

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN β -KAROTEN PADA RUMPUT LAUT MERAH
Eucheuma cottonii DAN *Eucheuma spinosum***

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

Oleh :

**HOSNATUS HASANAH
NIM. 105080301111051**



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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN β -KAROTEN PADA RUMPUT LAUT MERAH
Eucheuma cottonii DAN *Eucheuma spinosum***

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

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

Oleh :

**HOSNATUS HASANAH
NIM. 105080301111051**



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

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN β -KAROTEN PADA RUMPUT LAUT MERAH
Eucheuma cottonii DAN *Eucheuma spinosum*

Oleh :

HOSNATUS HASANAH

NIM. 105080301111051

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 04 Desember 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 :

Dosen Penguji II

Eko Waluyo, S.Pi., M.Sc.

NIP : 19800424 200501 1 001

Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS)

NIP : 19550503 198503 2 001

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)

NIP : 19640726 198903 2 004

Tanggal :

Mengetahui

Ketua Jurusan MSP,

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS

NIP.19620805 198603 2 001

Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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



Malang, 06 Mei 2014

Mahasiswa,

(HOSNATUS HASANAH)

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

- Allah SWT atas segala rahmat, bimbingan, pertolongan, dan karunia-Nya sehingga saya dapat menjalankan dan menyelesaikan penelitian ini.
- Kedua orang tua, Bapak Sarkawi dan Ibu Sumini atas segala bantuan, doa dan motivasi.
- Kakakku Hosnatus Holifah, atas dukungan & semangat selama ini.
- PT. GAS NEGARA atas beasiswa yang diberikan sehingga memberikan banyak manfaat untuk penelitian ini.
- Ibu Iwin, Ibu Reni, dan Bapak Wahyudi, selaku Laboran Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan atas bantuan dan arahan selama penelitian.
- Seluruh teman-teman THP 2010 dan pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

Malang, 01 November 2014

Penulis

RINGKASAN

HOSNATUS HASANAH. Uji Aktivitas Antioksidan β -Karoten pada Rumput Laut Merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* (di bawah bimbingan **Dr.Ir.Kartnini Zaelanie, MS.** dan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**)

Antioksidan merupakan senyawa pendonor electron (reduktan) dengan berat molekul kecil, Antioksidan mampu mencegah terbentuknya radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi di dalam sel. β -karoten sebagai pigmen turunan bersifat larut dalam lemak dan berfungsi sebagai peredam radikal bebas serta sebagai pigmen pelengkap dalam kloroplas yang membantu optimasi penangkapan cahaya untuk fotosintesis. Rumput laut merah (*Rhodophyceae*) terutama *Eucheuma cottonii*, *Eucheuma spinosum* dan *Gracilaria* merupakan jenis yang paling banyak dibudidayakan di perairan Indonesia. Secara fisik *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* memiliki kemiripan bentuk *thallus* berupa bulat tegak (silindris), namun terdapat beberapa ciri fisik lainnya yang membedakan antara spesies ini antara lain pada bentuk duri dipermukaan *thallus* dan warna yang dominan pada *thallus*, serta karagenan yang dihasilkan yaitu kappa karagenan pada *Eucheuma cottonii* dan iota karagenan pada *Eucheuma spinosum*. Perbedaan ini diduga akan berpengaruh terhadap kandungan pigmen β -karoten yang terkandung didalamnya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan pigmen β -karoten pada rumput laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* yang dihasilkan dan aktivitas antioksidan β -karoten yang dihasilkan serta korelasinya dengan analisa total fenol. Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 10 April 2014 – 15 Agustus 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Dasar dan Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ialah metode eksploratif. Metode uji aktivitas antioksidan yang digunakan ialah Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil). Parameter yang diamati antara lain kadar air, nilai rendemen, total karotenoid, nilai Rf, nilai absorbansi Spektrofotometer UV-Vis, nilai kadar β -karoten, nilai aktivitas antioksidan β -karoten, nilai IC₅₀ dan nilai total fenol.

Berdasarkan hasil penelitian, sampel *Eucheuma cottonii* memiliki kadar air 86,12% $\pm$ 0,006875, nilai rendemen 2,0022% $\pm$ 0,07881, nilai total karotenoid 9.724,48 μ g/100g $\pm$ 364,2803, nilai Rf=0,9, nilai absorbansi tertinggi pada panjang gelombang 452 nm dan 477 nm, nilai kadar β -karoten 0,004745% $\pm$ 0,0003482, nilai aktivitas antioksidan tertinggi pada dosis 50 ppm sebesar 11,0463 %, nilai IC₅₀ ialah 237,87ppm $\pm$ 23,5735, dan nilai total fenol 1,73 mg GAE/g $\pm$ 0,1410. Pada sampel *Eucheuma spinosum* memiliki kadar air 78,88% $\pm$ 0,008092, nilai rendemen sebesar 1,0044% $\pm$ 0,11248, nilai total karotenoid 3.954,92 μ g/100g $\pm$ 508,1647, nilai Rf=0,94, nilai absorbansi tertinggi pada panjang gelombang 451 nm dan 473,20 nm, kadar β -karoten 0,002531% $\pm$ 0,0003374, nilai aktivitas antioksidan tertinggi pada dosis 50 ppm sebesar 8,5861 %, nilai IC₅₀ ialah 289,70ppm $\pm$ 19,1767, dan nilai total fenol 1,23 mg GAE/g $\pm$ 0,1757.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi dengan judul Uji Aktivitas Antioksidan β -Karoten pada Rumput Laut Merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum*. Dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi penjelasan antioksidan β -Karoten dalam Rumput Laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dan metode analisa aktivitas antioksidan metode DPPH.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS selaku dosen pembimbing I
2. Ibu Dr.Ir. Hartati Kartikaningsih selaku dosen pembimbing II
3. Bapak Dr. Ir. Bambang Budi S., MS selaku dosen penguji I
4. Bapak Eko Waluyo, S.Pi, M.Sc selaku dosen penguji II

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

Malang, 06 Mei 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Kegunaan.....	4
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Rumput Laut	5
2.1.1 <i>Eucheuma cottonii</i>	5
2.1.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.1.2 Komposisi Kimia dan Nutrisi	6
2.1.1.3 Struktur Dinding Sel	7
2.1.1.4 Manfaat dan Kegunaan.....	8
2.1.2 <i>Eucheuma spinosum</i>	8
2.1.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.1.2.2 Komposisi Kimia dan Nutrisi	9
2.1.2.3 Struktur Dinding Sel	10
2.1.2.4 Manfaat dan Kegunaan.....	11
2.2 Pigmen Rumput Laut Merah.....	11
2.3 Radikal Bebas	12
2.4 Antioksidan	14
2.5 Antioksidan Rumput Laut Merah	16
2.6 Beta Karoten	16
2.7 Ekstraksi	17
2.7.1 Maserasi.....	17
2.7.2 Fraksinasi (Partisi)	18
2.7.3 Evaporasi	19
2.7.4 Gas Nitrogen	19
2.7.5 Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi	20
2.8 Pelarut	21
2.8.1 Metanol (CH ₃ OH)	22
2.8.2 Aseton (CH ₃ COCH ₃)	22
2.8.3 Dietil Eter (C ₄ H ₁₀ O)	23
2.9 Kromatografi	24
2.9.1 Kromatografi Kolom.....	24
2.9.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	25
2.9.3 Fase Diam	26
2.9.3.1 Silica Gel	26
2.9.4 Fase Gerak	27
2.9.4.1 n-Heksan (C ₆ H ₁₄)	28

2.9.4.2 Etil Asetat (C ₄ H ₈ O ₂)	28
2.10 Spektrofotometer UV-Vis	29
2.11 Metode Analisa Antioksidan	30
2.11.1 Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil)	31
2.11.1.1 DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil)	31
2.11.1.2 Ethanol	32
2.11.1.3 BHT	33
2.11.2 Fenol	34
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	35
3.1.1 Alat Penelitian	35
3.1.2 Bahan Penelitian	35
3.2 Metode Penelitian	36
3.2.1 Metode Penelitian	36
3.3 Persiapan Penelitian	36
3.3.1 Preparasi Sampel	36
3.3.2 Analisa Kadar Air	37
3.3.3 Pembuatan Saturasi Garam	38
3.4 Alur Penelitian	39
3.5 Penelitian Awal	41
3.5.1 Ekstraksi Pigmen	41
3.5.2 Analisa Total Karotenoid	44
3.6 Penelitian Utama	46
3.6.1 Isolasi Senyawa β-Karoten	46
3.6.2 Identifikasi Senyawa β-Karoten	49
3.6.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	49
3.6.2.2 Spektrofotometer UV-Vis	51
3.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan	53
3.6.4 Analisa Total Fenol	55
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Pengamatan	57
4.2 Pembahasan	58
4.2.1 Analisa Kadar Air	58
4.2.2 Hasil Rendemen Ekstrak Pigmen	59
4.2.3 Hasil Analisa Total Karotenoid	60
4.2.4 Hasil Isolasi β-Karoten	61
4.2.5 Hasil Identifikasi β-Karoten	62
4.2.5.1 Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	62
4.2.5.2 Hasil Spektrofotometer UV-Vis	64
4.2.6 Hasil Analisa Kadar β-Karoten	65
4.2.7 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan	66
4.2.8 Hasil Analisa Total Fenol	68
4.2.9 Analisa Korelasi Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol	69
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	71
5.2 Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	78

DAFTAR GAMBAR

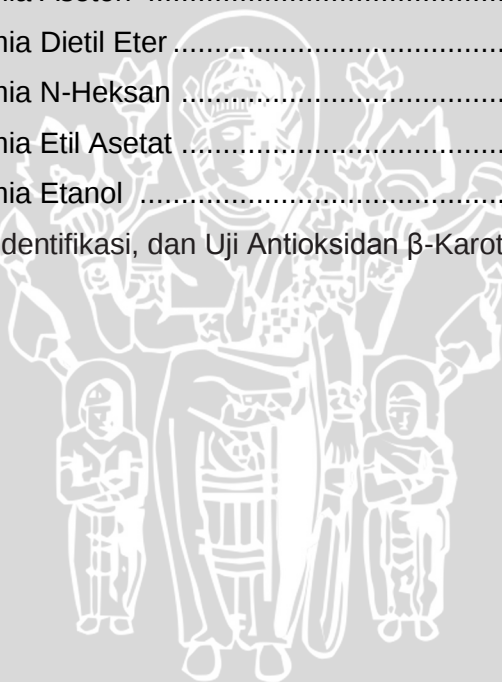
Gambar	Halaman
1. <i>Eucheuma cottonii</i>	6
2. Struktur Kappa Karagenan.....	7
3. <i>Eucheuma spinosum</i>	9
4. Struktur Iota Karagenan.....	10
5. Sel Alga (Rumput Laut)	11
6. Reaksi Radikal Hidroksil	12
7. Reaksi Antioksidan dan Radikal Bebas	14
8. Struktur β -Karoten	16
9. Rotary Evaporator.....	19
10. Kromatografi Kolom	24
11. Proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	26
12. Struktur Kimia Silika Gel	27
13. Spektrofotometer UV-Vis	30
14. Reaksi DPPH dengan Antioksidan	31
15. Reaksi yang Dimungkinkan antara β -Karoten dan DPPH	32
16. Struktur Kimia Etanol	32
17. Struktur Kimia BHT (<i>Butylated Hydroxytoluene</i>).....	33
18. Reaksi Senyawa Fenol	34
19. Diagram Alir Preparasi Sampel	37
20. Diagram Alir Analisa Kadar Air Bahan	38
21. Diagram Alir Pembuatan Saturasi Garam	39
22. Diagram Alir Alur Penelitian	40
23. Diagram Alir Proses Ekstraksi Pigmen	43
24. Diagram Alir Analisa Total Karotenoid	45
25. Diagram Alir Isolasi β -Karoten	48
26. Diagram Alir Identifikasi β -Karoten Kromatografi Lapis Tipis	50
27. Diagram Alir Uji Spektrofotometer UV-Vis Isolat β -Karoten	52
28. Diagram Alir Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	54
29. Diagram Alir Analisa Total Fenol β -Karoten	56
30. Hasil Analisa Kadar Air	58
31. Hasil Analisa Rendemen Ekstrak	59

32. Hasil Analisa Total Karotenoid Ekstrak	61
33. Isolat yang Diduga sebagai Isolat β -Karoten (a) <i>Eucheuma cottonii</i> dan (b) <i>Eucheuma spinosum</i>	62
34. Hasil Identifikasi KLT Isolat β -Karoten (a) <i>Eucheuma cottonii</i> , (b) <i>Eucheuma spinosum</i> dan (c) Identifikasi Pigmen Menurut Astutiningsih, et al. (2010) dalam Romiyanto (2014)	63
35. Pola Spektra (a) β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i> dan (b) β -Karoten <i>Eucheuma spinosum</i>	64
36. Hasil Analisa Kadar β -Karoten	65
37. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (a) β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i> , (b) β -Karoten <i>Eucheuma spinosum</i> , dan (c) BHT	66
38. Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (a) β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i> , (b) β -Karoten <i>Eucheuma spinosum</i> , (c) BHT, dan (b) Gabungan Ketida Sampel.....	67
39. Grafik Data Nilai IC ₅₀ BHT, β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i> , dan β - Karoten <i>Eucheuma spinosum</i>	67
40. Hasil Analisa Total Fenol	69
41. Grafik Korelasi Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol	70



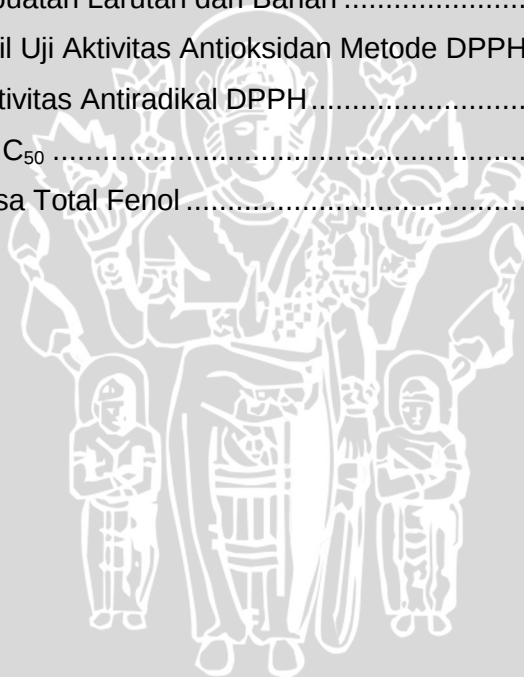
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Kimia <i>Eucheuma cottonii</i>	7
2. Komposisi Kimia <i>Eucheuma spinosum</i>	10
3. Senyawa Radikal Bebas Biologis	13
4. Senyawa Antioksidan dalam Sel	15
5. Sifat Fisika dan Kimia Gas Nitrogen	20
6. Konstanta Dielektrik Pelarut	21
7. Sifat Fisika dan Kimia Metanol	22
8. Sifat Fisika dan Kimia Aseton	23
9. Sifat Fisika dan Kimia Dietil Eter	23
10. Sifat Fisika dan Kimia N-Heksan	28
11. Sifat Fisika dan Kimia Etil Asetat	29
12. Sifat Fisika dan Kimia Etanol	32
13. Data Hasil Isolasi, Identifikasi, dan Uji Antioksidan β -Karoten.....	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi Foto Kegiatan Penelitian	78
2. Perhitungan Analisa Kadar Air	84
3. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak Pigmen.....	85
4. Perhitungan Kadar Total Karotenoid	86
5. Data Hasil Isolasi β -Karoten Kromatografi Kolom	87
6. Perhitungan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) β -Karoten	90
7. Hasil Uji Spektrofotometer UV-Vis β -Karoten.....	91
8. Perhitungan Kadar β -Karoten	93
9. Perhitungan Pembuatan Larutan dan Bahan	96
10. Data & Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	99
11. Perhitungan % Aktivitas Antiradikal DPPH.....	102
12. Perhitungan Nilai IC_{50}	104
13. Perhitungan Analisa Total Fenol	106



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk oksigen reaktif berenergi tinggi dengan elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya. Dalam kondisi yang berlebihan, radikal bebas dapat menyerang dan merusak fungsi sel seperti lipid, lipoprotein, protein, karbohidrat, RNA, maupun DNA dan menimbulkan penyakit degenerative seperti kardiovaskular, kanker, penuaan dini dan lain-lain (Winarsi, 2011). Kondisi ini disebabkan pembentukan radikal bebas dari luar tubuh (eksogenus) akibat polusi lingkungan, radiasi ultraviolet (UV), makanan dan minuman, asap rokok, pestisida, azon dan lain-lain (Rohmatussalihat, 2009). Untuk itu dibutuhkan senyawa yang dapat meredam reaktifitas dan memutus reaksi pembentukan radikal bebas yaitu senyawa yang bersifat antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa pendonor elektron (reduktan) dengan berat molekul kecil, senyawa ini mampu mencegah terbentuknya radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi di dalam sel. Antioksidan secara alami diproduksi didalam tubuh berupa enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase serta antioksidan non-enzimatis. Antioksidan non-enzimatis merupakan antioksidan sekunder yang berasal dari asupan bahan makanan seperti vitamin C, E, A, dan β -karoten yang berasal dari sayuran, buah-buahan, dan biji-bijian (Arief, 2003). Asupan antioksidan dari bahan makanan sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk menyeimbangkan jumlah antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh. Salah satu sumber antioksidan eksogenus di bidang perikanan adalah rumput laut.

Wibowo dan Fitriyani (2012) melaporkan bahwa kandungan gizi rumput laut sebagai bahan pangan ialah air sekitar 80-90%, karbohidrat (gula atau

“vegetable-gum”), protein, lemak, abu berupa senyawa garam natrium dan kalium, β -karoten, vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12, C, dan vitamin E, serta mineral seperti kalium, kalsium, fosfor, natrium, zat besi, dan iodin. Ditambahkan oleh Suparman (2013), pemanfaatan rumput laut dibidang kesehatan adalah sebagai antioksidan dengan kandungan vitamin C, vitamin E, klorofil a, dan β -karoten yang berfungsi untuk membersihkan radikal bebas sehingga meningkatkan sistem kekebalan dan mengurangi gejala alergi dalam tubuh.

β -karoten merupakan salah satu dari 600 komponen karotenoid dalam tanaman maupun buah-buahan. β -karoten sebagai pigmen turunan bersifat larut dalam lemak dan berfungsi sebagai peredam radikal bebas serta sebagai pigmen pelengkap dalam kloroplas yang membantu optimasi penangkapan cahaya untuk fotosintesis (Winarsi, 2011). Menurut Sulaswatty (2001) yang melaporkan bahwa β -karoten memiliki nilai biologis yang tinggi yaitu menanggulangi kebutaan akibat *xerophthalmia*, memusnahkan radikal bebas, mencegah penuaan dini, mencegah resiko penyakit degeneratif, dan mencegah penyakit kanker.

Ditinjau dari tingginya manfaat yang dapat diperoleh dari β -karoten sebagai senyawa antioksidan, saat ini di bidang perikanan telah bermunculan penelitian aktivitas antioksidan β -karoten dalam rumput laut terutama pada rumput laut coklat. Jenis rumput laut yang sering digunakan dalam penelitian pigmen karotenoid adalah *Sargassum* sp. dan *Padina* sp. namun untuk jenis rumput laut merah masih sangat sedikit penelitian mengenai aktivitas antioksidan β -karoten yang terkandung didalamnya. Suparman (2013) melaporkan bahwa jenis rumput laut merah (*Rhodophyceae*) terutama *Eucheuma cottonii*, *Eucheuma spinosum* dan *Gracilaria* merupakan jenis yang paling banyak dibudidayakan di perairan Indonesia. Hal ini dikarenakan jenis ini merupakan jenis yang mudah dibudidayakan dan banyak digunakan sebagai bahan baku

industri baik makanan, kosmetik, obat-obatan, maupun kertas. Tingginya potensi budidaya, nilai ekonomi serta potensi β -karoten dalam rumput laut merah di bidang kesehatan, penelitian mengenai aktivitas antioksidan β -karoten rumput laut merah yang sangat penting untuk dilakukan mengingat masih minimnya penelitian mengenai hal ini.

Hidayati (2003) dan Romiyanto (2014) melaporkan bahwa secara fisik *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* memiliki kemiripan bentuk *thallus* berupa bulat tegak (silindris), namun terdapat beberapa ciri fisik lainnya yang membedakan antara spesies ini antara lain pada bentuk duri dipermukaan *thallus* serta pada warna fisik yang dominan pada *thallus*. Selain perbedaan secara fisik juga terdapat perbedaan karagenan yang dihasilkan yaitu kappa karagenan pada *Eucheuma cottonii* dan iota karagenan pada *Eucheuma spinosum*. Perbedaan fisik pada *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* yaitu diduga dapat berpengaruh terhadap kandungan pigmen β -karoten yang dihasilkan. Disamping untuk mengetahui adanya perbedaan kandungan β -karoten, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan β -karoten yang terkandung didalamnya.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun perumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- Berapakah kandungan pigmen β -karoten yang terdapat pada rumput laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum*?
- Bagaimanakah aktivitas antioksidan β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* serta korelasinya dengan analisa total fenol?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian uji aktivitas antioksidan β -karoten pada rumput laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* adalah :

- Untuk mengetahui kandungan pigmen β -karoten pada rumput laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* yang dihasilkan.
- Untuk mengetahui aktivitas antioksidan β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* serta korelasinya dengan analisa total fenol.

1.4 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang kandungan pigmen karotenoid pada rumput laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* serta manfaat antioksidan β -karoten yang terkandung didalamnya bagi kesehatan bila dikonsumsi.

1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Dasar dan Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 10 April 2014 – 15 Agustus 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumput Laut

Rumput laut merupakan jenis alga (ganggang) multiseluler yang termasuk dalam golongan thallophyta. Rumput laut memiliki ciri-ciri tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati, namun berbentuk menyerupai batang yang disebut *thallus*. Rumput laut tumbuh di alam dengan melekatkan diri pada substrat berupa karang, lumpur, pasir, batu, maupun pada tumbuhan lain secara epifitik. Terdapat beberapa jenis rumput laut antara lain berbentuk bulat, pipih, tabung seperti dahan yang bercabang. Seperti halnya tanaman darat, rumput laut juga memiliki klorofil dan pigmen warna (Prasetyowati *et al.*, 2008). Menurut Suparman (2013), jenis rumput laut yang dapat dimakan antara lain jenis ganggang hijau (*chlorophyceae*), ganggang merah (*rhodophyceae*), ganggang coklat (*phaeophyceae*), dan ganggang biru (*Cyanophyceae*).

2.1.1 *Eucheuma cottonii*

Suparman (2013), melaporkan bahwa dari empat kelas rumput laut berdasarkan pigmen yang terkandung didalamnya, jenis yang paling banyak digunakan sebagai bahan baku industri ialah jenis *Rhodophyceae* (ganggang merah). Indonesia merupakan salah satu negara produsen *Eucheuma cottonii* yang memasok 50% kebutuhan rumput laut dunia, jenis ini merupakan jenis yang paling banyak digunakan dalam industri kosmetik maupun farmasi.

2.1.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Eucheuma cottonii memiliki ciri-ciri fisik berupa *thallus* silindris, dengan permukaan licin dan *cartilaginous* (seperti tulang rawan). Warna fisik *Eucheuma cottonii* tidak selalu tetap terkadang berwarna hijau, hijau kekuningan, abu-abu

sampai merah. Kondisi warna fisik pada *Eucheuma cottonii* yang berbeda-beda sering terjadi diakibatkan pengaruh lingkungan yang berbeda. Kondisi lingkungan berpengaruh terhadap proses adaptasi kromatik berupa penyesuaian antara proporsi pigmen dengan kualitas pencahayaan yang digunakan *Eucheuma cottonii* pada proses fotosintesis untuk memproduksi makanannya sendiri (Prasetyowati *et al.*, 2008). Sampel *Eucheuma cottonii* disajikan pada Gambar 1.

Berikut ini taxonomy *Eucheuma cottonii* menurut Zipcodezoo (2014), yaitu:

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Biliphyta
Phylum	: Rhodophyta
Subphylum	: Macrorhodophytina
Class	: Florideophyceae
Order	: Gigartinales
Family	: Solieraceae
Genus	: <i>Eucheuma</i>
Specific epithet	: <i>cottonii</i>
Botanical name	: <i>Eucheuma cottonii</i>



Gambar 1. *Eucheuma cottonii*
(Dokumentasi Penelitian)

2.1.1.2 Komposisi Kimia dan Nutrisi

Kandungan nutrisi dalam *Eucheuma cottonii* menurut Wiratmaja, *et al.* (2011) antara lain mengandung karbohidrat 68,48%, kadar abu 19,92%, serat kasar 7,02%, protein 2,80% dan lemak 1,78%. Menurut Ulfah (2009), komposisi kimia *Eucheuma cottonii* yang membedakan dengan rumput laut lainnya adalah kandungan kappa karagenan dan tingginya kandungan mineral kalium pada dinding selnya, komposisi kimia disajikan pada Tabel 1.

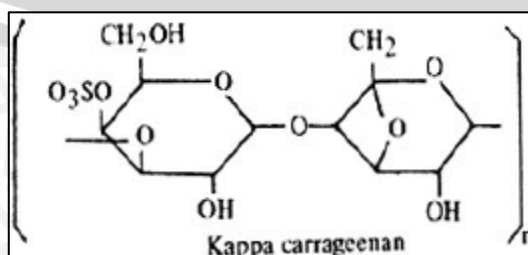
Tabel 1. Komposisi Kimia *Eucheuma cottonii*

Komponen Kimia	Komposisi
Kadar air	80-90%
Protein	0,7%
Lemak	0,2%
Serat pangan tidak larut	58,6 g/100 g (berat kering)
Serat pangan larut	10,7 g/100 g (berat kering)
Abu	3,4%
Mineral Zn	0,01 ppm
Mineral Mg	2,88 ppm
Mineral Ca	2,80 ppm
Mineral K	87,10 ppm
Mineral Na	11,93 ppm
Karagenan	61,52 %

Sumber : Ulfah (2009).

2.1.1.3 Struktur Dinding Sel

Menurut Rohman (2013), sel alga merah terdiri dari perakaran sel tunggal maupun sel banyak dengan komponen dinding sel berupa selulosa, agar, karagenan, porpiran, dan selaran. Menurut Purnomo (2005), perbedaan utama rumput laut merah dengan rumput laut jenis lainnya ialah pigmen berwarna merah dan dinding sel yang mengandung karagenan. Ulfah (2009) melaporkan bahwa sumber karagenan utama dari spesies *Eucheuma cottonii* ialah jenis kappa karagenan. Kappa karagenan tersusun dari ikatan β -1,3 pada unit D-galaktosa-4-sulfat dan ikatan α -1,4 pada unit 3,6-anhidro-D-galaktosa. Kandungan unit 3,6-anhidro-D-galaktosa menyebabkan peningkatan sensitivitas karagenan terhadap ion kalium, hal ini menyebabkan kekuatan gel karagenan meningkat. Kappa karagenan membentuk gel yang (rigid) keras dan mudah patah. Berikut ini struktur kappa karagenan yang disajikan di Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kappa Karagenan (Ulfah, 2009)

2.1.1.4 Manfaat dan Kegunaan

Kementrian Perdagangan Republik Indonesia (2013), Salah satu manfaat *Eucheuma cottonii* ialah sebagai bahan makanan, bahan farmasi dan kosmetik, sebagai pembuat gel, dan sebagai pengental atau penstabil. Ditambahkan oleh Kadi (2004), melaporkan bahwa *Eucheuma cottonii* banyak dimanfaatkan dalam industri makanan, sebagai bahan kosmetik, farmasi, pasta gigi, dan salep. *Eucheuma cottonii* juga dapat digunakan sebagai antimikroba dan antioksidan.

2.1.2 *Eucheuma spinosum*

Rumput laut *Eucheuma spinosum* hasil budidaya biasanya diolah secara sederhana menjadi manisan rumput laut, sirup, selai, jelly, maupun jus. Suparman (2013) melaporkan bahwa perbedaan antara *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* adalah karagenan yang dihasilkan. *Eucheuma spinosum* menghasilkan karagenan jenis iota. Selain dari karagenan yang dihasilkan perbedaan antara keduanya juga dapat dilihat dari ciri-ciri morfologi keduanya antara lain pada duri dan warna dipermukaan *thallus*.

2.1.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Murdinah (2011), morfologi *Eucheuma spinosum* ialah *thallus* berbentuk silindris, permukaan licin, *cartilaginous*, dengan warna coklat tua, hijau kecoklatan, hijau kekuningan, atau merah keunguan. Ciri khusus *Eucheuma spinosum* ialah memiliki duri-duri yang tumbuh berderet melingkar pada *thallus* dengan interval yang bervariasi sehingga membentuk ruas-ruas *thallus* yang dilingkari duri. Percabangan *thallus* berselang-seling dan timbul teratur pada deretan duri antara ruas-ruas dan merupakan perpanjangan dari duri-duri. Cabang dan duri pada ruas *thallus* juga dapat tumbuh namun relatif pendek. Ujung percabangan *thallus* berbentuk meruncing dan mudah melekar pada

substrat. Sampel *Eucheuma spinosum* disajikan pada Gambar 3. Adapun taxonomy *Eucheuma spinosum* menurut Zipcodezoo (2014), yaitu:

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Biliphyta
Phylum	: Rhodophyta
Subphylum	: Macrorhodophytina
Class	: Florideophyceae
Order	: Gigartinales
Family	: Solieraceae
Genus	: Eucheuma
Specific epithet	: spinosum
Botanical name	: <i>Eucheuma spinosum</i>



Gambar 3. *Eucheuma spinosum*
(Dokumentasi Penelitian)

2.1.2.2 Komposisi Kimia dan Nutrisi

Komposisi kima dan nutrisi yang terkandung dalam *Eucheuma spinosum* cukup beragam. Kandungan dalam *Eucheuma spinosum* yang paling banyak digunakan dalam bidang industri ialah karagenan. Namun selain karagenan *Eucheuma spinosum* juga memiliki kandungan nutrisi lainnya yang memberikan manfaat yang bagi kesehatan bila dikonsumsi. Kandungan nutrisi *Eucheuma spinosum* yang membedakan dengan rumput laut lainnya ialah kandungan iota karagenan dan kandungan mineral Kalsium (Ca) pada dinding selnya (Ulfah, 2009). Berikut ini merupakan komposisi kimia dari *Eucheuma spinosum* menurut Khamdiyah (2010) yang dapat dilihat pada Tabel 2.

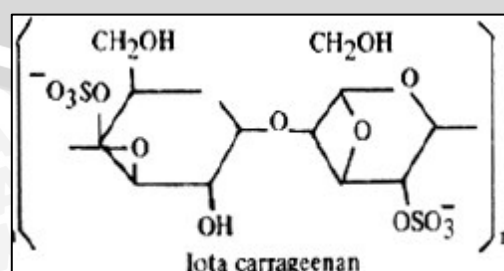
Tabel 2. Komposisi Kimia *Euचेuma spinosum*

Komponen Kimia	Komposisi
Kadar air	21,90% (berat kering)
Protein	5,12%
Lemak	0,13%
Karbohidrat	13,38%
Serat Kasar	1,39%
Abu	14,21%
Ca	52,85 ppm
Fe	0,180 ppm
Pb	0,768 ppm
Vit. B ₁ (Thiamin)	0,21 mg/100 g
Vit. B ₂ (Ribolavin)	2,26 mg/100 g
Vit. C	43 mg/100 g
Karagenan	65,75%

Sumber : Khamdiyah (2010)

2.1.2.3 Struktur Dinding Sel

Menurut Ichwan dan Winarti (2014), materi dinding sel dari alga ialah selulosa xilan, manan, polisakarida yang mengandung gugus sulfat (karagenan), asam alginat, protein, silikon, dan CaCO₃. Struktur thallus pada *Euचेuma spinosum* bersifat *cartilaginous* dan *calcareous* (mengandung zat kapur). Kandungan CaCO₃ dipermukaan thallus *E. spinosum* menyebabkan struktur permukaan thallus keras. Ulfah (2009) melaporkan bahwa sumber karagenan utama dari spesies *Euचेuma spinosum* ialah jenis iota karagenan. Iota karagenan tersusun dari ikatan β -1,3 pada unit D-galaktosa-4-sulfat dan ikatan α -1,4 pada unit 3,6-anhidro-D-galaktosa-2-sulfat. Kandungan gugus 2-sulfat meningkatkan sensitivitas karagenan terhadap ion kalsium. Berikut ini struktur iota karagenan yang disajikan di Gambar 4.



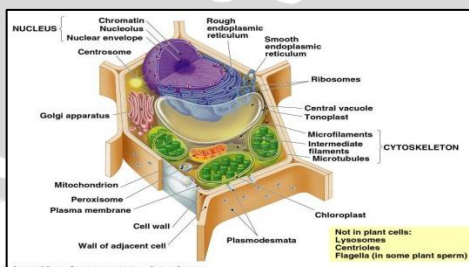
Gambar 4. Struktur Iota Karagenan (Ulfah, 2009)

2.1.2.4 Manfaat dan Kegunaan

Kementrian Perdagangan Republik Indonesia (2013), melaporkan bahwa salah satu manfaat *Eucheuma spinosum* ialah digunakan sebagai stabilisator, emulsifier dalam bidang industri pangan, kosmetik dan obat-obatan. Selain itu ditinjau dari kandungan Vitamin C dan karoten yang terkandung didalamnya, *Eucheuma spinosum* dapat berpotensi sebagai sumber antioksidan alami yang bermanfaat untuk kesehatan. Ditambahkan oleh Abdan, *et al.* (2013), *Eucheuma spinosum* banyak dimanfaatkan dalam industri kosmetik, makanan, farmasi, kertas, tekstil, fotografi, pasta, dan pengalengan ikan.

2.2 Pigmen Rumput Laut Merah

Winarno, *et al.* (1980), melaporkan bahwa sebagian besar pigmen tanaman terkumpul di dalam sel-sel tenunan, misalnya khlorofil yang terdapat dalam khloroplast. Menurut Rohman (2013), sel alga merah memiliki pigmen fikobilin berupa fikoeritrin (merah) dan fikosianin (biru) yang bersifat adaptif kromatik. Sifat adaptif kromatik pigmen dalam sel alga merah merupakan bentuk penyesuaian proporsi pigmen sesuai kualitas pencahayaan sehingga menimbulkan berbagai warna yang berbeda pada *thallus*, seperti warna merah tua, coklat, kuning, hijau, dan pirang. Sel alga disajikan di Gambar 5.



Gambar 5. Sel Alga (Rumput Laut)
(Wikipedia, 2014)

Menurut Juneidi (2004), menyatakan bahwa rumput laut dapat disebut tanaman karena memiliki klorofil (zat hijau daun) sehingga mampu berfotosintesis. Adapun pigmen fotosintetik yang terkandung dalam rumput laut merah antara lain carotene, xantofil, fikobilin, r-fikoeritrin penyebab warna merah, dan klorofil a dan d. Ditambahkan oleh Suparman (2013) yang menyatakan bahwa alga merah memiliki pigmen-pigmen kromatofor berupa klorofil, santofil, karotena, fikoeretrin, dan fikosianin.

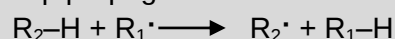
2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu bahan kimia berupa atom atau molekul yang memiliki elektron tidak stabil berpasangan pada lapisan luarnya. Atom-atom dengan elektron yang tidak berpasangan akan mencoba melengkapi lapisan elektron luarnya untuk mencapai keadaan stabil. Menurut Suryohudoyo (1993), radikal bebas memiliki sifat reaktivitas tinggi karena cenderung menarik electron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi senyawa radikal. Sifat inilah yang berbahaya karena dapat membentuk reaksi rantai (*chain reaction*) radikal. Berikut ini salah satu contoh reaksi terbentuknya radikal bebas yaitu reaksi radikal hidroksil menurut Suryohudoyo(1993) di Gambar 6.

Tahap inisiasi



Tahap propagasi



Tahap terminasi



Gambar 6. Reaksi Radikal Hidroksil
(Suryohudoyo,1993)

Senyawa radikal bebas dapat terbentuk melalui 3 tahap yaitu tahap awal pembentukan radikal bebas (inisiasi), tahap terbentuknya senyawa radikal baru (propagasi), dan tahap akhir pengubahan senyawa radikal menjadi senyawa non radikal (terminasi). Dalam metabolisme normal, tubuh memproduksi partikel kecil bertenaga besar sebagai radikal bebas yang berfungsi untuk menghasilkan tenaga dan untuk membunuh bakteri dan virus dalam tubuh (Arief, 2003).

Menurut Rohmtulssalihat (2009), terdapat dua sumber radikal bebas radikal bebas yaitu endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen berasal dari reaksi autooksidasi, oksidasi, enzimatis, fagositosis, dalam respirasi dan transfer elektron di mitokondria serta dari oksidasi ion-ion logam transisi. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari luar sistem tubuh seperti sinar UV, polusi, asap rokok, makanan, minuman, ozon, dan pestisida. Menurut Arief (2003), terdapat beberapa senyawa radikal bebas penting dalam tubuh yaitu radikal derivat dari oksigen dan termasuk dalam kelompok radikal reaktif (*reactive oxygen species* / ROS) yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Senyawa Radikal Bebas Biologis

Kelompok Oksigen Reaktif	
O_2^*	Radikal Superoksida (<i>Superoxide radical</i>)
*OH	Radikal Hidroksil (<i>Hydroxyl radical</i>)
ROO^*	Radikal Peroksil (<i>Peroxyl radical</i>)
H_2O_2	Hydrogen Peroksida (<i>hydrogen Peroxide</i>)
1O_2	Oksigen Tunggal (<i>Singlet Oxygen</i>)
NO^*	Nitrit Oksida (<i>Nitric oxide</i>)
$ONOO^*$	Nitrit Peroksida (<i>Peroxynitrite</i>)
$HOCl$	Asam Hipoklor (<i>hypochlorous acid</i>)

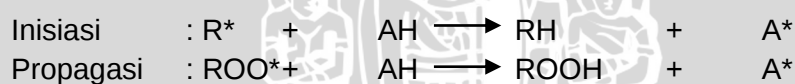
Sumber: Arief (2003)

Sholihah dan Widodo (2008) melaporkan radikal bebas pada konsentrasi yang berlebihan dapat menyerang PUFA (poly unsaturated fatty acid), protein, asam nukleat, dan DNA sel sehingga meningkatkan perkembangan penyakit kronis seperti kanker, jantung koroner, dan diabetes melitus serta kerusakan sel, jaringan, dan mutasi genetik. Berdasarkan penelitian di dunia kesehatan

Rohmatussolihat (2009), diperoleh fakta bahwa terdapat komponen penting yang dapat menyelamatkan sel dari bahaya radikal bebas yaitu antioksidan. Keseimbangan antara kandungan antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh dapat menjadi salah satu faktor yang berpengaruh terhadap kesehatan. Sehingga asupan antioksidan dari bahan makanan sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk menyeimbangkan jumlah antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh.

2.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pendonor satu atau lebih atom hydrogen. Nuraini (2007) mengemukakan antioksidan memiliki fungsi sebagai pemberi atom H dan menghambat laju reaksi autooksidasi dengan mekanisme memutus rantai reaksi autooksidasi dan mengubah radikal bebas menjadi radikal yang stabil. Senyawa antioksidan memberikan atom H dengan cepat ke senyawa radikal bebas (R^* , ROO^*) dan mengubahnya ke bentuk senyawa radikal stabil, senyawa turunan antioksidan (A^*) relatif stabil. Berikut ini reaksi antara senyawa antioksidan dan radikal bebas menurut Nuraini (2007) disajikan di Gambar 7.



Gambar 7. Reaksi Antioksidan dan Radikal Bebas
(Nuraini, 2007)

Dalam mempertahankan diri dari radikal bebas endogen yang dihasilkan dari proses metabolisme tubuh, sel dalam tubuh juga memproduksi senyawa antioksidan di dalam sel. Antioksidan secara alami diproduksi didalam tubuh berupa enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase serta antioksidan non-enzimatis. Antioksidan non-enzimatis merupakan antioksidan sekunder yang berasal dari asupan bahan makanan seperti vitamin C, E, A, dan β -karoten yang berasal dari sayuran, buah-buahan,

dan biji-bijian (Arief, 2003). Berikut ini merupakan senyawa antioksidan endogen yang ada di dalam sel menurut Arief (2003), yang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Senyawa Antioksidan dalam Sel

Antioksidan	Keterangan
– Glutathione	– Antioksidan utama di dalam (2-10 μ M) dan di luar sel (plasma 5-25 μ M)
– Sulfhydryl	– Cysteine dan homocysteine
– Vitamin C	– Antioksidan hidrofilik ekstraseluler (plasma 40-140 μ M)
– Vitamin E	– Pembersih di ruang hidrofobik (plasma 10-40 μ M)
– β -carotene	– 0,055 mg/dl
– Uric Acid	– Hasil metabolic adenosine dan xanthine, bereaksi pada radikal hidroksil (OH*)
– Billirubin	– Antioksidan hidrofobik terikat pada albumin 20 μ M
– Coenzyme Q10	– 0,08 mg/dl

Sumber: Arief (2003)

Sumber-sumber antioksidan dari luar tubuh (eksogen) dapat berupa antioksidan sintetik maupun antioksidan alami. Menurut Swatara dan Parwata (2011), sumber antioksidan sintetik banyak digunakan di industri minuman dan makanan. Sedangkan sumber antioksidan alami banyak terdapat pada tumbuhan (Zuhra, *et al.* 2008). Nuraini (2007) menyatakan bahwa senyawa yang terkandung dalam antioksidan alami antara lain fenol, polifenol, dan yang paling umum adalah flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin, flavonon), turunan asam sinamat, tokofenol, dan asam organik polifungsi, sedangkan antioksidan sintetik antara lain PG (*propyl galate*), TBHQ (*tert-butylhydroxyquinone*), BHA (*butylated hydroxyanisole*), dan BHT (*butylated hydroxytoluene*).

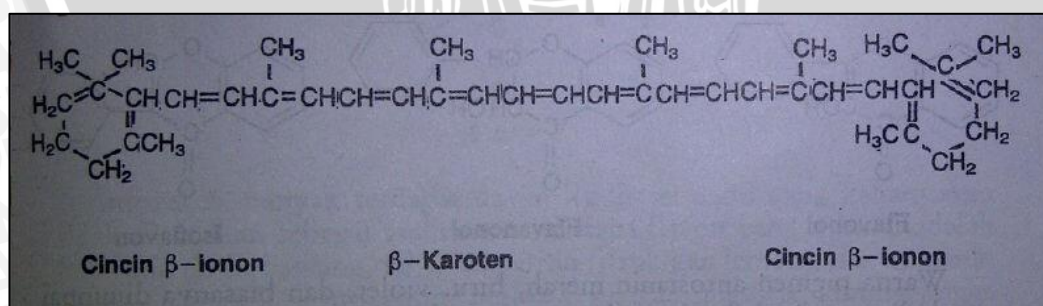
Menurut Tamat, *et al.* (2007) manfaat antioksidan bagi kesehatan dan kecantikan, antara lain mencegah penyakit kanker, tumor, penyempitan pembuluh darah, dan penuaan dini pada tubuh. Terdapat beberapa syarat antioksidan yang dapat digunakan, antara lain tidak beracun maupun memiliki efek fisiologis pada tubuh, tidak menimbulkan flavor baik rasa maupun warna, dapat larut sempurna, dan efektif dalam jumlah relative kecil (Dwihandita, 2009).

2.5 Antioksidan Rumput Laut Merah

Wibowo dan Fitriyani (2012) melaporkan bahwa kandungan gizi rumput laut sebagai bahan pangan ialah air sekitar 80-90%, karbohidrat (gula atau "vegetable-gum"), protein, lemak, abu berupa senyawa garam natrium dan kalium, β -karoten, vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12, C, dan vitamin E, serta mineral seperti kalium, kalsium, fosfor, natrium, zat besi, dan iodin. Berdasarkan penelitian Julyasih, *et al.* (2009) melaporkan bahwa kandungan total fenol dan total karotenoid yang terkandung dalam rumput laut *Caulerpa* spp., *Glacilaria* spp., dan *Eucheuma spinosum* berpotensi tinggi sebagai sumber senyawa antioksidan untuk menangkal radikal bebas di dalam tubuh.

2.6 Beta Karoten

Riawan (2013), menyatakan bahwa karotenoid merupakan senyawa isoprenoid dan tetrapenoid yang diproduksi dalam sel tumbuhan, senyawa ini memiliki warna kuning, oranye, atau merah oranye. Karotenoid terdiri atas likopen, α -karoten, β -karoten, zeaxantin, dan cryptoxanthin. Beta karoten memiliki rumus kimia ($C_{40}H_{56}$) yang tersusun dari 4 unit isoprena dengan ujung membentuk lingkaran β -karoten. Struktur β -karoten dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Struktur β -Karoten
(Winarno, 2004).

Menurut Kumalaningsih (2006) melaporkan bahwa karakteristik β -karoten ialah larut dalam lemak, sensitif terhadap, udara, cahaya, dan suhu tinggi. Ditambahkan oleh Winarsi (2011) mengemukakan di dalam kloroplas algae, β -

karoten berfungsi sebagai pigmen pelengkap untuk penyerapan cahaya. Peran terpenting dari β -karoten di dalam sel ialah sebagai detoksifikasi oksigen teraktivasi dan klorofil triplet hasil reaksi fotosintesis dengan cahaya, selain itu β -karoten juga berperan dalam meredam singlet oksigen dan radikal bebas.

2.7 Ekstraksi

Septiana dan Asnani (2012) mengemukakan bahwa prinsip dari ekstraksi adalah pemisahan komponen dalam bahan yang diekstrak dengan pelarut tertentu. Proses ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa atau bahan tertentu yang mengandung komponen aktif. Terdapat beberapa metode yang digunakan dalam proses ekstraksi, antara lain ekstraksi dengan pelarut, destilasi, pengepresan mekanik, dan sublimasi.

Metode yang dipilih dalam ekstraksi dapat berpengaruh terhadap sifat fisikokimia dari ekstrak yang dihasilkan. Terdapat tiga teknik ekstraksi dengan pelarut organik yaitu maserasi, *digestion*, dan perkolasi. Proses maserasi meliputi proses penghancuran sampel, perendaman dengan pelarut dalam waktu tertentu, dan penyaringan atau pengepresan hingga diperoleh cairan. Proses *digestion* meliputi pemanasan pada suhu dan waktu tertentu. Proses perkolasi merupakan teknik ekstraksi dengan menggunakan aliran pelarut dengan pemanasan atau tanpa pemanasan (Septiana dan Asnani, 2012).

2.7.1 Maserasi

Proses maserasi sampel meliputi proses penghancuran sampel, perendaman dengan pelarut dalam waktu tertentu, dan penyaringan sampel hingga diperoleh cairan berupa filtrat dan residu sampel (Septiana dan Asnani, 2012). Menurut Hijaz (2009) yang melaporkan bahwa dalam proses maserasi dengan perendaman pelarut dalam suhu ruang dapat mengekstrak senyawa

alami bahan akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel yang menyebabkan dinding sel serta membran sel terpecah. Setelah dinding sel dan membran sel pecah kemudian senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan ikut terlarut dalam pelarut organik yang digunakan.

Dalam proses maserasi sampel sangat dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, lama waktu perendaman, serta perlakuan tambahan berupa perlakuan fisik seperti penumbukan yang dapat memberikan efektifitas tinggi terhadap proses ekstraksi sampel. Ditambahkan oleh Winarno, *et al.* (1980) yang menyatakan bahwa jika sel-sel mengalami pukulan mekanik kemudian pecah, maka pigmen akan keluar dan sebagian dapat mengalami kerusakan akibat teroksidasi saat kontak dengan udara.

2.7.2 Fraksinasi (Partisi)

Fraksinasi merupakan suatu proses pemisahan fraksi yang terkandung dalam suatu larutan maupun suspensi yang memiliki perbedaan karakteristik. Pemisahan kedua fraksi dalam proses fraksinasi dilakukan dengan memanfaatkan perbedaan sifat yang terkandung dalam fraksi. Jenis pelarut dan senyawa kompleks yang digunakan sangat berpengaruh terhadap proses pemisahan fraksi (Yuliasih, *et al.* 2005). Ditambahkan Simanjuntak (2008) yang melaporkan bahwa proses fraksinasi ekstrak dengan memasukkan ekstrak cair homogen ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut organik seperti n-heksan, kloroform, etil asetat, lalu fraksi pelarut dipisahkan dengan fraksi cair.

Menurut Romiyanto (2014), pemisahan dalam proses fraksinasi didasarkan pada bobot tiap fraksi, dimana fraksi dengan berat molekul ringan berada di atas dan fraksi dengan berat molekul tinggi akan berada di bawah. Dalam proses fraksinasi biasanya digunakan pelarut organik untuk pemisahan fraksi seperti eter, aseton, benzena, etanol, diklorometana, atau campurannya.

2.7.3 Evaporasi

Frayekti (2012) mengemukakan bahwa evaporasi merupakan proses penguapan atau pemekatan pelarut dalam suatu bahan atau ekstrak cair yang menghasilkan zat cair pekat dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Dalam proses evaporasi menghasilkan sisa penguapan berupa zat cair ataupun zat cair dengan viskositas tinggi dan bukan zat padat maupun fraksi-fraksi. Alat yang digunakan dalam proses evaporasi dinamakan evaporator. Evaporator memiliki prinsip dasar berupa penukaran panas dan pemisahan uap yang terbentuk dari cairan pelarut. Evaporator menurut Distantina, *et al.* (2006) dapat dilihat di Gambar 9.



Gambar 9. Rotary Evaporator
(Distantina, *et al.* 2006)

2.7.4 Gas Nitrogen

Nitrogen merupakan komponen terbesar pertama pada atmosfer bumi dengan jumlah mencapai 70%, dalam sistem periodik nitrogen disimbolkan "N" dengan 7 unsur atom. Nitrogen bersifat independen dan tidak mudah bereaksi dengan senyawa atau unsur lain, berbentuk gas, tidak berwarna, tidak berbau, dan tidak berasa. Prinsip penguapan pelarut dengan menggunakan gas nitrogen ialah molekul N_2 berikatan kovalen rangkap tiga dengan energi ikatan tinggi

bereaksi dengan molekul pelarut, selain itu nitrogen bereaksi dengan hidrogen atau oksigen pada suhu tinggi (Romiyanto, 2014).

Ditambahkan Setianingsih (2010) sifat kimia gas Nitrogen antara lain memiliki energi ikatan sebesar 1410 kJ/mol, sukar bereaksi pada suhu tinggi (endoterm), pada suhu ruang mampu bereaksi dengan logam seperti Li, dan dapat bereaksi dengan oksigen maupun hidrogen pada suhu tinggi melalui loncatan bunga api yang membentuk gas NH_3 dan NO_3 . Metode penguapan pelarut dengan menggunakan gas nitrogen ialah penyemprotan gas N_2 pada tekanan tertentu, sehingga molekul N_2 berikatan dengan molekul pelarut dan diuapkan melalui reaksi dengan oksigen diudara. Sifat fisika dan kimia gas nitrogen dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Sifat Fisika dan Kimia Gas Nitrogen

No.	Karakteristik	Gas Nitrogen
1.	Nama kimia	Nitrogen (N_2)
2.	Massa jenis	(0°C; 101,325 kPa) 1.251 g/L
3.	Titik lebur	63.15 K (-210.00°C, -346.00°F)
4.	Titik didih	77.36 K (-195.79°C, -320.42°F)
5.	Titik kritis	126.21 K, 3.39 MPa
6.	Berat jenis relative	0.97
7.	Berat molekul	28.013
8.	Kalor peleburan	(N_2) 0.720 kJ/mol
9.	Kalor penguapan	(N_2) 5.57 kJ/mol
10.	Kapasitas kalor	(25°C) (N_2) 29.124 J/(mol K)

Sumber : Romiyanto (2014).

2.7.5 Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi bahan menurut Rahayu (2009) dalam Romiyanto (2014), laju ekstraksi antara lain dipengaruhi oleh ukuran partikel, zat pelarut, temperatur, dan pengadukan fluida. Pengaruh ukuran partikel dimana semakin kecil ukuran partikel maka semakin luas permukaan antara padatan dan pelarut sehingga laju perpindahan semakin besar. Pengaruh zat pelarut ditinjau dari kemurnian dan viskositas pelarut.

Penggunaan pelarut murni akan meningkatkan konsentrasi zat terlarut dan laju ekstraksi, sedangkan viskositas berpengaruh pada semakin rendah nilai viskositas maka semakin mudah sirkulasi antara pelarut dan padatan. Temperatur berpengaruh pada kelarutan zat terlarut yang akan semakin meningkat seiring dengan kenaikan temperatur yang digunakan saat ekstraksi.

2.8 Pelarut

Menurut Sudarmadji, *et al.* (2007) pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat komponen senyawa yang akan diisolasi, terutama sifat polaritas dan gugus polar dari senyawa tersebut. Senyawa yang bersifat polar dapat larut dalam pelarut polar dan senyawa nonpolar dapat larut dalam senyawa nonpolar. Polaritas bahan saat proses ekstraksi dapat berubah karena terjadinya perubahan kimia. Tingkat polaritas bahan ditunjukkan melalui pengukuran konstanta dielektrik bahan pelarut, dimana semakin besar konstanta dielektrik maka tingkat kepolaran akan semakin besar.

Nuraini (2007) mengemukakan prinsip ekstraksi dengan pelarut organik ialah dengan mengontakkan bahan yang akan diekstrak dengan pelarut selama beberapa waktu tertentu hingga terlarut, kemudian komponen terlarut yang akan diekstrak dipisahkan dengan pelarut dari bahan yang diekstrak. Konstanta dielektrik pelarut menurut Sudarmadji, *et al.* (2007) disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Konstanta Dielektrik Pelarut

Bahan Pelarut	Konstanta Dielektrik	Tingkat kelarutan dalam air			
		Tak larut	Sedikit	Misible*	
n-heksan	1.89	Tak larut			Non-polar
Petroleum ether	1.90	Tak larut			
Dietilether	3.34		Sedikit		
Etilasetat	6.02		Sedikit		
Aseton	20.70			Misible*	Polar
Metanol	33.60			Misible*	
Air	80.40			Misible*	

*Misible ialah dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi

Sumber : Sudarmadji, *et al.* (2007)

2.8.1 Metanol (CH_3OH)

Metanol merupakan monohidrat dimana tiap molekulnya mengandung satu gugus hidroksil (Gardjito, *et al.* 1992). Senyawa ini berbahaya bila dikonsumsi dalam jumlah besar, resiko yang ditimbulkan ialah kebutaan. Methanol memiliki sifat dapat larut sempurna dalam air pada suhu 20°C , memiliki titik didih 65°C , pada suhu ruang berbentuk cairan ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, berbau khas, dan beracun (Romiyanto, 2014). Sifat fisika dan kimia metanol dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Sifat Fisika dan Kimia Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol
2.	Rumus bangun	CH_3OH $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	-97°C
5.	Titik didih	64.7°C
6.	Massa molar	32.04 g/mol
7.	Densitas	$0,7918 \text{ g/cm}^3$, cair
8.	Titik nyala	11°C
9.	Konstanta dielektrik	33

Sumber: Romiyanto (2014)

2.8.2 Aseton (CH_3COCH_3)

Menurut Lyman (1982), melaporkan bahwa Aseton memiliki rumus kimia $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ yang berupa cairan tidak berwarna, dapat larut sempurna dalam air dan pelarut organik seperti etanol dan benzen, serta berbau sedikit tajam dan khas. Ditambahkan oleh Romiyanto (2014) yang menyatakan bahwa asetone memiliki nama lain dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter, dan piroasetis spirit. Fungsi utama dari asetone adalah sebagai pelarut, karena bersifat higroskopis, sangat volatil, tidak beresidu dan mudah terbakar. Selain itu kegunaan lain dari asetone adalah sebagai pelarut senyawa

asetilen, campuran adesif, campuran parfum, campuran pembersih, dan campuran resin. Berikut ini merupakan sifat kimia dan fisika Aseton pada Tabel 8.

Tabel 8. Sifat Kimia dan Fisika Aseton

Sifat Kimia dan Fisika	Keterangan
Rumus Molekul	C_3H_6O
Rumus Kimia	$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3-C-CH_3 \end{array}$
Berat Molekul	58,08
Kepadatan	0,78998 g/mL
Titik Lebur	-95,35 °C
Titik Didih	56,2 °C
Tekanan Uap (20 °C)	181,72 mmHg
Titik Nyala	465 °C
Batas Ledak Atas	12,8% v/v
Batas Ledak Bawah	2,6% v/v

Sumber : Lyman (1982)

2.8.3 Dietil Eter ($C_4H_{10}O$)

SNI (1992) melaporkan bahwa dietil eter merupakan senyawa dengan komponen utama ($C_2H_5-O-C_2H_5$). Adapun sifat umum dari dietil eter ialah berbentuk cairan jernih tidak berwarna, mudah terbakar, mudah menguap, dan berbau khas. Ditambahkan oleh Romiyanto (2014) yang menyatakan bahwa dietil eter dikenal sebagai etoksi etana memiliki kelarutan dalam air sebesar 6,9 g/100 ml. Dietil eter biasanya digunakan untuk anestesi umum. Sifat fisika dan kimia dietil eter menurut Romiyanto (2014) dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Sifat Fisika dan Kimia Dietil Eter

No.	Karakteristik	Dietil Eter
1.	Nama IUPAC	Ethoxyethane 3-oxapentane
2.	Rumus Molekul	$C_4H_{10}O$ ($C_2H_5OC_2H_5$)
3.	Rumus Kimia	$CH_3-CH_2-O-CH_2-CH_3$
4.	Massa molar	74.12 g/mol
5.	Densitas dan Fase	0.7134 g/cm ³ , cair
6.	Titik Leleh	-116.3 °C (156.85 K)
7.	Titik didih	34.6 °C (307.75 K)
8.	Penampilan	Jernih, cairan tak berwarna
9.	Viskositas	0.224 cP at 25°C

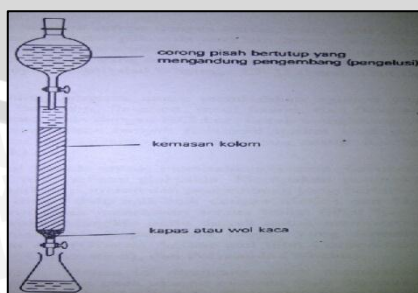
Sumber : Romiyanto (2014)

2.9 Kromatografi

Kromatografi berasal dari kata “chroma” berarti warna dan “graphein” berarti menuliskan (Sudarmadji, *et al.* 2007). Menurut Ardianingsih (2010), kromatografi ialah teknik pemisahan bahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan parambatan komponen pada medium tertentu. Prinsip pemisahan kromatografi ialah distribusi komponen berdasarkan perbedaan sifat fisik komponen. Persyaratan fase gerak dan fase diam dalam kromatografi ialah fase gerak dan fase tidak boleh bereaksi, sampel ekstrak harus larut dalam fase gerak dan berinteraksi dengan fase diam, fase gerak harus dapat mengalir dalam fase diam, serta fase diam harus tetap dalam posisinya.

2.9.1 Kromatografi Kolom

Markham (1988) melaporkan cara isolasi menggunakan kromatografi kolom dengan menempatkan ekstrak dalam kolom yang berisi serbuk penyerap (selulosa, silika ataupun poliamida) dengan ditambahkan elusi berupa pelarut yang sesuai. Ditambahkan oleh Lenia (2010) yang menyatakan kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dengan menggunakan fase padat dan fase cair untuk memurnikan fraksi-fraksi yang diinginkan. Menurut Sudarmadji, *et al.* (2007) melaporkan bahwa kromatografi juga dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang tidak berwarna. Berikut ini bagian-bagian dari kromatografi kolom yang dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Kromatografi Kolom (Markham, 1988)

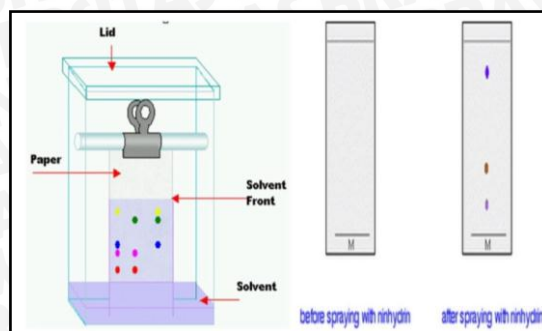
2.9.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu metode analisa kandungan senyawa kimia berdasarkan warna dan jarak tempuh sampel. Prinsip dari analisa KLT ialah dengan pemisahan senyawa campuran menjadi komponen-komponen tertentu melalui fase diam yang dibawa oleh fase gerak. Fase diam yang sering digunakan dalam beberapa penelitian ialah silika gel F_{254} (Dahnum, *et al.* 2007).

Ditambahkan oleh Markham (1988) yang melaporkan bahwa jenis pelat KLT yang banyak digunakan ialah dengan bahan plastik karena dapat tmbus sinar UV sehingga memudahkan dalam mendeteksi bercak dan mudah dipotong sehingga dapat digunakan dalam beberapa ukuran. Adapun beberapa jenis KLT yang ada dipasaran saat ini antara lain Merck (selulosa; kiselgel; poliamida 11F), Schleicher & Schull (selulosa F1440; kiselgel F1500; mikropoliaramida A1700), dan Mecherey-Nagel (poligram selulosa 300 UV). Pelat KLT memiliki beberapa kegunaan utama yaitu sebagai indikator untuk mencari pelarut saat kromatografi kolom, sebagai analisa fraksi senyawa hasil kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni dalam skala kecil.

Dalam analisa senyawa dengan metode KLT dilakukan dengan pengukuran jarak tempuh suatu senyawa dalam fase diam yang di bawa oleh fase gerak pada jarak tertentu yang sering disebut dengan bilangan R_f (Markham, 1988). Menurut Hijaz (2009), bilangan R_f didefinisikan sebagai jarak tempuh suatu senyawa yang dibagi dengan jarak yang ditempuh dari garis awal hingga batas atas pelat KLT, sehingga bilangan R_f selalu kurang dari 1,0. Gambaran proses kromatografi lapis tipis disajikan pada Gambar 11. Adapun rumus untuk menentukan nilai R_f menurut Hijaz (2009) ialah :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$



Gambar 11. Proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
(Romiyanto, 2014)

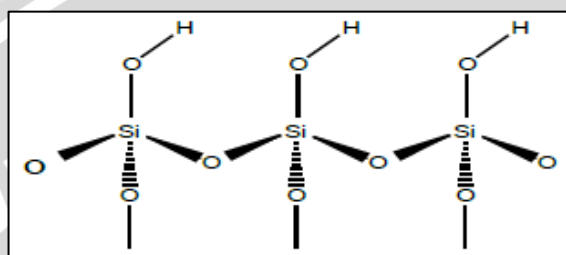
2.9.3 Fase Diam

Fase diam merupakan bahan penyerap yang berperan dalam memisahkan senyawa campuran dalam bahan. Terdapat beberapa fase diam yang akan digunakan dalam kromatografi antara lain fase diam tidak boleh bereaksi dengan fase gerak, fase diam harus dapat berinteraksi dengan sampel ekstrak, dapat dilewati fase gerak, dan harus terikat kuat pada posisinya (Ardianingsih, 2010). Ditambahkan oleh Markham (1988) yang melaporkan bahwa terdapat beberapa jenis bahan yang digunakan sebagai fase diam kromatografi kolom antara lain selulosa, silika, atau poliamida.

2.9.3.1 Silica Gel

Silika gel memiliki struktur dengan gugus polar berupa ikatan Si-O dan O-H serta dapat berinteraksi dengan dipol senyawa yang dipisahkan silika gel sebagai fase diam dalam kromatografi. Selain itu, silika gel dapat membentuk ikatan hidrogen dengan alkohol, fenol, amina, amida, dan asam karboksilat (Lestari, 2011). Ditambahkan Romiyanto (2014) yang menyatakan bahwa silika gel merupakan polimer asam silikat dengan berat molekul besar, terdiri dari globula-globula SiO_4 tetrahedral tidak beraturan membentuk kerangka tiga dimensi, bertekstur padat kenyal, mampu menyerap air, dan bersifat polar.

Ditambahkan oleh Markham (1988) yang menyatakan bahwa jenis fase diam yang sering digunakan dalam kromatografi ialah jenis GF254 dengan G adalah gypsum (CaSO_4), F adalah floroscene, dan 254 melambangkan panjang gelombang 254 nm dan untuk pemisahan senyawa yang kurang polar fase diam yang terbaik digunakan ialah Silika gel jenis Kisel gel 60, 70-230 mesh (Merck). Struktur kimia dari silika gel dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Struktur Silika Gel
(Lestari, 2011)

2.9.4 Fase Gerak

Fase gerak merupakan fase yang bergerak dalam reaksi pemisahan senyawa campuran kromatografi berupa bahan cair atau pelarut. Adapun syarat-syarat fase gerak yang digunakan dalam kromatografi ialah tidak bereaksi dengan fase diam, fase gerak harus dapat melarutkan sampel, dan fase gerak harus dapat mengalir melewati fase diam (Ardianingsih, 2010). Menurut Markham (1988), fase gerak yang digunakan dalam kromatografi kolom ialah pelarut tunggal maupun campuran yang dipilih dari tingkat kelarutan bahan dimulai dari pelarut non polar kemudian sedikit demi sedikit menuju ke polar.

Pelarut dengan sifat polar digunakan untuk mengelusi senyawa dengan adsorbansi tinggi dan pelarut non polar digunakan untuk mengelusi senyawa dengan adsorbansi rendah. Kekuatan elusi pelarut atau fase gerak ialah aquadest > metanol > etanol > propanol > aseton > etil asetat > kloroform > metil klorida > benzena > toluen > trikloroetilena > sikloheksana > heksan (Lestari, 2011).

2.9.4.1 N-Heksana (C_6H_{14})

N-heksana merupakan suatu senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia (C_6H_{14} ($CH_3-(CH_2)_4-CH_3$)). Penamaan heksana berasal dari “heks-” berarti enam atom karbon dan “-ana” berasal dari alkana. Pada kondisi atmosfer n-heksana berupa cairan tidak berwarna dan tidak larut dalam air (Romiyanto, 2014). Ditambahkan oleh Abdullah dan Widiwati (2010) yang melaporkan bahwa sifat fisik dari n- heksana ialah berbentuk cair, jernih atau tidak berwarna, berbau seperti gasoline, bersifat kelarutan tidak larut dalam air dan lebih mudah terlarut dalam alkohol, tekanan uap 151 mmHg, nilai viskositas 0,31 mPas, titik didih (760 mmHg) pada suhu $62^\circ C - 69^\circ C$, titik beku $-95^\circ C$, dan nilai kelarutan ($20^\circ C$) 0,1 g/L. Sifat fisika dan kimia pelarut n- heksana menurut Siswadi dan Permatasari (2009) dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Sifat Fisika dan Kimia N-Heksana

No.	Sifat fisis	Keterangan
1	Rumus molekul	C_6H_{14}
2	Rumus kimia	$H_3C-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$
3	Berat molekul	86,18 g/mol
4	Bentuk, Warna	Cairan, Bening
5	Densitas	0,6548 g/ml
6	Titik leleh	$-95^\circ C$ (178 K)
7	Titik didih	$69^\circ C$ (342 K)
8	Kelarutan dalam air	Tidak larut
9	Viskositas	0,294 cp ($25^\circ C$)

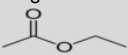
Sumber : Siswadi dan Permatasari (2009)

2.9.4.2 Etil Asetat ($C_4H_8O_2$)

Etil asetat merupakan pelarut dari jenis semi polar dengan titik didik relatif rendah yaitu $77^\circ C$. Dalam proses destilasi etil asetat berfungsi untuk memudahkan pemisahan minyak dan pelarutnya (Susanti, *et al.* 2012). Menurut Romiyanto (2014), etil asetat merupakan senyawa hasil ester dari etanol dan asam asetat. Etil asetat berupa zat cair dan tidak berwarna serta beraroma khas. Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang mudah menguap, tidak beracun

dan tidak higroskopis. Ditambahkan oleh Absori dan Paramitha (2011) yang melaporkan bahwa manfaat etil asetat dibidang industri antara lain tinta, thinner, atupun cat. Adapun sifat fisika dan kimia etil asetat dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Sifat Fisika dan Kimia Etil Asetat

No.	Spesifikasi	Keterangan
1	Bentuk	Cairan tidak berwarna
2	Rumus molekul	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$
		
3	Berat molekul	88,106 g/mol
4	Titik didih (1 atm)	77,1 °C
5	Temperatur kritis	250°C
6	Tekanan kritis	37,8 atm
7	Densitas	1,85 g/mol
8	Kemurnian	>99,5 %

Sumber : Absori dan Paramitha (2011)

2.10 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer merupakan instrumen yang digunakan untuk analisa kimia berdasarkan sifat-sifat dari interaksi antara energi radiasi elektromagnetik dengan zat kimia. Hasil dari interaksi ini dapat menimbulkan beberapa peristiwa seperti pemantulan, pembiasan, interferensi, difraksi, absorbansi (penyerapan), fluoresensi, fosforensi, dan ionisasi. Dasar dari analisa kimia dengan spektroskopi adalah absorbansi, karena secara kualitatif proses absorbansi pada setiap zat kimia bersifat spesifik atau unik dan secara kuantitatif absorbansi juga berbanding lurus dengan banyaknya zat kimia (Sudarmadji, *et al.* 2007). Menurut Sudarman (2012), besarnya serapan cahaya sebanding dengan jumlah molekul sesuai hukum *Lambert-Beer* dengan ketentuan larutan harus jernih (bebas dari koloid) dan encer, alat tidak boleh terdisosiasi, berasosiasi, atau bereaksi dengan pelarut, dan radiasi cahaya harus monokromatis, rumus perhitungan ialah:

Keterangan:

$$A = \epsilon bc$$

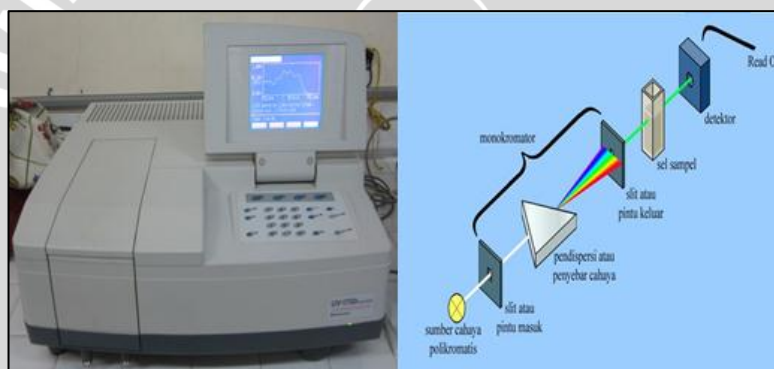
A = Absorbansi

ϵ = Absorptivitas Molar (*Molar extinction coefficient*)

b = Tebal Tempat Komponen

c = Konsentrasi Komponen

Menurut Hijaz (2009) yang melaporkan bahwa panjang gelombang yang digunakan dalam metode pengukuran spektrofotometer ialah range ultraviolet (200-400 nm), sinar tampak (400-700 nm), dan cahaya yang mendekati inframerah (700-800 nm). Sebagian besar spektrofotometri yang digunakan dalam eksperimen adalah pada range panjang gelombang untraviolet dan sinar tampak (UV-Vis) dengan transisi pada daerah spektrum (200-700 nm). Komponen spektrofotometer terdiri dari spektrometer yang berfungsi untuk menghasilkan cahaya pada panjang gelombang tertentu dan fotometer yang berfungsi sebagai piranti unuk mengukur intensitas berkas cahaya monokromatik. Alat spektrofotometer UV-Vis disajikan pada Gambar 13.



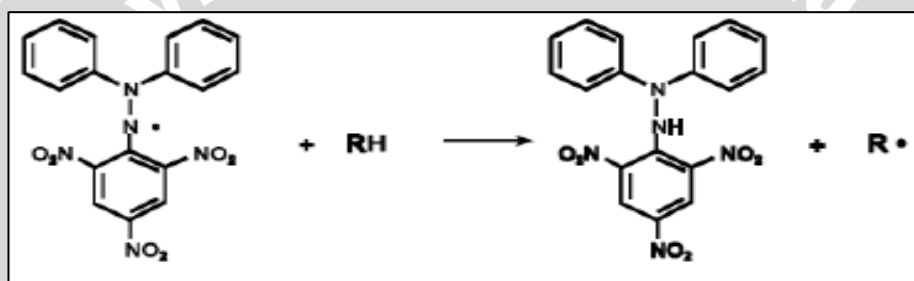
Gambar 13. Spektrofotometer UV-Vis
(Romiyanto, 2014)

2.11 Metode Analisa Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan tidak dapat diukur secara langsung, melainkan dengan mengukur efek antioksidan terhadap senyawa radikal bebas dalam keadaan terkontrol. Menurut Apak, *et al.* (2007), terdapat beberapa metode uji aktivitas antioksidan yang banyak digunakan dalam penelitian antara lain metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil / α, α), metode ABTS (Asam 2,2-Azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6- sulfonat), metode TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter), metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) dan metode CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity).

2.11.1 Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil)

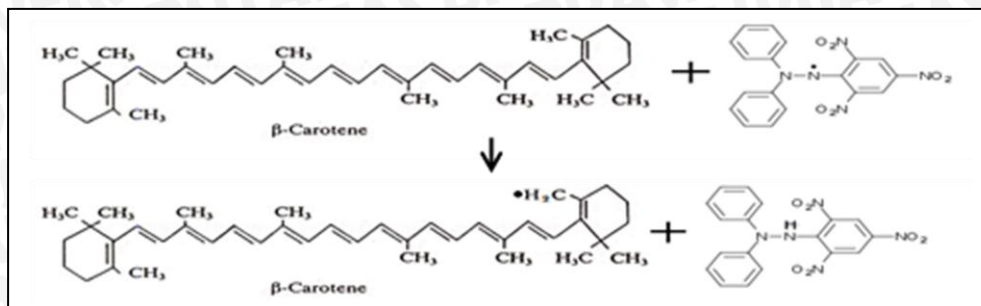
Uji aktivitas antioksidan metode DPPH dilakukan dengan pengukuran kemampuan senyawa antioksidan dalam menangkap radikal bebas DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil). Dalam reaksi ini senyawa antioksidan menyumbangkan elektron atau hidrogen yang kemudian bereaksi memudahkan warna radikal bebas DPPH, sehingga merubah warna DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil) yang semula berwarna ungu menjadi (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazin) yang berwarna kuning (Hertiani, *et al.* 2007). Berikut ini merupakan reaksi DPPH dengan senyawa antioksidan menurut Widyastuti (2010), dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Reaksi DPPH dengan Antioksidan (Widyastuti, 2010)

2.11.1.1 DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil)

memiliki ciri-ciri berupa padatan berwarna ungu kehitaman, larut dalam pelarut DMF atau etanol/metanol, titik didih 127–129°C, panjang gelombang maksimal ialah 517 nm, berat molekul 394,3 g/mol, dan memiliki rumus molekul $C_{18}H_{12}N_5O_6$ (Hijaz, 2009). Pada uji aktivitas antioksidan, DPPH menerima elektron/ hidrogen dari antioksidan sehingga menyebabkan perubahan warna dari ungu menjadi kekuningan. DPPH mampu mengukur senyawa antioksidan yang terlarut dalam pelarut organik, terutama alkohol. Reaksi aktivitas antioksidan dengan DPPH memiliki sifat sensitif terhadap cahaya, oksigen, pH, dan jenis pelarut (Widyastuti, 2010). Berikut ini merupakan reaksi antara DPPH dan β -karoten yang mungkin terjadi yang disajikan pada Gambar 15.



Gambar 15. Reaksi yang Dimungkinkan antara β -Karoten dan DPPH

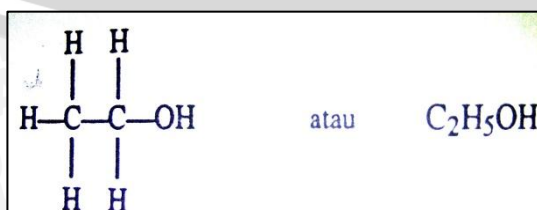
2.11.1.2 Etanol

Dalam ilmu kimia alkohol merupakan suatu senyawa organik yang mengandung gugus hidroksil (-OH) sebagai gugus fungsional. Namun secara umum sering kali menyebutkan etanol sebagai alkohol. Etanol sendiri merupakan senyawa alkohol dengan rumus kimia C_2H_5OH yang berupa zat cair jernih tidak berwarna, berbau khas, mudah terbakar, berfase cair pada suhu ruang, mudah menguap, dan mudah bercampur dengan air. Etanol dapat dihasilkan dari proses alami seperti fermentasi (Wiratmaja, *et al.* 2011). Struktur kimia dari etanol dapat dilihat pada Gambar 16. Sifat kimia dan fisika Etanol menurut Soebagyo (1980) dalam Khamdiyah (2010) dapat dilihat di Tabel 12.

Tabel 12. Sifat Kimia dan Fisika Etanol

Sifat Kimia dan Fisika	Keterangan
Berat Molekul	46
Kepadatan	0,791 g/mL
Titik Lebur	-117,3 °C
Titik Didih	78,3 °C
Titik Bakar	21 °C
Titik Nyala	372 °C
Batas Ledak Atas	19% v/v
Batas Ledak Bawah	3,5% v/v

Sumber : Soebagyo (1980) dalam Khamdiyah (2010)

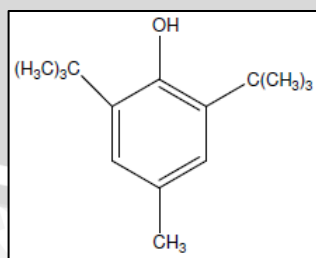


Gambar 16. Struktur Kimia Etanol
(Gardjito, *et al.* 1992)

Secara umum menurut Wiratmaja, *et al.* (2011), etanol banyak digunakan sebagai pelarut baik untuk zat organik maupun anorganik, sebagai bahan dasar industri asam cuka, ester, spiritus, asetaldehid, antiseptik, dan bahan baku pembuatan eter dan etil aster, selain itu etanol juga digunakan untuk campuran minuman dan sebagai bahan bakar (gasohol). Ditambahkan oleh Kultsum (2009) dalam Khamdiyah (2010), mengemukakan etanol digunakan sebagai bahan antiseptik, bahan minuman keras, bahan bakar, dan bahan baku beberapa industri kimia.

2.11.1.3 BHT

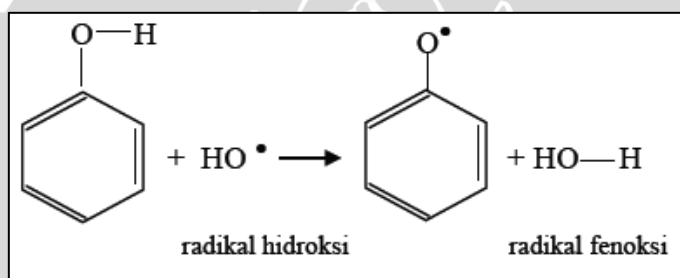
BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) merupakan antioksidan sintetis yang sering digunakan pada produk makanan. Adapun penggunaan BHT di bidang industri pangan harus memenuhi beberapa syarat antara lain tidak berbahaya untuk kesehatan, efektif pada konsentrasi rendah, tidak menimbulkan warna yang tidak diinginkan, larut dalam lemak, mudah didapat dan ekonomis (Winarno, 2004). Ditambahkan oleh Hijaz (2009) yang melaporkan bahwa BHT memiliki rumus kimia $C_{15}H_{24}O$ dengan 1 gugus hidroksil. BHT memiliki berat molekul sebesar 220,36 g/mol dan titik lebur $69-70^{\circ}C$. BHT merupakan antioksidan primer dengan mekanisme pendonoran atom hidrogen sama dengan senyawa fenolat. Struktur kimia BHT dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Struktur Kimia BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) (Hijaz, 2009)

2.11.2 Fenol

Senyawa fenol merupakan senyawa antioksidan dengan gugus hidroksil yang terikat cincin aromatic dan efektif meredam radikal bebas dengan mendonorkan atom hydrogen (proton) dari gugus hidroksil (Tamat, *et al.* 2007). Antioksidan golongan fenol memiliki sifat intensitas warna rendah sampai tidak berwarna, tidak beracun, dan sebagian besar dihasilkan dari alam. Urutan antioksidan golongan fenol berdasarkan tingkat efektivitas penghambatan oksidasi ialah pirogalol > hidrokuinon > katekol > eugenol > timol, α -nafatol, floroglusinol, resorsinol, dan fenol (Dwiandita, 2009). Reaksi pembentukan senyawa radikal fenoksi dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Reaksi Senyawa Fenol
(Hart, *et al.* 2003)

Hart, *et al.* (2003) melaporkan bahwa atom hydrogen pada senyawa fenolik terikat pada radikal peroksida ($\text{ROO}^{\bullet}$) dan radikal hidroksi ($\text{HO}^{\bullet}$) pada suatu reaksi oksidasi dan menghasilkan radikal fenoksi yang lebih stabil. Pengukuran total antioksidan dapat dilakukan dengan pengukuran total fenolik bahan menggunakan pereaksi Folin-ciocalteu sebagai reagen. Analisis total fenol menggunakan kurva standart asam galat yang kemudian hasil absorbansi sampel disubstitusikan ke dalam persamaan kurva asam galat. Satuan kadar total fenol ialah mg GAE/g (Galic Acid Ekuivalent) (Djapiala, *et al.* 2013).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Dalam penelitian Uji Aktivitas Antioksidan β -Karoten pada Rumput Laut Merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* alat-alat yang digunakan antara lain cold box, keranjang plastik, kain bersih, gunting, kipas, cooper (blender), sendok, timbangan digital, botol plastik (1,5 liter), botol timbang, sendok bahan, timbangan analitik, loyang, oven, *crushable tank*, desikator, tumbukan batu, sendok bahan, gelas ukur (ukuran 250 ml dan 100 ml), beaker glass (ukuran 1000 ml 250 ml, 100 ml, dan 50 ml), spatula, erlen meyer (ukuran 500 ml dan 250 ml), corong kaca, labu pemisah (corong pisah), *rotary vacuum evaporator*, *freezer*, statif, kromatografi kolom, *magnetic stirrer*, *hot plate*, tabung gas Nitrogen (N_2), pipet tetes, pipet volume (ukuran 1 ml dan 10 ml), bola hisap, pipa kapiler, penggaris, *cutter*, pensil 2B, pinset, spidol marker, cuvet, botol sampel (ukuran 100 ml dan 15 ml), tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikro pipet (ukuran 0,1 ml), tabung centrifuge, centrifuge, dan spektrofotometer UV-Vis merk pharo 300.

3.1.1 Bahan Penelitian

Dalam penelitian Uji Aktivitas Antioksidan β -Karoten pada Rumput Laut Merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* bahan baku yang digunakan adalah rumput laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* pada kondisi segar yang diperoleh dari perairan Desa Cabiye, Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura. Bahan kimia yang digunakan antara lain $CaCO_3$, aseton PA, methanol PA, dietil eter PA, aquadest pH 7, saturasi garam, gas nitrogen, n-heksan PA, etil asetat PA, *silica gel* F-254 (60 mesh), pasir laut (sea

sand), pelat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil), etanol 95% PA, antioksidan BHT, pereaksi *folin-ciocalteu phenol*, sodium karbonat 20%, asam galat, petroleum eter PA, dan Na_2SO_4 . Bahan-bahan lain yang digunakan kertas koran, garam grosok, kertas saring kasar dan halus, kapas, air, alumunium foil, *cling wrap*, kertas Whatman No. 42, dan kertas label.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

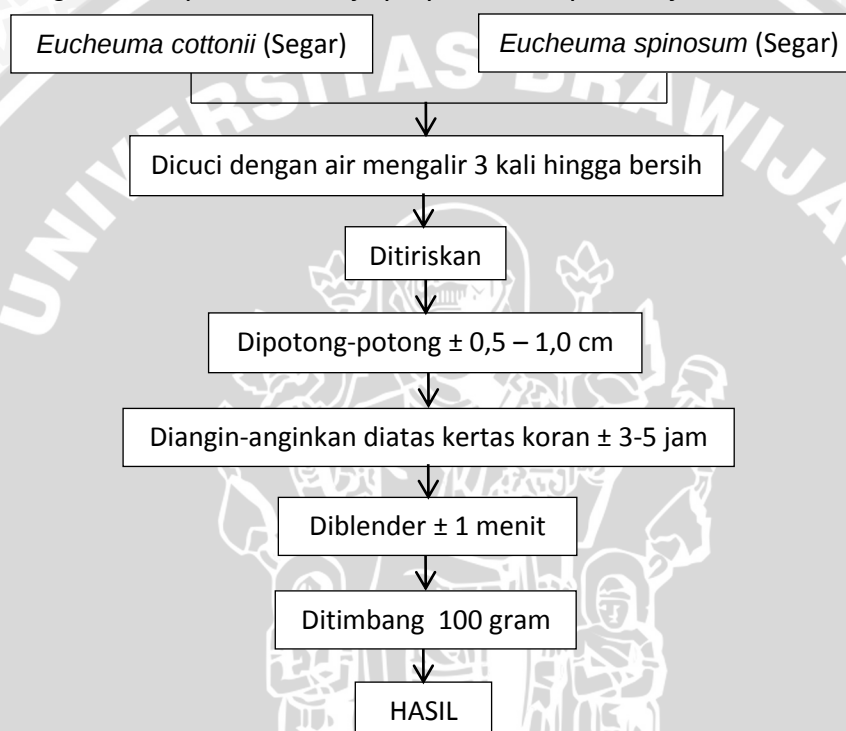
Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksploratif. Ditinjau dari tujuannya, metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh familiaritas dari suatu fenomena batu atau hubungan baru agar dapat merumuskan persoalan lebih tepat dan untuk menemukan hipotesis bila dipandang perlu (Marzuki, 1983). Menurut Singarimbun dan Effendi (1989), metode eksploratif bertujuan untuk mengetahui suatu gejala setelah melalui tahap observasi dan masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama untuk penelitian yang lebih mendalam.

3.3. Persiapan Penelitian

3.3.1 Preparas Sampel

Preparasi bahan baku sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* bertujuan untuk membersihkan sampel, memperluas permukaan, dan mengurangi kadar air. Pembersihan dilakukan dengan mencuci sampel dengan air bersih yang mengalir dan menggosok tiap sela-sela dan thalus sampel sehingga bersih dari kotoran dan pasir laut yang dapat menghambat proses ekstraksi. Perluasan permukaan sampel dengan memotong sampel ukuran 0,5 – 1,0 cm sehingga kandungan air dalam bahan lebih mudah diuapkan.

Selanjutnya dipilih batang thallus dengan kepekatan warna yang tinggi untuk digunakan pada proses ekstraksi. Kemudian sampel diangin-anginkan pada suhu ruang dan ruangan kedap cahaya, untuk mengurangi kadar air sampel, menghindari degradasi pigmen, dan memaksimalkan ekstraksi β -karoten pada sampel. Menurut Kumalaningsih (2006), karakteristik β -karoten yang larut dalam lemak, sensitif terhadap alkali, udara, cahaya, dan suhu tinggi (Kumalaningsih, 2006). Skema kerja preparasi sampel disajikan di Gambar 19.



Gambar 19. Diagram Alir Preparasi Sampel

3.3.2 Analisa Kadar Air

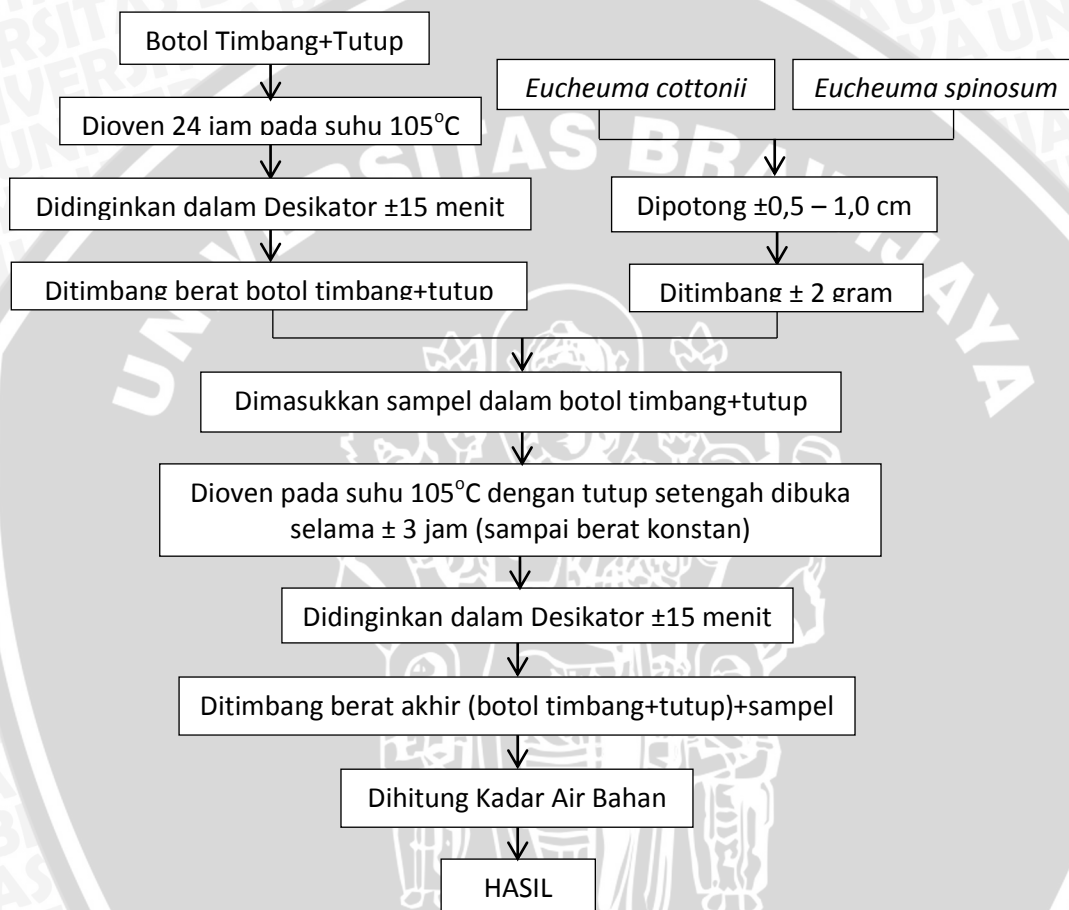
Analisa kadar air dalam sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan menggunakan metode thermografimetri menurut Winarno (2004). Dalam metode ini, analisa kadar air bahan diukur dari penguapan kandungan air dalam bahan melalui pemanasan menggunakan oven pada suhu 105°C hingga sampel mencapai berat konstan yaitu selama ± 3 jam. Analisa kadar air dilakukan berdasarkan reduksi massa atau berat sampel awal

karena penguapan air. Skema kerja dan perhitungan analisa kadar air bahan dapat dilihat pada Gambar 20.

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

Keterangan :

- A = berat botol timbang (g)
- B = berat botol timbang + sampel awal (g)
- C = berat botol timbang + sampel kering (g)

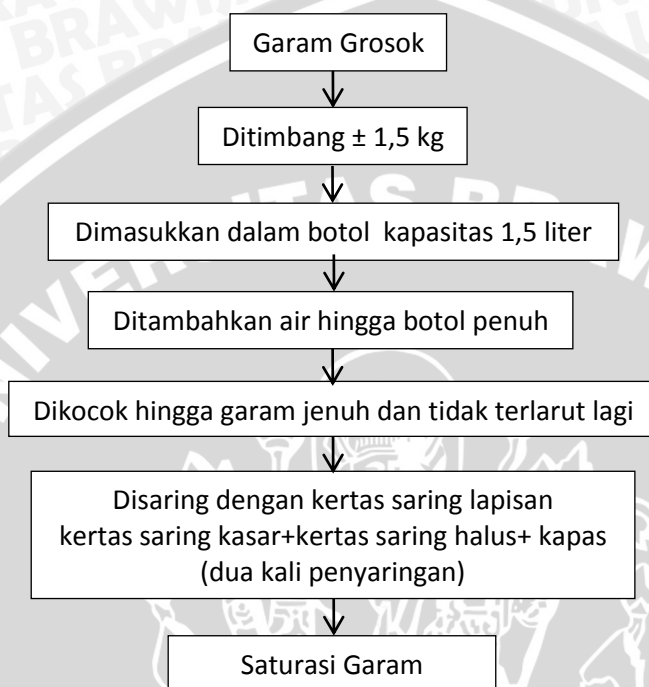


Gambar 20. Diagram Alir Analisa Kadar Air Bahan (Winarno, 2004)

3.3.3 Pembuatan Saturasi Garam

Pembuatan saturasi garam dilakukan dengan menggunakan metode menurut Junet, *et al.* (2009), yaitu dengan menghomogenkan kristal garam (garam dapur) ke dalam air hingga garam jenuh. Kejenuhan larutan garam ditandai dengan sudah tidak larutnya lagi kristal garam dalam larutan garam. Selanjutnya larutan garam disaring (2 kali penyaringan) dengan menggunakan

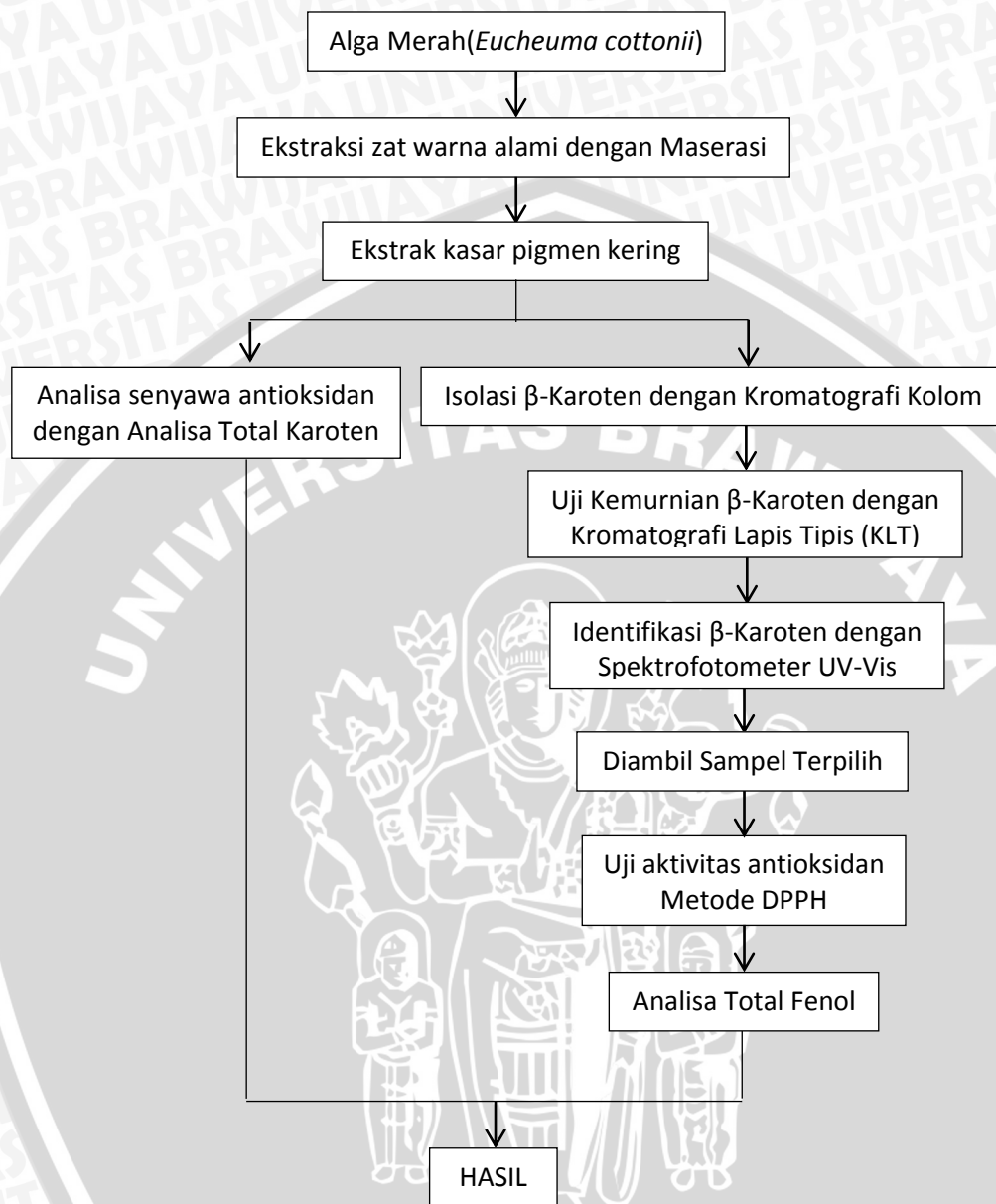
lapisan kertas saring kasar, halus, dan kapas untuk menyaring kotoran pada larutan garam dan menjernihkannya. Bahan saturasi garam nantinya digunakan sebagai dahan saat partisi (fraksinasi) ekstrak saat proses ekstraksi pigmen pada bahan. Langkah pembuatan saturasi garam dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Diagram Alir Pembuatan Saturasi Garam (Costa, et al. 2009)

3.4. Alur Penelitian

Penelitian Uji Aktivitas Antioksidan β -Karoten pada Rumput Laut Merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* secara garis besar terdiri dari dua proses penelitian yaitu ekstraksi, isolasi β -karoten, identifikasi β -karoten, analisa kadar β -karoten, uji aktivitas antioksidan β -karoten, dan identifikasi senyawa antioksidan yang terkandung pada bahan. Keseluruhan alur penelitian uji aktivitas antioksidan β -karoten pada rumput laut merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* disajikan pada Gambar 22.



Gambar 22. Diagram Alir Alur Penelitian

3.5. Penelitian Awal

3.5.1 Ekstraksi Pigmen

Dilakukan perbandingan pada sampel bahan baku berupa sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* yang diekstrak dan diisolasi senyawa β -karoten sebagai bahan utama uji aktivitas antioksidan untuk penelitian. Proses ekstraksi senyawa pigmen dari sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* mengacu pada metode ekstraksi da Costa, *et al.* (2009) yang dimodifikasi pada beberapa prosesnya untuk memaksimalkan proses ekstraksi. Setelah proses preparasi sampel selesai dilakukan, dilanjutkan proses ekstraksi senyawa pigmen sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum*.

Proses ekstraksi dilakukan penimbangan sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* sebanyak 100 g dan ditambahkan CaCO_3 sebagai agen penetral saat ekstraksi. Selanjutnya dilakukan penumbukan sampel dengan tumbukan batu untuk memperluas permukaan bahan dan memaksimalkan poses ekstraksi. Hal ini dikarenakan menurut Winarno, *et al.* (1980) yang menyatakan bahwa jika sel mengalami pukulan mekanik akan mengalami pemecahan sel sehingga senyawa pigmen akan keluar. Selain itu ditambahkan oleh Rahayu (2009) dalam Romiyanto (2014) yang menyatakan bahwa semakin kecil ukuran maka luas permukaan akan semakin besar dan laju perpindahan senyawa dari sel ke pelarut akan semakin tinggi, hal ini dikarenakan jarak difusi zat terlarut semakin kecil.

Proses maserasi sampel dengan penambahan pelarut metanol P A dan aseton P A (7:3 v/v) sebanyak 400 ml dan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang dan kondisi kedap cahaya. Menurut Liqun, *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa pelarut dengan kemampuan terbaik dalam mengekstrak senyawa pigmen karotenoid ialah pelarut metanol dan aseton nilai ekstraksi sebesar 0,570 mg/10

g untuk metanol dan 0,532 mg/10 g untuk aseton. Ditambahkan oleh Vargas, *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa jenis pelarut terbaik yang digunakan untuk proses ekstraksi senyawa karotenoid ialah senyawa polar seperti metanol, aseton, dan etanol. Karena saat proses ekstraksi karotenoid terjadi proses perpindahan karotenoid hidrofobik dari media hidrofilik, sehingga jenis pelarut yang dianjurkan ialah pelarut polar dengan kemurnian tinggi.

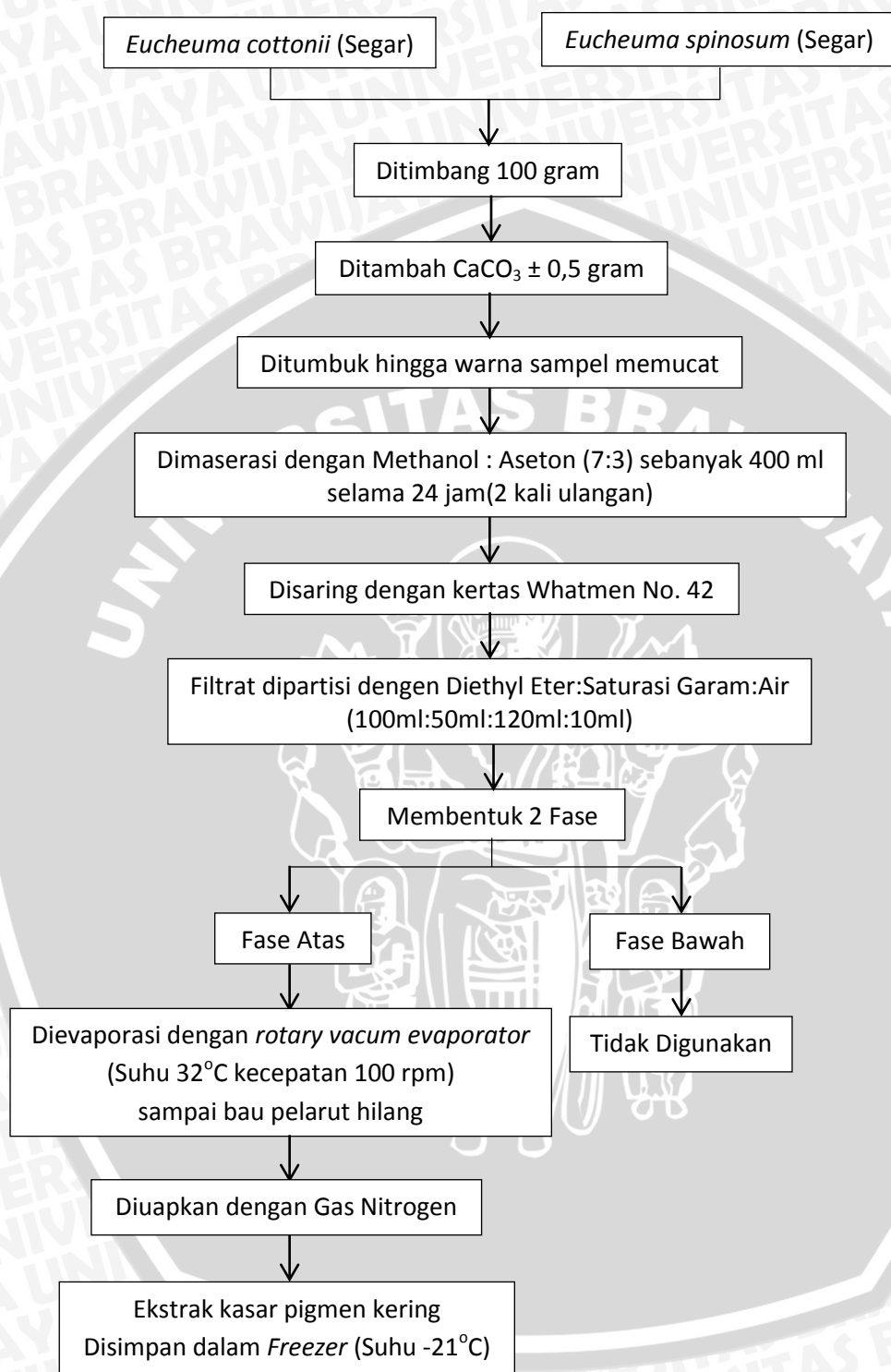
Langkah selanjutnya ialah penyaringan menggunakan kertas Whatman No. 42 untuk memisahkan antara filtrat dan residu sampel. Kemudian filtrat dipartisi (difraksinasi) dengan penambahan Dietil eter, saturasi garam dan air dalam perbandingan (100 ml : 50 ml : 120 ml : 10 ml) untuk memisahkan komponen pigmen dari komponen lain dengan pembentukan dua fraksi/fase. Selanjutnya fase bawah tidak digunakan atau dibuangkan, sedangkan fase atas di proses evaporasi yang bertujuan untuk menguapkan sebagian besar pelarut sehingga didapatkan ekstrak kasar pigmen berupa pasta dengan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* pada suhu 32°C dan kecepatan 100 rpm.

Kemudian ekstrak kasar pigmen diuapkan kembali menggunakan gas Nitrogen (N₂) untuk memaksimalkan penguapan pelarut dan didapatkan ekstrak kasar pigmen kering, selanjutnya dilakukan analisa nilai rendemen. Ekstrak kasar pigmen kering dapat disimpan pada *freezer* dengan suhu -21°C untuk menghindari degradasi senyawa pigmen. Diagram alir proses ekstraksi pigmen sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Gambar 23. Menurut Nuraini (2007), setelah didapatkan ekstrak murni dari sampel. Kemudian ekstrak murni ditimbang dan dihitung rendemennya dengan

$$\text{rumus: } \% \text{ Rendemen} = \frac{W}{W_0 \times (1 - \text{Kadar Air})} \times 100 \%,$$

Dengan : W = bobot ekstrak murni (g)

W₀ = bobot bahan yang diekstrak (g)



Gambar 23. Diagram Alir Proses Ekstraksi Pigmen
(Modifikasi metode da Costa, et al. 2009)

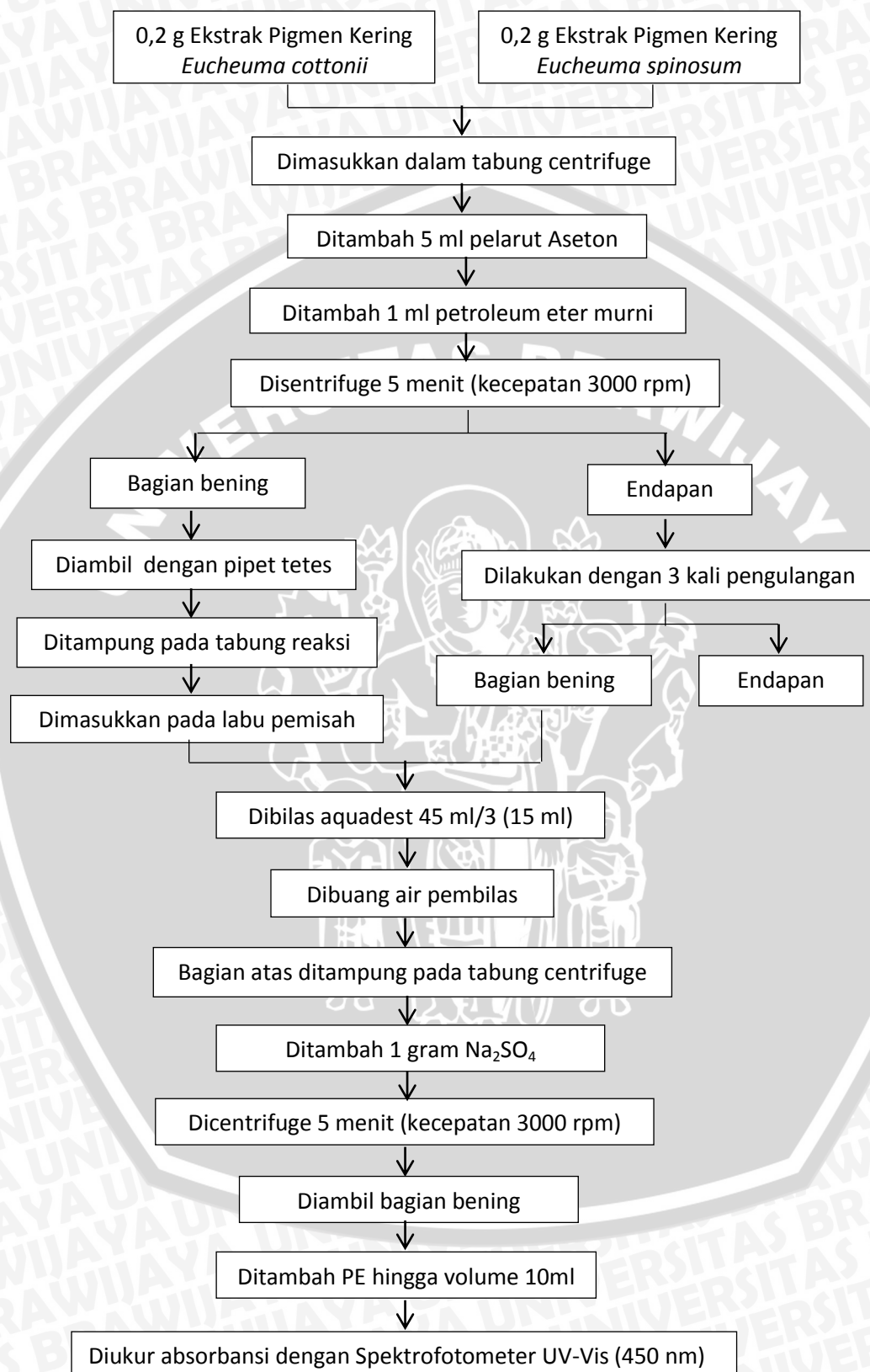
3.5.2 Analisa Total Karotenoid

Analisa total Karotenoid yang terkandung dalam ekstrak pigmen kering *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dilakukan menurut metode analisa total karotenoid menurut Julyasih, *et al.* (2009). Menurut Riawan (2013) yang menyatakan bahwa karotenoid merupakan senyawa isoprenoid dan tetraprenoid yang disintesis dalam tumbuhan dan tersusun atas likopen, α -karoten, β -karoten, lutein, zeaxantin, dan cryptoxantin.

Langkah awal analisa total karotenoid ialah menimbang sampel ekstrak pigmen kering *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* sebanyak 0,2 g. Kemudian sampel dimasukkan dalam tabung centrifuge dan ditambahkan pelarut aseton PA sebanyak 5 ml serta 1 ml petroleum eter PA. Lalu sampel disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Bagian bening ditampung pada tabung reaksi, dan bagian endapan ditambahkan pelarut aseton PA sebanyak 5 ml serta 1 ml petroleum eter PA dan disentrifuge selama 5 menit kecepatan 3000 rpm, bagian bening ditampung di tabung reaksi yang sama (3 kali).

Selanjutnya bagian bening dimasukkan ke dalam labu pemisah dan dibilas aquadest pH 7 15 ml (3 kali). Bagian atas ditampung pada tabung centrifuge dan bagian air bilasan yang berada dibagian bawah dibuang. Lalu ditambahkan Na_2SO_4 sebanyak 1 gram untuk mengikat air yang terkandung pada sampel. Kemudian sampel disentrifuge 5 menit pada kecepatan 3000 rpm. Kemudian bagian bening diambil dan ditambahkan petroleum eter hingga volume 10 ml. Setelah itu sampel diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 450 nm dengan pelarut petroleum eter murni sebagai blanko. Proses analisa total karotenoid dapat dilihat pada Gambar 24. Hasil absorbansi selanjutnya dihitung kadar total karoten dengan rumus perhitungan kadar total karotenoid menurut Julyasih, *et al.* (2009) ialah :

$$\text{Kadar total karoten} = \frac{\text{total Volume} \times \text{absorbansi}}{0,2 \times \text{berat sampel}} \times 100 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$



Gambar 24. Diagram Alir Analisa Total Karotenoid
(Julyasih, et al. 2009)

3.6. Penelitian Utama

3.6.1 Isolasi Senyawa β -Karoten

Isolasi senyawa β -karoten yang terkandung dalam rumput laut merah sampel terpilih dari penelitian dilakukan dengan kromatografo kolom berdasarkan modifikasi metode isolasi pigmen menurut Pangestuti, *et al.* (2007). Kromatografo kolom yang digunakan berukuran panjang = 53 cm dan diameter = 2 cm. Menurut Sudarmadji, *et al.* (2007), kromatografi dapat digunakan untuk isolasi komponen warna dan pemisahan senyawa tidak berwarna. Bahan yang digunakan dalam kromatografi kolom ialah silika gel-60 sebagai fase diam serta pelarut n-heksan dan etil asetat sebagai fase geraknya.

Markham (1988) menyatakan bahwa bahan terbaik untuk pemisahan senyawa yang kurang polar ialah silika gel jenis Kisel gel 60, 70-230 mesh (Merck). Menurut Lestari (2011), untuk mengelusi senyawa dengan absorbansi tinggi digunakan pelarut polar dan untuk senyawa absorbansi rendah digunakan pelarut non polar. Kekuatan elusi fase gerak ialah aquadest > metanol > etanol > propanol > aseton > etil asetat > kloroform > metil klorida > benzena > toluen > trikloroetilena > sikloheksana > heksan.

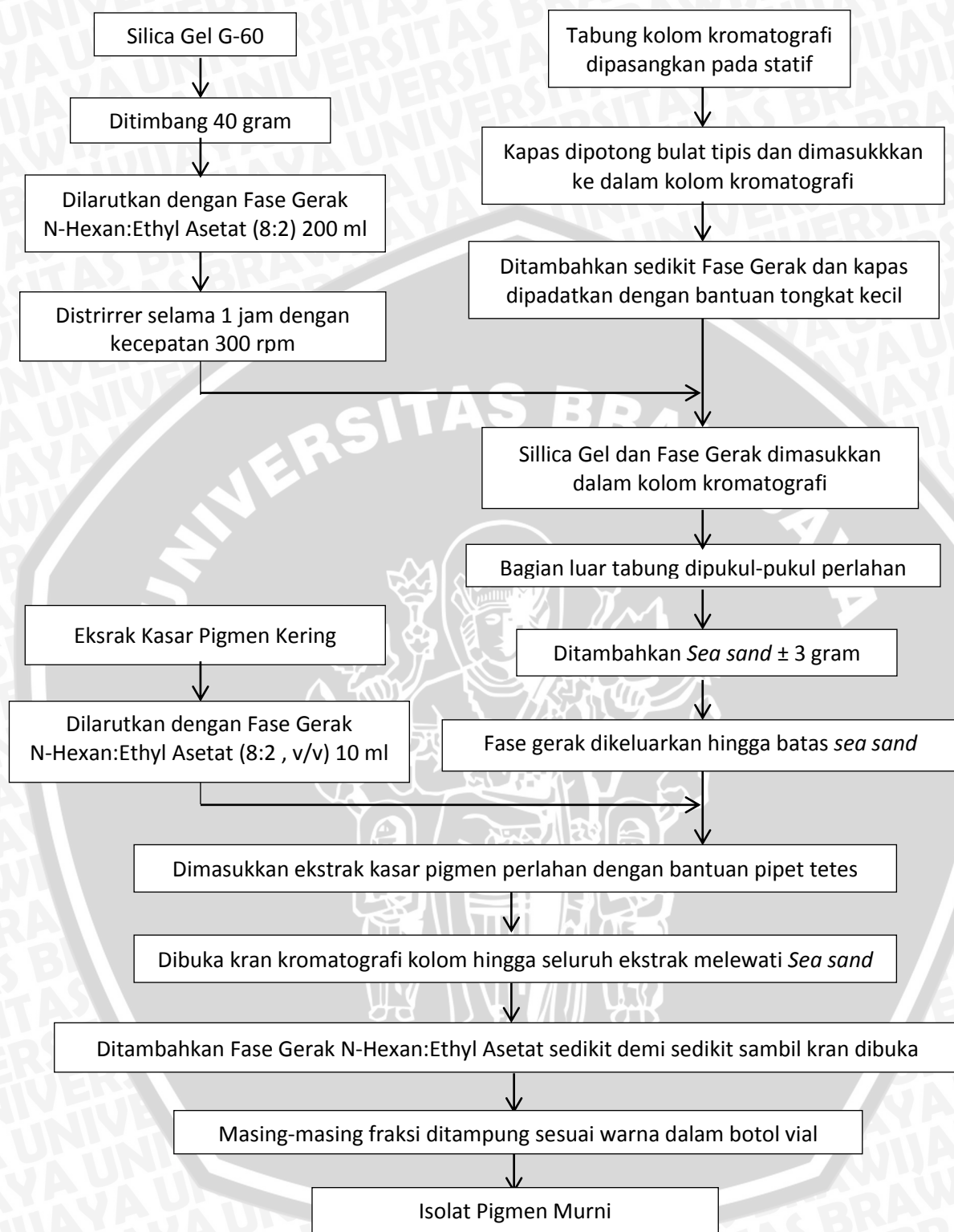
Langkah awal proses isolasi β -karoten ialah preparasi kolom berdasarkan cara Markham (1988) yaitu dengan memasukkan kapas pada ujung kolom kromatografi, kemudian kemasan kolom (fase diam) yaitu silika gel-60 mesh ± 40 gram, dan pengelusi (fase gerak) berupa pelarut n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (8 : 2 v/v). Saat memasukkan segumbal kapas pada leher kolom, kapas harus direndam dengan fase gerak ± 10 cm. Selanjutnya silika gel-60 dibuat bubur dahulu dengan menghomogenkan 40 gram silika gel-60 ke dalam 200 ml fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v) menggunakan *Magnetic Stirrer* dan di *Stirrer* selama ± 1 jam. Setelah itu bubur silika gel-60 dimasukkan

ke dalam kolom kromatografi secara hati-hati dan terus menerus (tidak terputus-putus) untuk mencegah terbentunya lapisan.

Selanjutnya kolom kromatografi diketuk-ketuk pelahan untuk meratakan posisi silika gel dan didiamkan ± 12 jam agar mengeras dengan ditutup pada bagian ujung dan pangkal kromatografi untuk menghindari penguapan pelarut. Setelah silika gel mengeras, selanjutnya dimasukkan *sea sand* (pasir laut halus) ± 3 gram yang berfungsi sebagai penyaring partikel berukuran besar dalam senyawa yang akan diisolasi agar tidak ikut masuk pada fase diam dan menghalangi fase gerak.

Proses isolasi dimulai dengan melarutkan ekstrak kasar pigmen kering $\pm 0,3-0,4$ gram ke dalam ± 10 ml fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v). Selanjutnya seluruh fase gerak dikeluarkan terlebih dari kolom kromatografi hingga batas *sea sand*. Kemudian larutan ekstrak pigmen dimasukkan secara perlahan-lahan dengan menggunakan pipet tetes. Lalu kran kolom kromatografi di buka dan ditunggu hingga seluruh larutan ekstra pigmen melewati *sea sand* dan masuk ke dalam fase diam silika gel-60. Setelah itu ditambahkan fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v) perlahan-lahan hingga seluruh tabung terisi penuh. Selanjutnya kran dibuka dan seluruh fraksi warna yang muncul di tampung ke dalam botol sampel (botol vial) yang telah di bungkus dengan alumunium voil untuk melindungi isolat dari degradasi karena pengaruh cahaya.

Fase gerak yang digunakan terus ditingkatkan kepolarannya dengan rata-rata volume 200-300 ml yaitu dari perbandingan n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v), n-heksan dan etil asetat (7:3 v/v), n-heksan dan etil asetat (6:4 v/v), hingga perbandingan n-heksan dan etil asetat (5:5 v/v). Seluruh fraksi warna yang tertampung diberi tanda penomoran dengan keterangan warna dan waktu penampungan. Cara kerja proses isolasi β -karoten ekstrak pigmen rumput laut merah dapat dilihat pada Gambar 25.



Gambar 25. Diagram Alir Isolasi β -Karoten
(Modifikasi Metode Pangestuti, et al. 2007)

3.6.2 Identifikasi Senyawa β -Karoten

3.6.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi kemurnian isolat β -karoten rumput laut merah dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) berdasarkan metode yang digunakan oleh Pangestuti, *et al.* (2007). Jenis pelat KLT yang digunakan ialah Silika gel F₂₅₄ (F adalah florescene dan 254 adalah panjang gelombang 254 nm) dan fase gerak yang digunakan ialah pelarut n-heksan dan aseton (7:3 v/v). Menurut Markham (1988) melaporkan bahwa pelat KLT memiliki fungsi antara lain untuk analisa fraksi senyawa hasil kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni dalam skala kecil.

Langkah awal ialah mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, kemudian pembuatan fase gerak dengan menghomogenkan 7 ml n-heksan dan 3 ml aseton. Selanjutnya pelat KLT yang akan digunakan dipotong-potong menjadi beberapa bagian dengan ukuran 5 cm. Kemudian pada tiap potongan KLT diberi tanda garis pada bagian bawah berjaran 1,0 cm dan pada bagian atas berjarak 0,5 cm sehingga terbentuk jarak tempuh senyawa sepanjang 3,5 cm.

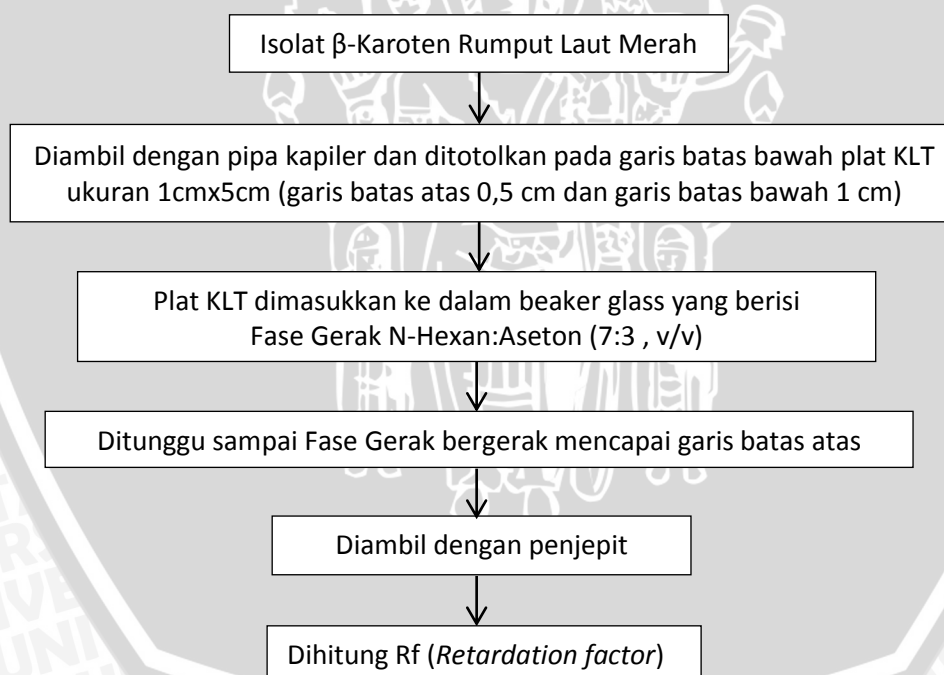
Dalam identifikasi kemurnian senyawa β -karoten rumput laut merah dilakukan dengan mengambil 5-10 μ l isolat β -karoten rumput laut merah dengan menggunakan pipa kapiler, lalu ditotolkan pada batas bawah pelat KLT dan ditiup sebentar agar terserap pada silika gel. Selanjutnya pelat KLT dimasukkan ke dalam beaker glass 50 ml yang berisi fase gerak dan ditutup dengan menggunakan plastik *clink wrap* untuk menghindari penguapan pelarut dan memaksimalkan proses kapilaritas dari fase gerak ke fase diam.

Proses kapilaritas ditunggu hingga fase gerak mencapai batas atas pelat KLT, lalu pelat KLT diambil dengan menggunakan pinset. Kemurnian isolat diidentifikasi dari warna yang terbentuk di sepanjang jarak tempuh senyawa dan

dilihat dari nilai R_f yang dihasilkan. Kemurnian isolat β -karoten rumput laut merah diidentifikasi bila warna yang terbentuk hanya satu warna yaitu warna kuning dengan nilai R_f 0,8 – 1,0.

Uji kemurnian sampel isolat β -karoten di tandai dengan terbentuknya satu pola warna pada pelat KLT, sedangkan identifikasi senyawa β -karoten ditandai dari jarak tempuh sampel warna pada pelat KLT yaitu dengan nilai R_f 0,8-1,0. Ditambahkan oleh Hijaz (2009) yang menyatakan bahwa bilangan R_f ialah jarak tempuh suatu senyawa yang dibagi dengan jarak yang ditempuh dari garis awal hingga batas atas pelat KLT, sehingga bilangan R_f selalu kurang dari 1,0. Cara kerja identifikasi pigmen β -karoten dapat dilihat pada Gambar 26.

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$



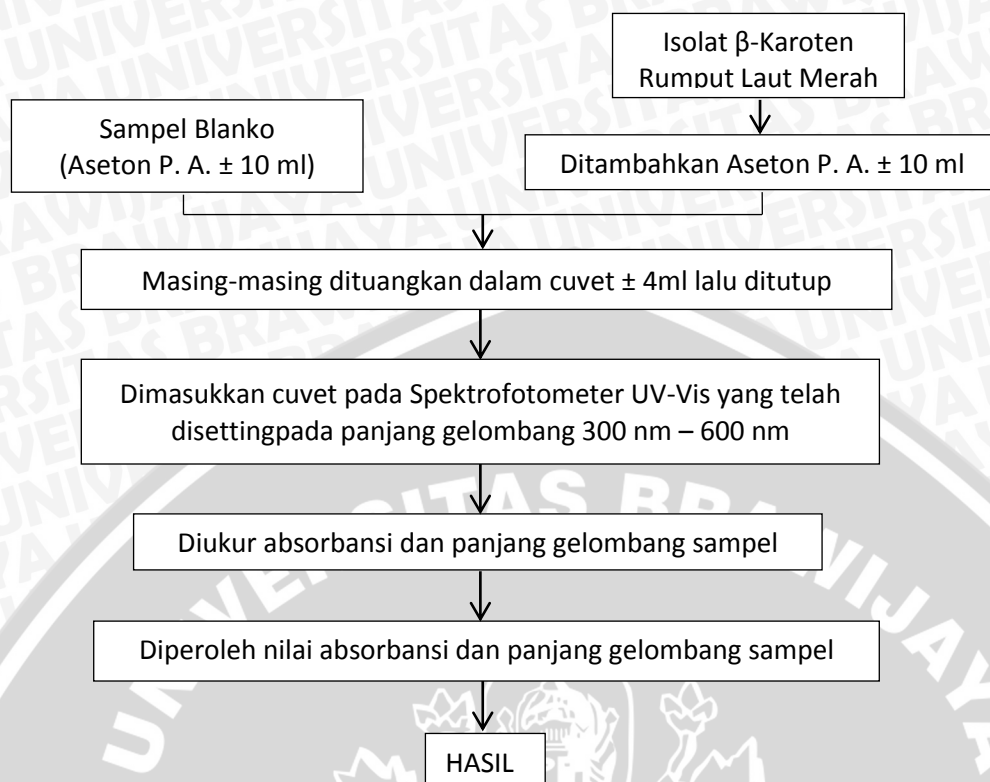
Gambar 26. Diagram Alir Identifikasi β -Karoten Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti, et al. 2009)

3.6.2.2 Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi isolat β -karoten rumput laut merah salah satunya dilakukan dengan Spektrofotometer UV-Vis berdasarkan metode Pangsetuti, *et al.* (2007). Menurut Sudarmadji, *et al.* (2007), dasar analisa kimia spektroskopi ialah absorbansi, dimana absorbansi setiap zat kimia bersifat spesifik dan berbanding lurus dengan banyaknya zat kimia yang terkandung. Ditambahkan oleh Hijaz (2009) yang menyatakan bahwa spektrofotometri yang digunakan dalam eksperimen adalah pada range panjang gelombang untraviolet dan sinar tampak (UV-Vis) dengan transisi pada daerah spektrum (200-700 nm).

Dalam identifikasi β -karoten rumput laut merah digunakan sampel yang diyakini sebagai sampel murni β -karoten berdasarkan hasil uji KLT dengan Rf 0,8-1,0. Lalu sampel dilarutkan dalam pelarut aseton PA sebanyak 10 ml. Sebelum pengukuran absorbansi sampel, terlebih dahulu dilakukan pengukuran pelarut aseton PA sebagai indikator blanko agar serapan absorbansi sampel yang akan diukur tidak bercampur dengan serapan absorbansi pelarut.

Setelah pengukuran sampel blanko, selanjutnya dilakukan pengukuran larutan sampel isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dengan memasukkan sampel ke dalam cuvet sebanyak ± 4 ml dengan menggunakan pipet tetes lalu ditutup. Kemudian cuvet dimasukkan ke dalam Spektrofotometer UV-Vis dan diukur nilai absorbansi dengan panjang gelombang 300 – 600 nm. Menurut Pangsetuti, *et al.* (2007), panjang gelombang yang digunakan dalam identifikasi senyawa karotenoid ialah pada rentang 300 – 600 nm. Selanjutnya hasil dari grafik spektrofotometer UV-Vis dibandingkan dengan literatur penelitian sebelumnya dengan kesamaan metode dan jenis senyawa yang diidentifikasi yaitu senyawa β -karoten. Cara kerja identifikasi β -karoten dengan Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 27.



Gambar 27. Diagram Alir Uji Spektrofotometer UV-Vis Isolat β-Karoten (Pangestuti, *et al.* 2007)

Setelah didapatkan hasil absorbansi isolat β-karoten *Eucheuma cottonii* selanjutnya dilakukan analisa kadar β-karoten *Eucheuma cottonii* menggunakan hukum *Lambert-Beer*. Menurut Sudarman (2012), hukum *Lambert-Beer* memiliki ketentuan larutan harus jernih (bebas dari koloid) dan encer, alat tidak boleh terdisosiasi, berasosiasi, atau bereaksi dengan pelarut, dan radiasi cahaya harus monokromatis, adapun rumus perhitungan berdasarkan hukum *Lambert-Beer* ialah:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan:

A = Absorbansi

ϵ = Absorptivitas Molar (*Molar extinction coefficient*)

b = Tebal Tempat Komponen

c = Konsentrasi Komponen

3.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan β -karoten rumput laut merah dilakukan dengan menggunakan metode DPPH berdasarkan metode uji antiradikal DPPH menurut Hijaz (2007). Menurut Hertiani, *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa dasar pengukuran uji aktivitas antioksidan metode DPPH ialah dari kemampuan senyawa antioksidan dalam menangkap radikal bebas DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil) yang ditandai dengan indikator perubahan warna DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil) dari ungu menjadi kuning (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazin).

Proses uji aktivitas antioksidan β -karoten rumput laut merah diawali dengan penimbangan sampel stok isolat β -karoten rumput laut merah sebagai sampel stok atau indukan utama. Kemudian sampel isolat β -karoten rumput laut merah dilarutkan ke dalam 100 ml Etanol 95%. Setelah itu, dari larutan stok dibuat larutan antioksidan pada beberapa konsentrasi dosis yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm dengan cara pengenceran dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah.

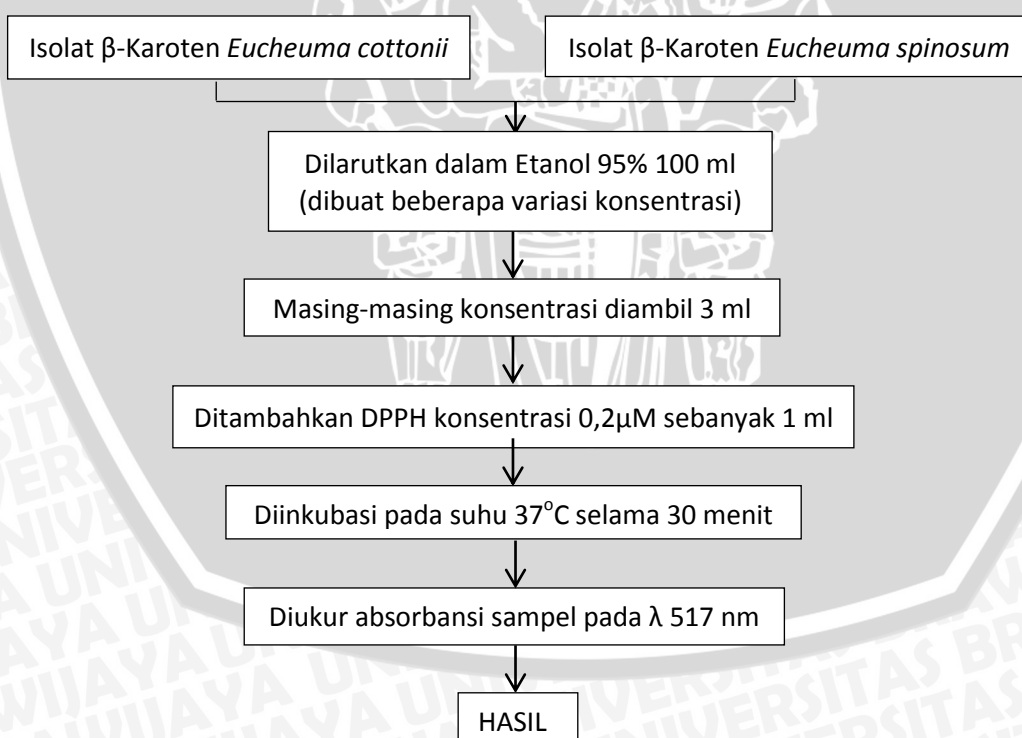
Selanjutnya pembuatan larutan DPPH konsentrasi 0,2 μ M dengan melarutkan DPPH murni 8 mg (0,008 g) ke dalam 100 ml Etanol 95%. Selain itu juga dibuat kontrol negatif ialah 100 ml pelarut Etanol 95% tanpa penambahan antioksidan (0 ppm) dan kontrol positif yaitu antioksidan BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) dengan konsentrasi dosis 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm yang dilarutkan dalam 100 ml Etanol 95%.

Selanjutnya sampel pada masing-masing konsentrasi diambil 3 ml dengan pipet volum yang berbeda dan dimasukkan pada botol sampel yang telah ditutup aluminium foil dan telah diberi tanda. Kemudian ditambahkan larutan DPPH konsentrasi 0,2 μ M sebanyak 1 ml pada masing-masing sampel. Setelah itu campuran sampel antioksidan dan DPPH dikocok perlahan dan diinkubasi

pada inkubator pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 517 nm.

Selanjutnya dari hasil absorbansi dilakukan perhitungan aktivitas antioksidan dan perhitungan nilai IC_{50} berdasarkan grafik aktivitas antioksidan. Menurut Merdekawati, et al. (2009), Nilai IC_{50} (*Inhibition Concentraze₅₀*) merupakan parameter untuk mengetahui konsentrasi antioksidan yang efektif dalam menghambat aktivitas radikal bebas hingga sejumlah 50%, dengan ketentuan semakin kecil nilai konsentrasi IC_{50} maka saktivitas antioksidan sampel uji akan semakin besar atau berbanding terbalik. Adapun proses uji aktivitas antioksidan metode DPPH dapat dilihat pada Gambar 28. Menurut Hijaz (2007), perhitungan aktivitas antioksidan berdasarkan rumus berikut ini :

$$\% \text{ Aktivitas antiradikal} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$



Gambar 28. Diagram Alir Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (Hijaz, 2007)

3.6.4 Analisa Total Fenol

Analisa kandungan total fenol pada isolat β -karoten rumput laut merah dilakukan dengan mengacu pada metode analisa total fenol menurut Julyasih, *et al.* (2009). Menurut Tamat, *et al.* (2007), senyawa fenol merupakan senyawa antioksidan peredam radikal bebas dengan mendonorkan atom hydrogen (proton) dari gugus hidroksil yang terikat cicin aromatic.

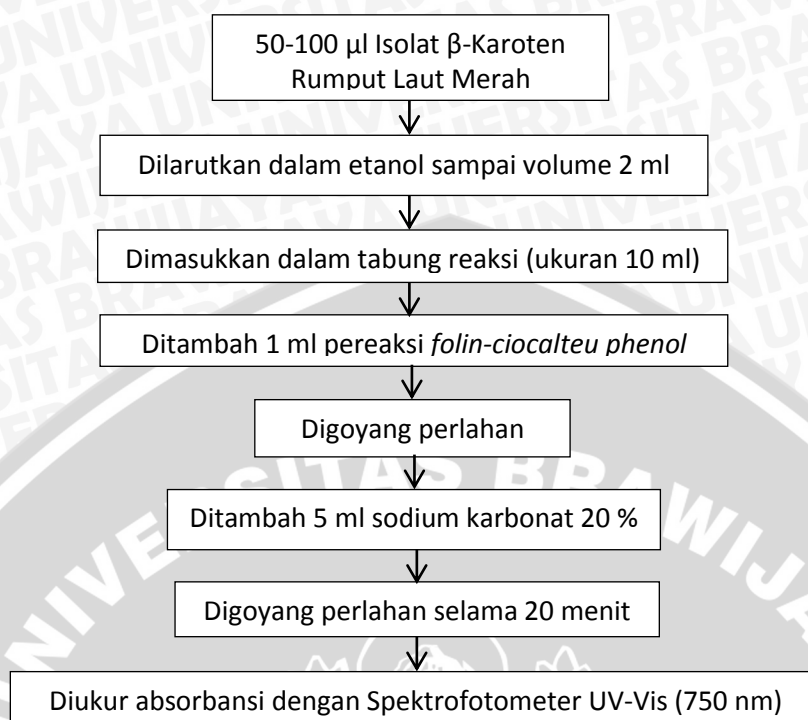
Analisa total fenol sampel yang digunakan ialah isolat murni β -karoten rumput laut merah sebanyak 50-100 μ l yang diambil menggunakan mikro pipet lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan pelarut Etanol 95% hingga volume mencapai 2 ml. Kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi *folin-ciocalteu phenol*. Lalu digoyangkan perlahan agar sampel dan pereaksi *folin-ciocalteu phenol* saling bereaksi. Selanjutnya ditambahkan 5 ml sodium karbonat 20%, lalu sampel digoyang-goyang perlahan selama 20 menit agar bereaksi. Kemudian sampel diukur nilai absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm.

Selanjutnya hasil absorbansi yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan garis pada kurva standart asam galat yang berperan sebagai senyawa standart total fenol. Hasil perhitungan yang dihasilkan dinyatakan dengan satuan mg GAE/g (Galic Acid Ekuivalent). Proses analisa total fenol β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* disajikan di Gambar 29. Berikut ini rumus perhitungan kadar total fenol menurut Samin, *et al.* (2013) ialah:

$$\text{Kadar total fenol} = \frac{C \times V \times fp}{g}$$

Keterangan :

- C = Konsentrasi fenolik (nilai x)
- V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)
- fp = Faktor pengenceran
- g = Berat sampel yang digunakan (g)



Gambar 29. Diagram Alir Analisa Total Fenol β -Karoten
(Julyasih, et al. 2009)

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengamatan

Hasil penelitian dari Uji Aktivitas Antioksidan β -Karoten pada Rumput Laut Merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* meliputi nilai kadar air, nilai rendemen ekstrak, nilai total karotenoid ekstrak, hasil isolasi β -karoten kromatografi kolom, identifikasi β -karoten Kromatografi Lapis Tipis, identifikasi β -karoten Spektrofotometer UV-Vis, nilai kadar β -karoten, uji aktivitas antioksidan β -karoten metode DPPH, nilai IC_{50} , dan analisa total fenol β -karoten, dapat dilihat di Tabel 13.

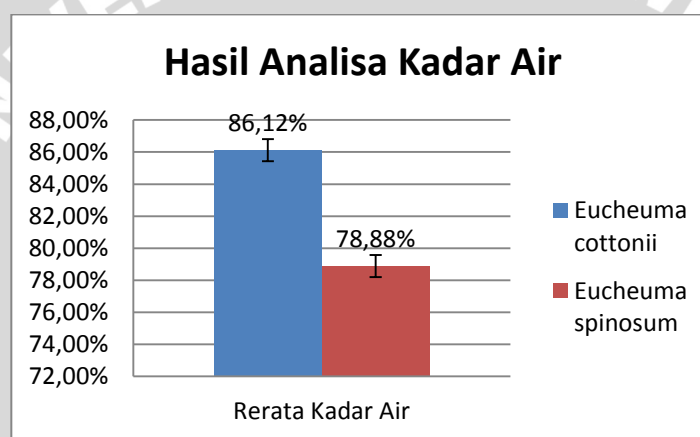
Tabel 13. Data Hasil Isolasi, Identifikasi, dan Uji Antioksidan β -Karoten

Uji Identifikasi	Hasil		Literatur
	<i>E. cottonii</i>	<i>E. spinosum</i>	
Kadar Air	86,12% $\pm$ 0,006875	78,88% $\pm$ 0,008092	Ulfah (2009), kadar air rumput laut segar mencapai 80-90%.
Rendemen Ekstrak	2,0022% $\pm$ 0,07881	1,0044% $\pm$ 0,11248	Julyasih, <i>et al.</i> (2009) total karotenoid <i>Eucheuma</i> sp. ialah 1.989,93 μ g/100g
Analisa Total Karotenoid	9.724,48 μ g/100g $\pm$ 364,2803	3.954,92 μ g/100g $\pm$ 508,1647	Merdekawati, <i>et al.</i> (2009), pita warna β -karoten pada rumput laut ialah warna kuning dan nilai Rf β -karoten ialah 0,8-1,0.
Isolasi β -karoten	2 botol sampel isolat β -karoten berwarna kuning	3 botol sampel isolat β -karoten berwarna kuning	Limantara dan Heriyanto (2010) melaporkan bahwa absorbansi maxima β -karoten ialah 452 nm, dan 478 nm.
Kromatografi Kolom	Nilai Rf = 0,9	Nilai Rf = 0,94	Menurut Romiyanto (2014), kadar β -karoten <i>E. spinosum</i> ialah 0,0019% $\pm$ 0,00001061.
Identifikasi β -karoten KLT	Nilai absorbansi tertinggi dipanjang gelombang 452 nm dan 477 nm	Nilai absorbansi tertinggi dipanjang gelombang 451 nm dan 473,20 nm	Merdekawati, <i>et al.</i> (2009), aktivitas antioksidan β -karoten <i>Sargassum</i> sp. dan β -karoten marker dengan nilai IC_{50} ialah 351,64 $\pm$ 0,05 ppm dan 356,89 $\pm$ 10,68 ppm
Identifikasi β -karoten Spektrofotometer UV-Vis	0,004745% $\pm$ 0,0003482	0,002531% $\pm$ 0,0003374	Julyasih, <i>et al.</i> (2009) total fenol <i>Eucheuma</i> sp. ialah 1,50 mg GAE/g
Kadar β -karoten	Rerata aktivitas tertinggi pada dosis 50 ppm yaitu 11,0463 %	Rerata aktivitas tertinggi pada dosis 50 ppm yaitu 8,5861 %	
Uji Aktivitas Antioksidan	Rerata IC_{50} ialah 237,87 ppm $\pm$ 23,5735	Rerata IC_{50} ialah 289,70 ppm $\pm$ 19,1767	
Nilai IC_{50}	1,73 mg GAE/g $\pm$ 0,1410	1,23 mg GAE/g $\pm$ 0,1757	
Analisa Total Fenol			

4.2 Pembahasan

4.2.1 Analisa Kadar Air

Analisa kadar air sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan metode thermografimetri menurut Winarno (2004). Identifikasi kadar air didapatkan dari reduksi massa atau berat awal sampel karena penguapan air akibat pemanasan dalam oven. Selanjutnya data reduksi massa disubstitusikan ke dalam rumus perhitungan kadar air, data hasil dan perhitungan kadar air sampel dapat dilihat pada Lampiran 2. Hasil analisa kadar air dapat dilihat di Gambar 30.



Gambar 30. Hasil Analisa Kadar Air

Dari data analisa kadar air yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa kadar air yang terkandung dalam *Eucheuma cottonii* lebih tinggi yaitu berkisar $86,12\% \pm 0,006875$ dan kandungan kadar air pada *Eucheuma spinosum* lebih rendah yaitu berkisar $78,88\% \pm 0,008092$. Menurut Ulfah (2009), kadar air *Eucheuma* sp. segar mencapai 80–90% . Lebih rendahnya kandungan air pada *Eucheuma spinosum* kemungkinan dipengaruhi kandungan gugus sulfat pada iota karagenan *Eucheuma spinosum* yang lebih tinggi (28-35%) dari pada kappa karagenan *Eucheuma cottonii* (25-30%). *Eucheuma spinosum* memiliki kandungan air bebas lebih rendah dari *Eucheuma cottonii*. Hal ini dikarenakan Iota karagenan mudah mengikat air karena adanya gugus sulfat pada rantai molekulnya yang bersifat hidrofilik dan reversible.

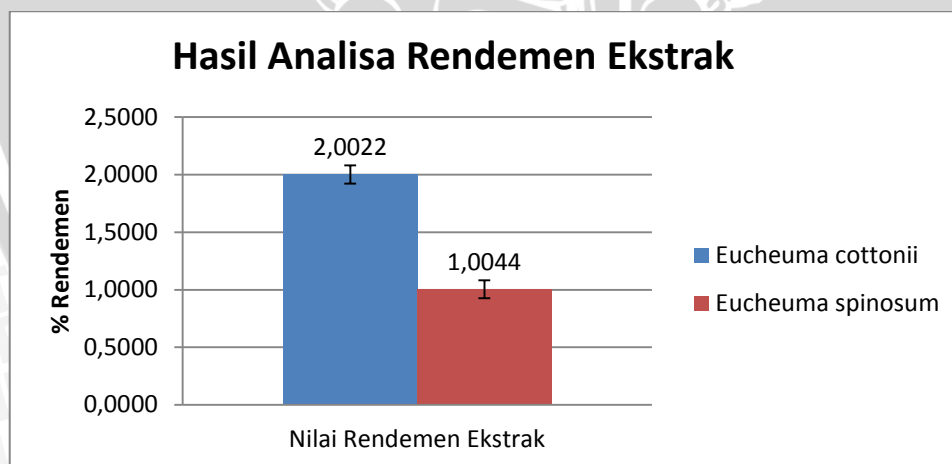
4.2.2 Hasil Rendemen Ekstrak

Hasil proses ekstraksi pigmen dari sampel segar *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dengan metode ekstraksi menurut da Costa, et al. (2009) yang dimodifikasi pada beberapa tahapannya didapatkan hasil berupa ekstrak kasar pigmen kering dengan warna hijau tua pekat. Hasil ekstrak *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* kemudian dianalisa nilai rendemennya dengan menggunakan rumus perhitungan rendemen menurut Widyastuti (2010), yang menyatakan bahwa setelah proses ekstraksi kemudian ekstrak murni ditimbang dan dihitung rendemennya. Hasil analisa rendemen ekstrak kering *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Gambar 31. Data hasil dan perhitungan % rendemen dapat dilihat pada Lampiran 3. Rumus % rendemen ialah:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{W}{W_0 \times (1 - \text{Kadar Air})} \times 100 \%,$$

Dengan : W = bobot ekstrak murni (g)

W₀ = bobot bahan yang diekstrak (g)



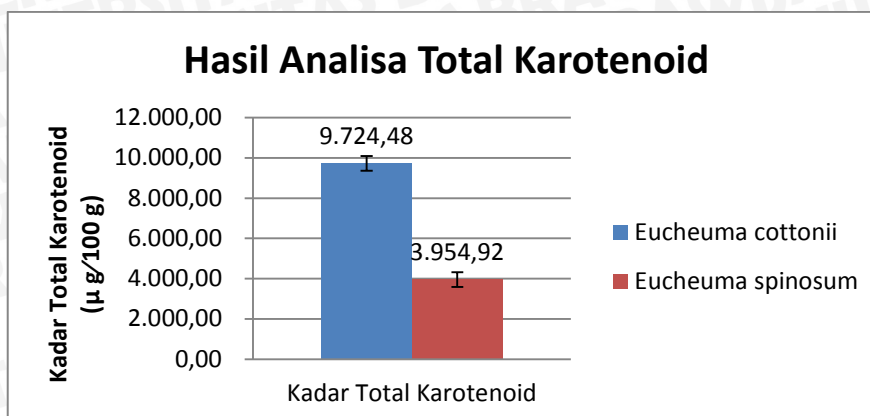
Gambar 31. Hasil Analisa Rendemen Ekstrak

Dari data hasil perhitungan rendemen ekstrak kering *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* didapatkan bahwa hasil rendemen ekstrak *Eucheuma cottonii* lebih tinggi yaitu 2,0022%±0,078809, sedangkan hasil rendemen ekstrak

Eucheuma spinosum lebih rendah yaitu $1,0044\% \pm 0,112483$. Perbedaan hasil ekstraksi pada *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* diduga karena perbedaan struktur dinding sel yang dipengaruhi oleh karagenan yang dihasilkan. Menurut Rohman (2013), dinding sel pada alga merah terdapat selulosa, agar, karagenan, porpiran, dan selaran. Menurut Ulfah (2009), *Eucheuma spinosum* memiliki struktur dinding sel yang lebih keras karena mengandung iota karagenan dengan gugus 2 sulfat yang tinggi sehingga memiliki sensitivitas tinggi terhadap ion kalsium (Ca^{2+}) dan kekuatan gelnnya lebih rendah, hal ini menyebabkan struktur dinding sel pada *Eucheuma spinosum* lebih sulit ditembus oleh pelarut.

4.2.3 Hasil Analisa Total Karotenoid

Sampel ekstrak kasar pigmen kering *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* selanjutnya dilakukan analisa total karotenoid dengan menggunakan metode menurut Julyasih, et al. (2009). Dari analisa total karotenoid didapatkan hasil kadar total karotenoid yang terkandung dalam sampel ekstrak kasar pigmen kering *Eucheuma cottonii* lebih tinggi yaitu sebesar $9.724,48 \mu\text{g}/100\text{g} \pm 364,2803$ dan pada sampel ekstrak kasar pigmen kering *Eucheuma spinosum* didapatkan hasil yang lebih rendah yaitu $3.954,92 \mu\text{g}/100\text{g} \pm 508,1647$. Menurut Julyasih, et al. (2009), kandungan total karotenoid pada *Eucheuma spinosum* ialah sebesar $1.989,930 \mu\text{g}/100\text{g}$. Data dan perhitungan total karotenoid disajikan di Lampiran 4. Hasil analisa total karotenoid ekstrak *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* disajikan di Gambar 32.



Gambar 32. Hasil Analisa Total Karotenoid Ekstrak

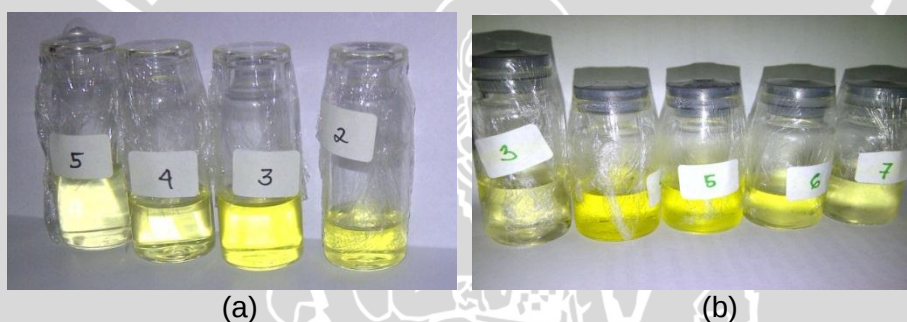
Lebih tingginya total karotenoid pada *Eucheuma cottonii* kemungkinan dikarenakan hasil ekstraksi senyawa karotenoid pada sampel *Eucheuma cottonii* lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil ekstraksi pada *Eucheuma spinosum*. Hasil kandungan total karotenoid dalam penelitian ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil penelitian Julyasih, *et al.* (2009), hal ini kemungkinan dikarenakan penggunaan pelarut yang berbeda saat proses ekstraksi. Menurut Liqun, *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa pelarut dengan kemampuan terbaik dalam mengekstrak senyawa karotenoid ialah pelarut metanol dan aseton dengan nilai ekstraksi sebesar 0,570 mg/10 g untuk metanol dan 0,532 mg/10 g untuk aseton, dibandingkan dengan pelarut etanol dengan nilai ekstraksi sebesar 0,195 mg/10 g.

4.2.4 Hasil Isolasi β -Karoten

Isolasi senyawa β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan mengacu pada metode isolasi pigmen menurut Pangestuti, *et al.* (2007). Dari proses isolasi $\pm 0,3$ - $0,4$ gram ekstrak kering *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* didapatkan hasil pada sampel *Eucheuma cottonii* yaitu 50 botol sampel isolat pigmen dengan isolat yang diduga sebagai isolat β -karoten sebanyak 4 botol dengan warna kuning, sedangkan pada sampel

Eucheuma spinosum didapatkan hasil yaitu 45 botol sampel isolat pigmen dengan isolat yang diduga sebagai isolat β -karoten sebanyak 5 botol dengan warna kuning.

Menurut Winarno (2004), Senyawa β -karoten merupakan karotenoid berwarna kuning dan merah yang terdapat pada tumbuhan maupun buah-buahan. Ditambahkan oleh Merdekawati, *et al.* (2009), pita warna β -karoten pada rumput laut ialah warna kuning. Rincian hasil isolasi senyawa β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Lampiran 5. Hasil isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Gambar 33.



Gambar 33. Isolat yang Diduga sebagai Isolat β -Karoten (a) *Eucheuma cottonii* dan (b) *Eucheuma spinosum*

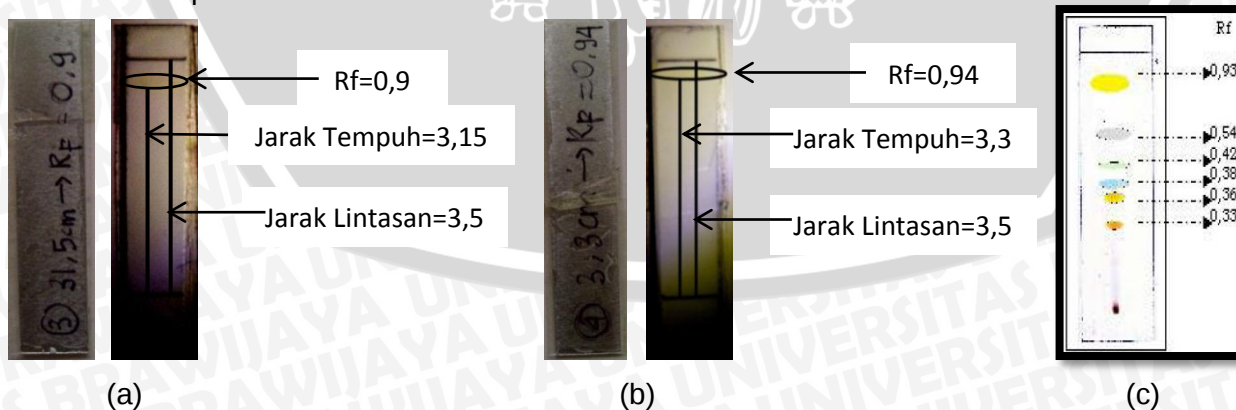
4.2.5 Hasil Identifikasi β -Karoten

4.2.5.1 Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil isolat yang diduga sebagai sampel dengan kandungan β -karoten selanjutnya diidentifikasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan metode uji KLT menurut Pangestuti, *et al.* (2007). Menurut Markham (1988), pelat KLT berfungsi untuk analisa fraksi senyawa hasil kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni dalam skala kecil. Sampel Isolat yang diduga sebagai isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* dilakukan pengujian kemurnian dan identifikasi senyawa β -karoten.

Menurut Merdekawati, *et al.* (2009) yang melaporkan bahwa pita warna pada β -karoten yang terkandung dalam rumput laut ialah warna kuning dan nilai faktor retensi (R_f) β -karoten ialah 0,8-1,0. Dari 4 sampel botol yang diduga sebagai isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* didapatkan 2 sampel botol yang teridentifikasi sebagai isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* yaitu pada botol sampel nomer 2 dan 3 dengan nilai R_f 0,9 pada jarak tempuh warna 3,15 cm. Untuk 5 sampel botol yang diduga sebagai isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* didapatkan 3 sampel botol yang teridentifikasi sebagai isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* yaitu pada botol sampel nomer 4, 5, dan 6 dengan nilai R_f 0,94 pada jarak tempuh warna 3,3 cm.

Astutiningsih, *et al.* (2010) dalam Romiyanto (2014) melaporkan bahwa identifikasi pigmen pada ekstrak kasar alga merah menghasilkan 6 jenis warna yaitu spot 1 & 2 dengan warna merah oranye dan oranye dengan R_f 0,33 dan 0,36 teridentifikasi sebagai xantofel, spot 3 berwarna hijau biru dengan R_f 0,38 teridentifikasi sebagai klorofil *a*, spot 4 berwarna hijau dengan R_f 0,42 teridentifikasi sebagai klorofil *b*, spot 5 berwarna abu-abu dengan R_f 0,54 teridentifikasi sebagai feofitin, dan spot 6 yang paling atas berwarna kuning dengan R_f 0,93 teridentifikasi sebagai β -karoten. Hasil identifikasi KLT dapat dilihat pada Gambar 34.



Gambar 34. Hasil Identifikasi KLT Isolat β -Karoten (a) *Eucheuma cottonii*, (b) *Eucheuma spinosum* dan (c) Identifikasi Pigmen Menurut Astutiningsih, *et al.* (2010) dalam Romiyanto (2014)

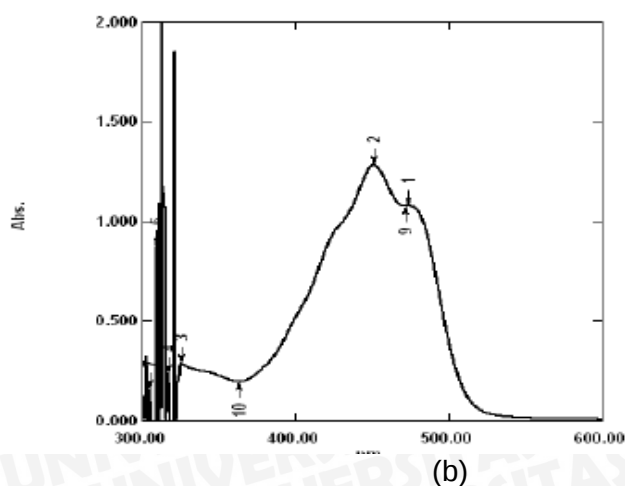
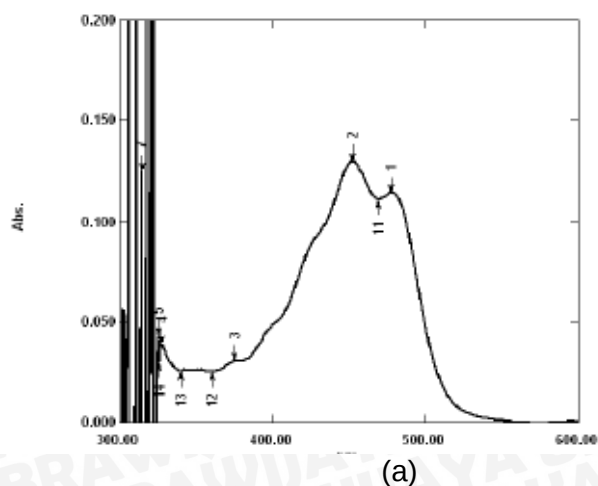
4.2.5.2 Hasil Spektrofotometer UV-Vis

Hasil sampel pigmen yang terpilih sebagai isolat *β*-karoten *Eucheuma cottonii* dan isolat *β*-karoten *Eucheuma spinosum* digunakan untuk identifikasi selanjutnya, yaitu identifikasi senyawa *β*-karoten dengan Spektrofotometer UV-Vis menggunakan metode Pangestuti, *et al.* (2007) dengan rentang panjang gelombang yang digunakan ialah 300-600 nm. Dari uji spektrofotometer UV-Vis didapatkan hasil pada isolat *β*-karoten *Eucheuma cottonii* serapan absorbansi tertinggi terjadi pada panjang gelombang 452,00 nm dan 477,60 nm, dan pada isolat *β*-karoten *Eucheuma spinosum* terjadi pada panjang gelombang 451,00 nm dan 473,20 nm.

Hal ini sesuai pendapat Limantara dan Heriyanto (2010) yang melaporkan bahwa absorbansi maxima pada senyawa *β*-karoten ialah 426 nm, 452 nm, dan 478 nm. Ditambahkan oleh Jeffrey (1961) yang menyatakan bahwa absorbansi maxima *β*-karoten yang terkandung dalam alga laut ialah 429 nm, 450 nm, dan 478 nm. Hasil grafik absorbansi isolat *β*-karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Gambar 35. dan Lampiran 7.

Sampel *β*-Karoten *Eucheuma cottonii*

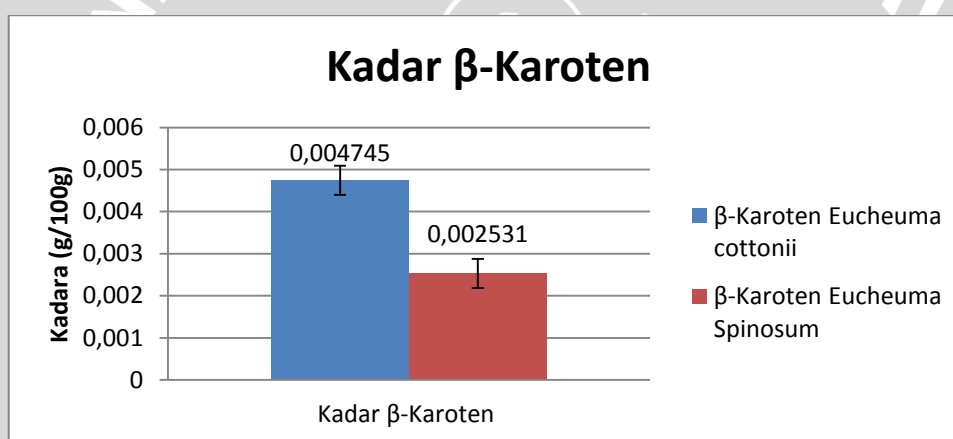
⇒ Sampel *β*-Karoten *Eucheuma spinosum*



Gambar 35. Pola Spektra (a) *β*-Karoten *Eucheuma cottonii* dan (b) *β*-Karoten *Eucheuma spinosum*

4.2.6 Hasil Analisa Kadar β -Karoten

Hasil kadar β -karoten dalam isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma cottonii* dengan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan analisa berdasarkan rumus perhitungan hukum *Lambert-Beer* menurut Sudarman (2012) dengan pengukuran absorbansi pada λ 450 nm. Dari analisa kadar β -karoten pada isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* ialah sebesar $0,004745\% \pm 0,0003482$ dan kadar β -karoten pada isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* ialah sebesar $0,002531\% \pm 0,0003374$. Analisa kadar β -karoten pada isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* isolat β -karoten disajikan di Lampiran 8 dan Gambar 36.

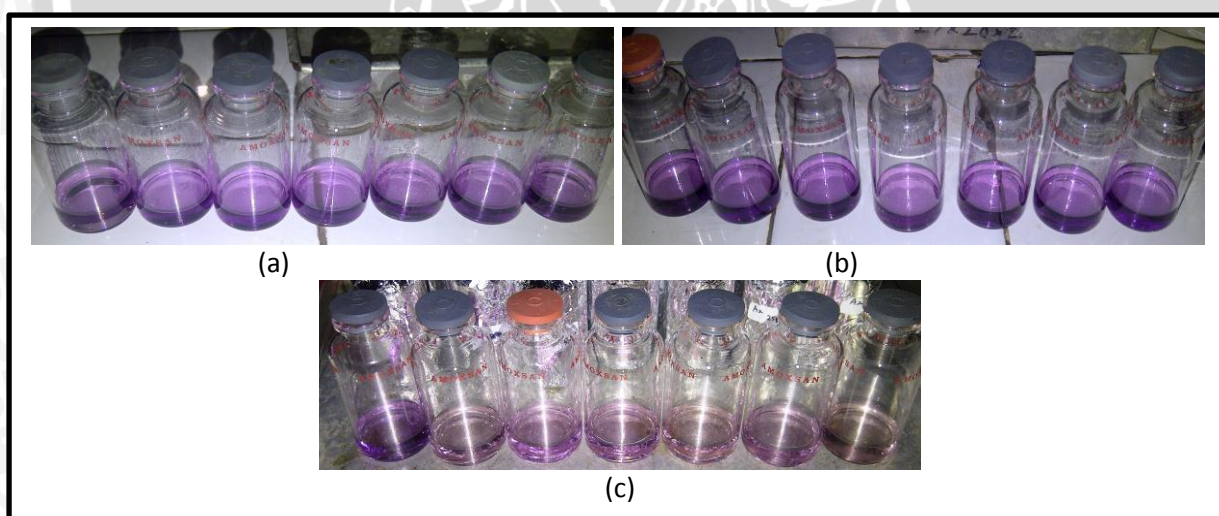


Gambar 36. Hasil Analisa Kadar β -Karoten

Tingginya kadar β -karoten pada *Eucheuma cottonii* diduga dikarenakan pada sampel *Eucheuma cottonii* senyawa karotenoid yang terekstrak lebih tinggi dan nilai absorbansi yang dihasilkan juga lebih tinggi sehingga kadar β -karoten yang dihasilkan juga lebih tinggi. Menurut Sudarmadji, *et al.* (2007), analisa kimia dengan spektrofotometer UV-Vis berdasakaan interaksi energi radiasi elektromagnetik dengan zat kimia yang menimbulkan peristiwa seperti penyerapan (absorbansi), secara kuantitatif ansorbansi berbanding lurus dengan banyaknya zat kimia.

4.2.7 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

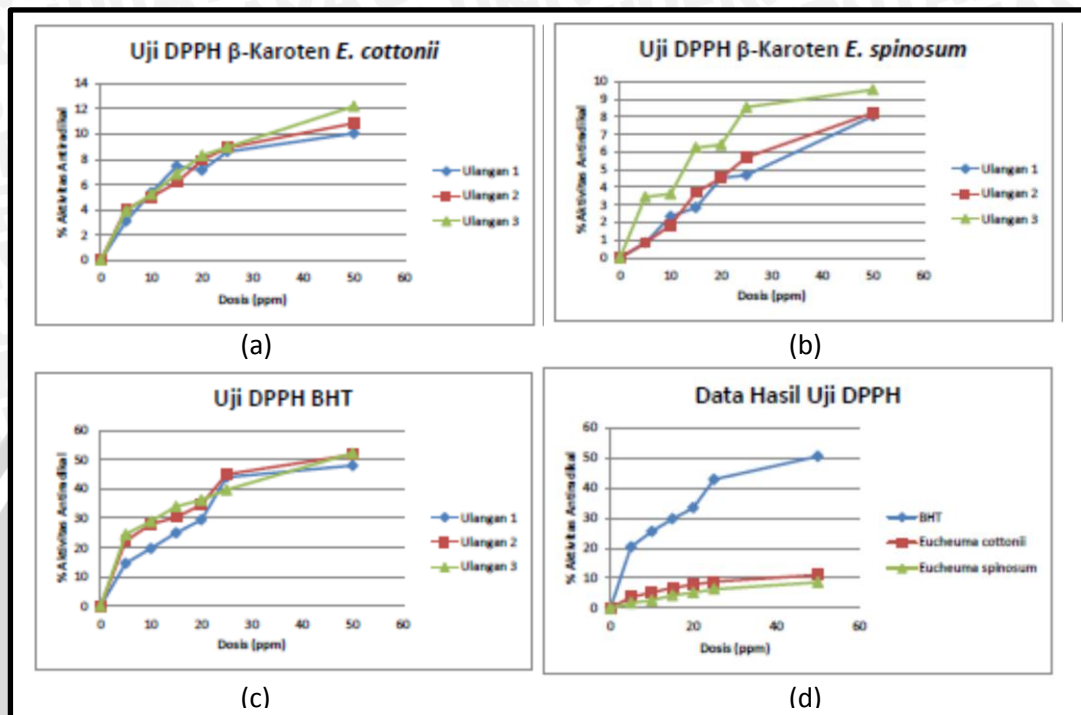
Identifikasi aktivitas antiradikal DPPH diukur berdasarkan metode DPPH menurut Hijaz (2007), nilai absorbansi sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Menurut Hijaz (2007) yang menyatakan bahwa DPPH memiliki elektron bebas yang memberikan warna ungu dengan absorbansi maksimum pada $\lambda 517$ nm. Elektron bebas DPPH yang menangkap atom H^+ dari antioksidan akan menyebabkan intensitas warna berubah menjadi kuning. Sehingga aktivitas antioksidan diperoleh dari menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH melalui pengukuran absorbansi larutan uji yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Hasil uji DPPH dapat dilihat di Gambar 37. Hasil absorbansi kemudian dihitung aktivitas antiradikal (% inhibisi) menurut Hijaz (2007). Data & perhitungan (% inhibisi) disajikan di Lampiran 11.



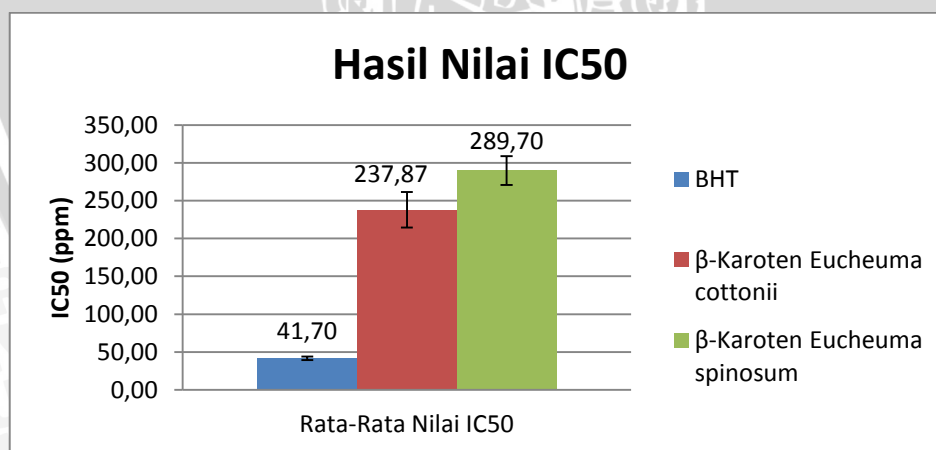
Gambar 37. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (a) β -karoten *Eucheuma cottonii*, (b) isolat β -karoten *Eucheuma spinosum*, dan (c) BHT

Berdasarkan data hasil uji aktivitas antioksidan isolat β -karoten *Eucheuma cottonii*, isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* dan BHT (kontrol (+)) dapat didapatkan aktivitas antioksidan tertinggi pada perlakuan dengan konsentrasi tertinggi yaitu 50 ppm. Data Hasil, perhitungan, dan analisa data

aktivitas antioksidan dan nilai IC_{50} penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 11. Hasil uji aktivitas antioksidan dan grafik aktivitas antioksidan metode DPPH dapat dilihat pada di Gambar 38. Grafik hasil nilai IC_{50} dapat dilihat pada Gambar 39.



Gambar 38. Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (a) β -karoten *Eucheuma cottonii*, (b) β -karoten *Eucheuma spinosum*, (c) BHT, dan (d) Gabungan Ketiga Sampel



Gambar 39. Grafik Data Nilai IC_{50} BHT, β -Karoten *Eucheuma cottonii*, dan β -Karoten *Eucheuma spinosum*

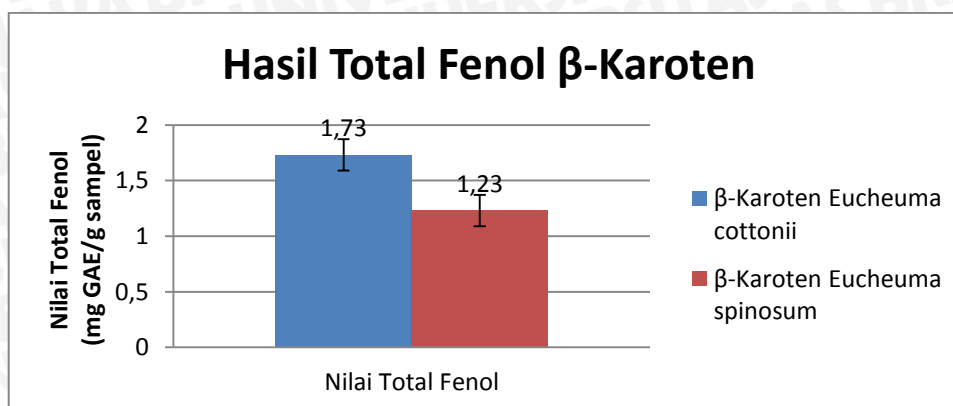
Dari data perhitungan IC_{50} diketahui bahwa nilai IC_{50} sampel β -karoten *Eucheuma cottonii* lebih rendah dari pada nilai IC_{50} sampel β -karoten *Eucheuma spinosum*. Hasil nilai IC_{50} pada sampel BHT ialah $41,70 \text{ ppm} \pm 2,3324$, pada sampel isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* ialah $237,87 \text{ ppm} \pm 23,5735$, dan pada sampel isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* ialah $289,70 \text{ ppm} \pm 19,1766$. Menurut Merdekawati, *et al.* (2009) ketentuan nilai IC_{50} ialah semakin kecil nilai konsentrasi IC_{50} maka aktivitas antioksidan sampel uji akan semakin besar. Nilai IC_{50} pada sampel purifikasi β -karoten *Sargassum* sp. ialah $351,63 \pm 0,05 \text{ ppm}$ dan pada sampel β -karoten marker ialah $356,89 \pm 10,68 \text{ ppm}$.

4.2.8 Hasil Analisa Total Fenol

Sampel isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* selanjutnya dilakukan analisa kandungan total fenol dengan mengacu pada metode menurut Julyasih, *et al.* (2009). Menurut Djapiala, *et al.* (2013), cara pengukuran total fenolik bahan ialah menggunakan pereaksi Folin-ciocalteu sebagai reagen. Analisis total fenol menggunakan kurva standart asam galat dengan substitusi hasil absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva asam galat.

Analisa total fenol diawali membuat kurva kalibrasi asam galat sebagai standart total fenol. Data dan kurva kalibrasi (standart) asam galat dapat dilihat pada Lampiran 13. Selanjutnya, hasil absorbansi analisa total fenol sampel isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan garis pada kurva standart asam galat $Y = 0,0021x + 0,732$ dengan koefisien korelasi (R^2) = 0,9923 yang berarti bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier. Hasil perhitungan yang dihasilkan dinyatakan sengan satuan mg GAE/g (Galic Acid Ekuivalent). Data hasil dan perhitungan analisa total fenol dapat dilihat pada Lampiran 13. Hasil

analisa total fenol isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dapat dilihat di Gambar 40.



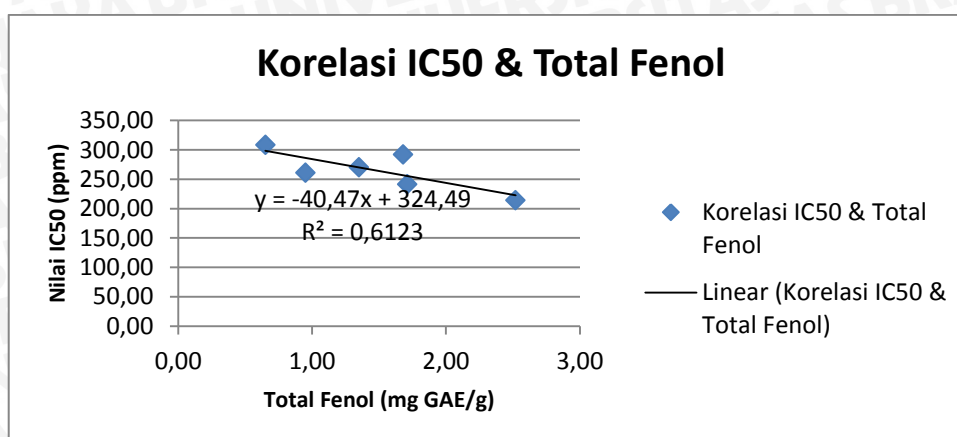
Gambar 40. Hasil Analisa Total Fenol

Dari analisa total fenol pada sampel isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* didapatkan hasil pada sampel isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* memiliki kandungan fenol lebih tinggi yaitu 1,73 mg GAE/g $\pm$ 0,1410, sedangkan pada sampel isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* memiliki kandungan total fenol lebih rendah yaitu 1,23 mg GAE/g $\pm$ 0,1757. Menurut Julyasih, *et al.* (2009) yang melaporkan kandungan total fenol pada ekstrak *Eucheuma spinosum* ialah sebesar 1,50 mg GAE/g. Menurut Apek, *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa senyawa antioksidan fenolat terdiri dari kelas-kelas senyawa seperti asam fenolik, asam hydroxycinnamic, flavonoid, dan karotenoid.

4.2.9 Analisa Korelasi Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol

Analisa korelasi antara aktivitas antioksidan (IC_{50}) dan total fenol bertujuan untuk menentukan kedekatan hubungan diantara keduanya. Menurut Djapiala, *et al.* (2013), analisa total fenol pada sampel antioksidan bertujuan untuk menentukan jumlah senyawa fenolik yang terkandung didalamnya, dimana kandungan senyawa fenolik yang tinggi diduga akan menghasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Hal ini dikarenakan sebagian besar antioksidan yang

berasal dari tanaman merupakan senyawa polifenol. Hubungan korelasi antara nilai IC₅₀ dan nilai total fenol disajikan pada Gambar 41.



Gambar 41. Grafik Korelasi Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol

Dari analisa korelasi antara nilai IC₅₀ dan total fenol diketahui bahwa antara keduanya memiliki korelasi negatif dengan tingkat korelasi sedang yaitu $(r) = 0,6123$. Menurut Septiana, *et al.* (2013) melaporkan hubungan aktivitas antioksidan dengan kadar total fenol ialah berkorelasi sedang dengan koefisien korelasi $(r) = 0,698$. Ditambahkan oleh Ukieyanna, *et al.* (2012) dalam Samin, *et al.* (2013) yang melaporkan hubungan antara kandungan total fenolik (mg GAE/g) memberikan korelasi sebesar 77% terhadap aktivitas antioksidan (IC₅₀) pada tumbuhan.

Diketahui bahwa semakin rendah nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidan akan semakin tinggi, dan dalam analisa korelasi diketahui bahwa pada nilai IC₅₀ rendah nilai total fenol tinggi begitu pula sebaliknya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi nilai total fenol maka aktivitas antioksidan yang dihasilkan semakin besar. Diduga pada isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* aktivitas antioksidan tidak hanya berasal dari senyawa fenolik tatapi terdapat mekanisme aktivitas antioksidan lain terutama dari komponen karotenoid.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

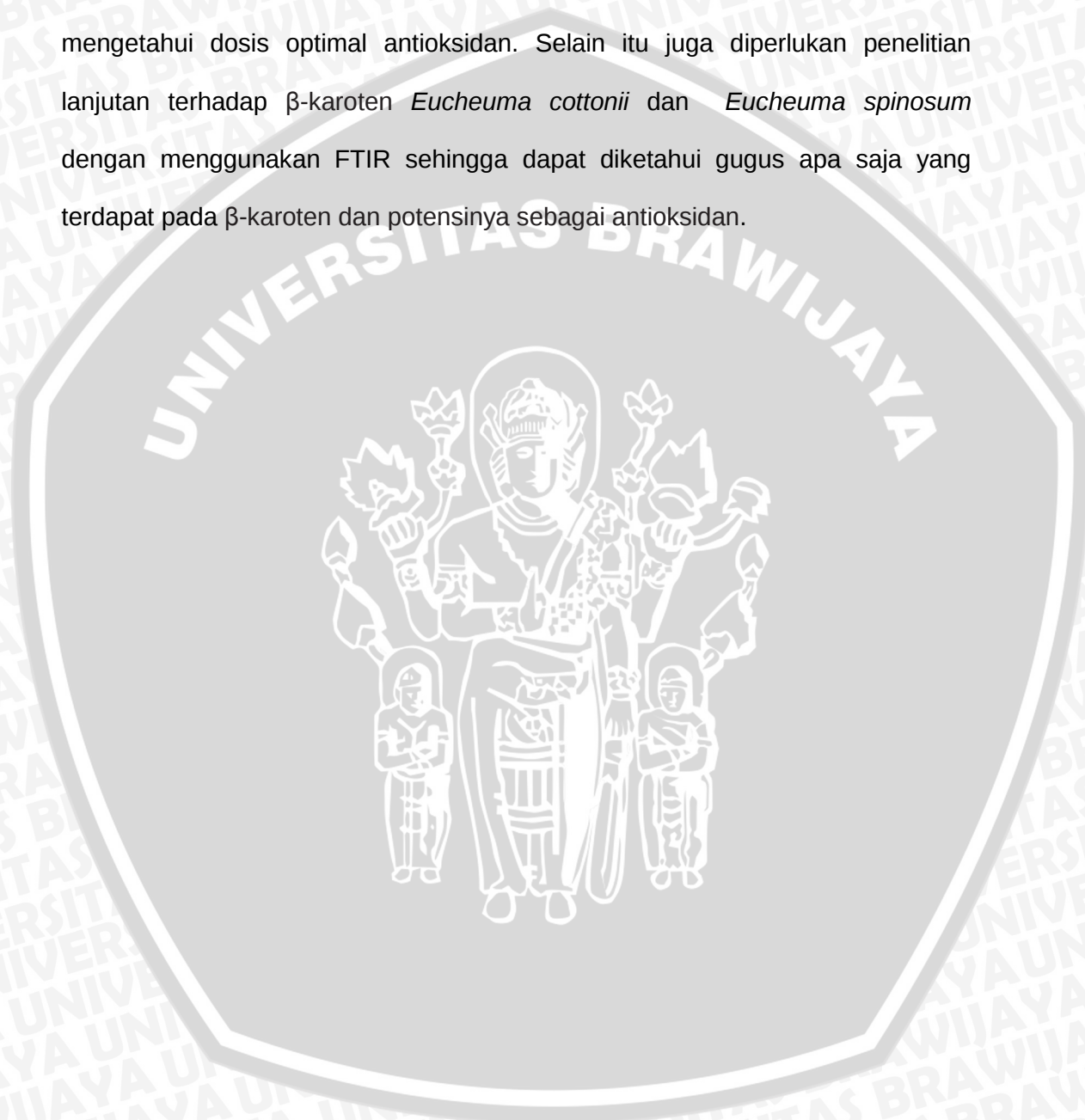
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Uji Aktivitas Antioksidan β -Karoten Pada Rumput Laut Merah *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum*, didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

- Kandungan β -karoten sampel *Eucheuma cottonii* lebih tinggi yaitu nilai total karotenoid ekstrak $9.724,48\mu\text{g}/100\text{g} \pm 364,2803$ dan kadar β -karoten $0,004745\% \pm 0,0003482$, sedangkan kandungan β -karoten sampel *Eucheuma spinosum* lebih rendah yaitu nilai total karotenoid $3.954,92\mu\text{g}/100\text{g} \pm 508,1647$ dan kadar β -karoten $0,002531\% \pm 0,0003374$.
- Aktivitas antioksidan isolat β -karoten *Eucheuma cottonii*, isolat β -karoten *Eucheuma spinosum* menunjukkan hasil regresi yang linier dan aktivitas inhibis tertinggi pada dosis tertinggi yaitu 50 ppm.
- Aktivitas antioksidan pada isolat β -karoten *Eucheuma cottonii* lebih tinggi dari isolat β -karoten *Eucheuma cottonii*, dan dari nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas antioksidan tergolong sangat lemah.
- Aktivitas antioksidan (IC_{50}) β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* memiliki korelasi negatif dengan kandungan total fenol bahan dengan tingkat korelasi sedang yaitu $(r) = 0,6123$.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian aktivitas antioksidan β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* yang menunjukkan hasil regresi yang linier, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan dosis yang lebih tinggi untuk mengetahui dosis optimal antioksidan. Selain itu juga diperlukan penelitian lanjutan terhadap β -karoten *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dengan menggunakan FTIR sehingga dapat diketahui gugus apa saja yang terdapat pada β -karoten dan potensinya sebagai antioksidan.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdan, A. Rahman, dan Ruslaini. 2013. Pengaruh Jarak Tanam Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Karagenan Rumpuk Laut (*Euclima spinosum*) Menggunakan Metode Long Line. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. **03**(12): 113-123.
- Abdullah, V. Dan A. Widiawati. 2010. Pabrik Minyak Ikan dari Ikan Tuna (*Tuna Fish Oil*) dengan Proses Ekstraksi N-Hexane. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. 14 hlm.
- Absori, M. U. dan S. B. U. Paramitha. 2011. Tugas Prarancangan Pabrik Etil Asetat dengan *Reactive Distillation* Kapasitas 30.000 Ton per Tahun. Universitas Diponegoro. Semarang. 11 hlm.
- Anonymous. 2013. Potensi Ekspor Produk Rumpuk Laut di Pasar Thailand. Kementerian Perdagangan Republik Indonesia. Bangkok. 38 hlm.
- Apak, R., K. Guclu, B. Demirata, M. Ozyurek, S. E. Celik, B. Bektasoglu, K. I. Berker, dan D. Ozyurt. 2007. *Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compound with the CUPRAC Assay*. *Molecules*. **12**(1): 1496-1547.
- Ardianingsih, R. 2010. Penggunaan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam Proses Analisa Deteksi Ion. *Berita Dirgantara*. **10**(4): 101-104.
- Arief, S. 2003. Radikal Bebas. SMF Ilmu Kesehatan Anak FK UNAIR/RSU Dr. Soetomo Surabaya. Surabaya. 9 hlm.
- Costa, J. F. da, F. F. Karwur, dan L. Limantara. 2009. Efek Beta karoten dan Agregasi Klorofil pada Fotostabilitas Klorofil a dalam Pelarut Aseton. **11**(2): 115-123.
- Dahnum, D., L. Dachliyat, S. Fajriyah, dan H. Abimanyu. 2007. Isolasi Artemisinin sebagai Obat Anti Malaria dari *Artemisia annua* L. Melalui Ekstraksi Metanol. Pusat Penelitian Kimia. LIPI. Banten. 8 hlm.
- Distantina, S., O. Rusman, dan S. Hartati. 2006. Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat pada Perendaman Terhadap Kecepatan Ekstraksi Agar-Agar. *Ekilibrium*. **5**(1): 34-39.
- Djapiala, F. Y., L. A. D. Y. Montolalu, dan F. Mentang. 2013. Kandungan Total Fenol dalam Rumpuk Laut *Caulerpa racemosa* yang Berpotensi sebagai Antioksidan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Unsrat. 5 hlm.
- Dwiandita, N. 2009. Perubahan Kandungan Antioksidan Anggur Laut (*Caulerpa racemosa*) Akibat Pengolahan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 97 hlm.
- Frayekti, M. C. 2012. Evaporator : Operasi Teknik Kimia II. PT. Badak LNG. Politeknik Negeri Jakarta. Bontang. 18 hlm.

- Gardjito, M., S. Naruki, A. Murdiati, Sardjono, dan R. B. Kasmodjo. 1992. Ilmu Pangan : Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi, dan Mikrobiologi. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 305 hlm.
- Hart, H., L. E. Craine, dan D. J. Hart. 2003. Kimia Organik. Terjemah oleh S. S. Achmadi. Erlangga. Jakarta. 600 hlm.
- Hertiani, T. I. A. Nihlati, dan A. Rohman. 2007. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*(Roxb.) Schlecht) dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 8 hlm.
- Hidayati, P. W. 2003. Mempelajari Pengaruh Penambahan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dan Khitosan sebagai Bahan Penjernih pada Proses Pembuatan Tepung Karagenan dari Rumput Laut Jenis *Eucheuma cottonii*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 62 hlm.
- Hijaz, M. N. 2009. Uji Aktivitas Antioksidan Karagenan dalam Alga Merah Jenis *Eucheuma cottonii* dan *Gracillaria verrucosa*. Universitas Islam Negeri (UIN) Malang. Malang. 116 hlm.
- Ichwan, Z. dan Y. Winarti. 2014. Thallophyta (Alga). Universitas Negeri Semarang. Semarang. 16 hlm.
- Jeffrey, S. W. 1961. Paper-Chromatographic Separation of Chlorophylls and Carotenoids from Marine Algae. *Biochim.* **80**(3): 336-342.
- Julyasih, K. S. M., L. G. P. Wirawan, W. S. Harijani, dan W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (Seaweeds) Komersial di Bali. Fakultas Pertanian. LPPM UPN "Veteran". 8 hlm.
- Juneidi, W. 2004 Rumput Laut, Jenis dan Morfologi. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta. 56 hlm.
- Kadi, A. 2004. Potensi Rumput Laut Dibeberapa Perairan Pantai Indonesia. *Oseana*. **29**(4): 25-36.
- Kamdiyah, N. 2010. Pembuatan Etanol dari Alga Merah Jenis *Eucheuma spinosum* dengan Sakarifikasi dan Tanpa Sakarifikasi pada Variasi Lama Fermentasi. Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Maliki Ibrahim. Malang. 89 hlm.
- Kumalaningsih, S. 2006. Antioksidan Alami (Penangkal radikal bebas : Sumber, manfaat, cara penyediaan, dan pengolahan). Trubus Agrisarana. Surabaya. 112 hlm.
- Lestari, P. 2011. Isolasi dan Identifikasi Komponen kimia Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.). Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 72 hlm.
- Limantara, L., dan Heriyanto. 2010. Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Cokelat dari Perairan Madura dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Ilmu Kelautan*. **15**(1): 23-32.

- Liqun, Y., L. Pangcheng, dan F. Shoujin. 2008. The Extraction of Pigmen from Fresh *Laminaria japonica*. *Chainese Journal of Oceanology and Limnology*. **26**(2): 193-196.
- Lyman. 1982. *Acetone : Chemical and Physical Information*. Department of Transportation. North America. 4 pp.
- Markham, K. R. 1988. Cara Identifikasi Flavonoid. ITB. Bandung. 110 hlm.
- Marzuki. 1983. Metodologi Riset. PT. Hanindita Offset. Yogyakarta. 130 hlm.
- Merdekawati, W., A. B. Susanto, dan L. Limantara. 2009. Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Klorofil a dan β -Karoten *Sargassum* sp. **2**(1): 1-12.
- Murdinah. 2011. Prospek Pengembangan Produk Berbasis Rumput Laut *Eucheuma spinosum* dari Nusa Penida, Bali. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. 1139-1142.
- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lank). Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 64 hlm.
- Nuraini, A. D. 2007. Ekstraksi Komponen Antibakteri dan Antioksidan dari Biji Teratai (*Nymphaea pubescens* Wild). Institut Pertanian Bogor. Bogor. 94 hlm.
- Pangestuti, R., L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycistum* C. A. Agardh. **9**(2): 201-208.
- Prasetyowati, C. Jasmine A., dan D. Agustiawan. 2008. Pembuatan Tepung Karaginan dari Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Berdasarkan Perbedaan Metode Pengendapan. *Jurnal Teknik Kimia*. **15**(2): 27-33.
- Purnomo, B. 2005. Pengenalan Sifat-Sifat Umum Mikroorganisme. PS. IHPT. Fakultas Pertanian. UNIB. 15 hlm.
- Riawan. 2013. Keterangan Karotenoid Total dan Klorofil Total dalam Jaringan Prostat Mencit *Balb/C* Akibat Pemberian Pasta Tomat. IKIP PGRI Semarang. Semarang. 62 hlm.
- Rohman, S. 2013. Pengaruh Penambahan Natrium Hidroksida (NaOH) Terhadap Kandungan Protein dan Abu pada Karagenan Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Pasca Panen. IKIP PGRI Semarang. Semarang. 103 hlm.
- Rohmatussolihat. 2009. Antioksidan Penyelamat Sel-Sel Tubuh Manusia. *BioTrends*. **4**(1): 5-9.
- Romiyanto, A. 2014. Study Kandungan β -Karoten pada Rumput Laut Merah (*Eucheuma spinosum*) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Universitas Brawijaya. Malang. 118 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.

- Septiana, A. T. dan A. Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Agrointek*. **6**(1): 22-28.
- Setianingsih, T. 2010. Golongan V A. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang. 8 hlm.
- Sholihah, Q. Dan M. A. Widodo. 2008. Pembentukan Radikal Bebas Akibat Gangguan Ritme Sirkadian dan Paparan Debu Batubara. *Jurnal Kesehatan lingkungan*. **4**(2): 89-100.
- Simanjuntak, M. 2008. Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Daun Tumbuhan Senduduk (*Melastoma malabathricum*. L) serta Pengujian Efek Sediaan Krim Terhadap Penyembuhan Luka Bakar. Universitas Sumatera Utara. Medan. 85 hlm.
- Singarimbun, M. Dan S. Effendi. 1989. Metode Penelitian Survei: Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta. 128 hlm.
- Siswadi, A. D. dan G. Permatasari. 2009. Ekstraksi Asphaltene dari Minyak Bumi. Universitas Diponegoro. Semarang. 6 hlm.
- SNI. 06-2594. 1992. Dietil Eter Teknis. Badan Standarisasi Nasional. 8 hlm.
- Sudarmadji S., B. Haryono, dan Suhardi. 2007. Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian Liberty. Yogyakarta. 172 hlm.
- Sudarman, A. 2012. Uji Kinerja Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak Berkas Ganda Terhadap Pengukuran Ambroksol HCL pada Tablet Ekspektoran. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 35 hlm.
- Sulaswatty, A. 2001. Penggunaan Pelarut Teknis pada Pemisahan α - dan β -Karoten dari Pemekatan Karotenoid *Crude Olein*. *Kimia dalam Industri dan Lingkungan*. **10**(1): 26-36.
- Suparman. 2013. Cara Mudah Budidaya Rumput Laut Menyehatkan dan Menguntungkan. Pustaka Baru Press. Yogyakarta. 225 hlm.
- Suryohudoyo, P. 1993. Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas. Laboratorium Biokimia. Fakultas Kedokteran. Unair. 11 hlm.
- Susanti, A. D., D. Ardiana, G. Gumelar P., dan Y. Bening G. 2012. Polaritas Pelarut sebagai Pertimbangan dalam Pemilihan Pelarut untuk Ekstraksi Minyak Bekatul dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glatinosa*). *Simposium Nasional RAPI*. **9**(6): 8-14.
- Swatara, I. M. D. dan I. M. O. A. Parwata. 2011. Kajian Senyawa antioksidan pada Rumput Laut dari Pantai Sekitar Bali. *The Excellence Research*. Universitas Udayana. 89-96.
- Tamat, S. R., T. Wikanta, dan L. S. Maulana. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **5**(1): 31-36.

- Ulfah, M. 2009. Pemanfaatan Iota Karagenan (*Euclima spinosum*) dan Kappa Karagenan (*Kappaphycus alvarezii*) sebagai Sumber Serat untuk Meningkatkan Kekenyalan Mie Kering. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 111 hlm.
- Vargas, F. D., A. R. Jimenez, dan O. P. Lopez. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **40**(3): 173-289.
- Wibowo, L. Dan E. Fitriyani. 2012. Pengolahan Rumput Laut (*Euclima cottonii*) Menjadi Serbuk Minuman Instan. *Vokasi*. **8**(2): 101-109.
- Widyastuti, N. 2010. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC, DPPH, dan FRAP serta Korelasinya dengan Fenol dan Flavonoid pada Enam Tanaman. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 31 hlm.
- Wikipedia. 2014. Sel Alga (Rumput Laut). http://id.wikipedia.org/wiki/Sel_alga. Diakses tanggal 5 April 2014.
- Winarno, F. G. 2007. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 250 hlm.
- Winarno, F. G., S. Fardiaz, dan D. Fardiaz. 1980. Pengantar Teknologi Pangan. PT. Gramedia. Jakarta. 90 hlm.
- Winarsi, H. 2011. Antioksidan Alami dan Radikal bebas. Kanisius. Yogyakarta. 282 hlm.
- Wiratmaja, I. G., I. G. B. W. Kusuma, dan I. N. S. Winaya. 2011. Pembuatan Etanol Generasi Kedua dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Euclima cottonii* sebagai Bahan Baku. *Jurnal Ilmiah Teknik Mesin CakraM*. **5**(1): 75-84.
- Yuliasih, I., T. T. Iarawan, I. Sailah, H. Pranamuda, K. Setyowati, dan T. C. Sunarti. 2005. Pengaruh Proses Fraksinasi Pati Sagu Terhadap Karakteristik Fraksi Amilonya. *Jurnal Teknologi Indonesia Pertanian*. **17**(1): 29-36.
- Zipcodezoo. 2014^a. Klasifikasi dan taxonomy *Euclima cottonii*. http://www.zipcodezoo.com/Plants/Euclima_cottonii. Diakses tanggal 20 April 2014.
- Zipcodezoo. 2014^b. Klasifikasi dan taxonomy *Euclima spinosum*. http://www.zipcodezoo.com/Plants/Euclima_spinosum. Diakses tanggal 20 April 2014.
- Zuhra, C. F., J. Br. Tarigan, dan H. Sihotang. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L) Mer.). *Jurnal Biologi Sumatera*. **3**(1): 7-10.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Foto Kegiatan Penelitian

⇒ Foto Kegiatan Penelitian :

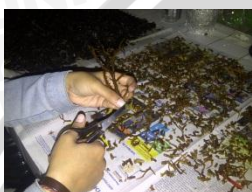
- Preparasi Sampel



Sampel segar *E. Cottonii* & *E. Spinosum*



Proses Pencucian Sampel



Proses Pemotongan & Dianginkan

Proses Blender Sampel



Proses Penimbangan Sampel

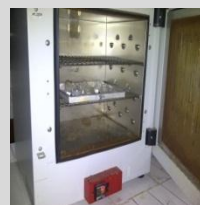
- Analisa Kadar Air



Preparasi Alat



Penimbangan Sampel



Proses Pengovenan Sampel



Hasil Pengeringan kemudian Didinginkan dalam Desikator

Lampiran 1. (Lanjutan)

- Proses Pembuatan Saturasi Garam



Proses Pembuatan Saturasi Garam

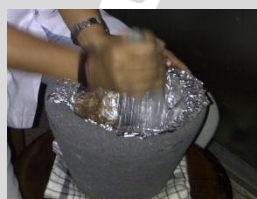
- Proses Ekstraksi Pigmen



Penimbangan Sampel 100 g



Penambahan $\text{CaCO}_3 \pm 0,5 \text{ g}$



Penumbukan Sampel



Proses Maserasi Metanol & Aseton (7:3)



Proses Filtrasi Ekstrak



Proses Fraksinasi (Partisi)



Proses Evaporasi Ekstrak



Proses Nitrogen Ekstrak Pigmen



Lampiran 1. (Lanjutan)

- Analisa Total Karotenoid



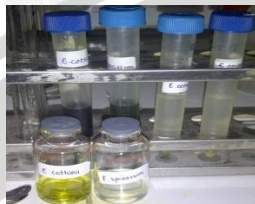
Penambahan Aseton & Petroleum Eter



Proses Centrifuge



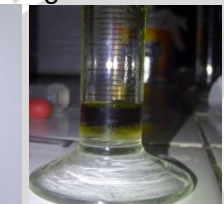
Proses Pengulangan Perlakuan



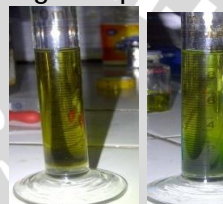
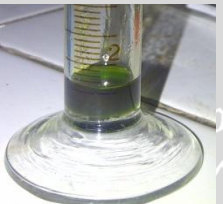
Pencucian dengan Aquadest pH 7



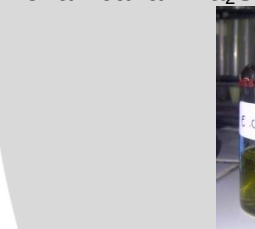
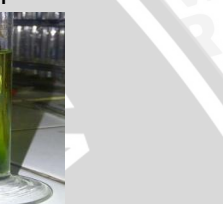
Penambahan Na_2SO_4



Pengukuran Bagian Bening



Penambahan PE 10ml



Pengukuran Spektrofotometer UV-Vis (450 nm)



- Isolasi β -Karoten



Pelarutan Ekstrak dalam Fase Gerak (8:2)



Pemasukan Sea Sand



Pemasukan Ekstrak



Proses Isolasi β -Karoten

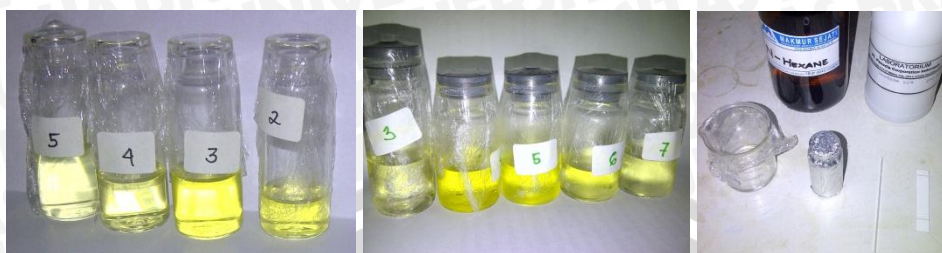


N_2 (β -Karoten)



Lampiran 1. (Lanjutan)

- Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Persiapan Alat, Bahan, dan Isolat β -Karoten *E. cottonii* & *E. spinosum*



Proses Uji KLT isolat β -Karoten *E. cottonii* & *E. spinosum*

- Uji Spektrofotometer UV-Vis



Persiapan Alat, Bahan, dan Isolat β -Karoten *E. cottonii* & *E. spinosum*



Proses Uji Spektrofotometer UV-Vis isolat β -Karoten *E. cottonii* & *E. spinosum*

Lampiran 1. (Lanjutan)

- Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH



Persiapan Bahan & isolat *β*-Karoten *E. cottonii* & *E. spinosum*



Penimbangan Sampel

Pembuatan Dosis Antioksidan



Proses Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH



Inkubasi Suhu 37°C (30 menit)

Pengukuran Absorbansi (λ 517 nm)



Hasil Pengamatan Uji DPPH

Lampiran 1. (Lanjutan)

- Analisa Total Fenol



Preparasi Bahan & isolat β -Karoten *E. cottonii* & *E. spinosum*



Penambahan Reagen *folin-ciocalteu*

Penambahan Na Carbonat 20%



Pengukuran Absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis (λ 750 nm)

Lampiran 2. Perhitungan Analis Kadar Air

- Data Hasil Analisa Kadara Air

No	Sampel	U _n	Botol Timbang	(Botol Timbang + Sampel Awal)	(Botol Timbang + Sampel Akhir)	Kadar Air	Rerata Kadar Air
1	<i>Eucheuma cottonii</i>	C1	19,4365 g	21,4912 g	19,7282 g	85,80%	86,12%
		C2	25,7335 g	27,7826 g	26,0275 g	85,65%	
		C3	17,9160 g	19,9185 g	18,1781 g	86,91%	
2	<i>Eucheuma spinosum</i>	S1	17,8831 g	19,9689 g	18,3041 g	79,82%	78,88%
		S2	18,2722 g	20,3269 g	18,7150 g	78,45%	
		S3	18,8907 g	20,9436 g	19,3345 g	78,38%	

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

Keterangan:

A = berat botol timbang (g)

B = berat botol timbang + sampel awal (g)

C = berat botol timbang + sampel kering (g)

Kadar Air Sampel *Eucheuma cottonii*

- Ulangan 1 (C1)

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{21,4912 - 19,7282}{21,4912 - 19,4365} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{1,763}{2,0547} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = 85,8033 \%$$

- Ulangan 2 (C2)

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{27,7826 - 26,0275}{27,7826 - 25,7335} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{1,7551}{2,0491} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = 85,6522 \%$$

- Ulangan 3 (C3)

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{19,9185 - 18,1781}{19,9185 - 17,9160} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{1,7404}{2,0025} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = 86,9114 \%$$

- Rata-Rata (C)

$$\text{Rata - Rata} = \frac{C1 + C2 + C3}{n}$$

$$\text{Rata - Rata} = \frac{85,80 + 85,65 + 86,91}{3}$$

$$\text{Rata - Rata} = 86,12 \%$$

Kadar Air Sampel *Eucheuma spinosum*

- Ulangan 1 (S1)

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{19,9689 - 18,3041}{19,9689 - 17,8831} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{1,6648}{2,0858} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = 79,8159 \%$$

- Ulangan 2 (S2)

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{20,3269 - 18,7150}{20,3269 - 18,2722} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{1,6119}{2,0547} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = 78,4494 \%$$

- Ulangan 3 (S3)

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{20,9436 - 19,3345}{20,9436 - 18,8907} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{1,6091}{2,0529} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = 78,3818 \%$$

- Rata-Rata (S)

$$\text{Rata - Rata} = \frac{S1 + S2 + S3}{n}$$

$$\text{Rata - Rata} = \frac{79,82 + 78,45 + 78,38}{3}$$

$$\text{Rata - Rata} = 78,88 \%$$

Lampiran 3. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak Pigmen

- Data Hasil Analisa Rendemen

No	Sampel	U _n	Bobot Bahan yang Diekstrak (g)	Bobot Ekstrak Murni (g)	Kadar Air Sampel	Rendemen	Rata-Rata Rendemen
1	<i>Eucheuma cottonii</i>	C1	100 g	0,2948 g	85,80%	2,0760 %	2,0022 %
		C2	100 g	0,2754 g	85,65%	1,9192 %	
		C3	100 g	0,2633 g	86,91%	2,0115 %	
2	<i>Eucheuma spinosum</i>	S1	100 g	0,2180 g	79,82%	1,0803 %	1,0044 %
		S2	100 g	0,1886 g	78,45%	0,8752 %	
		S3	100 g	0,2287 g	78,38%	1,0578 %	

- Rumus Perhitungan % Rendemen Ekstrak

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{W}{W_0 \times (1 - \text{Kadar Air})} \times 100 \%,$$

Keterangan: W = bobot ekstrak murni (g)

W₀ = bobot bahan yang diekstrak (g)

Rendemen Sampel *Eucheuma cottonii*

• Ulangan 1 (C1)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2948}{100 \times (1 - 0,8580)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2948}{100 \times (0,142)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2948}{14,2} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 2,0760 \%$$

• Ulangan 2 (C2)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2754}{100 \times (1 - 0,8565)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2754}{100 \times (0,1435)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2754}{14,35} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 1,9192 \%$$

• Ulangan 3 (C3)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2633}{100 \times (1 - 0,8691)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2633}{100 \times (0,1309)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2633}{13,09} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 2,0115 \%$$

• Rata-Rata (C)

$$\text{Rata - Rata} = \frac{C1 + C2 + C3}{n}$$

$$\text{Rata - Rata} = \frac{2,0760 + 1,9192 + 2,0115}{3}$$

$$\text{Rata - Rata} = 2,0022 \%$$

Rendemen Sampel *Eucheuma spinosum*

• Ulangan 1 (S1)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2180}{100 \times (1 - 0,7982)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2180}{100 \times (0,2018)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2180}{20,18} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 1,0803 \%$$

• Ulangan 2 (S2)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,1886}{100 \times (1 - 0,7845)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,1886}{100 \times (0,2155)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,1886}{21,55} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 0,8752 \%$$

• Ulangan 3 (S3)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2287}{100 \times (1 - 0,7838)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2287}{100 \times (0,2162)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,2287}{21,62} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 1,0578 \%$$

• Rata-Rata (S)

$$\text{Rata - Rata} = \frac{S1 + S2 + S3}{n}$$

$$\text{Rata - Rata} = \frac{1,0803 + 0,8752 + 1,0578}{3}$$

$$\text{Rata - Rata} = 1,0044 \%$$

Lampiran 4. Perhitungan Kadar Total Karotenoid

- Data Hasil Analisa Total Karotenoid

No	Sampel	Barat (g)	Volume (ml)	U _n	Absorbansi	Kadar Total Karotenoid (μg/100 g)	Rata-Rata Kadar Total Karotenoid (μg/100 g)
1	Ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i>	0,2633	1,6	U1	3,121	9.475,52	9724,4782
				U2	3,341	10.143,45	
				U3	3,148	9.557,50	
2	Ekstrak <i>Eucheuma spinosum</i>	0,2287	1,4	U1	1,175	3.599,56	3954,923
				U2	1,481	4.536,98	
				U3	1,217	3.728,23	

- Rumus Kadar Total Karotenoid

Kadar Total Karotenoid

$$= \frac{\text{Total volume (ml)} \times \text{Absorbansi}}{0,2 \times \text{Berat Sampel (g)}} \times 100 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

- Perhitungan Kadar Total Karotenoid

- Kadar Total Karotenoid Sampel *Eucheuma cottonii*

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = \frac{1,6 \times 3,203}{0,2 \times 0,2633} \times 100 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = \frac{5,1248}{0,05266} \times 100 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = \frac{512,48}{0,05266} \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = 9.742,966 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

- Kadar Total Karotenoid Sampel *Eucheuma spinosum*

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = \frac{1,4 \times 1,291}{0,2 \times 0,2287} \times 100 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = \frac{1,8074}{0,04574} \times 100 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = \frac{180,74}{0,04574} \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

$$\text{Kadar Total Karotenoid} = 3.951,465 \left(\frac{\mu g}{100 g} \right)$$

Lampiran 5. Data Hasil Isolasi β - Karoten Kromatografi Kolom

- Data Hasil Isolasi β - Karoten *Eucheuma cottonii*

No Botol	Warna	Waktu	Konsentrasi Fase Gerak
1	Bening	14:00 WIB	8:2 (N-Hexan:Ethyl Asetat)
2	Kuning Pekat (β- Karoten)	14:05 WIB	(8:2)
3	Kuning Pekat (β- Karoten)	14:07 WIB	(8:2)
4	Kuning Bening	14:09 WIB	(8:2)
5	Kuning Bening	14:13 WIB	(8:2)
6	Bening	14:15 WIB	(8:2)
7	Bening	14:17 WIB	(8:2)
8	Bening	14:20 WIB	(8:2)
9	Bening	14:22 WIB	(8:2)
10	Bening	14:26 WIB	(8:2)
11	Bening	14:30 WIB	(8:2)
12	Bening	14:38 WIB	(8:2)
13	Bening	14:42 WIB	(8:2)
14	Bening	14:46 WIB	(8:2)
15	Bening Kehitaman	14:50 WIB	(8:2)
16	Bening Kehitaman	14:54 WIB	(8:2)
17	Bening Kehitaman	14:59 WIB	7:3 (N-Hexan:Ethyl Asetat)
18	Bening	15:08 WIB	(7:3)
19	Bening	15:12 WIB	(7:3)
20	Bening	15:14 WIB	(7:3)
21	Bening	15:16 WIB	(7:3)
22	Bening	15:21 WIB	(7:3)
23	Bening	15:24 WIB	(7:3)
24	Bening	15:28 WIB	(7:3)
25	Bening Kehijauan	15:32 WIB	(7:3)
26	Bening Kehijauan	15:34 WIB	(7:3)
27	Bening Kehijauan	15:40 WIB	(7:3)
28	Bening	15:44 WIB	(7:3)
29	Bening	15:49 WIB	(7:3)
30	Bening	15:53 WIB	6:4 (N-Hexan:Ethyl Asetat)
31	Bening	15:56 WIB	(6:4)
32	Bening	15:59 WIB	(6:4)
33	Bening	16:09 WIB	(6:4)
34	Bening	16:16 WIB	(6:4)
35	Bening	16:23 WIB	(6:4)
36	Bening	16:29 WIB	(6:4)
37	Bening	16:36 WIB	(6:4)
38	Kuning	16:39 WIB	(6:4)
39	Kuning	16:44 WIB	(6:4)

Lampiran 5. (Lanjutan)

40	Kuning	16:48 WIB	(6:4)
41	Kuning	16:52 WIB	5:5 (N-Hexan:Ethyl Asetat)
42	Kuning	16:56 WIB	(5:5)
43	Kuning Bening	17:01 WIB	(5:5)
44	Kuning Bening	17:03 WIB	(5:5)
45	Bening	17:08 WIB	(5:5)
46	Bening	17:12 WIB	(5:5)
47	Bening	17:16 WIB	(5:5)
48	Bening	17:19 WIB	(5:5)
49	Bening	17:22 WIB	(5:5)
50	Bening	17:26 WIB	(5:5)

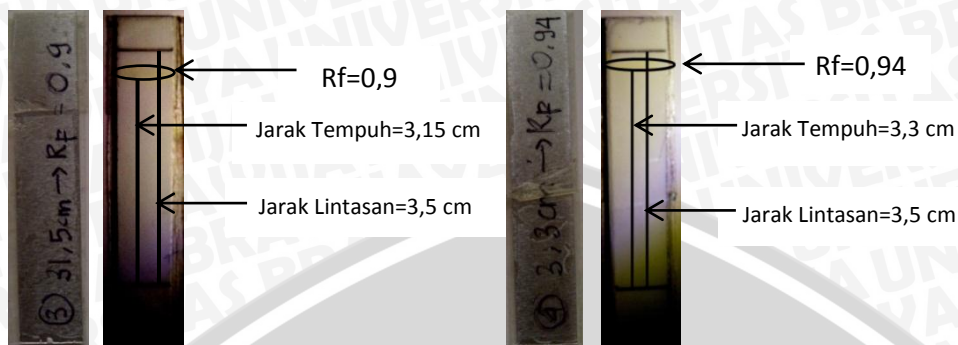
- Data Hasil Isolasi β - Karoten *Eucheuma spinosum*

No Botol	Warna	Waktu	Konsentrasi Fase Gerak
1	Bening	17:30 WIB	8:2 (N-Hexan:Ethyl Asetat)
2	Bening	17:35 WIB	(8:2)
3	Kuning Bening	17:38 WIB	(8:2)
4	Kuning Pekat (β- Karoten)	17:40 WIB	(8:2)
5	Kuning Pekat (β- Karoten)	17:42 WIB	(8:2)
6	Kuning Pekat (β- Karoten)	17:45 WIB	(8:2)
7	Kuning Bening	17:47 WIB	(8:2)
8	Bening	17:54 WIB	(8:2)
9	Bening	17:56 WIB	(8:2)
10	Bening	18:02 WIB	(8:2)
11	Bening	18:09 WIB	(8:2)
12	Bening Kehitaman	18:13 WIB	(8:2)
13	Coklat Kehitaman	18:18 WIB	(8:2)
14	Coklat Kehitaman	18:21 WIB	(8:2)
15	Coklat Kehitaman	18:35 WIB	(8:2)
16	Coklat Bening	18:45 WIB	(8:2)
17	Bening	18:49 WIB	(8:2)
18	Bening	18:54 WIB	(8:2)
19	Bening	19:02 WIB	(8:2)
20	Bening	19:10 WIB	7:3 (N-Hexan:Ethyl Asetat)
21	Bening	19:17 WIB	(7:3)
22	Bening	19:24 WIB	(7:3)
23	Bening	19:31 WIB	(7:3)
24	Bening	19:40 WIB	(7:3)
25	Bening	19:46 WIB	(7:3)
26	Bening	19:55 WIB	(7:3)

Lampiran 5. (Lanjutan)

27	Bening	20:02 WIB	(7:3)
28	Bening	20:09 WIB	(7:3)
29	Bening	20:17 WIB	(7:3)
30	Bening	20:28 WIB	(7:3)
31	Bening	20:33 WIB	6:4 (N-Hexan:Ethyl Asetat)
32	Kuning Bening	20:39 WIB	(6:4)
33	Kuning Bening	20:46 WIB	(6:4)
34	Kuning	20:48 WIB	(6:4)
35	Kuning	20:50 WIB	(6:4)
36	Kuning	20:53 WIB	(6:4)
37	Kuning	20:55 WIB	(6:4)
38	Kuning	20:59 WIB	(6:4)
39	Kuning	21:02 WIB	(6:4)
40	Kuning	21:04 WIB	(6:4)
41	Kuning	21:06 WIB	(6:4)
42	Kuning	21:08 WIB	(6:4)
43	Kuning Bening	21:14 WIB	(6:4)
44	Kuning Bening	21:18 WIB	(6:4)
45	Kuning Bening	21:22 WIB	(6:4)

Lampiran 6. Perhitungan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) β -Karoten



⇒ Rumus Perhitungan Harga Rf (*Retardation Factor*)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

- **Rf Sampel β -Karoten *Eucheuma cottonii***

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

$$\text{Harga Rf} = \frac{3,15 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$\text{Harga Rf} = 0,9$$

- **Rf Sampel β -Karoten *Eucheuma spinosum***

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

$$\text{Harga Rf} = \frac{3,3 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$\text{Harga Rf} = 0,94$$

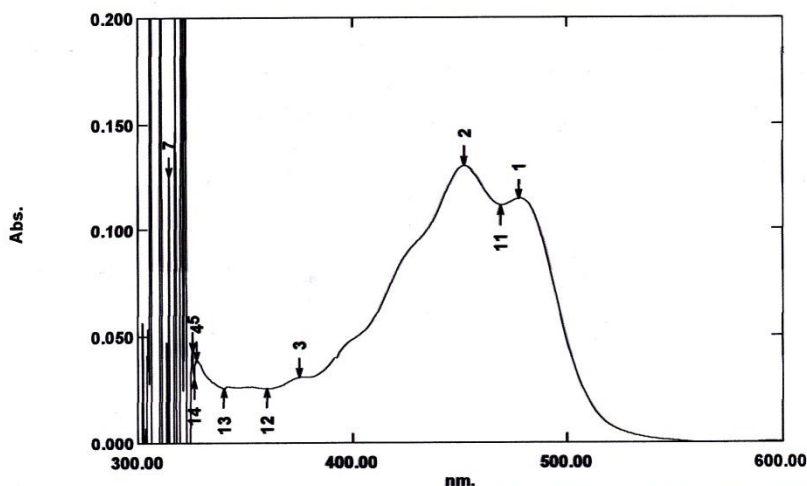
Lampiran 7. Hasil Uji Spektrofotometer UV-Vis β -Karoten

- Uji Spektrofotometer UV-Vis β -Karoten *Eucheuma cottonii*

Spectrum Peak Pick Report

05/26/2014 08:49:10 PM

Data Set: Betakaroten euclidean cottonii - RawData - E:\PERIKANAN\Betakaroten euclidean cottonii.spc



Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 300.00 to 600.00
Scan Speed: Fast
Sampling Interval: 0.2
Auto Sampling Interval: Enabled
Scan Mode: Single

Sample Preparation Properties
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

Instrument Properties
Instrument Type: UV-1600 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 2.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
Attachment:

None

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	477.60	0.115	
2	●	452.00	0.130	
3	●	375.20	0.031	
4	●	327.00	0.039	
5	●	325.20	0.043	
6	●	317.40	0.277	
7	●	314.60	0.126	
8	●	310.40	0.297	
9	●	306.00	1.067	
10	●	574.20	-0.000	
11	●	468.80	0.112	
12	●	360.00	0.025	
13	●	339.80	0.026	
14	●	326.20	0.030	
15	●	318.80	-0.326	
16	●	316.00	-0.241	
17	●	312.00	-0.151	
18	●	307.60	-0.602	

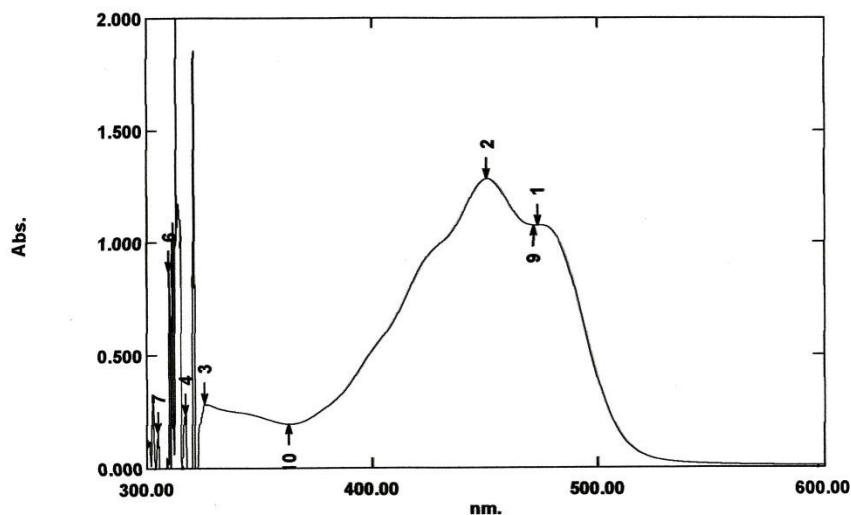
Lampiran 7. (Lanjutan)

- Uji Spektrofotometer UV-Vis β -Karoten *Eucheuma spinosum*

Spectrum Peak Pick Report

06/19/2014 09:31:01 PM

Data Set: Beta karoten Eucheuma spinosum - RawData - E:\PERIKANAN\Beta karoten
Eucheuma spinosum.spc



Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 300.00 to 600.00
Scan Speed: Fast
Sampling Interval: 0.2
Auto Sampling Interval: Enabled
Scan Mode: Single

Sample Preparation Properties
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

Instrument Properties
Instrument Type: UV-1600 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 2.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
Attachment:

None

No.	PV	Wavelength	Abs.	Description
1	●	473.20	1.077	
2	●	451.00	1.283	
3	●	325.40	0.289	
4	●	317.20	0.240	
5	●	313.00	2.013	
6	●	309.80	0.874	
7	●	305.00	0.159	
8	●	597.60	0.008	
9	●	471.40	1.077	
10	●	363.00	0.196	
11	●	321.80	-0.318	
12	●	315.60	0.015	
13	●	310.60	-0.546	
14	●	306.60	-0.328	
15	●	303.80	-0.000	

Lampiran 8. Perhitungan Kadar β -Karoten

• Perhitungan Kadar β -Karoten

- Data Kadar β -Karoten

No	Sampel	fp	U _n	Absorbansi	Kadar β -Karoten (gram)	Rata-Rata Kadar β -Karoten	Standart Deviasi
1	β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i>	10 ¹	U1	1,077	0,004607	0,004745%	0,0003482
			U2	1,283	0,005141		
			U3	1,077	0,004487		
1	β -Karoten <i>Eucheuma spinosum</i>	10 ¹	U1	0,595	0,002384	0,002531%	0,0003374
			U2	0,728	0,002917		
			U3	0,572	0,002292		

- Rumus Kadar β -Karoten (Hukum *Lambert-Beer*), yaitu:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan:

A = Absorbansi

ϵ = Absorptififikasi Molar (*Molar extinction coefficient*)

b = Lebar bagian dalam Cuvet

c = konsentrasi

- Perhitungan Kadar β -Karoten

➤ β -Karoten *Eucheuma cottonii*

• Ulangan 1

$$1,077 = 134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{1,077}{134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = \frac{1,077}{134 \times 10} (1 \text{ mol}^1)$$

$$c = 8,037 \times 10^{-4} (1 \text{ mol})$$

$$\text{Mol} = \left(\frac{g}{Mr_{\beta\text{-karoten}}} \right) \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$8,037 \times 10^{-4} = \left(\frac{x}{536,87} \right) \times \frac{1000}{10}$$

$$x = 8,037 \times 536,87 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,004315 \text{ gram}$$

• Ulangan 2

$$1,283 = 134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{1,283}{134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = \frac{1,283}{134 \times 10} (1 \text{ mol}^1)$$

$$c = 9,575 \times 10^{-4} (1 \text{ mol})$$

$$\text{Mol} = \left(\frac{g}{Mr_{\beta\text{-karoten}}} \right) \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$9,575 \times 10^{-4} = \left(\frac{x}{536,87} \right) \times \frac{1000}{10}$$

$$x = 9,575 \times 536,87 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,005141 \text{ gram}$$

• Ulangan 3

$$1,077 = 134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{1,077}{134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = \frac{1,077}{134 \times 10} (1 \text{ mol}^1)$$

$$c = 8,037 \times 10^{-4} (1 \text{ mol})$$

$$\text{Mol} = \left(\frac{g}{Mr_{\beta\text{-karoten}}} \right) \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$8,037 \times 10^{-4} = \left(\frac{x}{536,87} \right) \times \frac{1000}{10}$$

$$x = 8,037 \times 536,87 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,004315 \text{ gram}$$

Lampiran 8. (Lanjutan)

➤ β -Karoten *Eucheuma spinosum*

• Ulangan 1

$$0,595 = 134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,595}{134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = \frac{0,595}{134 \times 10} (1 \text{ mol}^1)$$

$$c = 4,440 \times 10^{-4} (1 \text{ mol})$$

$$\text{Mol} = \left(\frac{g}{Mr_{\beta\text{-karoten}}} \right) \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$4,440 \times 10^{-4} = \left(\frac{x}{536,87} \right) \times \frac{1000}{10}$$

$$x = 4,440 \times 536,87 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,002384 \text{ gram}$$

• Ulangan 2

$$0,728 = 134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,728}{134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = \frac{0,728}{134 \times 10} (1 \text{ mol}^1)$$

$$c = 5,433 \times 10^{-4} (1 \text{ mol})$$

$$\text{Mol} = \left(\frac{g}{Mr_{\beta\text{-karoten}}} \right) \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$5,433 \times 10^{-4} = \left(\frac{x}{536,87} \right) \times \frac{1000}{10}$$

$$x = 5,433 \times 536,87 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,002917 \text{ gram}$$

• Ulangan 3

$$0,572 = 134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,572}{134 \times 10 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = \frac{0,572}{134 \times 10} (1 \text{ mol}^1)$$

$$c = 4,269 \times 10^{-4} (1 \text{ mol})$$

$$\text{Mol} = \left(\frac{g}{Mr_{\beta\text{-karoten}}} \right) \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$4,269 \times 10^{-4} = \left(\frac{x}{536,87} \right) \times \frac{1000}{10}$$

$$x = 4,269 \times 536,87 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,002292 \text{ gram}$$

• Standart Deviasi β -Karoten *Eucheuma cottonii*

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

$$S = \sqrt{\frac{(0,004607 - 0,004745)^2 + (0,005141 - 0,004745)^2 + (0,004607 - 0,004745)^2}{3 - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(-1,38 \times 10^{-4})^2 + (3,96 \times 10^{-4})^2 + (-1,38 \times 10^{-4})^2}{2}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(1,90 \times 10^{-8}) + (15,68 \times 10^{-8}) + (1,90 \times 10^{-8})}{2}}$$

$$S = \sqrt{\frac{19,49 \times 10^{-8}}{2}}$$

$$S = \sqrt{9,75 \times 10^{-8}}$$

$$S = 3,4815 \times 10^{-4}$$

$$\text{Nilai Rendemen} = 0,004745\% \pm 0,0003482$$

Lampiran 8. (Lanjutan)

- Standart Deviasi β -Karoten *Eucheuma spinosum*

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

$$S = \sqrt{\frac{(0,002384 - 0,002531)^2 + (0,002917 - 0,002531)^2 + (0,002292 - 0,002531)^2}{3 - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(-1,47 \times 10^{-4})^2 + (3,86 \times 10^{-4})^2 + (-2,39 \times 10^{-4})^2}{2}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(2,16 \times 10^{-8}) + (14,90 \times 10^{-8}) + (5,71 \times 10^{-8})}{2}}$$

$$S = \sqrt{\frac{22,77 \times 10^{-8}}{2}}$$

$$S = \sqrt{11,39 \times 10^{-8}}$$

$$S = 3,3749 \times 10^{-4}$$

Nilai Rendemen = 0,002531% $\pm$ 0,0003374



Lampiran 9. Perhitungan Pembuatan Larutan dan Bahan

⇒ Pembuatan Larutan DPPH 0,2 μM dalam 100 ml Etanol 95%.

- Pembuatan Larutan DPPH 0,2 μM

Diketahui : Konsentrasi = 0,2 μM

Volume = 100 ml

Mr DPPH ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) = 394,33 g/mol

Ditanya : Gram DPPH yang dibutuhkan = g ?

Jawab :

$$\text{Mol} = 100 \text{ ml} \times 0,2 \mu\text{M}$$

$$= 20 \mu\text{mol}$$

$$= 0,00002 \text{ mol}$$

$$\text{Gram} = \text{mol} \times \text{Mr}$$

$$= 0,00002 \text{ mol} \times 394,33 \text{ g/mol}$$

$$= 0,007887 \text{ g}$$

$$= 7,887 \text{ mg}$$

$$= 8 \text{ mg}$$

⇒ Perhitungan Bahan Antioksidan Konsentrasi (5,10,15, 20, 25, dan 50 ppm) dalam 100 ml Etanol 95%.

Diket : ppm = mg/1000 ml $\Rightarrow$ ppm = mg/1L

Volume = 100 ml $\Rightarrow$ ppm = mg/0,1L

- Perhitungan Bahan BHT

$$- 5 \text{ ppm} = \text{mg}/0,1 \text{ L}$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 5 \times 0,1$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 0,5 \text{ mg}$$

$$\text{g}_{\text{Sampel}} = 0,0005 \text{ gram}$$

$$- 10 \text{ ppm} = \text{mg}/0,1 \text{ L}$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 10 \times 0,1$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 1,0 \text{ mg}$$

$$\text{g}_{\text{Sampel}} = 0,0010 \text{ gram}$$

$$- 15 \text{ ppm} = \text{mg}/0,1 \text{ L}$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 15 \times 0,1$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 1,5 \text{ mg}$$

$$\text{g}_{\text{Sampel}} = 0,0015 \text{ gram}$$

$$- 20 \text{ ppm} = \text{mg}/0,1 \text{ L}$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 20 \times 0,1$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 2,0 \text{ mg}$$

$$\text{g}_{\text{Sampel}} = 0,0020 \text{ gram}$$

$$- 25 \text{ ppm} = \text{mg}/0,1 \text{ L}$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 25 \times 0,1$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 2,5 \text{ mg}$$

$$\text{g}_{\text{Sampel}} = 0,0025 \text{ gram}$$

$$- 50 \text{ ppm} = \text{mg}/0,1 \text{ L}$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 50 \times 0,1$$

$$\text{mg}_{\text{Sampel}} = 5,0 \text{ mg}$$

$$\text{g}_{\text{Sampel}} = 0,0050 \text{ gram}$$

Lampiran 9. (Lanjutan)

- Perhitungan Pengenceran β -Karoten *Eucheuma cottonii*

Diketahui : Sampel Stok = 0,007 g = 7 mg

Volume = 100 ml

ppm = mg/1000 ml $\Rightarrow$ ppm = mg/1L

Volume = 100 ml $\Rightarrow$ ppm = 0,1 mg/100ml

➤ Konsentrasi Sampel Stok

β -Karoten *E. cottonii*

$$\frac{1 \text{ ppm}}{x \text{ ppm}} = \frac{0,1 \text{ mg}/100 \text{ ml}}{7 \text{ mg}/100 \text{ ml}}$$

$$\frac{1}{x} = \frac{0,1}{7}$$

$$7 = 0,1 x$$

$$x = \frac{7}{0,1}$$

$$x = 70 \text{ ppm}$$

➤ Perhitungan Pengenceran

Konsentrasi

Diketahui :

Konsentrasi Stok = 70 ppm

Volume Sampel = 100 ml

- Konsentrasi 50 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 70 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 50 \\ V_1 &= \frac{5000 \text{ ml}}{70} \\ V_1 &= 71,42 \text{ ml} \\ V_1 &= 71 \text{ ml} \end{aligned}$$

>Jadi 71 ml sampel Stok + 29 ml

Etanol 95%

- Konsentrasi 25 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 70 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 25 \\ V_1 &= \frac{2500 \text{ ml}}{70} \\ V_1 &= 35,71 \text{ ml} \\ V_1 &= 36 \text{ ml} \end{aligned}$$

>Jadi 36 ml (sampel 70 ppm) +

64 ml Etanol 95%

- Konsentrasi 20 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 25 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 20 \\ V_1 &= \frac{2000 \text{ ml}}{25} \\ V_1 &= 80 \text{ ml} \end{aligned}$$

>Jadi 80 ml (sampel 25 ppm) +

20 ml Etanol 95%

- Konsentrasi 15 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 20 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 15 \\ V_1 &= \frac{1500 \text{ ml}}{20} \\ V_1 &= 75 \text{ ml} \end{aligned}$$

>Jadi 75 ml (sampel 20 ppm) +

25 ml Etanol 95

- Konsentrasi 10 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 15 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 10 \\ V_1 &= \frac{1000 \text{ ml}}{15} \\ V_1 &= 66,7 \text{ ml} \\ V_1 &= 67 \text{ ml} \end{aligned}$$

>Jadi 67 ml (sampel 15 ppm) +

33 ml Etanol 95%

- Konsentrasi 5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 10 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 5 \\ V_1 &= \frac{500 \text{ ml}}{10} \\ V_1 &= 50 \text{ ml} \end{aligned}$$

>Jadi 50 ml (sampel 10 ppm) +

50 ml Etanol 95%

Lampiran 9. (Lanjutan)

- Perhitungan Pengenceran β -Karoten *Eucheuma spinosum*

Diketahui : Sampel Stok = 0,0095 g = 95 mg

Volume = 100 ml

ppm = mg/1000 ml $\Rightarrow$ ppm = mg/1L

Volume = 100 ml $\Rightarrow$ ppm = 0,1 mg/100ml

➤ Konsentrasi Sampel Stok

β -Karoten *E. spinosum*

$$\frac{1 \text{ ppm}}{x \text{ ppm}} = \frac{0,1 \text{ mg}/100 \text{ ml}}{9,5 \text{ mg}/100 \text{ ml}}$$

$$\frac{1}{x} = \frac{0,1}{9,5}$$

$$7 = 0,1 x$$

$$x = \frac{9,5}{0,1}$$

$$x = 95 \text{ ppm}$$

➤ Perhitungan Pengenceran

Konsentrasi

Diketahui :

Konsentrasi Stok = 95 ppm

Volume Sampel = 100 ml

- Konsentrasi 50 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 95 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 50 \\ V_1 &= \frac{5000 \text{ ml}}{95} \end{aligned}$$

$$V_1 = 52,63 \text{ ml}$$

$$V_1 = 53 \text{ ml}$$

>Jadi 53 ml sampel Stok + 47 ml

Etanol 95%

Konsentrasi 25 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 95 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 25 \\ V_1 &= \frac{2500 \text{ ml}}{95} \end{aligned}$$

$$V_1 = 26,31 \text{ ml}$$

>Jadi 26 ml (sampel 95 ppm) +

24 ml Etanol 95%

- Konsentrasi 20 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 25 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 20 \\ V_1 &= \frac{2000 \text{ ml}}{25} \end{aligned}$$

$$V_1 = 80 \text{ ml}$$

>Jadi 80 ml (sampel 25 ppm) +

20 ml Etanol 95%

- Konsentrasi 15 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 20 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 15 \\ V_1 &= \frac{1500 \text{ ml}}{20} \end{aligned}$$

$$V_1 = 75 \text{ ml}$$

>Jadi 75 ml (sampel 20 ppm) +

25 ml Etanol 95%

- Konsentrasi 10 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 15 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 10 \\ V_1 &= \frac{1000 \text{ ml}}{15} \end{aligned}$$

$$V_1 = 66,67 \text{ ml}$$

$$V_1 = 67 \text{ ml}$$

>Jadi 67 ml (sampel 15 ppm) +

33 ml Etanol 95%

- Konsentrasi 5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 10 \text{ ppm} &= 100 \text{ ml} \times 5 \\ V_1 &= \frac{500 \text{ ml}}{10} \end{aligned}$$

$$V_1 = 50 \text{ ml}$$

>Jadi 50 ml (sampel 10 ppm) +

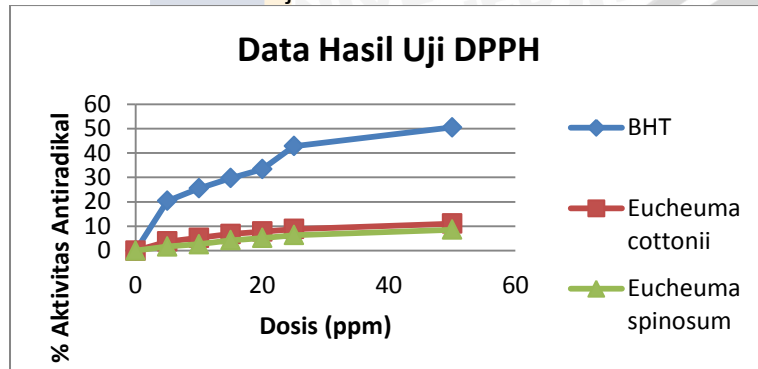
50 ml Etanol 95%

Lampiran 10. Data & Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidasi Metode DPPH

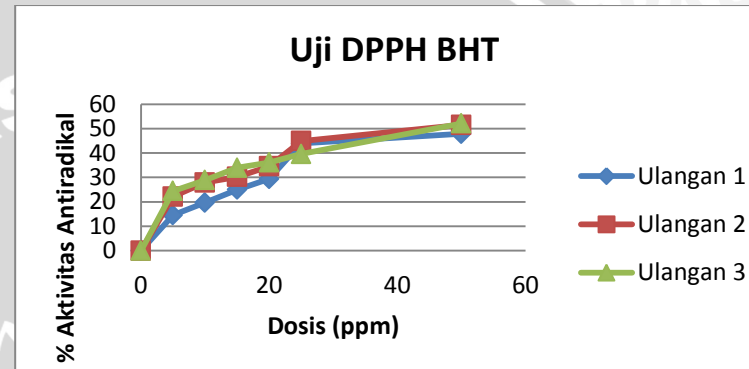
No	Sampel	Kons. (ppm)	Abs. U1	Abs. U2	Abs. U3	Inhibisi U1 (%)	Inhibisi U2 (%)	Inhibisi U3 (%)	Rerata Inhibisi	IC ₅₀ U1 (ppm)	IC ₅₀ U2 (ppm)	IC ₅₀ U3 (ppm)	Rata-Rata IC ₅₀ (ppm)
1	BHT	0	0,453	0,483	0,495	0	0	0	0	44,3371	40,1180	40,5043	41,6959
		5	0,387	0,376	0,374	14,5695	22,1532	24,4444	20,3890				
		10	0,364	0,348	0,352	19,6468	27,9503	28,8889	25,4953				
		15	0,340	0,337	0,327	24,9448	30,2277	33,9394	29,7040				
		20	0,320	0,316	0,316	29,3598	34,5756	36,1616	33,3657				
		25	0,254	0,266	0,299	43,9294	44,9275	39,5960	42,8176				
		50	0,236	0,234	0,237	47,9029	51,5528	52,1212	50,5256				
2	β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i>	0	0,616	0,617	0,614	0	0	0	0	261,3062	241,6894	214,3695	237,8709
		5	0,597	0,592	0,590	3,0844	4,0519	3,9088	3,6817				
		10	0,583	0,586	0,582	5,3571	5,0243	5,2117	5,1977				
		15	0,570	0,579	0,572	7,4675	6,1588	6,8404	6,8222				
		20	0,572	0,568	0,563	7,1429	7,9417	8,3062	7,7969				
		25	0,563	0,562	0,559	8,6039	8,9141	8,9577	8,8252				
		50	0,554	0,550	0,539	10,0649	10,8590	12,2150	11,0463				
3	β -Karoten <i>Eucheuma spinosum</i>	0	0,598	0,597	0,609	0	0	0	0	308,5143	292,1086	270,2886	289,6992
		5	0,593	0,592	0,588	0,8361	0,8432	3,4483	1,7092				
		10	0,584	0,586	0,587	2,3411	1,8425	3,6125	2,5987				
		15	0,581	0,575	0,571	2,8428	3,6851	6,2397	4,2559				
		20	0,571	0,570	0,570	4,5151	4,5226	6,4039	5,1472				
		25	0,570	0,563	0,557	4,6823	5,6951	8,5386	6,3053				
		50	0,550	0,548	0,551	8,0268	8,2077	9,5238	8,5861				

Lampiran 10. (Lanjutan)

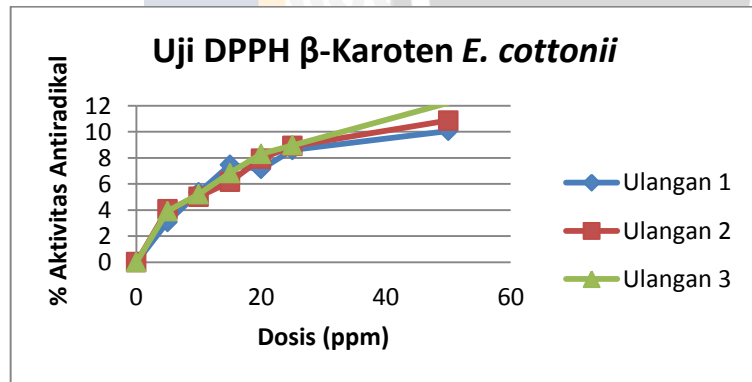
- Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan



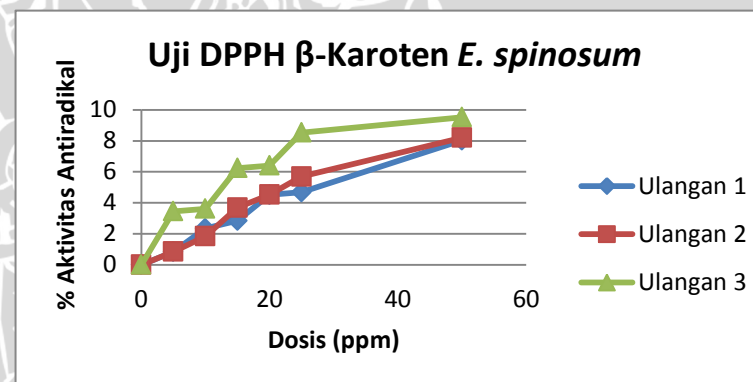
Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan



Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel BHT



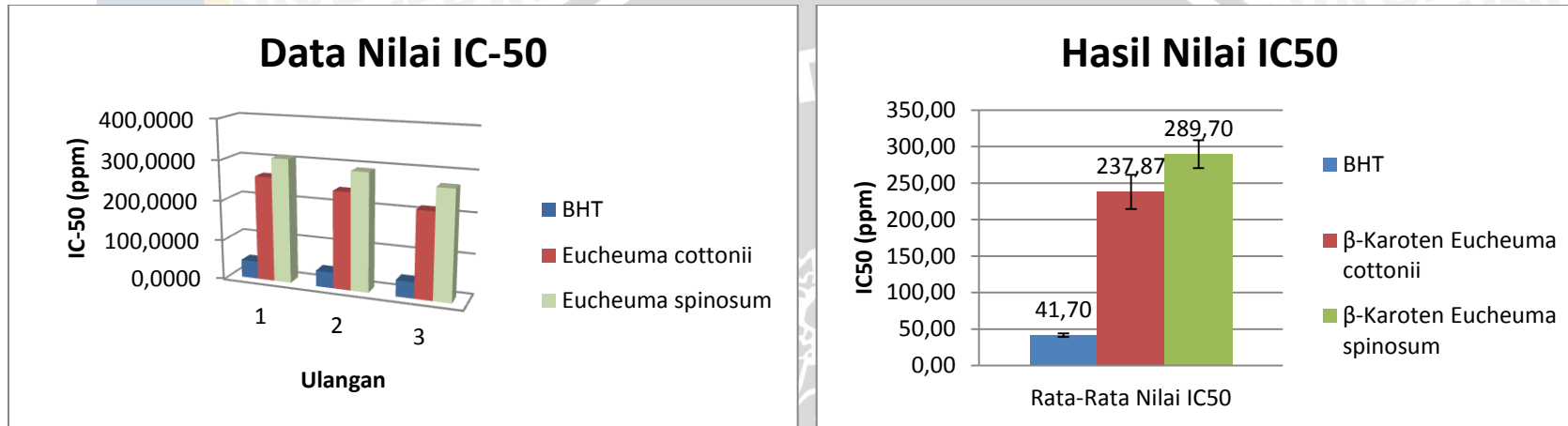
Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel β -Karoten *E. cottonii*



Grafik Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel β -Karoten *E. spinosu*

Lampiran 10. (Lanjutan)

- Grafik Hasil Nilai IC₅₀



Grafik Nilai IC₅₀ Sampel BHT, β-Karoten *E. cottonii*, β-Karoten *E. spinosum*

Lampiran 11. Perhitungan % Aktivitas Antiradikal DPPH

- Data Hasil Nilai Absorbansi Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

No	Sampel	Kons. (ppm)	Abs. U1	Abs. U2	Abs. U3	Inhibisi U1 (%)	Inhibisi U2 (%)	Inhibisi U3 (%)
1	BHT	0	0,453	0,483	0,495	0	0	0
		5	0,387	0,376	0,374	14,57	22,15	24,44
		10	0,364	0,348	0,352	19,65	27,95	28,89
		15	0,340	0,337	0,327	24,94	30,23	33,94
		20	0,320	0,316	0,316	29,36	34,58	36,16
		25	0,254	0,266	0,299	43,93	44,93	39,60
		50	0,236	0,234	0,237	47,90	51,55	52,12
2	β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i>	0	0,616	0,617	0,614	0	0	0
		5	0,597	0,592	0,590	3,08	4,05	3,91
		10	0,583	0,586	0,582	5,36	5,02	5,21
		15	0,570	0,579	0,572	7,47	6,16	6,84
		20	0,572	0,568	0,563	7,14	7,94	8,31
		25	0,563	0,562	0,559	8,60	8,91	8,96
		50	0,554	0,550	0,539	10,06	10,86	12,22
3	β -Karoten <i>Eucheuma spinosum</i>	0	0,598	0,597	0,609	0	0	0
		5	0,593	0,592	0,588	0,84	0,84	3,45
		10	0,584	0,586	0,587	2,34	1,84	3,61
		15	0,581	0,575	0,571	2,84	3,69	6,24
		20	0,571	0,570	0,570	4,52	4,52	6,40
		25	0,570	0,563	0,557	4,68	5,70	8,54
		50	0,550	0,548	0,551	8,03	8,21	9,52

- Rumus % Aktivitas Antiradikal (% Inhibisi)

$$\% \text{ Aktivitas antiradikal} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

- Perhitungan Aktivitas Antiradikal (% Inhibisi)

➤ **% Aktivitas Antiradikal Sampel BHT**

- Dosis 5 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,477 - 0,379}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,098}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 20,3890 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 20,39 \%$$

- Dosis 10 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,477 - 0,355}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,122}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 25,4953 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 25,50 \%$$

- Dosis 15 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,477 - 0,335}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,142}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 29,7040 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 29,70 \%$$

- Dosis 20 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,477 - 0,317}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,16}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 33,3657 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 33,37 \%$$

Lampiran 11. (Lanjutan)

- Dosis 25 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,477 - 0,273}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,204}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 42,8176 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 42,82 \%$$

- Dosis 50 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,477 - 0,266}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,211}{0,477} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 50,5256 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 50,53 \%$$

➤ % Aktivitas Antiradikal Sampel β-Karoten *Eucheuma cottonii*

- Dosis 5 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,616 - 0,593}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,023}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 3,6817 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 3,68 \%$$

- Dosis 10 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,616 - 0,584}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,032}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 5,1977 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 5,20 \%$$

- Dosis 15 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,616 - 0,574}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,042}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 6,8222 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 6,82 \%$$

- Dosis 20 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,616 - 0,568}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,048}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 7,7969 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 7,80 \%$$

- Dosis 25 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,616 - 0,561}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,055}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 8,8252 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 8,83 \%$$

- Dosis 50 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,616 - 0,548}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,068}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 11,0463 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 11,05 \%$$

➤ % Aktivitas Antiradikal Sampel β-Karoten *Eucheuma spinosum*

- Dosis 5 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,601 - 0,592}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,009}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 1,7092 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 1,71 \%$$

- Dosis 10 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,601 - 0,586}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,015}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 2,5987 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 2,60 \%$$

- Dosis 15 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,601 - 0,576}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,025}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 4,2559 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 4,26 \%$$

- Dosis 20 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,601 - 0,570}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,031}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 5,1472 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 5,15 \%$$

- Dosis 25 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,601 - 0,563}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,038}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 6,3053 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 6,31 \%$$

- Dosis 50 ppm

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,601 - 0,550}{0,616} \times 100 \%$$

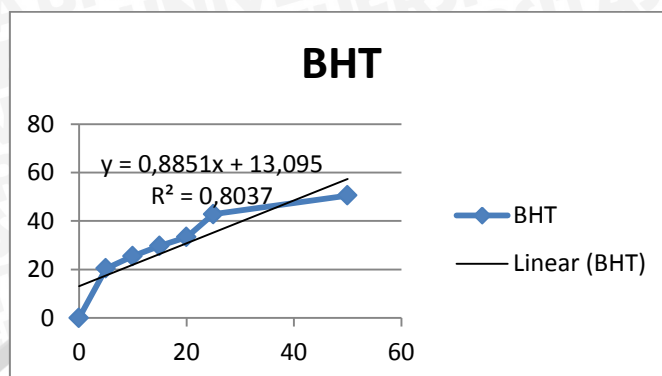
$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{0,051}{0,616} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 8,5861 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 8,59 \%$$

Lampiran 12. Perhitungan Nilai IC₅₀

- Nilai IC₅₀ Sampel BHT



Kurva % Aktivitas Antiradikal Sampel BHT

- Perhitungan Nilai IC₅₀ Sampel BHT

Diketahui : Persamaan BHT

$$y = 0,8851x + 13,095$$

$$R = 0,8037$$

Ditanya : Nilai IC₅₀ BHT =ppm ?

Jawab :

$$y = 0,8851x + 13,095$$

$$50 = 0,8851x + 13,095$$

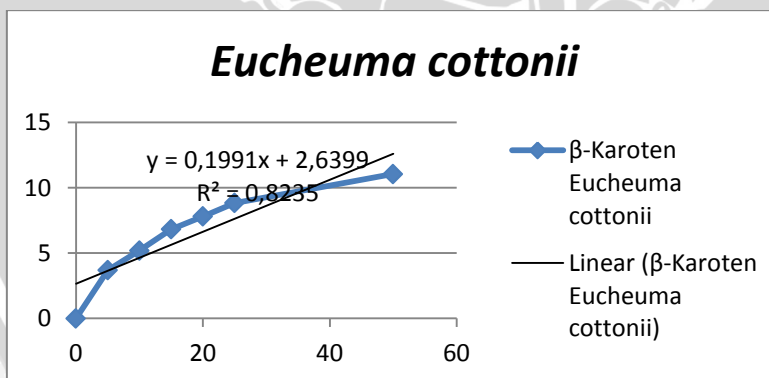
$$x = \frac{50 - 13,095}{0,8851}$$

$$x = \frac{36,905}{0,8851}$$

$$x = 41,6959$$

$$x = 41,70 \text{ ppm}$$

- Nilai IC₅₀ Sampel β-Karoten *Eucheuma cottonii*



Kurva % Aktivitas Antiradikal Sampel β-Karoten *Eucheuma cottonii*

- Perhitungan Nilai IC₅₀ Sampel β-Karoten *Eucheuma cottonii*

Diketahui :

Persamaan β-Karoten *E. cottonii*

$$y = 0,1991x + 2,6399$$

$$R = 0,8285$$

Ditanya : Nilai IC₅₀ =ppm ?

Jawab :

$$y = 0,1991x + 2,6399$$

$$50 = 0,1991x + 2,6399$$

$$x = \frac{50 - 2,6399}{0,1991}$$

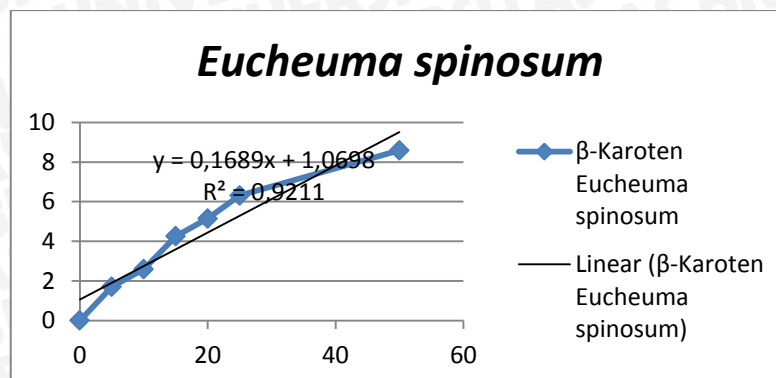
$$x = \frac{47,3601}{0,1991}$$

$$x = 237,8709$$

$$x = 237,87 \text{ ppm}$$

Lampiran 12. (Lanjutan)

- Nilai IC₅₀ Sampel β-Karoten *Eucheuma spinosum*



Kurva % Aktivitas Antiradikal Sampel β-Karoten *Eucheuma spinosum*

- Perhitungan Nilai IC₅₀ Sampel β-Karoten *Eucheuma spinosum*

Diketahui :

Persamaan β-Karoten *E. spinosum*

$$y = 0,1689x + 1,0698$$

$$R = 0,9211$$

Ditanya : Nilai IC₅₀ =ppm ?

Jawab :

$$y = 0,1689x + 1,0698$$

$$50 = 0,1689x + 1,0698$$

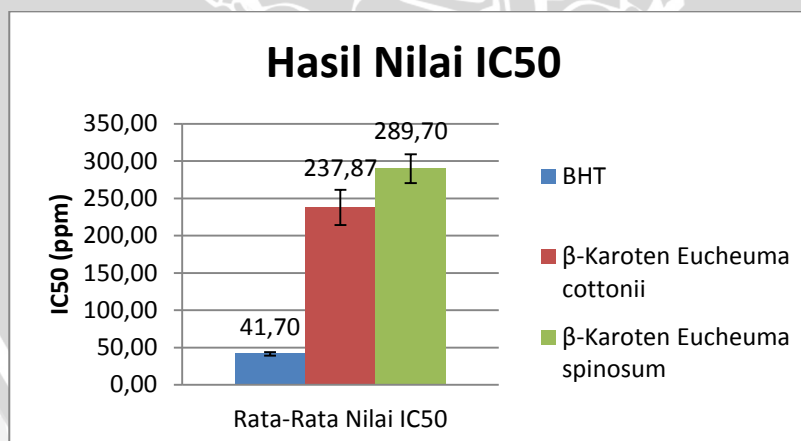
$$x = \frac{50 - 1,0698}{0,1689}$$

$$x = \frac{48,9302}{0,1689}$$

$$x = 289,6992$$

$$x = 289,70 \text{ ppm}$$

- Grafik Data Hasil Nilai IC₅₀ Uji Aktivitas Antioksidan β-Karoten

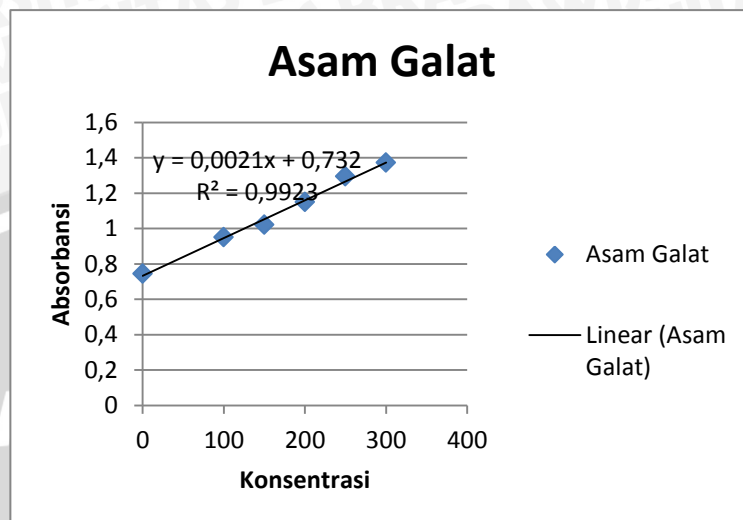


Grafik Nilai IC₅₀ Uji Aktivitas Antioksidan β-Karoten.

Lampiran 13. Perhitungan Analisa Total Fenol

- Data Kurva Standart Asam Galat

No	Sampel	Kons. (ppm)	Abs.
1	Asam Galat	0	0,744
2	Asam Galat	100	0,950
3	Asam Galat	150	1,021
4	Asam Galat	200	1,150
5	Asam Galat	250	1,295
6	Asam Galat	300	1,372



- Data Hasil Analisa Total Fenol β -Karoten

No	Sampel	U _n	Bobot Sampel (mg)	Abs.	Konsentrasi Sampel (mg/L)	Total Fenol Ekstrak (mg GAE/g)	Total Fenol β -Karoten (mg GAE/g)	Rerata Total Fenol (mg GAE/g)
1	β -Karoten <i>Eucheuma cottonii</i>	1	1,70	1,182	214,29	126,05	2,52	1,73
		2	1,72	1,040	146,67	85,27	1,71	
		3	1,68	0,900	80,00	47,62	0,95	
2	β -Karoten <i>Eucheuma spinosum</i>	1	1,65	1,200	222,86	135,06	1,35	1,23
		2	1,57	1,286	263,81	168,03	1,68	
		3	1,58	0,948	102,86	65,10	0,65	

- Perhitungan Nilai Konsentrasi β -Karoten *E. cottonii* & β -Karoten *E. spinosum*

Diketahui : Persamaan Kurva Standart Asam Galat

$$y = 0,0021x + 0,732$$

$$R = 0,9923$$

Ditanya : Konsentrasi Sampel =ppm ?

Jawab :

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 1)

$$y = 0,0021x + 0,732$$

$$1,182 = 0,0021x + 0,732$$

$$x = \frac{1,182 - 0,732}{0,0021}$$

$$x = \frac{0,450}{0,0021}$$

$$x = 214,29 \text{ ppm}$$

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 2)

$$y = 0,0021x + 0,732$$

$$1,040 = 0,0021x + 0,732$$

$$x = \frac{1,040 - 0,732}{0,0021}$$

$$x = \frac{0,308}{0,0021}$$

$$x = 146,67 \text{ ppm}$$

Lampiran 13. (Lanjutan)

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 3)

$$y = 0,0021 x + 0,732$$

$$0,900 = 0,0021 x + 0,732$$

$$x = \frac{0,900 - 0,732}{0,0021}$$

$$x = \frac{0,168}{0,0021}$$

$$x = 80 \text{ ppm}$$

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 1)

$$y = 0,0021 x + 0,732$$

$$1,200 = 0,0021 x + 0,732$$

$$x = \frac{1,200 - 0,732}{0,0021}$$

$$x = \frac{0,468}{0,0021}$$

$$x = 222,86 \text{ ppm}$$

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 2)

$$y = 0,0021 x + 0,732$$

$$1,286 = 0,0021 x + 0,732$$

$$x = \frac{1,286 - 0,732}{0,0021}$$

$$x = \frac{0,554}{0,0021}$$

$$x = 263,81 \text{ ppm}$$

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 3)

$$y = 0,0021 x + 0,732$$

$$0,948 = 0,0021 x + 0,732$$

$$x = \frac{0,948 - 0,732}{0,0021}$$

$$x = \frac{0,216}{0,0021}$$

$$x = 102,86 \text{ ppm}$$

- Perhitungan Total Fenol β -Karoten *E. cottonii* & β -Karoten *E. spinosum*

$$\text{Diketahui : Total Fenol} = \frac{\text{Konsentrasi (mg/L)} \times \text{fp} \times 10^{-3} (\text{L/ml})}{\text{Bobot Sampel (mg)} \times 10^{-3} (\text{g/mg})}$$

$$\text{Ditanya : Total Fenol} = \dots \text{ mg GAE/g}_{\text{Ekstrak}} ?$$

Jawab :

- Sampel β -Karoten *Eucheuma cottonii*

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 1)

$$\text{Total Fenol} = \frac{214,2857 \times 1 \times 10^{-3}}{1,7 \times 10^{-3}}$$

$$\text{Total Fenol} = \frac{214,2857}{1,7}$$

$$\text{Total Fenol} = 126,05 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 2)

$$\text{Total Fenol} = \frac{146,6667 \times 1 \times 10^{-3}}{1,72 \times 10^{-3}}$$

$$\text{Total Fenol} = \frac{146,6667}{1,72}$$

$$\text{Total Fenol} = 85,27 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 1)

$$\text{Total Fenol} = \frac{80 \times 1 \times 10^{-3}}{1,68 \times 10^{-3}}$$

$$\text{Total Fenol} = \frac{80}{1,68}$$

$$\text{Total Fenol} = 47,62 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel β -Karoten *Eucheuma spinosum*

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 1)

$$\text{Total Fenol} = \frac{222,8571 \times 1 \times 10^{-3}}{1,65 \times 10^{-3}}$$

$$\text{Total Fenol} = \frac{222,8571}{1,65}$$

$$\text{Total Fenol} = 135,06 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 2)

$$\text{Total Fenol} = \frac{236,8095 \times 1 \times 10^{-3}}{1,57 \times 10^{-3}}$$

$$\text{Total Fenol} = \frac{236,8095}{1,57}$$

$$\text{Total Fenol} = 168,03 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 3)

$$\text{Total Fenol} = \frac{102,8571 \times 1 \times 10^{-3}}{1,58 \times 10^{-3}}$$

$$\text{Total Fenol} = \frac{102,8571}{1,58}$$

$$\text{Total Fenol} = 65,10 \text{ mg GAE/g}$$

Lampiran 13. (Lanjutan)

- Perhitungan Kadar Total Fenol β -Karoten *E. cottonii* & β -Karoten *E. spinosum*

$$\text{Diketahui : Kadar Total Fenol} = \frac{\text{Total Fenol}}{1 \text{ g (ekstrak)}} \times \frac{1 \text{ g}(\beta\text{-karoten})}{\text{rendemen}}$$

Ditanya : Total Fenol = mg GAE/g β -karoten ?

– β -Karoten *Eucheuma cottonii*

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 1)

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{126,05 \text{ mg GAE}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1/0,02}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 126,05 \times 0,02$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 2,521 \text{ mg GAE/g}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 2,52 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 2)

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{85,27 \text{ mg GAE}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1/0,02}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 85,27 \times 0,02$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 1,7054 \text{ mg GAE/g}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 1,71 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. cottonii* (Ulangan 1)

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{47,62 \text{ mg GAE}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1/0,02}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 47,62 \times 0,02$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 0,9524 \text{ mg GAE/g}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 0,95 \text{ mg GAE/g}$$

– β -Karoten *Eucheuma spinosum*

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 1)

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{135,06 \text{ mg GAE}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1/0,01}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 135,06 \times 0,01$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 1,3506 \text{ mg GAE/g}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 1,35 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 2)

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{168,03 \text{ mg GAE}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1/0,01}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 168,03 \times 0,01$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 1,6803 \text{ mg GAE/g}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 1,68 \text{ mg GAE/g}$$

- Sampel *E. spinosum* (Ulangan 3)

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{65,10 \text{ mg GAE}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1/0,01}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 65,10 \times 0,01$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 0,6510 \text{ mg GAE/g}$$

$$\text{Kadar Total Fenol} = 0,65 \text{ mg GAE/g}$$