecepatannya diubah setiap 15 menit sekali selanjutnya pada 15 menit terakhir menggunakan kecepatan 700 rpm, 500 rpm, 300 rpm dan yang terakhir 150 rpm yang dikecepatannya diubah setiap 5 menit sekali, hal ini bertujuan agar tidak ada gelembung udara yang tersisa dalam silika gel dan agar saat silika gel dimasukkan ke dalam kolom tidak mengalami keretakan. Fase diam (*silica gel*) berfungsi sebagai fase penyerap komponen senyawa sedangkan fase gerak untuk melarutkan zat komponen campuran. Sementara proses stirrer sedang berlangsung disiapkan juga kolom yang telah dipasang pada statif dan diisi fase gerak sedikit untuk membasahi kapas. Kapas dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi. Tahapan selanjutnya kolom diisi fase gerak sampai penuh secara perlahan melalui dinding kolom. Bubur silika gel dimasukkan ke dalam kolom kromatografi sampai kolom dapat terbentuk sempurna, dimana silika gel yang dimasukkan mencapai $\frac{3}{4}$ tinggi kolom. Selanjutnya kolom yang sudah siap dibiarkan selama 24 jam untuk mengetahui apakah ada keretakan atau tidak. Jika fase diam (*silica gel*) pecah maka dilakukan pengulangan prosedur karena akan berakibat pada proses penyerapan senyawa yang tidak sempurna. Tahap berikutnya pasir (*sea sand*) sebanyak 2 gram ditambahkan agar pelarut tidak mengenai silika gel dan sebagai penyaring saat sampel dimasukkan.

Sampel kering yang telah dilarutkan dengan 10 ml fase gerak heksan:etil asetat (8:2, v/v) dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan agar tidak

merusak silika gel. Kran pada kolom dibuka dan pita-pita warna yang terbentuk ditampung pada tabung reaksi sesuai warna masing-masing sambil terus menambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar silika gel tidak kering. Fase gerak yang ditambahkan ditingkatkan terus menerus kepolarannya dengan menaikkan konsentrasi etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan adalah 8:2 v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v, dan 5:5 v/v. Prosedur isolasi fukosantin dengan kromatografi dapat dilihat pada Gambar 8.

3.4.3 Kromatografi Kolom Lapis Tipis

Identifikasi pigmen fukosantin dilakukan dengan metode Kromatografi Kolom Lapis Tipis (KLT). Tahap pertama dalam KLT ini adalah membuat garis dari pelat dengan menggunakan pensil 2B pada kedua ujung plat. Pada bagian bawah plat berukuran 1 cm yang berfungsi untuk menunjukkan posisi awal dimana fraksi ditotolkan sedangkan pada bagian atas plat berukuran 0,5 cm digunakan sebagai batas akhir yang ditempuh pelarut. Selanjutnya pigmen fukosantin kering dilarutkan dengan aseton secukupnya dan ditotolkan pada plat KLT bagian bawah dengan menggunakan mikro pipet dan ditunggu sampai pelat kering. Selanjutnya pelat KLT dimasukkan dalam beaker glass yang berisi fase gerak berupa heksan : etil asetat (8:2, v/v) 10ml, ditutup dengan cawan petri agar pelarut tidak menguap dan ditunggu sampai pelarut mencapai batas atas. Pelat KLT dihitung nilai Rf-nya. Prosedur KLT untuk identifikasi fukosantin dapat dilihat pada Gambar 9.





Gambar 8. Isolasi fukosantin dengan kromatografi kolom
 Pangestuti *et al.*, (2008) yang dimodifikasi Mu'amar (2009)

Pelat KLT



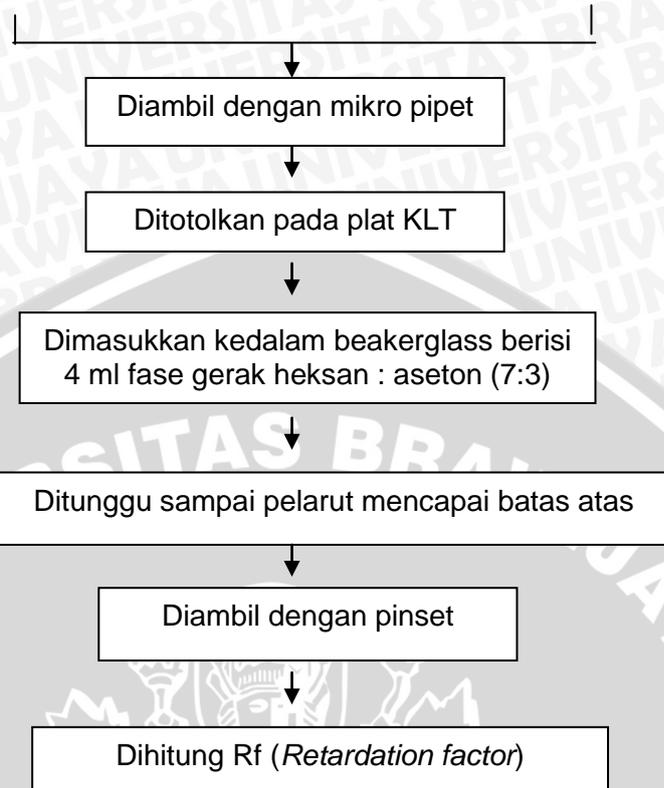
Dipotong dengan ukuran 1 cm x 5 cm,
 diberi garis batas atas 0,5 cm dan
 garis batas bawah 1 cm

Ekstrak pigmen kering



Dilarutkan dalam
 1 ml aseton





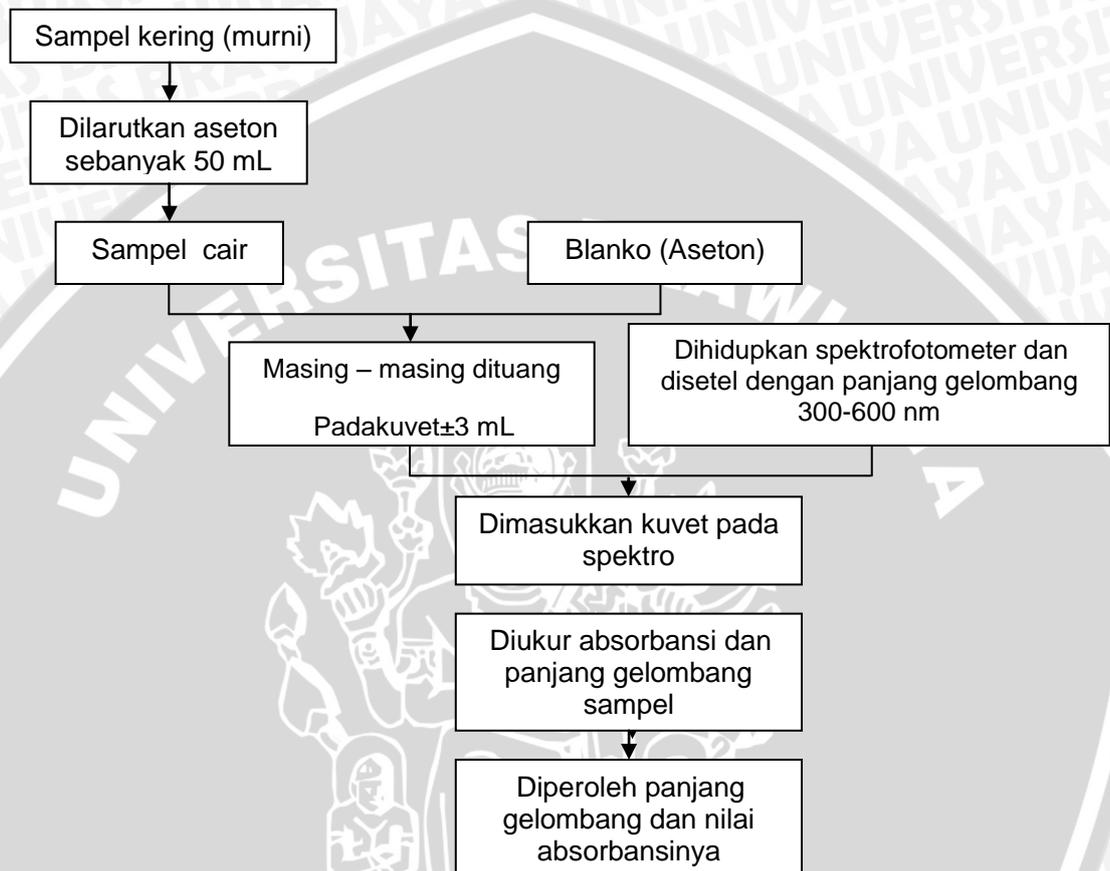
Gambar 9. Identifikasi fukosantin dengan KLT
Pangestuti *et al.*, (2008)

3.5 Prosedur Analisis Parameter Uji

3.5.1 Spektrofotometer UV-vis (Limantara *et al.*, 2009)

Langkah pertama dalam pengujian spektrofotometer UV-Vis adalah fraksi hasil dari kromatografi kolom dan KLT yang telah diyakini sebagai fukosantin dan sudah dalam berbentuk kering ditambahkan aseton (P.A) secukupnya. Kemudian disiapkan aseton di dalam *beaker glass* secukupnya. Sampel yang telah dilarutkan sebelumnya selanjutnya dimasukkan kedalam beaker glass sedikit menggunakan pipet tetes. Larutan pigmen dituangkan pada kuvet ± 3 mL dan kuvet kemudian dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer 1601 Shimadzu dan dilakukan pengujian. Hasil serapan maksimum yang terbentuk

oleh pimen fukosantin kemudian dibandingkan dengan serapan spektra maksimum menurut literatur. Prosedur Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 10.

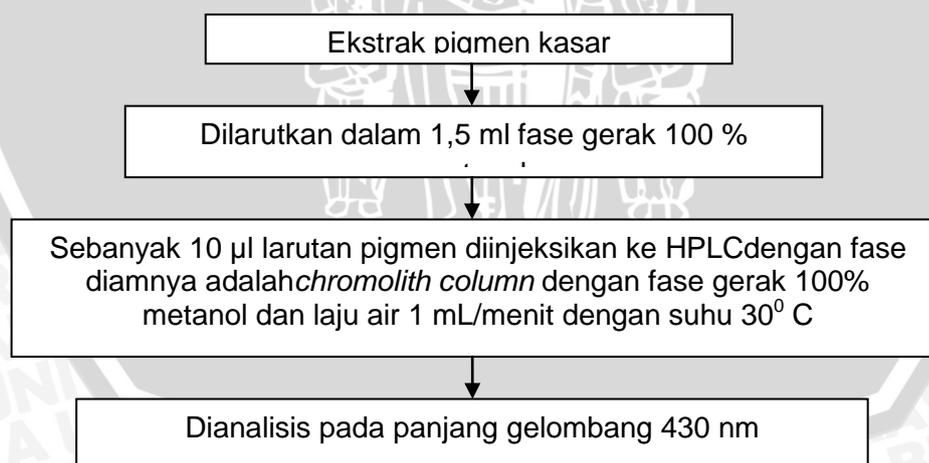


Gambar 10. Prosedur Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis 1601

3.5.2 Analisa HPLC

Perkembangan HPLC merupakan suatu terobosan untuk analisis karatenoid (Syahputra *et al.*, 2005). Pada ekstrak pigmen yang diduga fukosantin diidentifikasi menggunakan metode HPLC. Tahap ini disebut proses pemisahan, yaitu untuk memisahkan pigmen fukosantin dengan pigmen-pigmen lain yang terdapat pada alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan “teh” dengan melihat waktu tambat masing-masing puncak yang terbentuk. Tahap pertama ekstrak kering dilarutkan 1,5 mL dengan fase gerak 100% metanol (Terasaki.

et.,al.2009). Fase gerak merupakan salah satu variabel yang mempengaruhi pemisahan, dengan memperlihatkan faktor-faktor antara lain murni (tidak ada kontaminan), tidak bereaksi dengan wadah, dapat melarutkan sampel. Tahap selanjutnya sebanyak 10 µl larutan pigmen diinjeksi ke HPLC dengan fase diamnya adalah *chromolith column* dengan sistem elusi gradien 100% metanol lama elusi selama 15 menit dan laju alirnya 1 mL/menit pada suhu 30⁰ C. Elusi gradien adalah penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Efek dari elusi gradien adalah mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat pada kolom. Tahap berikutnya dilakukan analisa pada panjang gelombang 430 nm. Selanjutnya komponen yang dihasilkan direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah *peak* menyatakan komponen sedangkan luas *peak* menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran. Komputer dapat digunakan untuk mengontrol absorbansi dan analisis kerja sistem HPLC dan mengumpulkan serta mengolah data hasil pengukuran HPLC dengan cara online software (solusi LC versi 1.25) Shimadzu. Prosedur analisa HPLC dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Analisa HPLC

3.5.3 DPPH

Analisa aktivitas antioksidan untuk mengetahui kemampuan rumput laut *Sargassum cristaefolium* baik sampel segar dan basa kering “Teh” yang

digunakan untuk menghambat aktivitas radikal bebas. Ekstra kasar pigmen fukosantin perlakuan segar dan basa kering "Teh" tersebut dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (*2,2 diphenyl 1-picrylhydrazil*). Ekstra kasar pigmen fukosantin yang sudah dilarutkan sebelumnya menggunakan aseton diambil sebanyak 2 mL dan dibuat dalam variasi konsentrasi (0, 5, 10, 15 dan 20 ppm) konsentrasi 0 ppm sebagai blanko. Dari variasi – variasi konsentrasi tersebut dibuat menjadi 2 ulangan. Masing – masing ekstra kasar pigmen fukosantin dengan variasi berbeda dimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan 4,0 mL larutan DPPH 1mm dalam pelarut methanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visshimadzu pada panjang gelombang 517nm. Lalu pada proses selanjutnya dilakukan juga pengukuran absorbansi pada blanko. Besarnya aktifitas antioksidan dapat dihitung menggunakan rumus:

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

Nilai konsentrasi dan hambatan ekstrak diplot masing-masing pada sumbu x dan y. Persamaan garis yang sudah diperoleh dalam bentuk $y = bLn + a$ digunakan untuk mencari nilai IC (*inhibitor concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Suryaningrum *et al.*, 2006). Prosedur analisa DPPH dapat dilihat pada Gambar 12.

Dipipet ekstrak sebanyak 1 ml kemudian dilarutkan dengan 10 ml acetone (diperoleh konsentrasi 1 ppm)

Dilakukan pengenceran dengan menambahkan metanol hingga diperoleh sampel dengan konsentrasi 5,10,15 dan 20 ppm

Dipipet 0,2 ml larutan sampel dengan pipet mikro dan dimasukkan dalam botol vial

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Gambar 12. Prosedur Analisa DPPH

3.5.4 Intensitas Warna (L, a, b) dan Nilai °Hue

Menurut Khuluq *et al.*, (2007), kandungan pigmen yang tinggi mempengaruhi tingkat kecerahan. Hal ini dapat menyebabkan kenampakan ekstrak semakin cerah. Pengukuran warna ini menggunakan alat *colour reader*. L, a+, b+. Nilai L mewakili *lightness*, yaitu 0 untuk hitam dan 100 untuk putih, axis a menunjukkan intensitas warna merah (+) atau hijau (-), dan axis b menunjukkan intensitas warna kuning (+) atau biru (-) (Saati, 2002).

Menurut Setianingtias (2005), nilai a dan b digunakan untuk menentukan derajat HUE. Derajat HUE berfungsi untuk menentukan warna dari produk. Derajat HUE mempunyai rumus, yaitu : $^{\circ}\text{HUE} = \text{arc tg} (b/a)$ Nilai warna yang ditentukan berdasarkan nilai derajat HUE. Warnakuning merah mempunyai derajat HUE paling rendah dan warna ungu mempunyai derajat HUE paling tinggi. Prosedur pengukuran (L, a, b) dapat dilihat pada Gambar 13.

Dihidupkan *chromameter*, dilakukan kalibrasi



Disiapkan sampel cair dalam beaker glass
50 mL



Diukur warnanya

Gambar 13. Prosedur Pengukuran (L, a, b)



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

Hasil penelitian isolasi fukosantin dari rumput laut alga coklat (*Sargassum cristaefolium*) dengan menggunakan parameter hasil kolom, uji identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), uji spektrofotometer UV-Vis, uji HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), uji DPPH (*High Performance Liquid Chromatography*) dan uji L, a, b dapat dilihat pada Tabel 5 dibawah ini.

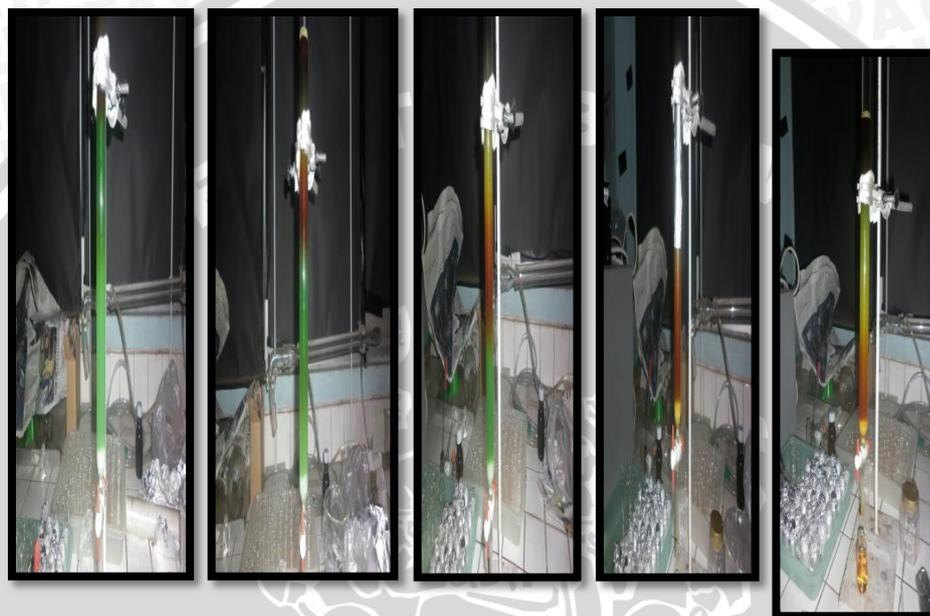
Tabel 4. Data hasil isolasi fukosantin

N	Uji Identifikasi	Hasil Segar	Hasil "Teh"	Literatur
1.	Kolom Kromatografi	64 isolat pigmen dalam botol vial dengan volume tiap tabung 10 mL. Isolat pigmen Fukosantin didapat dari botol vial ke 50 samapi 62	87 isolat pigmen dalam botol vial dengan volume tiap tabung 10 mL. Isolat pigmen Fukosantin didapat dari botol vial ke 71 samapi 75	Fukosantin berwarna oranye (Jeffrey, 1961)
2.	KLT(Kromatografi Lapis Tipis)	Rf 0,26-0,28	Rf 0,26-0,28	Rf 0,25-0,28 (Yan <i>et al.</i> , 1999).
3.	Pola Spektra (Uv-Vis 1601 Shimadzu)	446,6 nm	446 nm	Dalam menggunakan pelarutan Aseton didapatkan panjang gelombang 446,3 nm (Jeffrey, <i>et al.</i> , 1997)
4.	HPLC Fukosantin	6,42 menit	6,456 menit	5.85 menit (Hegazi <i>et al.</i> , 1998)

4.2 Pembahasan

4.2.1 Hasil Isolasi Fukosantin

Pembahasan tentang pigmen fukosantin menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam berupa *silica gel* dan fase gerak n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8:2 v/v (200ml), dan 5:5 v/v (200ml) dapat dilihat pada Gambar 14 di bawah ini.



Gambar 14. Isolasi Pigmen Fukosantin

Dari gambar di atas terbentuknya pita – pita pigmen berdasarkan warna dan tingkat kepolarannya masing - masing. Pada penelitian ini sistem kromatografi kolom yang dipergunakan adalah “*normal phase*” yaitu fase diam yang mempunyai sifat polar dan fase gerak yang mempunyai sifat lebih nonpolar, sehingga pigmen yang bersifat nonpolar akan keluar terlebih dahulu (Jeffrey, *et al.*, 1997). Ditambahkan oleh Lenny (2006), komponen yang mudah tertahan oleh fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Dari pemisahan pigmen menggunakan kromatografi kolom ini untuk sampel segar dihasilkan 64 fraksi dan untuk yang

basa kering juga menghasilkan 64 fraksi. Fraksi – fraksi ini di tampung pada tabung reaksi sesuai dengan warna masing – masing. Fraksi yang diduga pigmen fukosantin untuk sampel segar terdapat pada tabung 50-55 sedangkan untuk sampel teh kering terdapat pada tabung 71-75. Hal ini dapat dilihat pada warna fraksi yang memiliki warna oranye, ini sesuai dengan yang diungkapkan Jeffrey *et al.*, (1997), yaitu pigmen fukosantin berwarna oranye. Berdasarkan hasil tersebut juga diketahui mengenai tingkat kepolaran pigmen fukosantin, yaitu bersifat polar. Sedangkan menurut Gross (1991), golongan santofil (fukosantin) bersifat lebih polar dibandingkan dengan karoten. Pada penelitian ini warna oranye fukosantin keluar pada perbandingan fase gerak heksan : etil asetat 6:4 v/v untuk sampel segar, sedangkan untuk sampel kering perbandingan heksan : etil asetat 5:5 v/v. Pigmen fukosantin hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Hasil Isolasi Fukosantin

4.2.2 Identifikasi Fukosantin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi pigmen fukosantin hasil dari kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel dan fase gerak n-heksan : aseton (7:3 v/v). Tujuan dari penggunaan fase

gerak n-heksan dan aseton (7:3 v/v) yaitu untuk melarutkan senyawa yang polar, non polar maupun semi polar seperti fukosantin. Hasil KLT pigmne fukosantin dapat dilihat pada Gambar 16 di bawah ini.



Gambar 16. Hasil KLT Fukosantin

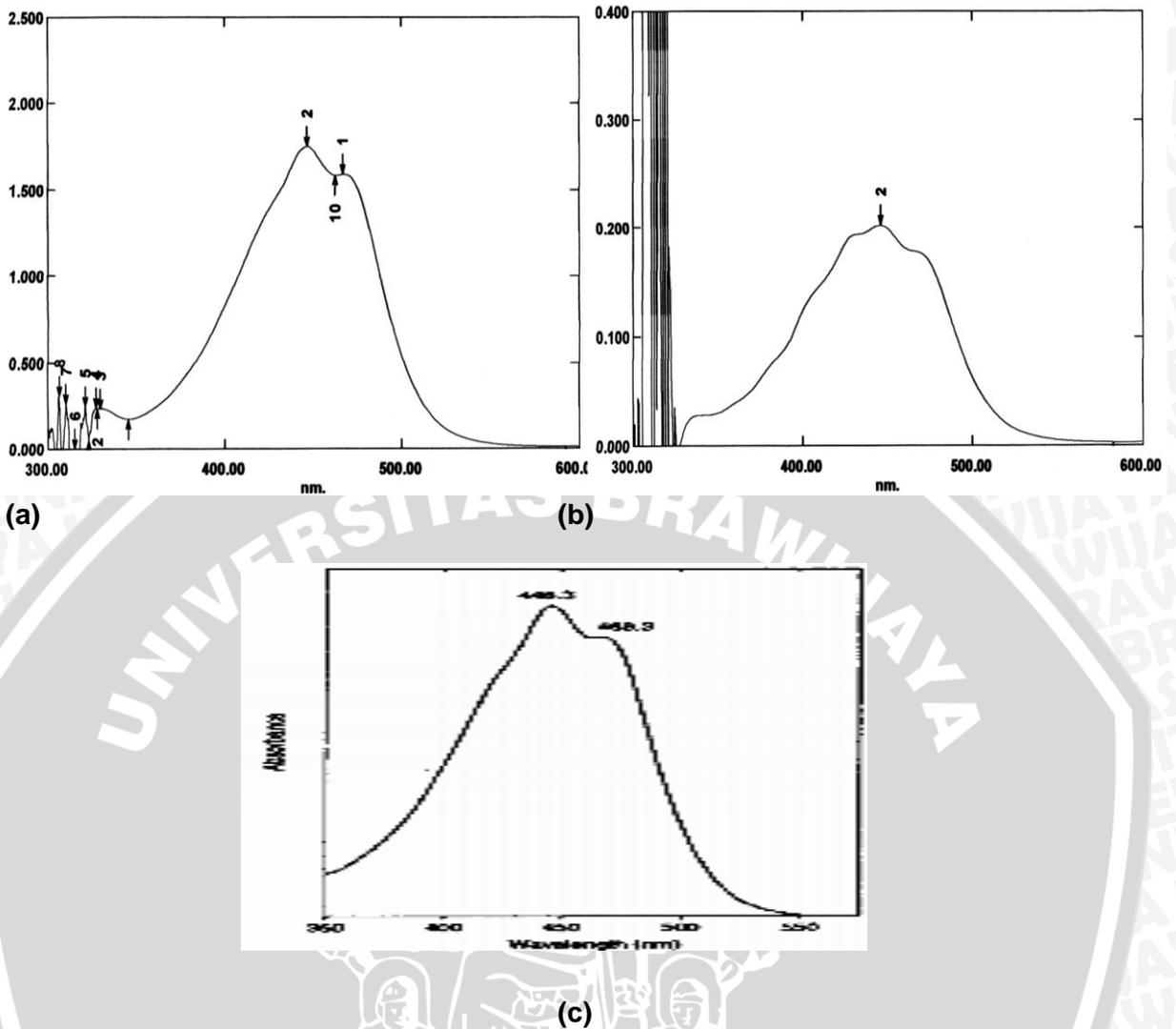
Dari hasil KLT diatas, diketahui bahwa totalan warna yang terbentuk hanya satu, yaitu berwarna orange yang diduga sebagai pigmne fukosantin. Menurut Yan *et al.*, (1999), nilai Rf pigmen fukosantin berkisar antara 0,25-0,28. Hal ini sama dengan nilai Rf yang diperoleh dari KLT diatas, yaitu 0,28. Jumlah total warna yang terbentuk pada pelat KLT memberikan informasi mengenai banyak sedikitnya pigmen yang terdapat pada ekstrak. Menurut Warsito (2007), selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan juga dapat di gunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika diperoleh satu total warna maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni.

Identifikasi pigmen menggunakan KLT lebih efesien karena memiliki kelebihan daripada analisa lainnya, menurut Gritter *et al.*, (1991), keuntungan seperti senyawa organik alam dan senyawa organik sintetis, kompleks organik dan anorganik serta ion organik dalam waktu singkat menggunakan alat yang tidak terlalu mahal. Metode ini kepekaannya cukup tinggi dengan jumlah

cuplikan beberapa mikrogram. Kelemahannya adalah harga Rf yang tidak tetep. Kromatografi lapis tipis adalah suatu identifikasi awal fukosantin dengan cara penotolan pada suatu plat yang dimasukkan kedalam suatu nilai atau jarak yang ditempuh oleh suatu zat tersebut. Analisa Rf perlu dilakukan untuk memperkuat identifikasi komposisi pigmen berdasarkan warna. Menurut Pangestuti *et al.*, (2007), faktor yang mempengaruhi nilai Rf pada KLT antara lain: kualitas adsorben, ketebalan lapisan, kejenuhan ruang kromatografi, teknik pengembangan (ilusi), suhu, dan kualitas pelarut. Ditambahkan oleh Harbone (1996), kepekaan KLT yang lebih besar disebabkan oleh sifat penyerap yang lebih. Kepekaan KLT disebabkan dapat memisahkan bahan yang jumlahnya lebih sedikit dari ukurannya μg .

4.2.3 Hasil Identifikasi Fukosantin dengan Pola Spektra dan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{max})

Uji pola spektra dan panjang gelombang dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601 ini bertujuan untuk membuktikan bahwa hasil yang diperoleh memang benar-benar senyawa fukosantin. Data yang sudah diperoleh dari hasil uji kemudian dibandingkan dengan literature yang telah ada dari Jeffrey *et al.*, (1997) dengan menggunakan pelarut aseton. Hasil analisa spektrofotometer sampel segar dapat dilihat pada Gambar 17 (a), untuk sampel basa kering dapat dilihat pada Gambar 17 (b) dan Gambar dari literature Jeffrey *et al.*, (1997) dapat dilihat pada Gambar 17 (c).



Gambar 17. (a). Pola Spektra Pigmen Fukosantin Sampel Segar
(b). Pola Spektra Pigmen Fukosantin Sampel Teh Kering
(c). Pola Spektra Pigmen Fukosantin Sampel Jeffrey *et al.*, (1997)

Gambar diatas menunjukkan hasil pengukuran pola spektra dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601. Hasil pengukuran pola spektra pada penelitian ini dengan menggunakan pelarut aseton dapat diperoleh serapan maksimum pada sampel segar sebesar 446,6nm, untuk sampel kering diperoleh serapan maksimum sebesar 446 nm, sedangkan serapan maksimum puncak spektra dalam pelarut aseton yang ada pada literatur Jeffrey *et al.*, (1997), adalah 446.3 nm. Dilihat dari hasil pengukuran pola spektra pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan literatur Jeffrey *et al.*, (1997), namun pada perubahan puncak yang lebih landai dan terdapat puncak tambahan pada 313,5nm

menandakan bahwa fukosantin yang didapat telah mengalami degradasi yang didapat pada sampel teh kering sedangkan untuk sampel segar mengalami sedikit pergeseran panjang gelombang. Perubahan pola spektra tersebut diduga juga terjadi karena adanya degradasi pada fukosantin. Menurut Nurcahyandian Limantara (2007), menyatakan bahwa degradasi pigmen dapat dilihat dari perubahan pola spektranya, penurunan absorbansi tersebut menunjukkan terjadinya pembentukan produk degradasi yang lebih kecil dari molekul awal. Pergeseran yang terjadi juga memungkinkan karena adanya perbedaan kemurnian pigmen saat digunakan pada saat proses identifikasi ataupun dikarenakan sudah terjadinya perubahan fukosantin dari *trans* menjadi *Cis-fukosantin*. Ditambahkan oleh Gross (1991), menyatakan bahwa serapan spektrum *cis-isomer* ditunjukkan adanya puncak tambahan di daerah serapan *niar-ultraviolet* yang disebut puncak *cis*. Pergeseran serapan maksimum (λ max) pada sampel segar dan sampel teh kering dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 5. Rerata Panjang Gelombang Fukosantin Pada Sampel Segar dan Teh Kering

Sampel	Retara Panjang Gelombang (λ .max)	Panjang Gelombang Menurut Literatur
Segar	446.6nm	Menurut Jeffrey <i>et al.</i> , (1997) panjang gelombang fukosantin adalah 446,3
Teh Kering	446nm	

Tabel diatas menunjukkan bahwa pengolahan teh alga coklat *Sargassum cristaefolium* mengalami pergeseran panjang gelombang kearah yang lebih pendek (hipsokromik) dan juga kearah yang lebih panjang pada sampel segar (batokromik). Rahmawan (2008), menyatakan bahwa pergeseran panjang gelombang kearah lebih panjang atau kedaerah merah (batokromik) menunjukkan terjadinya degradasi.. Pergeseran yang terjadi juga dimungkinkan karena perbedaan alat yang dipergunakan pada saat proses. Degradasi yang terjadi

pada sampel teh kering dimungkinkan dapat terjadi akibat perendaman dalam larutan air kapur yang memiliki sifat basa dan pengeringan menggunakan metrowealth, karena fukosantin memiliki sifat labil akan pH basa dan panas. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan Nurcahyati dan Timontius (2008), bahwa sifat-sifat fukosantin antara lain fukosanton labil pada suasana basa ditambahkan oleh Marsandate (2008), bahwa fukosantin sangat rentan terhadap degradasi agen eksternal seperti panas, Ph, dan cahaya.

4.2.4 Intensitas Warna Tingkat Kecerahan (L), (a), (b)

Analisis terhadap warna pigmen fukosantin dilakukan secara obyektif dengan menggunakan alat *Colour Reader*. Dengan menggunakan alat ini warna dari pigmen fukosantin yang di ukur dengan menggunakan tiga nilai yang ditambahkan dengan L (Kecerahan), a (Kemerahan), b (Kekuningan). Nilai L menyatakan bahwa derajat kecerahan pada pigmen, nilai a menyatakan gradiasi hijau hingga waran merah, sedangkan nilai b menyatakan gradiasi warna dari biru hingga kuning. Untuk nilai a dan b rentang nilainya adalah dari negatif hingga positif. Dari hasil analisis intensitas warna (L), (a), (b) pada pigmen fukosantin dapat dilihat pada Tabe 6.

Tabel 6. Hasil analisis itensitas warna (L), (a), (b)

Sampel	(L)	(a)	(b)	°Hue
Segar	23,8	10,5	9,0	40,60
Teh kering	23,0	11,7	10,5	41,90

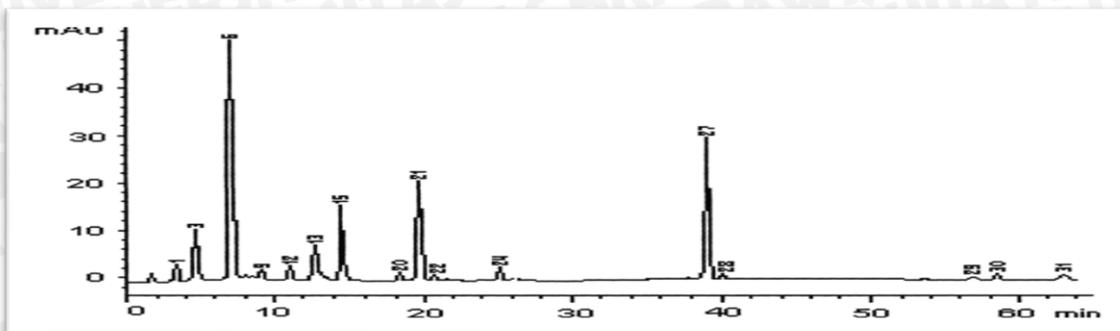
Bedasarkan hasil analisis itensitas warna tingkat (L) pada pigmen fukosantin diperoleh nilai itensitas warna tingkat kecerahan (L) dari fukosantin yang paling rendah pada perlakuan teh kering yaitu 23,0 sedangkan pada sampel teh segar lebih tinggi yaitu 23,8 dari nilai (L) kedua sampel tersebut menunjukkan bahwa warna pigmen pada sampel teh kering lebih gelap daripada sampel teh segar. Dari data diatas maka dapat disimpulkan bahwa nilai itensitas warna tingkat (L) pada sampel teh kering mengalami degradasi akibat perlakuan

perendaman pada larutan air kapur yang bersifat basa sehingga warna pigmen menjadi lebih gelap. Khuluq *et al.*, (2007), menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi pigmen dalam ekstrak akan memberikan konsentrasi warna yang lebih tinggi. Hal ini dapat menyatakan kenampakan ekstrak semakin cerah.

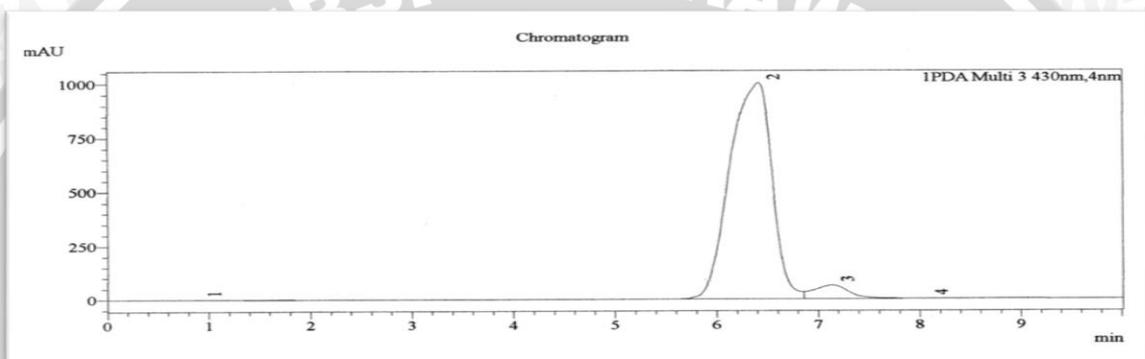
4.2.5 Analisa High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC merupakan suatu metode yang sangat baik dalam menganalisis pigmen pada tumbuhan tingkat tinggi dan alga karena dengan sampel sedikit dan analisa yang pendek dapat memisahkan klorofil, karotenoid, serta turunannya (Gross, 1991). Kandungan pigmen dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi selanjutnya diidentifikasi dengan detektor PDA yang dapat menghasilkan pola spektra dari puncak-puncak yang diperoleh secara kuantitatif (Bonora *et al.*, 2000). Penentuan jenis pigmen alga coklat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi hasil penelitian dengan literatur yang menggunakan HPLC yang sama dengan penelitian, dan fase gerak dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang hampir sama.

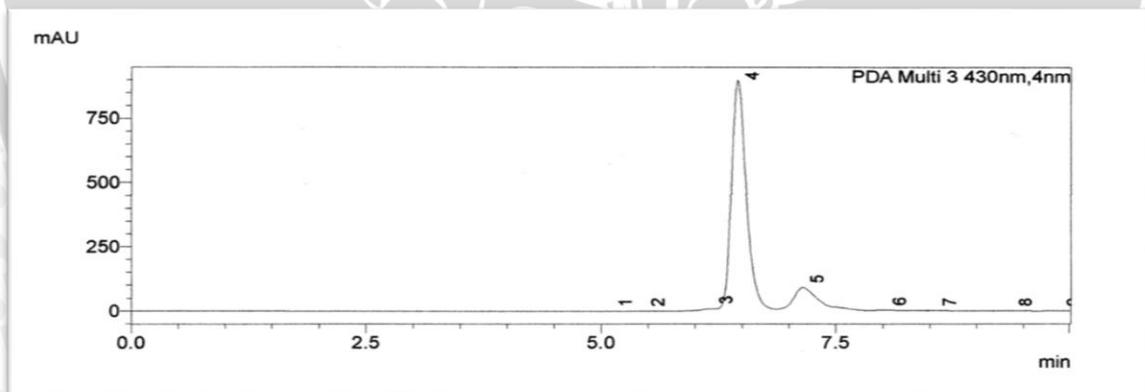
Hasil analisa HPLC dari *Sargassum cristaefolium* sampel segar dan “teh” diidentifikasi dengan menggunakan panjang gelombang 430 nm selanjutnya dibandingkan dengan literatur Hegazi *et al.*, (1998) yang sama panjang gelombang 430 nm. Dari gambar diatas, hasil analisis menunjukkan bahwa menurut literatur Hegazi *et a.*, (1998) fukosantin jenis *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens*, *Padina pavonica* terdeteksi pada waktu retensi 5,85 menit, sedangkan fukosantin dari jenis alga coklat *Sargassum cristaefolium* sampel segar terdeteksi pada waktu 6,42 menit dan *Sargassum cristaefolium* sampel “teh” terdeteksi pada waktu 6,45 menit. Hasil identifikasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi waktu tambat dapat dilihat pada Gambar 18. (a) literatur pembandingan Hegazi *et al.*, (1998), gambar 18 (b) sampel “teh” dan gambar 18 (c) sampel segar.



(a)



(b)



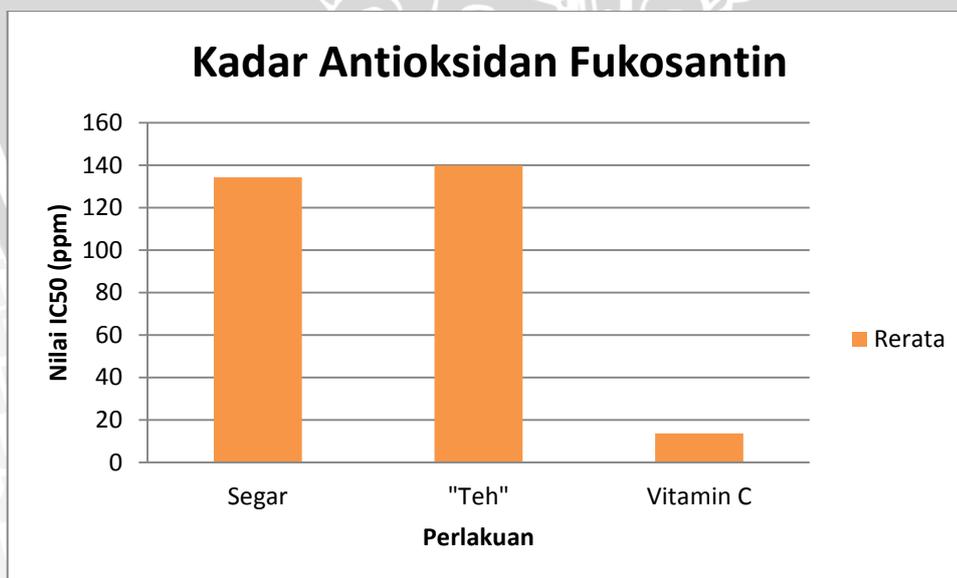
(c)

Gambar 18:

- a. Hasil HPLC waktu tambat literatur Hegazi *et,al* (1998).
- b. Hasil HPLC waktu tambat sampel segar alga coklat
- c. Hasil HPLC waktu tambat sampel "teh" alga coklat

4.2.6 Pengukuran Aktivitas Antioksidan menggunakan metode DPPH

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. Metode ini dipilih karena memiliki kelebihan yaitu sederhana, mudah cepat, peka dan membutuhkan sedikit sampel (Purwaningsih, 2012). Penelitian ini yang dijadikan pembandingan Antioksidan yaitu Vitamin C dan telah didapatkan nilai IC_{50} sebesar 13,676 ppm. Aktivitas antioksidan dihitung melalui nilai IC_{50} , dimana semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Prinsip uji dengan metode ini yaitu DPPH berperan sebagai radikal bebas yang direndam oleh bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk *1,1-difenil-2-pikrilhidrazin*. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning atau kuning gelap yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis 517 nm, sehingga aktivitas perendaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Sunarni *et al.*, 2005). Nilai IC_{50} aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas DPPH dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Nilai IC_{50} Penangkap Radikal Bebas DPPH

Dari Gambar 19. Perhatikan nilai IC_{50} terkecil dimiliki oleh sampel segar sebesar 134,23 ppm, perlakuan basa kering sebesar 139,94 ppm. Nilai

IC₅₀ yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin tinggi, maka makna dari nilai IC₅₀ pada sampel segar maupun kering dengan nilai IC₅₀ pada masing-masing sampel sebesar 134,23 ppm dan 139,94 ppm maka dapat diartikan bahwa dengan nilai IC₅₀ sebesar 134,23 ppm dan 139,94 ppm dapat menghambat radikal bebas sebesar 50%. Nilai IC₅₀ dapat dikatakan berbanding terbalik dengan antioksidan (Molyneux, 2004).

Perbedaan aktivitas antioksidan pada *Sargassum cristaefolium* diduga disebabkan oleh (1) pelarut yang dipergunakan dalam proses ekstraksi (metanol) dan (2) adanya pengaruh reaksi dengan basa pada struktur polifenol (flafonoid) pada perlakuan basa kering. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Muawwanah *et al.*, (1997) terhadap ekstrak alga laut *Sargassum sp.* Basah memperhatikan aktivitas antioksidan tertinggi dengan pelarut metanol sedangkan ekstrak *Sargassum sp.* kering kurang mempunyai aktivitas antioksidan.

Menurut Adam (2013), kemampuan metanol dalam mengekstrak jaringan tanaman disebabkan pelarut ini secara efektif dapat melarutkan senyawa polar, seperti gula, asam amino dan glikosida. Berdasarkan penelitian Atta-ur-Rahman (2001) senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flafonoid, fenolat dan alkaloid, yang merupakan senyawa-senyawa polar, akan terektrak pada fraksi ekstrak etanol karena etanol adalah pelarut polar. Ditambahkan oleh Ariani *et al.*, (tanpa tahun) sebagian besar flafonoid memiliki aktivitas antioksidan yang disebabkan karena adanya gugus hidroksi fenolik dalam struktur molekulnya. Semakin tinggi kadar flafonoid maka potensi antioksidannya juga akan semakin tinggi. Akan tetapi, komponen polifenol mudah teroksidasi menjadi bentuk lain yang dapat mengurangi kemampuannya sebagai antioksidan (Shahidi dan Naczki, 2004).

Senyawa antioksidan dapat berupa senyawa alam ataupun senyawa sintetik. Sebagai golongan senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang dikenal sebagai sumber *radical scavenger* adalah golongan senyawa fenol, seperti: flafonoid, flafonon, flavon, fenil propanoid, antrakuinon, ataupun lignin; senyawa-senyawa alkaloid, saponin, fenol, flafonoid, dan antra-kuinon (Lisdawati *et al.*, 2006).

Pengujian dengan radikal bebas DPPH merupakan suatu metode pengujian secara kuantitatif, yang menunjukkan jika nilai IC_{50} semakin kecil, maka semakin tinggi aktivitas senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak menangkap radikal DPPH begitu juga sebaliknya jika nilai IC_{50} semakin besar maka semakin rendah aktivitas senyawa antioksidan yang terkandung di dalam ekstrak penangkap radikal DPPH. Nilai IC_{50} dapat didefinisikan sebagai senyawa konsentrasi yang menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebanyak 50% (Ukhty, 2011). Senyawa antioksidan dinyatakan baik jika nilai IC_{50} -nya semakin kecil (Apriandi, 2011).

Menurut Zuhra *et al.*, (2008) senyawa antioksidan dikategorikan dalam empat golongan yaitu sangat kuat (IC_{50} antara 1-50 ppm), kuat (IC_{50} antara 50-100 ppm), sedang (IC_{50} antara 100-150 ppm) dan lemah (IC_{50} antara 150-200 ppm). Jika IC_{50} lebih dari 200 ppm maka tidak berpotensi sebagai senyawa antioksidan. Pada Lampiran 82 Telah dibuktikan dengan menggunakan uji T, bahwa aktivitas antioksidan pada sampel segar dan "teh" tidak ada perbedaan. Serta aktivitas antioksidan pada perlakuan segar dan "teh" masuk dalam kata gori sedang itu diakibatkan adanya perlakuan basa, Sedangkan antioksidan tidak dapat berada dalam suasana basa.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai aktivitas antioksidan alga coklat *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya aktivitas antioksidan pigmen fukosantin pada perlakuan segar dan "teh" dari alga coklat *Sargassum cristaefolium* dimana pada masing – masing hasil perlakuan di peroleh nilai IC_{50} untuk sampel segar sebesar 134,23 ppm dan untuk sampel "teh" diperoleh nilai IC_{50} sebesar 139,780 ppm. Pada masing – masing hasil yang di peroleh dari nilai IC_{50} maka dapat dikatakan bahwa kandungan antioksidan yang tinggi berada pada sampel segar. Dalam penelitian ini dapat dikatakan bahwa tidak adanya perbedaan aktivitas antioksidan pada pigmen fukosantin segar maupun "teh".

5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lanjutan tentang aktivitas antioksidan pada beberapa sampel alga coklat segar dan "teh" dengan menggunakan uji lain selain DPPH. Selain itu perlu memperhatikan perlakuan dalam penelitian pigmen karena pigmen sangat rentan akan cahaya dan tingkat kebersihan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam. C., G. S. Djarkasi., M. M Ludong., dan T. Langi. 2013. **Penentuan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae*)**. Jurnal Teknologi Pertanian. Hlm: 1-5.
- Adnan M., 1997. **Teknik Kromatografi untuk Analisa Bahan Makanan**. Penerbit Andi.Yogyakarta
- Ahmad. B, dan Khoiruman. 2011. **Optimisasi Pengeringan Pada Pembuatan Karaginan dengan Proses Ekstraksi dari Rumput Laut Jenis *Euchema cottoni***. Jurnal Fakultas Teknik Kimia. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Ahmadsoffa. 2009. **Cerita Rumput Laut dari Alor**. <http://Theahmadinstitute.com>. Dikases tanggal 24 Mei 2014, pukul 09.00 WIB.
- Amirin, T. M. 2009. **Penelitian Eksploratori (Eksploratif)**. www.Tatangmanguny. Wordpress.com. Diakses pada tanggal 21 Mei 2014 pukul 20.00 WIB.
- Andaka, G. 2008. Optimasi **Proses Ekstraksi Minyak Kacang Tanah Dengan Pelarut n-Heksana**. Jurnal Teknologi. Volume 2(1) :80-88.
- Andayani, R; Lisawati, Y dan Mimuna. 2008. **Penentuan Aktifitas Antioksidan. Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum Lycopersicum L.*)**. Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi 13 (1) : 31-37.
- Anggadiredja, J; A. Zatik; H. Purwanto dan S. Istini. 2006. **Rumput Laut. Penebar Swadaya**. Jakarta. Hal 6-7
- Apriandi, A. 2011. **Aktivitas Antioksidan Dan Komponen Bioaktif Keong Ipong-Ipong (*Fasciolaria Salmon*)**. FPIK. IPB. Bogor.
- Asai, A; T. Sugawarna; H. Ono; and A. Nagao. 2004. **Biotransformation of Fucoxanthional Into Amarouciaxanthin in Mice and HEPG2 Cell; Formation and Cytotoxicity of Fucoxanthin Metabolites Drug Metabilism and Dispotion**. 32; 205-211.
- Astuti, N. Y. 2009. Uji **Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Oleh Analog Kurkumin Monoketon dan Heteroalifatik Monoketon**.<http://dosc.google.com/viewer>. **Skripsi Fakultas Farmasi UNMUH. Surakarta**
- .Ballard, L. J; L. A. Glassgow; L. C Hoskins and T. Krohe. 2008. **The Resonance Raman Excitation Profil of Fucoxanthin**. Spectrochimica Acta 45 A (12); 1235-1238.
- Bintang, M. 2010. **Biokimia Teknik Penelitian**. Jakarta Erlangga, 141-148.

- Britton, G., L. Jensen, S dan Pefender. H. 1995. **Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis**. Birkauser Veriag, Basel, Baston. Berlin.
- Ching, L.W; Siew, L.H; Pooi, Y.C; Kwan, K.W. 2010. **Stability Studies of Fucoxanthin From *Sargassum binderi***. Auatralian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(10): 4580-4584, 2010.
- Clark , J. 2002. **The Mechanism for Esterification Reaction**. <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/entermenu.html/1#top>
- Clark. J. 2007. **Kromatografi Lapis Tipis**. http://www.chem-is-try.org/materi_kimia/instrumen_analisis/kromatografi_lapis_tipis/. Diakses Tanggal 22 Mei 2014.
- Fahri, M. 2010. **Kajian Kandunagn Metabolit Sekunder darai Alga Coklat *Sargassum Cristaefolium***.http://elfahrybima.blogspot.com/2010/10/kajian-kandungan-metabolit_sekunser.html.Diakses pada tanggal 28 Mei 2014.
- Fauziah, Fifit. F; U. P. Juswono dan S. Herwiningsih. 2012. **Pengaruh Pemberian Buah Sirsak dan Kunyit Terhadap Kandungan Radikal Bebas Pada Daging Sapi yang Diradiasai Dengan Sinar Gamma**. Jurusan Fisika, F. MIPA Universitas Brawijaya.
- Firdhayani, I. R. 2010. **Solusi Sehat Bagi Penderita Kanker dan Diabetes**. Jurnal Program Kreatifitas Mahasiswa. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universotas Airlangga. Surabaya.
- Gritter F J. Diterjemahkan oleh K. Padmawinata. 1991. **Pengantar Kromatografi**. ITB. Bandung. Hal 107.
- Gross, J. 1991. **Pigments In Vegetables Chlorophylls and Carotenoids**. An Avi Book. New York.
- Guenther, E. Diterjemahkan oleh S. Ketaren. 1987. **Minyak Asiri I**. Penerbit UI. Jakarta.
- Harbone, J. B. 1984. **Metode Fito Kimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**. Penerbit ITB. Bandung
- Haugan, J, A., dan Liaaen-jensen, S . 1992. **Naturally Occuring Stereoisomers of Fucoxanthin**. Phytochemistry. Hal 1359-1361.
- Hegazi M. M, AP. Ruzafa, L; Almela and M.E Candela. 1998. **Separation and Identification of Chlorophylls and Caratenoids From *Caulerpa prolifera*, *Jania rebens*, and *panadia pavonic* by Reversedphase high performance Liquid Cromatography**. Journal of Chromatography, A 829 : 153-159.
- Hendayana, S. 2006. **Kimia Pemisahan**. PT Remaja Rosdakarya. Bandung.

- Hermawan, A.M., Hartati K., dan Kartini Z. 2013. **Perbedaan pH Perendaman Dalam Larutan Kapur (Ca(OH)₂ Dengan Pengeringan Oven Terhadap Kualitas Kimia Teh Alga Coklat (*Sargassum filipendula*) (skripsi)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang
- Huda, N. 2001. **Pemeriksaan Kerja Spektrofotometer UV-Vis CBC911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CL 19140**. Bidang Evaluasi dan Pengembangan Keselamatan Instalasi Sigma Epsilon.
- Jeffrey, S. W., 1961. **Paper Chromatographic Separation of Chlorophylls and Carotenoids from Marine Algae**. C. S. I. R. O. Marine Laboratory. Cronulla. Sydney. Australia.
- Jeffrey, S. W, R. F. C Mantoura, and S. W Wright. 1997. **Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Method**. UNESCO Publishing. Paris.
- Kartika, H. P. 2011. **Pemanfaatan Rumput Laut Coklat (*Sargassum sp*) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh**. Jurnal Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Khuluq. A. D., S.B. Widjarnako dan E. S. Murtini. 2007. **Ekstraksi dan Stabilitas Betasianin Daun Darag (Alternatif dentata) Kajian Perbandingan Pelarut Air : Etanol dan Suhu Ekstraksi**. Jurnal Teknologi Pertanian. 8(3) Hal: 169-178.
- KKP. 2011. **Teknologi Pengolahan Pasca Panen dan Pengolahan**. <http://kkp.org/encyclopedia>. Diakses tanggal 18 April 2014. Pukul 20.10 WIB.
- Lenny, S. 2006. **Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp**. USU repository.
- Limantara, L. 2006. **Buku Panduan Praktikum**. Widya Sari Press. Salatiga.
- Limantara, L dan Heriyanto. 2010. **Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Coklat dari Perairan Madura Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**. Ilmu Kelautan. Vol. 15 (1) 23-31.
- Limantara, L dan Heriyanto. 2011. **Optimasi Proses Ekstraksi Fukosantin Rumput Laut Coklat *Padina Australis* Hauck Menggunakan Pelarut Organik Polar**. Ilmu Kelautan. Vol. 16 (2) 86-94.
- Lisdawati, V, L; Broto dan S. Kardono. 2006. **Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)**. Media Libang Kesehatan XVI (4): 1-7
- Marcandate, A.Z. 2008. **Carotenoid In Food Source and Stability During Processing and Storage In Carmen S (ed) Food Chmical and Functional Properties**. Boca Raton CRC Press.
- Markham, K.R. 1998. **Cara Mengidentifikasi Flafonoid Terjemahan Kasih Padmawinata**. Bandung: Penerbit ITB, 15-35, 43-55, 85-89.

- Molyneux, P. 2004. **The Use of Stable Free Radical Diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity.** Songklanakari J. Sci. Technol 26 (2) : 211-219.
- Mu'amar, H.A. 2009. **Studi Termostabilitas Pigmen Fukosantin, Klorofil a dan Ekstrak Kasar Padina australis dan Sargassum Polycystum terhadap Suhu dan Lama Pemanasan yang Berbeda.**
- Muawwanah, I Setyaningsih., W. Zahiruddin., dan J. Anggadiredja. 1997. **Ekstraksi Antioksidan dari Alga Laut *Sargassum sp* dan Ektefitas dalam Menghambat Kerusakan Awal Emulsi Minyak Ikan.** Buletin Teknologi Hasil Perikanan. Vol III. No 1 THP 6-9.
- Nazir. 1985. **Metode Penelitian.** Jakarta : Ghalla.
- Pangestuti, R, L Limantara, dan A. Susanto. 2007. **Kandunagn dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin Srgassum polycystum C. A Agardh.** Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal. 201-209.
- Peng, J., Yuan, JP., Wu, CF, dan Wang, JH. 2011. **Fucoxanthin, a Marine Caratenoid Present In Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health.** Mar. Drugs, 9. 1806-1828.
- Pipin K. 2009. **Potensi Pengembang Produk Pangan Fungsional Berantioksidan dari Makroalga dan Mikroalaga.** J. Oseana Vol. XXXIV. No. 3:9:18.
- Purwaningsih, S. 2012. **Aktivitas Antioksidan Dan Komposisi Kimia Keong Mata Merah (*Cerihidae obtusa*).** Departemen teknologi Hasil Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB: Bogor
- Purwati, dan U. Rastuti. 2009. **Skrining Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Aktifitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Daun Wedusan (*Eupatorium odoratum*).** Jurnal Fakultas Sains dan Teknik Unsoed. Yogyakarta. Molekul, Vol. 4. No. 2. November, 2009: 94-104.
- Putra, S. V. 2006. **Alga Laut sebagai Biotarget Industri.** <http://www.chem-is-try.org/?sect=fokus&ext=24.html> diakses tanggal 29 April 2014 pukul 20:02
- Rachmat, R. 1999. **Potensi Algae Coklat di Indonesia dan Prospek Pemanfaatannya.** Prosidings Forum Komunikasi Ikatan Fisiologi Indonesia (IFI) hal 31-35
- Rahmawan, L. S. 2008. **Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*).** Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Rivai, H. 1995. **Azas Pemeriksaan Kimia.** UI Press. Jakarta.
- Saati, E. A. 2002. **Identifikasi dan Uji Kualitas Pigmen Kulit Buah Naga Merah (*Hylocareus Costaricensis*) Pada Beberapa Umur Simpan Dengan Beberapa Perbedaan Jenis Pelarut.** Tesis Progra Pascasajana. Universitas Brawijaya. Malang.

- Sastrohamidjojo, H. 2007. **Kromatografi**. Liberty. Yogyakarta.
- Sachindra, M. N; E, Satu; H, Maeda; M. Hosokawa; Y. Niwano; M. Kohno; and K. Migashita. 2007. **Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching. Activity of Marine Carotenoid Fucoxanthin and Its Metabolites**. J. Agric Food Chem, 55, 8516 – 8522.
- Santianez, E. J. W dan C. Gavino; Jr. Trono. 2013. **Taxonomy of the Genus Sargassum (*Fucales, Phaeophyceae*) From Alabat Island, Quezon, Northeastern Philippines**. Science Diliman. 25; 1, 29-50
- Schefflan, L. and B. Morris. Jacobs. 1983. **The Handbook of Solvent**. D. Van Nostrand Comp. Inc. New York.
- Setiadi. 2010. **Pemindahan masa**. Depok. Universitas Indonesia. Jurusan Teknik Kimia.
- Shahidi dan Naczka. 2004. **Phenolics : Chemistry, Dietary Sources Metabolism, and Nutritional Significance Nutrition Reviews**, 56, page: 317-333.
- Sholihah, H. M. 2010. **Uji Afrodisiaka Fraksi Larut Air Ekstrak Etanol 70% Kuncup Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum (L.) Merr.& Perry*). Terhadap Libido Tikus Jantan**. Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Shriner, R.L,R.C.Fuson, D.Y.Curtin, C.K.F. Hermawan and T.C.Morili.1980. **The Systematic Identification of Organic Compounds**. 6th Edition. Jhon Willey dan Sins, Inc. Singapore.
- Singarimbun, M dan Effendi, S. 1989. **Metode Penelitian Survei**. Edisi Revisi. LP3ES.Jakarta.
- SNI. 1992. Etil Asetat. Pusat Standarisasi Industri. Departemen Perindustrian. Jakarta.**
- Soekarno, S. I., 1990. Dasar-Dasar Pengawasan dan Standarisasi Mutu Pangan.PAU Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor. Bogor**
- Sulistianai. 2013. **Kromatografi Kolom**. Tugas Kimia. SMAN 12 Bandung. Bandung..
- Sunarni, T. 2005. **Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Kecambah dari Biji Tanaman Familia Papilion aceae**. Jurnal Farmasi Indonesia 2 (2) 2001, 53-61.
- Suryaningrum, D., T. Wikanta,., dan H. Kristiana. 2006. **Uji Aktivitas Antioksidan dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euchema cottonii***. Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan 1 (1) : 51-63.
- Towaha, J. 2013. **Kandungan Senyawa Kimia dari Daun Teh (*Camellia sinensis*)**. **Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri**. Volume 19 Nomor 3, Desember 2013.

- Ukhty, N.2011. Kandungan Senyawa Fitokimia. **Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Lamun *Syringodium isoetifolium***. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wanto dan M. Ramli. 1977. **Alat-alat Industri Kimia I**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta.
- Warsito. 2007. **Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder dari Tanaman**. Jurnal Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Winarno.1994. **Teknologi Pengolahan Rumput Laut**. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta
- Wisudyawati, D dan N. Ike. 2010. **Peningkatan Pendapatan dan Tarif Hidup Masyarakat Melalui Pelatihan Pembuatan Teh *Sargassum sp.* di Pantai Ponjuk Kecamatan Talango Kabupaten Sumenep**. www Scribd. com. Diakses pada tanggal 28 Mei 2014 Pukul 19.30 WIB.
- Yan, X;Y. Chuda; M. Suzuki; and T. Nagata.1999. **Fucoxanthin as The Major Antioxidant in *Hijika Fosiformis*, a Common Edible Seaweed**. Biochem Vol 63 (3). 605-607.
- Zailanie, K dan Sukoso. 2014. **Study on of Fucoxanthin Content and its Identification in Brown Algae from Padike Vilage Talango District**.Madura Islands.
- Zuhra, C.F., Julianti, B.R. dan Herlince. S. 2010. **Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus* (L) Merr). Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hassanudin. Makasar. Jurnal Biologi Sumatera, Januari 2008, hlm. 7 – 10 Vol. 3, No. 1 ISSN 1907-5537.**
- Zulviah, V. 2009. **Studi Ekstraksi Crude Fucoxanthin Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) Menggunakan Suhu dan Lama Ekstraksi Yang Berbeda**. Jurnal Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Lampiran1. Prosedur Persiapan Sampel dan Pembuatan Teh Alga Coklat

Prosedur Persiapan Sampel

Prosedur persiapan sampel segar, sebagai berikut :

- Sargassum cristaefolium segar dicuci dengan air tawar mengalir dan disikat bagian daun untuk menghilangkan sisa pasir dan lendir yang menempel sehingga alga coklat menjadi bersih.
- Sampel ditiriskan untuk mengurangi resapan air pada bahan.
- Sampel dipilih dan diambil bagian daun lalu digunting kecil-kecil kurang lebih 1 cm.
- Ditimbang dengan timbangan digital dengan ketelitian 10^{-4} sebanyak 100 gram.
- Dihaluskan menggunakan mortar serta ditambahkan CaCO_3 sebanyak 10 gram untuk menetralkan alga coklat.
- Hasil sampel segar.

Prosedur persiapan sampel "teh", sebagai berikut :

- Disiapkan Sargassum cristaefolium segar yang sudah bersih, timbangan digital, bak, larutan air kapur, pH paper, dan beaker glass 1000mL.
- Dibuat larutan air kapur dengan pH 11 dengan cara ditimbang kapur sirih 20 gram dan dilarutkan dalam air keran sebanyak 5000 mL (5 L), lalu diukur pH dengan pH paper.
- Alga coklat direndam kedalam larutan air kapur selama 4,5 jam.
- Dicuci kembali hingga bersih untuk menghilangkan bau kapur.
- Ditiriskan menggunakan keranjang dan dikeringkan diatas lembaran koran untuk mengurangi kandungan air pada bahan.
- Dikeringkan sampel menggunakan microwave dengan suhu 80°C selama 30 menit sampai kadar airnya 5%.

- Digiling sampel menggunakan blender sampai menjadi serbuk teh.
- Serbuk teh dimasukkan ke dalam plastik klip dilapisi dengan aluminium foil. Tujuannya untuk menjaga kualitas pigmen teh.
- Teh alga coklat.



Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi (Pangestuti, etal., (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009)

Prosedur Ekstraksi

Prosedur ekstraksi dilakukan sebagai berikut:

- Disiapkan alga coklat segar yang sudah bersih, teh alga coklat, mortar dan alu, CaCO_3 beaker glass 1000 mL, gelas ukur 100 mL, pelarut aseton (p.a), metanol (p.a), kertas saring halus, aluminium foil, dan wrap.
- Ditimbang sampel segar dan teh alga coklat sebanyak 100 gram dengan timbangan digital dengan ketelitian 10^{-4} gram.
- Dihaluskan dengan menggunakan mortar dan diberi CaCO_3 sebanyak 10 gram sampel segar. Untuk sampel teh langsung ke perlakuan selanjutnya.
- Dimaserasi bertingkat dengan pelarut metanol : aseton ((7:3 v/v)) sebanyak 300 mL selama 24 jam, 12 jam, dan 6 jam.
- Disaring filtrat setiap pergantian waktu maserasi dengan menggunakan kertas saring halus.
- Filtrat hasil maserasi lalu di partisi.

Prosedur Fraksinasi

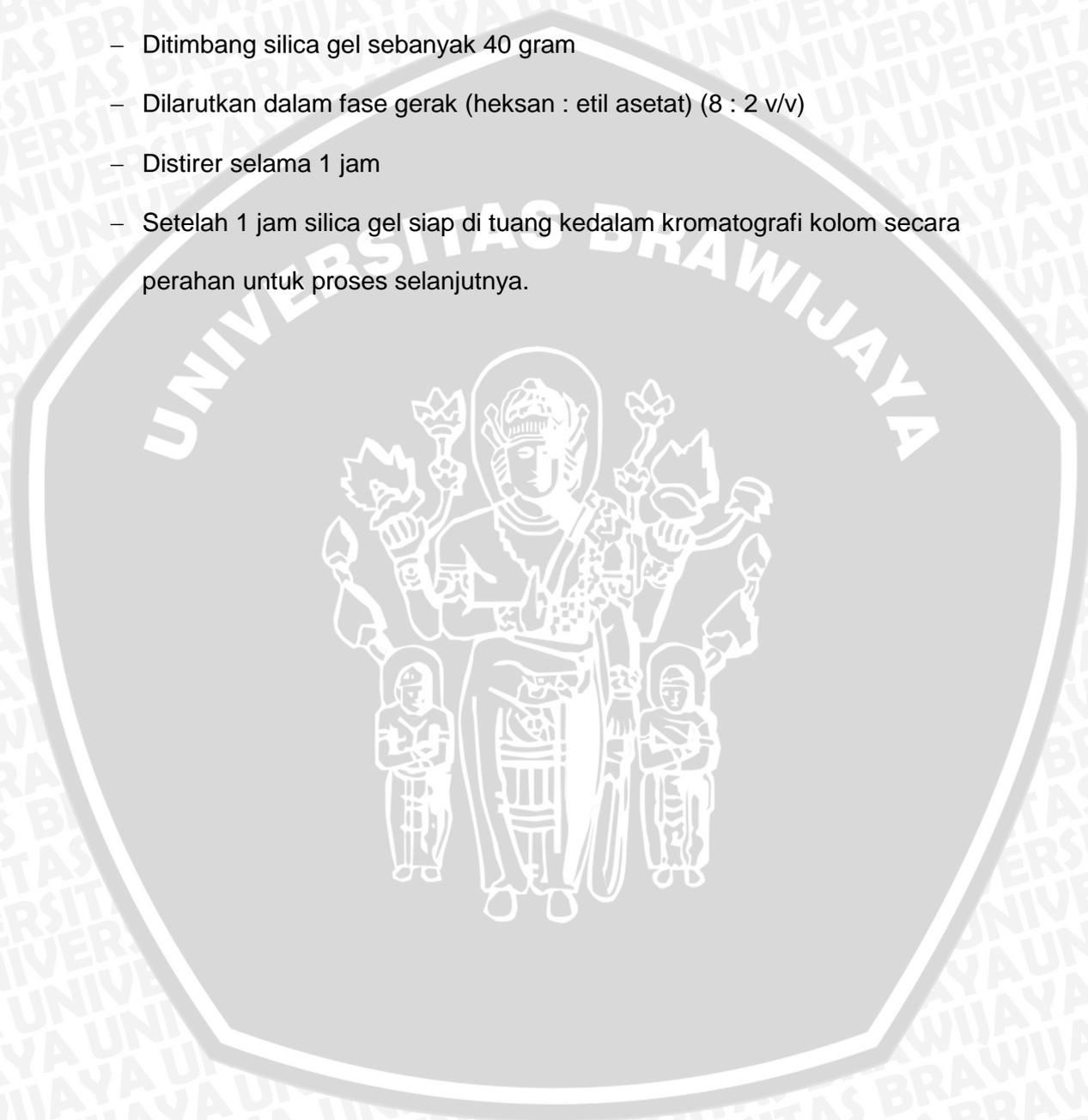
Prosedur fraksinasi, sebagai berikut:

- Disiapkan filtrat hasil maserasi, beaker glass 1000mL, erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 100 mL, pelarut dietil eter (p.a), saturasi garam, air ledeng, kertas saring halus, corong pisah, rotavapor, boto vial, aluminium foil, dan wrap.
- Filtrat partisi dengan pelarut dietil eter, saturasi garam, dan air ledeng dengan perbandingan 50 mL : 25 mL : 60 mL : 5 mL. Penambahan pelarut berurutan dimulai dari filtrat – dietil eter – saturasi garam – air ledeng.
- Diambil fase atas dan fase bawah dibuang. Fase atas ditampung ke dalam erlenmeyer 250 mL.
- Filtrat hasil dari partisi di rotary vacuum evaporator dengan suhu 30°C dan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang dan terbentuk kerak.
- Dipindahkan filtrat kerak ke dalam botol vial dengan cara ditetesi pelarut dietil eter ± 4mL.
- Dikeringkan kembali dengan gas nitrogen agar sampel kering sempurna.
- Ditutup botol vial dengan cling wrap dan dilapisi aluminium foil. Lalu disimpan di dalam freezer.
- Ekstrak pigmen kering.

Prosedur Pembuatan Silica Gel

Prosedur pembuatan silica gel sebagai berikut :

- Disiapkan serbuk silica gel, beaker glass 1000 ml, magnetic stirrer dan timbangan digital
- Ditimbang silica gel sebanyak 40 gram
- Dilarutkan dalam fase gerak (heksan : etil asetat) (8 : 2 v/v)
- Distirer selama 1 jam
- Setelah 1 jam silica gel siap di tuang kedalam kromatografi kolom secara perlahan untuk proses selanjutnya.



Lampiran 3. Prosedur Kolom Kromatografi (Pangestuti, etal., (2008) yang telahdimodifikasi oleh Muamar (2009)

Prosedur kolom kromatografi untuk isolasi pigmen alga coklat, sebagai berikut:

- Disiapkan ekstrak pigmen kering, silika gel F-254, kolom kromatografi, magnetic dan stirer, pelarut heksan dan etil asetat (p.a), beaker glass 500 mL, gelas ukur 100 ml, pasir laut, corong kaca, dan tabung rekasi.
- Ditimbang fase diam silika gel ditimbang sebanyak 40 gram dengan timbangan digital dengan ketelitian 10^{-4} gram. Lalu dibuat fase gerak yaitu campuran pelarut heksan : etil asetat (8:2, v/v) \pm 250 mL.
- Distirer fase diam dilarutkan dengan fase gerak. Proses stirer dilakukan selama 1 jam.
- Disiapkan kolom kromatografi dengan cara diisi fase gerak sedikit lalu dimasukkan kapas tipis yang dibentuk bulat ke dalam kolom. Kemudian ditambahkan fase gerak sampai setengah kolom.
- Fase diam yang telah distirer dimasukkan perlahan ke dalam kolom dengan bantuan corong kaca dialirkan melalui dinding kolom. Selama memasukkan fase diam, kolom diketuk-ketuk agar tidak terdapat gelembung udara.
- Ditunggu 24 jam untuk melihat ada tidaknya keretakan pada kolom.
- Ditambahkan pasir laut sebanyak 2 gram.
- Dimasukkan ekstrak pigmen kering yang dilarutkan lebih dulu dengan fase gerak 10 mL (heksan : etil asetat) (8:2, v/v) ke dalam kolom.
- Dibuka kran kolom sambil terus ditambahkan fase gerak agar silika gel tidak mengering. Komposisi fase gerak antara lain : 8:2v/v, 7:3 v/v. 6:4 v/v dan 5:5 v/v.

- Ditampung fraksi di dalam tabung reaksi sesuai warnanya. Lalu dimasukkan ke dalam botol vial sesuai warnanya dan dikeringkan dengan gas nitrogen.
- Didapat isolat pigmen murni,



Lampiran 4. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis dan Pemurnian Pigmen Fukosantin

Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti et al., 2008)

Prosedur kromatografi lapis tipis, sebagai berikut:

- Disiapkan Plat KLT, fase gerak dengan pelarut heksan : aseton, pensil 2B, penggaris, gunting, beaker glass 50 mL, gelas ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, mikropipet, dan plastik wrap.
- Dibuat garis pada plat yang berukuran 1 cm x 5 cm dimana 1 cm pada bagian bawah dan 0,5 cm di bagian atas.
- Ekstrak pigmen kering dilarutkan dengan 1 mL aseton.
- Ditotolkan ekstrak pigmen cair dengan bantuan mikropipet pada garis bawah dan ditunggu sampai kering.
- Dimasukkan ke dalam beaker glas berisi fase gerak berupa heksan : aseton (7:3, v/v) sebanyak 4 mL, lalu ditutup dengan plastik wrap dan ditunggu sampai pelarut mencapai batas atas.
- Dihitung nilai RF warna pada plat KLT.

Lampiran 5. Prosedur Analisa Spektrofotometer UV-Vis dan Analisa KCKT

Prosedur Analisa Spektrofotometer UV-Vis (Indra, 2012)

Prosedur analisa spektrofotometer UV-Vis, sebagai berikut :

- Disiapkan ekstrak pigmen kering segar dan teh hasil dari pemurnian KLT.
- Diencerkan pigmen kering dengan aseton (p.a) \pm 3mL.
- Dimasukkan larutan pigmen murni ke dalam beaker glass yang berisi aseton (p.a) 50 mL menggunakan mikropipet sesuai absorbansi yang diinginkan.
- Dituang ke dalam kuvet \pm 3mL lalu dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Prosedur Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Fung et., el 2009)

- Disiapkan ekstrak pigmen kasar
- Dilarutkan dalam 1,5 mL fase gerak 100 % metanol
- Sebanyak 10 μ l larutan pigmen diinjeksikan ke KCKT dengan fase diamnya adalah chromolith column dengan fase gerak 100% metanol dan laju air 1 mL/menit dengan suhu 30^o C
- Dianalisis pada panjang gelombang 430 nm

Lampiran 6. Prosedur Pembuatan Larutan dan Garam Grosok

Larutan Ekstraksi

Metanol : aseton (7:3, v/v) dalam 300 mL

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

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

Larutan Kolom

- Heksan : Etil Asetat (8:2, v/v) dalam 10 mL

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

$$\text{Etil asetat} = \frac{2}{10} \times 10 \text{ ml} = 2 \text{ mL}$$

- Heksan : Etil Asetat (8:2, v/v) dalam 250 mL

$$\text{Heksan} = \frac{8}{10} \times 250 \text{ ml} = 200 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{2}{10} \times 250 \text{ ml} = 50 \text{ mL}$$

- Heksan : Etil Asetat (7:3, v/v) dalam 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) dalam 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) dalam 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 KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Heksan : Aseton (7 : 3 v/v) dalam 5 ml

- Heksan $= \frac{7}{10} \times 5 \text{ ml} = 3,5 \text{ ml}$
- Aseton $= \frac{3}{10} \times 5 \text{ ml} = 1,5 \text{ ml}$

Larutan Saturasi Garam Grosok

- Disiapkan Garam grosok 300 gram dan botol aqua 1L
- Dilarutkan dengan air ledeng 600 mL
- Disaring dengan kapas
- Disaring dengan kertas saring kasar
- Disaring dengan kertas saring halus
- Larutan saturasi garam dapur



Lampiran 7. Perhitungan Nilai Rf Fukosantin

$$\begin{aligned} R_f \text{ (Retardation factor)} &= \frac{\text{Jarak yang di tempuh pigmen}}{\text{panjang KLT}} \\ &= \frac{1}{3,5} \\ &= 0,28 \end{aligned}$$

Lampiran 8. Data Absorbansi

Alga Coklat	Ulangan	Absorbansi
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Segar	1,750
	"Teh"	0,203

Lampiran 9. Kadar Fukosantin

Algacoklat	Ulangan	Kandungan Fukosantin
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Segar	0,1054mLg
	"Teh"	0,0122 mLg

Lampiran 10. Data Rendemen

Alga Coklat	Ulangan	Gram sampel	Rendemen (%)
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Segar	100 gram	0,27%
	"Teh"	100 gram	0,23%

Lampiran 11. Perhitungan Kadar Fukosantin

$$A = \varepsilon b c$$

Keterangan: *A*= absorbansi

ε= absorptifitas molar (Molar extinction coefficient)

b= lebar bagian dalam kuvet

c= konsentrasi (molar)

- **Absorbansi Fukosantin Sampel Segar**

$$A = \varepsilon b C$$

$$C = \frac{A}{\varepsilon x b}$$

$$C = \frac{1,705}{1660} x (100 \text{ mLg}^{-1}\text{cm}^{-1}) x 1\text{cm}$$

$$C = \frac{1,705}{16,6} = 0,1054 \text{ mLg}$$

-Absorbansi Fukosantin Basa Kering

$$A = \varepsilon b C$$

$$C = \frac{A}{\varepsilon x b}$$

$$C = \frac{0,203}{1660} x (100 \text{ mLg}^{-1}\text{cm}^{-1}) x 1\text{cm}$$

$$C = \frac{0,203}{16,6} = 0,0122 \text{ mLg}$$

-Perhitungan Kadar Rendemen

Rendemen Sampel Segar

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

$$\text{Rendemen} = \frac{0,27}{100} x 100\% = 0,27 \%$$

Rendemen Sampel Basa Kering

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

$$\text{Rendemen} = \frac{0,23}{100} x 100\% = 0,23 \%$$

Lampiran 12. Foto Pengolahan Te



a.



b.



c.



d.



e.



f.



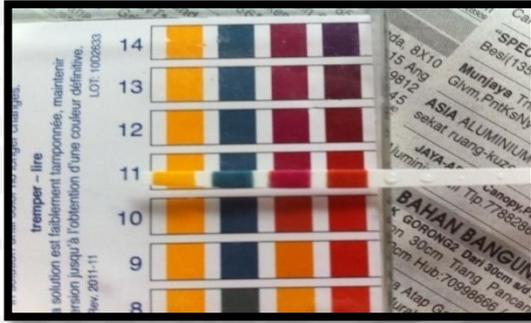
g.



h.



i.



j.



k.



l.



m.

Keterangan :

- a. Proses pencucian alga coklat *Sargassum cristaefolium*
- b. Proses pemotongan alga coklat *Sargassum cristaefolium*
- c. Proses diangin-anginkan setelah di *thawing*
- d. Proses penimbangan alga coklat 100 gram
- e. Proses sebelum di tumbuk menggunakan mortar
- f. Proses penimbangan CaCO_3
- g. Proses alga coklat ditambah CaCO_3
- h. Proses pembuatan larutan kapur
- i. Proses perendaman alga coklat
- j. Proses pengukuran pH larutan kapur
- k. Proses Pengeringan alga oklat dalam *microwave*
- l. Proses pengambilan alga coklat yang sudah kering
- m. Hasil teh kering

Lampiran 13. Foto Proses Ekstraksi



a.



b.



c.



d.



e.



f.

Keterangan :

- a. Sampel Alga Coklat
- b. Proses Pembuatan Larutan Ekstraksi
- c. Proses Masrasi
- d. Penyaringan Filtrat Sampel Segar
- e. Penyaringan Filtrat Sampel "Teh"
- f. Pengukuran Filtrat Hasil Masrasi

Lampiran 14. Foto Proses Partisi, Evaporator dan Gas N₂



a.b.c.



d.

e.

Keterangan :

- a. 2 fase ang terbentuk fase bawah dan fase atas
- b. Fase atas yang digunakan
- c. Fase bawah yang tidak digunakan
- d. Proses evaporasi
- e. Proses Pengeringan menggunakan Gas N₂

Lampiran 15. Foto Proses Kromatografi Kolom



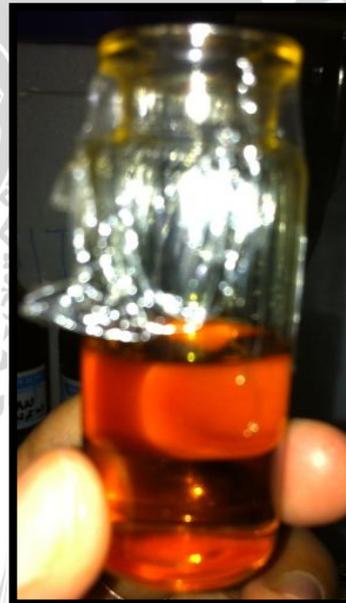
a.



b.



c.



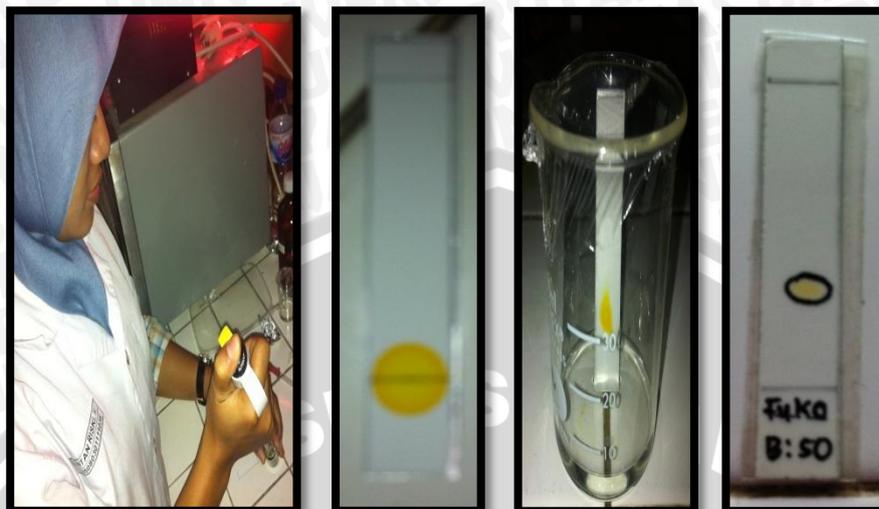
d.e.

Keterangan :

- a. Penimbangan Silica
- b. Proses pemasukan
- c. Proses Silica Gel
- d. Pergerakan Pigmen
- e. Pigmen Fukosantin

Gel
 kapas ke dasar kolom
 dibiarkan selama 24 jam
 dalam kromatografi kolom
 hasil isolasi kromatografi kolom

Lampiran 16. Proses Identifikasi Pigmen Fukosantin



a. b.

c.

d.

Keterangan :

- a. Proses totol sampel menggunakan mikro pipet
- b. Hasil totol pada plat KLT
- c. Proses pergerakan pigmen menggunakan KLT
- d. Hasil identifikasi dengan KLT

Lampiran 17. Hasil Analisis Fukoantin Menggunakan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi)

Hasil analisa KCKT sampel segar

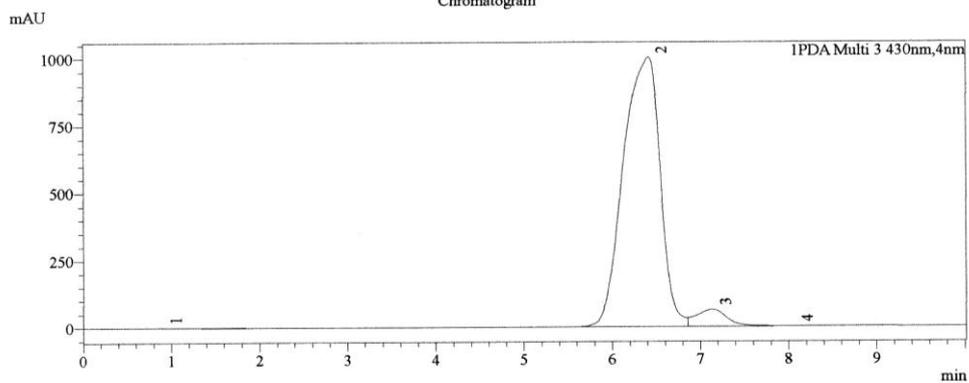
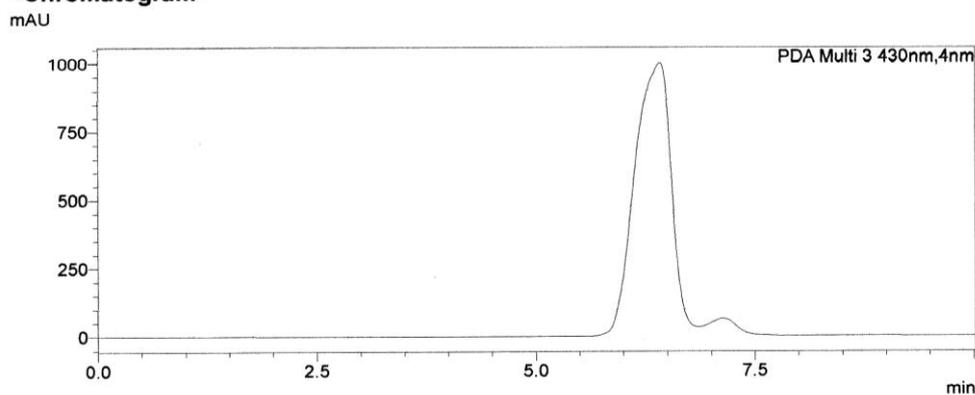


Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : Fuco 1.5 mL 10uL 100 MeOH 30 C (12052014)
 Sample ID :
 Data Filename : Fuco 1.5 mL 10uL 100 MeOH 30 C (12052014)2.lcd
 Method Filename : cek B 100% MeOH (19032014).lcm
 Batch Filename :
 Vial # : 1-3
 Injection Volume : 5 uL
 Date Acquired : 5/12/2014 3:27:18 PM
 Date Processed : 5/12/2014 3:37:21 PM
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%
1	0.906	57007	917	0.186
2	6.419	29002464	1002490	94.644
3	7.141	1580841	63388	5.159
4	8.064	3412	235	0.011
Total		30643724	1067029	100.000

Height%	0.086
---------	-------



Hasil analisa KCKT sampel basa kering

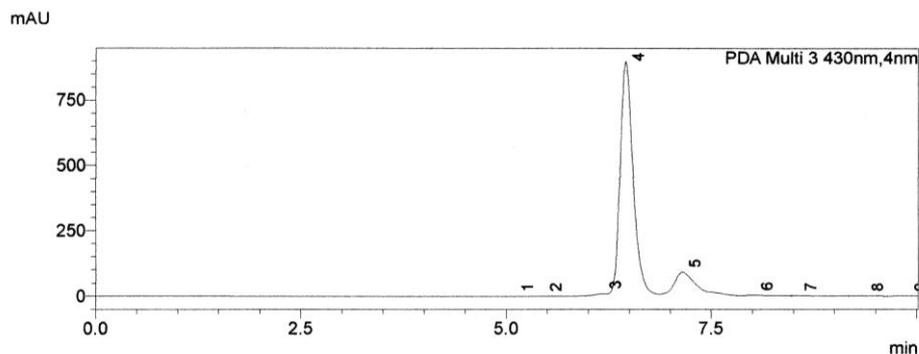
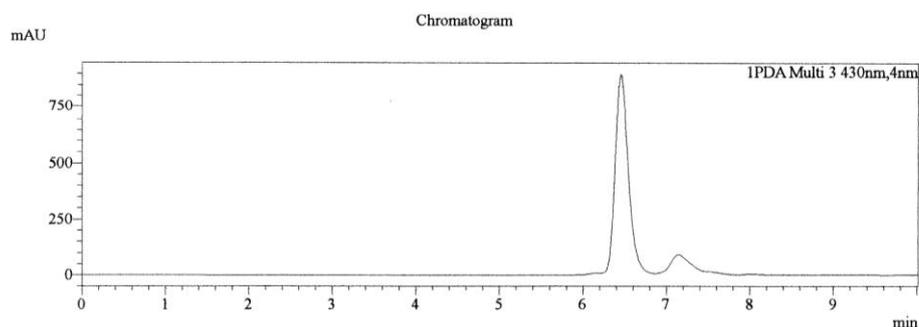


Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: Fucoxanthin B71 1.5 mL MeOH. 100% MeOH 30C 1uL(06062014)	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: Fucoxanthin B71 1.5 mL MeOH1. 100% MeOH 30C 1uL(06062014).lcd	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: cek B 100% MeOH (19032014).lcm	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: Batch Filename		
Vial #	: 1-31		
Injection Volume	: 1 uL		
Date Acquired	: 6/6/2014 10:22:17 AM		
Date Processed	: 6/6/2014 10:32:20 AM		

<Chromatogram>



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	5.104	1687	219	0.014	0.022
2	5.451	2757	153	0.023	0.015
3	6.176	93240	8996	0.779	0.896
4	6.456	9977408	899489	83.389	89.583
5	7.146	1840254	91333	15.380	9.096
6	8.023	30321	2342	0.253	0.233
7	8.559	7606	618	0.064	0.062
8	9.367	7390	522	0.062	0.052
9	9.890	4295	411	0.036	0.041
Total		11964959	1004082	100.000	100.000



Lampiran 18 Data Antioksidan Fukosantin "Teh" dan Segar

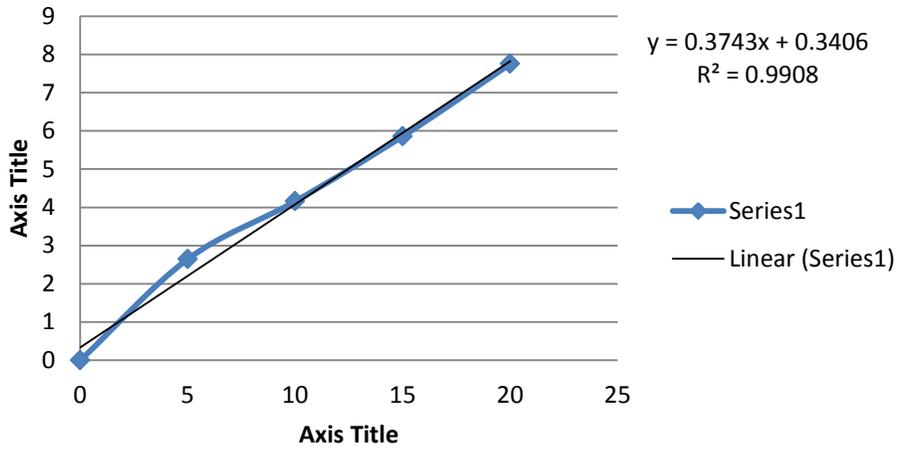
Data Antioksidan Fukosantin Segar

Konsentrasi (ppm)	ulangan	m smp	Absorbansi	% aktivitas	IC50 1 (ppm)	IC50 2 (ppm)	Rata-rata
0	1	0.2	0.529	0.000	132.78	135.68	134.23
	2	0.2	0.529	0.000			
5	1	0.2	0.515	2.647			
	2	0.2	0.516	2.457			
10	1	0.2	0.507	4.159			
	2	0.2	0.506	4.348			
15	1	0.2	0.498	5.860			
	2	0.2	0.499	5.671			
20	1	0.2	0.488	7.750			
	2	0.2	0.489	7.561			

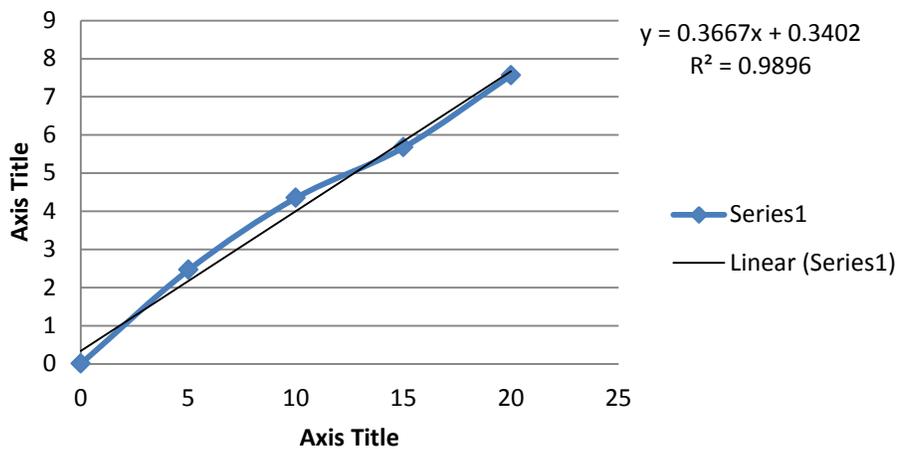
Data Antioksidan fukosantin "Teh"

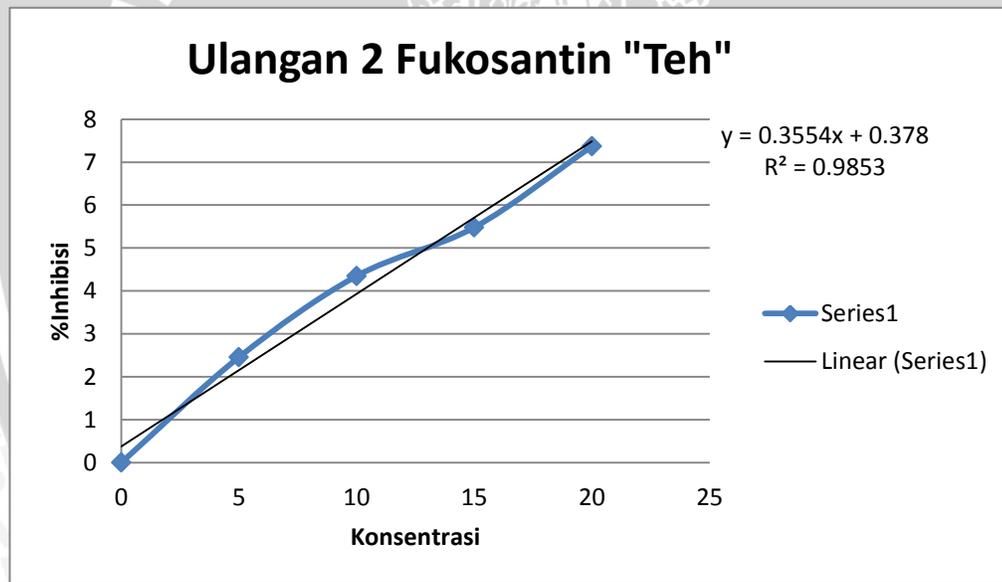
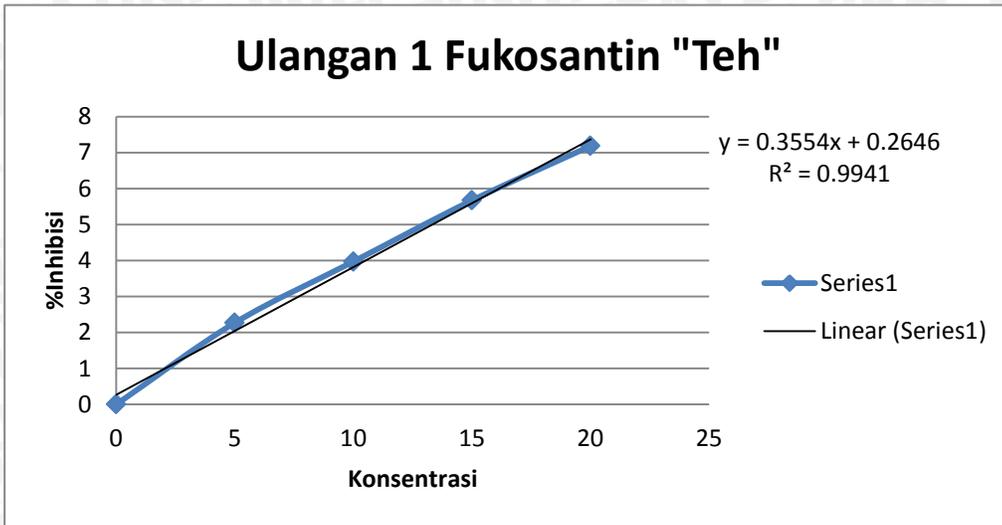
Konsentrasi (ppm)	ulangan	m smp	Absorbansi	% aktivitas	IC50 1 (ppm)	IC50 2 (ppm)	Rata-rata
0	1	0.2	0.529	0.000	140.1	139.78	139,494
	2	0.2	0.529	0.000			
5	1	0.2	0.517	2.268			
	2	0.2	0.516	2.457			
10	1	0.2	0.508	3.970			
	2	0.2	0.506	4.348			
15	1	0.2	0.499	5.671			
	2	0.2	0.5	5.482			
20	1	0.2	0.491	7.183			
	2	0.2	0.49	7.372			

Ulangan 1 Fukosantin Segar



Ulangan 2 Fukosantin Segar





Lampiran 19. Analisa Uji T Kandungan Antioksidasi

Hipotesa pada penelitian ini meliputi

H_0 : Diduga bahwa kandungan IC_{50} sampel *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" tidak terdapat perbedaan pengaruh terhadap kandungan antioksidannya.

H_1 : Diduga bahwa kandungan IC_{50} sampel *Sargassum cristaefolium* segar dan "teh" terdapat perbedaan pengaruh terhadap kandungan antioksidannya.

Konsentrasi (ppm)	IC_{50} Sampel "Teh"			IC_{50} Sampel Segar		
	X_1	$X_1 - \bar{x}_1$	$(X_1 - \bar{x}_1)^2$	X_1	$X_1 - \bar{x}_1$	$(X_2 - \bar{x}_2)^2$
0	0	-3.8751	15.016	0	-4.0453	16.364
	0	-3.8751	15.016	0	-4.0453	16.364
5	2,268	-1.6071	2.5827	2.647	-1.3983	1.955
	2.457	-1.4181	2.011	2.457	-1.5883	2.522
10	3.97	0.0949	9.006	4.159	0.1137	0.012
	4.348	0.4729	0.2236	4.348	0.3027	0.091
15	5.671	1.7959	3.2252	5.86	1.8147	3.293
	5.482	1.6069	2.5821	5.671	1.6257	2.642
20	7.183	3.3079	10.9422	7.75	3.7047	13.724
	7.372	3.4969	12.2283	7.561	3.5157	12.36
TOTAL	38.751	0	72.8331	40.453	0	69.327
RERATA	3.8751			4.0453		

1. Perhitungan Standart Defiasi (SD)

Untuk sampel "Teh"

$$\begin{aligned}
 SD_1 &= \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{(72,8331)^2}{10-1}} \\
 &= \sqrt{\frac{5304,66}{9}} \\
 &= \sqrt{589,40} \\
 &= 24,27
 \end{aligned}$$

Sampel Segar

$$\begin{aligned} SD_2 &= \frac{\sqrt{\varepsilon(x) - (\bar{X})^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(69.327)^2}}{10-1} \\ &= \frac{\sqrt{4806.23}}{9} \\ &= \sqrt{534,02} \\ &= 23,109 \end{aligned}$$

2. Perhitungan F hitung

$$\begin{aligned} F_{\text{hitung}} &= \frac{s^1}{s^2} \\ &= \frac{(24,27)^2}{(23,109)^2} \\ &= \frac{589,03}{534,02} \\ &= 1,103 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dengan Df} &= n_1 - 1 \\ &= 10 - 1 \\ &= 9 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dan} &= n_2 - 1 \\ &= 10 - 1 \\ &= 9 \end{aligned}$$

$$F_{\text{tabel } 0,05 (9,9)} = 3,18$$

F hitung < F tabel maka H_0 diterima dan H_1 ditolak. Jika H_0 diterima artinya bahwa dengan IC_{50} sampel segar dan "teh" tidak berpengaruh (sama) terhadap kandungan antioksidannya.

3. Perhitungan T Hitung

$$T_{\text{hitung}} = \frac{x_1 - x_2}{sp \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}}$$



Dimana perhitungan $SP = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{Df}}$ dengan $Df = n_1 + n_2 - 2$

$$\begin{aligned} Df &= n_1 + n_2 - 2 \\ &= 10 + 10 - 2 \\ &= 18 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} SP &= \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{Df}} \\ &= \sqrt{\frac{(10-1)(24,27)^2 + (10-1)(23,109)^2}{18}} \\ &= \sqrt{\frac{(9)(589,03) + (9)(534,02)}{18}} \\ &= \frac{\sqrt{5301,27 + 4806,18}}{18} \\ &= \frac{\sqrt{10107,45}}{18} \\ &= \sqrt{561,525} \\ &= 23,69 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Maka } T_{\text{Hitung}} &= \frac{x_1 - x_2}{Sp \sqrt{\left(\frac{1}{n_1}\right) + \left(\frac{1}{n_2}\right)}} \\ &= \frac{40,453 - 38,751}{23,69 \sqrt{\left(\frac{1}{10}\right) + \left(\frac{1}{10}\right)}} \\ &= \frac{0,702}{23,69 \sqrt{(0,1) + (0,1)}} \\ &= \frac{0,702}{23,69 \sqrt{0,2}} \\ &= \frac{0,702}{23,69 (0,44)} \\ &= \frac{0,702}{10,42} \\ &= 0,0673 \end{aligned}$$

T tabel (n = 18) dengan selang kepercayaan 95 % = 2,10092

Kesimpulan = H_0 diterima dan H_1 ditolak, artinya bahwa dengan nilai IC_{50} sampel segar dan "teh" tidak ada perbedaan atau sama pada masing masing antioksidannya.

Lampiran 21. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* "Teh"

Tabung Ke-	Menit	Warna	Pelarut (Heksan: Etil asetat)	mL Pelarut	Jumlah Pelarut Tiap botol vial	Keterangan
1	10.37	Bening	8:2	250 mL	10 mL	
2	10.40	Kuning bening				
3	10.45	Kuning pekat				β – Karoten
4	10.49	Kuning pekat				β – Karoten
5	10.53	Kuning pekat				β – Karoten
6	10.58	Kuning pekat				β – Karoten
7	11.03	Kuning bening				
8	11.13	Kuning bening				
9	11.22	Kuning bening				
10	11.32	Kuning kehijauan				
11	11.43	Kuning kehijauan				
12	11.53	Hijau kehijauan	7:3	200 mL	10 mL	
13	11.57	Kuning kehijauan				
14	12.06	Kuning kehijauan				
15	12.12	Kuning kehijauan				
16	12.18	Kuning kehijauan				
17	12.23	Kuning kehijauan				
18	12.29	Kuning kehijauan				
19	12.34	Kuning kehijauan				
20	12.42	Kuning kehijauan				
21	12.48	Kuning kehijauan				
22	12.52	Kuning kehijauan				
23	12.59	Kuning kehijauan				
24	13.03	Bening				
25	13.09	Bening				
26	13.16	Bening				
27	13.24	Bening	6:4	200 mL	10 mL	
28	13.32	Bening				
29	13.39	Bening				
30	13.45	Bening				
31	13.55	Bening				
32	14.06	Bening				
33	14.15	Bening				
34	14.22	Bening				
35	14.40	Bening kekuningan				
36	14.56	Bening kekuningan				
37	15.06	Bening kekuningan				
38	15.12	Kuning kehitaman				
39	15.27	Kuning kehitaman				
40	15.47	Kuning kehitaman	5:5	200 mL	10 mL	
41	16.05	Kuning kehitaman				
42	16.21	Kuning kehitaman				

43	16.49	Kuning kehitaman				
44	16.54	Kuning kehitaman				
45	16.58	Biru				Klorofil
46	17.00	Biru pekat				Klorofil
47	17.03	Biru pekat				Klorofil
48	17.09	Biru pekat				Klorofil
49	17.15	Biru pekat				Klorofil
50	17.21	Biru pekat				Klorofil
51	17.27	Biru pekat				Klorofil
52	17.35	Biru pekat				Klorofil
53	17.42	Biru pekat				Klorofil
54	17.49	Biru kehijauan				
55	17.57	Biru kehijauan				
56	18.04	Hijau pekat				
57	18.11	Hijau pekat				
58	18.22	Hijau pekat				
59	18.31	Hijau pekat				
60	18.39	Hijau pekat				
61	18.48	Hijau pekat				
62	18.59	Hijau pekat				
63	19.08	Hijau pekat				
64	19.17	Hijau pekat				
65	19.27	Hijau pekat				
66	19.34	Hijau pekat				
67	19.43	Hijau pekat				
68	19.52	Hijau bening				
69	19.58	Hijau kekuningan				
70	20.04	Kuning pekat				
71	20.11	Orange				Fukosantin
72	20.16	Orange				Fukosantin
73	20.21	Orange				Fukosantin
74	20.26	Orange				Fukosantin
75	20.31	Orange				Fukosantin
76	20.36	Orange				
77	20.41	Orange				
78	20.46	Orange				
79	20.51	Orange				
80	20.58	Orange				
81	21.04	Orange				
82	21.14	Orange				
83	21.22	Orange				
84	21.29	Orange				
85	21.35	Kuning pekat				
86	21.43	Kuning pekat				
87	22.00	Kuning pekat				

Lampiran 22. Data Kromatografi Kolom Sampel Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* Segar

Tabung Ke-	Menit	Warna	Pelarut (Heksan: Etil asetat)	mL Pelarut	Jumlah Pelarut Tiap botol via l	Keterangan
1	11.39	Kuning bening	8:2	250 mL	10 mL	
2	11.55	Kuning pekat				β – Karoten
3	12.13	Kuning pekat				β – Karoten
4	12.29	Kuning pekat				β – Karoten
5	12.57	Kuning bening				
6	13.26	Kuning bening				
7	13.52	Bening				
8	14.15	Bening				
9	14.32	Bening				
10	14.49	Hijau kecoklatan				
11	15.05	Hijau kecoklatan				
12	15.11	Hijau kecoklatan				
13	16.19	Hijau kecoklatan				
14	15.37	Hijau kecoklatan				
15	15.51	Abu-abu				
16	16.08	Abu-abu				
17	16.23	Hijau kekuningan	7:3	200 mL	10 mL	
18	16.38	Kuning bening				
19	16.54	Kuning bening				
20	17.09	Hijau bening				
21	17.26	Hijau bening				
22	17.32	Biru bening				Klorofil
23	17.41	Biru kehijauan				Klorofil
24	17.50	Biru kehijauan				Klorofil
25	17.56	Biru kehijauan				Klorofil
26	18.09	Hijau pekat				
27	18.15	Hijau pekat				
28	18.18	Hijau pekat				
29	18.26	Hijau pekat				
30	18.34	Hijau bening				
31	18.43	Hijau bening				
32	18.51	Hijau bening				
33	18.58	Hijau bening				

34	19.14	Hijau bening				
35	19.26	Kuning bening				
36	19.45	Kuning bening				
37	20.00	Kuning bening				
38	20.16	Kuning bening				
39	20.32	Kuning bening				
40	20.47	Kuning bening				
41	21.01	Kuning bening				
42	21.16	Kuning bening				
43	21.31	Kuning bening				
44	21.47	Kuning bening				
45	21.56	Kuning pekat	6:4	200 mL	10 mL	
46	22.03	Kuning pekat				
47	22.11	Kuning pekat				
48	22.18	Kuning pekat				
49	22.25	Kuning pekat				
50	22.32	Orange				Fukosantin
51	22.40	Orange				Fukosantin
52	22.48	Orange				Fukosantin
53	22.56	Orange				Fukosantin
54	23.03	Orange				Fukosantin
55	23.11	Orange				Fukosantin
56	23.18	Orange				Fukosantin
57	23.26	Orange				Fukosantin
58	23.36	Orange				Fukosantin
59	23.40	Orange	5:5	200 mL	10 mL	Fukosantin
60	23.46	Orange				Fukosantin
61	00.13	Orange				Fukosantin
62	00.25	Orange				Fukosantin
63	00.44	Kuning				
64	00.50	Kuning				