

**PENGARUH KOMBINASI PEMBEKUAN DAN FERMENTASI DENGAN STARTER
Trichoderma viride TERHADAP AKTIFITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR
ALGA COKLAT *Sargassum filipendula***

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

Oleh:
HARRIS FRILINGGA KUSUMA
NIM. 0710830032



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2014

**PENGARUH KOMBINASI PEMBEKUAN DAN FERMENTASI DENGAN STARTER
Trichoderma viride TERHADAP AKTIFITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR
ALGA COKLAT *Sargassum filipendula***

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

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

Oleh:
HARRIS FRILINGGA KUSUMA
NIM. 0710830032



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2014

SKRIPSI

PENGARUH KOMBINASI PEMBEKUAN DAN FERMENTASI DENGAN STARTER
Trichoderma viride TERHADAP AKTIFITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR
ALGA COKLAT *Sargassum filipendula*

Oleh:

HARRIS FRILINGGA KUSUMA

NIM. 0710830032

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 27 Januari 2014
dan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. : _____
Tanggal : _____

Menyetujui
Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Hardoko, MS)
NIP. 19620108 198802 1 001

Dosen Penguji II

(Ir. Darius M. Biotech)
NIP. 19500531 198103 1 003

Menyetujui
Dosen Pembimbing I

(Ir. Bambang Budi Sasmito, MS)
NIP. 19570119 198601 1 001

Dosen Pembimbing II

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

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuansaya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah tertulis 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 dnegan hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 27 Januari 2014

Mahasiswa,

Harris Frilingga Kusuma
0710830032



RINGKASAN

HARRIS FRILINGGA KUSUMA 0710830032. Pengaruh Kombinasi Pembekuan Dan Fermentasi Dengan Starter *Trichoderma Viride* Terhadap Aktifitas Antioksidan Ekstrak Kasar Alga Coklat *Sargassum filipendula* (dibawah bimbingan Ir. BAMBANG BUDI SASMITO,MS Dan Dr. Ir. HARTATI KARTIKANINGSIH,MS).

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

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

Proses pembekuan lambat akan menyebabkan *freezing injury* atau sel akan terluka akibat terbentuknya kristal es. Pada saat mencair sel akan mengalami rigiditas/ kekakuan dan dehidrasi sehingga terjadi kerusakan sel dan jaringan menjadi lunak.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada Bulan Januari 2012- Mei 2013. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kombinasi pembekuan dan fermentasi yang terbaik untuk mengekstrak antioksidan dari *Sargassum filipendula*.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan utama. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mencari nilai optimum dari variable-variabel pada proses pembekuan dan fermentasi dan penelitian utama untuk mengetahui perlakuan terbaik dari kombinasi keduanya yang ditambah jamur *Trichoderma viride*. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Uji t yang terdiri dari 2 faktor, 4 kali ulangan. Parameter uji yang digunakan ada dua yaitu kuantitatif dan kualitatif. Parameter kualitatifnya yaitu uji senyawa fitokimia sedangkan parameter kuantitatifnya yaitu jumlah rendemen, kadar air, total senyawa fenol dan nilai IC50. Untuk mengetahui kombinasi terbaik dilakukan analisis Uji t pada taraf 5%.

Hasil penelitian menunjukkan kombinasi pembekuan yang dilanjutkan fermentasi dengan kombinasi fermentasi yang dilanjutkan pembekuan tidak memberikan perbedaan yang nyata. Kedua kombinasi tersebut memiliki nilai dari parameter kadar air berkisar 94,67-96,53%, rendemen filtrat kering berkisar 1,65-2,27%, Total fenol berkisar 114,01-116,56%, IC50 berkisar 142,59-144,45. Uji fitokimia menunjukkan bahwa filtrat sampel positif mengandung senyawa Alkaloid, Flavonoid dan Fenolik.

KATA PENGANTAR

Atas berkat dan rahmat karunia Allah SWT, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Pengaruh kombinasi pembekuan dan fermentasi dengan starter trichoderma viride terhadap aktifitas antioksidan ekstrak kasar alga coklat sargassum filipendula. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana perikanan di fakultas perikanan dan ilmu kelautan, universitas brawijaya malang.

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Allah SWT, yang telah memberikan kelancaran dan kemudahan.
2. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS, selaku dosen Pembimbing I dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen Pembimbing II yang telah dengan sabar membimbing serta kedua dosen penguji saya, Dr. Ir. Hardoko, MS selaku penguji I dan Ir. Darius M. Biotech selaku penguji II.
3. Ibu, Alm. Bapak, Hima, Tante Yuni, Almh. Tante Sumar, terima kasih atas doa dan dukungan finansialnya.
4. Teman-teman Tim Antioksidan yang bersama-sama membantu Anita, Agus, Dewi, Ester dan Tim Antioksidan 2009 Niken, Devita, Ocha terima kasih atas semangat dan kerjasamanya.
5. Mar'atul Mukarromah yang membantu dukungan moral dan semangat.

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

Malang, Februari 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah	3
1.3. Tujuan penelitian.....	3
1.4. Hipotesis	4
1.5 Kegunaan penelitian	4
1.6 Tempat dan Waktu	4

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alga coklat	5
2.2. <i>Sargassum fillipendula</i>	7
2.3. Freezing Injury dan Pembekuan	8
2.4. Fermentasi	12
2.5. <i>Trichoderma viride</i>	13
2.6. Dinding Sel.....	15
2.7. Enzim selulase.....	16
2.8. Antioksidan	18
2.9. Radikal bebas	20
2.10. Ekstraksi	21
2.11. Pelarut.....	22
2.12. Uji aktivitas senyawa antioksidan.....	23
2.13 GC-MS (Gas Chromathography Mass Spectrometry).....	25
2.14. Kandungan <i>Sargassum fillipendula</i> yang berpotensi sebagai antioksidan.....	26

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi penelitian.....	28
3.1.1. Bahan penelitian	28
3.1.2. Alat penelitian.....	28
3.2 Metode penelitian.....	29
3.3 Prosedur penelitian	29
3.3.1. Penelitian pendahuluan.....	29
3.3.2. Penelitian utama	31



3.4	Prosedur Penelitian.....	32
3.4.1.	Inokulasi <i>Trichoderma viride</i> pada PDB.....	32
3.4.2.	Perhitungan Koloni Jamur Dengan <i>Hemacytometer</i>	33
3.4.3.	Kombinasi Fermentasi Dan Pembekuan <i>S.filipendula</i>	33
3.4.4.	Kombinasi Pembekuan Dan Fermentasi <i>S.filipendula</i>	35
3.4.5.	Ekstraksi Kasar (crude extract).....	36
3.5	Prosedur Analisis Parameter Uji.....	36
3.5.1.	Uji antioksidan (DPPH).....	36
3.5.2.	Uji total fenol.....	38
3.5.3	Uji kadar air.....	38
3.5.4.	Uji fitokimia.....	39
3.6	Analisa Data.....	39
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Data Hasil Penelitian.....	40
4.2	Kadar air dan rendemen.....	40
4.2.1	Kadar air.....	40
4.2.2	Rendemen.....	42
4.3	Aktivitas antioksidan.....	43
4.4	Total fenol.....	44
4.5	Analisis fitokimia.....	46
5.	PENUTUP	
5.1.	Kesimpulan.....	48
5.2.	Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA		49
LAMPIRAN		55



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia alga coklat.....	6
2. Jenis dan kadar mineral alga coklat.....	7
3. keuntungan dan kerugian dari <i>Trichoderma viride</i>	15
4. Konstanta dielektrik beberapa bahan pelarut.....	22
5. Desain rancangan Uji t (t test)	31
6. Data Hasil Penelitian.....	40
7. Hasil uji fitokimia <i>Sargassum filipendula</i>	46



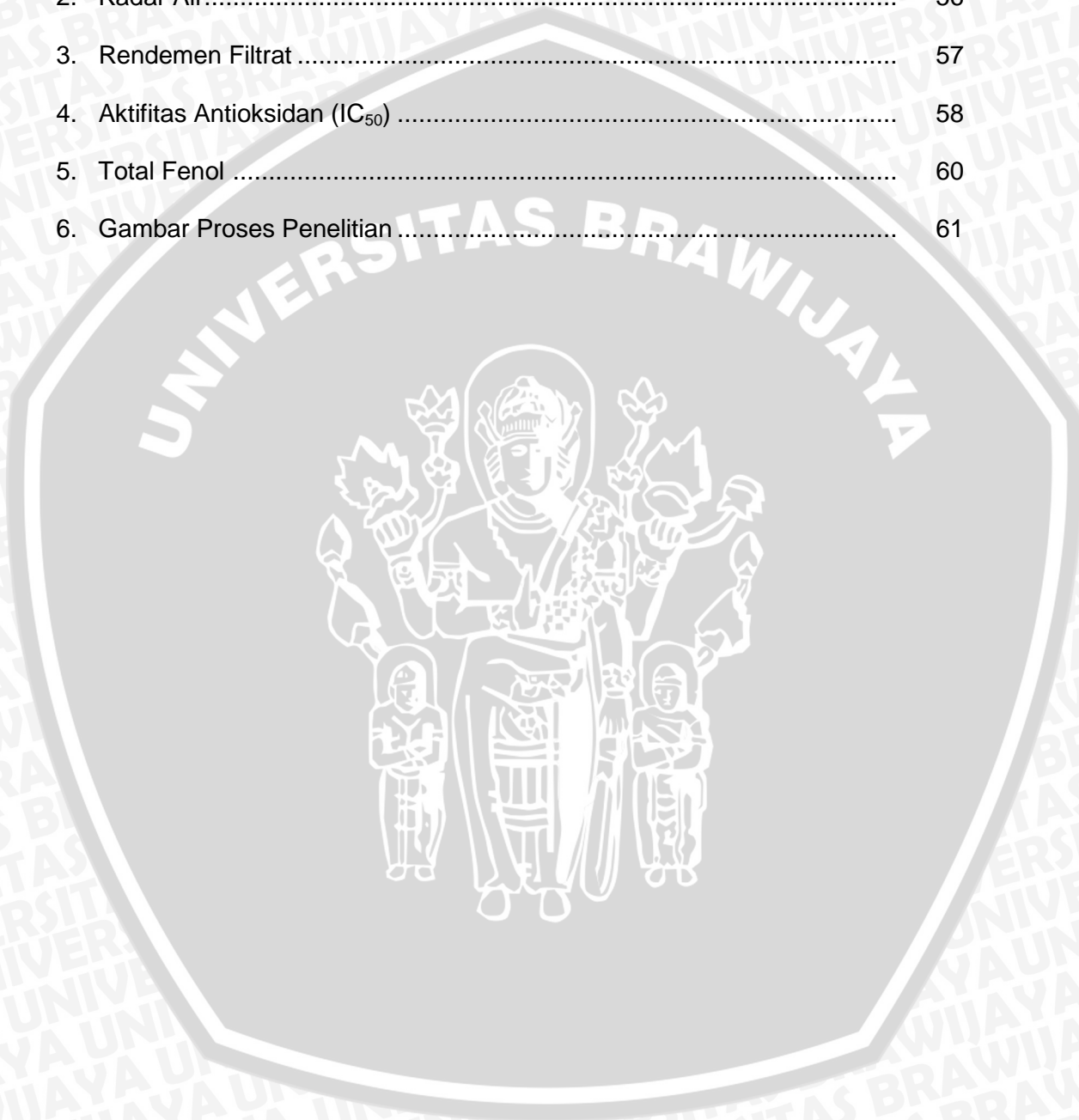
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum filipendula</i>	8
2. Grafik penurunan suhu selama pembekuan.....	11
3. Bentuk dan komponen-kompoen sel <i>Trichoderma viride</i>	14
4. Diagram struktur mikroskopis dinding sel.....	16
5. Skema tahap-tahap hidrolisa selulosa secara enzimatis	18
6. Mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH.....	24
7. Grafik penelitian pendahuluan pada proses fermentasi.....	30
8. Grafik penelitian pendahuluan pada proses pembekuan.....	31
9. Inokulasi <i>Trichoderma viride</i> pada PDB	32
10. Skema kerja proses fermentasi dan pembekuan <i>Sargassum filipendula</i> ..	34
11. Skema kerja proses pembekuan dan fermentasi <i>Sargassum filipendula</i> ..	35
12. Skema kerja ekstraksi <i>Sargassum filipendula</i>	36
13. Skema kerja uji antioksidan (DPPH)	37
14. Grafik persen kadar air	41
15. Grafik persen rendemen	42
16. Grafik nilai IC ₅₀ Ekstrak Kasar <i>Sargassum filipendula</i>	43
17. Grafik nilai total fenol Ekstrak Kasar <i>Sargassum filipendula</i>	45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Uji t.....	55
2. Kadar Air.....	56
3. Rendemen Filtrat.....	57
4. Aktifitas Antioksidan (IC_{50}).....	58
5. Total Fenol.....	60
6. Gambar Proses Penelitian.....	61



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Alga merupakan salah satu sumberdaya alam Indonesia yang sangat potensial. Alga merupakan tumbuhan tingkat rendah dan dibagi dalam tiga kelas yaitu alga hijau (*Chlorophyceae*), alga merah (*Rhodophyceae*), dan alga coklat (*Phaeophyceae*) (Bahtiar, 2007). Alga coklat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai reversal agent dan industri agrokimia terutama untuk antioksidan, fungisida dan herbisida. Dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi pemanfaatan alga dalam bentuk olahan semakin meluas. Penelitian yang semakin maju memungkinkan mengetahui kandungan kimia dari berbagai alga sehingga dapat diisolasi dan diidentifikasi yang selanjutnya dimanfaatkan dalam bentuk hasil olahan atau dalam bentuk substansi (Simanjuntak, 1995). Alga coklat merupakan sumber potensi senyawa bioaktif yang mengandung antioksidan alami. Kandungan metabolit sekunder dalam alga coklat sudah mulai diteliti antara lain kandungan steroid, alkaloid, phenol dan vitamin (Rachmaniar *et al.*, 1999).

Alga coklat merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang sangat bermanfaat bagi pengembangan (1) industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai reversal agent dan (2) industri agrokimia terutama untuk antifeedant fungisida dan herbisida. Kemampuan alga untuk memproduksi metabolit sekunder terhalogenasi yang bersifat sebagai senyawa bioaktif dimungkinkan terjadi, karena kondisi lingkungan hidup alga yang ekstrem seperti salinitas yang tinggi atau akan digunakan untuk mempertahankan diri dari ancaman predator. (Anonymous, 2012^a)

Pada beberapa penelitian, ditemukan bahwa dalam ekstrak *Sargassum filipendula* banyak ditemukan zat yang berpotensi sebagai antioksidan, diantaranya xanthofil, karotenoid, dan fukosanthin. Antioksidan merupakan sebagai senyawa yang dapat menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh, sehingga dapat mencegah atau mengurangi terjadinya kerusakan sel (Abdul, 2003). Antioksidan merupakan salah satu bahan aditif yang dapat melindungi bahan pangan dari kerusakan oksidasi penyebab ketengikan. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi atas antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami dianggap lebih aman daripada antioksidan sintetik. Hasil penelitian Fujimoto *et al.* (1985) dan Cahyana *et al.* (1992) telah membuktikan adanya senyawa bioaktif pada alga laut yang berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Suryaningrum, *et al.* (2006), kelemahan dari antioksidan adalah sifatnya yang mudah rusak bila terpapar oksigen, cahaya, suhu tinggi dan pengeringan. Penggunaan bahan pelarut yang tidak tepat juga dapat merusak aktivitas antioksidan yang ada.

Dalam menghasilkan antioksidan pada *Sargassum filipendula* dapat dilakukan dengan proses ekstraksi. Sejauh ini jumlah antioksidan yang didapat jumlahnya hanya sedikit. Dari hal itu diduga karena pada saat proses maserasi, pada dinding sel rumput laut tersebut tidak terpecahkan secara maksimal. Pada dinding sel rumput laut ini mengandung zat algin, selulosa dan pektin dimana dari zat tersebut termasuk dalam golongan polisakarida jenis serat pangan. Untuk menghasilkan antioksidan yang lebih banyak, maka sebelum proses maserasi dilakukan kombinasi metode dengan cara pembekuan dan fermentasi. Salah satu teknik fermentasi adalah dengan menggunakan kapang *Trichoderma viride*.

Trichoderma viride dapat tumbuh optimal pada suhu 32-35°C dan pH optimal sekitar 4.0 (Enari,1983). *Trichoderma viride* adalah kapang berfilamen

yang sangat dikenal sebagai organisme selulolitik dan menghasilkan enzim-enzim selulolitik, termasuk enzim selobiohidrolase, endoglukanase dan β -glukosidase (Deacon, 1997) Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Gunam *et al.*, (2011) diketahui bahwa dengan substrat ampas tebu sebagai substrat untuk produksi enzim selulase dari *Trichoderma viride* kombinasi perlakuan terbaik untuk produksi enzim selulase kasar adalah pada konsentrasi substrat ampas tebu 3% dengan lama fermentasi 7 hari dengan nilai rata-rata aktivitas selulase (*filter paperase*), protein terlarut, dan aktivitas spesifik selulase (*filter paperase*) berturut-turut 0,771 Unit/mL filtrat, 0,262 mg/mL filtrat, dan 2,940 Unit/mg protein. Hasil penelitian lain menurut Hartati (2001), menyatakan bahwa pada substrat serbuk limbah agar-agar kertas, pada kondisi terbaik *Trichoderma viride* mampu memproduksi enzim selulase adalah pada perbandingan 2:4 dan lama inkubasi selama 12 dengan pH 5,5.

Penelitian terdahulu telah banyak melakukan ekstraksi dengan cara fermentasi dan juga pembekuan. Namun untuk melakukan kombinasi kedua teknik tersebut masih belum dilakukan, maka penelitian ini mengambil kombinasi dari pembekuan dan fermentasi yang diharapkan dapat mengoptimalkan jumlah dan aktivitas antioksidannya.

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan uraian diatas, masalah yang mendasari penelitian ini yaitu:

- Apakah urutan tahapan antara fermentasi dan pembekuan berpengaruh terhadap rendemen dan mutu antioksidan dari *Sargassum filipendula*?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula* yang diperoleh dari kombinasi dua tahapan antara pembekuan

dilanjutkan dengan fermentasi dan fermentasi dilanjutkan dengan pembekuan.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah diduga kombinasi pembekuan dan fermentasi dengan *Trichoderma viride* berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Sargassum filipendula*

1.5. Kegunaan Penelitian

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

1.6. Tempat dan Waktu

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

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alga Coklat

Alga coklat merupakan sumber potensi senyawa bioaktif yang mengandung antioksidan alami. Kandungan metabolit sekunder dalam alga coklat sudah mulai diteliti antara lain kandungan steroid, alkaloid, phenol dan vitamin (Rachmaniar *et al.*, 1999). Alga coklat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai reversal agent dan industri agrokimia terutama untuk antioksidan, fungisida dan herbisida. Dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi pemanfaatan alga dalam bentuk olahan semakin meluas. Penelitian yang semakin maju memungkinkan mengetahui kandungan kimia dari berbagai alga sehingga dapat diisolasi dan diidentifikasi yang selanjutnya dimanfaatkan dalam bentuk hasil olahan atau dalam bentuk substansi (Simanjuntak, 1995).

Pada umumnya rumput laut dapat dikelompokkan menjadi empat kelas yaitu rumput laut hijau (Chlorophyceae), rumput laut hijau biru (Cyanophyceae), rumput laut coklat (Phaeophyceae), rumput laut merah (Rhodophyceae). Pembagian ini berdasarkan pigmen yang dikandungnya. Namun rumput laut merah dan coklat merupakan jenis yang komersil, dan rumput laut coklat merupakan rumput laut yang memiliki potensi untuk dikembangkan. Rumput laut coklat banyak dijumpai di perairan Indonesia terutama untuk jenis *Sargassum sp.* Rumput laut coklat mengandung pigmen klorofil a dan c; beta karoten; violasantin dan flukosantin; pirenoid dan filakoid (lembaran fotosintesis); cadangan makanan berupa laminarin; dinding sel yang terdapat selulosa dan alginat. Selain bahan-bahan tadi, rumput laut coklat merupakan bahan makanan yang baik sebagai penghasil yodium. Secara kimia, alga coklat terdiri dari air (27,8%), protein (5,4%), karbohidrat (33,3%), lemak (8,60%), serta serat kasar (3,0%), dan abu (22,25%) (Anonymous, 2012^b).

Algae ini mempunyai pigmen fotosintetik yang terdiri atas klorofil a dan c, karoten, fukoxantin dan xantofil. Cadangan makanan di dalam selnya berupa laminarin dan manitol, dengan dinding sel tersusun dari selulosa, asam alginat, dan mukopolisakarida sulfat. Algae ini mempunyai dua flagela yang tidak sama panjang dengan letak lateral. Anggota kelompok ini terdiri lebih dari 200 genera dan 1500 spesies. Anggota algae ini yang banyak hidup di laut adalah genera *Sargassum sp*, *Macrocystis sp*, *Nereocystis sp*, dan *Laminaria sp*. Algae coklat ini dapat tumbuh dengan sangat cepat, misalnya *Nereocystis sp* dapat mencapai panjang 40 meter dalam satu musim. Kebanyakan cara perkembangbiakan algae coklat sama dengan algae hijau *Ulva* (Wasetiawan, 2010).

Potensi *Sargassum* yang berasal dari kelas Phaeophyta di Indonesia pada tahun 1999 adalah 52 juta ton, pada tahun 2000 adalah 76,53 juta ton, sedangkan pada tahun 2004 adalah 139,74 juta ton (Statistik Kelautan dan Perikanan Indonesia, 2005). Potensi *Sargassum* di Kepulauan Madura pada tahun 2005 menurut data DKP Sumenep adalah 7,1 juta ton per tahun (DKP Sumenep, 2007). Adapun komposisi kimia alga coklat dan kadar mineralnya dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Komposisi kimia alga coklat

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

Sumber : Yunizal (1999).

Tabel 2. Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat

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

Sumber : Winarno (1990) dalam Yunizal (1999).

2.2. *Sargassum filipendula*

Ciri-ciri *Sargassum filipendula* adalah berbentuk thallus yang umumnya silinder atau gepeng, tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat, berukuran relatif besar, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter), dan warna thallus umumnya coklat. *Sargassum* tersebar luas di Indonesia, tumbuh di perairan yang terlindung maupun yang berombak besar pada habitat batu. *Sargassum filipendula* ini hidup melekat pada batu karang dan dapat terlepas dari substratnya apabila ombak besar dan hanyut dipermukaan laut atau terdampar di permukaan pasir pantai. Jenis *Sargassum filipendula* pemanfaatannya sangat terbatas, bahkan masih dianggap sebagai sampah laut karena pada musim tertentu hanyut dipermukaan laut dan terdampar di pantai karena tercabut atau patah akibat ombak yang besar atau karena perubahan musim (Anonymous, 2012^o).

Adapun gambar dari *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasinya sebagai berikut (Anonymous, 2012^d) :

Kingdom	: Plantae
Diviso	: Phaeophyta
Class	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Family	: Sargasseceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>Sargassum filipendula</i>



Gambar 1. *Sargassum filipendula*

2.3. **Freezing Injury dan Pembekuan**

Sel tanaman terluka saat suhu turun di bawah tingkat kritis jenis tanaman tersebut. Luka yang terjadi pada atau di bawah titik beku (32°F, 0°C) disebut *frost injury* atau *freezing injury*. *Frost injury* dan *freezing injury* berhubungan dekat. Kerusakan *frost* terjadi pada waktu pembekuan secara radiasi; kerusakan *freeze* terjadi pada waktu pembekuan secara adveksi. Keduanya menyebabkan terbentuknya kristal es dalam jaringan tanaman, dehidrasi sel dan gangguan membran (Costello *et al.*, 2003).

Freezing injury terjadi ketika kristal es terbentuk di dalam jaringan. Jaringan yang terluka oleh pembekuan pada umumnya kehilangan rigiditas dan menjadi lembut ketika dicairkan. Gejala *Freezing injury* yang paling umum adalah munculnya *water-soaked* atau resapan air (Shudheer dan Indira, 2007).

Secara umum, tanaman daerah iklim sedang tidak peka terhadap terjadinya gangguan karena pendinginan pada temperatur di atas 0°C dan cenderung memperlihatkan tanda-tanda kerusakan hanya sesudah es terbentuk di dalam jaringannya. Sebagai contoh, telah diperlihatkan bahwa fotosintesis pada beberapa spesies pohon tidak berhenti sama sekali sampai es ekstraseluler terbentuk (pada umumnya pada -3 sampai -5°C) dan bahkan kemudian perhentian awal aktivitas mungkin disebabkan oleh pengaruh fisik murni-terjadinya pemblokiran difusi CO_2 oleh es (Fitter dan Hay, 1991).

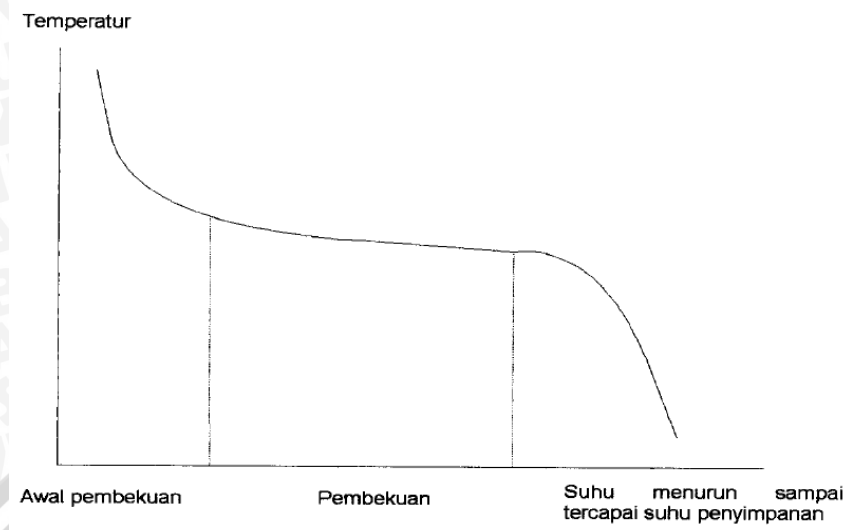
Menurut Sun (2012), ketika air dibekukan pada tekanan atmosfer, air memuai mendekati 9%. Perubahan derajat pemuaian berhubungan dengan faktor yang mengikutinya yaitu:

- Kandungan cairan, dengan semakin tinggi kandungan cairan menghasilkan perubahan volume yang semakin besar.
- Susunan sel, yaitu, ruang udara antar intersel, yang mana umumnya pada jaringan tanaman. Pada bagian tersebut dapat memungkinkan menampung pertumbuhan kristal, dan dengan demikian meminimalkan perubahan ukuran luar sampel. Sebagai contoh, strawberi utuh bertambah volume sebesar 3%, sebaliknya strawbery yang digilas bertambah volume sebesar 8.2%, ketika keduanya dibekukan pada suhu -20°C .
- Kosentrasi bahan terlarut, kosentrasi yang tinggi menurunkan titik beku dan tidak membeku atau memuai pada suhu pembekuan komersial.
- Suhu alat pembekuan, yang mana menentukan jumlah air yang tidak beku dan derajat pemuaian.

- Komponen pembentuk kristal, termasuk es, lemak, dan bahan terlarut, yang mana mengkerut ketika didinginkan; ini menurunkan volume bahan pangan.

Proses kristalisasi es memiliki dua tahap: pembentukan inti (nukleus) dan pertumbuhan berikutnya dari inti ke ukuran kristal yang khusus, dengan ukuran akhir kristal menjadikan sebuah kegunaan dari derajat pengintian dan pertumbuhan kristal dan juga suhu akhir. Pengintian adalah tahap penentu pertama dalam pembentukan kristal, dimulai dengan tumbukan (tubrukan) antar molekul oleh karena gerakan acaknya dalam larutan, yang mengarah pada pembentukan kelompok-kelompok pra-inti. Jika populasi dari kelompok tersebut meningkat, kelompok tersebut mulai berasosiasi ke bentuk embrio. Beberapa embrio, melalui tubrukan (tumbukan) lanjutan, bertumbuh menjadi inti (kristalit kecil sekali dari ukuran terkecil mampu berdiri sendiri), berperan pada pembentukan kristal ukuran makroskopis dalam proses yang diistilahkan sebagai pertumbuhan kristal (Sun, 2012).

Proses pelepasan panas atau penurunan suhu selama pembekuan, berlangsung dalam tiga tahap (Gambar 2). Tahap pertama, penurunan suhu yang berlangsung cepat hingga sedikit di bawah 0°C , yakni saat air mulai membeku. Tahap kedua, yakni tahap penahanan panas. Artinya pelepasan panas dari bahan berlangsung lambat dan sukar, berhubung bagian terbesar dari air bahan harus diubah menjadi kristal es. Hal ini berlangsung pada wilayah suhu antara 0°C sampai -5°C . tahap ketiga, yakni pembekuan selanjutnya air yang tersisa mencapai suhu operasi penyimpanan bekunya (Heldman dan Taylor, 1997). Grafik penurunan suhu selama pembekuan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik Penurunan Suhu Selama Pembekuan (Heldman dan Taylor, 1997)

Menurut King (1971), laju pembekuan dibagi ke dalam 3 golongan yaitu, 1) Laju pembekuan lambat, jika waktu pembekuan adalah 30 menit atau lebih per sentimeter bahan yang dibekukan, 2) Laju pembekuan sedang, jika waktu pembekuan adalah 20–30 menit per sentimeter bahan yang dibekukan, dan 3) Laju pembekuan cepat, jika waktu pembekuan adalah kurang dari 20 menit per sentimeter bahan yang dibekukan.

Pembekuan lambat disebut juga dengan pembekuan tajam (*sharp freezing*). Di dalam metode ini, bahan ditempatkan dalam ruang pembekuan pada suhu antara -4°C hingga -29°C . Pembekuan membutuhkan waktu 3 hingga 72 jam di bawah kondisi yang demikian (Srilakshmi, 2005). Kemampuan jaringan bertahan hidup lebih baik pada pembekuan cepat dibandingkan dengan pembekuan lambat karena air tidak memiliki waktu untuk bermigrasi membentuk kristal besar (Vaclavik dan Christian, 2008). Pembekuan lambat menghasilkan kristal-kristal es di ruang antar sel dan kristal tersebut berukuran besar. Kristal-kristal es tersebut dapat mengakibatkan dehidrasi dan kerusakan sel, sehingga jaringan menjadi lunak setelah bahan dilelehkan (Fellow, 1988).

2.4 Fermentasi

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

Fermentasi adalah segala macam proses metabolik dengan bantuan enzim dari mikroba (jasad renik) untuk melakukan oksidasi, reduksi, hidrolisa dan reaksi kimia lainnya sehingga terjadi perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk tertentu (Saono, 1976) dan menyebabkan terjadinya perubahan sifat bahan tersebut (Winarno *et al.*, 1979). Mikroba yang banyak digunakan sebagai inoculum fermentasi adalah kapang, bakteri, khamir dan ganggang. Pemilihan inokulum yang akan digunakan lebih berdasarkan pada komposisi media, teknik proses, aspek gizi dan aspek ekonomi (Tannenbeum *et al.*, 1975). Bahkan dewasa ini mikroba sebagai probiotik dengan berbagai merk dagang dapat diperoleh dengan mudah.

Menurut Nurhidayat (2008), mikrobia yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir dan kapang. Contoh bakteri yang digunakan dalam fermentasi adalah *Acetobacter xylinum* pada pembuatan nata decoco, *Acetobacter aceti* pada pembuatan asam asetat. Contoh khamir dalam fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan alkohol sedang contoh kapang adalah *Rhizopus* sp pada pembuatan tempe, *Monascus purpureus* pada pembuatan angkak dan sebagainya. Fermentasi dapat dilakukan menggunakan kultur murni ataupun alami serta dengan kultur tunggal ataupun

kultur campuran. Contoh penggunaan kultur murni tunggal adalah *Lactobacillus casei* pada fermentasi susu sedang contoh campuran kultur murni adalah pada fermentasi kecap, yang menggunakan *Aspergillus oryzae* pada saat fermentasi kapang dan saat fermentasi garam digunakan bakteri *Pediococcus* sp dan khamir *Saccharomyces rouxii*. Proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor :

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

2.5. *Trichoderma viride*

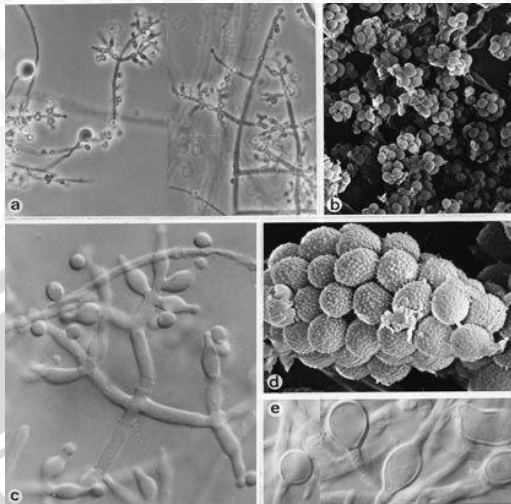
Salah satu mikroorganisme yang mampu memanfaatkan selulosa untuk pertumbuhannya adalah kapang *Trichoderma viride*. Kapang ini menghasilkan enzim selulolitik yang sangat efisien, terutama enzim yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis kristal selulosa (Kosaric *et al.*, 1980).

Klasifikasi *Trichoderma viride* menurut Zaldifar (2001) adalah sebagai berikut :

Divisio	: Mycophita
Classis	: Deuteromycetes
Sub classis	: Ascomycetes
Ordo	: Hypocreales
Familia	: Hypocreaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Species	: <i>Trichoderma viride</i>

Trichoderma mempunyai koloni yang berwarna hijau muda sampai hijau tua. Konidia kapang tersebut bulat dan terusun seperti buah anggur. Tingkat pertumbuhannya cepat sehingga dalam empat atau lima hari koloninya sudah memenuhi cawan petri. *Trichoderma viride* paling banyak dijumpai diantara genusnya dan mempunyai kelimpahan yang tinggi pada tanah dan bahan yang

mengalami dekomposisi. Bentuk dan komponen komponen sel *Trichoderma viride* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Bentuk dan komponen-komponen sel *Trichoderma viride* : a.Konidia dan konidiospor *T.viride* perbesaran 512x, b.perbesaran 1000x, c.perbesaran 1600x, d.perbesaran 4400x, e.Klamidiospora perbesaran 1600x (de Hoog, 2000)

Trichoderma viride merupakan jamur yang potensial memproduksi selulase dalam jumlah yang relatif banyak untuk mendegradasi selulosa. *Trichoderma viride* merupakan kelompok jamur selulolitik yang dapat menguraikan glukosa dengan menghasilkan enzim kompleks selulase. Enzim ini berfungsi sebagai agen pengurai yang spesifik untuk menghidrolisis ikatan kimia dari selulosa dan turunannya. *Trichoderma viride* dan *Trichoderma reesei* merupakan kelompok jamur tanah sebagai penghasil selulase yang paling efisien. Enzim selulase yang dihasilkan *Trichoderma viride* mempunyai kemampuan dapat memecah selulosa menjadi glukosa sehingga mudah dicerna oleh ternak. Selain itu *Trichoderma viride* mempunyai kemampuan meningkatkan protein bahan pakan dan pada bahan berselulosa dapat merangsang dikeluarkannya enzim selulase. *Trichoderma viride* banyak digunakan dalam penelitian karena memiliki beberapa keuntungan dan kerugian, hal ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Table 3. Keuntungan dan Kerugian dari *Trichoderma viride*

Keuntungan	Kerugian
- Selulase yang diperoleh mengandung semua komponen-komponen yang diperlukan untuk proses hidrolisis seluruh kristal selulosa.	- β -glukosidase yang dihasilkan mempunyai level yang rendah.
- Protein selulase dihasilkan dalam kualitas sangat tinggi.	- Selulase yang dihasilkan mempunyai aktivitas spesifik yang rendah.
	- Tidak dapat mendegradasi lignin

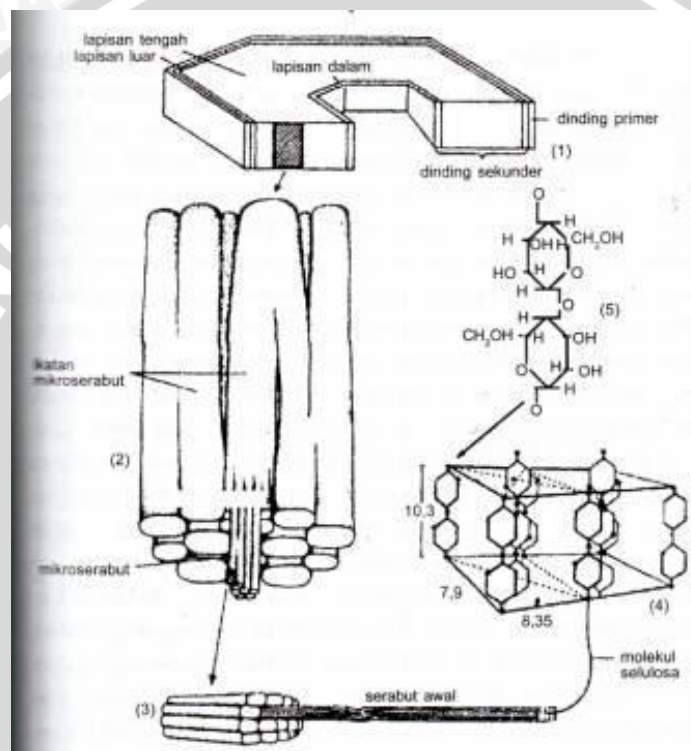
Pada medium agar dan pembiakan sintetik, suhu optimum adalah 20-28°C. Pada suhu 6°C dan 32°C kapang terlihat masih tumbuh dengan baik. Kisaran pH pertumbuhan kapang adalah selang pH 1,5 hingga 9 dengan pH optimum antara 5 dan 5,5 (Domsch dan Gams, 1972). Kisaran pH 3,0 – 7,0 adalah ideal bagi kebanyakan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

2.6. Dinding sel

Dinding sel hanya terdapat pada sel tumbuhan. Dinding sel terdiri dari selulosa yang kuat yang dapat memberikan sokongan, perlindungan dan untuk mengekalkan bentuk sel. Terdapat liang pada dinding sel untuk membenarkan pertukaran bahan di luar dengan bahan di dalam sel. Dinding sel juga berfungsi sebagai penyokong mekanisme organ tumbuhan, khususnya pada dinding tebal. Dinding sel terdiri selulosa (sebagian besar), hemiselulosa, pektin, lignin, kitin, garam karbonat dan silikat dari Ca dan Mg (Putri, 2012).

Berdasarkan perkembangan dan struktur jaringan tumbuhan, lapisan dinding sel dapat dibedakan menjadi 3 bagian yaitu lamela tengah-tengah atau

lapisan antar sel, dinding sel primer dan dinding sekunder. Dinding primer merupakan struktur yang sama dengan dinding sekunder, yang terdiri atas mikroserabut selulosa dan matriks non selulosa. Pada phycomyctes, beberapa mikroserabutnya berisi kitin atau senyawa yang lain, sedangkan matriksnya berisi pektin dan hemiselulosa. struktur submikroskopis dinding sel dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram stuktur submikroskopis dinding sel: (1) bagian sel pada lapisan dinding sekunder; (2) ikatan mikroserabut; (3) bagian dari mikroserabut yang tersusun atas serabut sederhana; (4) dua unit sel selulase Presidon (1952) dan (5) dua residu gula (Fahn,1989)

2.7. Enzim Selulase

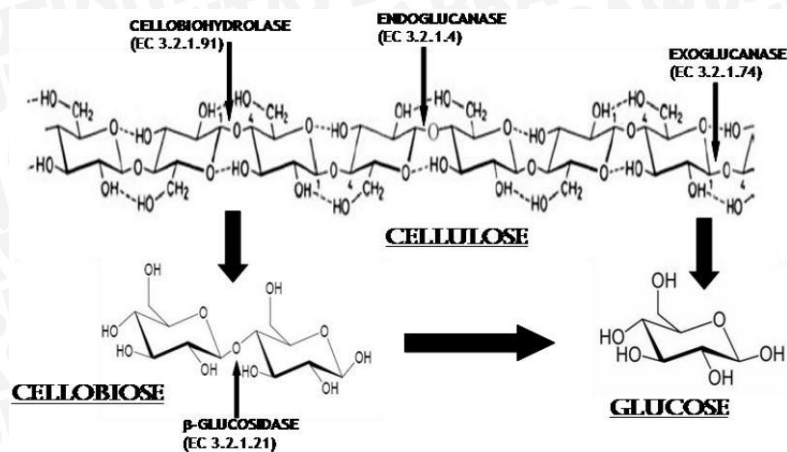
Selulase adalah nama trivial enzim yang mempunyai nama sistemik β -1,4-glukan-4-glukanohidrolase (EC.3.2.1.4). Nama selulase merupakan nama umum bagi semua enzim yang dapat memutuskan ikatan β -1,4-glukosida dalam

selulosa, selodekstrin, selobiosa, serta turunan selulosa yang lain (Sekarsari, 2003).

Menurut Yunasfri (2008), terdapat empat kelompok enzim utama sebagai komponen penyusun selulase berdasarkan spesifikasi substrat masing-masing enzim, yaitu:

- Endo- β -1,4-glukanase menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida secara acak. Enzim ini tidak menyerang selobiosa tetapi menghidrolisis selodekstrin, selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat dan selulosa yang telah disubstitusi seperti CMS dan HES (Hidroksi Etil Selulosa).
- β -1,4-D-glukan selobiohidrolase (EC 3.2.1.91), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim ini dapat menyerang selodekstrin tetapi tidak menyerang selulosa yang telah disubstitusi serta tidak dapat menghidrolisis selobiosa.
- β -1,4-D-glukan glukohidrolase (EC.3.2.1.74), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan glukosa. Enzim ini menyerang selulosa yang telah dilonggarkan dengan asam fosfat, selo-oligosakarida dan CMC.
- β -1,4-D-glukosidase (EC.3.2.1.21), menghidrolisis selobiosa dan selo-oligosakarida rantai pendek serta menghasilkan glukosa. Enzim ini tidak menyerang selulosa atau selodekstrin.

Konsep mekanisme hidrolisa enzimatis terhadap selulosa diilustrasikan oleh Monara *et al.*, (2011) pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema tahap-tahap hidrolisa selulosa secara enzimatik (Monara et al., 2011)

2.8 Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang dapat menetralkan atau menghancurkan radikal bebas. Radikal bebas merupakan jenis oksigen yang memiliki tingkat reaktif yang tinggi dan secara alami ada didalam tubuh sebagai hasil dari reaksi biokimia di dalam tubuh. Radikal bebas juga terdapat di lingkungan sekitar kita yang berasal dari polusi udara, asap tembakau, penguapan alkohol yang berlebihan, bahan pengawet dan pupuk, sinar Ultra Violet, X-rays, dan ozon. Radikal bebas dapat merusak sel tubuh apabila tubuh kekurangan zat anti oksidan atau saat tubuh kelebihan radikal bebas. Hal ini dapat menyebabkan berkembangnya sel kanker, penyakit hati, arthritis, katarak, dan penyakit degeneratif lainnya, bahkan juga mempercepat proses penuaan. Radikal bebas dapat merusak membran sel serta merusak dan merubah DNA. Merubah zat kimia dalam tubuh dapat meningkatkan resiko terkena kanker serta merusak dan menonaktifkan protein (Muchtadi, 2012).

Tubuh kita memerlukan suatu substansi penting yakni antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan meredam dampak negatif senyawa ini. Namun, hal ini tergantung terhadap pola

hidup dan pola makan kita yang harus benar. Konsumsi antioksidan yang memadai dapat mengurangi terjadinya berbagai penyakit seperti kanker, kardiovaskuler, katarak, masalah pencernaan serta penyakit degeneratif lainnya (Greenvald *et al.*, 1995; Kumalaningsih, 2007).

Menurut Larson (1988), senyawa antioksidan didalam tanaman tingkat tinggi selain senyawa protein, senyawa bernitrogen dan senyawa karotenoid dan vitamin C, adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan primer dalam tanaman bersifat polar, dapat berupa vitamin E, flavonoid, asam fenolat dan senyawa fenol yang lain. Senyawa fenol tersebut larut dalam pelarut polar seperti metanol maupun etanol. Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok (Hartoyo, 2013) :

- Antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia). Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan penggunaannya untuk makanan dan penggunaannya telah sering digunakan, yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan-antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintetis untuk tujuan komersial.
- Antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Di dalam makanan dapat berasal dari senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992).

Antioksidan berfungsi untuk menetralisasi radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang tidak berpasangan mendapatkan pasangan electron dan

menjadi stabil. Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit degeneratif dan kanker. Selain itu antioksidan juga membantu menekan proses penuaan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan atau meredam radikal bebas, serta menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh, sehingga dapat mencegah atau mengurangi terjadinya kerusakan sel (Abdul, 2003).

2.9 Radikal Bebas

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

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

Radikal bebas secara umum dapat dihambat oleh antioksidan tertentu baik alami maupun sintetis. Sebagian besar antioksidan alami berasal dari

tanaman antara lain berupa senyawa tokoferol, karotenoid, asam askorbat, fenol dan flavonoid (Juniarti *et al.*, 2009).

2.10 Ekstraksi

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

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

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

2.11 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor utama yang menentukan keberhasilan dalam proses ekstraksi. Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non polar (Vogel, 1987). Adapun konstanta dielektrik bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 3 dan sifat pelarut umum dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut

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

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

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

termasuk pelarut polar, sedangkan hidrokarbon termasuk ke dalam non polar (Nurmillah, 2009).

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

2.12 Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan

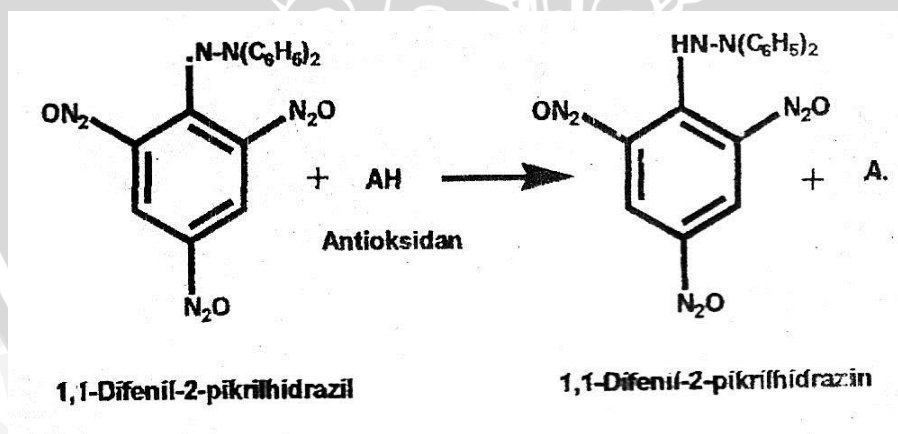
Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikan keseimbangannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein atau jaringan lemak (Praptiwi *et al.*, 2006).

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

Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) terhadap *edible seaweed* seperti nori, kumbu, wakame dan

hyiki menunjukkan rumput laut tersebut mengandung antioksidan yang cukup tinggi. Kandungan antioksidan pada rumput laut terutama berupa senyawa antioksidatif polifenol (Suryaningrum, 2006).

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima electron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron satu radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan. Contoh mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan DPPH terdapat pada Gambar 6 (Suratmo, 2009).



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

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak metanol dari *Sargassum fillipendula* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode Blois (1958), ekstrak metanol dari *Sargasssum fillipendula*

dilarutkan dalam metanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5ml. Ke dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 0,5 mL larutan DPPH 1mM dalam metanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus :

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

Nilai konsentrasi dan hambatan ekstrak diplot masing-masing pada sumbu x dan y. Persamaan garis yang diperoleh dalam bentuk $y=b\ln(x) + a$ digunakan untuk mencari nilai IC (inhibitor concentration), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Aktivitas antioksidan dapat dikatakan kuat apabila mempunyai IC_{50} kurang dari 200 μ g/ml Blois (1958).

2.13 GC-MS (Gas Chromathography Mass Spectrometry)

Analisa GC-MS menggunakan penggabungan 2 alat yaitu Gas Chromatography (GC) yang berfungsi menganalisa struktur molekul senyawa dan memisahkan fraksi-fraksi kimia dalam senyawa. Mass Spectrometry (MS) yang berfungsi untuk menganalisa jumlah senyawa secara kuantitatif (mencari kandungan kimia dalam senyawa serta massa partikel dan konsentrasinya (Anonymous, 2013^a).

Kromatografi Gas (GC) merupakan jenis kromatografi yang digunakan dalam kimia organik untuk pemisahan dan analisis. GC dapat digunakan untuk

menguji kemurnian dari bahan tertentu, atau memisahkan berbagai komponen dari campuran. Dalam beberapa situasi, GC dapat membantu dalam mengidentifikasi sebuah kompleks. Dalam kromatografi gas, fase yang bergerak (atau "mobile phase") adalah sebuah operator gas, yang biasanya gas murni seperti helium atau yang tidak reactive seperti gas nitrogen. Stationary atau fasa diam merupakan tahap mikroskopis lapisan cair atau polimer yang mendukung gas murni, di dalam bagian darisistem pipa-pipa kaca atau logam yang disebut kolom. Instrumen yang digunakan untuk melakukan kromatografi gas disebut gas chromatograph (atau "aerograph", "gas pemisah").

Kromatografi gas yang pada prinsipnya sama dengan kromatografi kolom (serta yang lainnya bentuk kromatografi, seperti HPLC, TLC), tapi memiliki beberapa perbedaan penting. Pertama, proses memisahkan compounds dalam campuran dilakukan antara stationary fase cair dan gas fase bergerak, sedangkan pada kromatografi kolom yang seimbang adalah tahap yang solid dan bergerak adalah fase cair. (Jadi, nama lengkap prosedur adalah "kromatografi gas-cair", merujuk ke ponsel dan stationary tahapan, masing-masing.) Kedua, melalui kolom yang lolos tahap gas terletak di sebuah oven dimana temperatur gas yang dapat dikontrol, sedangkan kromatografi kolom (biasanya) tidak memiliki kontrol seperti suhu. Ketiga, konsentrasi yang majemuk dalam fase gas adalah hanya salah satu fungsi dari tekanan uap dari gas.

2.14 Kandungan *Sargassum filipendula* Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan

- Senyawa Fenol

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

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

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

- Alkaloid

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

- Flavonoid

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

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Pada bahan penelitian ini menggunakan alga coklat pada jenis *Sargassum filipendula* segar diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Rumput laut yang dipanen dari daerah budidaya dan pada saat pemanenan bahan langsung dicuci dengan air laut. Sampel dicuci dengan air laut dengan tujuan untuk membersihkan sisa-sisa lumpur dan pasir yang masih melekat pada rumput laut. Sampel dimasukkan ke dalam *coolbox* lalu diberi dengan es balok dan bagian luar *coolbox* disegel dengan lakban untuk mempertahankan suhu rendah dalam *coolbox* selama proses transportasi dan agar *coolbox* tidak rusak sampai tujuan. Selang waktu pengangkutan dari tempat pemanenan ke laboratorium adalah 9 jam.

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi antioksidan algae coklat *Sargassum filipendula* yaitu pelarut etanol teknis, asam asetat dan aquadest. Bahan-bahan yang digunakan untuk pengujian adalah serbuk DPPH (1,1 *diphenil-2-pikrilhidrazil*) merk. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji fitokimia adalah HCL 2N, dan 6 ml aquadest untuk uji alkaloid, 20 ml etanol 96%, larutan FeCl_3 untuk uji fenol, serbuk magnesium (Mg) dan 2 ml HCL 2N untuk uji flavonoid.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada proses maserasi (ekstraksi) senyawa antioksidan pada algae coklat *Sargassum filipendula* adalah baskom, gunting, pisau, timbangan analitik, spatula, erlenmayer 300ml, *beaker glass* 300 ml, gelas corong, gelas ukur, dan shaker. Peralatan yang digunakan pada pengaturan pH bahan ialah menggunakan pH meter, wadah plastik. Peralatan yang digunakan

untuk pengaturan suhu ialah freezer, botol plastik, termometer. Peralatan yang digunakan untuk pengaturan konsentrasi biakan ialah pipet volume, erlenmeyer 300ml. Sedangkan pada peralatan yang digunakan pada saat pemisahan pelarut dari ekstrak adalah 1 unit *rotary vacuum evaporator* merk IKA RV10 dan botol vial. Dan pada peralatan yang digunakan untuk uji DPPH adalah botol vial, *beaker glass* 50 ml, erlenmeyer 250 ml, bola hisap, pipet volume 5 ml dan pipet volume 10 ml. Untuk mengidentifikasi pada senyawa fitokimia menggunakan alat *beaker glass* 100 ml, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan gelas ukur.

3.2 Metode Penelitian

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

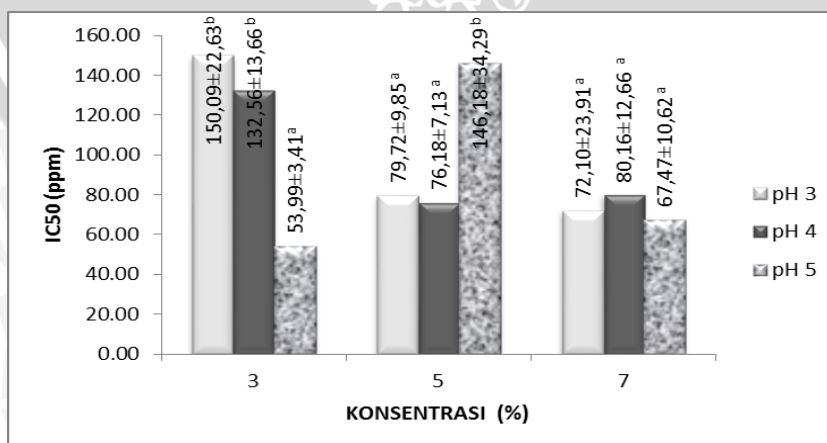
3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

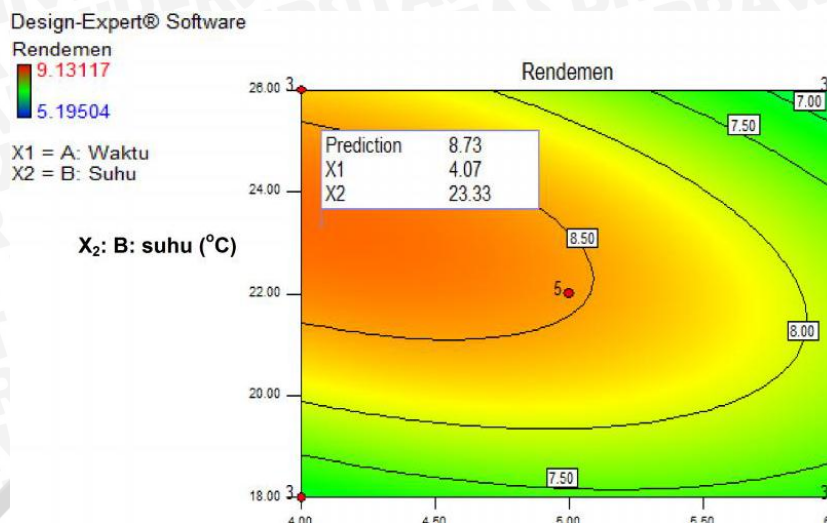
Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahapan yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi 2 proses yaitu ekstraksi alga coklat *Sargassum filipendula* dengan cara fermentasi dan ekstraksi dengan cara pembekuan. Tujuan dari penelitian pendahuluan ini adalah untuk mengetahui nilai optimum dari variabel yang diselidiki. Nilai optimum yang didapat akan digunakan sebagai acuan pada penelitian utama. Variabel bebas dari ekstraksi

dengan cara fermentasi adalah pH sampel dengan pH 3, 4 dan 5, konsentrasi biakan jamur *Trichoderma viride* dengan rasio 3%, 5% dan 7% (b/v). Variabel bebas dari ekstraksi dengan cara pembekuan adalah suhu pembekuan dengan suhu antara -18°C sampai -26°C, lama pembekuan dengan waktu 4 sampai 6 jam.

Hasil penelitian pendahuluan ini didapatkan bahwa nilai optimum dari proses fermentasi berdasarkan penelitian (Ratnafuri, 2013), nilai IC₅₀ terbaik dicapai pada pH 5 dengan konsentrasi 3% selama 5 hari sebesar 53,99 ppm, sehingga berdasarkan data tersebut dapat diambil acuan bahwa pH substrat, konsentrasi biakan starter, dan lama fermentasi yang akan digunakan pada penelitian utama yaitu pH 5, konsentrasi starter 3% (v/b), dan lama fermentasi 5 hari. Pada proses pembekuan berdasarkan penelitian (Rivai, 2013) nilai optimum untuk rendemen dicapai pada suhu -23,33°C selama 4,07 jam sebesar (8,73±1.06)% (bk). Untuk hasil IC₅₀ dan kandungan total fenol tidak signifikan pada suhu -22°C selama 6,86 jam, sehingga berdasarkan data tersebut dapat diambil acuan bahwa suhu dan waktu yang akan digunakan pada penelitian utama yaitu suhu -22°C selama 5 jam. Hasil dari penelitian pendahuluan pada proses fermentasi dapat dilihat pada Gambar 7 dan Hasil dari proses pembekuan dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 7. Grafik Penelitian Pendahuluan Pada Proses Fermentasi (Ratnafuri, 2013)



Gambar 8. Grafik Penelitian Pendahuluan Pada Proses Pembekuan (Rivai, 2013)

3.3.2 Penelitian Utama

Penelitian utama ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang terbaik dari gabungan antara tahapan pembekuan dilanjutkan fermentasi dengan fermentasi dilanjutkan proses pembekuan.

Rancangan penelitian utama dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Desain Rancangan Uji t (t test)

Ulangan	Tahapan Ekstraksi	
	P F	F P
	Kontrol	Kontrol
1	(PF) ₁	(FP) ₁
2	(PF) ₂	(FP) ₂
3	(PF) ₃	(FP) ₃
4	(PF) ₄	(FP) ₄

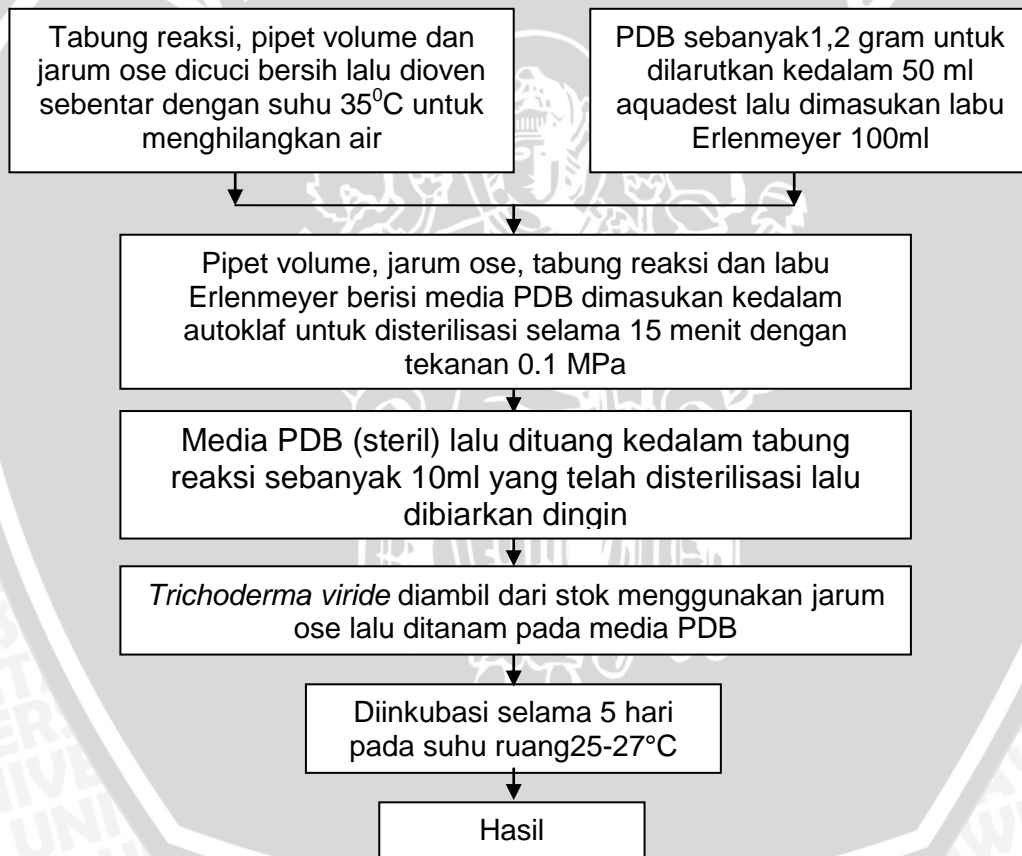
Keterangan :

- P : Pembekuan
- F : Fermentasi
- P F : Pembekuan Dilanjutkan Fermentasi
- F P : Fermentasi Dilanjutkan Pembekuan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Inokulasi *Trichoderma viride* pada PDB

Sebelum fermentasi dilakukan, terlebih dahulu dilakukan penyiapan inokulum (starter) dengan media cair PDB (*Potatoe Dextrose Broth*). Biakan kapang diinokulasikan secara aseptis dengan jarum ose didalam tabung reaksi yang berisi media PDB dan ditumbuhkan secara aerobik selama 5 hari menggunakan inkubator goyang pada 30°C atau suhu kamar. Proses inokulasi biakan *Trichoderma viride* dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Inokulasi *Trichoderma viride* pada PDB

3.4.2 Perhitungan Koloni Jamur dengan Hemacytometer (Metode Petroff Hauser)

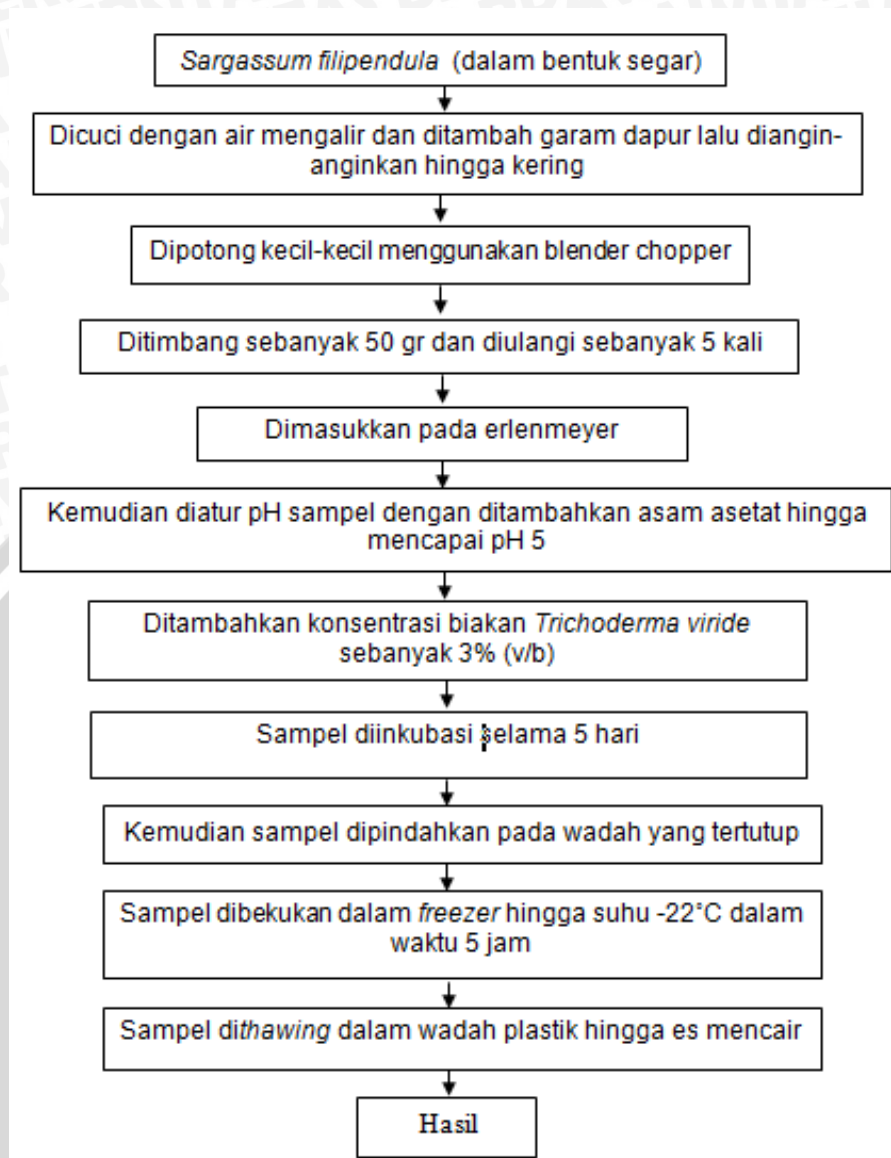
Dalam metode *petroff hauser*, hitungan mikroskopik dilakukan dengan pertolongan kotak-kotak skala dimana dalam setiap ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 25 buah kotak besar dengan luas 0.04 mm² dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil. Tinggi sampel yang terletak diantara gelas obyek dan gelas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

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

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

3.4.3 Kombinasi Fermentasi dan pembekuan *Sargassum filipendula*

Proses fermentasi alga coklat *Sargassum filipendula*, sampel yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 50 gram dengan timbangan digital. Setelah itu dimasukkan kedalam *beaker glass* 100 ml dicampur dengan asam asetat dan diatur masing-masing sampel pada pH 5. Selanjutnya sampel yang sudah diatur pH, ditambahkan dengan *Trichodermaviride* dengan konsentrasi 3%^(b/v). Sampel siap difermentasi selama 5 hari pada suhu ruang (27°C). setelah fermentasi sampel dibekukan dengan freezer dengan suhu -22°C. Pembekuan dilakukan selama 5 jam. Skema kerja tahapan Fermentasi dan pembekuan *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 10.

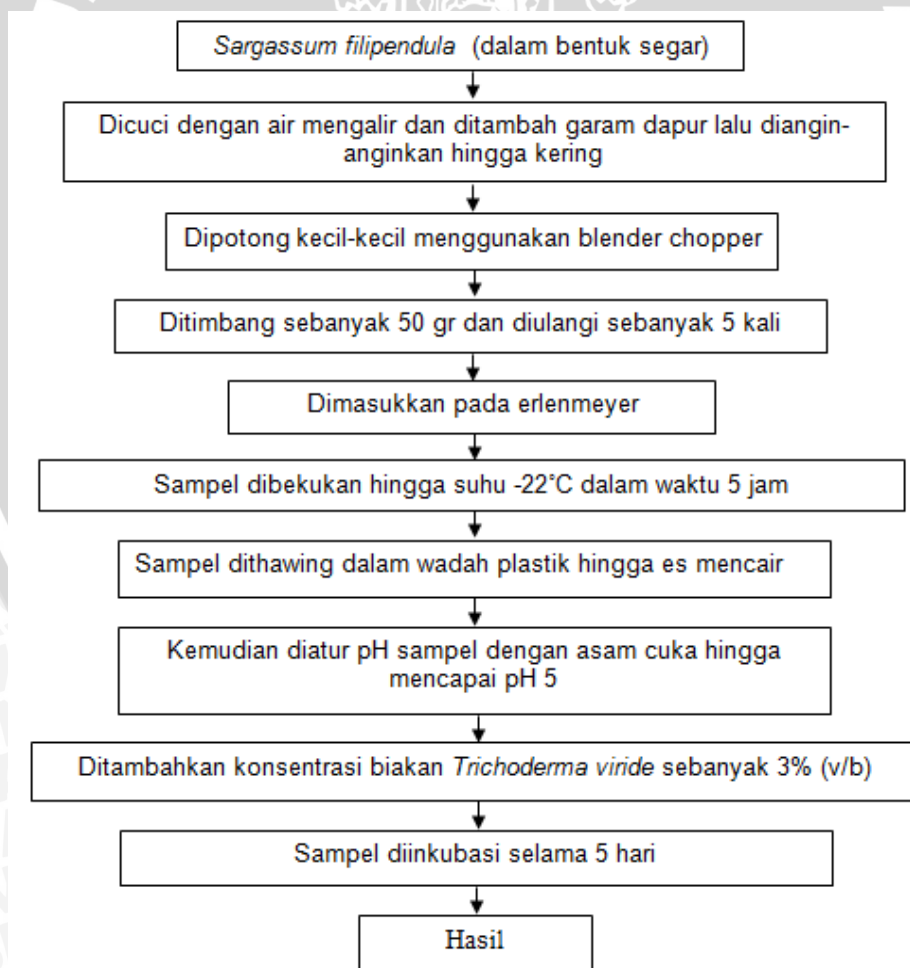


Gambar 10. Skema kerja proses fermentasi dan pembekuan *Sargassum filipendula*

Sampel yang telah terfermentasi dan dibekukan ini kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:3 (w/v) sehingga didapatkan 150 ml pelarut. Dimaserasi selama 1x24 jam di atas *shaker*. Maserasi ini bertujuan agar zat-zat aktif yang ada pada alga coklat *Sargassum filipendula* dapat keluar dari dinding sel. Setelah dimaserasi larutan tersebut disaring dengan kertas saring yang ditempatkan dalam erlenmeyer 500 ml. Larutan ini disebut filtrat alga coklat *Sargassum filipendula*.

3.4.4 Kombinasi Pembekuan dan Fermentasi *Sargassum filipendula*

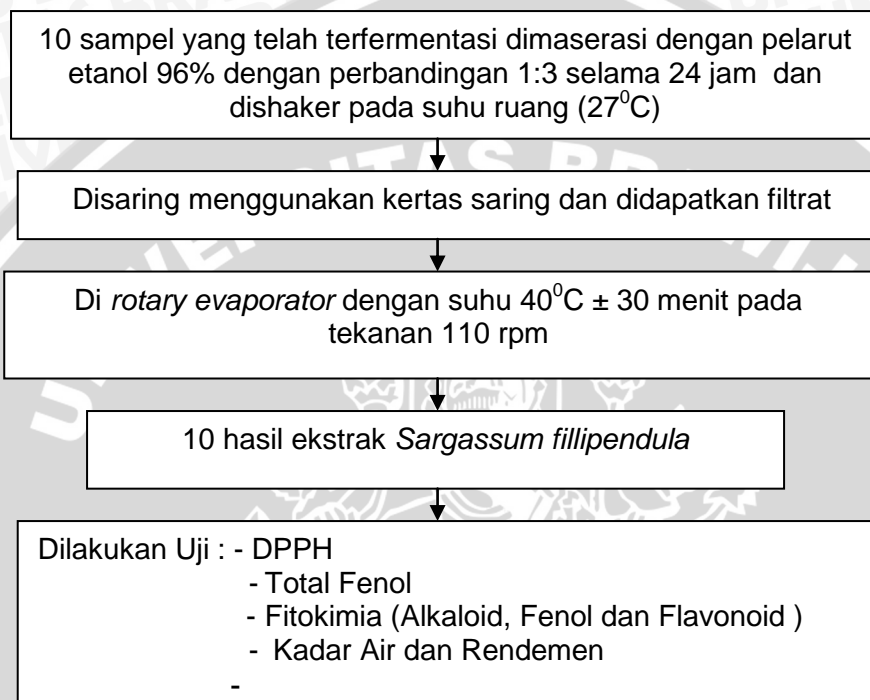
Proses Pembekuan alga coklat *Sargassum filipendula*, sampel yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 50 gram dengan timbangan digital. Setelah itu dimasukkan kedalam wadah plastik tertutup. Sampel dibekukan pada suhu -22°C . Proses pembekuan dilakukan selama 5 jam. Sampel yang telah dibekukan dithawing dengan air mengalir selama setengah jam. Selanjutnya sampel dicampur dengan asam asetat dan diatur masing-masing sampel pada pH 5. Setelah sampel sudah diatur pH, ditambahkan dengan *Trichoderma viride* dengan konsentrasi 3% (v/v). Sampel siap difermentasi selama 5 hari pada suhu ruang (27°C). Skema kerja tahapan Pembekuan dan Fermentasi *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Skema kerja proses pembekuan dan fermentasi *Sargassum filipendula*

3.4.5 Ekstraksi Kasar (Crude Extract) (Suryaningrum *et al.*, 2006)

Filtrat alga coklat *Sargassum fillipendula* yang telah disaring kemudian ekstrak dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40°C selama ± 30 menit hingga filtrat tersebut menjadi lebih pekat. Skema kerja Proses ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Skema Kerja Ekstraksi Kasar *Sargassum fillipendula*

3.5 Prosedur Analisis Parameter Uji

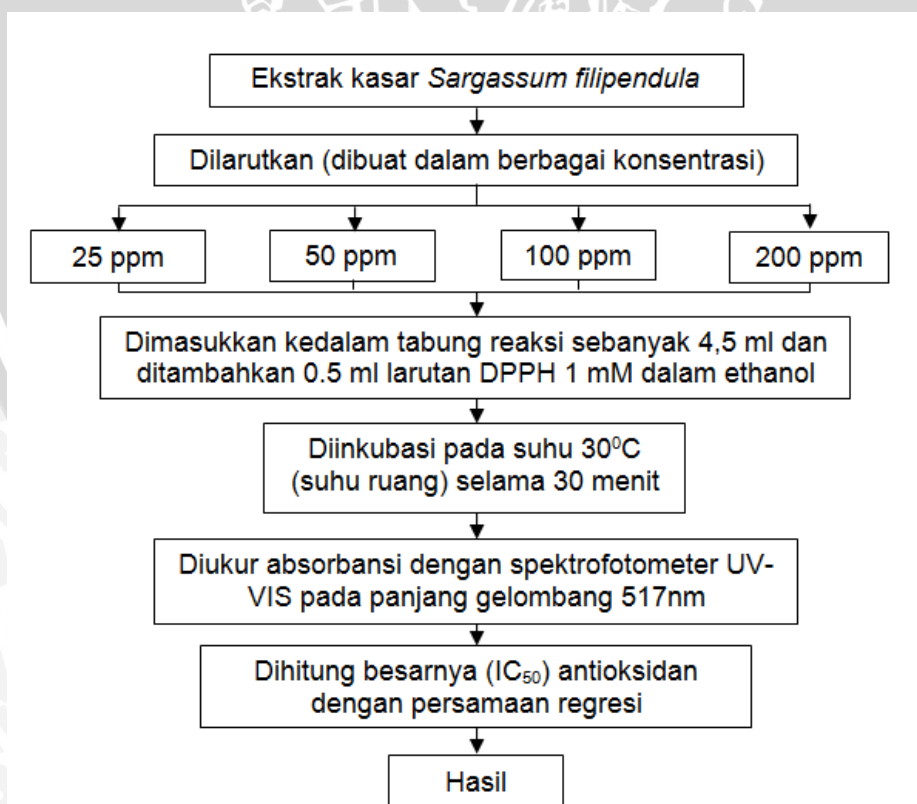
3.5.1 Uji Antioksidan (DPPH)

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

menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus:

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

Nilai konsentrasi dan hambatan ekstrak diplot masing-masing pada sumbu x dan y. Persamaan garis yang diperoleh dalam bentuk $y = b \ln(x) + a$ digunakan untuk mencari nilai IC (*inhibitor concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀ menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Suryaningrum *et al.*, 2006). Skema Kerja Uji Antioksidan dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Skema Kerja Uji Antioksidan (DPPH)

3.5.2 Uji Total Fenol (Yangthong *et al.*, 2009)

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

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

Uji kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah air bebas ekstrak sampel dalam ethanol 96%. Uji yang dilakukan berdasarkan metode *Thermogravimetri* (Sudarmadji *et al.*, 1997) yaitu dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105-110⁰C selama 3 jam atau didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Prosedurnya yaitu sampel yang telah diketahui beratnya dimasukan dalam botol timbang yang juga telah diukur beratnya lalu dimasukan ke dalam oven dengan suhu 105⁰C selama 3 jam. Ditimbang berat akhir sampel setelah dikeringkan lalu dihitung persen kadar air dengan rumus :

$$\% \text{Kadar air} = \frac{(A + B) - C}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat botol timbang

B = Berat sampel

C = Berat akhir (Botol timbang + sampel)

3.5.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak *Sargassum fillipendula* masing-masing pelarut. Uji fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, flavonoid, dan fenolik.

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

3.6 Analisis Data

Pada penelitian pendahuluan dianalisis dengan RSM (*Respon Surface Method*) untuk mencari nilai optimum . pada penelitian utama dengan rancangan Uji t (t test) untuk mengetahui perlakuan terbaik, dalam hal ini kombinasi fermentasi dan pembekuan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil penelitian

Hasil penelitian dari pengaruh kombinasi pembekuan dan fermentasi dengan starter *Trichoderma viride* terhadap aktifitas antioksidan ekstrak kasar alga coklat (*Sargassum filipendula*) dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Data Hasil Penelitian

PERLAKUAN	K. AIR (%)	Rendemen filtrat		IC 50 (ppm)	Total Fenol (mg GAE/g)
		BASAH (%)	KERING (%)		
K. FP	93.81	56.46	3.50	153.60	92.88
FP	94.67	43.09	2.27	144.45	114.01
K. PF	96.53	52.81	1.84	155.86	93.59
PF	96.53	47.76	1.65	142.59	116.56

Keterangan :

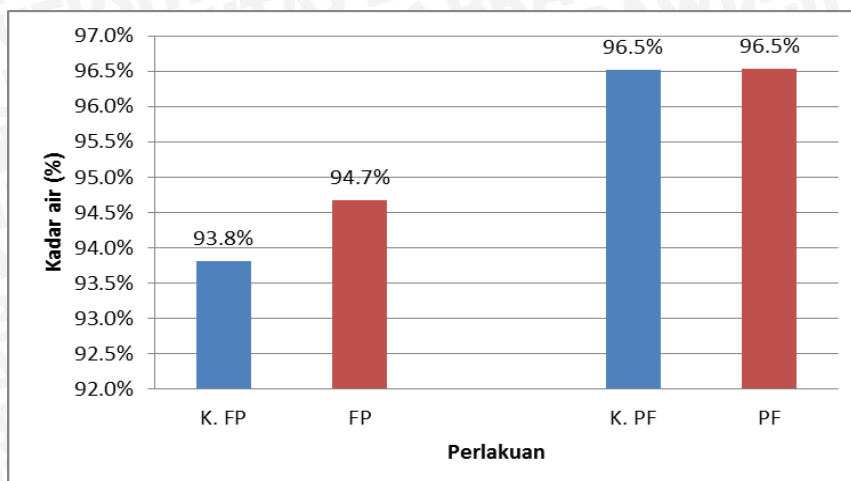
- K.FP = kontrol pada kombinasi fermentasi ke pembekuan
- FP = kombinasi fermentasi ke pembekuan
- K.PF = kontrol pada kombinasi pembekuan ke fermentasi
- PF = kombinasi pembekuan ke fermentasi

4.2 Kadar Air dan Rendemen

4.2.1 Kadar Air

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

Perhitungan analisis terhadap persen kadar air ekstrak ethanol *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 1. Hasil Uji t persen kadar air tidak berbeda nyata oleh ($p < 0.05$) dengan nilai berkisar antara 94.67-96.53%, baik kombinasi fermentasi pembekuan maupun kombinasi pembekuan fermentasi. Grafik hasil uji lanjut persen kadar air dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Persen kadar air ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil kombinasi fermentasi dan pembekuan

Dari grafik diatas diketahui bahwa persen kadar air terendah terdapat pada kontrol fermentasi pembekuan tanpa *Trichoderma viride* sebesar 93,81%, sedangkan persen kadar air tertinggi terdapat pada kontrol pembekuan fermentasi dan perlakuan pembekuan fermentasi dengan nilai sama sebesar 96,53%. Perbedaan persen kadar air ini secara statistik dinyatakan tidak berbeda nyata. Salah satu faktor yang mempengaruhi berlangsungnya proses fermentasi adalah pH. pH awal substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pH 5. Menurut Enari (1983), bahwa *T. viride* dapat tumbuh optimal pada suhu 32-35°C serta pH sekitar 5. Sehingga pertumbuhannya sangat cocok pada substrat yang banyak mengandung polisakarida dan karbohidrat kompleks seperti selulosa, hemiselulosa dan pektin.

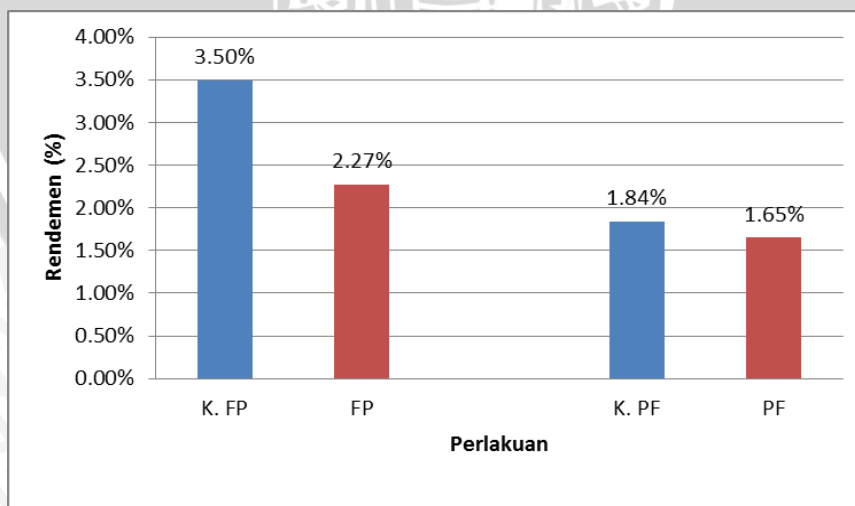
Pada persen kadar air dan persen rendemen sampel saling berhubungan. Nilai rendemen tinggi belum tentu berkualitas tinggi dan lebih banyak senyawa bioaktif yang dihasilkan, karena jika kadar airnya juga tinggi maka konsentrasi ekstrak yang didapatkan rendah. Perlakuan kombinasi fermentasi dan pembekuan dengan penambahan konsentrasi biakan *Trichoderma viride*

memberikan hasil persen rendemen dan persen kadar air yang tidak berbeda nyata secara statistik.

4.2.2 Rendemen

Kombinasi perlakuan yang berbeda, berupa kombinasi fermentasi dan pembekuan menunjukkan nilai rendemen kering rata-rata pada perlakuan FP sebesar 2.27% dan pada perlakuan PF sebesar 1.65%. Rendemen ekstrak merupakan perbandingan antara bobot ekstrak kasar yang dihasilkan dengan bobot awal yang digunakan dan nilainya dinyatakan dalam bentuk persen. Persen rendemen menunjukkan seberapa banyak ekstrak yang bisa diambil dari sampel. Semakin besar persen rendemen maka semakin banyak ekstrak senyawa bioaktif yang didapatkan.

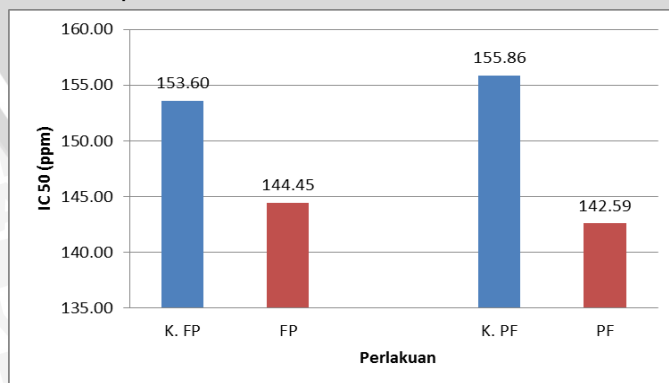
Perhitungan analisis terhadap persen rendemen ekstrak ethanol *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 2. Hasil Uji t, persen rendemen tidak berpengaruh secara nyata oleh ($p < 0.05$) (Lampiran 1), baik perlakuan fermentasi pembekuan maupun pembekuan fermentasi. Grafik hasil persen rendemen dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Persen Rendemen ekstrak kasar *Sargassum filipendula* hasil kombinasi fermentasi dan pembekuan

4.3 Aktivitas Antioksidan

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena merupakan metode yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu singkat (Hanani, 2005). Aktivitas antioksidan dihitung melalui nilai IC_{50} , semakin kecil nilai IC_{50} yang dihasilkan maka semakin besar aktivitas antioksidan yang dimiliki (Panjaitan *et al.*, 2003). IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Suryaningrum *et al.*, 2006). Prinsip uji dengan metode ini yaitu DPPH berperan sebagai radikal bebas yang direndam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning atau kuning gelap yang dapat diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 517 nm, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Sunarni *et al.*, 2005). Antioksidan pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah Vitamin C. Nilai IC_{50} pada perlakuan FP didapat sebesar 144.45 ppm dan pada perlakuan PF sebesar 142.59 ppm. Hasil Uji t nilai IC_{50} tidak berpengaruh secara nyata oleh ($p < 0,05$), baik perlakuan kombinasi fermentasi pembekuan maupun kombinasi pembekuan fermentasi. Grafik hasil nilai IC_{50} dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Grafik Nilai IC_{50} Ekstrak Kasar *Sargassum filipendula* hasil kombinasi fermentasi dan pembekuan

Secara keseluruhan aktivitas antioksidan ekstrak *Sargassum fillipendula* masih di bawah aktivitas antioksidan vitamin C sebagai kontrol pembandingan dalam penelitian ini. Hal ini dikarenakan ekstrak *Sargassum fillipendula* bukan merupakan senyawa murni, tetapi masih berupa ekstrak kasar yang mengandung senyawa-senyawa lain yang kemungkinan tidak mempunyai aktivitas antioksidan. Menurut Wikanta *et al.*, (2005) Kadar senyawa antioksidan dalam ekstrak sangat rendah akibat banyaknya komponen lain yang merupakan pengotor atau komponen pengotor yang terdapat didalam ekstrak masih sangat tinggi.

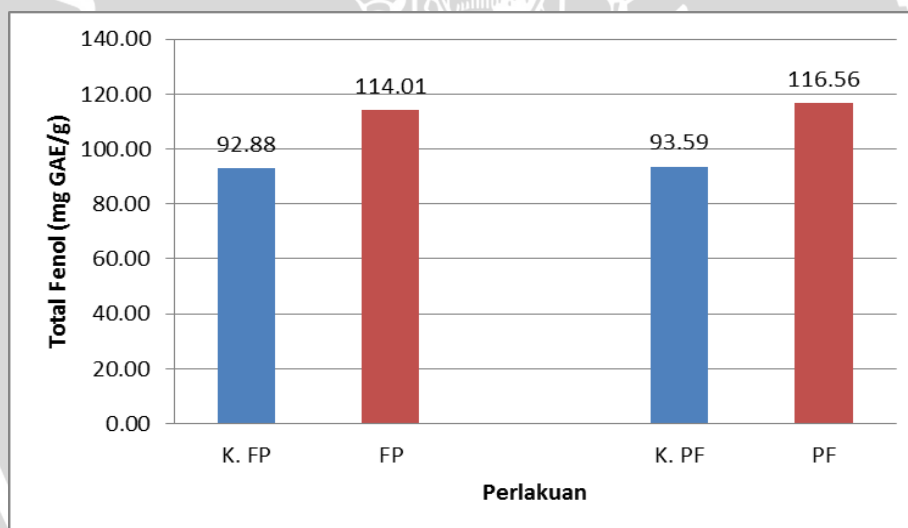
Aktivitas antioksidan ekstrak ethanol *Sargassum fillipendula* memiliki nilai IC_{50} yang masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan vitamin C, hal ini diduga akibat sampel *Sargassum fillipendula* masih berupa ekstrak kasar dan belum melalui proses pemurnian. Akan tetapi dari hasil penelitian telah diketahui bahwa ekstrak *Sargassum fillipendula* yang dikombinasi dengan perlakuan fermentasi dan pembekuan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar 142,59 ppm. Menurut Blouis (1958), suatu senyawa antioksidan dikatakan kuat apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 200 ppm.

4.4 Total Fenol

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

Senyawa fenol mempunyai sifat yang mudah teroksidasi dan sensitif terhadap perlakuan panas (Ramma *et al.*, 2002), sehingga dengan pengeringan secara langsung dengan sinar matahari dapat merusak senyawa fenol secara langsung.

Nilai total fenol rata-rata pada perlakuan FP didapat sebesar 114.01 mg GAE/g dan pada perlakuan PF sebesar 116.56 mg GAE/g. Perhitungan terhadap nilai kandungan total fenol ekstrak ethanol *Sargassum filipendula* disajikan pada Lampiran 4. Hasil Uji t nilai total fenol tidak berpengaruh secara nyata oleh ($p < 0,05$) (Lampiran 1), baik perlakuan kombinasi fermentasi pembekuan maupun kombinasi pembekuan fermentasi. Grafik nilai total fenol dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Grafik Nilai Total Fenol Ekstrak Kasar *Sargassum filipendula* hasil kombinasi fermentasi dan pembekuan

Total fenol dengan aktivitas antioksidan memiliki keterkaitan erat. Semakin tinggi nilai total fenol maka semakin tinggi kemampuan antioksidan dalam mendonorkan elektronnya sehingga semakin tinggi kemampuannya dalam menekan perkembangan radikal bebas, semakin meningkat kemampuan

mereduksi, dan semakin meningkat kemampuannya dalam menghambat oksidasi lipid lanjut (Sandrasari, 2008).

4.5 Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa-senyawa bioaktif di dalam sampel *Sargassum filipendula*. Hasil dari uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 7.

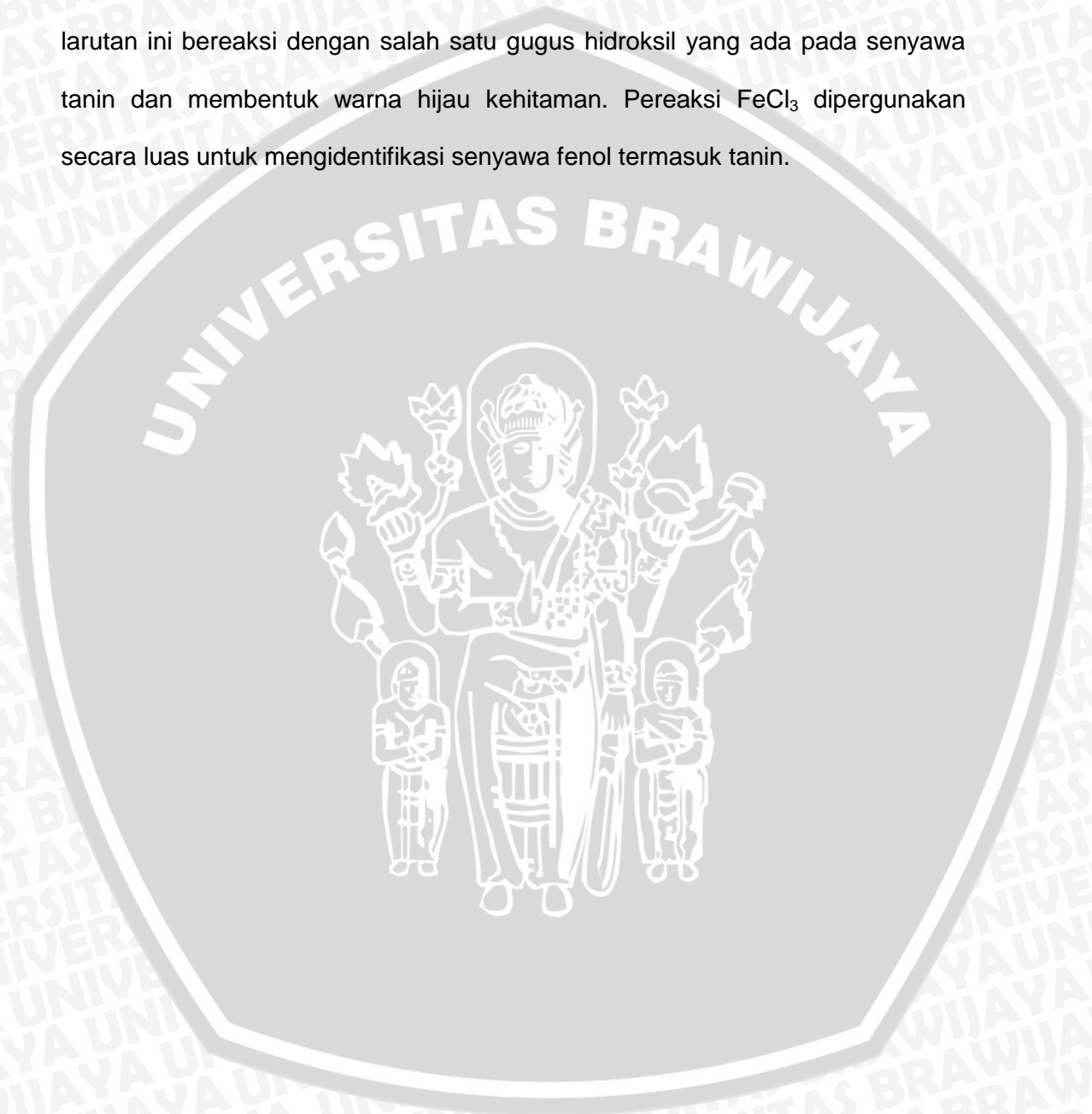
Tabel 7. Hasil Uji Fitokimia *Sargassum filipendula*

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

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

Pada sampel *Sargassum filipendula* yang dilakukan uji fitokimia menunjukkan sampel tersebut mengandung senyawa flavonoid, karena terbentuk warna kuning. Perubahan warna kuning yang tersebut karena senyawa flavonoid bereaksi dengan senyawa amoniak yang ditambahkan pada sampel. Seperti halnya menurut Harborne (1987), flavonoid berupa senyawa fenol, oleh karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau amoniak.

Pada hasil uji fitokimia diketahui sampel *Sargassum filipendula* mengandung senyawa fenol. Hal tersebut ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna hijau kehitaman setelah sampel ditambah larutan FeCl_3 1%. Menurut Marlinda *et al.* (2012), pada penambahan larutan FeCl_3 1% diperkirakan larutan ini bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin dan membentuk warna hijau kehitaman. Pereaksi FeCl_3 dipergunakan secara luas untuk mengidentifikasi senyawa fenol termasuk tanin.



5. Kesimpulan dan Saran

5.1 Kesimpulan

Kombinasi antara fermentasi dan pembekuan yang dilakukan dalam penelitian ini menghasilkan nilai yang sama berdasarkan atas nilai kadar air, rendemen, kandungan total fenol dan IC_{50} .

Nilai yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu kadar air didapat antara 94.67 - 96.53%, rendemen kering sebesar 1.65 - 2.27%, total fenol sebesar 114.01 – 116.56%, dan nilai IC_{50} sebesar 142.59 - 144.45 ppm. Nilai IC_{50} pada penelitian ini menunjukkan bahwa antioksidan yang didapat bermutu sedang.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini yaitu bagi pelaku usaha apabila jumlah rumput yang akan diolah sedikit maka yang baik dilakukan fermentasi dahulu kemudian dilakukan pembekuan. Apabila rumput laut dalam jumlah yang besar maka proses pembekuan lebih baik untuk kemudian dilakukan proses fermentasi sesuai kebutuhan. Penanganan awal rumput laut juga sangat penting, yaitu proses sortasi dan pencucian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul, M. 2003. **Peranan Radikal Bebas dan Antioksidan Dalam Kesehatan dan Penyakit**. [Http://www.Intisari.com/radikal.html](http://www.Intisari.com/radikal.html). Diakses tanggal 30 Maret 2011.
- Andayani, R., Yovita L., dan Maimunah. 2008. **Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L)**. Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang, Sumatra Barat.
- Anonymous, 2012^a. **Alga Laut sebagai Biotarget Industri**. http://www.chem-is-try.org/artikel_kimia/berita/alga_laut_sebagai_biotarget_industri/. Diakses tanggal 10 september 2012.
- _____, 2012^b. **Rumput Laut**. <http://zee-marine.blogspot.com/2011/06/rumput-laut.html>. Diakses tanggal 11 september 2012.
- _____, 2012^c. **Sargassum filipendula**. http://diaryroomblog.blogspot.com/2008_11_01_archive.html. Diakses 11 september 2012.
- _____, 2012^d. **Taxonomi Sargassum filipendula**. http://algaebase.org/search/species/detail/?species_id=823&sk=0&from=results. Diakses 29 november 2012
- _____, 2013^a. **Definisi, Instrumentasi, Prinsip Kerja, Dan Metode Analisis Gas Cromatografi Mass Spectrometry (GCMS)**. http://dhiajenglarasati.blogspot.com/2012_12_01_archive.html. Diakses tanggal 15 april 2013.
- Ansel, Howard C. (1989). **Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi**. Jakarta : UI Press.
- Bachtiar E. 2007. **Penelusuran sumber daya hayati laut (alga) sebagai biotarget industri [skripsi]**. Jatinangor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran.
- Blois, M.S. 1958. **Antioxidant Determinations by The Use of a Stable Free Radical**. Nature, 181, pp. 1199-1200.
- Costello, C. 2003. **Acid mine drainage: Innovative treament technologies**. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovative Office .Washington, DC
- Deacon, J.W. 1997. **Modern Micology**. Blackwell Science. New York.
- De Hoog, G.S. 2000. **Atlas of Clinical Fungi** ed.2: 1-1126

- DKP Sumenep, 2007. **Potensi *Sargassum sp* di Kepulauan Madura**. <http://www.DKPSumenep.com.html>. Diakses pada tanggal 1 Mei 2012 pukul 19.00.
- Domsch, K.H., dan W. Gams. 1972. **Fungi in Agricultural Soils**. Longman Group Limited Publishing. London.
- Edhisambada. 2012. **Antioksidan**. <http://edhisambada.wordpress.com>. Diakses pada tanggal 6 Mei 2012 Pukul 09.30 WIB.
- Enari, T.M. 1983. **Microbial Cellulase In: W.M. Fogarty (Ed). Microbial Enzymes and Biotechnology**. Applied Science Pub. New York
- Fahn, A. 1989.. **Anatomi Tumbuhan**. Diterjemahkan oleh Soediro, A. 1991. Gadjahmada University Press. Yogyakarta.
- Fellow, P.J.1988. **Food Processing Technology. Principle and Practice**. Ellis Horwood. New York.
- Fitter A.H. dan Hay, R.K.M. (1991), **Fisiologi Lingkungan Tanaman**. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Fujimoto, Y., H. Uno, C. Kagen, T. Ueno dan T. Fujita. 1985. **Effect of Diarachidonin on Prostaglandin Ez Synthesis in Rabbit Kidney Medulla Slices**. Biochemical Journal. Page 625.
- Greenvald, P. Kellof, C. Burch-Whitman, C., & Kramer, B.S., 1995. **Chemoprevention**. CA: A Cancer Journal For Clinicians.
- Gunam, I. B. W., Wayan R. A. dan I. B. N. S. Darma. 2011. **Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi**. Jurnal Biologi XV (2):29-33.
- Hanani, E., 2005. **Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia sp*. Dari Kepulauan Seribu**. Departemen Farmasi FMIPA – UI Depok.
- Harborne. J. B. 1987. **Metode Fitokimia**. Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediso, penerbit ITB, Bandung. 69-94, 142-158, 234-238.
- Hartati, S. 2001. **Pemanfaatan Limbah Agar-agar Kertas Untuk Produksi Enzim Selulase dari Kapang *Trichoderma viride***. Teknologi Hasil Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor
- Hartoyo, Dwi. 2013. **ANTIOKSIDAN - Pengertian Antioksidan - Fungsi Antioksidan- Cara kerja Antioksidan - Jenis Jenis Antioksidan**. <http://filsafat-ilmu-fakta-dunia.blogspot.com/2013/03/antioksidan.html>. Diakses tanggal 15 april 2013.
- Heldman, D.R. and T.A, Taylor, 1997. **Modeling of food freezing**, P. 52-64 dalam Erickson, M.C & Y.C. Hung (editor), Quality in Food Freezing.chapman & Hall. New york, USA.

Juniarti, Delvi O. dan Yuhernita. 2009. **Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.)**. Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta, Indonesia.

King, C.J., 1971. **Freeze Drying of Food** CRC. The Chemical Rubber co., Clevelanland- Ohio.

Kosaric, N., D.C.M. Ng I. Russels and G.S. Stewart, 1980. **Ethanol Production by Fermentation : an Alternative Liquid Fuel dalam Advance in Microbiology**.D. Pearlman (Ed) Academic Press. New York.

Larson, R.A. 1988. **The Antioxidants of Higher Plants**. *Phytochemistry*. 27: 969-977

Lichfield, J. H. 1984. **Single-cell Protein Di dalam Sarjoko (ed.). Bioteknologi : Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya**. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee AM, Aruoma OI (2002): **Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Acacia fistula***. *J Agr Food Chem* 50: 5042–5047.

Marlinda, M., M. S. Sangi dan A. D. Wuntu. 2012. **Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitan Ekstrak etanol Biji Buah Alpokat (*Persea Americana* Mill.)**. Jurnal MIPA Unsrat Online 1 (1) 24-28

Mega, I Made, dan Dewa A. 2010. **Screening Fitokimia dan Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak Metanol dan Gaharu (*Gyrinops versteegii*)**. Jurnal Kimia 4 (2) Juli 2010.

Morana, A.M., 2011. **Cellulose from fungi and bacteria and their biotechnological applications**. In A.E. Golan, Cellulose : Types And Action ; Mechanism and Uses (p.6). New York : Nova Science Publishers, INC.

Muchtadi, Indra K., 2012. **Topik ke-23: “Anti Oksidan”**. <http://indramuhtadi.weebly.com/1/post/2010/11/topik-ke-23-anti-oksidan.html> . Diakses tanggal 29 november 2012.

Mukhopadhiay, M. 2000. **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide**. CRC Press. London. New York.

Nazir. 1989. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Nurhidayat. 2008. **Fermentasi Pada Produk Pangan**. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol XIX no 2. Thn 2008. Agroindustri.

Nurmilla, O.Y. 2006. **Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galangal*) dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazil)**. Universitas Diponegoro. Semarang.

- Praptiwi, P., Dewi, M., dan Harapini. 2006. **Nilai Peroksida dan Anti Radikal Bebas Diphenyl Pycrylhydrazil Hidrate DPPH Ekstrak Methanol Knema laurina**. Majalah Farmasi Indonesia. (17) 1: 32-36.
- Pratt DE. 1992. **Natural antioxidant from plant material**. Di dalam: Huang MT, Ho CT, Lee CY, editor. Phenolic Compound in Food and Their Effect on Health. Washington DC: American Society.
- Pujaningsih, R. 2005. **Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas pakan**. Laboratorium Teknologi Makanan Ternak. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Putri, K.H. 2011. **Pemanfaatan Rumput Laut Cokelat (*Sargassum sp*) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh**. IPB. Bogor.
- Rachmaniar, R. 1999. **Potensi Algae Coklat Di Indonesia dan Prospek Pemanfaatannya**. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta.
- Ratnafuri, E., 2013. **PENGARUH pH DAN KONSENTRASI BIAKAN *Trichoderma viride* TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KASAR *Sargassum fillipendula* SEGAR**. Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan Universitas Brawijaya. Malang.
- Rivai, H., 2013. **PENGARUH LAMA WAKTU DAN SUHU PEMBEKUAN LAMBAT TERHADAP RENDEMEN DAN MUTU ANTIOKSIDAN ALGA COKLAT *Sargassum filipendula***. Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan Universitas Brawijaya. Malang.
- Sandrasari, D.A. 2008. **Kapasitas Antioksidan dan Hubungannya dengan Nilai Total Fenol Ekstrak Sayuran *Indigenous***. Intitut Pertanian Bogor. Bogor
- Sastrohamidjojo, H. 1996. **Kromatografi**. Liberty. Yogyakarta. Halaman 6-12.
- Saono, S. 1976. **Koleksi Jasad Renik Suatu Prasarana yang Diperlukan Bagi Pengembangan Mikrobiologi**. Berita Ilmu Pengetahuan dan Teknologi. Jakarta.
- Sekarsari, I. D. 2003. **Seleksi Isolat Bakteri Rumen (Anaerob) Penghasil karboksi Metil Selulase**. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Sudheer KP, Indira V. 2007. **Post Harvest Technology of Horticultural Crops. Peter KV, Chief Editor**. Horticulture Science Series Vol. 7. Pitam Pura, New Delhi: New India Publishing Agency.
- Simanjuntak, M. 2008. **Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Daun Tumbuhan Senduduk (*Melastoma malabathricum L*) Serta Pengujian Efek Sediaan Krim Terhadap Penyembuhan Luka Bakar**. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Sirait. 2007. **Alkaloid**. <http://repository.ipb.ac.id/>. Diakses pada tanggal 17 agustus 2012 pukul 15.00 WIB.

- Srilakshmi, B. 2005. **Food Science Third Edition**. New Age International Publisher. New Delhi. Hal. 334.
- Sudarmadji, S.B., Haryono dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Liberty. Yogyakarta.
- Sunarni, T. 2005. **Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae**, *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 (2), 2001, 53-61.
- Suratmo. 2009. **Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Antioksidan**. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang. Indonesia. 5 hal.
- Suryaningrum, D., Wikanta, T. dan Kristiana, H. 2006. **Uji Aktivitas Antioksidan Dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* Dan *Eucheuma cottonii***. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol.1 No. 1 Juni 2006.
- Tannenbaum, S.R. dan D.LC.Wang. 1975. **Single-cell Protein IT**. London: The Massachusetts Institute of Technology Press.
- Utami, W dan Suhendi, A. 2009.. **Analisis Rhodamin B Dalam Jajanan Pasar Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis**. *Penelitian Sains & Toksikologi*. **10(2)**: 148-155, Surakarta
- Vaclavik VA, Christian EW.2008. **Essentials of Food Science. Third edition**. NewYork: Springer.
- Vogel, A.I. 1987. **Textbook of Practical Organic Chemistry**. Revised by Furnies B.S. 4nd Edition. New York.
- Wasetiawan, 2010. **Algae**. [Http://www.blog.unila.ac.id](http://www.blog.unila.ac.id). Diakses tanggal 30 Juli 2012.
- Wikanta, T., Hedi I.Y., dan M. Nursed. 2005. **Uji Aktivitas Antioksidan, Toksisitas dan Sitotoksisitas Ekstrak Alga Merah *Rhodymea Palmata***. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* Volume 11 Nomor 4 Tahun 2005. Jakarta
- Winarno, FG. 1990. **Kimia Pangan dan Gizi**. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F.G. dan S. Fardiaz. 1979. **Biofermentasi dan Biosintesa Protein**. Angkasa. Bandung.
- Yangthong, M., Nongporn, H. T., Phromkuntong, W. 2009. **Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand**. *Plant Foods Human Nutrition*. 64 : 218-223.
- Yunasfi. 2008. **Serangan Patogen dan Gangguan Terhadap Proses Fisologis Pohon**. Universitas Sumatera Utara

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

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

Zaldifar, M. 2001. **Trichoderma aureoviride 7-121 a mutant with enchaneed production and/ or biocontrol**. 9hml. http://www.ejbiotechnology.info/content/vol_14/issue3full/7/index.html. Diakses pada tanggal 4 Februari 2013



Lampiran 1. Uji t

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IC50	FP	4	1.4444E2	9.12037	4.56019
	PF	4	1.4258E2	5.45347	2.72673
R.BASAH	FP	4	43.0950	4.56381	2.28191
	PF	4	47.7575	3.84475	1.92237
R.KERING	FP	4	2.2675	.71830	.35915
	PF	4	1.6500	.24671	.12336
TPC	FP	4	1.1401E2	15.70840	7.85420
	PF	4	1.1656E2	10.84672	5.42336
k.AIR	FP	4	94.6725	1.92760	.96380
	PF	4	96.5325	.60373	.30187

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
IC50	Equal variances assumed	.457	.524	.350	6	.738	1.86000	5.31323	-11.14100	14.86100
	Equal variances not assumed			.350	4.902	.741	1.86000	5.31323	-11.88056	15.60056
R.BASAH	Equal variances assumed	.092	.772	-1.563	6	.169	-4.66250	2.98372	-11.96341	2.63841
	Equal variances not assumed			-1.563	5.832	.171	-4.66250	2.98372	-12.01474	2.68974
R.KERING	Equal variances assumed	2.537	.162	1.626	6	.155	.61750	.37974	-.31170	1.54670
	Equal variances not assumed			1.626	3.698	.185	.61750	.37974	-.47167	1.70667
TPC	Equal variances assumed	.470	.519	-.267	6	.799	-2.54500	9.54470	-25.90004	20.81004
	Equal variances not assumed			-.267	5.331	.800	-2.54500	9.54470	-26.62938	21.53938
k.AIR	Equal variances assumed	3.621	.106	-1.842	6	.115	-1.86000	1.00996	-4.33130	.61130
	Equal variances not assumed			-1.842	3.583	.148	-1.86000	1.00996	-4.79764	1.07764

Lampiran 2 Kadar Air

PERLAKUAN	BERAT AWAL (a)	BERAT BT + SAMPEL 2ML	BERAT SAMPEL (b)	BERAT AKHIR (c)	K. AIR
KONTROL FP	17.3054	19.1919	1.8865	17.4222	93.81%
FP 1	21.4875	23.3980	1.9105	21.5793	95.19%
FP 2	28.6270	30.6432	2.0162	28.7920	91.82%
FP 3	20.2095	22.1320	1.9225	20.2877	95.93%
FP 4	18.5654	20.4845	1.9191	18.6470	95.75%
KONTROL PF	18.1303	20.0902	1.9599	18.1984	96.53%
PF 1	22.3309	24.2531	1.9222	22.3959	96.62%
PF 2	18.5696	20.4000	1.8304	18.6197	97.26%
PF 3	18.5488	20.4513	1.9025	18.6162	96.46%
PF 4	21.3188	23.2644	1.9456	21.4008	95.79%

Rumus kadar air =
$$\frac{(a + b) - c}{b}$$



Lampiran 3 Rendemen

PERLAKUAN	BERAT SAMPEL	volume filtrat (ml)	BERAT AWAL (BTL)	BERAT BT + SAMPEL 2ML	BERAT SAMPEL (S)	BERAT AKHIR (BT+S)	Rendemen filtrat	
							BASAH	KERING
KONTROL FP	50.12	30	17.3054	19.1919	1.8865	17.4222	56.46%	3.50%
FP 1	50.17	22	21.4875	23.3980	1.9105	21.5793	41.89%	2.01%
FP 2	49.97	20	28.6270	30.6432	2.0162	28.7920	40.35%	3.30%
FP 3	50.10	21	20.2095	22.1320	1.9225	20.2877	40.29%	1.64%
FP 4	50.05	26	18.5654	20.4845	1.9191	18.6470	49.85%	2.12%
KONTROL PF	50.10	27	18.1303	20.0902	1.9599	18.1984	52.81%	1.84%
PF 1	50.03	26	22.3309	24.2531	1.9222	22.3959	49.95%	1.69%
PF 2	50.66	26	18.5696	20.4000	1.8304	18.6197	46.97%	1.29%
PF 3	49.96	27	18.5488	20.4513	1.9025	18.6162	51.41%	1.82%
PF 4	50.12	22	21.3188	23.2644	1.9456	21.4008	42.70%	1.80%



Lampiran 4 IC₅₀

PERLAKUAN	absorb blanko	ABSORB sampel				IC 50
		25	50	100	200	
KONTROL FP	1.0740	0.785	0.627	0.565	0.520	153.6034
FP 1	1.0740	0.779	0.646	0.570	0.478	144.7694
FP 2	1.0740	0.697	0.592	0.479	0.504	134.8224
FP 3	1.0740	0.769	0.623	0.563	0.534	156.6317
FP 4	1.0740	0.715	0.595	0.529	0.504	141.5640
KONTROL PF	1.0740	0.757	0.594	0.579	0.531	155.8598
PF 1	1.0740	0.694	0.574	0.515	0.517	141.0469
PF 2	1.0740	0.645	0.571	0.518	0.502	135.7397
PF 3	1.0740	0.775	0.606	0.519	0.515	145.2115
PF 4	1.0740	0.783	0.603	0.538	0.518	148.3436

1. Sargassum Filipendula fermentasi-pembekuan (FP)

Konsentrasi ulangan	Absorbansi				% inhibisi				IC50			Rata-rata
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	1.074	1.074	1.074	1.074	0	0	0	0				
25	0.779	0.697	0.7685	0.7145	27.47	35.15	28.45	33.47	144.7694	134.8224	156.6317	141.564
50	0.646	0.592	0.623	0.595	39.90	44.93	41.99	44.60				
100	0.570	0.479	0.5625	0.529	46.93	55.40	47.63	50.74				
200	0.478	0.504	0.534	0.504	55.54	53.07	50.28	53.07				

2. Sargassum Filipendula pembekuan-fermentasi (PF)

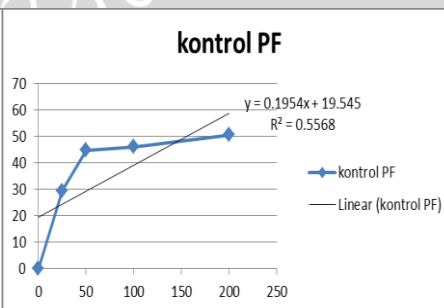
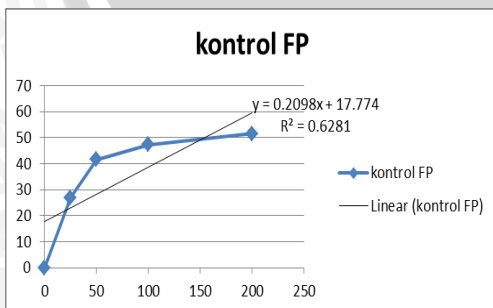
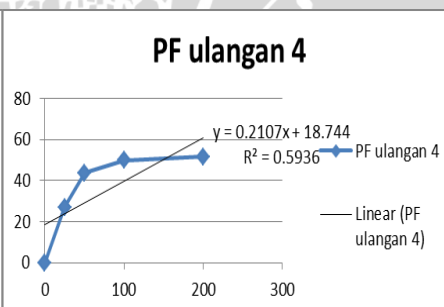
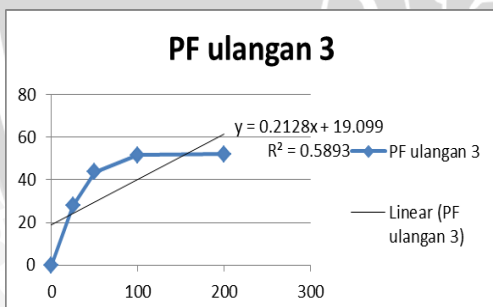
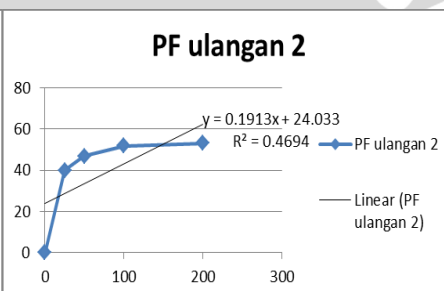
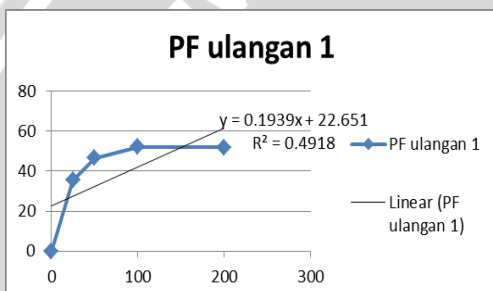
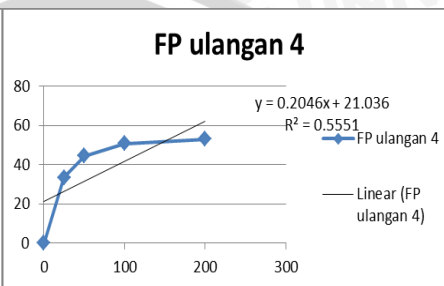
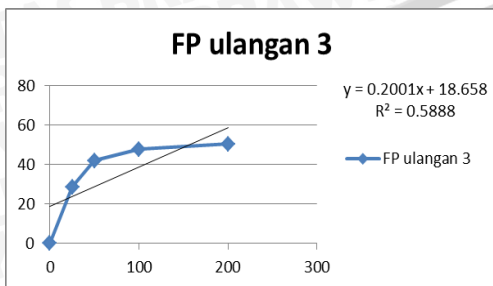
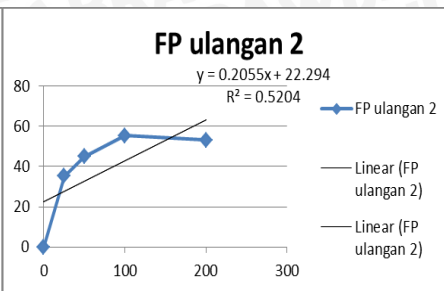
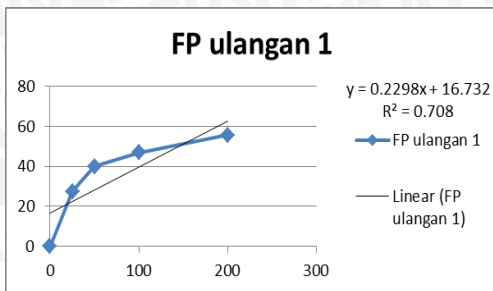
Konsentrasi	Absorbansi				% inhibisi				IC50			Rata-rata
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	1.074	1.074	1.074	1.074	0	0	0	0				
25	0.694	0.645	0.775	0.783	35.428	39.991	27.886	27.14	141.0469	135.7397	145.2115	148.3436
50	0.574	0.571	0.606	0.603	46.601	46.834	43.622	43.85				
100	0.515	0.518	0.519	0.538	52.095	51.816	51.676	49.95				
200	0.517	0.502	0.515	0.518	51.862	53.259	52.095	51.77				

3. Sargassum Filipendula kontrol FP

Konsentrasi	Absorbansi	% inhibisi	IC50	Rata-rata
0	1.074	0	153.60	153.60
25	0.785	26.91		
50	0.627	41.67		
100	0.565	47.39		
200	0.520	51.58		

4. Sargassum Filipendula kontrol PF

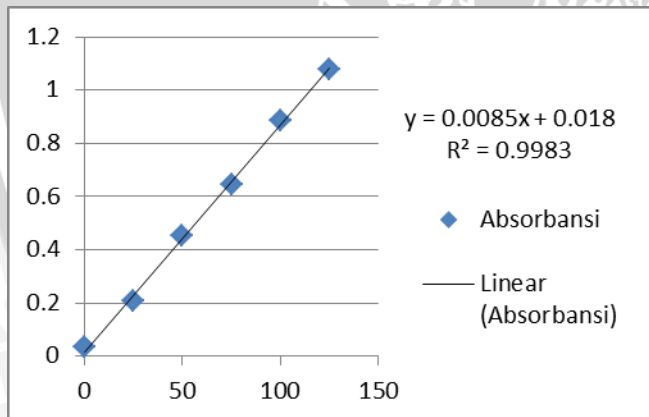
Konsentrasi	Absorbansi	% inhibisi	IC50	Rata-rata
0	1.074	0	155.86	155.86
25	0.757	29.52		
50	0.594	44.74		
100	0.579	46.14		
200	0.531	50.61		



Lampiran 5 TOTAL FENOL

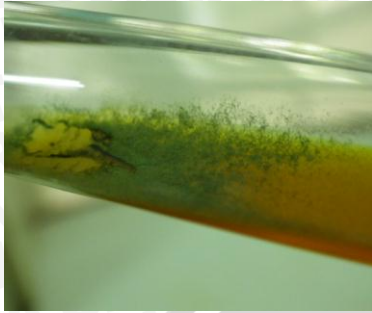
Perlakuan	ABSORBANSI	TOTAL FENOL
KONTROL FP	0.808	92.88
FP 1	0.843	97.00
FP 2	1.160	134.29
FP 3	0.938	108.24
FP 4	1.009	116.53
KONTROL PF	0.814	93.59
PF 1	0.904	104.18
PF 2	0.982	113.35
PF 3	1.026	118.53
PF 4	1.125	130.18

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



Lampiran 6. Gambar Proses Penelitian

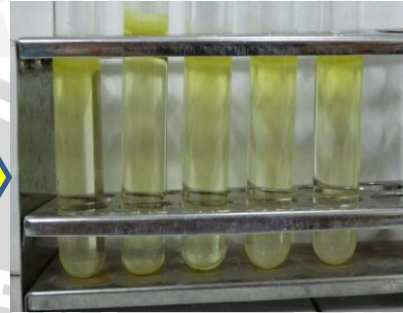
➤ Proses pembiakan starter jamur *Trichoderma viride*



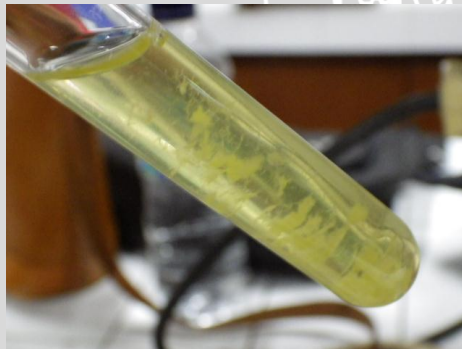
Stok jamur *T. Viride*



Penanaman dalam media PDB



T. viride dalam media PDB



T. viride yang sudah homogen



Divortex agar homogen

➤ Penanganan awal sampel *Sargassum fillipendula*



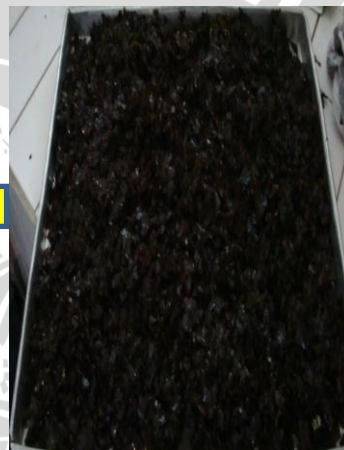
Sargassum fillipendula segar



Pencucian



Proses *chopping*



Penirisan



Penimbangan sampel

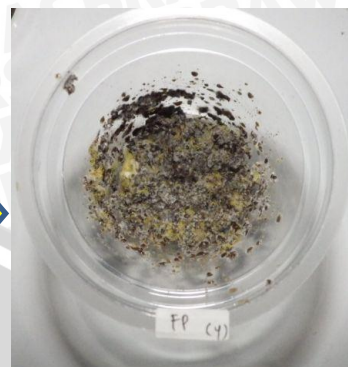
➤ **Proses fermentasi sampel *Sargassum fillipendula***



Pengaturan pH



Penambahan starter *T. Viride*



Sampel yang telah terfermentasi

➤ **Proses pembekuan sampel *Sargassum fillipendula***



sampel segar dan fermentasi



pembekuan lambat



setelah pembekuan



Sampel setelah dithawing



sampel di thawing



Hasil proses pembekuan

➤ Proses ekstraksi sampel



Penyaringan sampel



Hasil penyaringan



Pemisahan pelarut dengan sampel menggunakan vacuum rotary evaporator

➤ Proses perhitungan rendemen dan kadar air



Perhitungan rendemen



Perhitungan kadar air



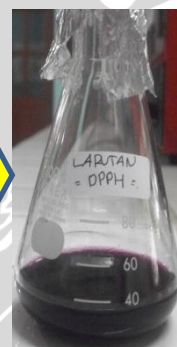
➤ Uji aktifitas Antioksidan (Metode DPPH)



Proses pengenceran



Hasil pengenceran



Larutan DPPH



Sampel yang telah ditambah DPPH

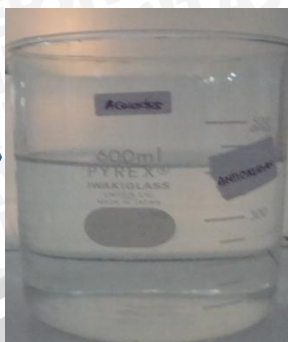


Proses penghitungan absorbansi sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

➤ Uji Total Fenol



Reagen etanol



Reagen aquadest



Reagen follin



Na₂CO₃



Proses penghitungan absorbansi sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



Sampel yang telah diuji Total fenol

Uji Fitokimia



Reagen $HgCl_2$



Reagen I_2 dan KI



Uji fenolat



Uji flavonoid



Uji alkaloid meyer



Uji alkaloid wagner