

**UJI TOKSISITAS KLOROFIL B DARI ALGA COKLAT *Sargassum filipendula*
DENGAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test***

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

Oleh:
**NAJMAH AROFAH
NIM. 125080300111069**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

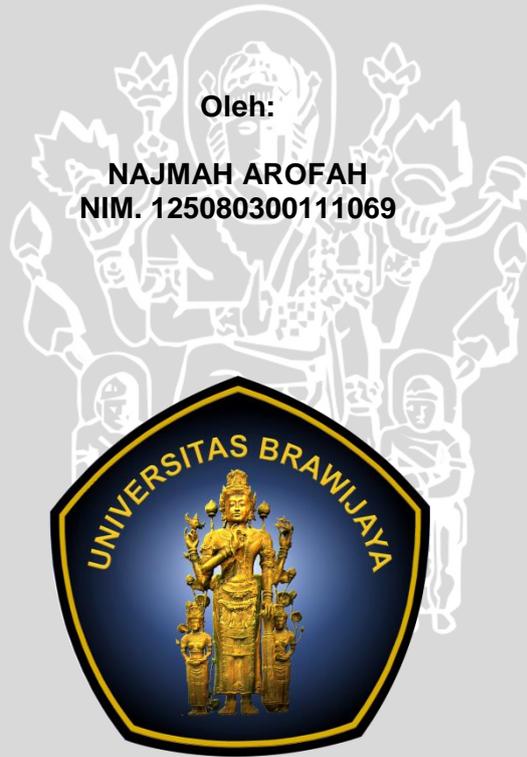
**UJI TOKSISITAS KLOROFIL B DARI ALGA COKLAT *Sargassum filipendula*
DENGAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test***

**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:

**NAJMAH AROFAH
NIM. 125080300111069**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

SKRIPSI
UJI TOKSISITAS KLOORIFIL B DARI ALGA COKLAT *Sargassum fillopendula*
DENGAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test*

Oleh:
NAJMAH AROFAH
NIM. 125080300111069

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 23 September 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP
NIP. 19810602 200604 1 001
Tanggal: 18 OCT 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS
NIP. 19550503 198503 2 001
Tanggal: 18 OCT 2016

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal: 18 OCT 2016



Mengetahui
Ketug. Jurusan MSP,

Dr. Ir. Arinda Wilujeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal: 18 OCT 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, September 2016

Mahasiswa

Najmah Arofah

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS dan Ibu Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku pembimbing, yang telah banyak memberikan pengarahan, bimbingan serta ilmunya selama proses penelitian maupun penyusunan hingga terselesaikannya laporan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi, MP dan Bapak Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku penguji yang telah banyak memberikan saran serta masukan dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
3. Sujud dan terima kasih yang penulis persembahkan kepada Ibunda Yayuk Indah Kusmiati, Ayahanda Achmad Dzul Izzah dan kakanda Lailatus Sya'baniyah tercinta, atas dorongan semangat yang kuat, kebijaksanaan, menguatkan disaat sedih, serta biaya dari awal kuliah hingga terselesaikannya laporan skripsi ini dan tak lupa pula doa.
4. Teman seperjuangan tim "Pigmen" yang telah banyak membantu dengan sepenuh hati, berbagi informasi, serta saling menyemangati, berjuang bersama baik dalam keadaan suka maupun duka.
5. Sahabat-sahabat Luluk Putri Purnamasari, Sindy Yulia Rosalinda, Afifah Fadhila R, Imroatul Faizah dan Ida Maulidatur R. yang senantiasa mendorong, menyemangati sekaligus menghibur disaat jenuh dan sedih, serta selalu memberikan motivasi dalam mengerjakan laporan skripsi ini.
6. Segenap keluarga besar THP 2012 yang senantiasa membantu, menyemangati dan berjuang bersama dari awal masuk kuliah hingga akhir masa perkuliahan.

Malang, September 2016

Najmah Arofah

RINGKASAN

NAJMAH AROFAH. Skripsi tentang uji toksisitas klorofil b dari alga coklat *Sargassum filipendula* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS** dan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**).

Jenis ganggang coklat seperti jenis *Sargassum* sangat potensial, karena ganggang coklat ini mengandung pigmen klorofil a, b dan c, *beta carotene*, *filakoid*, *violasantin* dan *fukosantin*, *pirenoid*, dan cadangan makanan berupa laminarin, dinding sel yang terdapat pada selulosa dan algin. Salah satu perspektif ke depan klorofil b dalam *Sargassum filipendula* sampai saat ini sepanjang yang diketahui belum mendapatkan perhatian, sementara beberapa penelitian menggunakan bahan uji lain, oleh karena itu akan dilakukan penelitian tentang uji toksisitas klorofil b dari alga coklat *Sargassum filipendula* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* menggunakan nauplii *Artemia sp.* umur 24 jam pada instar III.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas toksisitas klorofil b bagian thallus alga coklat (*Sargassum filipendula*) terhadap *Artemia Salina*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari hingga Mei 2016 di Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Mineral dan Material Maju Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif eksploratif. Penelitian eksploratif memiliki tujuan untuk mengetahui hal yang baru berupa pengelompokan suatu gejala atau fakta tertentu. Isolasi pigmen dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Identifikasi pigmen dilakukan dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis), spektrofotometri UV-Vis dan FTIR. Untuk uji toksisitas dari klorofil b dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang kemudian dianalisa dengan probit LC_{50} .

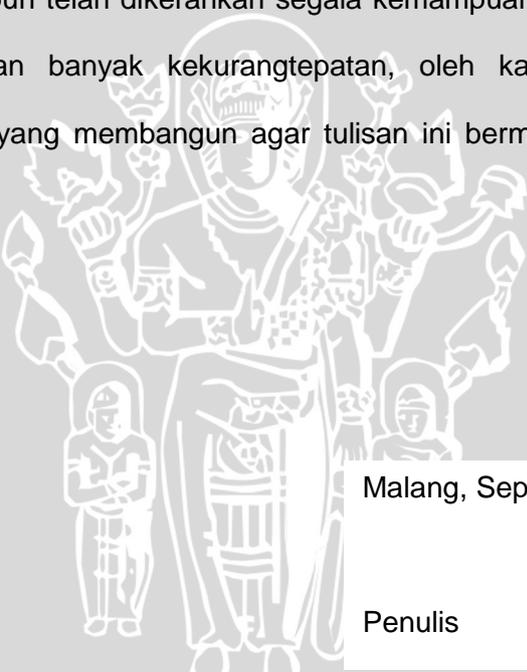
Hasil penelitian didapatkan isolat berwarna kuning kehijauan. Hasil identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis diperoleh nilai R_f 0,49, hasil uji spektrofotometer UV-Vis didapatkan gelombang (λ) maksimal sebesar 645 nm, hasil uji FTIR (*Fourier Transform Infrared*) teridentifikasi senyawa Keton (C=O), Alkana (-CH), Aldehid (-CHO), dan Ester (-CO-O), sehingga sampel teridentifikasi sebagai klorofil b. Hasil isolasi *Sargassum filipendula* menghasilkan kandungan dari pigmen klorofil b sebesar 28000 μg . Dari hasil percobaan dengan tiga kali ulangan diperoleh nilai antilog/ LC_{50} sebesar 847,03 $\mu\text{g/ml}$ yang berarti pigmen klorofil b tidak bersifat toksik.

Dari hasil penelitian dapat disarankan, masih perlu adanya variasi hewan uji berbeda seperti tikus atau mencit menggunakan metode LD_{50} dengan cara klorofil b disuntikkan atau di campurkan dalam makanan hewan uji. Dan pada penentuan konsentrasi uji sebaiknya digunakan perbandingan dengan skala aritmatik.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul Uji Toksisitas Klorofil B dari Alga Coklat *Sargassum filipendula* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*. Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi latar belakang, tinjauan pustaka pendukung, metode penelitian serta hasil dan pembahasan dari penelitian.

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



Malang, September 2016

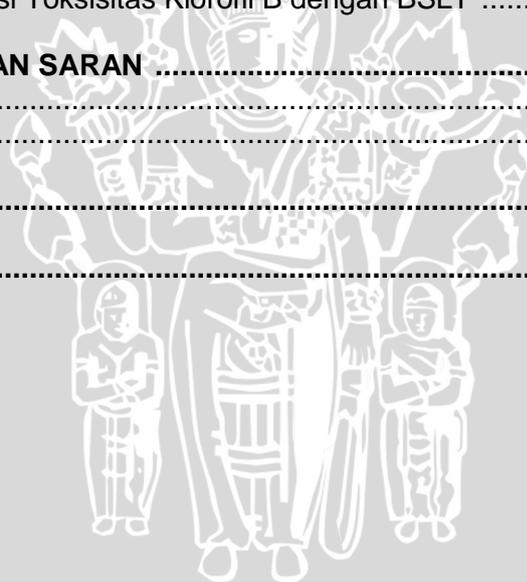
Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Klorofil b	4
2.2 Rumput Laut	6
2.2.1 Rumput Laut Coklat	7
2.2.2 Komposisi Kimia Rumput Laut Coklat	8
2.2.3 <i>Sargassum filipendula</i>	9
2.3 Artemia	10
2.4 Ekstraksi Pigmen	11
2.4.1 Maserasi	12
2.4.2 Fraksinasi	13
2.4.3 Evaporasi	14
2.4.4 Gas Nitrogen	15
2.5 Pelarut Ekstraksi	16
2.5.1 Aseton (CH_3COCH_3)	16
2.5.2 Metanol (CH_3OH)	17
2.5.3 Dietil Eter ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)	18
2.6 Kromatografi Kolom Kromatografi Lapis Tipis	19
2.6.1 Fase Diam	20
2.6.1.1 <i>Silica Gel</i> (SiO_2)	21
2.6.2 Fase Gerak	22
2.6.2.1 N-Heksan	22
2.6.2.2 Etil Asetat	23
2.7 <i>Fourier Transform Infrared</i> (FT-IR)	24
2.8 Spektrofotometer UV-Vis	25
2.9 Toksisitas	26
2.9.1 Uji BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>)	27
2.9.2 Dimetil Sulfoksida (DMSO)	27
3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Alat Penelitian	29
3.2 Bahan Penelitian	29
3.3 Metode Penelitian	30
3.4 Prosedur Penelitian	30
3.4.1 Preparasi Sampel	30

3.4.2 Ekstraksi Pigmen	31
3.4.3 Fraksinasi dan Evaporasi	32
3.4.4 Isolasi Pigmen	34
3.5 Identifikasi Pigmen Klorofil b	37
3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	37
3.5.2 FT-IR	38
3.5.3 Spektrofotometer UV-Vis	39
3.6 Pengukuran Rendemen.....	40
3.7 Uji BSLT	41
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	43
4.1 Data Hasil Penelitian	43
4.1.1 Data Hasil Isolasi dan Identifikasi Pigmen Klorofil B	43
4.1.2 Data Hasil Uji BSLT	43
4.2 Hasil dan Pembahasan	44
4.2.1 Isolasi Pigmen Klorofil B dengan Kromatografi Kolom	44
4.2.2 Identifikasi Klorofil B dengan Kromatografi Lapis Tipis	45
4.2.3 Identifikasi Klorofil B dengan Spektrofotometer UV-Vis	46
4.2.4 Identifikasi Pigmen Klorofil B dengan FT-IR	48
4.2.5 Rendemen Pigmen Klorofil B	50
4.2.6 Identifikasi Toksisitas Klorofil B dengan BSLT	50
5. KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	60



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat-sifat korofil b	5
2. Komposisi kima beberapa jenis rumput laut	9
3. Sifat fisika gas nitrogen	16
4. Sifat-sifat aseton	17
5. Sifat-sifat metanol	18
6. Sifat-sifat dietil eter	18
7. Sifat-sifat n-heksan	23
8. Sifat-sifat etil asetat	24
9. Sifat-sifat dimetil slfoksida (DMSO)	28
10. Hasil isolasi dan identifikasi komponen pigmen klorofil b alga coklat <i>Sargassum filipendula</i>	43
11. Pengaruh berbagai konsentrasi klorofil b dari ekstrak alga coklat <i>Sargassum filipendula</i> terhadap larva <i>Artemia Salina Leach</i>	44
12. Gugus fungsional pita serapan FT-IR	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur molekul (a) klorofil a (b) klorofil b	6
2. Rumput laut coklat <i>Sargassum filipendula</i>	10
3. Morfologi <i>Artemia salina</i> dewasa	11
4. Diagram alir ekstraksi dan fraksinasi <i>Sargassum filipendula</i>	34
5. Diagram alir isolasi pigmen dengan kromatografi kolom	37
6. Skema alat spektroskopi FT-IR	39
7. Diagram alir analisa pigmen dengan spektrofotometer UV-Vis.....	40
8. Isolasi komponen pigmen klorofil b dari alga coklat <i>Sargassum filipendula</i> dengan kromatografi kolom.....	45
9. Hasil identifikasi komponen pigmen klorofil b alga coklat <i>Sargassum filipendula</i> dengan KLT.....	46
10. Pola spektra klorofil b hasil isolasi <i>Sargassum filipendula</i> dalam pelarut aseton	47
11. Spektrum standar klorofil b dalam referensi pelarut aseton 100%.....	47
12. Hasil uji FT-IR klorofil b yang diisolasi dari <i>Sargassum filipendula</i> dalam pelarut aseton	48
13. Grafik kematian artemia	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur penelitian uji toksisitas klorofil b dari alga coklat <i>Sargassum filipendua</i> dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	60
2. Pembuatan larutan	61
3. Dokumentasi proses penelitian	63
4. Tabel hasil isolasi pigmen dengan kromatografi kolom	68
5. Tabel hasil perhitungan nilai Rf pada KLT	70
6. Data absorbansi	71
7. Perhitungan kadar pigmen	72
8. Perhitungan pengenceran uji BSLT	73
9. Uji BSLT	75
10. Perhitungan kadar rendemen pigmen	78
11. Hasil uji FT-IR	79



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut merupakan salah satu sumber daya alam yang berasal dari laut dan memiliki kelimpahan tumbuh di Indonesia khususnya perairan Madura. Menurut Dinas Kelautan dan Perikanan Pemerintah Kabupaten Sumenep (2015), capaian produksi rumput laut di daerah Kabupaten Sumenep dari tahun 2011 hingga 2015 mengalami rata-rata kenaikan produksi sebesar 3,30% pertahun. Pada tahun 2011 produksi rumput laut basah sebesar 533706,37 ton, lalu pada tahun 2012 sebesar 549717,52 ton, pada tahun 2013 sebesar 569651,41 ton, kemudian pada tahun 2014 sebesar 583691,05 ton dan semakin meningkat pada tahun 2015 yaitu sebesar 599353,77 ton. Sedangkan jumlah produksi rumput laut kering pada tahun 2015 sebesar 85622 ton. Data produksi budidaya rumput laut ini diperoleh dari Kecamatan Bluto, Saronggi, Gligenting, Ambunten, Dungkek, Gapura, Talango, Ra'as, Arjasa dan Sapeken, dengan jumlah petani sebanyak 7100 orang pada lahan seluas 143048 Ha.

Kandungan rumput laut umumnya adalah mineral esensial (besi, iodin, aluminium, mangan, kalsium, nitrogen dapat larut, *phosphor, sulfur, chlor, silicon, rubidium, strontium, barium, titanium, cobalt, boron, copper*, kalium, dan unsur-unsur lainnya), asam nukleat, asam amino, protein, mineral, *trace elements*, tepung, gula dan vitamin A, D, C, D E, dan K (Yunizal, 2004).

Menurut Atmadja *et al.*, (1996) pada awal 1980 perkembangan permintaan rumput laut di dunia meningkat seiring dengan peningkatan pemakaian rumput laut untuk berbagai keperluan antara lain di bidang industri, makanan, tekstil, kertas, cat, kosmetika, dan farmasi (obat-obatan). Di Indonesia, pemanfaatan rumput laut untuk industri dimulai untuk industri agar-agar

(*Gelidium* dan *Gracilaria*) kemudian untuk industri kerajinan (*Eucheuma*) serta untuk industri alginat (*Sargassum*).

Jenis ganggang cokelat sangat potensial, seperti jenis *Sargassum* dan *Turbinaria*. Hal ini karena ganggang cokelat ini mengandung pigmen klorofil a, b dan c, *beta carotene*, *filakoid*, *violasantin* dan *fukosantin*, *pirenoid*, dan cadangan makanan berupa laminarin, dinding sel yang terdapat pada selulosa dan algin (Uji, 2014).

Klorofil atau pigmen utama tumbuhan banyak dimanfaatkan sebagai *food suplement* yang dimanfaatkan untuk membantu mengoptimalkan fungsi metabolik, sistem imunitas, detoksifikasi, meredakan radang (inflamatorik) dan menyeimbangkan sistem hormonal (Limantara, 2007). Klorofil juga merangsang pembentukan darah karena menyediakan bahan dasar dari pembentuk haemoglobin. Peran ini disebabkan karena struktur klorofil yang menyerupai hemoglobin darah dengan perbedaan pada atom penyusun inti dari cincin porfirinnya.

Terdapat penelitian terdahulu yang ada kaitannya dengan uji toksisitas dengan mengambil senyawa bioaktifnya seperti ekstrak dari *Eucheuma alvarezii* yang diujikan terhadap *Artemia salina* sebagai studi pendahuluan antikanker (Nurhayati, 2011). Salah satu perspektif ke depan klorofil b dalam *Sargassum filipendula* sampai saat ini sepanjang yang diketahui belum mendapatkan perhatian, sementara beberapa penelitian menggunakan bahan uji lain, oleh karena itu akan dilakukan penelitian tentang uji toksisitas klorofil b dengan menggunakan naupli *Artemia sp.* umur 24 jam pada instar III.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan hasil uraian di atas, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

- Bagaimana aktivitas toksisitas dari klorofil b alga coklat *Sargassum filipendula* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Mengetahui aktivitas toksisitas dari klorofil b alga coklat *Sargassum filipendula* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat:

- Memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga, dan institusi lain mengenai aktivitas toksisitas dari klorofil b alga coklat *Sargassum filipendula*

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Mineral dan Material Maju Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Adapun penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Mei 2016.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klorofil b

Klorofil merupakan pigmen berwarna hijau yang terdapat dalam kloroplas. Pada tumbuhan tingkat tinggi, kloroplas terutama terdapat pada jaringan parenkim palisade dan parenkim spons daun. Dalam kloroplas, pigmen utama klorofil serta karotenoid dan xantofil terdapat pada membran tilakoid (Salisbury dan Ross, 1991).

Menurut Dwidjoseputro (1994), sifat fisik klorofil adalah menerima dan atau memantulkan cahaya dengan gelombang yang berlainan (berpendar atau berfluoresensi). Klorofil banyak menyerap sinar dengan panjang gelombang antara 400-700 nm, terutama sinar merah dan biru. Sifat kimia klorofil, antara lain tidak larut dalam air, melainkan larut dalam pelarut organik yang lebih polar, seperti etanol dan kloroform, inti Mg akan tergeser oleh 2 atom H bila dalam suasana asam, sehingga membentuk suatu persenyawaan yang disebut feofitin yang berwarna coklat.

Klorofil merupakan pigmen utama yang berperan dalam proses fotosintesis dengan menyerap dan menggunakan energi cahaya matahari untuk mensintesis oksigen dan karbohidrat yang dibutuhkan sebagai nutrisi alga. Klorofil merupakan pigmen pembawa warna hijau. Struktur dasar klorofil adalah porpirin, dimana atom nitrogen pada keempat cincin pirol dalam makrosiklik membentuk ikatan kovalen dengan ion Mg^{2+} yang merupakan pusat dari molekul klorofil (Gross 1991; Scheer 2006).

Klorofil merupakan pigmen berwarna hijau yang terdapat dalam kloroplas bersama-sama dengan karoten dan xantofil. Ada dua jenis klorofil yang telah berhasil diisolasi yaitu klorofil a dan klorofil b. Keduanya terdapat pada tanaman dengan perbandingan 3:1. Kedua jenis klorofil tersebut secara kimiawi sangat

mirip. Perbedaan keduanya terletak pada atom C no. 3; metil pada klorofil a diganti dengan aldehid pada klorofil b. Molekul klorofil sampai sekarang belum dapat disintesis. Pada hakikatnya klorofil merupakan senyawa yang tidak stabil sehingga sulit untuk menjaga agar molekulnya tetap utuh dengan warna hijau yang sangat menarik. Beberapa peneliti berpendapat bahwa dalam perannya kloroplas pecah dan klorofilnya keluar. Klorofil dalam daun yang masih hidup berikatan dengan protein. Dalam proses pemanasan terdenaturasi dan klorofil dilepaskan (Winarno, 2004).

Klorofil a dan b merupakan pigmen utama yang terdapat dalam membran tilakoid. Selain kedua pigmen ini terdapat pula pigmen-pigmen kuning sampai jingga yang disebut karotenoid. Ada dua jenis karotenoid yaitu karoten (murni hidrokarbon) dan xantofil (mengandung oksigen). Semua klorofil dan karotenoid terikat pada molekul protein oleh ikatan non-kovalen (Lakitan, 2001). Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan klorofil antara lain gen, cahaya, dan unsur N, Mg, Fe sebagai pembentuk dan katalis dalam sintesis klorofil. Semua tanaman hijau mengandung klorofil a dan klorofil b. Klorofil a menyusun 75 % dari total klorofil. Kandungan klorofil pada tanaman adalah sekitar 1% berat kering (Subandi 2008).

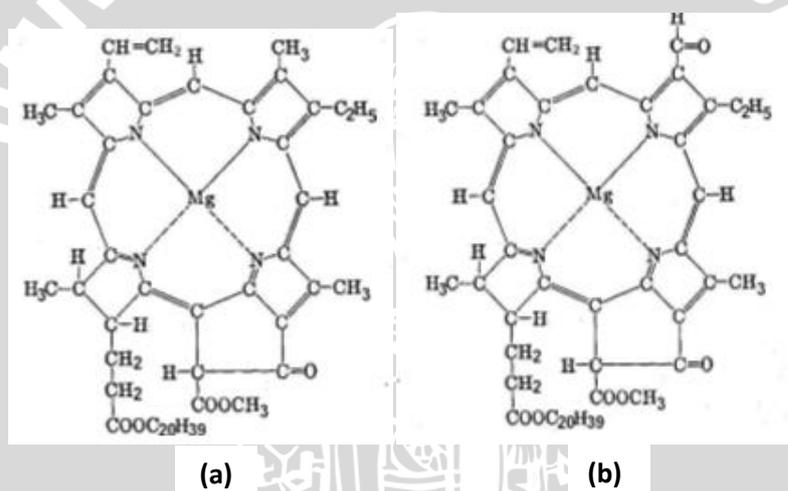
Tabel 1. Karakteristik klorofil b

No.	Karakteristik	Klorofil b
1.	Nama lain	Klorofil b, Chl b
2.	Rumus bangun	$C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$
3.	Sifat	Mudah terbakar, sangat volatil, tidak beresidu
4.	Berat molekul	907,49
5.	Titik leleh	120-130°C
6.	Titik didih	203-204°C
7.	Kelarutan	Larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter, aseton

Sumber: Jeffrey, 1997.

Molekul klorofil terdiri dari porfirin sebagai kepala yang bersifat polar (larut air), terbentuk dari cincin tetrapirrol dengan sebuah atom Mg sebagai pusat, serta

sebuah fitol sebagai ekor. Klorofil a memiliki susunan kimia $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ dengan warna hijau kebiruan. Hemoglobin termasuk ke dalam jenis pigmen yang serupa dengan klorofil a yaitu porfirin (di mana atom logam diapit oleh 4 atom N dari cincin pirol), bedanya atom logam yang ada pada hemoglobin bukanlah Mg melainkan Fe. Sedangkan klorofil b merupakan klorofil dengan warna hijau kekuningan dengan susunan kimia $C_{55}H_{70}MgN_4O_6$. Klorofil jenis ini memiliki struktur yang sama dengan klorofil a, kecuali pada posisi 3 terdapat gugus formil, bukan gugus metil yang dimiliki klorofil a. Struktur molekul klorofil a dan b dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur molekul (a) klorofil a, (b) klorofil b Othmer (1965)

2.2 Rumput Laut

Menurut Suparmi dan Ahmad (2009), Rumput laut atau seaweed merupakan salah satu tumbuhan laut yang tergolong dalam makroalga benthik yang banyak hidup melekat di dasar perairan. Rumput laut merupakan ganggang yang hidup di laut dan tergolong dalam divisi *thallophyta*. Klasifikasi rumput laut berdasarkan kandungan pigmen terdiri dari 4 kelas, yaitu rumput laut hijau

(*Chlorophyta*), rumput laut merah (*Rhodophyta*), rumput laut coklat (*Phaeophyta*) dan rumput laut pirang (*Chrysophyta*).

Rumput laut ini merupakan salah satu kelompok tumbuhan laut yang mempunyai sifat tidak bisa dibedakan antara bagian akar, batang, dan daun. Seluruh bagian tumbuhan disebut thallus, sehingga rumput laut tergolong tumbuhan tingkat rendah (Susanto dan Mucktianty, 2002). Bentuk thallus rumput laut bermacam-macam, ada yang bulat seperti tabung, pipih, gepeng, bulat seperti kantong, rambut, dan lain sebagainya. Thallus ini ada yang tersusun hanya oleh satu sel (*uniseluler*) atau banyak sel (*multiseluler*). Percabangan thallus ada yang thallus *dichotomus* (dua-dua terus menerus), *pinate* (dua-dua berlawanan sepanjang thallus utama), *pectinate* (berderet searah pada satu sisi thallus utama) dan ada juga yang sederhana tidak bercabang. Sifat substansi thallus juga beraneka ragam ada yang lunak seperti gelatin (*gelatinous*), keras diliputi atau mengandung zat kapur (*calcareous*), lunak bagaikan tulang rawan (*cartilagenous*), berserabut (*spongy*) dan sebagainya dengan berbagai keanekaragaman warna (Soegiarto *et al*, 1978).

Kandungan rumput laut umumnya adalah mineral esensial (besi, iodine, aluminium, mangan, kalsium, nitrogen dapat larut, *phosphor*, *sulfur*, *chlor*, *silicon*, *rubidium*, *strontium*, *barium*, *titanium*, *cobalt*, *boron*, *copper*, kalium, dan unsur-unsur lainnya), asam nukleat, asam amino, protein, mineral, *trace elements*, tepung, gula dan vitamin A, D, C, D E, dan K.

2.2.1 Rumput Laut Coklat

Banyak di antara anggota divisi *Phaeophyta* merupakan jenis alga dengan ukuran thalus terbesar di dunia, Pada umumnya alga coklat banyak dijumpai hidup di laut dan tumbuh di dasar perairan dan melekat pada berbagai jenis substrat batuan maupun pasir serta pecahan karang (Sumich, 1992).

Rumput laut coklat merupakan sumber dari metabolit yang bernilai ekonomi seperti karotenoid, laminarin, alginat, fukoidan, manitol, dan phlorotanin (Demirel *et al.*, 2012; Jaswir *et al.*, 2012). Rumput laut coklat lebih dikenal sebagai penghasil alginat dan iodin. Kandungan pigmen pada thallus didominasi oleh klorofil a, c, beta karoten, violasantin, dan fukosantin (Kadi, 2004).

2.2.2 Komposisi Kimia Rumput Laut Coklat

Jenis ganggang cokelat sangat potensial, seperti jenis *Sargassum* dan *Turbinaria*. Hal ini karena ganggang cokelat ini mengandung pigmen klorofil a dan c, *beta carotene*, *filakoid*, *violasantin* dan *fukosantin*, *pirenoid*, dan cadangan makanan berupa laminarin, dinding sel yang terdapat pada selulosa dan algin (Uji, 2014).

Warna rumput laut coklat dipengaruhi oleh komposisi dan kandungan pigmen yang tersusun didalamnya, dimana komposisi pigmen dari masing-masing jenis rumput laut coklat berbeda. Pigmen penyusun pada rumput laut coklat berasal dari golongan klorofil dan turunannya, golongan karotenoid polar (ksantofil), serta golongan karotenoid non polar (karoten). Klorofil a, pigmen berwarna hijau kebiruan, merupakan pigmen utama dalam proses fotosintetik dari tumbuhan, termasuk didalamnya rumput laut coklat, sedangkan karotenoid hanya sebagai pigmen pelengkap. Haugan *et al.* (1995) dan Matsuno (2001) menyatakan bahwa fukosantin merupakan karotenoid utama yang terdapat dalam rumput laut coklat dan warna coklat pada rumput laut ini berasal dari fukosantin (Wehr, 2003). Komposisi kimiawi dari beberapa jenis rumput laut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Kimiawi Beberapa Jenis Rumput Laut

Jenis RL	Karbohidrat %	Protein %	Lemak %	Air %	Abu %	Serat Kasar %
<i>E. Cottonii</i>	57.52	3.46	0.93	14.96	16.05	7.08
<i>Sargassum sp</i>	19.06	5.53	0.74	11.71	34.57	28.39
<i>Turbinari sp</i>	44.90	4.79	1.66	9.73	33.54	16.38
<i>Glacelaria sp</i>	41.68	6.59	0.68	9.38	32.76	8.92

Sumber: Yunizal, 2004

2.2.3 *Sargassum filipendula*

Sargassum filipendula C. Agardh memiliki ciri-ciri panjang thallus hingga 25 cm, tegak, melekat pada substrat berbentuk kerucut, dan melekat dengan erat. Cabang utama memiliki cabang alternatif atau anak cabang, dengan panjang mencapai 5 cm. *Phylloids* yang alternatif, batang, panjang 1-4 cm, lebar 1-3 mm, daun berbentuk utuh-linear, atau mutlak, pada bagian bawah tanaman, tak jarang bercabang, bagian tepi bergerigi. *Cryptostomata* yang banyak, tersebar atau banyak di sekitar pelepah conspicuous. Vesikel bulat, 2-4 mm, pada batang, tangkai panjang hingga 4 mm. *Receptacle* tunggal atau bercabang, luas sampai dengan 1 mm dan panjang 6mm (Kareem, 2009).

Sargassum filipendula menurut Asfar (2015), hidup melekat pada batu karang dan dapat terlepas dari substansinya apabila terkena ombak besar dan hanyut di permukaan laut atau terdampar dipermukaan pantai. Klasifikasi *sargassum filipendula* adalah sebagai berikut:

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



Gambar 2. Rumput laut coklat *Sargassum filipendula*

2.3 Artemia

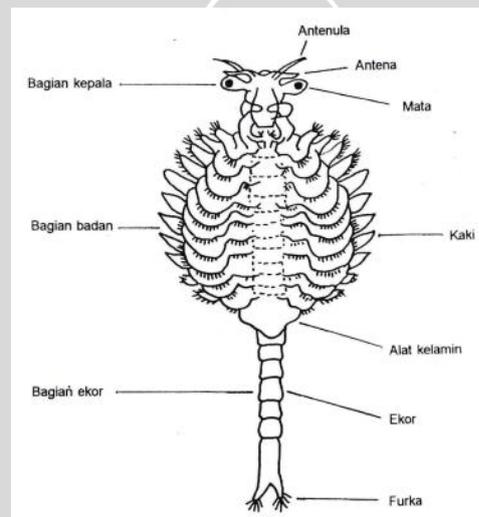
Artemia masuk golongan udang-udangan yang kecil ukurannya, bentuk dewasanya mencapai ukuran 1 cm. Hidup di perairan yang kadar garamnya tinggi sekali, dimana hanya beberapa jenis bakteri serta algae yang dapat bertahan hidup. Hewan ini makan plankton, detritus serta butiran halus dalam air yang dapat masuk ke dalam mulutnya, jadi termasuk "*filter feeder*". Dalam kondisi kadar garam tinggi Artemia akan menghasilkan kista yaitu telur yang diseliputi oleh selubung kuat untuk melindungi embryo dari perubahan lingkungan yang merugikan. Pada kadar garam yang tinggi, kista akan mengapung dan mudah dikumpulkan, dibersihkan, dikeringkan selanjutnya dikalengkan dan dijual. Bila akan digunakan sebagai makanan hidup, kista direndam dalam air laut dan akan menetas menjadi nauplius. Nauplius inilah yang digunakan untuk makanan larva udang atau ikan (Panggabean, 1984).

Artemia mempunyai nama lokal bermacam-macam, antara lain *brine shrimp* (Inggris), *brineworm* (Belanda), *saltzierchen* dan *fezzanwurum* (Jerman), *Verme de sale* (Italia, Spanyol), *Sofereg* (Rusia), *bahar el dud* (Arab) dan lain-lain nama. Biasanya dijual dalam kaleng dengan berat bermacam-macam seperti 365 g, satu *pond* (453 g), bahkan ada yang seberat 5 kg. Artemia dihasilkan oleh beberapa negara dan biasanya namanya disesuaikan dengan daerah dimana

dihasilkan, seperti *San Fransisco Bay*, *Great Salt Lake* (Amerika Serikat), *Macau* (Brasilia), *Buenos Aires* (Argentina), *Laval duc* (Perancis), *Tientsin* (RRC), *Chaplin Lake* (Kanada), *Salinera Es-panola*, *San Fernando*, *Ibiza* (Spanyol) dan masih banyak lagi (Panggabean, 1984).

Klasifikasi *Artemia salina* menurut Mudjiman (1995), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Crustacea
Subclass	: Branchiopoda
Ordo	: Anostraca
Family	: Artemiidae
Genus	: <i>Artemia</i>
Spesies	: <i>Artemia salina</i> Leach



Gambar 3. Morfologi *Artemia salina* Dewasa Harefa (2003)

2.4 Ekstraksi Pigmen

Ekstraksi merupakan suatu metode pengambilan bahan aktif dari suatu tanaman. Dalam proses ekstraksi ini, bahan aktif akan terlarut oleh zat penyari yang sesuai sifat kepolarannya (Gafur, *et al.*, 2013). Pada dasarnya proses ekstraksi terdiri dari tiga langkah, yaitu pencampuran, pembentukan fase setimbang dan pemisahan fase setimbang. Faktor yang mempengaruhi proses

ekstraksi yaitu, ukuran partikel, temperatur, waktu kontak, perbandingan pelarut, pengadukan dan waktu dekantasi (yasita dan Rachmawati, 2009).

Prinsip dari ekstraksi adalah memisahkan komponen yang ada dalam bahan yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut tertentu. Ekstraksi dengan pelarut dilakukan dengan mempertemukan bahan yang akan diekstrak dengan pelarut selama waktu tertentu, diikuti pemisahan filtrat terhadap residu bahan yang diekstrak (Houghton dan Raman, 1998). Ekstraksi dengan menggunakan pelarut seperti etanol, metanol, etil asetat, heksana dan air mampu memisahkan senyawa-senyawa yang penting dalam suatu bahan. Pemilihan pelarut yang akan dipakai dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diisolasi. Sifat yang penting adalah polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa. Menurut Sudarmadji *et al.*, (1989), pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya sehingga akan mempengaruhi sifat fisiko kimia ekstrak yang dihasilkan.

Proses ekstraksi komponen kimia dalam sel tanaman menggunakan pelarut organik. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel (Mc Cabe, 2005).

2.4.1 Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam sel dengan yang diluar sel, maka larutan pekat didesak

keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel (Octaviani *et al.*, 2014).

Ekstraksi dengan metode maserasi merupakan suatu proses pemisahan senyawa dari sampel rumput laut segar dengan tujuan untuk mengambil senyawa yang lebih spesifik dari kedua sampel. Proses maserasi menggunakan metanol akan mengakibatkan metanol masuk kedalam sel sampel rumput laut yang mengandung zat aktif. Perbedaan konsentrasi antara senyawa aktif dalam rumput laut dan metanol mengakibatkan zat aktif yang ada didalam rumput laut baik itu senyawa polar maupun non polar akan didesak keluar dan larut dalam metanol. Menurut Harborne (1994), hal ini dapat terjadi karena metanol memiliki kemampuan untuk mengikat senyawa polar maupun non polar. Hasil ekstraksi yang diperoleh menunjukkan bahwa kedua ekstrak berwarna hijau kecoklatan, warna hijau diindikasikan karena kandungan klorofil, sedangkan warna coklat diakibatkan oleh karotenoid yang didominasi oleh fukosantin dan pigmen lain dari kedua ekstrak tersebut. Limantara dan Heriyanto (2010) menyatakan bahwa rumput laut coklat didominasi oleh klorofil dan karotenoid, yang di dominasi fukosantin.

2.4.2 Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil atau fraksi-fraksi, dimana dalam prosesnya menggunakan corong pisah. Tujuan dari proses fraksinasi ini yaitu untuk memisahkan fraksi pigmen yang terkandung dalam larutan berdasarkan polaritas dan massa jenisnya, maka akan terbentuk dua fase, yaitu fase atas dan fase bawah. Fraksinasi dilakukan dengan penambahan dietil eter ($C_4H_{10}O$), saturasi garam, dan *aquadest* dengan perbandingan berurutan (100 ml : 50 ml : 120 ml : 10 ml) dari filtrat hasil ekstraksi dalam corong pisah, sehingga

komponen pigmen non polar akan terangkat oleh dietil eter dan terbentuk dua fase (fase atas dan bawah). Fase atas bersifat non polar berisikan fraksi yang terkandung ekstrak kasar pigmen terlarut dalam dietil eter, dan fase bawah bersifat polar terdiri dari fraksi yang merupakan campuran saturasi garam, *aquadest* serta pelarut.

Pada proses fraksinasi dietil eter ($C_4H_{10}O$) bertujuan untuk mengikat larutan senyawa pigmen yang terdapat dalam filtrat hasil dari maserasi. Dietil eter ($C_4H_{10}O$) memiliki sifat non polar, sehingga dapat melarutkan senyawa dari pigmen yang bersifat non polar. Dietil eter memiliki massa jenis paling ringan, dalam larutan yang menjadikan senyawa pigmen terlarut dan terangkat ke atas yang disebut fase atas. Pada saturasi garam yang terlarut air akan bersifat polar dan mempunyai massa jenis lebih tinggi, ini mengakibatkan terpisahnya fase atas serta tercampur dengan pelarut filtrat dan sebelumnya digunakan dari proses maserasi, yaitu metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) yang membentuk fase bawah. Fase bawah dari fraksinasi tidak dipergunakan, sedangkan fase atas diukur serta ditampung dalam labu erlenmeyer 250 ml.

2.4.3 Evaporasi

Evaporasi merupakan proses penguapan sebagian pelarut untuk memperoleh zat cair pekat dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Evaporasi bertujuan untuk memekatkan larutan dimana terdiri dari pelarut yang mudah menguap dan zat terlarut yang tak mudah menguap (Praptiningsih, 1999).

Larutan hasil fraksinasi dipekatkan dengan "*Vacuum Rotary Evaporator*". *Vacuum Rotary Evaporator* adalah alat yang berfungsi untuk memisahkan suatu larutan dari pelarutnya sehingga dihasilkan ekstrak dengan kandungan kimia tertentu sesuai yang diinginkan. Cairan yang ingin diuapkan biasanya ditempatkan dalam suatu labu yang kemudian dipanaskan dengan bantuan

pemanas, dan diputar. Uap cairan yang dihasilkan didinginkan oleh suatu pendingin (kondensor) dan ditampung pada suatu tempat (*receiver flask*). Kecepatan alat ini dalam melakukan evaporasi sangat cepat, terutama bila dibantu oleh vakum. Terjadinya *bumping* dan pembentukan busa juga dapat dihindari. Kelebihan lainnya dari alat ini adalah diperolehnya kembali pelarut yang diuapkan. Prinsip kerja alat ini didasarkan pada titik didih pelarut dan adanya tekanan yang menyebabkan uap dari pelarut terkumpul di atas, serta adanya kondensor (suhu dingin) yang menyebabkan uap ini mengembun dan akhirnya jatuh ke tabung penerima (*receiver flask*). Setelah pelarutnya diuapkan, akan dihasilkan ekstrak yang dapat berbentuk padatan (*solid*) atau cairan (*liquid*) (Nugroho, *et al.* 1999). Ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi awal ini (ekstraksi dari sampel) disebut sebagai ekstrak kasar (*crude extract*).

2.4.4 Gas Nitrogen

Menurut Romiyanto (2014), Nitrogen adalah senyawa dengan simbol N memiliki unsur atom 7 pada sistem periodik, di udara sekitar komposisi mencapai 70% pada suhu dan tekanan standar. Nitrogen merupakan gas inert, sebuah zat yang independen, tidak mudah bereaksi dengan unsur atau senyawa lain. Berbentuk gas, tidak berwarna, tidak berbau dan tidak berasa. Memiliki titik lebur -196°C dan di proses di kilang ASP (*Air Separation Plant*) berdasarkan titik leburnya. Prinsip penguapan pelarut dengan menggunakan gas nitrogen ialah molekul N_2 berikatan kovalen rangkap tiga dengan energi ikatan tinggi bereaksi dengan molekul pelarut, selain itu nitrogen bereaksi dengan hidrogen atau oksigen pada suhu tinggi.

Tabel 3. Sifat Fisika Gas Nitrogen

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

Sumber: Romiyanto, (2014)

2.5 Pelarut Ekstraksi

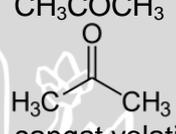
Organisme autotrof memiliki satu pigmen utama yaitu pigmen klorofil dan dua pigmen asesoris yaitu karotenoid dan fikobilin protein/fikobilin. Karotenoid terbagi lagi menjadi dua: kelompok pigmen karoten dan xantofil, sedangkan fikobilin terbagi menjadi empat: fikoeritrobin, fikosianobilin, fikoeritrosianin, dan fikourobilin (Nobel, 2009). Berdasarkan kepolaran dan kelarutannya, pigmen-pigmen ini dikelompokkan ke dalam golongan pigmen polar (hidrofilik) dan non polar (lipofilik). Klorofil dan karotenoid termasuk pigmen non polar dan harus diekstrak dengan pelarut organik (metanol, etanol, aseton) dengan kepolaran tertentu (indeks kepolaran d'' 5,2). Pigmen fikobilin merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan bersifat polar serta larut air, dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut air atau *buffer* (Masojidek *et al.*, 2004).

2.5.1 Aseton (CH₃COCH₃)

Aseton merupakan senyawa keton yang paling sederhana. Aseton memiliki nama lain yakni propanon, dimetil keton, 2-propanon, propan-2-on, dan β -ketopropana. Aseton adalah larutan yang mudah menguap dan tidak berwarna.

Aseton merupakan pelarut yang sangat penting karena memiliki sifat mudah larut dalam air, etanol, eter dan lain-lain. Aseton bersifat semi polar sehingga dapat melarutkan sampel yang bersifat polar dan non polar. Aseton juga bersifat netral, toksisitasnya rendah dan harganya murah. Aseton memiliki 6 hidrogen yang berposisi α . Hidrogen yang berposisi α mudah disingkirkan oleh suatu basa kuat sehingga membentuk ion enolat yang stabil karena pengaruh resonansi. Ion enolat ini dapat digunakan sebagai nukleofil dalam reaksi organik (Setiadi, 2008).

Tabel 4. Sifat-Sifat Aseton

No.	Karakteristik	Aseton
1.	Nama lain	β -ketopropana, dimetil keton, imetilformaldehida, DMK
2.	Rumus bangun	CH_3COCH_3 
3.	Sifat	Mudah terbakar, sangat volatil, tidak beresidu
4.	Berat molekul	58.1
5.	Titik leleh	-94.6°C
6.	Titik didih	56.1-56.5°C
7.	Massa molar	58.08 g/mol
8.	Kelarutan	Larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter

Sumber: Schelfan, *et al.*, (1983)

2.5.2 Metanol (CH_3OH)

Sebagian besar senyawa polifenol merupakan senyawa polar, oleh sebab itu rumput laut segar diekstrak dengan pelarut methanol. Menurut Suryanto dan Wehantouw (2009), senyawa polifenol bersifat polar maka sampel diekstrak dengan methanol agar komponen polifenol yang larut dalam metanol lebih banyak. Besarnya kandungan total polifenol dalam ekstrak berhubungan langsung dengan aktivitas antioksidatif dari ekstrak.

Tabel 5. Sifat-Sifat Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat
2.	Rumus bangun	CH ₃ OH $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	-97°C
5.	Titik didih	64.7°C
6.	Massa molar	32.04 g/mol
7.	Titik nyala	11°C

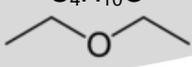
Sumber: Romiyanto, (2014)

2.5.3 Dietil Eter (C₄H₁₀O)

Dietil eter banyak dipergunakan sebagai pelarut untuk melakukan reaksi-reaksi organik dan reaksi pemisahan senyawa organik dari sumber alamnya. Sebagai pelarut penggunaan dietil eter antara lain untuk pelarut lemak, minyak, resin, getah, mikroselulosa, alkaloid, parfum dan sebagian kecil digunakan dalam industri butadiena (Widayat dan Satriadi, 2008).

Eter adalah senyawa tak berwarna dengan bau enak yang khas. Titik didihnya rendah dibanding alkohol dengan jumlah atom karbon yang sama, dan kenyataannya mempunyai titik didih sama dengan hidrokarbon, dimana pada eter gugus -CH₂- digantikan oleh oksigen. Dietil eter mempunyai rumus bangun sebagai berikut CH₃CH₂-O-CH₂CH₃. (Fessenden and Joan, 1997).

Tabel 6. Sifat-Sifat Dietil eter

No.	Karakteristik	Dietil eter
1.	Nama IUPAC	Ethoxyethane 3-oxapentane
2.	Rumus molekul	C ₄ H ₁₀ O 
3.	Titik leleh	-116.3°C (156.85 K)
4.	Titik didih	34.6°C (307.75 K)
5.	Massa molar	74.12 g/mol

Sumber: Romiyanto, (2014)

2.6 Kromatografi Kolom dan Kromatografi Lapis Tipis

Menurut Ibrahim dan Sitorus (2013), kromatografi kolom adalah jenis kromatografi yang digunakan oleh Twest untuk memisahkan zat warna (pigmen) tumbuhan. Kromatografi kolom adalah jenis kromatografi cair yaitu fasa gerak cair yang disebut eluen dan fasa diam padatan yang dikenal dengan istilah absorben sehingga prinsip kerjanya adalah adsorpsi atau cair yang prinsip kerjanya adalah partisi. Kromatografi kolom diterapkan secara luas untuk pemisahan senyawa-senyawa hasil alam khususnya metabolit sekunder. Pemisahan terjadi karena terjadinya perbedaan daya serap atau partisi fasa diam terhadap komponen-komponen sampel yang akan dipisahkan dengan digerakkan oleh fasa gerak (eluen). Komponen yang interaksinya dengan absorben paling lemah atau partisinya paling sedikit untuk fasa diam cair akan keluar terlebih dahulu dari dalam kolom dan yang paling kuat interaksinya atau partisinya paling sedikit akan keluar paling akhir dari dalam kolom. Untuk pemisahan senyawa organik yang umum digunakan adalah kromatografi kolom dengan fasa diam padatan atau yang didasarkan pada pemisahan karena perbedaan daya serap (adsorpsi).

Kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi, komponen-komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal. Sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Semua kromatografi memiliki fase diam (dapat berupa padatan, atau

kombinasi cairan-padatan) dan fase gerak (berupa cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda (Haqiqi, 2008).

Kromatografi lapis tipis (KLT) atau TLC (*thin layer chromatography*) digunakan untuk preparatif atau memisahkan senyawa-senyawa dalam jumlah kecil. KLT menghasilkan pemisahan yang lebih baik dibandingkan dengan kromatografi kolom dan lebih efisien karena waktu yang dibutuhkan lebih cepat. Absorben yang sangat umum digunakan adalah silikagel dan alumina dan ditambah dengan kalsium sulfat untuk jadi perekat pada plat kaca atau porselen dengan ukuran 20x20 cm. Prosedurnya adalah sampel yang akan dipisahkan ditotolkan dengan pipa kapiler pada KLT lalu dimasukkan dalam tabung yang berisi eluen dan ditutup agar uapnya jenuh (Ibrahim dan Sitorus, 2013).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan suatu metode pemisahan yang mudah dan efektif karena dalam pelaksanaannya hanya sedikit peralatan yang digunakan, murah, sederhana, tidak diperlukan waktu lama untuk analisa, dan daya pisah baik (sudjadi, 1988).

2.6.1 Fase Diam

Fase diam dengan pemisahan berdasarkan perbedaan adsorpsi ada dua jenis yaitu fasa normal yang bersifat polar dan fasa terbalik (*reversed phase*) yang bersifat non polar. Fasa normal yang umum digunakan adalah silika gel dan alumina dimana pemisahan terjadi karena perbedaan daya serap, yang disebabkan perbedaan kepolaran komponen yang akan dipisahkan. Pada fase normal yang kepolarannya paling rendah atau non polar akan keluar (terelusi) paling awal dan yang paling polar akan terelusi paling akhir. Sedangkan pada fase terbalik yang akan terelusi paling awal adalah yang paling polar dan yang

paling akhir adalah yang kepolarannya paling rendah atau non polar, fase terbalik yang umum digunakan adalah RP4, RP8 dan RP18. Konsep pemilihan fasa diam adalah berdasarkan kepolaran komponen yang akan dipisahkan yaitu fasa normal untuk yang polar dan fasa balik untuk yang non polar. Bila komponen-komponen yang akan dipisahkan adalah semi polar (amfifilik) seperti lipid dan minyak atau lemak maka dapat digunakan baik fasa normal atau fasa terbalik (Ibrahim dan Sitorus, 2013).

Pelaksanaan kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Gel silika (atau alumina) merupakan fase diam. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis seringkali juga mengandung substansi yang mana dapat berpendar flour dalam sinar ultra violet. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai. Fase diam lainnya yang biasa digunakan adalah alumina-aluminium oksida. Atom aluminium pada permukaan juga memiliki gugus -OH. Apa yang kita sebutkan tentang gel silika kemudian digunakan serupa untuk alumina (Haqiqi,2008).

2.6.1.1 Silica Gel (SiO_2)

Silika gel merupakan salah satu bahan anorganik yang memiliki kelebihan sifat, yaitu memiliki kestabilan tinggi terhadap pengaruh mekanik, temperatur, dan kondisi keasaman. Kelebihan sifat silika gel ini menyebabkan silika gel banyak digunakan sebagai adsorben, material pendukung katalis, dan lain-lain(Sriyanti, *et al.*, 2005).

Sifat silika gel ditentukan oleh orientasi dari ujung tempat gugus hidroksil berkombinasi. Susunan permukaan SiO_4 tetrahedral tidak teratur, sehingga jumlah distribusinya perunit area bukan menjadi ukuran kemampuan adsorpsi silika gel, meskipun gugus silanol dan siloksan terdapat pada permukaan silika

gel. Kemampuan adsorpsi ternyata tidak sebanding dengan jumlah gugus silanol dan gugus siloksan yang ada pada permukaan silika gel, tetapi tergantung pada distribusi gugus OH per unit area adsorben (Oscik, 1982).

Pemanfaatan silika gel secara umum adalah sebagai penjerap uap air pada penyimpanan berbagai bahan yang bersifat higroskopis. Pada pemanfaatan ini dapat dipakai silika gel yang sebelumnya telah dipanaskan untuk menghilangkan air dalam pori. Demikian juga pemanfaatan lain, yaitu sebagai fasa diam pada analisis kromatografi, diperlukan proses pemanasan dan pembentukan butir dengan ukuran sama dengan cara digerus dan diikuti pengayakan dengan ukuran tertentu.

2.6.2 Fase Gerak

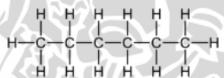
Fase gerak terdiri dari campuran pelarut yang secara keseluruhan berperan pada daya elusi dan resolusi. Daya dari elusi dan resolusi ditentukan berdasarkan pada polaritas keseluruhan pelarut, polaritas diam dan sifat komponen sempel. Pada fase normal fase diam bersifat lebih polar dibanding fase gerak, dimana kemampuan elusi akan meningkat bersamaan dengan meningkatnya polaritas dari pelarut. Fase terbalik yakni ketika fase diam lebih kurang polar dibanding fase gerak, dimana kemampuan elusi menurun bersamaan dengan meningkatnya polaritas dari pelarut (Labib, 2013).

2.6.2.1 N-Heksan

Heksana (C_6H_{14}) merupakan senyawa hidrokarbon alkana yang memiliki rumus isomer utama $CH_3(CH_2)_4CH_3$. Awalan heks- menunjukkan jumlah atom karbon yang terdapat didalamnya dan akhiran -ana menunjukkan ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Heksana merupakan salah satu jenis pelarut non polar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Menurut Arindah (2010), n-Heksan merupakan hidrokarbon alifatik yang mudah menguap. Memiliki ikatan tunggal dan sifatnya yang kovalen menjadikan n-Heksana tidak reaktif dan umum digunakan sebagai pelarut inert untuk reaksi organik. Heksana memiliki karakteristik yang sangat tidak polar, volatil dan memiliki bau yang khas. Berat molekul heksana yaitu 86,2 gram/mol dan mempunyai titik leleh -94,3 sampai -95,3°C; titik didih heksana tekanan 760 mmHg yaitu 66 sampai 71°C. Heksana merupakan alkana cair yang diperoleh dari fraksi ringan minyak mentah. Penggunaan utamanya yaitu sebagai campuran bensin dan sebagai pelarut (Daintith, 2004).

Tabel 7. Sifat-Sifat N-heksan

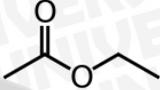
No.	Karakteristik	N-heksan
1.	Nama lain	n-heksan
2.	Rumus bangun	C_6H_{14} 
3.	Sifat	Sangat reaktif dan sering digunakan sebagai pelarut dalam reaksi organik
4.	Titik leleh	-96-(-94)°C
5.	Titik didih	68-69°C
6.	Massa molar	86.18 g/mol

Sumber: Romiyanto, (2014)

2.6.2.2 Etil Asetat

Etil asetat ($C_4H_8O_2$) merupakan komponen organik bersifat semi polar, tidak berwarna dan berbau tajam yang kurang enak. Kelebihan dari penggunaan etil asetat sebagai pelarut yaitu sifatnya volatil, non toksik dan tidak higroskopis (Repina, 2007). Etil asetat juga dikenal sebagai ester asetat, eter asetat dan asetidin dengan rumus isomer utama $CH_3COOC_2H_5$ yang memiliki sifat dapat sedikit larut dalam air dan mendidih pada suhu 77°C (Hill, 2003).

Tabel 8. Sifat-Sifat Etil Asetat

No.	Karakteristik	Etil Asetat
1.	Nama lain	Etil asetat, ester asetat, ester etanol
2.	Rumus bangun	$C_4H_8O_2$ 
3.	Sifat	Cairan tidak berwarna
4.	Titik lebur	-83.6°C (189.55 K)
5.	Titik didih	77.1°C (350.25 K)
6.	Massa molar	88.12 g/mol

Sumber: Romiyanto, (2014)

Etil asetat merupakan penerima ikatan hidrogen yang lemah, dan tidak memiliki proton yang bersifat asam (yaitu hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif seperti fluor, oksigen, dan nitrogen) sehingga bukan merupakan suatu donor ikatan hidrogen. Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3%, dan larut dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar. Kelarutannya meningkat pada suhu yang lebih tinggi. Namun demikian, senyawa ini tidak stabil dalam air yang mengandung asam atau basa (Romiyanto,2014).

2.7 *Fourier Transform Infrared (FT-IR)*

Metode *fourier transform infrared (FT-IR)* merupakan metode bebas reagen, tanpa penggunaan radioaktif dan dapat mengukur kadar secara kualitatif dan kuantitatif. Prinsip kerja FT-IR yaitu mengenali gugus fungsi suatu senyawa dari absorbansi inframerah yang dilakukan pada senyawa tersebut. Pola absorbansi tiap senyawa berbeda sehingga dapat dibedakan dan dikuantifikasikan (Sankari, 2010).

Menurut Anam *et al.*, (2007), metode spektroskopi yang digunakan pada FT-IR adalah metode absorpsi, yaitu metode spektroskopi yang didasarkan atas perbedaan penyerapan radiasi inframerah. Absorpsi inframerah oleh suatu materi dapat terjadi jika dipenuhi dua syarat, yaitu kesesuaian antara frekuensi radiasi

inframerah dengan frekuensi vibrasional molekul sampel dan perubahan momen dipol selama bervibrasi.

2.8 Spektrofotometri UV-Vis

Menurut Huda (2001), Spektrofotometer UV-Visible adalah alat yang umum digunakan di laboratorium kimia. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia semi kualitatif. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia tertentu di daerah ultra lembayung (ultra violet) dan sinar tampak (*visible*). Meskipun tidak sepeka analisa dengan menggunakan teknologi nuklir, analisa dengan spektrofotometri sinar tampak (*colorimetry*) memiliki kepekaan yang cukup tinggi dan relatif mudah dilakukan. Analisa dengan cara ini digunakan secara meluas untuk menganalisa sampel dalam berbagai spesies, baik ion maupun senyawa. Menurut Hendayana *et al.*, (1994), metode ini berdasarkan penyerapan sinar ultraviolet maupun sinar tampak yang menyebabkan terjadinya transisi elektron (perpindahan elektron dari tingkat energi yang rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi).

Beberapa sumber radiasi polikromatik yang dipakai pada spektrofotometer UV-Vis adalah lampu deuterium, lampu tungsten dan lampu merkuri. Sumber radiasi tersebut akan mengeksitasi benda ke tingkat energi yang lebih tinggi. Benda atau materi akan kembali ke tingkat energi yang lebih rendah atau ke dasarnya, melepaskan foton dengan energi yang sesuai dengan perbedaan energi antara tingkat tereksitasi dengan tingkat dasar rendah (Oktaviani *et al.*, 2014).

2.9 Toksisitas

Toksikologi ialah ilmu pengetahuan mengenai kerja senyawa kimia yang merugikan terhadap organisme hidup. Suatu zat dinyatakan sebagai racun, bila zat tersebut menyebabkan efek yang merugikan pada yang menggunakannya. Kehadiran suatu zat potensial toksik di dalam organisme belum tentu menghasilkan keracunan. Risiko keracunan tidak hanya tergantung pada sifat zatnya sendiri, tetapi juga pada kemungkinan untuk berkontak dengannya dan pada jumlah yang masuk dan diabsorpsi, dengan kata lain tergantung pada cara kerja, frekuensi kerja, dan waktu kerja (Ariens, *et.al.*, 1986).

Uji toksisitas merupakan uji hayati yang berguna untuk menentukan tingkat toksisitas dari suatu zat atau bahan pencemar dan digunakan juga untuk pemantauan rutin suatu limbah. Uji toksisitas akut dengan menggunakan hewan uji merupakan salah satu bentuk penelitian toksikologi perairan yang berfungsi untuk mengetahui apakah *effluent* atau badan perairan penerima mengandung senyawa toksik dalam konsentrasi yang menyebabkan toksisitas akut. Parameter yang diukur biasanya berupa kematian hewan uji, yang hasilnya dinyatakan sebagai konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian hewan uji (LC₅₀) dalam waktu yang relatif pendek satu sampai empat hari (Husni dan Esmiralda, 2012).

Tingkat toksisitas dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor sebagai berikut (Mangkoediharjo dan Samudro, 2009):

- a. Berkaitan dengan toksikan itu sendiri. Toksisitas toksikan dapat dipengaruhi oleh komposisi toksikan. Ada kemungkinan komponen toksikan mempunyai perbedaan toksisitas. Faktor lain adalah sifat-sifat fisik kimia toksikan.
- b. Berkaitan dengan pemaparan toksikan. Toksikan akan menghasilkan efek negatif jika kontak dan bereaksi dengan target biota pada konsentrasi tertentu dan waktu tertentu. Faktor-faktor yang berkaitan dalam pemaparan

toksikan yaitu jenis toksikan, durasi pemaparan, frekuensi pemaparan, dan konsentrasi toksikan.

- c. Berkaitan dengan lingkungan Sifat-sifat lingkungan yang mempengaruhi toksikan di atas juga mempengaruhi toksisitas toksikan.
- d. Berkaitan dengan biota Toksisitas toksikan berbeda untuk berbagai spesies biota, karena adanya perbedaan ketahanan dan kemudahan spesies biota menerima toksikan. Perbedaan diantara spesies biota tersebut berkaitan dengan faktor-faktor genetik, umur dan status kesehatan.

2.9.1 Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah metode menguji aktivitas suatu senyawa menggunakan hewan uji berupa larva udang *Artemia salina* Leach. Metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan dalam memandu pencarian senyawa anti kanker yang berasal dari tumbuhan. Metoda ini telah digunakan sejak 1956 untuk berbagai pengamatan bioaktivitas antara lain untuk mengetahui residu pestisida, anestetik lokal, senyawa turunan morfin, mikotoksin, karsinogenesis suatu senyawa (Meyer, 1982). Metode ini merupakan *bioassay* yang cepat, murah, dapat dipercaya dan hasil yang diperoleh sering dihubungkan dengan aktivitas sitotoksik yang merupakan syarat utama obat-obat anti tumor.

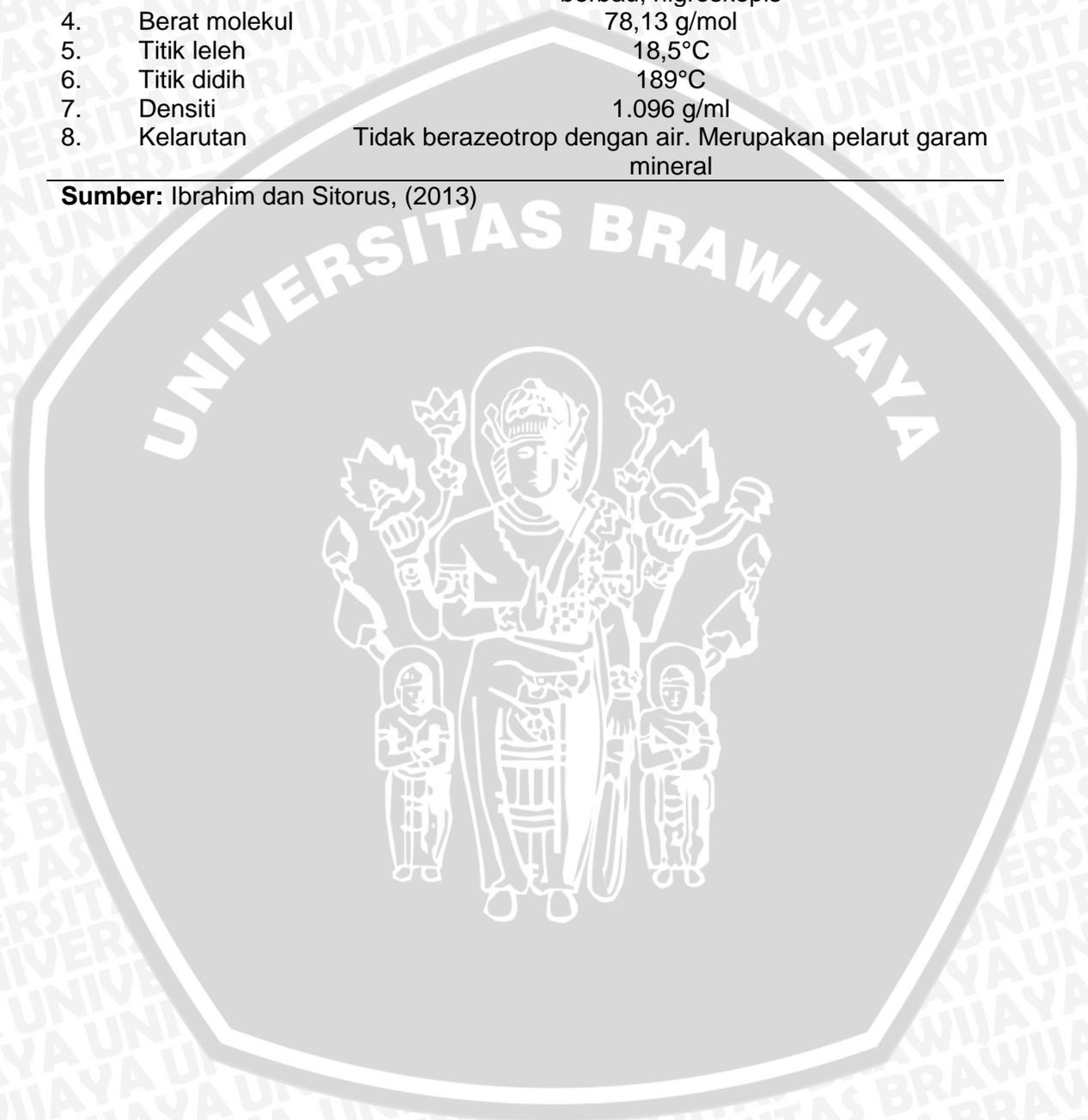
2.9.2 Dimetil Sulfoksida (DMSO)

Bahan uji yang senyawanya berasal dari bahan alam baik berupa ekstrak maupun fraksi terkadang sulit untuk dilarutkan dalam air. Salah satu pelarut yang dapat di gunakan yaitu dimetil sulfoksida (DMSO). Selain sebagai pelarut dimetil sulfoksida termasuk dalam senyawa yang memiliki toksisitas rendah, memiliki efek antiinflamasi dan analgenik (Suwandi, 2009).

Tabel 9. Sifat-sifat dimetil sulfoksida (DMSO)

No.	Karakteristik	Dimetil Sulfoksida (DMSO)
1.	Nama lain	Dimetilsulfoksida (DMSO)
2.	Rumus bangun	$\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$
3.	Sifat	Sedikit beracun, berupa cairan tidak berwarna, tidak berbau, higroskopis
4.	Berat molekul	78,13 g/mol
5.	Titik leleh	18,5°C
6.	Titik didih	189°C
7.	Densiti	1.096 g/ml
8.	Kelarutan	Tidak berazeotrop dengan air. Merupakan pelarut garam mineral

Sumber: Ibrahim dan Sitorus, (2013)



3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi, isolasi dan peralatan analisa. Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi dan isolasi adalah Gunting, *Beaker glass* (ukuran 1000 ml, 500 ml, 250 ml), Gelas ukur (ukuran 1000 ml, 100 ml), Timbangan digital, Corong kaca, Erlenmeyer 250 ml, *Rotary Vacuum Evaporator*, Labu Evaporator, Mortal dan Alu, Pipet Tetes, Pipet Volume, Bola Hisap, *Hot Plate*, *Magnetic Stirrer*, Corong Pisah, Statif, Pipet Serologis, *Freezer*, Spatula, Kolom Kromatografi, Selang Nitrogen dan Botol vial 10 ml. Adapun alat yang digunakan pada proses analisa yaitu Penggaris, *Cutter/gunting*, Pensil, Pipa Kapiler, *Beaker glass* 50 ml, Cawan Petri, Selang, Aerator, Toples, Botol vial 10 ml, Pinset, Pipet Tetes, Gelas ukur 100 ml, Pipet Volume, FT-IR Shimadzu dan Spektrofotometer UV-Vis merk Shimadzu 1601.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah rumput laut coklat *Sargassum filipendula* yang diperoleh dari perairan desa Cabiye, pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura. Adapun bahan kimia yang digunakan yaitu *Aluminium foil*, *plastik wrap*, CaCO_3 , Aseton, Methanol, Garam grosok, N-heksan, Kertas label, *Aquadest*, *Artemia salina*, kapas, kertas saring kasar dan halus, Vaseline, Dietil Eter, Etil Asetat, silica gel F-254 (60 mesh), Gas Nitrogen (N_2), kertas *whatman* No.42, *tissue*, Kain Blancu, *sea sand* (pasir laut), Air, Plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), Air Laut, DMSO dan Kertas Koran.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif memiliki tujuan untuk mengetahui hal yang baru berupa pengelompokan suatu gejala atau fakta tertentu. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan suatu variabel, gejala, dan keadaan atau fenomena apa adanya tanpa menguji suatu hipotesis tertentu (Arikunto, 2002). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas toksisitas klorofil b pada bagian *thallus* alga coklat *Sargassum filipendula* terhadap *Artemia salina*.

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang akan dilakukan sebelum menganalisa aktivitas toksisitas klorofil b pada alga coklat *Sargassum filipendula* terhadap *Artemia salina* meliputi: preparasi sampel, ekstraksi pigmen, isolasi pigmen dan identifikasi pigmen.

3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel rumput laut coklat *Sargassum filipendula* diambil dari daerah Sumenep, Madura pada bulan Januari 2016. Rumput laut yang baru diambil segera dicuci dengan air laut, dimasukkan dalam *cool box* berisi es kemudian diikat dan dimasukkan ke dalam karung plastik. Perlakuan ini bertujuan untuk mempertahankan kualitas rumput laut, terutama agar tidak terkena sinar matahari secara langsung yang dapat merusak pigmen dalam rumput laut.

Setelah sampai di Laboratorium, rumput laut *Sargassum filipendula* dibawa ke dalam ruang gelap dan dilakukan sortir agar tidak tercampur rumput laut spesies lain dan diambil bagian *thallus* (menyerupai daun) yang dipisahkan dengan bagian lain. Kemudian dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan sisa kotoran dan garam yang menempel pada sampel.

Berikutnya sampel dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di atas kertas koran agar air dipermukaan sampel berkurang.

3.4.2 Ekstraksi Pigmen

Setelah proses preparasi sampel dilakukan, dilanjutkan proses ekstraksi pigmen dengan sampel *Sargassum filipendula*. Proses ekstraksi pigmen dari sampel *Sargassum filipendula* berpedoman pada metode Costa *et al.*, (2009), yang dimodifikasi beberapa prosesnya untuk memaksimalkan hasil ekstraksi.

Menurut Agustian *et al.*, (2013), metode yang dilakukan adalah dengan cara ekstraksi melalui proses maserasi. Maserasi awal dilakukan dengan perendaman alga dengan pelarut metanol PA dan homogenisasi menggunakan *magnetic stirrer*, disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Maserasi metanol-aseton dilakukan dengan ditambahkan pelarut aseton:metanol dengan perbandingan 3:7 v/v. Fraksinasi dietil eter dilakukan dengan menggunakan filtrat maserasi metanol-aseton ditambah dengan pelarut dietil eter PA yang difraksinasi dengan corong pemisah dan ekstrak cair dietil eter dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Sampel rumput laut dihaluskan menggunakan mortal dan alu untuk memperluas permukaan dan memecah sampel sehingga pigmen dapat lebih mudah keluar dan meaksimalka proses ekstraksi, kemudian ditimbang sebanyak 250 gram. Selama proses penghalusan sampel ditambahkan CaCO_3 sebanyak 0,5 gram sebagai penetral dan mencegah terbentuknya metabolit klorofil yang tidak diinginkan.

Sampel yang telah halus dimasukkan dalam *beakerglass* 1000 ml yang sudah dibungkus aluminium foil dan ditambahkan pelarut metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) dengan perbandingan 7:3 (v/v) sebanyak 600 ml kemudian ditutup rapat menggunakan *plastic wrap*, yang dilapisi *aluminium foil*. Selanjutnya

sampel didiamkan 24 jam di dalam ruang gelap. Setelah 24 jam, sampel di saring menggunakan kertas whatmen no. 42 yang berfungsi untuk memisahkan filtrat dan residu dari sampel. Menurut Wulandari (2011), prinsip maserasi adalah penyaringan zat aktif dengan cara merendam secara sederhana dengan cairan selama 24 jam pada suhu ruang (kamar) dan tidak terkena cahaya, cairan penyaring masuk dalam sel terlebih dahulu melewati dinding sel. Isi sel akan terlarut akibat perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel. Larutan dengan konsentrasi tinggi akan keluar dan tergantikan oleh cairan yang konsentrasinya rendah disebut proses difusi. Endapan yang didapatkan dipisah dan filtratnya akan dipekatkan.

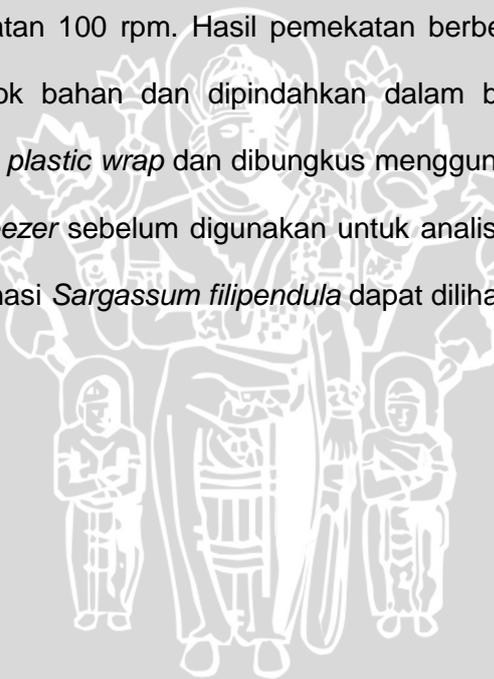
3.4.3 Fraksinasi dan Evaporasi

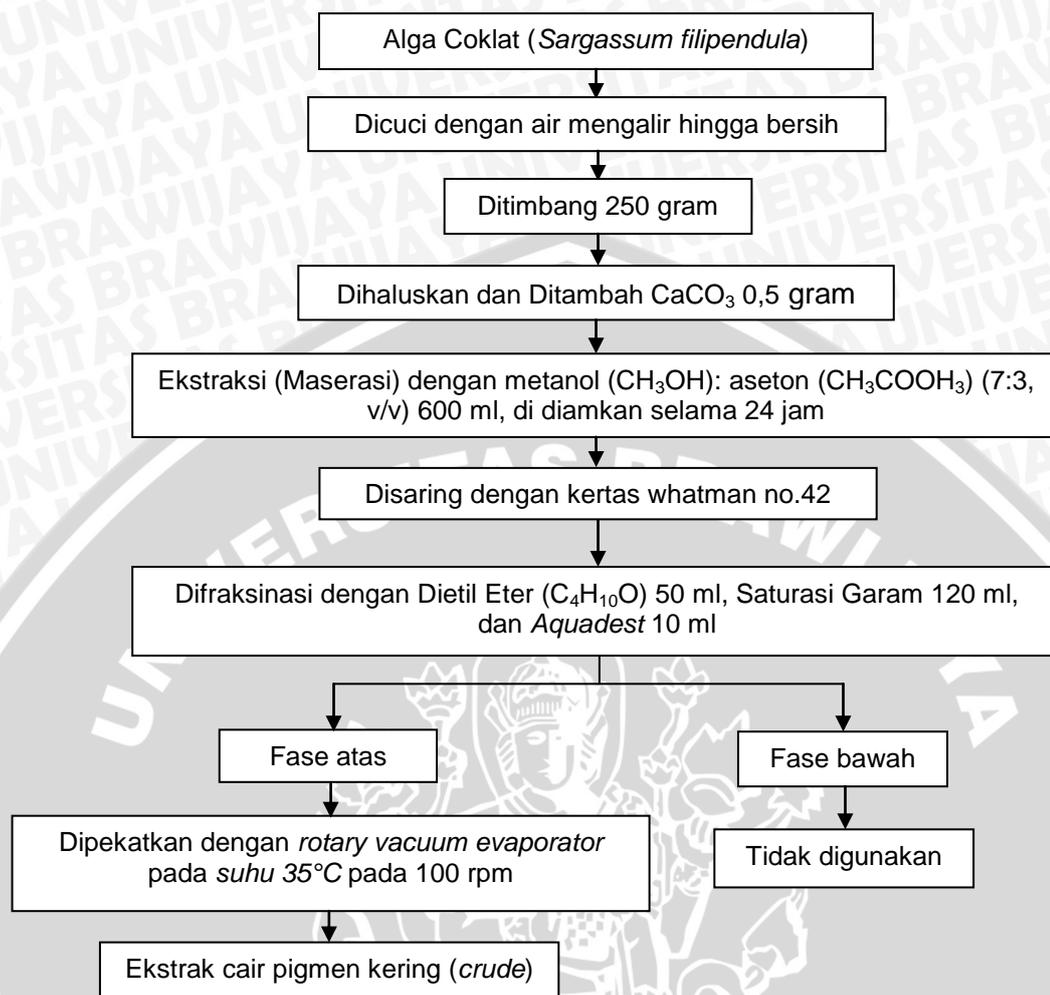
Proses fraksinasi bertujuan untuk pemisahan fraksi pigmen yang terkandung dalam filtrat yang terdapat pada larutan berdasarkan polaritas dan masa jenis, yang nantinya akan membentuk dua fase yaitu fase atas dan fase bawah. Proses fraksinasi dilakukan dengan penambahan dietil eter ($C_4H_{10}O$), saturasi garam dan *aquadest* berurutan dengan perbandingan (100 ml : 50 ml : 120 ml : 10 ml) dari filtrat hasil ekstraksi, kemudian dikocok selama lebih kurang 2 menit, lalu dimasukkan ke dalam corong pisah dan didiamkan beberapa saat hingga *crude* pigmen non polar terangkat oleh dietil eter dan terbentuk dua fase, yaitu fase atas dan fase bawah. Fase atas (non polar) yaitu fraksi yang terkandung ekstrak kasar pigmen terlarut dalam dietil eter, fase bawah (polar) yaitu fraksi dari campuran saturasi garam, *aquadest* serta pelarut.

Kegunaan dietil eter ($C_4H_{10}O$) pada proses fraksinasi yaitu untuk mengikat larutan senyawa pigmen yang ada di dalam filtrat hasil dari maserasi. Dietil eter ($C_4H_{10}O$) bersifat non polar, sehingga dapat melarutkan senyawa dari pigmen yang bersifat non polar. Massa jenis dari dietil eter adalah yang paling

ringan dalam larutan yang menjadikan senyawa pigmen terlarut dan terangkat ke atas yang kemudian disebut sebagai fase atas. Pada saturasi garam yang terlarut air akan bersifat non polar dan mempunyai massa jenis lebih tinggi, ini menyebabkan terpisahnya fase atas serta tercampur dengan pelarut filtrat dan sebelumnya digunakan dari proses maserasi, yakni metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) yang membentuk fase bawah.

Fase bawah dari proses fraksinasi tidak dipergunakan, fase atas kemudian diukur dan ditampung dalam labu erlenmeyer 250 ml. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan *rotary vacuum evapuator* tekanan rendah pada suhu *waterbath* 35°C kecepatan 100 rpm. Hasil pemekatan berbentuk *crude* diambil dengan bantuan sendok bahan dan dipindahkan dalam botol sampel. Botol sampel tersebut ditutup *plastic wrap* dan dibungkus menggunakan *aluminium foil* lalu disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan untuk analisa pigmen. Diagram alir ekstraksi dan fraksinasi *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 4.





Gambar 4. Diagram Alir Ekstraksi dan Fraksinasi *Sargassum filipendula* Modifikasi metode Costa *et al.*, (2009)

3.4.4 Isolasi Pigmen

Tahap awal isolasi pigmen menggunakan metode kromatografi kolom merupakan preparasi kolom kromatografi. Serbuk *Silica gel* F-254 ditimbang sebanyak 30 gram selanjutnya dimasukkan dalam 200 ml fase gerak gabungan dari n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (8:2 v/v) dalam *beakerglass*, kemudian tutup dengan *plastik wrap* yang bertujuan untuk meminimalisir terjadinya penguapan. Kemudian *silica gel* dan fase gerak dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirer* selama ± 12 jam dengan kecepatan 150

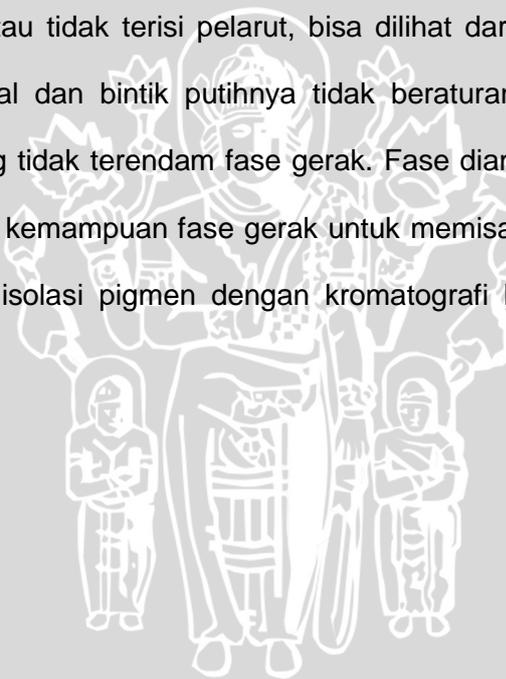
rpm, agar tidak timbul gelembung udara dalam kolom kromatografi yang menyebabkan terpecahnya *silica gel* (fase diam).

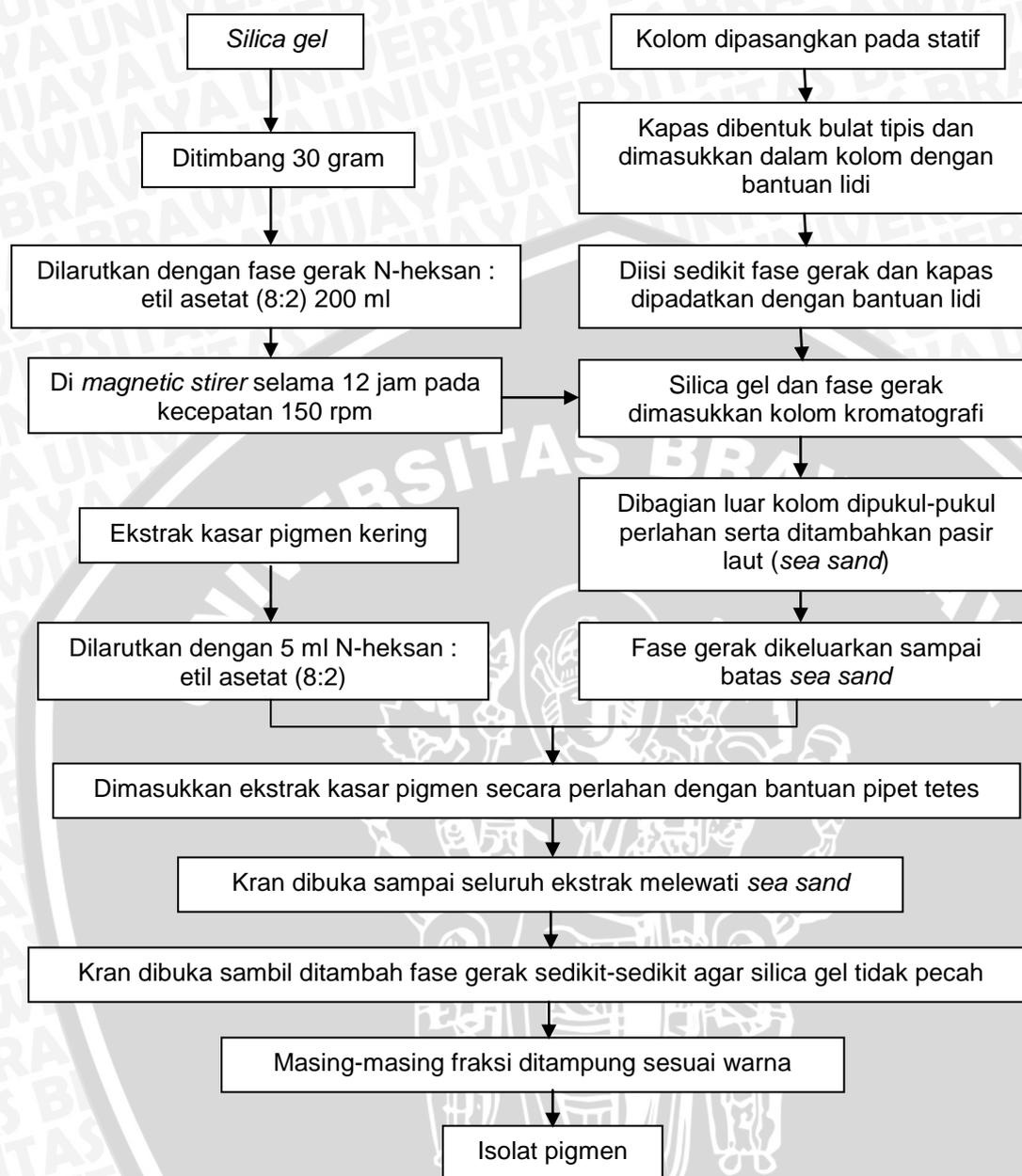
Kolom kromatografi kemudian dipasang pada statif dan diisi dengan kapas yang telah dibasahi fase gerak, lalu dipadatkan pada dasar kolom kromatografi dengan bantuan lidi. Kapas ini bertujuan untuk menahan fase diam agar tidak keluar melalui kran kolom kromatografi. Selanjutnya, kolom kromatografi diisi fase gerak n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (8:2 v/v) sampai setengah dari panjang kolom kromatografi. Kemudian bubuk dari *silica gel* dimasukkan dalam kolom kromatografi sedikit-sedikit dengan bantuan sendok bahan. Setelah semua bubuk *silica gel* telah dimasukkan, kemudian kolom kromatografi perlahan dipukul-pukul menggunakan bola hisap supaya fase diam padat dan permukaannya rata. Kolom kromatografi yang telah di preparasi didiamkan selama ± 12 jam, tujuannya yaitu agar *silica gel* benar-benar padat, untuk mulut kolom dan ujung kran ditutup dengan *plastic wrap* untuk meminimalisir menguapnya fase gerak.

Preparasi kolom kromatografi yang telah berhasil, kemudian ditambahkan pasir laut sebanyak ± 3 gram di atas permukaan fase diam dan diketuk perlahan agar permukaan rata. Penambahan pasir laut ini bertujuan untuk menyaring kotoran/residu yang tidak digunakan dari ekstrak kasar rumput laut. Selanjutnya, pengurangan volume fase gerak hingga mendekati permukaan pasir laut. Ekstrak kasar pigmen rumput laut kemudian dilarutkan pada 10 ml fase gerak N-Heksan (C_6H_{14}) dan Etil asetat ($C_4H_8O_2$) dengan perbandingan (8:2 v/v), lalu dimasukkan kedalam kolom dengan bantuan pipet tetes sedikit-sedikit dan perlahan melewati dinding kolom kromatografi. Berikutnya, kran kolom kromatografi dibuka dan ditunggu hingga ekstrak pigmen melewati *sea sand* dan masuk ke dalam fase diam *silica gel*. Fase gerak kemudian ditambahkan secara berkesinambungan

hingga muncul pita warna. Fase gerak ditingkatkan kepolarannya dengan volume 200 ml larutan n-heksan dan etil asetat perbandingan (8:2 v/v), (7:3 v/v), (6:4 v/v), (5:5 v/v), (4:6 v/v) hingga diperoleh pigmen fukosantin yaitu berwarna orange kemerahan. Fraksi warna yang keluar ditampung dalam botol vial 10 ml dan telah diberi label nomor. Botol vial yang telah terisi fraksi warna kemudian dibungkus *aluminium foil* agar isolat terlindung dari degradasi cahaya, serta dicatat keterangan warna serta waktu saat di tampung.

Pada proses kromatografi kolom ini yang harus diperhatikan yaitu pemberian fase gerak, supaya fase diam tidak pecah. Fase diam bisa pecah pada kondisi kering atau tidak terisi pelarut, bisa dilihat dari munculnya sekat-sekat secara horizontal dan bintik putihnya tidak beraturan yang disebabkan karena *silica gel* kering tidak terendam fase gerak. Fase diam yang pecah akan berakibat menurunnya kemampuan fase gerak untuk memisahkan senyawa dari pigmen. Diagram alir isolasi pigmen dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 5.





Gambar 5. Diagram alir isolasi pigmen dengan kromatografi kolom pangestuti *et al.*, (2007) dimodifikasi oleh Wijayanti (2010)

3.5 Identifikasi Pigmen

3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi *retardation factor* klorofil b dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam berupa *silica gel* F-254 dan fase gerak berupa N-heksan : Aseton. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih

dahulu disiapkan plat KLT yang dipotong dengan ukuran 1x5 cm, selanjutnya diberi garis melintang di kedua ujungnya. Garis pertama berjarak 1 cm dari tepi plat KLT sebagai batas awal fraksi warna pada saat ditotolkan dan garis kedua untuk ujung lainnya berjarak 0,5 cm dari tepi plat KLT sebagai batas jarak tempuh fase gerak. Sehingga jarak tempuh senyawa 3,5 cm.

Berikutnya disiapkan 10 ml fase gerak campuran n-heksan dan aseton dengan perbandingan (7:3 v/v). Sampel *crude* pigmen dan isolat hasil isolasi kromatografi kolom yang diduga klorofil b diambil dengan pipa kapiler dan ditotolkan tepat digaris batas bawah plat KLT. Plat KLT kemudian dimasukkan pada fase gerak di dalam *beakerglass* yang ditutup dengan menggunakan *plastic wrap* untuk meminimalisir terjadinya penguapan dan ditunggu beberapa saat hingga fase gerak mencapai garis batas atas. Plat KLT diambil dengan menggunakan pinset, selanjutnya bercak warna akan muncul di plat KLT, jarak tempuh dari pigmen kemudian dihitung untuk mengetahui R_f nya. Nilai R_f didefinisikan sebagai berikut:

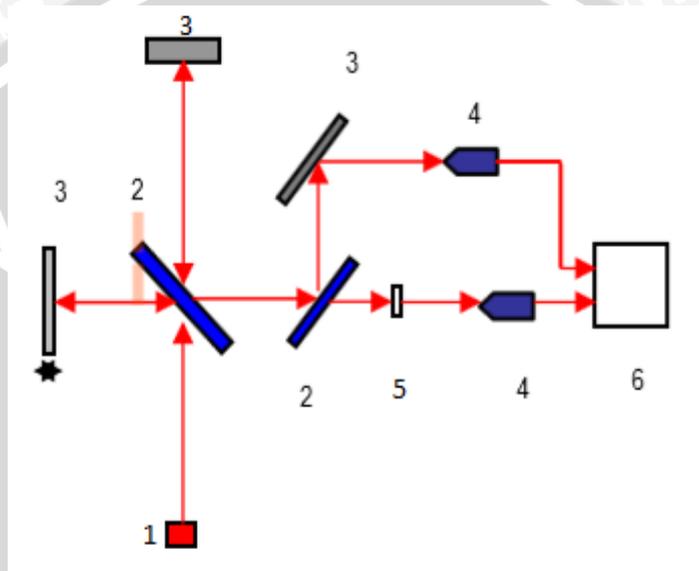
$$\text{Nilai } R_f = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut (fase gerak)}} = \frac{Y}{X}$$

Isolat yang diyakini klorofil b hasil isolasi kemudian dilarutkan pada aseton dan dianalisa pola spektanya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 300-800 nm. Kemudian diidentifikasi gugus fungsi yang terdapat pada klorofil b menggunakan Spektrofotometer FT-IR.

3.5.2 FT-IR (*Fourier Transform Infrared*)

Menurut Anam *et al.*, (2007), Inti spektroskopi FT-IR (*Fourier Transform Infrared*) adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari pentransmisi cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya

dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}). Skema alat spektroskopi FT-IR secara sederhana ditunjukkan pada Gambar 6.



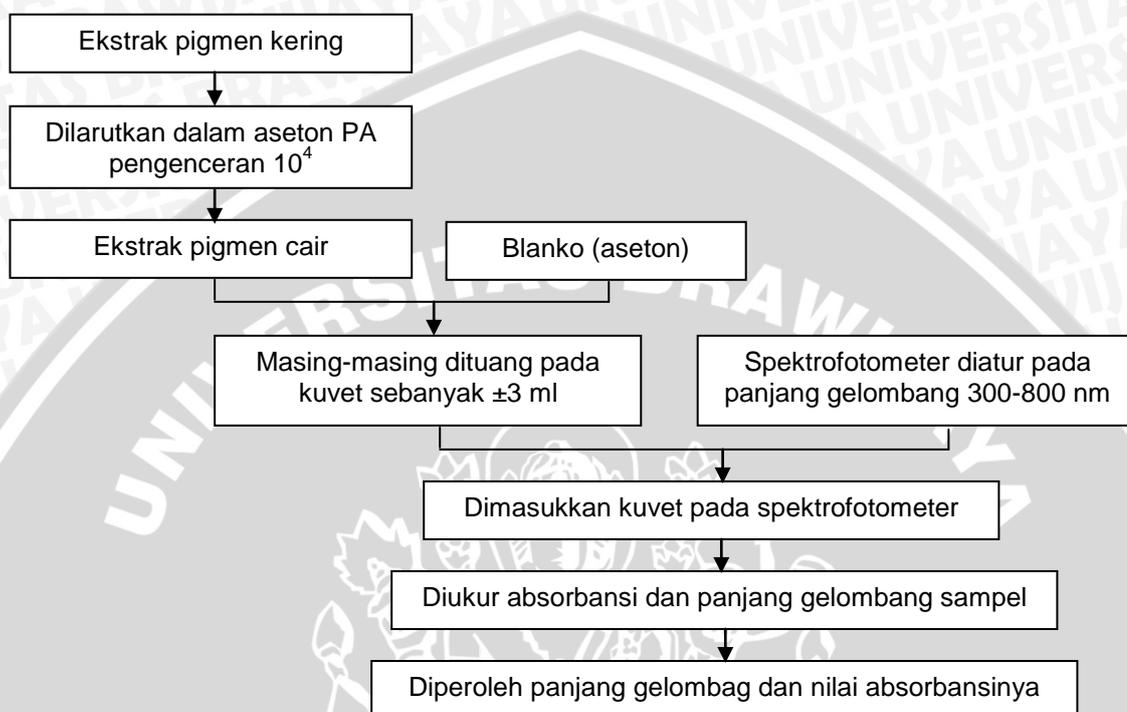
Gambar 6. Skema alat spektroskopi FT-IR. (1) sumber inframerah (2) perbagi berkas (*Beam Splitter*) (3) kaca pemantul (4) sensor inframerah (5) sampel (6) Display

Analisa gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum infra merah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding (yang sudah diketahui).

3.5.3 Spektrofotometer UV-Vis

Isolat warna pigmen hasil kromatografi kolom yang diduga klorofil b berdasarkan nilai R_f dari proses KLT, yang terlebih dahulu dikeringkan dengan dialiri gas nitrogen (N_2). Untuk isolat warna yang telah kering diencerkan terlebih dahulu dengan aseton PA pengenceran 10^4 dan dituang dalam kuvet ± 3 ml. Selanjutnya dimasukkan dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601 serta dilakukan pengujian pada panjang gelombang 300-800 nm, sehingga

dapat diketahui pola spektra dan nilai absorbansi maksimum isolat warna. Diagram alir analisa pigmen dengan spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir analisa pigmen dengan spektrofotometer UV-Vis Fretes *et al.*, (2012)

3.6 Pengukuran Rendemen

Perhitungan rendemen bertujuan untuk mengetahui kandungan dari jenis pigmen. Pigmen yang sudah diketahui nilai absorbansi dikonversi menggunakan hukum dari “Lambert-Beer” menurut Markham (1988) adalah:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan: A=Absorbansi

ϵ =Absorbansifitas molar (*Molar extinction coefficient*)

b=Lebar bagian kuvet dalam

c=Konsentrasi (molar)

Selanjutnya dihitung nilai rendemen dengan rumus menurut Khotimah (2013), yaitu:

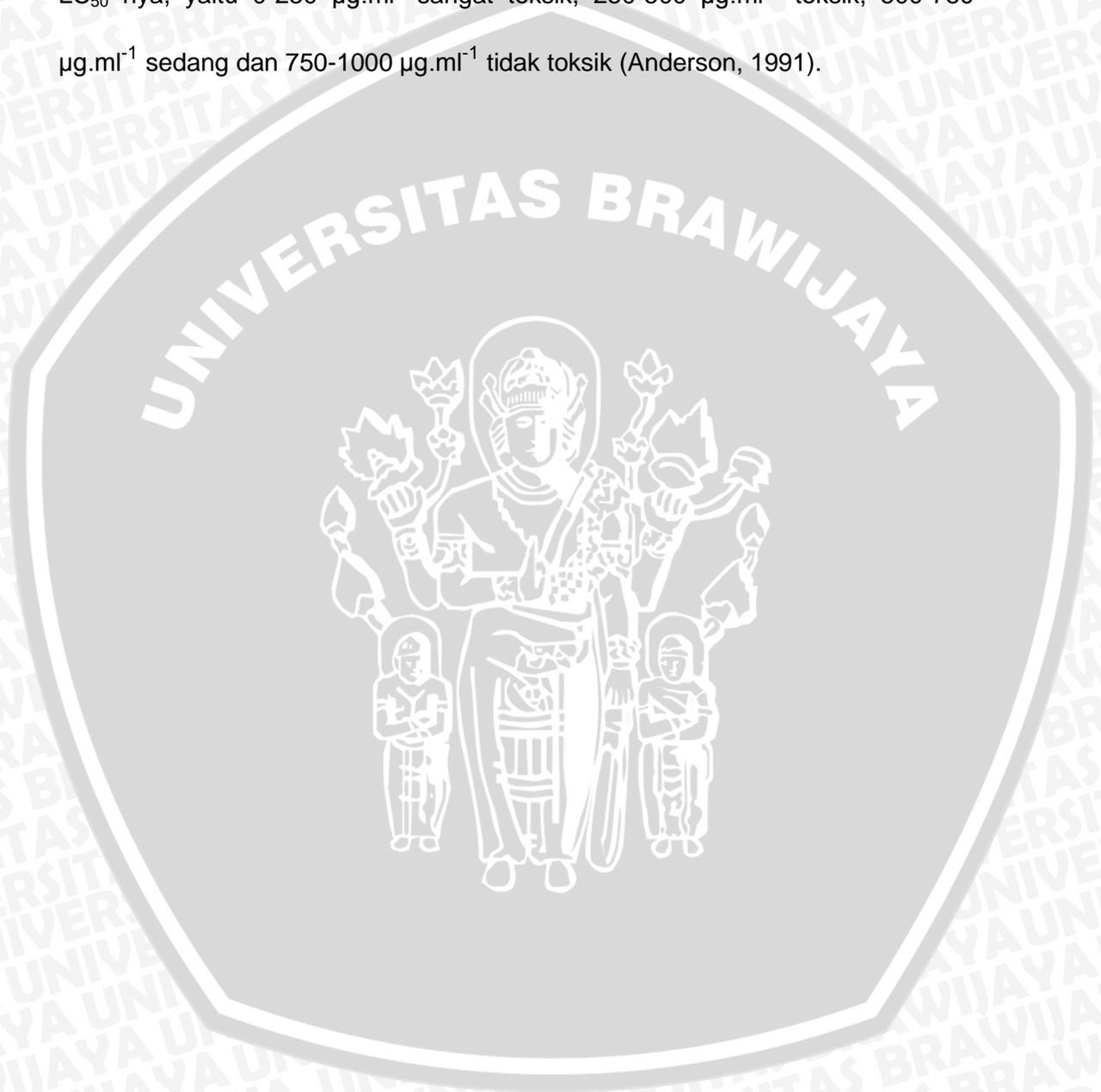
$$\frac{\text{nilai kadar yang diperoleh}}{\text{jumlah awal sampel yang dipakai}} \times 100\%$$

3.7 Uji BSLT

Uji toksisitas klorofil b menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), terlebih dahulu dilakukan preparasi. Telur *Artemia salina* diletakkan dalam air laut dengan penggunaan aerator sebagai sumber oksigen bagi *Artemia salina*. Setelah 48 jam, larva *Artemia salina* siap digunakan sebagai hewan uji. Setelah 48 jam dipersiapkan larutan stok, dibuat dengan cara klorofil b hasil ekstraksi dari alga coklat *Sargassum fillipendula* ditambahkan tiga tetes larutan 0,8% dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai pelarut klorofil b dan air laut sebanyak 56 ml, sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok sebesar 500 µg/ml. Selanjutnya diambil sebanyak 30 ml, dibuat seri konsentrasi ekstrak sebesar 0, 250, 200, 150, 100 dan 50 µg/ml. Dari larutan stok tersebut dengan pengenceran menggunakan air laut. Sebagai kontrol, digunakan larutan DMSO 0,8% dalam air laut tanpa ekstrak. Sepuluh ekor larva *A. salina* dimasukkan ke dalam botol vial yang berisi ekstrak sampel dalam berbagai seri konsentrasi. Masing-masing perlakuan dan kontrol dilakukan tiga kali ulangan. Selanjutnya, semua vial diinkubasikan di dalam ruang gelap untuk mencegah rusaknya kandungan pigmen klorofil b pada sampel selama 24 jam. Setelah diinkubasi, jumlah larva *A. salina* yang mati pada tiap vial dilihat dengan bantuan kaca pembesar dan dihitung untuk menentukan persentase kematiannya. Persen kematian dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100$$

Parameter yang digunakan adalah jumlah *Artemia* yang mati 50 % dari total larva uji. Kemudian dihitung nilai LC_{50} dengan memasukkan angka probit (50 % kematian larva uji). Tingkat toksisitas suatu senyawa dapat dilihat dari nilai LC_{50} nya, yaitu 0-250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ sangat toksik, 250-500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ toksik, 500-750 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ sedang dan 750-1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ tidak toksik (Anderson, 1991).



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

4.1.1 Data Hasil Isolasi dan Identifikasi Pigmen Klorofil b

Hasil identifikasi komponen pigmen klorofil b dari *crude* dan isolat alga coklat *Sargassum filipendula* dengan Kromatografi kolom, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), FT-IR dan Spektrofotometri UV-Vis, dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Isolasi dan Identifikasi Komponen Pigmen Korofil b Alga Coklat *Sargassum filipendula*

Uji Identifikasi	Alat	Hasil	Literatur
Kromatografi kolom	Kromatografi kolom	Diperoleh isolat kuning kehijauan (diduga klorofil b) pada botol vial ke 13 sampai 15	Menurut Gross (1991), klorofil b berwarna hijau kuning
KLT	Plat KLT silica gel F-254	0,49	Menurut Heriyanto dan Leenawaty (2006), kisaran nilai Rf klorofil b (hijau kekuningan) 0,48-0,56
Spektrofotometer UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601	401, 9 dan 645,0 nm	Menurut Jeffrey, (1997), gelombang (λ) maks klorofil b pada pelarut aseton yaitu sebesar 456,9 nm, 596,7 nm, dan 645,5 nm
FT-IR	FT-IR Shimadzu	C-H, -CHO, C=O, -O-CO-	Menurut Holt dan Jacobs (1995), -OH, C-H, -CHO, C=O, C=C
Nilai Rendemen		0,0112 %	

4.1.2 Data Hasil Uji BSLT

Jumlah kematian larva *Artemia Salina Leach* pada setiap botol vial dalam berbagai konsentrasi perlakuan klorofil b dari ekstrak alga coklat *Sargassum filipendula* ditunjukkan pada Tabel 11.

Tabel 11. Pengaruh berbagai konsentrasi klorofil b dari ekstrak alga coklat *Sargassum filipendula* terhadap larva *Artemia Salina Leach*.

Konsentrasi	Log konsentrasi	Ulangan	Jumlah kematian	Rata-rata	% kematian	% probit
0 µg/ml	0	1	0	0	0	-
		2	0			
		3	0			
50 µg/ml	1,699	1	0	0	0	-
		2	0			
		3	0			
100 µg/ml	2	1	1	0,067	6,7	3,52
		2	1			
		3	0			
150 µg/ml	2,176	1	1	0,17	17	4,05
		2	2			
		3	2			
200 µg/ml	2,301	1	2	0,23	23	4,26
		2	2			
		3	3			
250 µg/ml	2,398	1	3	0,3	30	4,48
		2	2			
		3	4			

4.2 Hasil dan Pembahasan

4.2.1 Isolasi Pigmen Klorofil B dengan Kromatografi Kolom

Sampel pigmen hasil isolasi alga coklat *Sargassum filipendula* diperoleh isolat berwarna kuning kehijauan yang diduga merupakan klorofil b. Hal tersebut didasarkan pada deskripsi Gross (1991), yang menyatakan bahwa klorofil a berwarna hijau biru, klorofil b hijau kuning dan karotenoid berwarna kuning orange, merah. Hasil isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom (Lampiran 4) dengan penggunaan n-heksan : etil asetat sebagai fase gerak (perhitungan dan pembuatan fase gerak Lampiran 2) dapat dilihat pada Tabel 10. Isolasi komponen molekul pigmen klorofil b dari alga coklat *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Isolasi Komponen pigmen klorofil b dari alga coklat *Sargassum fillipendula* dengan Kromatografi Kolom.

Berdasarkan hasil isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom pada Lampiran 4, diperoleh isolat berwarna kuning kehijauan pada botol vial ke 13 hingga 15 dengan penggunaan fase gerak (8:2) n-heksan : etil asetat. Hasil tersebut terjadi karena komponen klorofil b berinteraksi lemah dengan absorben (fase diam) sehingga keluar terlebih dahulu dari dalam kroatografi kolom.

Pemisahan terjadi karena adanya perbedaan daya serap atau partisi fasa diam terhadap komponen-komponen sampel yang akan dipisahkan yang digerakkan oleh fasa gerak (eluen). Komponen yang interaksinya dengan absorben paling lemah (untuk fasa diam padat) atau partisinya paling sedikit (untuk fasa diam cair) akan keluar terlebih dahulu dari dalam kolom dan yang paling kuat interaksinya atau partisinya paling banyak akan keluar paling akhir dari dalam kolom (Ibrahim dan Sitorus, 2013).

4.2.2 Identifikasi Pigmen Klorofil B dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisa dilanjutkan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengidentifikasi kandungan klorofil b berdasarkan bercak warna yang muncul dan nilai Rf. Isolat warna pada botol vial ke 13-15 diduga sebagai klorofil b dengan ulangan 1-3 diperoleh rata-rata nilai Rf sebesar 0,49 (Tabel 10). Identifikasi diamati dan dihitung nilai Rf dengan cara jarak tempuh senyawa

dibagi jarak tempuh pelarut (Lampiran 5). Memiliki kecenderungan yang sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Heriyanto dan Leenawaty (2006), kisaran nilai Rf klorofil b (hijau kuning) 0,48-0,56. Totolan warna pigmen terangkat ke atas terjadi karena adanya gaya adesi (gaya tarik menarik antara zat yang tak sejenis) yang kuat. Hasil identifikasi komponen molekul pigmen klorofil b alga coklat *Sargassum filipendula* dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 9.

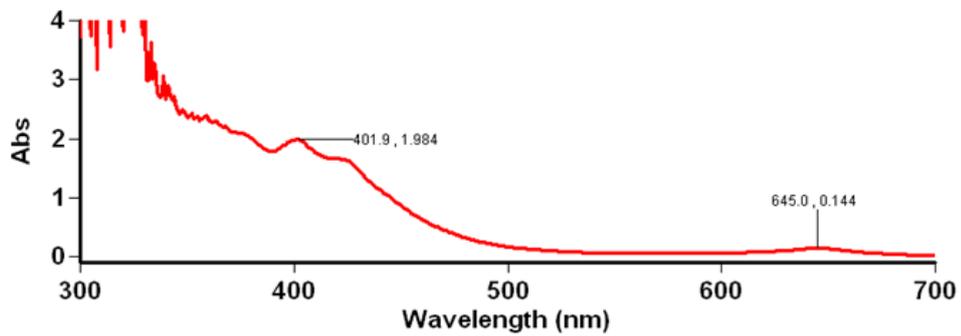


Gambar 9. Hasil Identifikasi komponen pigmen klorofil b alga coklat *Sargassum fillipendula* dengan KLT.

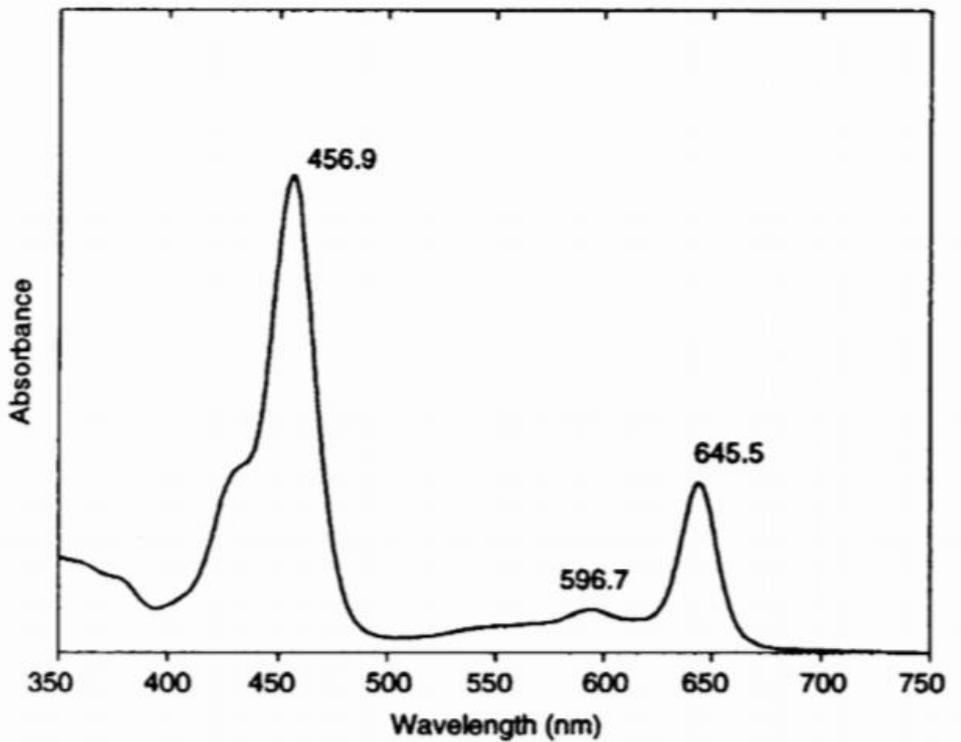
Dari hasil identifikasi isolat berwarna kuning kehijauan menggunakan KLT, didapatkan bahwa isolat tersebut masuk dalam kisaran nilai Rf dari klorofil b. Hasil ini dapat terjadi karena semakin non polar atau berpolaritas rendah suatu senyawa, maka semakin jauh jarak tempuh senyawa tersebut mengikuti aliran fase gerak. Dan jika lebih tinggi polaritas senyawa, maka semakin terhambat fase diamnya.

4.2.3 Identifikasi Klorofi B dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel pigmen klorofil b dari alga coklat *Sargassum filipendula* dilarutkan dengan aseton diuji pada panjang gelombang 300-800 nm. Hal ini didasarkan pada hasil uji panjang gelombang absorbansi maksimum Jeffrey (1997). Hasil absorbansi dan kadar klorofil b (Lampiran 6 dan perhitungan Lampiran 7) dapat dilihat pada Tabel 10. Pola spektra dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Pola Spektra Klorofil B Hasil Isolasi *Sargassum fillipendula* dalam Pelarut Aseton



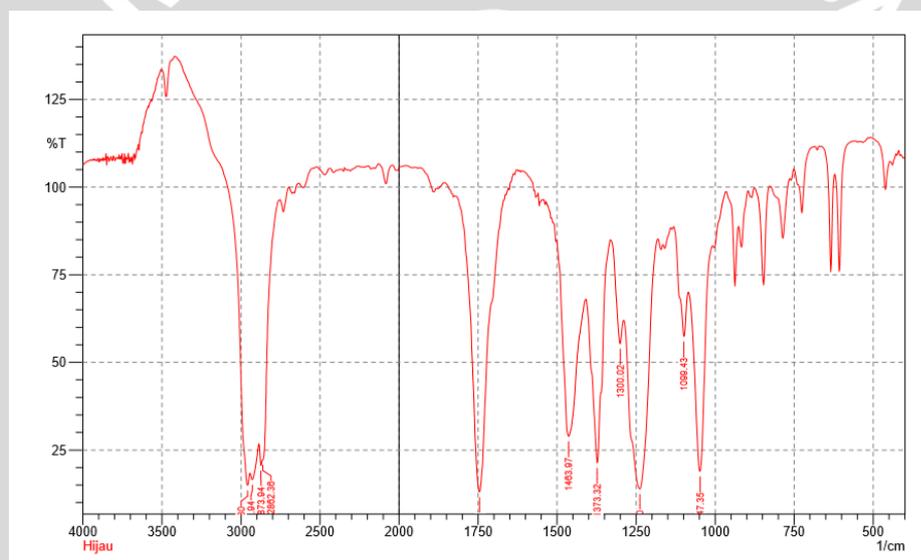
Gambar 11. Spektrum standar klorofil b dalam referensi pelarut aseton 100%.(Jeffrey, 1997)

Gambar 10 menunjukkan bahwa spektra komponen pigmen klorofil b yang di isolasi dari alga coklat *Sargassum fillipendula* diperoleh dua puncak gelombang, yaitu pada panjang gelombang 401 nm dan 645 nm dalam pelarut aseton. Hasil ini memiliki persamaan terhadap hasil pengujian Jeffrey (1997) yang memiliki panjang gelombang maksimum pada 645,5 nm pada Gambar 11, namun terdapat perbedaan pada hasil pengujian Jeffrey diperoleh tiga puncak

gelombang, yaitu pada 456,9 nm, 596,7 nm dan 645,5 nm. Dari serapan maksimum dapat disimpulkan bahwa isolat klorofil b dari alga coklat *Sargassum filipendula* tersebut teridentifikasi namun memiliki bentuk dan puncak spektra yang berbeda dari standar spektra Jeffry (1997).

4.2.4 Identifikasi Pigmen Klorofil B dengan FT-IR

Hasil FT-IR (Lampiran 11) menunjukkan gugus-gugus fungsional senyawa bioaktif yang diduga terdapat pada klorofil b yang diisolasi dari alga coklat *Sargassum filipendula* dengan pelarut aseton dapat dilihat pada Gambar 12 dan Tabel 12.



Gambar 12. Hasil Uji FT-IR klorofil b yang diisolasi dari *Sagassum filipendula* dalam pelarut aseton

Tabel 12. Gugus fungsional pita serapan FT-IR

Gugus	Hasil serapan (cm ⁻¹)	Standart serapan (cm ⁻¹)	Holt dan Jacobs (1995)
Alkana C-H <ul style="list-style-type: none">ulur	2958,8 & 2927,94 1463,97	2960-2850 1470-1430	2920 -
Aldehyd -CHO <ul style="list-style-type: none">ulur	2873,94 & 2862,36 1745,58	2900-2700 1740-1720	2720 1655
Ester -CO-O <ul style="list-style-type: none">ulur	- 1300,02 & 1238,3	1730-1715 1300-1050	1728 -
Keton C=O <ul style="list-style-type: none">ulur	- 1047,35 & 1099,43	1700-1680 1300-1050	1688 -
Alkenes C=C	-	1680-1620	1610



Dari Tabel 12 di atas diperoleh informasi bahwa pada pita serapan 2958,8 dan 2927,94 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus alkana. Gugus alkana ini merupakan regang C-H yang membentuk pita dengan intensitas sedang, dan diperkuat dengan munculnya serapan pada 1463,97 cm^{-1} . Pada bilangan gelombang 2873,94 dan 2862,36 cm^{-1} menunjukkan regang $-\text{CHO}$ menunjukkan adanya gugus aldehid yang merupakan gugus penting pada klorofil b, diperkuat dengan munculnya ulur $-\text{CHO}$ pada bilangan gelombang 1745,58 cm^{-1} . Adanya ulur $-\text{CO}-\text{O}$ ditunjukkan pada bilangan gelombang 1300,02 & 1238,3 cm^{-1} yang membentuk ikatan ester. Pada pita serapan 1047,35 dan 1099,43 menunjukkan adanya ulur dari senyawa keton $\text{C}=\text{O}$. Daerah-daerah serapan dan gugus dugaan tersebut terdapat sedikit perbedaan dari daerah-daerah serapan dan gugus hasil uji Holt dan Jacobs pada Tabel 12, yaitu pita serapan pada bilangan gelombang 1680-1620 tidak ditemukan gugus alkenes. Hasil FT-IR ini telah membuktikan bahwa sampel merupakan senyawa klorofil b.

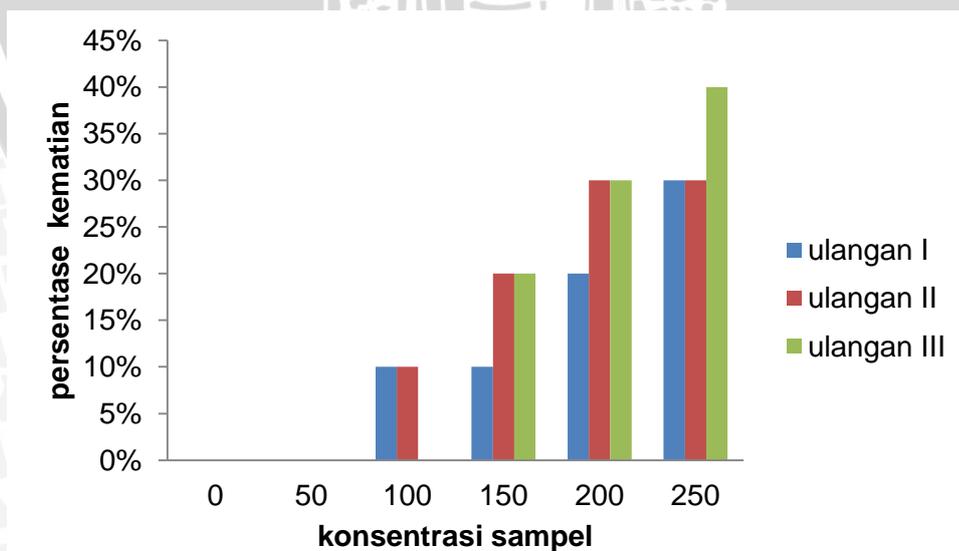
Tumbuhan tinggi mengandung dua macam klorofil yaitu klorofil a dan klorofil b. Klorofil a adalah suatu senyawa kompleks antara magnesium dan porfirin yang mengandung cincin siklontanon (cincin V). Keempat atom nitrogennya dihubungkan secara ikatan koordinasi dengan ion Mg^{2+} membentuk senyawa planar yang mantap. Rantai sampingnya yang bersifat hidrofob adalah suatu terpenoid alkohol, atau fitol, yang dihubungkan secara ikatan ester dengan gugus propionat dari cincin IV. Klorofil b adalah klorofil kedua yang terdapat dalam tumbuhan. Struktur klorofil b berbeda dengan klorofil a karena klorofil a mempunyai penyulih metil, sedangkan klorofil b mempunyai gugus aldehida yang terikat di kanan atas cincin pirol (Harborne 1987).

4.2.5 Rendemen Pigmen Klorofil B

Dari perhitungan rendemen pigmen, dilakukan dengan tujuan mengetahui besarnya ke efektivitasan penelitian yang dilakukan. Hasil rendemen yang semakin tinggi maka akan lebih efektif, dikarenakan pigmen yang di dapat semakin banyak. Nilai rendemen yang diperoleh sebesar 0,0112%.

4.2.6 Identifikasi Toksisitas Pigmen Klorofil B dengan *Brine Shrimp* Lethality Test (BSLT)

Hasil uji BSLT Jumlah kematian larva *Artemia Salina Leach* pada setiap botol vial dalam berbagai konsentrasi perlakuan klorofil b dari ekstrak alga coklat *Sargassum filipendula* pada percobaan ini memperlihatkan pengaruh yang berbeda. Grafik kematian artemia dapat dilihat pada Gambar 13. Jumlah larva tiap botol uji adalah 10 ekor dengan tiga kali ulangan. Jumlah total larva *Artemia Salina Leach* yang digunakan adalah 180 ekor larva. Persentase kematian *Artemia* diperoleh dengan membagi total kematian larva dengan jumlah artemia uji di kali 100%. Kemudian dihitung regresi persen probit kematian dengan log konsentrasi pada tiap ulangan, sehingga diperoleh anti log.



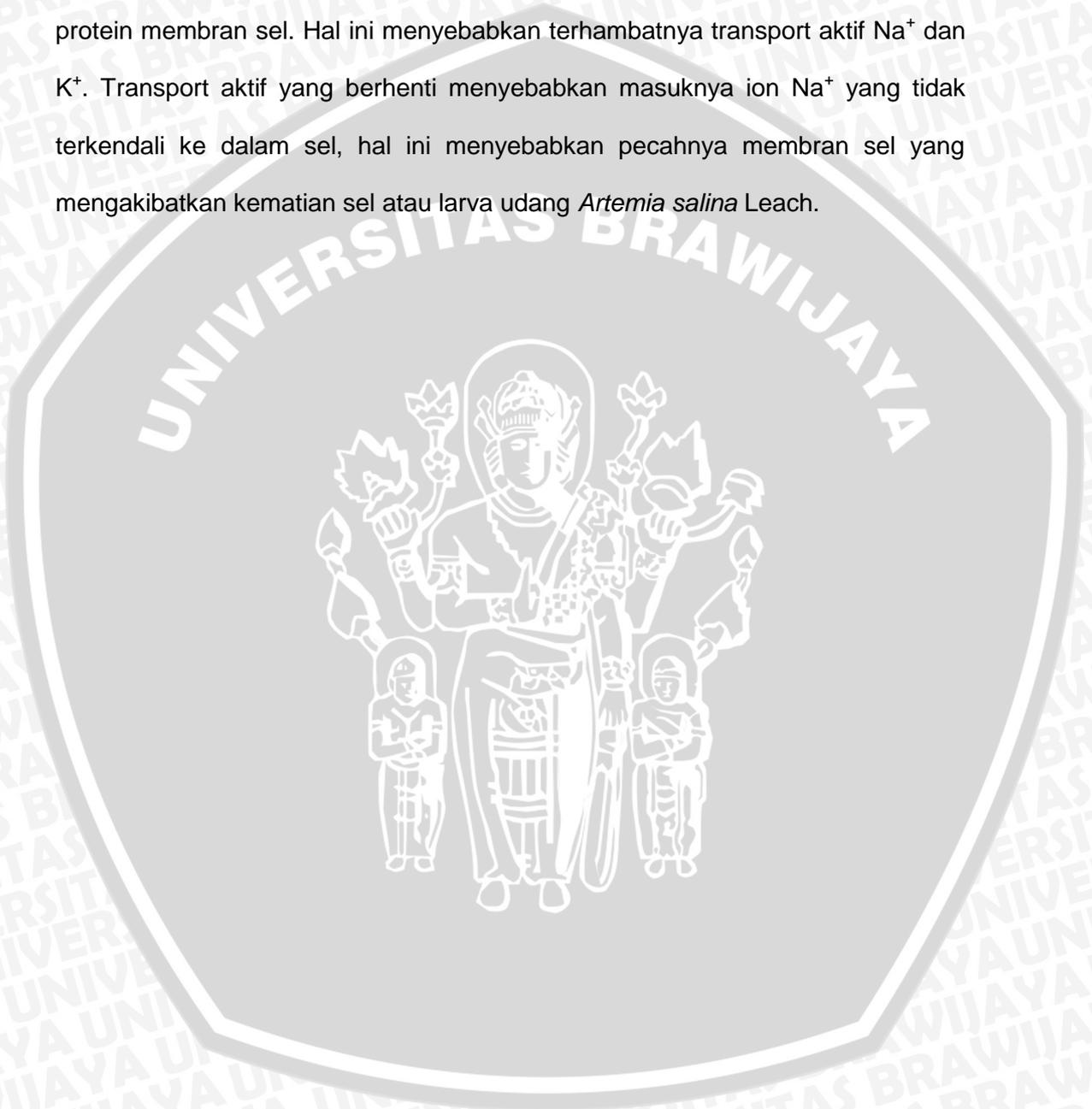
Gambar 13. Grafik persentase kematian artemia

Hasil uji BSLT (Tabel 10) menunjukkan pada konsentrasi 0 µg/ml (kontrol) dari ulangan 1 hingga ulangan 3 tidak ada larva *Artemia* yang mati sehingga diperoleh %kematian sebesar 0%. Pada konsentrasi 50 µg/ml dari ulangan 1 hingga ulangan 3 tidak ada larva *Artemia* yang mati, sehingga %kematian yang diperoleh juga sebesar 0%. Pada konsentrasi 100 µg/ml dari ulangan 1 dan 2 sebanyak 1 larva *Artemia* yang mati, dan pada ulangan 3 tidak ada larva yang mati, sehingga diperoleh %kematian sebesar 6,7%. Pada konsentrasi 150 µg/ml dari ulangan 1 sebanyak 1 larva *Artemia* yang mati, sedangkan pada ulangan 2 dan 3 sebanyak 2 larva yang mati, sehingga diperoleh %kematian sebesar 17%. Pada konsentrasi 200 µg/ml dari ulangan 1 sebanyak 2 larva *Artemia* yang mati, sedangkan pada ulangan 2 dan 3 sebanyak 3 larva yang mati, sehingga diperoleh %kematian sebesar 26,7%. Pada konsentrasi 250 µg/ml dari ulangan 1 dan 2 sebanyak 3 larva *Artemia* yang mati, pada ulangan 3 larva yang mati sebanyak 4, sehingga diperoleh %kematian sebesar 33,3%. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi klorofil b maka semakin tinggi persen kematian *Artemia*. Hal ini dikarenakan semakin banyaknya klorofil b yang ditambahkan, semakin banyak yang masuk kedalam tubuh *Artemia*. Hal tersebut dapat menghambat metabolisme *Artemia*.

Dari hasil percobaan dengan tiga kali ulangan tersebut diperoleh %probit pada konsentrasi 0 dan 50 µg/ml adalah 0%, pada konsentrasi 100 µg/ml %probitnya adalah 3,52%, pada konsentrasi 150 µg/ml diperoleh %probit 4,05%, pada konsentrasi 200 µg/ml %probitnya adalah 4,39%, dan pada konsentrasi 250 µg/ml diperoleh %probit 4,56%. Sehingga didapatkan nilai antilog/ LC₅₀ sebesar 847,03 µg/ml yang berarti pigmen klorofil b tidak bersifat toksik, sesuai dengan pernyataan Anderson (1991), tingkat toksisitas suatu senyawa dapat dilihat dari

nilai LC_{50} nya, yaitu $0-250 \mu\text{g.ml}^{-1}$ sangat toksik, $250-500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ toksik, $500-750 \mu\text{g.ml}^{-1}$ sedang dan $750-1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ tidak toksik.

Gugus fungsi (-OH) pada klorofil b yang dimiliki aldehid berikatan dengan protein membran sel. Hal ini menyebabkan terhambatnya transport aktif Na^+ dan K^+ . Transport aktif yang berhenti menyebabkan masuknya ion Na^+ yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran sel yang mengakibatkan kematian sel atau larva udang *Artemia salina* Leach.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil peneitian tentang uji toksisitas klorofil b dari alga coklat *Sargassum filipendula* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*, diambil kesimpulan bahwa klorofil b tidak bersifat toksik dan memiliki nilai LC_{50} sebesar 847,03 $\mu\text{g/ml}$.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian dapat disarankan, masih perlu adanya variasi hewan uji berbeda seperti tikus atau mencit menggunakan metode LD_{50} dengan cara klorofil b disuntikkan atau di campurkan dalam makanan hewan uji. Dan pada penentuan konsentrasi uji sebaiknya digunakan perbandingan dengan skala aritmatik.



DAFTAR PUSTAKA

- Agustian, R., E. Yudiati., dan S. Sedjati. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Pigmen Kasar Mikroalga *Spirulina platensis* dengan Metode Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Journal Of Marine Research*. **2** (1): 25-31.
- Anam, C., Sirojudin., dan K.S. Firdaus. 2007. Analisa Gugus Fungsi pada Sampel Uji, Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. *Berkala fisika*. **10** (1): 79-85.
- Anderson, J.E., C.M. Goetz., and J.L. Mc Laughlin. 1991. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochemical Analysis*. **2** (3): 107-111.
- Ariens, E.J., E. Mutschler., dan A.M. Simonis. 1986. Toksikologi Umum Pengantar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 279 hlm.
- Arikunto, S.M. 2002. Prosedur Penelitian. Rineka Cipta. Jakarta. 342 hlm.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Daging Buah Pepino (*Solanum muricatum Aiton*) yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang. [Skripsi]
- Asfar, N.W. 2015. Uji Toksisitas Akut Alga Coklat (*Sargassum sp*) Terhadap Mencit (*Mus musculus*). Fakultas kedokteran Gigi. Universitas Hasanudin. Makasar. [Skripsi]
- Atmadja, W.S., A. Kadi., Sulistijo., dan Radiamanias. 1996. Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut di Indonesia. Puslitbang Oseanografi. LIPI. Jakarta. 191 hlm.
- Costa, J.F.D., F.F. Karwur., dan L. Limantara. 2009. Efek Beta Karoten dan Agregasi Klorofil pada Fotostabilitas Klorofil a dalam Pelarut Aseton. *Jurnal Natur Indonesia*. **11** (2): 115-123.
- Daintith, J. 2004. The Facts On File Dictionary of Organic Chemistry. Facts On File Science Library. New York. p. 64.
- Demirel, Z., Z.D. Yildirim., I. Tuney., K. Kesici., and A. Sukatar. 2012. Biochemical analysis of some brown seaweeds from the Aegean Sea. *Botanica Serbica*. **36** (2): 91-95.
- Dinas Kelautan dan Perikanan Pemerintah Kabupaten Sumenep. 2015. Produksi Budidaya Rumput Laut Kabupaten Sumenep Tahun 2015. Sumenep. Madura. n.p
- Dwidjoseputro, D. 1994. Pigmen Klorofil. Erlangga. Jakarta.
- Fessenden, R.J., dan S.F. Joan. Kimia Organik. Terjemahan oleh Aloysius H.P. 1997. jilid 1 edisi ketiga. Penerbit Erlangga. Jakarta. 590 hlm.

- Frete, H.D., A.B. Susanto., B. Prasetyo., dan L. Limantara. 2012. Karotenoid dari Makroalgae dan Mikroalgae: Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi. *J. Tekno. Dan Industri Pangan*. **23** (2): 221-228.
- Gafur, M.A., I. Ishak., dan B. Nurhayati. 2013. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Jamblang (*Syzygium cumini*). Fakultas MIPA. Universitas Negeri Gorontalo. Gorontalo.
- Gross, J. 1991. Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids. An avi Book. Van Nostrand Reinhold. New York. p. 351.
- Haqiqi, S.H. 2008. Kromatografi Lapis Tipis. Nadjeeb.files.wordpress.com/2012/24/11/kromatografi.pdf. Diakses pada tanggal 15 Maret 2016.
- Harborne, J.B. 1994. Introduction to Ecological Biochemistry. Elsevier Science & Technology Books. p. 384.
- Harefa, F. 2003. Pembudidayaan Artemia untuk Pakan Udang dan Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 79 hlm.
- Haugan, J.A., T. Aakemann., and S. Liaaen-Jensen. 1995. Example 2: macroalgae and microalgae. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (Eds.), Carotenoid. Volume 1A: Isolation and Analysis. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p. 215-226.
- Hendayana, S., A. Kodorahman., A.A. Sumarna., dan A. Supritra. 1994. Kimia Analitik Instrument. Edisi I. IKIP Semarang Press. Semarang. 259 hlm.
- Hendri, M., D. Gusti., dan T. Jetun. 2010. Konsentrasi Letal (LC₅₀-48 Jam) Logam Tembaga (Cu) dan Logam Kadmium (Cd) Terhadap Tingkat Mortalitas Juwana Kuda Laut (*Hippocampus spp*). *Jurnal penelitian sains*. **13** (1): 26-30.
- Heriyanto., dan L. Limantara. 2006. Komposisi dan Kandungan Pigmen Utama Tumbuhan Taliputri *Cuscuta australis* R.Br. dan *Cassytha filiformis* L. *Makara, sains*. **10** (2): 69-75.
- Hill, M.G. 2003. Dictionary of Chemistry. Second Edition. United States of America. p.1154.
- Holt, A.S., and E.E. Jacobs. 1995. Infra-Red Absorption Spectra of Chlorophylls and Derivatives. University of Illinois. Urbana, Illinois. p. 553-559.
- Houghton, P.J., and Raman. 1998. Laboratory Handbook for The Fractination of Natural Extract. Chapman and Hall. London, UK. p. 199.
- Huda, N. 2011. Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis. GBC 911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CL 19140. *Sigma Epsilon*. **20** (21): 15-20.
- Hujaya, S.D. 2008. Isolasi Pigmen Klorofil, Karoten, dan Xantofil dari Limbah Alga di Area Budi Daya Ikan Bojongsong. Institut Teknologi Bandung. Bandung. [Skripsi]

- Husni, H., dan M.T. Esmiralda. 2012. Uji Toksisitas Akut Limbah Cair Industri Tahu Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Lin) (Studi Kasus: Limbah Cair Industri Tahu "SUPER", Padang). Universitas Andalas. Padang.
- Ibrahim, S., dan M. Sitorus. 2013. Teknik Laboratorium Kimia Organik. Edisi Pertama. Graha Ilmu. Yogyakarta. 140 hlm.
- Ibrahim, Y., K.S. Hertien., Riandi., dan Adi Anto. 2014. Analisis Keragaman Biota dan Faktor Fisiko-Kimia Pantai Karapyak Pengandaran untuk Kebutuhan Pengembangan Kuliah Lapangan Terpadu Mahasiswa Calon Guru Biologi. *Biologi, Sains, Lingkungan dan Pembelajarannya*. **11** (1): 740-744.
- Jaswir, I., D. Noviendi., H.M. Salleh., M. Taher., and Miyashita. 2011. Isolation of fucoxanthin and fatty acids analysis of *Padina australis* and cytotoxic effect of fucoxanthin on human lung cancer (H1299) cell lines. *African Journal of Biotechnology*. **10** (81): 18855–18862.
- Jeffrey, S.W. 1997. Chlorophyll b, *in*: Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura and S.W. Wright: Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods., Bremerhaven, Pangaea. p. 37.
- Kadi, A. 2004. Potensi rumput laut di beberapa perairan pantai di Indonesia. *Oseana*. **29** (4): 25–36.
- Kareem, A., S.M. Mohammad. 2009. Phenetic Studies and New Records of *Sargassum* Species (*Fucales*, *Phaeophyceae*) from the Arabian Gulf Coast of Saudi Arabia. *Academic Journal of Plant Sciences*. **2** (3): 173-181.
- Khotimah, K., Darius., dan B.B. Sasmito. 2013. Uji Aktivitas Senyawa Aktif Alga coklat (*Sargassum filipendula*) Sebagai Antioksidan pada Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*). *THPi Student Journal*. **1** (1): 10-20.
- Oswiler, G.D., T.L. Carson., W.B. Buck., and G.A. Gelder. 1976. Nitrates, Nitrites and Related Problems. Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology. Kendall/Hunt Publishing Co. Iowa. p. 460-470.
- Othmer, K. 1965. Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 8. 3rd edition. John Wiley and Sons. Inc., United States of Amerika. p. 880.
- Labib, B.R. 2013. Validasi Metode Penentuan Kadar Lansoprazol Dalam Darah Secara *In Vitro* dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. [Skripsi]
- Lakitan, B. 2001. Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 203 hlm.

- Limantara, L. 2007. Mengapa Kita Butuh Makanan Tambahan / Food Suplemen?. <http://pengobatan.wordpress.com/2007/04/14/mengapa-kita-butuh-makanan-tambahan-food-suplemen/>. diakses 30 Agustus 2016.
- Limantara, L., dan Heriyanto. 2010. Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Coklat dari Perairan Madura dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Ilmu kelautan*. **15** (1): 23-32.
- Mangkoediharjo, S., dan G. Samudro. 2009. Ekoteknologi Teknosfer. Guna Widya. Surabaya.
- Markham, K.R. 1988. Cara Identifikasi Flavonoid. Institut Teknologi Bandung. Bandung. 117 hlm.
- Masojidek, J., M. Koblizek., and G. Torzillo. 2004. Photosynthesis in microalgae in: A. Richmond (Ed). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blakwell Science Ltd., Iowa. p. 20-39.
- Widayat., dan H. Satriadi. 2008. Optimasi Pembuatan Dietil Eter dengan Proses Reaktif Distilasi. *Reaktor*. **12** (1): 7-11.
- Matsuno, T. 2001. Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science*. **67**: 771-783.
- Maulida, D., dan N. Zulkarnaen. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran, n-Heksan, Aseton, dan Etanol. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Mc-Cabe, W.L. 2005. Unit Operations of Chemical Engineering. 5th ed. Mc Graw-Hill. New York. p. 1152.
- Meyer B.N., N.R. Ferrigni., J.E. Putnam., L.B. Jacobsen., D.E. Nicols., and J.L. Mc-Laughlin. 1982. Brine Shrimp A Convenient General Bioassay for active Plant constituent. *Planta Medica*. **45** (1): 31-44.
- Mudjiman, A. 1995. Makanan Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 190 hlm.
- Nobel, P.S. 2009. Physicochemical and Enviromental Plant Physiology. Academic Press. Canada. p. 582.
- Nugroho, B.W., Dadang., dan D. Prijono. 1999. Pengembangan dan Pemanfaatan Insektisida Alami. Pusat Kajian Pengendalian Hama Terpadu. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hlm 8-20.
- Nurhayati, A.P.D., N. Abdulgani., dan R. Febrianto. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia Salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Jurnal Akta Kimindo*. **2** (1): 41-46.
- Octaviani, T., A. Gustarti., dan H. Susanti. 2014. Penetapan Kadar β -Karoten pada Beberapa Jenis Cabe (*Genus capsicum*) dengan Metode Spektrofotometri Tampak. *Pharmacia*. **4** (2): 101-109.
- Oscik, J. 1982. Adsorption. Ellis Harwood. New York. 206 hlm.

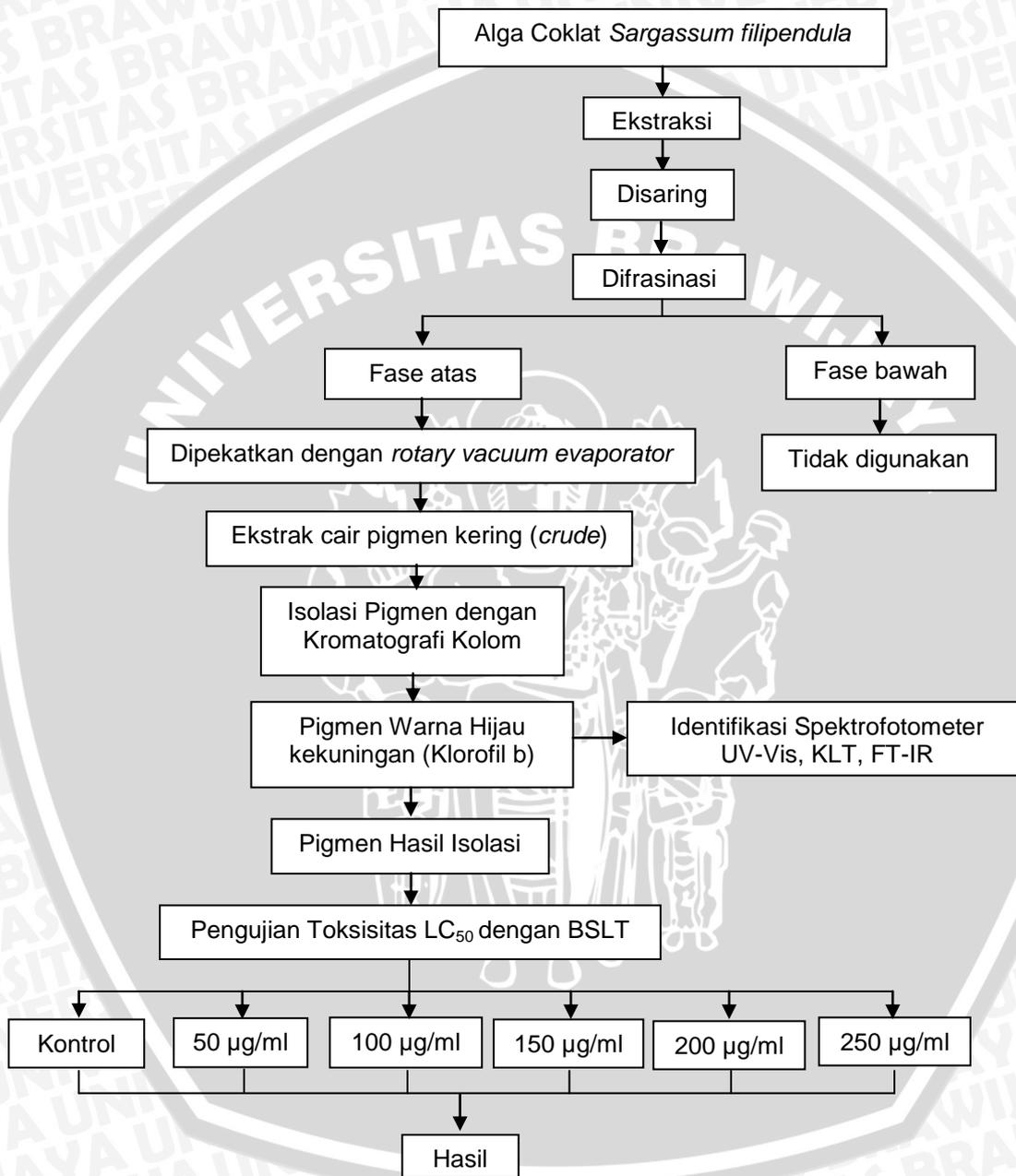
- Pangestuti, R., L. Limantara., dan A. Susanto. 2007. Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystrum* C.A. Agardh. Prosiding Seminar Nasional Pigmen, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga. p. 220-228.
- Panggabean, M.G.L. 1984. Teknik Penetasan dan Pemanenan Artemia Salina. *Oseana*. **9** (2): 57 - 65.
- Praptiningsih, Y. 2009. Buku Ajar Teknologi Pengolahan. Universitas Jember. Jember.
- Romiyanto, A. 2014. Studi Kandungan B-Karoten pada Rumput Laut Merah (*Eucheuma spinosum*) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Universitas Brawijaya Malang. Malang.
- Salisbury, F.B., dan W.C. Ross. 1991. Fisiologi tumbuhan. Jilid 2. Institut Teknologi Bandung. Bandung. 173 hlm.
- Sankari, G., E. Kriahnamoorthy., S. Jayakumar., S. Gunaeakaran., V.V. Priya., S. Subramanlam., S. Subramanlam., and S.K. Mohan. 2010. Analysis of serum immunoglobulins using fourier transform infrared spectral measurements. *Biol. Med.* **2** (3): 42-48.
- Scheer, H. 2006. An Overview of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll: Biochemistry, Biophysics, Function and Applications. Chapter 1. In: Grimm, B., Porra, R.J., Rudiger, W., and Scherr, H (ed). 2006. Chlorophyll and Bacteriochlorophylls, Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. Volume 25. Springer. Nederlands. p. 1-26.
- Schelfan., Leopoid., dan B.J. Morn. 1983. Bioactive Properties of Wild Blueberry Fruits. *Journal of Food Sciences*. **65** (2): 352-356.
- Setiadi, M.I. 2008. Sintesis Maltovanilat Melalui Mekanisme Steglich Menggunakan Pelarut Aseton. Universitas Indonesia: Depok.[Skripsi]
- Soegiarto, A.S., W.S. Atmaja., dan H. Mubarak. 1978. Rumput Laut, Manfaat, Potensi, dan Usaha Budidayanya. LON-LIPI. Jakarta. 49 Hlm.
- Sriyanti, T., Nuryono., dan Narsito. 2005. Pengaruh Keasaman Medium dan Imobilisasi Gugus Organik pada Karakter Silika Gel dari Abu Sekam Padi. *JSKA*. **8** (3): 1-12.
- Subandi, A. 2008. Metabolisme. <http://metabolisme.blogspot.com/2007/09>. Diakses pada 29 April 2016.
- Sudarmadji, S., B. Haryono., dan Suhardi. 1989. Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta. 171 hlm.
- Sudjadi. 1988. Metode Pemisahan. Kanisius. Yogyakarta. 182 hlm.
- Sulastri, S., dan K. Susila. 2010. Berbagai Macam Senyawa Silika Sintesis, Karakterisasi dan Pemanfaatan. Universitas Negeri Yogyakarta. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan*

MIPA, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta, 15 Mei 2010. 211-216.

- Sumich, J.L. 1992. An introduction to the biology of marine life. 5th ed. William C Brown. Dubuque. p. 449.
- Suparmi., dan S. Ahmad. 2009. Mengenal Potensi Rumput Laut Kajian Pemanfaatan Sumberdaya Rumput Laut dari Aspek Industri dan Kesehatan. *Sultan Agung*. **44** (118): 95-116.
- Suryanto. E., and F. Wehantouw. 2009. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus altilis F.*). *Chem. Prog.* **2** (1): 1-7.
- Susanto, A.B., dan A. Mucktiyany. 2002. Strategi Pengembangan Rumput Laut Pada SMK dan Community College. Pros. Seminar Riptek Kelautan Nasional.
- Suwandi, J.F. 2009. Pengaruh Pemberian DMSO Sebagai Pelarut Bahan Uji pada Uji Aktivitas Antiplasmodium In vivo Terhadap Pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada Mencit. *J. Sains MIPA*. **15** (3): 207 – 210.
- Uji, M.A. 2014. Mengambil Manfaat dari Hewan dan Tumbuhan Laut. Mitra Edukasi Indonesia. Bandung. 58 hlm.
- Wehr, J.D. 2015. Brown Seaweed. In: Wehr, J.D., Sheath, R.G., and J.P. Kociolek. *Freshwater Algae of North America*. 2th ed. Academic Press. San Diego. p. 851-871.
- Widyastuti, S. 2009. Kadar Alginat Rumput Laut yang Tumbuh di Perairan Laut Lombok yang Diekstrak dengan Dua Metode Ekstraksi. *Jurnal Teknologi Pertanian*. **10** (3): 144-152.
- Wijayanti, L. 2010. Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin pada Alga Coklat (*Sargassum duplicatum*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum filipendula*, *Padina australis*, dan *Turbinaria conoides*). Universitas Brawijaya. Malang. [Skripsi]
- Winarno, F.G. 2004. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 252 hlm.
- Wulandari, I. 2011. Teknologi Ekstraksi dengan Metode Maserasi dalam Etanol 70% pada Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus Benth*) di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) Tawaangu. Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret. [Skripsi]
- Yasita, D., dan I.D. Rachmawati. 2009. Optimasi Proses Ekstraksi Pada Pembuatan Karaginan dari Rumput Laut *Euclima cottoni* untuk Mencapai *Foodgrade*. Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro.
- Yunizal. 2004. Teknologi Pengolahan Alginat. Pusat Riset Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan Perikanan. Jakarta. 61 hlm.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur penelitian Uji Toksisitas Klorofil b dari Alga Coklat *Sargassum filipendula* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*



Lampiran 2. pembuatan Larutan

➤ Pembuatan Saturasi Garam

- Ditimbang \pm 1500 gram garam grosok
- Dimasukkan dalam botol plastik berkapasitas 1,5 liter
- Ditambahkan air ledeng hingga memenuhi botol
- Dikocok hingga larutan jenuh dan garam tidak larut lagi
- Didiamkan selama 24 jam
- Disaring menggunakan kertas saring yang disusun berturut-turut dari bawah kertas saring kasar, kertas saring halus, dan kapas
- Diperoleh saturasi garam dalam wadah botol

➤ Pembuatan Larutan Ekstraksi

Metanol : Aseton (7:3, v/v) dalam 600 ml

- Metanol = $\frac{7}{10} \times 600 = 420$ ml

- Aseton = $\frac{3}{10} \times 600 = 180$ ml

➤ Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Kolom

n-heksan : etil asetat (8:2, v/v) dalam 200 ml

- n-heksan = $\frac{8}{10} \times 200 = 160$ ml

- etil asetat = $\frac{2}{10} \times 200 = 40$ ml

n-heksan : etil asetat (7:3, v/v) dalam 200 ml

- n-heksan = $\frac{7}{10} \times 200 = 140$ ml

- etil asetat = $\frac{3}{10} \times 200 = 60$ ml

n-heksan : etil asetat (6:4, v/v) dalam 200 ml

- n-heksan = $\frac{6}{10} \times 200 = 120$ ml

- etil asetat = $\frac{4}{10} \times 200 = 80$ ml

n-heksan : etil asetat (5:5, v/v) dalam 200 ml

- n-heksan = $\frac{5}{10} \times 200 = 100$ ml

- etil asetat = $\frac{5}{10} \times 200 = 100$ ml

n-heksan : etil asetat (4:6, v/v) dalam 200 ml

- n-heksan = $\frac{4}{10} \times 200 = 80$ ml

- etil asetat = $\frac{6}{10} \times 200 = 120$ ml

➤ **Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Lapis Tipis**

n-heksan : aseton (7:3, v/v) dalam 10 ml

- n-heksan = $\frac{7}{10} \times 10 = 7$ ml

- etil asetat = $\frac{3}{10} \times 10 = 3$ ml

Lampiran 3. Dokumentasi Proses Penelitian

❖ Proses Ekstraksi Alga Coklat *Sargassum filipendula*



Sargassum filipendula



Proses pencucian



Proses pemotongan



Ditimbang 250 gram



Proses blender sampel



Proses diangin-anginkan



Ditimbang 0,5 gram
CaCO₃



Proses penumbukan



Proses maserasi dengan
larutan metanol : aseton





Penimbangan remendemen hasil maserasi



Proses filtrasi

❖ Proses Pembuatan Larutan Saturasi Garam



Dimasukkan garam gosok dan air



Dikocok dan didiamkan



Proses penyaringan



Saturasi garam

❖ Proses Fraksinasi Hasil Maserasi



Proses fraksinasi dengan dietil eter, saturasi garam dan aquadest



Terbentuk dua fase

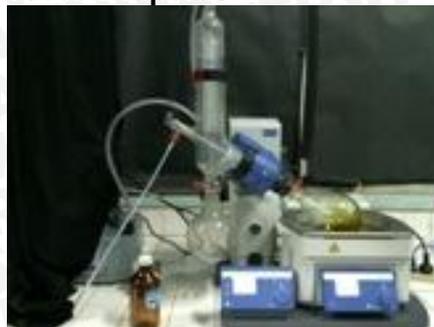


Dibuang fase bawah

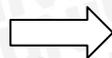


Fase atas diukur dan ditampung

❖ **Proses Evaporasi**



Proses evaporasi dengan *rotary vacuum evaporator*



Pasta hasil evaporasi diambil

❖ **Proses Preparasi Kolom Kromatografi**



Silica gel ditimbang 30 gram



Dihomogenkan bersama n-heksan : etil asetat dengan *magnetic stirrer*



Disaring pasir laut



Terbentuk pita warna dan ditampung pada botol sampel



Dimasukkan sampel ekstrak kasar



Kapas, pasir laut, *silica gel* dan fase gerak dimasukkan secara berurutan, didiamkan 24 jam



Proses nitrogen

❖ **Proses Identifikasi Pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**



Persiapan alat dan bahan



Penotolan pigmen untuk diidentifikasi pada plat KLT



Proses elusi dalam fase gerak (8:2) pada plat KLT



Hasil identifikasi pada plat KLT klorofil b

❖ Proses Preparasi dan Uji BSLT



Proses penetasan telur *Artemia salina* selama 48 jam



Larva *Artemia salina* umur 48 jam



Pengenceran sampel menggunakan DMSO



Sampel siap diuji BSLT



Pengenceran dengan konsentrasi berbeda dan tiga ulangan



Pembuatan larutan stok



Larva *Artemia salina* ditempatkan pada cawan petri



Diambil 10 *Artemia salina* untuk tiap botol vial



Setelah 24 jam diamati dan dihitung jumlah *Artemia salina* yang mati

Lampiran 4. Tabel Hasil Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom

Panjang kolom kromatografi = 45 cm

Diameter kolom kromatografi = 2 cm

No. Botol	Waktu	Warna	Konsentrasi Fase Gerak
1	10.55	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
2	11.25	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
3	12.44	Kuning bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
4	14.02	Kuning pekat (β -karoten)	(8:2) N-Heksan:etil asetat
5	15.29	Kuning pekat (β -karoten)	(8:2) N-Heksan:etil asetat
6	16.48	Kuning bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
7	18.09	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
8	19.36	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
9	21.01	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
10	22.33	Bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
11	23.56	Kuning bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
12	24.56	Kuning bening	(8:2) N-Heksan:etil asetat
13	01.58	Kuning kehijauan (Klorofil b)	(8:2) N-Heksan:etil asetat
14	03.00	Kuning kehijauan (Klorofil b)	(8:2) N-Heksan:etil asetat
15	04.10	Kuning kehijauan (Klorofil b)	(8:2) N-Heksan:etil asetat
16	05.13	Bening kehijauan	(7:3) N-Heksan:etil asetat
17	06.00	Bening kehijauan	(7:3) N-Heksan:etil asetat
18	06.45	Bening kehijauan	(7:3) N-Heksan:etil asetat
19	07.15	Hijau	(7:3) N-Heksan:etil asetat
20	07.45	Biru kehijauan (Klorofil a)	(7:3) N-Heksan:etil asetat
21	08.15	Biru kehijauan (Klorofil a)	(7:3) N-Heksan:etil asetat
22	08.39	Biru kehijauan (Klorofil a)	(7:3) N-Heksan:etil asetat
23	09.03	Biru kehijauan (Klorofil a)	(7:3) N-Heksan:etil asetat
24	09.28	Biru kehijauan (Klorofil a)	(7:3) N-Heksan:etil asetat
25	09.56	Hijau bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
26	10.26	Hijau bening	(7:3) N-Heksan:etil asetat
27	11.09	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
28	11.34	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
29	11.49	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
30	12.08	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
31	12.26	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
32	12.43	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
33	13.00	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
34	13.21	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
35	13.36	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
36	14.00	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
37	14.18	Hijau	(6:4) N-Heksan:etil asetat
38	14.33	Hijau bening	(6:4) N-Heksan:etil asetat
39	14.49	Hijau bening	(5:5) N-Heksan:etil asetat

40	15.03	Hijau bening	(5:5) N-Heksan:etil asetat
41	15.21	Hijau bening	(5:5) N-Heksan:etil asetat
42	15.41	Kuning kehijauan	(5:5) N-Heksan:etil asetat
43	15.55	Kuning keorangean	(5:5) N-Heksan:etil asetat
44	16.09	Orange pekat (Fukosantin)	(5:5) N-Heksan:etil asetat
45	16.21	Orange pekat (Fukosantin)	(5:5) N-Heksan:etil asetat
46	16.39	Orange pekat (Fukosantin)	(5:5) N-Heksan:etil asetat
47	16.48	Orange pekat (Fukosantin)	(5:5) N-Heksan:etil asetat
48	17.03	Orange pekat (Fukosantin)	(5:5) N-Heksan:etil asetat
49	17.20	Orange pekat (Fukosantin)	(5:5) N-Heksan:etil asetat
50	17.36	Orange pekat (Fukosantin)	(4:6) N-Heksan:etil asetat
51	17.47	Orange pekat (Fukosantin)	(4:6) N-Heksan:etil asetat
52	18.03	Orange pekat (Fukosantin)	(4:6) N-Heksan:etil asetat
53	18.15	Orange pekat (Fukosantin)	(4:6) N-Heksan:etil asetat
54	18.27	Orange	(4:6) N-Heksan:etil asetat
55	18.39	Orange bening	(4:6) N-Heksan:etil asetat
56	18.53	Bening kekuningan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
57	19.07	Bening kekuningan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
58	19.17	Bening kekuningan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
59	19.29	Bening kekuningan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
60	19.39	Bening kekuningan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
61	19.49	Bening kekuningan	(4:6) N-Heksan:etil asetat
62	20.02	Bening kekuningan	(4:6) N-Heksan:etil asetat



Lampiran 5. Tabel Hasil Perhitungan Nilai Rf pada KLT

Ulangan	Jarak tempuh senyawa (cm)	Jarak tempuh pelarut (cm)	Rf
1	1,8	3,5	0,51
2	1,6	3,5	0,46
3	1,7	3,5	0,49

Perhitungan:

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut (fase gerak)}} = \frac{Y}{X}$$

• Ulangan 1

$$\text{Rf} = \frac{1,8}{3,5} = 0,51$$

• Ulangan 2

$$\text{Rf} = \frac{1,6}{3,5} = 0,46$$

• Ulangan 3

$$\text{Rf} = \frac{1,7}{3,5} = 0,49$$

$$\text{nilai rata-rata Rf} = \frac{0,51+0,46+0,49}{3} = 0,49$$



Lampiran 6. Data Absorbansi dan Kadar Pigmen• **Data Absorbansi**

Jenis Pigmen	Pengenceran	Absorbansi	Kadar pigmen
Klorofil b	10 ⁴	0,144	28000 µg
		1,984	



Lampiran 7. Perhitungan Kadar Pigmen

Hukum Lambert Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan:

A= absorbansi

ϵ = absorbansivitas molar

b=lebar bagian dalam kuvet

c= konsentrasi (molar)

Kadar Klorofil b

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$0,144 = 46,61 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,144}{46,61 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$= 3,09 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

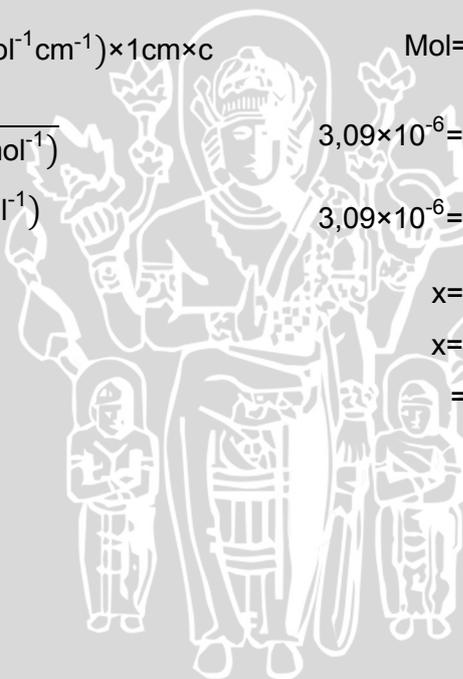
$$3,09 \times 10^{-6} = \frac{x}{907,49} \times \frac{1000}{100}$$

$$3,09 \times 10^{-6} = \frac{x}{9074,9}$$

$$x = 9074,9 \times 3,09 \times 10^{-7}$$

$$x = 0,028 \text{ gram}$$

$$= 28000 \mu\text{g}$$



Lampiran 8. Perhitungan Pengenceran Uji BSLT

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Dimana:

C_1 =Konsentrasi stok

C_2 =Konsentrasi yang diinginkan

V_1 = Volume larutan stok

V_2 =volume total yang dibuat

Larutan Stok

$$\begin{aligned} \frac{500 \mu\text{g}}{1 \text{ ml}} &= \frac{28000 \mu\text{g}}{x} \\ x &= \frac{28000 \mu\text{g/ml}}{500 \mu\text{g}} \\ &= 56 \text{ ml} \end{aligned}$$

Pengenceran

- Konsentrasi 250 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} C_1V_1=C_2V_2 &\longrightarrow 500 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times v_1 = 250 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 30\text{ml} \\ &= \frac{7500 \mu\text{g}}{500 \mu\text{g/ml}} \\ &= 15 \text{ ml} \end{aligned}$$

Artinya, 15 ml dari konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ ditambahkan 15 ml air laut

- Konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} C_1V_1=C_2V_2 &\longrightarrow 500 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times v_1 = 200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 30\text{ml} \\ &= \frac{6000 \mu\text{g}}{500 \mu\text{g/ml}} \\ &= 12 \text{ ml} \end{aligned}$$

Artinya, 12 ml dari konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ ditambahkan 18 ml air laut

- Konsentrasi 150 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} C_1V_1=C_2V_2 &\longrightarrow 500 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times v_1 = 150 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 30\text{ml} \\ &= \frac{4500 \mu\text{g}}{500 \mu\text{g/ml}} \\ &= 9 \text{ ml} \end{aligned}$$

Artinya, 9 ml dari konsentrasi 500 µg/ml ditambahkan 21 ml air laut

➤ Konsentrasi 100 µg/ml

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 & \longrightarrow & \quad 500 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times v_1 = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 30\text{ml} \\ & & & \quad = \frac{3000 \mu\text{g}}{500 \mu\text{g/ml}} \\ & & & \quad = 6 \text{ ml} \end{aligned}$$

Artinya, 6 ml dari konsentrasi 500 µg/ml ditambahkan 24 ml air laut

➤ Konsentrasi 50 µg/ml

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 & \longrightarrow & \quad 500 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times v_1 = 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 30\text{ml} \\ & & & \quad = \frac{1500 \mu\text{g}}{500 \mu\text{g/ml}} \\ & & & \quad = 3 \text{ ml} \end{aligned}$$

Artinya, 3 ml dari konsentrasi 500 µg/ml ditambahkan 21 ml air laut

Lampiran 9. Uji BSLT

- Tabel % Probit

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

- Tabel Kematian *Artemia salina*

Konsentrasi (µg/ml)	Ulangan		
	I	II	III
0	0	0	0
50	0	0	0
100	1	1	0
150	1	2	2
200	2	3	3
250	3	3	4

$$\% \text{ Kematian artemia} = \frac{\text{Jumlah artemia mati}}{\text{jumlah artemia uji}} \times 100\%$$

Log konsentrasi	% Probit
0	-
1,699	-
2	3,52
2,176	4,05
2,301	4,39
2,398	4,56

0 µg/ml: rata-rata %kematian artemia = $\frac{0}{30} \times 100\% = 0$

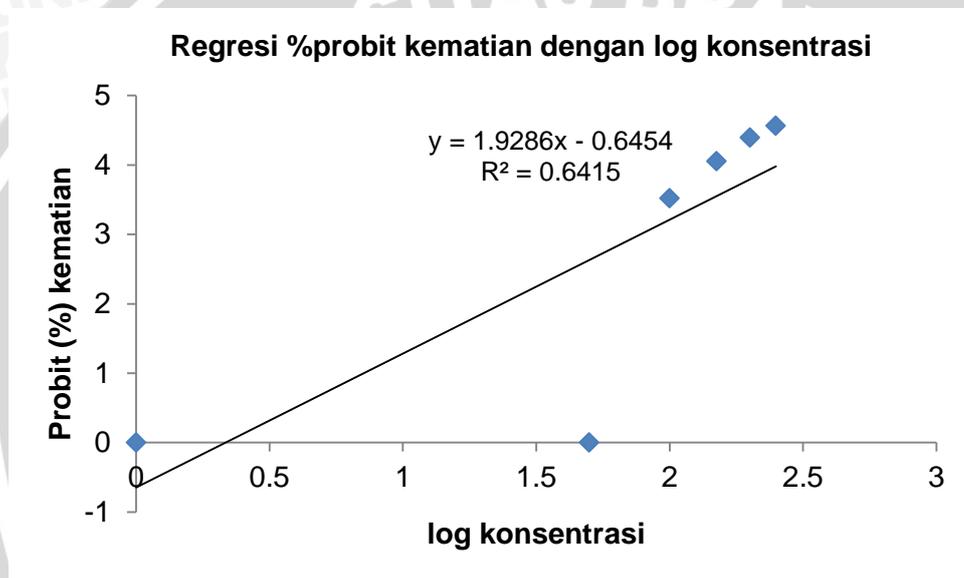
50 µg/ml: rata-rata %kematian artemia = $\frac{0}{30} \times 100\% = 0$

100 µg/ml: rata-rata %kematian artemia = $\frac{2}{30} \times 100\% = 6,7$

150 µg/ml: rata-rata %kematian artemia = $\frac{5}{30} \times 100\% = 17$

200 µg/ml: rata-rata %kematian artemia = $\frac{8}{30} \times 100\% = 26,7$

250 µg/ml: rata-rata %kematian artemia = $\frac{10}{30} \times 100\% = 33,3$



Diperoleh persamaan $y = 1,928x - 0,645$

Dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut (y) sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian hewan uji

$y = 1,928x - 0,645$

$5 = 1,928x - 0,645$

$1,928x = 5 + 0,645$

$1,928x = 5,645$

$x = \frac{5,645}{1,928} = 2,9279$

Antilog dari 2,9279 = 847,03 µg/ml

Lampiran 10. Perhitungan Kadar Rendemen Pigmen

- **Data Rendemen**

Jenis Pigmen	Gram Sampel	Rendemen (%)
Klorofil b	250 gram	0,0112%

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

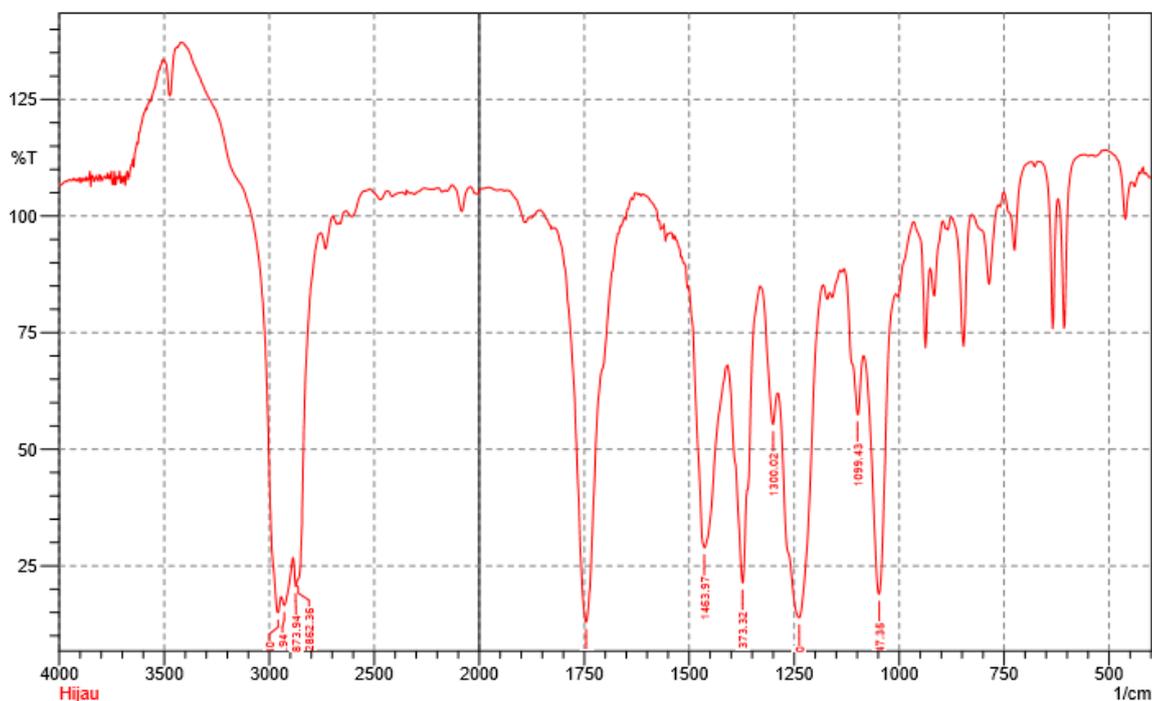
$$\begin{aligned} \text{Rendemen(\%)} &= \frac{0,028 \text{ gram}}{250 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 0,0112 \% \end{aligned}$$



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 11. Hasil Uji FT-IR



	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	1047.35	18.94	57.57	1083.99	1008.77	24.7	15.98
2	1099.43	57.43	18.2	1130.29	1085.92	7.12	2.42
3	1238.3	13.87	59.08	1288.45	1182.36	49.03	34.45
4	1300.02	55.3	12.14	1330.88	1290.38	6.98	1.32
5	1373.32	21.35	54.46	1408.04	1332.81	23.51	14.63
6	1463.97	28.91	49.02	1500.62	1409.96	28.02	17.04
7	1745.58	12.93	84.63	1818.87	1664.57	38.91	37.27
8	2862.36	22.19	1.31	2864.29	2754.35	21.05	0.34
9	2873.94	20.56	3.67	2885.51	2864.29	13.81	0.71
10	2927.94	16.54	3.89	2941.44	2887.44	37.95	2.74
11	2958.8	14.92	7.5	3396.64	2943.37	22.49	2.07

Gugus	Hasil serapan (cm ⁻¹)	Standart serapan (cm ⁻¹)
Alkana C-H	2958,8 & 2927,94	2960-2850
Ulur	1463,97	1470-1430
Aldehyd -CHO	2873,94 & 2862,36	2900-2700
ulur	1745,58	1740-1720
Ester -CO-O	-	1730-1715
ulur	1300,02 & 1238,3	1300-1050
Keton C=O	-	1700-1680
ulur	1047,35 & 1099,43	1300-1050
Alkenes C=C	-	1680-1620



