



REPUBLIK INDONESIA  
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

## SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : LPPM UNIVERSITAS SAM RATULANGI  
Kampus Unsrat, Manado 95115  
INDONESIA

Untuk Invensi dengan Judul : ASAM LEMAK PENTADEKANOAT ALGA LAUT *Halymenia durvillae* SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN PROSES ISOLASINYA

Inventor : Dr. Ir. Grace Sanger, M.Si.  
Prof. Dr. Ir. S.B. Widjanarko, M.App.Sc.  
Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si.  
Prof. Dr. Ir. S. Berhimon, M.App.Sc.

Tanggal Penerimaan : 09 Desember 2016

Nomor Paten : IDP000053431

Tanggal Pemberian : 14 September 2018

Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.  
NIP. 196611181994031001

(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000053431 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL  
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 14 September 2018

(51) Klasifikasi IPC<sup>4</sup> : C 07C 51/00(2006.01), C 08B 37/00(2006.01)

(21) No. Permohonan Paten : P00201608477

(22) Tanggal Penerimaan: 09 Desember 2016

(30) Data Prioritas :  
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

(43) Tanggal Pengumuman: 10 November 2017

(56) Dokumen Pembanding:  
Bina Lohita Sari dan rekan, "SkriningFitokimia dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*", *Pharm. Sci. Res.*, Agustus 2015 (vol. 2 No.2)  
WO-A-2011/117547, Rios Laurent et al "Oligosaccharide extracted from *Halymenia durvillaei*, Method for preparing such an oligosaccharide, and cosmetic use of said oligosaccharide",

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :  
LPPM UNIVERSITAS SAM RATULANGI  
Kampus Unsrat, Manado 95115  
INDONESIA

(72) Nama Inventor :  
Dr. Ir. Grace Sanger, M.Si., ID  
Prof. Dr. Ir. S.B. Widjanarko, M.App.Sc., ID  
Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si., ID  
Prof. Dr. Ir. S. Berhimon, M.App.Sc., ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Dra. Farida, M.IPL.

Jumlah Klaim : 2

(54) Judul Invensi : ASAM LEMAK PENTADEKANOAT ALGA LAUT *Halymenia durvillae* SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN PROSES ISOLASINYA

(57) Abstrak :

Invensi ini berhubungan dengan asam lemak pentadekanoat yang diperoleh dari alga laut *Halymenia durvillae* memiliki aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan DPPH, disimpulkan bahwa isolat murni fraksi n-heksana *H. durvillae* adalah asam lemak pentadekanoat (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) dengan berat molekul m/z 242 dan aktivitas antioksidan isolat murni sebesar IC<sub>50</sub> 800 ppm. Invensi ini juga berhubungan dengan proses isolasi asam lemak pentadekanoat alga laut *Halymenia durvillae* melalui tahapan maserasi, fraksinasi, kromatografi, karakterisasi dan interpretasi.



## Deskripsi

### ASAM LEMAK PENTADEKANOAT ALGA LAUT *Halimenia durvilae* SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN METODE EKSTRAKSINYA

5

#### Bidang Teknik

Invensi ini berhubungan dengan isolasi asam lemak pentadekanoat alga laut *Halimenia durvilae* sebagai antioksidan.

#### 10 Latar belakang

Alga laut adalah sumber yang kaya akan polisakarida, mineral, protein dan vitamin, serta mempunyai aktifitas antioksidan yang sangat bermanfaat bagi manusia sebagai makanan dan suplemen obat (Kumar et al., 2008). Alga laut mengandung *phloroglucinol* fenolik yang merupakan antioksidan yang baik, karena senyawa fenolik bersifat sebagai peredam spesies oksigen reaktif, pengkelat logam, modulator enzim dan mencegah peroksidasi lipida (Rodrigo and Bosco, 2006). Polifenol adalah senyawa pereduksi yang bersama-sama senyawa pereduksi lain seperti vitamin C, E, dan karotenoid bersifat antioksidan yang dapat melindungi jaringan tubuh melawan *oksidative stress* (Tapiero et al., 2002).

Menurut Armitage et al. (2002) bahwa senyawa biofungsional dapat diambil dari ekstraksi rempah-rempah dan herbal. Untuk mengekstrak senyawa-senyawa biofungsional yang terkandung dalam jaringan tanaman, sebaiknya digunakan pelarut yang berbeda-beda tingkat polaritasnya. Jenis pelarut, suhu dan pH dapat menentukan hasil ekstraksi, aktifitas dan stabilitas bioaktif.

Antioksidan sintetik seperti BHA (*Butylated hydroxyanisol*), BHT (*butylated hydroxy toluena*) dan TBHQ (*Tert-butyl hydroxyquinon*) yang digunakan secara komersial saat ini, telah dibatasi karena diduga bersifat karsinogenik. Oleh karena itu, bahan tambahan pangan alami lebih dianjurkan untuk digunakan sebagai alternatif (Huang and Wang, 2004).

Alga laut kaya akan asam lemak yang berfungsi menghalangi pertumbuhan penyebaran sistemik kanker payudara (Deveri *et al.*, 2001) sebagai anti inflamasi, anti thrombotik dan anti-arrhythmik respons (Kumari *et al.*, 2013 dan Gillies *et al.* 2011). Mohammed *et al.* (2004) melaporkan bahwa asam oleat memiliki pengaruh melawan komplikasi kardiovaskular dan diabetes karena tingkat glutathion (GSH), total lipid, dan triasilgliserol (TAG) dapat terkontrol. Didalam diabetes hiperlipidemik asam lemak dapat melindungi jaringan dari resiko thrombosis (Alturfan *et al.*, 2002).

Invensi tentang isolasi zat murni asam lemak pentadekanoat dari alga laut *H.durvilae* menggunakan kromatografi kolom dengan silika gel 60 F<sub>254</sub> dan eluen *n*-heksana-aseton. Isolat murni asam pentadekanoat yang diperoleh, dievaluasi aktifitas antioksidan dengan menggunakan radikal DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

Invensi sebelumnya yang berkaitan dengan ekstraksi asam lemak dari alga adalah paten CN 102977993 A, US8815570 B2 dan WO 2014134411 A1. Semua invensi tersebut menggunakan alga yang telah dikeringkan. Invensi yang diajukan ini menggunakan alga tanpa pengeringan (segar). Invensi lain pada paten US 5508033a adalah ekstrak alga laut yang mempunyai aktifitas antioksidan terhadap radikal superoksida diperoleh melalui ekstraksi menggunakan senyawa polar dengan pengontrolan pH. Sedangkan asam lemak yang dihasilkan dari invensi yang diajukan ini dari algae *H. durvilae* diperoleh dengan menggunakan pelarut metanol-air tanpa pengontrolan pH. Isolasi senyawa alga laut untuk *Halimena* dari spesies yang lain yaitu *Halymenia porphyroides* diperoleh senyawa dengan rumus N-[2,3,4-trihidroksil-1-(hidroksimetil) oktadesil] siklo nonadekana pentanamida dengan komposisi C 74,19%; H 12,31%; N 2,01%; O 11,49% dengan berat molekul 696,148 (Beno *et al.*, 1990. *H. durvilae* mempunyai aktifitas hipotensif dan diuretik (Lakshmi *et al.*, 2006).

Asam lemak pentadekanoat  $\beta$ -glukosida juga telah diisolasi dari ekstrak *n*-heksana *Clerodendrum inerme* (Pandey *et.al.*, 2006). Telah ditemukan juga aktifitas antioksidan TEAC (*Trolox*

*equivalent antioxidant Capacity*) dan FRAP (*Ferric Reducing antioxidant power*) ekstrak metanol alga laut *H.durvilae* masing-masing sebesar  $1,67 \pm 0,04 \text{ mM.mg}^{-1}$  dan  $182,29 \pm 13,35 \text{ } \mu\text{mol.mg}^{-1}$  ekstrak kering (Matanjudin *et al.*, 2007). *H. durvilae* mengandung spingosin (Muranidhar *et al.*, 2003) merupakan sumber Yodium yang tinggi 0,255% dengan LD<sub>50</sub> 119,1489  $\pm 4,9873 \text{ g/kg}$  pada tikus dan telah diformulasi menjadi tablet (Lakshmi *et al.*, 2006). Oleh karena itu, hasil isolasi asam lemak pentadekanoat dari alga *H. durvilae* merupakan invensi baru yang dapat dijadikan sebagai antioksidan.

### Ringkasan

Alga laut *H.durvilae* segar diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol 70% (metanol-air). Ekstrak metanol 70% kemudian difraksinasi menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan air. Ekstrak dan fraksi yang diperoleh diukur rendemen, kadar total fenol, aktifitas antioksidan peredam radikal DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion. Dari hasil fraksinasi ini diperoleh bahwa fraksi n-heksana mempunyai rendemen, kadar total fenol dan aktifitas pengkelat ion tertinggi

Proses isolasi dan pemurnian dilakukan dari fraksi n-heksana *H.durvilae* sebanyak 789,4 mg menggunakan kromatografi kolom. Kemurnian senyawa hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dan keberadaan senyawa antioksidan dideteksi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen n-heksana-aseton. Deteksi noda pada kromatogram diamati di bawah lampu UV 254 dan 365 nm. Isolat murni yang diperoleh dari hasil pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan eluen n-heksana-aseton. Isolat murni diukur aktifitas antioksidan dan dikarakterisasi dengan menggunakan NMR (Nuclear magnetic Resonance) merk JEOL tipe ECA-500 MHz, FTIR (Fourier Transform Infra Red) merk IR Prestige-21 SHIMADZU, dan ESMS (Electrospray Mass Spectrofotometer) merk WATERS tipe UPLC.MS/MS TQD.

### Uraian Lengkap

Invensi ini dimulai dengan menyiapkan *H. Durvilae*. Alga segar ini sebanyak 18 kg dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir, kemudian diblender selanjutnya dimaserasi menggunakan metanol 70% dengan perbandingan 1:2 (b/v) selama semalam. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali dengan cara yang sama, dengan menggunakan metanol yang baru. Maseratnya ditampung, kemudian difiltrasi dengan kertas saring Whatman no.1. Filtrat dikumpulkan kemudian dievaporasi dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* (40<sup>0</sup>C) hingga didapatkan ekstrak metanol 70% alga laut. Kemudian ekstrak kental yang diperoleh dilarutkan dalam aquades setelah itu difraksinasi secara bertingkat atau berkesinambungan dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut *n*-heksana sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana (bagian atas) dan fraksi air (bagian bawah). Selanjutnya fraksi air difraksinasi dengan kloroform, sehingga diperoleh fraksi kloroform dan fraksi air. Fraksi-fraksi hasil fraksinasi (*n*-heksana, kloroform dan air) diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40°C. Kemudian semua ekstrak dan fraksi alga laut dianalisis kadar total fenol, aktifitas antioksidan peredam radikal DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion. Fraksi *n*-heksana (FH) sebanyak 789,4 mg kemudian diisolasi dengan menggunakan 4 (empat) tahap pemisahan/pemurnian dengan kromatografi kolom. Setiap tahap pemurnian dalam kromatografi kolom, sampel terlebih dahulu diimprknasi dengan cara melarutkannya dengan *n*-heksana kemudian ditambahkan silika gel secukupnya sehingga terbentuk gumpalan lembut.

Pemurnian dengan kolom kromatografi pertama dilakukan pada Fraksi *n*-heksana (FH). Fraksi *n*-heksana (FH) sebanyak 789,4 mg terlebih dahulu diimprknasi kemudian dimasukkan ke dalam kromatografi kolom berdiameter 1,8 cm yang telah diisi dengan silika gel sebanyak 1,57 g. Hasil pemisahan dalam kromatografi kolom ini dengan menggunakan eluen *n*-heksana-aseton, diperoleh 16 fraksi (FH-1 s/d FH-16), dimana massa terbanyak terdapat

pada fraksi FH-3 yaitu sebesar 458,9 mg. Fraksi ini kemudian di pisahkan menggunakan KLT, kromatogram hasil KLT kemudian disemprot dengan DPPH 0,05% dan noda yang dihasilkan berwarna kuning. Hal ini mengindikasikan bahwa fraksi ini mengandung  
5 senyawa antioksidan. Oleh karena itu, untuk pemurnian dengan kromatografi kolom ke 2 menggunakan fraksi FH-3.

Fraksi FH-3 sebanyak 458,9 mg terlebih dahulu diimprknasi kemudian dimasukkan dalam kromatografi kolom berdiameter 1,8 cm, yang telah diisi silika gel sebanyak 1,2 g. Hasil pemisahan  
10 dengan kromatografi kolom ke 2 ini, dengan menggunakan eluen n-heksana-aseton diperoleh 21 fraksi (FH-3-1 s/d FH-3-21). Fraksi ini kemudian dipisahkan menggunakan KLT. Kromatogram hasil KLT setelah disemprot dengan DPPH 0,05%, semua fraksi terbentuk noda berwarna kuning. Fraksi FH-3-1 s/d FH-3-5 menunjukkan warna  
15 kuning yang lebih kuat, berarti fraksi-fraksi ini mempunyai aktifitas antioksidan yang tinggi. Pemurnian dengan kromatografi kolom ke 3 dan 4 dilakukan pada fraksi FH-3-2 dan FH-3-3 karena massanya besar.

Fraksi fH-3-2 dengan massa 179 mg terlebih dahulu  
20 diimprknasi kemudian dimasukkan dalam kromatografi kolom berdiameter 0,5 cm yang telah diisi silika gel sebanyak 1 g, Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom ke 3 ini menggunakan eluen n-heksana-aseton, diperoleh 21 fraksi (FH-3-2-1 s/d FH-3-2-21), selanjutnya fraksi ini dipisahkan menggunakan KLT. Noda  
25 pada kromatogram setelah diamati di bawah lampu UV 254 dan 365 nm, menunjukkan senyawa murni terdapat pada fraksi FH-3-2-5 dengan massa 5,7 mg.

Pemurnian dengan kromatografi kolom ke 4 dilakukan pada Fraksi FH-3-3. Fraksi FH-3-3 dengan massa 179,2 mg terlebih  
30 dahulu diimprknasi kemudian dimasukkan dalam kromatografi kolom berdiameter 0,5 cm yang telah diisi silika gel 736 mg. Hasil pemurnian dengan kromatografi kolom ini dengan menggunakan eluen n-heksana-aseton diperoleh 21 fraksi (FH-3-3-1 s/d FH-3-3-21). Kemudian pemisahan dengan KLT dilakukan pada fraksi yang  
35 mempunyai massa yang besar yaitu pada FH-3-3-1 s/d FH-3-3-9.

Noda pada kromatogram setelah diamati di bawah lampu UV 254 dan 365 nm, menunjukkan senyawa murni terdapat pada fraksi FH-3-3-7, FH-3-3-8 dan FH-3-3-9, dengan massa masing-masing 2,5 mg; 4,3 mg dan 11,5 mg.

5 Hasil pemurnian 4 Tahap dengan Kromatografi kolom setelah dipisahkan menggunakan KLT dan diidentifikasi berdasarkan penampakan noda dan penyemprotan larutan DPPH 0,05%, maka diperoleh bahwa fraksi yang menunjukkan terdapat senyawa murni dan mempunyai senyawa antioksidan yaitu FH-3-2-5, FH-3-3-7, FH-  
10 3-3-8 dan FH-3-3-9. Fraksi yang dapat diidentifikasi struktur senyawa murni adalah FH-3-3-9 (isolat fraksi n-heksana), karena massanya cukup (11,5 mg) untuk dikarakterisasi struktur senyawa dengan FTIR, ESMS dan NMR dan diuji aktifitas antioksidan.

Isolat murni FH-3-3-9 berupa padatan amorf berwarna putih  
15 dilarutkan dalam kloroform, kemudian dikarakterisasi dengan menggunakan NMR, FTIR, dan ESMS. Berdasarkan hasil interpretasi terhadap spektrum C-NMR, H-NMR, DEPT 135<sup>0</sup>, HMQC dan HMBC, FTIR dan ESMS menunjukkan bahwa isolat murni fraksi n-heksana *H.durvilae* (FH-3-3-9) adalah asam lemak pentadekanoat (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>),  
20 dengan berat molekul m/z 242.

Isolat murni fraksi FH-3-3-9 diuji aktifitas antioksidan. Fraksi FH-3-3-9 ini kemudian dipisahkan dengan KLT menggunakan eluen n-heksana aseton. Kromatogram hasil KLT setelah disemprot dengan DPPH 0,05% dalam metanol menghasilkan noda yang berwarna  
25 kuning, hal ini mengindikasikan bahwa fraksi ini terbukti mengandung senyawa antioksidan. Hasil analisis aktifitas antioksidan peredam radikal DPPH menunjukkan bahwa isolat murni fraksi n-heksana *H.durvilae* (FH-3-3-9) memiliki aktifitas antioksidan IC<sub>50</sub> 800 ppm.

30

35



**Klaim**

1. Asam lemak pentadekanoat yang diekstrak dari alga laut *Halimena durvilae* sebagai antioksidan.
2. Asam lemak pentadekanoat seperti dalam klaim 1 diekstrak  
5 melalui tahap-tahap sebagai berikut:
  - a. mengekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol 70%.
  - b. fraksinasi hasil ekstrak metanol 70% dengan menggunakan n-heksana, kloroform dan air.
  - 10 c. Fraksi n-heksana (FH) dimurnikan/diisolasi dengan menggunakan kromatografi kolom.
3. Asam lemak pentadekanoat alga *H. durvilae* dari fraksi n-heksana yang diperoleh melalui tahap-tahap yang dinyatakan dalam klaim 2 memiliki aktivitas antioksidan sebesar  $IC_{50}$   
15 800 ppm.

**Abstrak.****ASAM LEMAK PENTADEKANOAT ALGA LAUT *Halimena durvilae* SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN METODE EKSTRAKSINYA**

5

Invensi ini berkaitan dengan asam lemak pentadekanoat alga laut *Halimena durvilae* yang berfungsi sebagai antioksidan. Tahap-tahap untuk memperoleh asam lemak pentadekanoat adalah dengan metoda ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan metanol 70%. Hasil ekstrak methanol 70% alga dilakukan fraksinasi secara berkesinambungan dengan menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan air. Hasil fraksi n-heksana alga dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom sebanyak 4 tahap dengan silika gel 60 F<sub>254</sub> dan eluent n-heksana-aseton. Untuk mendeteksi kemurnian senyawa, semua fraksi hasil pemurnian dengan kromatografi kolom dielusidasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatogram hasil KLT diamati di bawah lampu UV 254 dan 365 nm. Isolat murni fraksi n-heksana yang diperoleh kemudian di karakterisasi menggunakan NMR, FTIR dan ESMS. Berdasarkan hasil interpretasi terhadap spektrum C-NMR, H-NMR, DEPT 135<sup>0</sup>, HMQC dan HMBC, FTIR dan ESMS dan pengujian aktifitas antioksidan peredam radikal DPPH disimpulkan bahwa isolat murni fraksi n-heksana *H.durvilae* adalah asam lemak pentadekanoat (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) dengan berat molekul m/z 242 dan aktifitas antioksidan isolat murni sebesar IC<sub>50</sub> 800 ppm.

10

15

20

25